



**UNIVERSITÉ  
DE REIMS  
CHAMPAGNE-ARDENNE**

**UFR DE MEDECINE**

ANNEE 2008



**ISBM**

THÈSE N°

## **THÈSE DE COTUTELLE**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

**DOCTEUR**

de L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE (FRANCE)  
et de L'UNIVERSITÉ DE MONASTIR (TUNISIE)

**Discipline** : Immunologie et Biotechnologie

Soutenue publiquement le 14 Février 2008

Par

**Wael MAHMOUD**

(Né le 04/07/1978 à Bizerte - TUNISIE)

### ***DEVIATION DE LA REPONSE IMMUNE A VISEE D'IMMUNO- INTERVENTION A L'AIDE DE PROTEINES RECOMBINANTES HETEROFUNCTIONNELLES***

Laboratoire d'Immunologie. Physiopathologie Dysimmunitaire et Infectieuse Humaine. EA  
3798 – Pôle Biomolécules. IFR 53 Biomolécules (Reims - FRANCE)  
Laboratoire de Pharmacognosie / Biologie Moléculaire – 99/UR/07-03 –  
Faculté de Pharmacie (Monastir- TUNISIE)

#### Membres du Jury

Monsieur le Professeur Michel PLUOT  
Monsieur le Professeur Daniel BATY  
Monsieur le Professeur Boulbaba SELMI  
Madame le Professeur Leïla CHEKIR-GHEDIRA  
Monsieur le Professeur Kamel GHEDIRA  
Monsieur le Professeur Jacques COHEN

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Co-Directeur de Thèse  
Directeur de Thèse

*A mon père, à ma mère*

*A Ahlem*

*A Nesrine*

*A Ramy*

*A toute ma grande famille*

## REMERCIEMENTS

PRESENTATION DU THEME DE RECHERCHE

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION .....	1
<i>I. LE SYSTEME IMMUNITAIRE : Description de certains éléments et leurs utilisations en thérapeutique</i> .....	2
I.1. Rôle du système immunitaire.....	2
I.2. Le système du complément.....	2
I.2.1. Les voies d'activation du complément.....	3
I.2.2. Régulation du système du complément .....	4
I.2.3. Applications de l'activation du complément en thérapeutique.....	4
I.3. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et ses applications en thérapeutique .....	6
<i>II. Déviation du système immunitaire</i> .....	7
II.1. La vaccination.....	7
II.1.1. Exemple de la vaccination antitétanique .....	8
II.1.2. Caractérisation et applications de l'entité immunogène de la toxine tétanique.....	10
II.2. PREVENTION DE L'ALLO-IMMUNISATION RHESUS-D FOETO-MATERNELLE .....	15
II.2.1. Le système Rhésus.....	15
II.2.2. L'allo-immunisation anti-RhD .....	19
II.2.3. Les différents protocoles de prévention de l'allo-immunisation Rhésus D.....	20
II.2.4. Evaluation de l'efficacité des différents protocoles de prévention.....	22
II.2.5. Risques et effets indésirables cliniques et biologiques des Immunoglobulines anti-RhD .....	25
II.2.6. Perspectives .....	27
II.3. APPROCHES SPECIFIQUES POUR LE TRAITEMENT DES TUMEURS.....	30
II.3.1. Introduction.....	30
II.3.2. Les mécanismes d'échappement de la cellule tumorale au système immunitaire.....	34
II.3.3. Les traitements.....	36
<i>III. Systèmes de ciblage cellulaire</i> .....	44
III.1. Structure, spécificité et différentes classes d'anticorps.....	44
III.2. Ingénierie des anticorps.....	48
III.2.1. Anticorps recombinants.....	48
III.2.2. Fragments d'anticorps recombinants.....	48
<i>IV. Les différents systèmes de multimérisation protéique</i> .....	56
IV.1. Théorie de la multivalence .....	56
IV.2. Intérêts de l'utilisation de systèmes multivalents multifonctionnels en thérapie humaine .....	57
IV.3. Cahier des charges d'un bon système multimérisant .....	58
IV.4. Systèmes biologiques multivalents naturels et leurs applications.....	59
IV.4.1. Les immunoglobulines bivalentes.....	59
IV.4.2. Les immunoglobulines de valence supérieure .....	60
IV.4.3. Les systèmes multimérisants de type « Leucine zipper » à interactions interchaînes hydrophobes .....	60
IV.4.4. La vérotoxine : système multimérisant décavalent .....	64
IV.4.5. Le système multimérisant utilisant la partie C-terminale de la <i>C4-Binding Protein</i> (C4BP).....	65

MATERIELS ET METHODES .....	73
<i>I. PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES HOMOMULTIMERIQUES ET HETEROMULTIMERIQUES</i> .....	74
I.1. Amplification des ADN codant les protéines d'intérêt.....	74
I.1.1. Amplification des parties C-terminales des chaînes $\alpha$ et $\beta$ de la C4BP .....	74
I.1.2. Clonage de l'ADN codant le fragment C de la toxine tétanique (TTFgC).....	76
I.1.3. Clonage de l'ADN codant le scFv anti-Glycophorine A (GPA) .....	77
I.1.4. Isolement et clonage des régions codant les chaînes lourdes et légères de l'anticorps anti-Rhésus D .....	78
I.1.5. Clonage de l'ADN codant le VHH anti-antigène carcino-embryonnaire (CEA) .....	78
I.2. Construction des vecteurs d'expressions protéiques.....	79
I.2.1. Construction du vecteur pEFIRES / TTFgC - C4BP $\alpha$ .....	79
I.2.2. Sélection des clones bactériens .....	83
I.2.3. Transfection des plasmides en cellules eucaryotes .....	83
I.2.4. Sélection des clones d'intérêt.....	84
I.2.5. Caractérisation des différentes formes moléculaires produites et détermination des valences .....	86
I.2.6. Quantification des protéines par ELISA .....	87
I.2.7. Purification des protéines par chromatographie d'exclusion.....	88
<i>II. Analyse de la FIXATION DES PROTEINES PRODUITES A LEURS CIBLES</i> .....	89
II.1. Héماغglutination directe.....	89
II.1.1. Protéines homomultimériques et hétéromultimériques contenant le scFv anti-GPA ....	89
II.1.2. Protéines homomultimériques et hétéromultimériques contenant le scFv anti-RhD ....	89
II.2. Cytométrie de flux .....	89
II.2.1. Sur globules rouges.....	90
II.2.2. Sur cellules cancéreuses .....	90
II.3. Test de compétition de fixation sur cellules cancéreuses .....	91
<i>III. Analyse, in vitro, de L'ACTIVATION DU COMPLEMENT PAR LES PROTEINES HETEROMULTIMERIQUES</i> .....	92
III.1. Analyse par cytométrie de flux et microscopie à fluorescence du dépôt de C3b et C4d du complément sur GR.....	92
III.2. Test hémolytique sur GR avec sérum autologue.....	92
III.3. Analyse par cytométrie de flux et microscopie à fluorescence du dépôt de C3b et C4d du complément sur cellules LS174T .....	93
<i>IV. Analyse de la fixation in vivo des chimères sur des tumeurs provoquées chez les souris NUDE</i> .....	94
IV.1. Fixation des chimères sur des coupes de tumeurs.....	94
IV.2. Fixation aux tumeurs des chimères injectées par voie intraveineuse.....	94
IV.3. Analyse de la biodistribution .....	95
<i>V. Analyse de L'ACTIVITE ANTI-TUMORALE DES CHIMERES chez les souris NUDE</i> .....	96
RESULTATS .....	97
<i>VI. PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES HOMOMULTIMERIQUES ET HETEROMULTIMERIQUES</i> .....	98
VI.1. Criblage des clones exprimant les protéines recombinantes.....	98
VI.2. Analyses structurales des protéines recombinantes .....	98
VI.2.1. Western Blotting .....	98
VI.2.2. Marquage biosynthétique au <sup>35</sup> S et migration des protéines en conditions réductrices .....	101
VI.2.3. Estimation des valences des entités produites en co-transfection.....	102

VI.2.4. Marquage biosynthétique au <sup>35</sup> S et migration des protéines en conditions partiellement de réductrices.....	104
VI.3. Quantification des protéines par ELISA .....	106
VI.4. Purification des protéines par chromatographie d'exclusion .....	106
VII. Analyse de la FIXATION DES PROTEINES PRODUITES sur LEURS CIBLES.....	109
VII.1. Héماغglutination directe des GR par les protéines homomultimériques et hétéromultimériques contenant le scFv anti-GPA.....	109
VII.2. Héماغglutination directe des GR Rh (D) par les protéines homomultimériques et hétéromultimériques contenant le scFv anti-RhD .....	110
VII.3. Analyse quantitative par cytométrie de flux de la fixation des chimères sur cellules .	111
VII.3.1. Cytométrie de flux sur GR.....	111
VII.3.2. Cytométrie de flux sur GR RhD .....	114
VII.3.3. Cytométrie de flux sur cellules LS174T .....	116
VII.3.4. Test de compétition de fixation sur cellules cancéreuses .....	118
VIII. Analyse, in vitro, de L'ACTIVATION DU COMPLEMENT PAR LES PROTEINES HETEROMULTIMERIQUES.....	119
VIII.1. Analyse par cytométrie de flux et microscopie à fluorescence du dépôt de C3b et C4d du complément .....	119
VIII.1.1. Sur globules rouges .....	119
VIII.1.2. Sur globules rouges RhD.....	121
VIII.1.3. Sur cellules LS174T .....	123
VIII.2. Test hémolytique avec sérum autologue .....	125
VIII.2.1. Sur globules rouges .....	125
VIII.2.2. Sur globules rouges RhD.....	127
IX. Analyse de la fixation in vivo, chez les souris NUDE, des chimères sur des tumeurs provoquées.....	128
IX.1. Fixation des chimères sur des coupes de tumeurs.....	128
IX.2. Fixation aux tumeurs des chimères injectées par voie intraveineuse et analyse de la biodistribution .....	129
X. Analyse de L'ACTIVITE ANTI-TUMORALE DES CHIMERES chez les souris NUDE ...	131
DISCUSSION .....	133
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	144
ANNEXE .....	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	161
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	198



## **REMERCIEMENTS**

Je Remercie Monsieur le Professeur Jacques COHEN de m'avoir accueilli dans son laboratoire en me permettant d'acquérir une formation à la recherche scientifique sur une thématique passionnante et de m'avoir toujours indiqué le meilleur chemin à suivre.

Je remercie Monsieur le Professeur Kamel GHEDIRA de m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour ses précieux conseils et son aide constante.

Je remercie Monsieur le Professeur Michel PLUOT qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, ainsi que pour son aide précieuse pour l'analyse de certains résultats.

Je remercie Monsieur le Professeur Daniel BATY d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et de nous avoir gracieusement donné l'ADN codant le VHH anti-CEA.

Je remercie Monsieur le Professeur Boulbaba SELMI d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse

Je remercie Madame le Professeur Leila CHEKIR-GHEDIRA d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie infiniment mes encadrants Béatrice DONVITO-GAY, Marcelle TONYE LIBYH et Thierry TABARY, pour leurs précieux conseils, leur disponibilité et tout l'effort et le temps qu'ils ont consacrés pour réviser ce manuscrit.

Je remercie le Docteur Xavier DERVILLEZ pour sa collaboration, ses précieux conseils et son aide indispensable

Je remercie mes collègues, Nathalie GODIN et Annelise GIMENEZ-MAITRE pour leurs participations à certaines parties de ce travail.

Je remercie mon collègue Aymric KISSERLI pour ses conseils et sa gentillesse.

Je remercie tous les membres du laboratoire d'immunologie, surtout Laurence COUSINA et Pascale PELLETIER pour leur gentillesse et leur disponibilité permanente.

## Présentation du thème de recherche

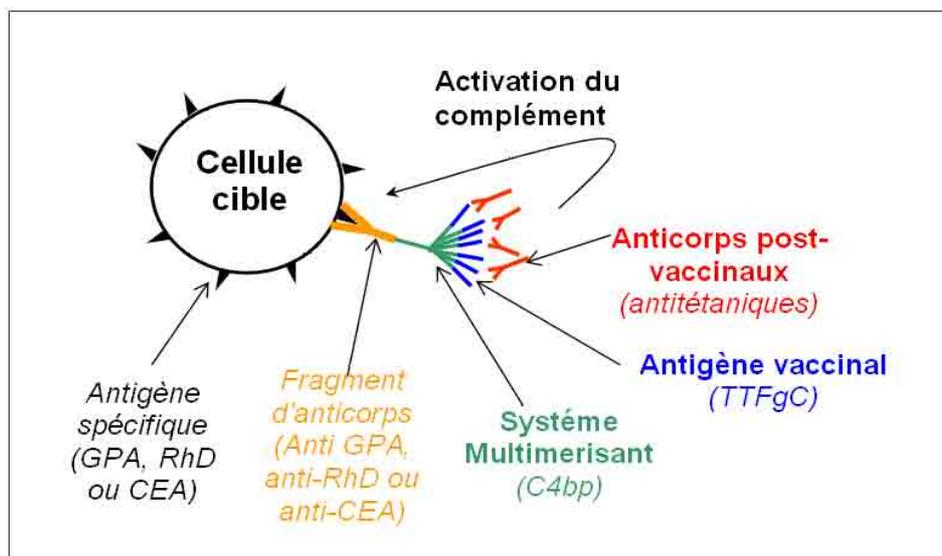
La lyse des cellules par approche de la déviation de la réponse immune est possible grâce à des molécules hétérofonctionnelles qui associent :

- Une fonction de ciblage de la cellule par un anticorps dirigé contre un antigène spécifique de surface.
- Une fonction effectrice immunogène entraînant l'activation des mécanismes biologiques effecteurs comme le système du complément et / ou la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) aboutissant à l'élimination de la cellule cible (schéma).

Grâce à la vaccination, une très grande majorité d'individus disposent d'anticorps post-vaccinaux dans leurs sérums. Aussi nous avons choisi comme fonction effectrice immunogène le fragment C de la toxine tétanique (TTFgC), partie non toxique et immunogène de la molécule.

La *C4 Binding Protein* (C4BP) est une protéine plasmatique humaine. Sa partie C-terminale permet la multimérisation en associant plusieurs fonctions (anticorps, enzyme, antigènes ...).

Nous avons appliqué le système multimérisant de la C4BP au TTFgC et aux anticorps spécifiques des cellules pour obtenir des hétéromultimères capables de se fixer d'une part aux cellules cibles et de déclencher une réponse immune à travers le TTFgC par activation du système du complément et / ou des cellules cytotoxiques aboutissant à la destruction de la cellule.



*Schéma illustrant le concept de la redirection de la réponse immune vaccinale pour le ciblage et la destruction de cellules à l'aide de protéines recombinantes hétérofonctionnelles.*

L'application de ce concept s'est déroulée en quatre étapes :

- 1- Production de protéines recombinantes homomultimériques et hétéromultimériques.
- 2- Développement, *in vitro*, d'un modèle de démonstration-évaluation sur globules rouges par la liaison de protéines recombinantes hétéromultimériques apportant une grappe d'antigènes tétaniques.  
L'efficacité de fixation des anticorps de la réponse immune vaccinale et leur capacité à assurer une lyse dépendante du complément ont été évaluées.
- 3- Développement, *in vitro*, d'un premier modèle de validation de ce concept sur globules rouges Rhésus D dans la perspective d'un outil prophylactique pour la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle.
- 4- Développement, *in vitro* puis *in vivo*, d'un modèle de validation de ce concept par ciblage de cellules cancéreuses en xénogreffe murine et évaluation de l'efficacité destructrice de la déviation de la réponse immune vaccinale vers ces cellules.

## **PARTIE I :**

### **PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES**

La production de protéines recombinantes hétérofonctionnelles nécessite l'utilisation d'un système capable à la fois d'assembler deux entités à activités différentes et de répondre au cahier des charges imposant la prise en compte de plusieurs contraintes liées à son utilisation en thérapie humaine.

La C4BP est une protéine plasmatique humaine régulatrice de l'activation du complément et de structure naturellement multimérique.

Nous avons développé un système multimérisant fondé sur l'utilisation des parties C-terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la C4BP. Ce système présente l'avantage d'être d'ingénierie aisée, dépourvu intrinsèquement d'activité biologique, non immunogène et permettant la synthèse de molécules homomultimériques et hétéromultimériques en assurant un nombre élevé de valences reliées de façon covalente. De plus, la multimérisation permet d'améliorer

les caractéristiques pharmacocinétiques de la molécule en augmentant son avidité et sa durée de vie plasmatique.

## **PARTIE II :**

### **MODELE DE DEMONSTRATION-EVALUATION DU CONCEPT**

Nous décrivons dans cette partie un modèle, *in vitro*, de démonstration-évaluation du concept de la redirection de la réponse immune vaccinale en utilisant des molécules multimériques recombinantes.

Ces hétéromultimères présentent une fonction de fixation au globule rouge (GR) par le biais d'un scFv anti-glycophorine A, antigène abondant à leur surface.

La fonction activatrice du complément est assurée par le TTFgC

Nous avons évalué l'efficacité de la liaison des anticorps de la réponse immune vaccinale et leur capacité à assurer une lyse dépendante du complément.

## **PARTIE III :**

### **MODELE DE VALIDATION DU CONCEPT SUR GR RHESUS D**

Le problème posé par l'allo-immunisation fœto-maternelle rhésus est qu'il s'agit non pas d'obtenir une immunisation ou une potentialisation d'immunisation mais à l'inverse, une absence d'immunisation. Elle doit être assurée par l'élimination sélective des GR RhD fœtaux dans la rate de la mère ou leur destruction dans la circulation en évitant en tout cas leur routage normal vers le foie où les cellules de Kupffer relayeraient vers une réponse immune.

La prévention de l'immunisation rhésus repose encore sur l'utilisation de gammaglobulines polyclonales humaines devant l'incapacité des anticorps monoclonaux à assurer ce rôle. En effet, le routage par les anticorps murins est préférentiel vers le foie tandis qu'ils sont incapables d'assurer la destruction des GR RhD dans la circulation à cause des faibles densité et accessibilité de l'antigène rhésus.

Nous décrivons dans cette partie un modèle de validation du concept sur GR Rhésus D (RhD) dans la perspective d'un outil prophylactique pour la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle.

Le système proposé vise à augmenter le recouvrement des GR RhD par des anticorps grâce à la déviation des Ig antitétaniques attirées sur une grappe d'antigènes tétaniques pour

chaque site de fixation reconnu par le scFv anti-RhD. Une telle amplification devrait permettre la destruction dans la circulation des GR RhD par le système du complément, évitant ainsi toute immunisation.

## **PARTIE VI :**

### **MODELE DE VALIDATION, IN VITRO PUIS IN VIVO, DU CONCEPT SUR CELLULES TUMORALES**

Les applications de l'activation du complément en thérapie sont essentiellement tournées vers l'élimination des cellules cancéreuses. Cependant, la surexpression des protéines régulatrices du complément (CRP) à la surface des cellules tumorales, n'a cessé de présenter un sérieux obstacle à des avancées significatives de cette approche, malgré les dernières démarches proposant l'utilisation d'anticorps neutralisants les CRP en supplément aux anticorps antitumoraux.

Le concept de la redirection de la réponse immune vaccinale, à l'aide de protéines recombinantes hétérofonctionnelles est testé, *in vitro* puis *in vivo* dans cette partie, pour le ciblage et la destruction des cellules tumorales dans un modèle murin de xénogreffe. Notre approche repose sur l'amplification de la réponse immune en augmentant le recouvrement des cellules cancéreuses par les grappes multivalentes d'antigènes tétaniques reliés à un fragment d'anticorps VHH anti-CEA (antigène carcino-embryonnaire).

Nous avons choisi d'analyser l'efficacité de l'activation du complément dans une approche d'inhibition du développement tumoral dans la perspective d'une application thérapeutique pour la prévention des récurrences dues aux cellules métastatiques.

## LISTE DES ABREVIATIONS

AcM	Anticorps monoclonal	Fab	Fragment de fixation de l'antigène
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps	F(ab)' <sub>2</sub>	Fragments d'anticorps divalents
ADEPT	Thérapie par prodrogue activée par des enzymes vectorisées par anticorps	Fc	Fragment cristallisable des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique	FcγR	Récepteur pour les Fc des Ig
AIFM	Allo-immunisation fœto-maternelle	FH	Facteur H
APC	Protéine C activée	FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
BAGE	Antigène tumoral de vessie	Fv	Fragments variables d'anticorps
BCG	Bacille de Calmette et Guérin	GAGE	Antigène tumoral gastrique
BiTEs	Molécules bispécifiques engageants les LT	GR	Globule rouge
C1inh	Inhibiteur du composant 1 du complément	GPA	Glycophorine A
C1q	Composant 1q du complément	HPV	Papillomavirus humains
C3b	sous-unité b du composant 3 du complément	HRF	Inhibiteur membranaire de la lyse réactive
C4d	sous-unité d du composant 4 du complément	Ig	Immunoglobuline(s)
C4BP	Protéine fixant le C4	IL	Interleukine
CAM	Complexe d'attaque membranaire	LISS	Tampon de basse force ionique
CCP	Protéine de contrôle du complément	MAGE	Antigène de mélanome
CDC	Cytotoxicité dépendante du complément	MCP	Cofacteur protéique membranaire
CDR	Région de l'anticorps déterminant la complémentarité	MEM	Milieu essentiel minimum
CEA	Antigène carcino-embryonnaire	NK	Natural killer
CH	Chaîne lourde	PAL	Phosphatase alcaline
CI	Complexe immun	PBS	Tampon phosphate
CL	Chaîne légère	PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	PSF	Pénicilline, streptomycine et fungizone
CPA	Cellule présentatrice d'antigène	PVDF	Polyvinylidène difluoride
CR1	Récepteur de type 1 du complément	RAGE	Antigène tumoral rénal
CRP	Protéines régulatrices de l'activation du complément	RAI	Recherche d'agglutinines irrégulières
CTL	Lymphocyte T cytotoxique	Recab	Anticorps colorimétrique recombinant
DAF	Facteur accélérateur de la dissociation	RH : 1	Antigène Rhésus D positif
DMEM	Milieu essentiel minimum de Dulbecco	RhD	Antigène Rhésus D positif
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate	SAB	Sérum albumine bovine
dsFv	Fragments variables d'anticorps reliés par pont disulfure	scdHLX	Structure de type Leucine Zipper en double hélice
ECL	Chimioluminescence augmentée	scFv	Fragments variables en chaîne unique
EGFR	Récepteurs des facteurs de croissance épidermiques	SCR	Courtes consensus répétées
		scZIP	Chaîne simple de type Leucine Zipper

SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide avec dodécylsulfate de sodium
SVF	Sérum de veau fœtal
TCR	Récepteur du lymphocyte T
TGF	Facteur de croissance tumorale
TIL	Lymphocyte tumoral infiltrant
TNF	Facteur de nécrose tumorale
Tris	Tri-(hydrométhyl)-amino-méthane
TTFgC	Fragment C de la toxine tétanique
TT	Toxine tétanique
VGEF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VH	Domaine variable de la chaîne lourde
VHH	Domaine variable de la chaîne lourde chez les camélidés
VL	Domaine variable de la chaîne légère.

# INTRODUCTION

# ***I. LE SYSTEME IMMUNITAIRE : DESCRIPTION DE CERTAINS ELEMENTS ET LEURS UTILISATIONS EN THERAPEUTIQUE***

## ***I.1. Rôle du système immunitaire***

Le terme immunité (du latin *immunis*, libre ou exempt) s'adressait initialement à la résistance des individus vis-à-vis des infections microbiennes. Cette définition s'est élargie aujourd'hui à l'ensemble des réactions tendant à éliminer des substances non reconnues comme "éléments du soi". Par extension, cette appellation désigne aussi l'ensemble des facteurs humoraux et cellulaires qui protègent l'organisme contre les agressions infectieuses, parasitaires et les proliférations malignes.

Sur la première ligne de défense, le système du complément figure à côté des anticorps, comme l'effecteur principal de la branche humorale du système immunitaire.

## ***I.2. Le système du complément***

C'est un système de défense ancestral, non spécifique, efficace et permanent de l'immunité humorale innée. Sa fonction principale a été traditionnellement considérée comme la reconnaissance et l'élimination des agents pathogènes par lyse directe (Moffitt *et al.*, 1994) et / ou opsonisation préparant la phagocytose (Brown, 1991), (Mueller-Ortiz *et al.*, 2004). Au cours de la dernière décennie, le système du complément a été identifié comme acteur principal dans la régulation de l'immunité. Il participe aux réponses immunes adaptatives en complétant l'action des anticorps (Molina *et al.*, 1996), conditionne la réponse immunitaire par les lymphocytes T (Kaya *et al.*, 2001), influence l'élaboration du répertoire natif des anticorps (Fleming *et al.*, 2002) et régule la tolérance aux auto-antigènes nucléaires (Prodeus *et al.*, 1998), (Carroll, 2000). En plus de ses fonctions immunorégulatrices, de nombreuses études insistent sur les conséquences des aspects pathologiques du complément : ischémie et maladies inflammatoires et auto-immunes (Hollers, 2003).

Les composants du complément sont sériques et inactifs. En présence d'un facteur immunogène ils s'activent en chaîne aboutissant à une explosion exponentielle en quelques secondes du nombre des molécules du complément sur le facteur activateur. Cette action reste brève et localisée. La courte durée de vie des composants du complément lui permet de

reprendre son état inactif au bout de quelques heures. La présence d'une large gamme de protéines régulatrices du complément (CRP: *Complement Regulatory Proteins*) contribue également à éviter son activation excessive.

L'activation de ce système peut se faire selon trois voies : voie classique, voie alterne et voie des lectines.

### I.2.1. Les voies d'activation du complément

L'activation du complément par les trois voies se fait selon différents "déclencheurs" mais elles aboutissent à la formation de C3b, élément charnière du système du complément contribuant à de nombreuses fonctions essentielles de l'immunité innée. La succession des différentes étapes aboutit, par l'assemblage successif de molécules, à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) responsable de la lyse de l'élément ciblé. Elle permet également de générer des molécules nécessaires à l'opsonisation pour la phagocytose (C3b, iC3b et C4b) et au maintien de l'état inflammatoire (C3a, C4a et C5a) (Fig.1).

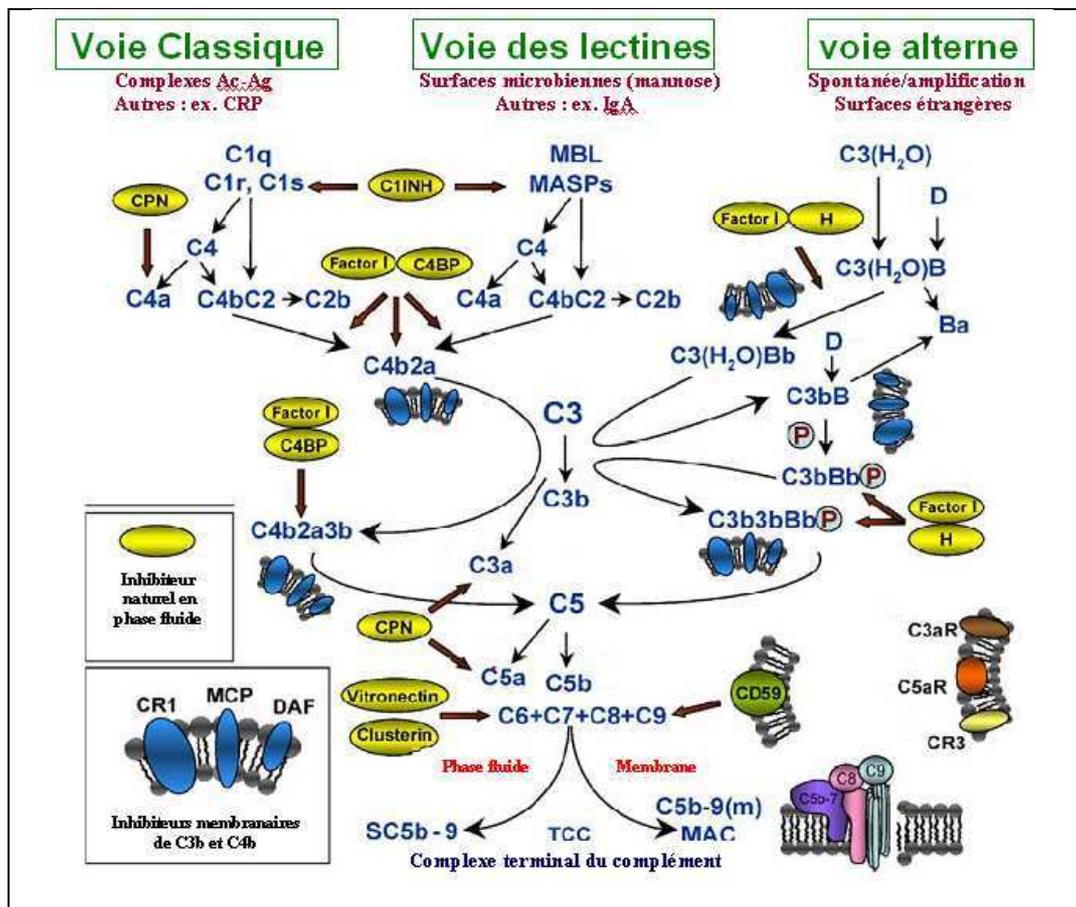


Figure 1. Les voies d'activation du complément. (d'après Mollnes *et al.*, 2006).

## **I.2.2. Régulation du système du complément**

Un mécanisme général de régulation de toutes les voies du complément est l'extrême labilité de ses nombreux constituants qui subissent une inactivation spontanée lorsqu'ils diffusent loin de leurs cibles. De plus, le système du complément comporte une série de CRP membranaires et sériques qui inactivent différents composants du complément tels que l'inhibiteur du C1 (C1inh), la *C4 Binding Protein* (C4BP), le facteur H, le récepteur du complément du type 1 (CR1, CD35), le cofacteur protéique membranaire (MCP, CD46), le facteur accélérateur de la dissociation (DAF, CD55), le facteur I, la protéine S, l'inhibiteur membranaire de la lyse réactive (MIRL, HRF, CD59) et les inhibiteurs des anaphylatoxines.

## **I.2.3. Applications de l'activation du complément en thérapeutique**

L'hyperactivation incontrôlée du complément a été désignée comme la cause d'un certain nombre de maladies inflammatoires et autoimmunes telles que l'arthrite rhumatoïde, l'angioedème héréditaire, le lupus érythémateux systémique (LES), le syndrome de réponse inflammatoire systémique, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, le choc septique et l'artériosclérose (Mollnes *et al.*, 2002).

Les CRP ont fait l'objet de plusieurs études dans le but de les utiliser comme outils thérapeutiques pour le traitement de certaines de ces maladies (FH, CR1, DAF, MCP et CD59 recombinants solubles) (Mollnes *et al.*, 2006).

Plusieurs déficits héréditaires et acquis peuvent également atteindre les composants du complément. Ces déficits se traduisent par des symptômes semblables, en particulier une augmentation importante des maladies associées aux dépôts de complexes immuns, telles que le LES, la glomérulonéphrite et les vascularites (Morgan *et al.*, 1991). Les traitements proposés consistent généralement en l'association d'immunosuppresseurs corticoïdes et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Les personnes atteintes peuvent également présenter des infections bactériennes récurrentes. Dans ce cas les traitements proposés sont essentiellement les antibiotiques.

Quelques approches thérapeutiques substitutives ont montré l'efficacité de l'administration de certains premiers composants de la cascade du complément.

L'un des meilleurs exemples est l'administration de doses de C2 aux patients qui en sont déficients et atteints de LES (Steinsson *et al.*, 1989). Bien que cette approche ait permis d'avoir des résultats encourageants, elle ne constitue pas une démarche généralisée.

Les propriétés du complément ont été par ailleurs détournées pour des applications thérapeutiques non liées aux maladies inflammatoires et auto-immunes.

En dehors de l'application du complément pour le ciblage et la destruction des cellules tumorales, très peu de recherches se sont intéressées à son utilisation contre d'autres types cellulaires. Dans ce cas, les cellules ont essentiellement servi de modèles de faisabilité et d'évaluation du concept du ciblage.

Un rare exemple d'une étude menée par l'équipe de MORGAN BP, a proposé un modèle de ciblage et de lyse complément-dépendante de globules rouges (GR) préalablement biotinylés après fixation, *in vitro*, à la streptavidine immobilisée (Muzykantov *et al.*, 1996). Cette approche a été proposée dans la perspective de développer un outil permettant de délivrer localement des molécules thérapeutiques.

Une récente étude de l'équipe de HOURCADE DE, a montré l'efficacité d'un scFv couplé à la properdine (qui stabilise la C3 convertase de la voie alterne) à entraîner une lyse complément-dépendante des GR (Spitzer *et al.*, 2007). Cette étude ouvre la voie sur l'exploitation d'autres éléments du système du complément pouvant améliorer son efficacité en applications thérapeutiques.

L'utilisation du complément pour la destruction des cellules tumorales s'appuie sur deux avantages. D'une part, la faible taille des composants du complément qui facilite leur pénétration dans le tissu tumoral, et d'autre part leur disponibilité locale car produits, pour un grand nombre d'entre eux, par de nombreuses cellules immunitaires. Le facteur limitant majeur reste l'effet inhibiteur exercé par les CRP très souvent surexprimées par les cellules tumorales. Ce mécanisme leur permet d'échapper à l'attaque du complément.

Plusieurs études ont proposé l'utilisation d'anticorps neutralisants les CRP membranaires en supplément des anticorps antitumoraux. Cette démarche a permis d'avoir des résultats prometteurs sur des modèles animaux (Macor *et al.*, 2007).

### ***1.3. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et ses applications en thérapeutique***

De nombreuses cellules douées d'un potentiel cytotoxique expriment des récepteurs membranaires de la région Fc des anticorps. La liaison spécifique des anticorps à une cellule cible, permet aux cellules cytotoxiques de se mettre au contact de ces dernières et de provoquer leur lyse. Parmi les cellules qui médient l'ADCC, figurent les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules Natural Killer (NK).

Les monocytes et les macrophages possèdent trois types de récepteurs pour les fragments Fc : à haute affinité (FcγRI = CD64), à affinité intermédiaire (FcγRII = CD32) et à faible affinité (FcγRIII = CD16). CD64 est dominant sur les monocytes et CD32 sur les granulocytes. La liaison de l'ensemble de ces cellules à une cible provoque la libération de diverses substances (enzymes lytiques, perforine, granzymes...). De plus, les monocytes activés, les macrophages et les cellules NK sécrètent le facteur de nécrose tumorale (TNF), à effet cytotoxique sur les cellules cibles liées.

Les cellules NK, dénommées ainsi en raison de leur cytotoxicité non spécifique, ne s'attaquent pas aux cellules exprimant un taux normal de molécules de CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I), mais tuent des cellules portant des molécules de CMH faiblement exprimées, absentes ou étrangères; phénomènes fréquemment associés aux infections virales et transformations malignes.

Les cellules NK exercent leur fonction effectrice cytotoxique par apoptose induite par l'interaction avec les récepteurs CD59 des cellules cibles ou par déclenchement du programme cytolytique ADCC suite au relargage de granules lytiques de perforine et de granzyme après interaction de leurs récepteurs CD16 avec les anticorps.

Plusieurs applications de l'ADCC ont été réalisées pour le ciblage et la lyse cellulaire. L'un des exemples les plus récents est celui de la production d'un anticorps monoclonal anti-Rhésus D (RhD) présentant une forte liaison aux récepteurs CD16 et capable d'induire une activation des cellules effectrices NK, avec comme conséquence la lyse des GR RhD (Cortey *et al.*, 2006).

Le ciblage et la destruction des cellules tumorales à l'aide de l'ADCC présente également un domaine d'application très important. L'un des premiers anticorps antitumoraux, le Rituximab, stimule une réaction lytique conduisant à la mort de la cellule suite à la fixation des cellules effectrices (LT cytotoxiques ou cellules NK) à sa portion Fc (Miller *et al.*, 1982).

## II. DEVIATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

### II.1. La vaccination

Le but principal de la vaccination est d'induire la production par l'organisme d'anticorps dirigés contre un élément pathogène spécifique. Il existe quatre types de vaccins selon leur préparation : agents infectieux inactivés, agents vivants atténués, sous-unités d'agents infectieux et toxines inactivées. La vaccination peut être préventive ou thérapeutique.

En France, les vaccinations ont depuis 1950 contribué à diviser par 30 ou plus la mortalité due à certaines maladies infectieuses, comme le montre le tableau (I).

	Diphtérie	Tétanos	Poliomyélite	Tuberculose	Coqueluche
En 1950	50 – 100	20 – 50	5 – 10	300 – 1000	20 – 50
Après 1990	0	0,25 – 0,5	0	13	0,1

Tableau I. Effet de la vaccination sur le nombre de décès en France. Mortalité par million de personnes. Source INSERM.

La liste des vaccins obligatoires en France est dressée contre les maladies suivantes: diphtérie, tétanos, coqueluche, poliomyélite, méningite due au germe *Haemophilus influenzae* de sérotype b, hépatite B, tuberculose (BCG), rougeole, rubéole, oreillons, pneumonie due au pneumocoque et cancer du col de l'utérus causé par le papillomavirus humain (BEH, 2007).

Le niveau du suivi vaccinal ainsi que les listes des agents ciblés est pratiquement identique dans tous les pays développés. Quelques vaccins spécifiques à des régions endémiques sont désormais obligatoires dans certains pays du tiers-monde (fièvre jaune en Afrique et Amérique du sud, méningite à méningocoques dans des pays Africains de la “ceinture méningitique”).

Idéalement, les vaccins ne doivent être inoculés qu'aux personnes en bonne santé car des effets secondaires plus ou moins sévères peuvent être observés avec une fréquence variable (fièvre post-vaccinale). Les accidents, parfois gravissimes, restent exceptionnels (allergie).

Les vaccins peuvent cependant être administrés à des personnes porteuses de maladies chroniques qui sont particulièrement sensibles à certaines infections comme par exemple la vaccination antigrippale des patients porteurs d'affections respiratoires).

Finalement, bien que l'intérêt de la vaccination ne soit pas contestable, certaines études faites à grande échelle et organisées par l'OMS ont démontré par exemple que le vaccin BCG n'avait aucune action préventive sur les formes de tuberculoses pulmonaires adultes (Indian J. Med. Res. 1999) et que l'efficacité du vaccin contre le choléra n'est pas actuellement bien établie (Institut Pasteur).

## **II.1.1. Exemple de la vaccination antitétanique**

### **II.1.1.1. Définition du tétanos**

Les symptômes cliniques du tétanos sont liés à la production d'une neurotoxine très active: la tétanospasmine, lors de la croissance de *Clostridium tetani* (Eisel *et al.*, 1986), (Fairweather *et al.*, 1986). Cette bactérie anaérobie n'envahit pas l'organisme et l'infection bactérienne reste localisée. Le germe du tétanos se trouve partout dans l'environnement (terre, boue, poussière...) et pénètre dans le corps à l'occasion de lésions de la peau. Ces spores sont transformées en bacilles tétaniques dans le tissu nécrosé, sous une pression réduite en oxygène. Le malade ressent des contractures musculaires commençant au niveau de la face (trismus), puis se généralisant à tout l'organisme. En raison de ces contractures, le corps décrit un arc de cercle (opisthotonus), et le malade ressent une douleur intense. La tête et le tronc se renversent en arrière, les bras et les jambes sont en extension. Malgré les soins, le malade décède dans un cas sur deux par asphyxie ou par arrêt cardiaque (Galazka, 1993).

La toxine tétanique diffuse vers son site d'action dans le système nerveux central, grâce à un transport rétrograde le long des nerfs. La toxine tétanique est neurotrope: elle se fixe sur les récepteurs gangliosidiques des terminaisons nerveuses. Une fois fixée au tissu nerveux, elle n'est plus affectée par l'antitoxine tétanique. Elle s'accumule dans le système nerveux central et bloque la libération dans les synapses, de neurotransmetteurs inhibiteurs tels que la glycine et l'acide gamma-aminobutyrique. La toxine tétanique est très toxique ; on estime la dose mortelle pour l'homme à moins de 2,5 ng par kilogramme (Galazka, 1993).

### **II.1.1.2. Immunité induite par l'anatoxine tétanique**

Gaston RAMON fut le premier à démontrer en 1925, que la toxine tétanique qui a subi l'action simultanée du formol et de la chaleur, se transforme en un dérivé inoffensif mais qui conserve intacte son pouvoir vaccinant. Il le nomma anatoxine tétanique.

L'anatoxine tétanique est adsorbée sur des sels d'aluminium (hydroxyde d'aluminium ou phosphate d'aluminium) afin d'accroître son antigénicité. Elle est stable et ne perd pas son potentiel immunogène après plusieurs mois à température ambiante ou après plusieurs semaines à 37°C.

L'immunité envers le tétanos est médiée par les anticorps spécifiques appartenant à la classe des IgG, capables de passer aisément la barrière placentaire et diffuser à travers le système sanguin et les zones extravasculaires. Ils peuvent neutraliser la toxine tétanique dans une plaie infectée.

### **II.1.1.3. Réponse immunitaire après la vaccination**

La protection obtenue avec une seule dose d'anatoxine est faible ou inexistante. Deux à quatre semaines après la seconde injection, le taux moyen d'anticorps antitétaniques dépasse le seuil protecteur minimum de 0,01 UI/ml, bien que le pourcentage de personnes faiblement immunisées «faibles répondeurs » soit encore de 10%. Un an après, le pourcentage d'individus peu immunisés peut atteindre 20% et le titre moyen d'anticorps décroît vers un seuil. Le risque de tétanos est plus élevé pour les enfants dont les mères ont une faible réponse immunitaire. Pour cette raison, il est nécessaire d'administrer une troisième dose d'anatoxine lors d'une deuxième grossesse ou 6 à 12 mois après les deux premières injections. Une troisième dose d'anatoxine induit une très forte production d'antitoxines, avec des titres moyens variant de 1 à 10 UI/ml. Dans ce cas, l'immunité est élevée et de longue durée. Un mois après la troisième injection, le pourcentage de faibles répondeurs est négligeable et les taux protecteurs se maintiennent pendant au moins cinq ans. Après cette troisième dose, chaque injection supplémentaire, espacée d'au moins un an, augmente le taux d'antitoxine et prolonge la durée de l'immunité. L'immunité durera 10 ans après la quatrième injection, et au moins vingt ans après la cinquième (Fig. 2). Chez les enfants, les trois premières doses de vaccin DTC, induisent un titre d'anticorps supérieur au minimum protecteur (> 0,2 UI/ml) (Edwards, 1989), (Pichichero *et al.*, 1986).

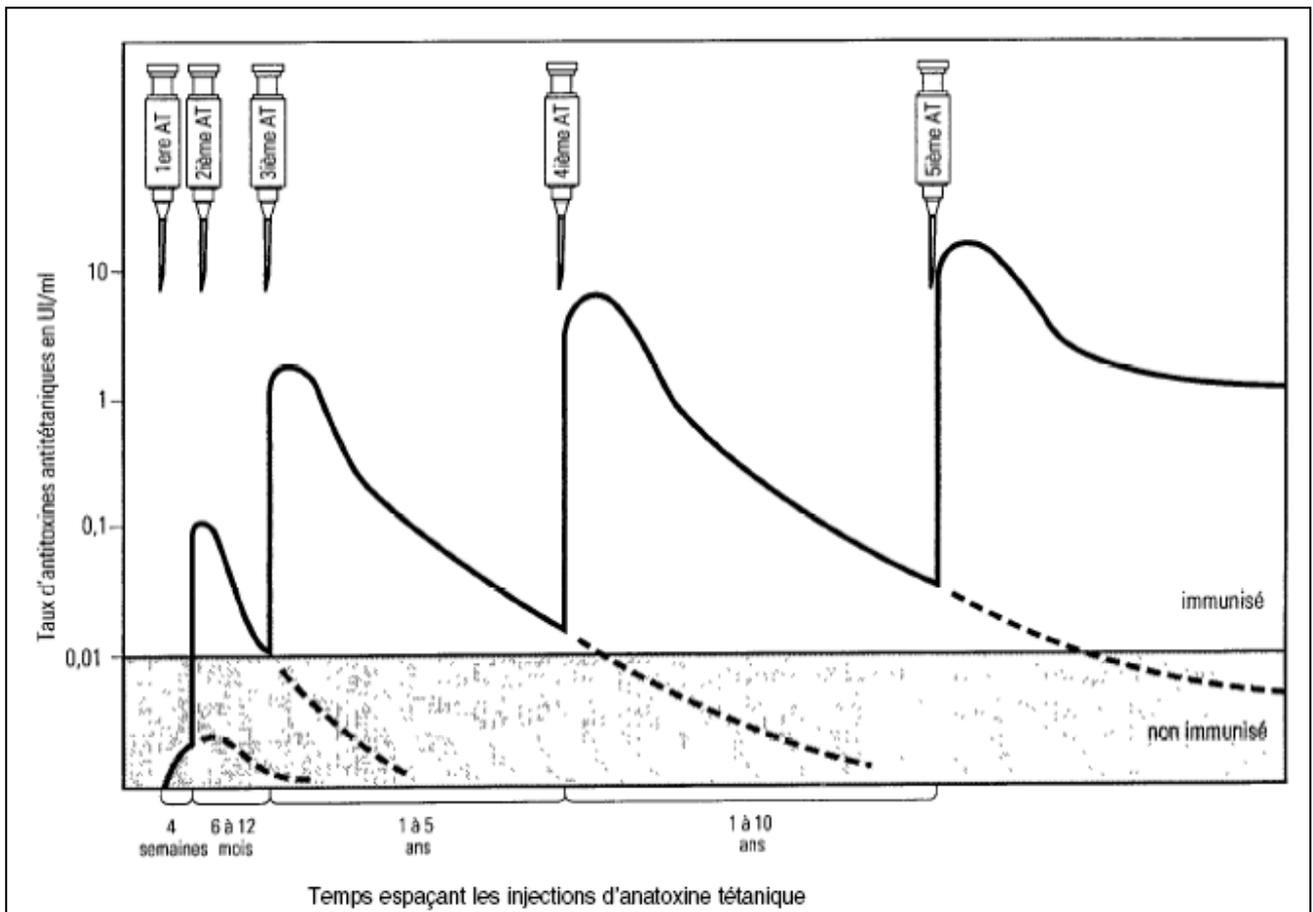


Figure 2. Réponse anticorps à l'anatoxine tétanique (AT). Les titres d'anticorps antitétaniques de l'adulte après la primo-vaccination et rappels avec l'AT. Le niveau et la durée de l'immunité augmentent avec le nombre d'injections d'AT.

## II.1.2. Caractérisation et applications de l'entité immunogène de la toxine tétanique

L'agent vaccinal, utilisé chez l'homme, contre le tétanos est l'anatoxine tétanique. Cependant, seulement une sous-unité de la toxine, est immunogène et non toxique.

En effet, la toxine tétanique est synthétisée sous forme d'une chaîne polypeptidique de 150 kDa (Galazka, 1993), clivée par la suite par les protéases clostridiales pour donner deux fragments : une chaîne légère N-terminale (L) de 50 kDa et une chaîne lourde (H) C-terminale de 100 kDa, reliées entre elles par un pont disulfure (Edwards, 1989). Le traitement *in vitro* par la papaïne ou d'autres protéases, engendre une protéolyse au niveau d'un site supplémentaire (Pichichero *et al.*, 1986), donnant lieu à deux fragments:

- La chaîne L entière reliée à la moitié N-terminale de la chaîne H ( $H_N$ ).
- La deuxième moitié C-terminale de la chaîne H : le fragment C de la toxine tétanique (TTFgC) (Fig. 3).

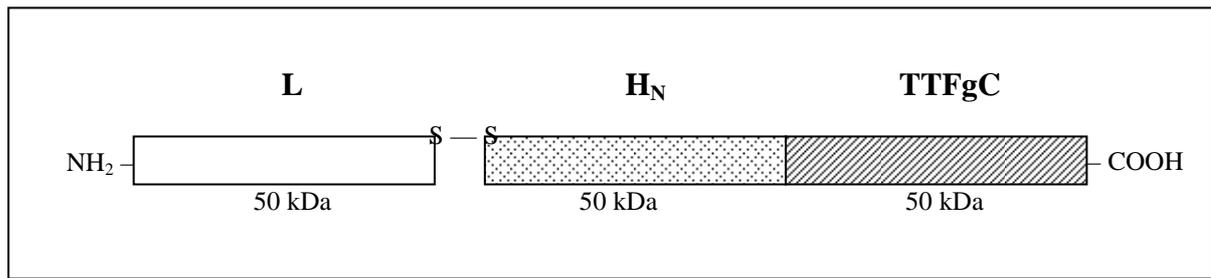


Figure 3. Représentation schématique de la toxine tétanique. La toxine active est composée de deux chaînes (L+H) reliées entre elles par un pont disulfure. La chaîne H peut être subdivisée en deux domaines fonctionnels H<sub>N</sub> et TTFgC.

Chacun des fragments de la toxine tétanique représente un domaine fonctionnel nécessaire pour les différentes étapes de l'intoxication. En effet, la chaîne L, porteuse de l'activité toxique, est une endoprotéase zinc-dépendante responsable du clivage de la synaptobrevine à la position Gln<sup>76</sup>-Phe<sup>77</sup>, empêchant ainsi l'exocytose des neuromédiateurs (Fig. 4) (Bizzini, 1978).

La partie N-terminale de la chaîne H (H<sub>N</sub>) est responsable de la fixation et l'internalisation de la TT dans les cellules neuronales (Simonsen, 1986), (Mochida *et al.*, 1989).

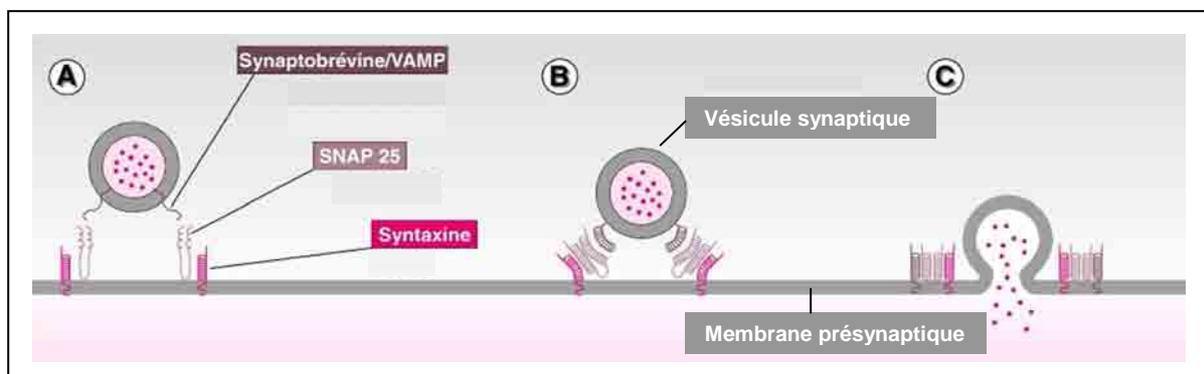


Figure 4. Mode d'action de la toxine tétanique. La TT possède une activité protéase dirigée contre les SNARE (*Soluble NSF Attachment protein Receptor*). La synaptobrevine, ou VAMP, est présente sur la membrane des vésicules de neurotransmetteur (A) et elle est la cible de la chaîne L de la TT. Le clivage de la VAMP rend impossible les interactions avec la SNAP 25 et la syntaxine (B). Elle empêche ainsi la membrane des vésicules synaptiques de fusionner avec la membrane présynaptique et bloque l'exocytose des neuromédiateurs (C).

Le TTFgC est l'entité immunogène et non toxique de la TT, il est nécessaire et suffisant à la reconnaissance et la fixation à la cellule nerveuse (Morris *et al.*, 1980), (Fotinou *et al.*, 2001), l'internalisation et le transport axonal rétrograde et trans-synaptique de la toxine (Fig. 5, 13) (Goldberg *et al.*, 1981), (Herrerros *et al.*, 2000). En effet, l'entrée de la TT dans la

cellule neuronale passe par la fixation du TTFgC aux résidus d'acide sialique ou N-acétylneuraminique (NeuAc) des gangliosides de la membrane cellulaire (Fig. 6, page 13).

La structure cristalline obtenue par rayons X (Umland *et al.*, 1997), (Emsley *et al.*, 2000), indique la présence de deux domaines dans le TTFgC : une partie N-terminale *lectine-like* embobinée et une région C-terminale en triple feuillet  $\beta$  (Fig. 5, page 13) (Fotinou *et al.*, 2001). Les études biochimiques et mutationnelles ont montré que ce dernier domaine du TTFgC contient les sites de fixation aux gangliosides de la cellule neuronale (Fig. 5, page 13) (Lalli *et al.*, 1999), (Halpern *et al.*, 1993), (Figueiredo *et al.*, 1995). L'analyse des sites de reconnaissance a montré l'implication de la région avoisinant le résidu His<sup>1293</sup> dans la fixation aux gangliosides (Shapiro *et al.*, 1997), et dont la valeur de la constante de dissociation  $K_D$  est de l'ordre du nanomolaire (Halpern *et al.*, 1995).

Actuellement, peu de données sont disponibles pour expliquer le mécanisme par lequel le TTFgC arrive à distinguer les caractéristiques structurales des différents gangliosides ; molécules présentes non seulement à la surface des cellules neuronales mais présentent un constituant universel des membranes phospholipidiques des cellules. Une récente étude de l'équipe de BURLINGAME, essaie de répondre à cette question en montrant que le domaine de fixation du TTFgC contient deux sites de liaison capables d'accueillir des résidus de NeuAc séparés de 25 Å de distance. Ce résultat est compatible avec la structure du G<sub>T1B</sub>, le trisialo sphingolipide à structure ramifiée hydrocarbonée contenant un résidu NeuAc sur un bras et deux autres sur le deuxième bras, distants eux aussi de 25 Å. La liaison TTFgC – G<sub>T1B</sub> représente la plus forte et la plus spécifique interaction ganglioside / TT (Fig. 6, page 13) (Prieto *et al.*, 2006).

Plusieurs études ont détaillé depuis quelques décennies, les propriétés immunogènes du TTFgC et ses applications pour la vaccination animale contre le tétanos ainsi que son association à des antigènes pour induire une immunisation contre plusieurs agents à la fois (exemple ; vaccins diphtérie-tétanos, diphtérie-tétanos-coqueluche) (Galazka, 1993), (Pichichero *et al.*, 1986).

Suite à l'essor des vaccins basés sur des vecteurs vivants, le TTFgC a été exprimé seul ou associé à d'autres antigènes, à la surface d'agents variés tels que *Salmonella typhi* (Barry *et al.*, 1996), (Lee *et al.*, 2000), *Mycobacterium bovis* : bacille de Calmette-Guerin (BCG) (Stover *et al.*, 1991), (Abomoelak *et al.*, 1999), *Lactococcus lactis* (Robinson *et al.*, 2004), *Streptococcus gordonii* (Medaglini *et al.*, 2001) et *Bacillus anthracis* (Mesnage *et al.*, 1999). L'utilisation de cette stratégie vaccinale permet de conférer une protection à la fois contre le tétanos et d'autres agents pathogènes. La présentation des antigènes à la surface des cellules

permet d'augmenter considérablement la réponse immune et la durée de l'immunité. Cette nouvelle voie présente aussi l'avantage d'une possible administration, chez les animaux, à travers les voies buccale ou nasale selon le type bactérien, cependant elle reste à l'heure actuelle au stade expérimental.

Grâce à ses propriétés de reconnaissance, de fixation aux cellules nerveuses, d'internalisation et de transport rétrograde à travers la moelle épinière, le TTFgC a été utilisé dans plusieurs applications ayant pour but d'introduire un agent thérapeutique dans le système nerveux. Dans le cadre du traitement ou de la prévention des maladies neurodégénératives, la capacité du TTFgC à délivrer au système nerveux une large gamme de molécules reliées par fusion chimique ou génétique, a été exploitée dans des études récentes. Ainsi les transports vers le tronc cérébral, les neurones moteurs et la moelle épinière, grâce au TTFgC, ont été appliqués à des agents neurotrophiques nécessaires à la survie et la croissance des motoneurones tels que la cardiotrophine-1 (Fig. 7, page 14) (Bordet *et al.*, 2001), l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) (Payne *et al.*, 2006) et la superoxyde dismutase (Matthews, 2000), (Francis *et al.*, 1995).

La propriété du TTFgC comme puissant agent recruteur des effecteurs de la réponse immunitaire a été exploitée en l'associant à un système de ciblage des cellules tumorales. Une étude de l'équipe de RICE J, a permis de montrer l'induction d'une réponse antitumorale des lymphocytes T chez des souris ayant subi la transfection d'ADN codant l'épitope AH1 de la lignée CT26 du carcinome du côlon, relié à l'ADN codant le TTFgC (Buchan *et al.*, 2005).

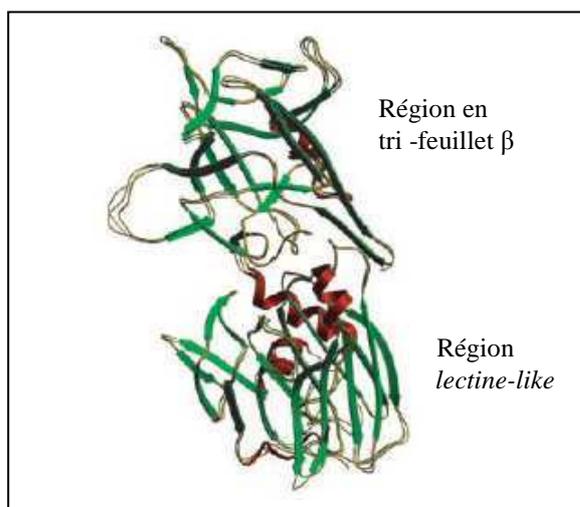


Figure 5. Structure tridimensionnelle du TTFgC. La région C-terminale en triple feuillet  $\beta$  contient les sites de fixation aux gangliosides de la cellule neuronale. (d'après Fotinou *et al.*, 2001).

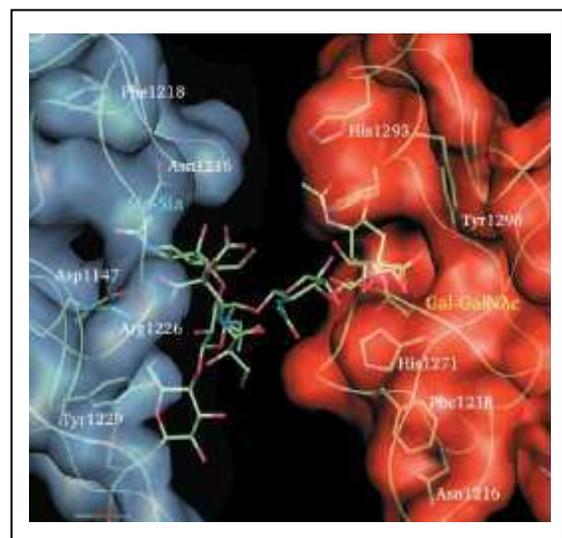


Figure 6. Interaction entre un ganglioside et ses sites de fixation sur le TTFgC. Deux résidus NeuAc du  $G_{T1B}$  distants de 25 Å sont fixés sur le premier TTFgC (bleu). Le troisième NeuAc est lié au TTFgC en rouge. (d'après Fotinou *et al.*, 2001).

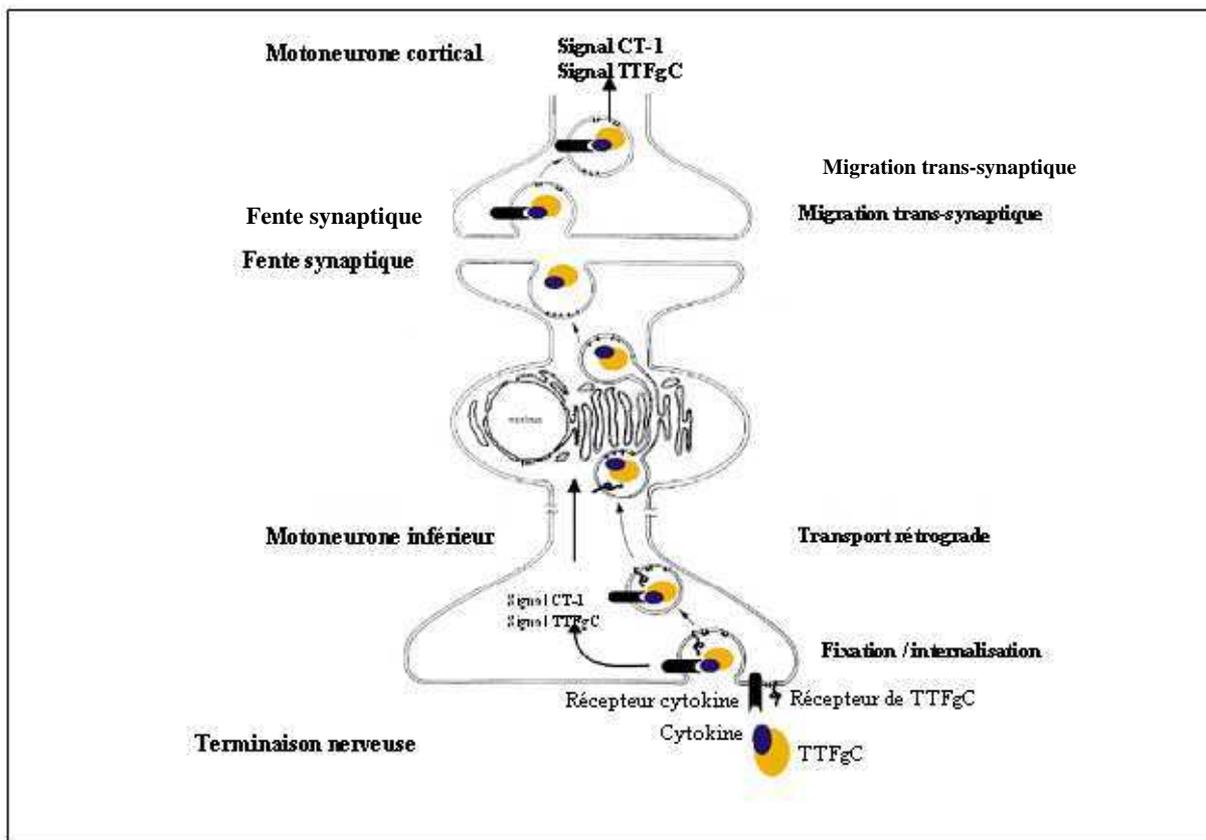


Figure 7. Stratégie thérapeutique pour la prévention *in vivo* de la dégénérescence des motoneurones par utilisation d'une cytokine couplée au TTFgC. Le complexe TTFgC/cytokine se fixe, avec une forte affinité, aux récepteurs des terminaisons nerveuses. D'après cet exemple, l'interaction entre le TTFgC/CT-1 et le récepteur membranaire de la CT-1, active la voie intracellulaire de la CT-1. La fixation du complexe au récepteur du TTFgC conduit à l'internalisation ainsi qu'au transport rétrograde et trans-synaptique de la protéine couplée. Cette stratégie permet l'arrivée du signal de CT-1 aux motoneurones corticaux affectés dans les cas de sclérose amyotrophique latérale chez l'Homme. (d'après Bordet *et al.*, 2001).

En conclusion, le TTFgC conserve les propriétés de reconnaissance, de fixation, d'internalisation, de transport axonal rétrograde, ainsi que le puissant potentiel immunogène de la toxine tétanique, sans son caractère toxique. Ses qualités neurotropes ont permis des avancées dans le traitement des maladies neurodégénératives. Les avantages du TTFgC comme agent vaccinal ont été largement exploités dans les applications animales et l'anatoxine tétanique a permis une couverture vaccinale à l'échelle mondiale chez l'Homme. L'exploitation du pouvoir immunogène du TTFgC pour le ciblage cellulaire représente un aspect très intéressant. Le schéma réactionnel profite dans ce cas de la présence des anticorps antitétaniques post vaccinaux nécessaires à l'initiation de l'activation des mécanismes effecteurs de la réponse immune par le complément et / ou par ADCC.

## **II.2. PREVENTION DE L'ALLO-IMMUNISATION RHESUS-D FOETO-MATERNELLE**

La première description de la maladie hémolytique du nouveau-né est historiquement associée à la découverte du système Rhésus (Rh) à la surface des globules rouges (GR) par Philippe LEVINE, en 1939 (Levine *et al.*, 1941). Cette découverte a conduit à des progrès importants car à partir de ces travaux, cette maladie a été successivement reconnue, diagnostiquée, traitée puis prévenue. Le système Rh s'est avéré également de toute première importance en médecine transfusionnelle à cause de son polymorphisme et de l'immunogénicité de ses antigènes.

### **II.2.1. Le système Rhésus**

#### **II.2.1.1. Définition**

Le système Rh est un système génétique indépendant des autres systèmes de groupes sanguins (ABO, Kell, Duffy...). Les antigènes du groupe Rh sont représentés par une famille de protéines transmembranaires hydrophobes non glycosylées de 30-32 kDa. Les protéines Rh sont codées par deux gènes homologues *RHD* et *RHCE* (96% d'identité de séquence) organisés en tandem sur le chromosome 1 (p34.1-1p36), et séparés de moins de 450 000 pb (Cherif *et al.*, 1991), (Macgeoch *et al.*, 1992). Les protéines D et non-D (417 acides aminés) diffèrent par 35 substitutions et possèdent une topologie membranaire semblable caractérisée par de courtes boucles hydrophiles reliant douze hélices transmembranaires. Les extrémités N et C-terminales sont intracytoplasmiques (Fig. 8) (Ansart, 2006). Plusieurs études détaillent l'implication des protéines Rh dans le maintien de l'asymétrie des aminophospholipides (Schroit *et al.*, 1990). D'autres, récemment publiées, leur attribuent un rôle de canaux à gaz biologiques pour NH<sub>3</sub> et CO<sub>2</sub> (Kustu *et al.*, 2006), (Ripoche *et al.*, 2006).

Il existe six allèles Dd, Cc et Ee dont la transmission est mendélienne simple par haplotypes. La présence ou l'absence du gène *RHD* et de son produit déterminent respectivement la base des phénotypes Rh-positif (RhD ou RH : 1) et Rh-négatif (Rhd ou RH : -1), tandis qu'un polymorphisme des positions 103 et 226 dans le produit du gène *RHCE* détermine respectivement la base des phénotypes C/c (Ser mutée en Pro) et E/e (Pro mutée en

Ala) (Fig. 8, 9) (Cartron et al., 1993), (Cartron, 1994). Les autres polymorphismes résultent essentiellement d'événements de conversion entre les gènes RH ou de mutations ponctuelles.

La densité antigénique D varie selon le phénotype Rh. Elle est comprise entre 10 000 à 30 000 sites/cellule (Fig. 9).

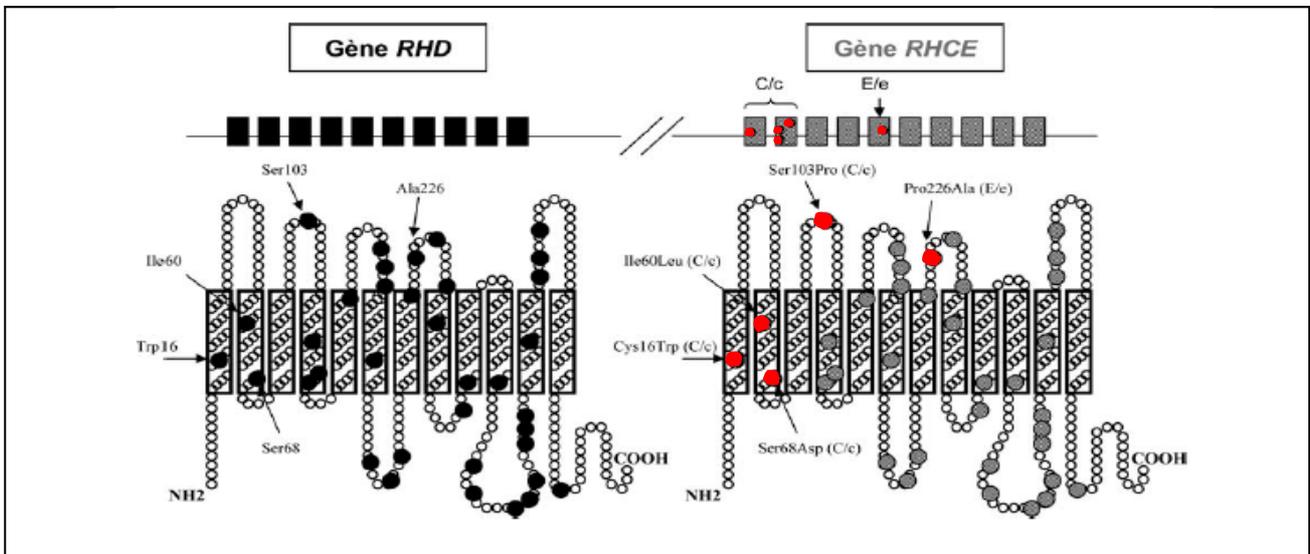


Figure 8. Polypeptides RhD et RhCE. Les deux protéines sont formées, chacune, de 417 acides aminés qui diffèrent par 35 substitutions. La protéine décrit une chaîne douze fois transmembranaire aux extrémités N et C-terminales intracytoplasmiques. Les cercles blancs représentent les aa communs aux deux protéines. Les cercles noirs sont des aa spécifiques des protéines RhD. Les cercles gris sont les aa spécifiques des protéines RhCE. Les cercles rouges sur le gène *RHCE* correspondent aux nucléotides polymorphes pour *C/c* et *E/e*. Les aa correspondants sont représentés sur la protéine RhCE par les mêmes cercles rouges. (d'après Ansart, 2006).

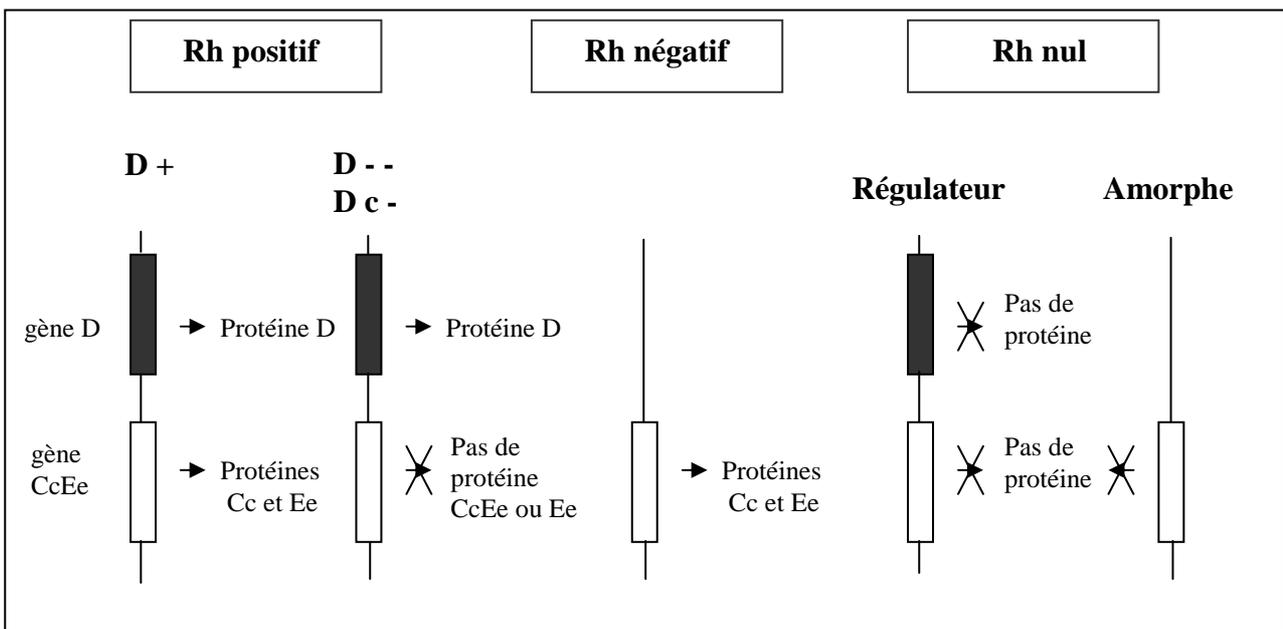


Figure 9. Le locus RH. Représentation schématique de la structure des chromosomes Rh chez les sujets de phénotype Rh positif (D +, D - - et D c -), Rh négatif et Rh nul. Seul le gène CcEe est présent et fonctionnel chez les sujets Rh négatif. Chez les sujets Rh nul (régulateur et amorphe), les gènes D et CcEe ne sont pas fonctionnels.

Cinq protéines au moins, codées par des gènes distincts indépendants définissent le complexe membranaire Rh : Rh, LW (Landsteiner-Wiener) également appelé ICAM-4 (Bailly *et al.*, 1994),

Rh50 (glycoprotéines de 50 kDa) (Moore *et al.*, 1987), CD47 (glycoprotéine de 47-52 kDa) (Mawby *et al.*, 1994), et GPB (Glycophorine B : glycoprotéine riche en acide sialique) (Cartron *et al.*, 1992).

### **II.2.1.2. Autre système de groupes sanguins : le système MNS**

Parmi les autres systèmes de groupes sanguins, le système MNS reste, après le système ABO, l'un des mieux connus. Le système MNS est responsable de l'essentiel de la charge électro-négative des GR, conférée par les acides sialiques. Il est défini par un locus du chromosome 4, codant pour les principales glycoprotéines membranaires des GR humains : glycophorines A et B.

#### **II.2.1.2.a. LA GLYCOPHORINE A**

Identifiée par WINZLER en 1969 (Winzler, 1969), la glycophorine A (GPA) est la sialoglycoprotéine majeure ( $0,3 \cdot 10^6$  à  $1,2 \cdot 10^6$  sites par GR) (Merry *et al.*, 1984), (Edwards, 1980). La molécule isolée possède un poids moléculaire de 31 kDa. Elle traverse la membrane de part en part avec un segment externe porteur des radicaux glucosidiques chargés négativement et se comportant comme des ligands pour de nombreux virus (Fig. 10) (Tomita *et al.*, 1978). La molécule se présente sous deux formes interconvertibles dimériques (PAS 1) et monomérique (PAS 2). Les homodimères présentent une structure tertiaire en hélices transmembranaires symétriques écartées d'un angle de  $45^\circ$  (Fig. 11) (Furthmayr *et al.*, 1976), (Chalou *et al.*, 1994), (Smith *et al.*, 1995), (Fan *et al.*, 2006). Le maintien de la stabilité de cette structure est assuré par des liaisons non covalentes : interactions de Van der Waals (Mckenzie *et al.*, 1997).

La fonction précise de la GPA reste mystérieuse, d'autant plus que les sujets possédant des GR déficients en GPA, ne présentent aucun signe clinique. Cependant ils sont résistants à l'invasion par certaines souches de *Plasmodium falciparum* (parasite responsable de la forme la plus sévère du paludisme), car les porteurs de la spécificité antigénique M et N présentent des ligands pour ce parasite. La GPA serait capable d'inhiber la lyse autologue des GR par le complément, en bloquant la formation de C5-C7 (Tomita *et al.*, 1993). Cette activité serait

cependant accessoire par rapport à la fonction essentiellement remplie par CD59. Bien que la GPA native ne contribue pas à la régulation de la morphologie ou des propriétés mécaniques des GR, la fixation de ligands sur la GPA induit une interaction avec le réseau des protéines du cytosquelette aboutissant à une rigidité membranaire. Ce processus peut être considéré comme une forme de transduction de signal (Chasis *et al.*, 1985), (Paulitschkem *et al.*, 1995).

Dans le but de concevoir des outils de diagnostic fondés sur les réactions d'hémagglutination, quelques études ont proposé des mini-anticorps scFv (fragment variable en chaîne unique) bispécifiques pouvant à la fois se lier à la GPA et à des épitopes d'agents pathogènes (Lillet *et al.*, 1994), (Atwell *et al.*, 1996).

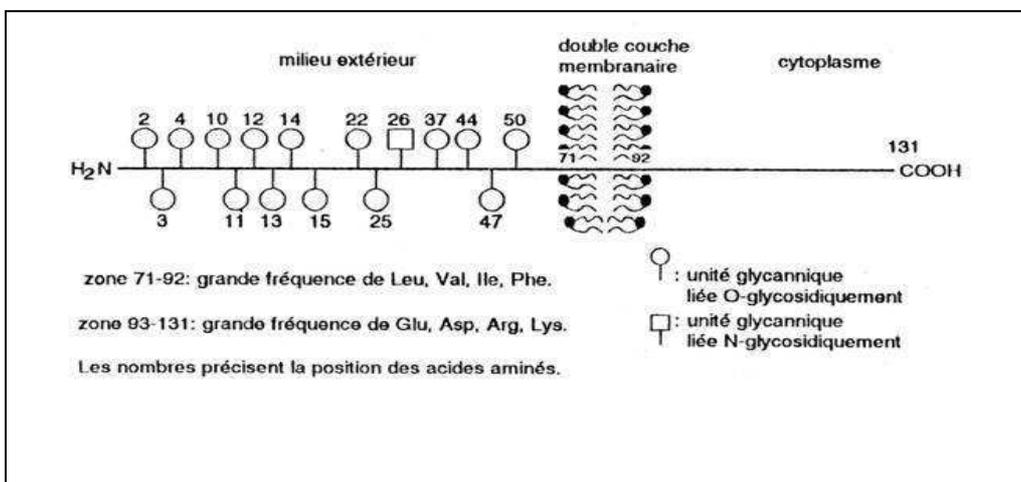


Figure 10. Structure schématique de la glycophorine A à travers la membrane érythrocytaire.

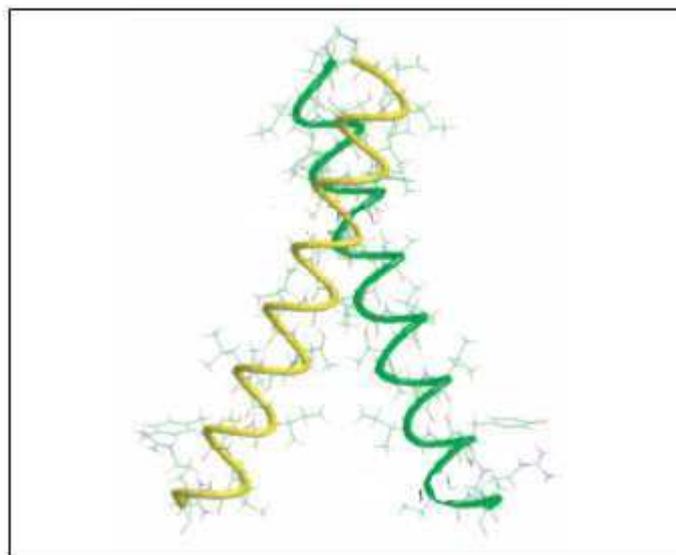


Figure 11. Structure tertiaire de la région transmembranaire du dimère de la glycophorine A. Les hélices sont symétriques et présentent un écart de 45°.

### **II.2.1.2.b. LA GLYCOPHORINE B**

Glycoprotéine transmembranaire de 20 kDa riche en glucides, moins abondante que la GPA (2 à  $3.10^5$  sites par GR). Elle est composée d'une chaîne polypeptidique unique de 72 aa. Son rôle fonctionnel n'est pas clairement défini, car le déficit total de ces protéines n'entraîne pas d'anomalies morphologiques et fonctionnelles des GR ou des signes cliniques particuliers (Cartron *et al.*, 1992).

### **II.2.2. L'allo-immunisation anti-RhD**

L'allo-immunisation anti-RhD est responsable d'anémies fœtales et néonatales sévères ainsi que d'ictères néonataux graves. Elle est due, chez la femme RH : -1, à la synthèse d'anticorps IgG anti-RhD en réponse au passage transplacentaire de GR fœtaux RH : 1 dans la circulation maternelle. Le débit d'anticorps vers le fœtus dépend de deux éléments principaux ; d'une part la concentration sérique maternelle en anticorps anti-RhD qui peut entraîner, si elle est élevée, une hémolyse et une anémie importante chez le fœtus, et d'autre part la cinétique du transfert transplacentaire de ces anticorps. En effet, la concentration en IgG augmente au cours de la grossesse ; faible avant 4 mois, elle dépasse le taux maternel en fin de grossesse ce qui confirme le caractère actif du transfert (Fig. 12, page 20).

Les GR fœtaux dans la circulation maternelle sont pris en charge et détruits par les macrophages de la rate et du foie. Ces cellules effectrices captent les GR par l'intermédiaire de la partie Fc des anticorps fixés. Le degré de l'activation macrophagique est lié à l'appartenance de l'anticorps à l'une des sous-classes d'IgG (IgG1, par exemple) plus pathogène pour les antigènes D.

Actuellement en France, la prévention par immunoglobulines anti-RhD au cours de la grossesse n'est pratiquée qu'en cas de situations à risque d'hémorragie fœto-maternelle (HFM) ; on parle alors d'immunisation ciblée en cas de métrorragies, fausse couche spontanée, interruption de grossesse, grossesse extra-utérine, cerclage, traumatisme abdominal, amniocentèse ou autre prélèvement ovulaire...

Il persiste cependant des cas d'allo-immunisation RhD qui peuvent avoir plusieurs causes : prévention oubliée ou inadaptée (doses et/ou délais), grossesses méconnues (fausses couches précoces...). Enfin, certaines immunisations surviennent en cours de grossesses, le plus souvent au cours du dernier trimestre, sans facteur de risque identifié d'HFM. Ces dernières échappent à la prévention ciblée et ont conduit de nombreux pays à proposer une

injection systématique supplémentaire d'immunoglobulines anti-RhD au troisième trimestre de la grossesse (Fig. 12).

Le nombre de grossesses chaque année en France est estimé à 800 000. Le groupe RH : -1 représente en moyenne 15% de la population française de type caucasien. Cette fréquence peut être différente dans d'autres populations (Fauchet *et al.*, 1995), (Bernard, 1983). Les Basques auraient une fréquence de RH : -1 de 35% et, à l'opposé, les populations d'origine africaine de 7%, et les Asiatiques de l'ordre de 0,3% (Reid *et al.*, 2004).

Au total, persisterait avec la prévention ciblée, un risque d'allo-immunisation fœto-maternelle (AIFM) en France de 0,9 pour mille des femmes, soit 720 cas par an (Brossard *et al.*, 2003).

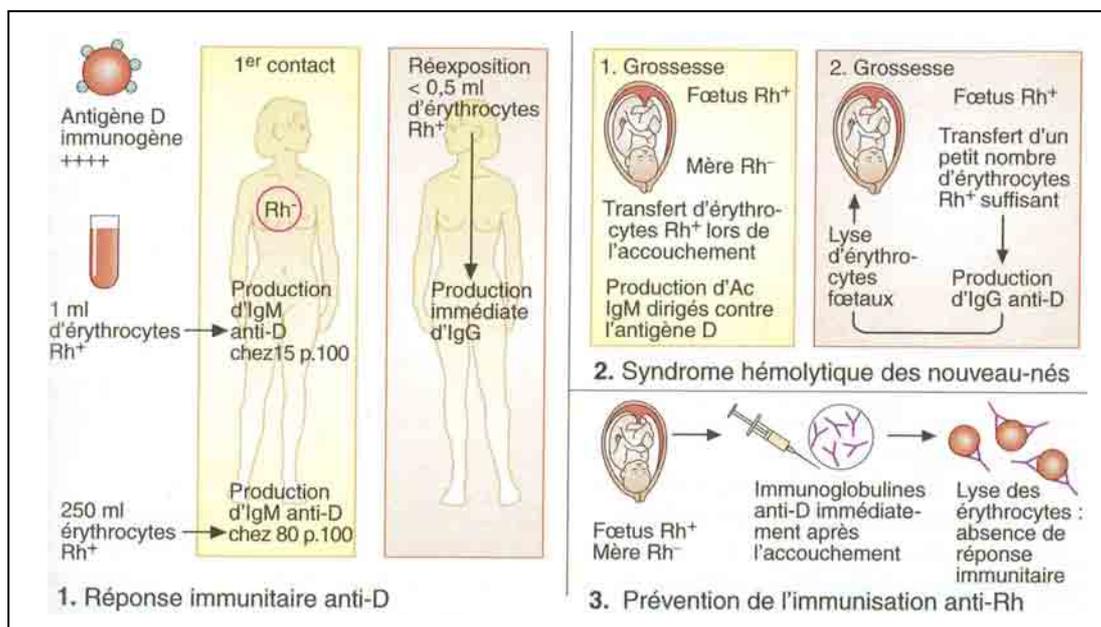


Figure 12. Allo-immunisation anti-RhD. L'exposition de la mère RH : -1, au cours d'une 1<sup>ère</sup> grossesse, aux GR de son fœtus RH : 1, entraîne la production chez la mère d'anticorps IgM anti-RhD (1). Ces anticorps deviennent plus spécifiques (IgG anti-RhD), après un nouveau contact de l'organisme maternel avec le sang fœtal RH : 1 pendant la 2<sup>ème</sup> grossesse. Dans ce cas les IgG peuvent franchir la barrière placentaire et provoquer la lyse des GR fœtaux (2). L'injection d'IgG anti-RhD, immédiatement après le 1<sup>er</sup> accouchement, permet de prévenir l'immunisation de la mère(3). (d'après l'Atlas de poche d'immunologie, Burmester et Pezzutto, p117).

### II.2.3. Les différents protocoles de prévention de l'allo-immunisation Rhésus D

La mise en application, dans les années 70, de la prophylaxie de l'AIFM anti-RhD dans le post-partum a contribué à faire baisser considérablement l'incidence de la mortalité périnatale liée à cette affection. Elle consiste à injecter des immunoglobulines anti-RhD chez toute femme RH : -1 non immunisée donnant naissance à un enfant RH : 1 ou dans les suites

d'une interruption de grossesse ou dans les situations anténatales à risque d'HFM. Son efficacité lorsqu'elle est appliquée correctement, est actuellement bien établie. En France, grâce à la généralisation de ce protocole prophylactique, le risque d'AIFM a diminué d'un facteur 10 en 30 ans ; l'incidence des cas d'AIFM par incompatibilité foeto-maternelle RhD est ainsi passée de 6 à 10 ‰ naissances vivantes avant 1970 à 0.9 ‰ actuellement (Ratsimbafy *et al.*, 2002). La persistance de cas résiduels d'AIFM anti-RhD (720 cas estimés par an en France) (Brossard *et al.*, 2003), malgré la prophylaxie actuelle censée s'appliquer de manière systématique ainsi que la constatation que les anticorps anti-RhD peuvent apparaître dès la première grossesse en l'absence de risque identifié (le plus souvent en fin de gestation), a conduit à soulever la question de la prévention systématique au troisième trimestre de la grossesse.

### **II.2.3.1. La prévention anténatale ciblée limitée aux situations à risque**

Cette prévention consiste à pratiquer l'injection d'anticorps anti-RhD dans certaines situations obstétricales anténatales à risque d'HFM, potentiellement sensibilisantes. Au-delà du 4<sup>ème</sup> mois, du fait de la grande disparité des volumes d'HFM observés, les situations à risque hémorragique important (interruption tardive de grossesse, mort fœtale *in utero*, traumatisme abdominal...) justifient la quantification systématique des GR fœtaux dans la circulation maternelle par test de KLEIHAUER dans le but d'adapter éventuellement des doses à injecter.

### **II.2.3.2. La prévention anténatale « systématique »**

Elle consiste à proposer systématiquement, en complément des situations envisagées précédemment, une injection d'Ig anti-RhD au début du 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse. La fréquence des HFM spontanées, d'autant plus élevée que la grossesse est avancée, est à la base de cette politique de prévention.

Il ne s'agit pas d'une question nouvelle puisque ce type de prophylaxie a été proposé pour la première fois en 1967 (Zipursky *et al.*, 1967) et que les premières études remontent aux années 1980 (Bowman *et al.*, 1978). Les modalités d'administration des Ig (posologies et dates) sont variables d'une étude à l'autre, ce qui rend difficile la comparaison des résultats et donc l'établissement d'une ligne de conduite.

Cette modalité de prévention est en vigueur dans de nombreux pays industrialisés où elle a fait l'objet de directives cliniques argumentées : Canada (Fung Kee Kung *et al.*, 2003), Etats-Unis (Acog, 1999), Royaume-Uni (Lee *et al.*, 1999), (Chilcott *et al.*, 2003). Les deux modalités actuellement les plus employées consistent à administrer soit 300 µg (1500 UI) à 28 semaines d'aménorrhée (SA) (Etats-Unis, Canada, Espagne, Pays-Bas, Suisse), soit 100 µg (500 UI) à 28 et à 34 SA (Royaume-Uni) (De Silva *et al.*, 2003).

#### **II.2.4. Evaluation de l'efficacité des différents protocoles de prévention**

Une mise à jour d'une méta-analyse établie par l'établissement Britannique Institut National de la Santé et de l'Excellence Clinique (*National Institute for Health and Clinical Excellence : NICE*), en 2006, a détaillé onze études comparatives : 2 essais contrôlés randomisés (Huchet *et al.*, 1987), (Lee *et al.*, 1995), 7 études comparatives de cohorte (Bowman *et al.*, 1978), (Parsons *et al.*, 1998), (Bowman *et al.*, 1978), (Tovey *et al.*, 1983), une étude rétrospective en population de type avant-après (48) et un essai d'intervention en population comparant 2 régions (Mac Kenzie *et al.*, 1999). Le tableau (II) résume les caractéristiques de ces études. Dans tous les cas, une administration d'anti-RhD était pratiquée en post-partum en cas d'accouchement d'un enfant RH : 1. L'hétérogénéité de ces études rend difficile une analyse globale, on peut cependant dégager les conclusions suivantes :

- Les posologies et les dates d'administration des Ig anti-RhD sont variables. Divers schémas ont été utilisés : 300 µg à 28 SA, 300 µg à 28 et 34 SA, 100 µg à 28 et 34 SA, 50 µg à 28 et 34 SA.
- Sur la totalité des 11 études, le taux d'immunisation dans le groupe témoin (absence de prophylaxie anténatale systématique) est globalement homogène de l'ordre de 1,5 % toute parité confondue. Dans le groupe intervention (prévention anténatale systématique), le taux est inférieur, compris entre 0 et 0,9 % toute parité confondue. Les résultats sont en faveur de la prévention systématique dans tous les groupes.

D'après les données françaises (150 000 femmes RH : -1 à 28 SA / an), le nombre de femmes immunisées passerait selon BRANGER de (1 100 - 2 100) par an avec la prévention ciblée à (375 – 455) par an avec la prévention systématique par an en France, soit une réduction de (655 - 1 700) par an en prenant les hypothèses extrêmes (Branger *et al.*, 2006).

En conclusion, l'ensemble des données disponibles montrent que beaucoup d'AIFM anti-RhD résiduelles (jusqu' à 30 % dans certaines études) sont liées à une application

imparfaite des protocoles de prévention actuellement en vigueur en France. L'amélioration des pratiques (meilleure utilisation du test de KLEIHAUER, adaptation des posologies, diminution des oublis...) est donc un préalable essentiel, quelle que soit la politique de prévention anténatale proposée : prévention ciblée limitée aux situations à risque avec ou sans prévention systématique au 3<sup>ème</sup> trimestre.

Malgré l'hétérogénéité et le peu d'études publiées (2 essais randomisés), les données disponibles à ce jour sont en faveur d'une prévention systématique. Des études complémentaires semblent nécessaires pour préciser les dates optimales d'administration des Ig anti-RhD, le nombre d'injections et la posologie idéale à adopter. Cependant la quasi-totalité des auteurs concluent à l'efficacité clinique de la prophylaxie systématique soit à la posologie de 300 µg à 28 SA, soit à la posologie de 100 µg à 28 SA, en complément de la prévention postnatale. Cette prévention anténatale n'exclut bien sûr pas une prévention ciblée supplémentaire en cas de situation à risque.

L'efficacité n'est pas le seul critère à considérer pour déterminer une stratégie de prévention. Le coût, les risques biologiques d'une administration à large échelle d'un produit dérivé sanguin, les possibilités d'approvisionnement en Ig ainsi que la modification des pratiques de surveillance des femmes RH : -1, doivent également être pris en compte.

Tableau 1. Résultats résumés des 11 études prises en compte dans la méta-analyse de CHILCOTT pour le *NICE*

Référence	Type d'étude	Schéma utilisé	Sélection des patientes	Groupe prophylaxie anti-D systématique			Groupe témoin : prophylaxie ciblée exclusive		
				N	R	% immunisat. (95 % IC)	N	R	% immunisat. (95 % IC)
BOWMAN (1978)	Prospective Non randomisée	300µg x 2 à 28 et 34 SA	Primigestes	1357	1	0,1 (0,1 à 0,2)	2768	45	1,6 (1,2 à 2,1)
BOWMAN et POLLOCK (1978)	Prospective Non randomisée	300µg à 28 SA	Non sélect.	1805	11	0,6 (0,3 à 1)	3533	62	1,8 (1,3 à 2,2)
TOVEY (1983)	Prospective Non randomisée	100µg x 2 à 28 et 34 SA	Primigestes	1238	5	0,4 (0,1 à 0,8)	2000	30	1,5 (1 à 2)
HERMANN (1984)	Prospective Non randomisée	250µg à 34 SA	Primigestes (P1)	236	4	1,7 (0 à 3,3)	286	5	1,7 (0,2 à 3,3)
			Multigestes (P1)	332	1	0,3 (0,3 à 0,9)	359	7	1,9 (0,2 à 2,6)
			(P1) non sélect.	568	5	0,9 (0,1 à 1,6)	645	12	1,9 (0,8 à 2,9)
BOWMAN et POLLOCK (1987)	Prospective Non randomisée	300µg à 28 SA	Non sélect.	9295	30	0,3 (0,2 à 0,4)	3533	62	1,8 (1,3 à 2,2)
HUCHET (1987)	Contrôlée randomisée	100µg x 2 à 28 et 34 SA	Primipares	461	0	-	454	4	0,9 (0 à 1,7)
			Multipares	138	1	0,7 (0,7 à 2,1)	136	3	2,2 (0,3 à 4,7)
			Non sélect.	599	1	0,2 (0,2 à 0,5)	590	7	1,2 (0,3 à 2,1)
TROLLE (1989)	Prospective Non randomisée	300µg à 28 SA	Non sélect.	291	0	-	322	6	1,9 (0,4 à 3,3)
LEE et RAWLINSON (1995)	Contrôlée randomisée	50µg x 2 à 28 et 34 SA	Primigestes	513	5	0,8 (0,1 à 1,8)	595	9	1,5 (0,5 à 2,5)
MAYNE (1997)	Rétrospective (type av/ap)	100µg x 2 à 28 et 34 SA	Primipares	1425	4	0,3 (0 à 0,6)	1426	16	1,1 (0,6 à 1,7)
PARSONS (1998)	Prospective Non randomisée	NP (300µg ?) à 28 SA	Non précisé	9684	72	0,7 (0,6 à 0,9)	Non précisé	Non précisé	- (0,8 %)
McKENZIE (1999)	Comparative communautaire	100µg x 2 à 28 et 34 SA	Primipares	3320	12	0,4 (0,2 à 0,6)	3146	26	0,8 (0,5 à 1,1)

N : nombre d'accouchements d'enfants RH : 1 par des femmes RH : -1.

R : nombre de femmes RH : -1 immunisées

## **II.2.5. Risques et effets indésirables cliniques et biologiques des Immunoglobulines anti-RhD**

Actuellement, la seule source d'Ig anti-RhD est le fractionnement de plasmas humains hyperimmuns fournie par des donneurs mâles RH : -1, hyperimmunisés par injections répétées de GR RH : 1. Quatre-vingt dix sept pourcent des plasmas proviennent des Etats-Unis (Cortey *et al.*, 2006).

### **II.2.5.1. Risques infectieux**

Tous les producteurs d'Ig soulignent l'importance donnée à la sécurité virale de leurs produits. Néanmoins, une possibilité de transmission de virus peut persister, en particulier avec des agents infectieux non encore répertoriés (NICE, 2002).

En ce qui concerne la transmission de prions par des médicaments dérivés du sang (et particulièrement du nouveau variant de Creutzfeld-Jacob (nvMCI)), aucun cas n'est rapporté à ce jour (Cortey *et al.*, 2006). Néanmoins, le fait de mélanger des dons pour produire des lots d'Ig pourrait augmenter le nombre des sujets exposés à un plasma à risque infectieux d'un donneur précis. L'étape finale de la préparation, la nanofiltration, réduit d'un facteur 1000 à 100 000 les agents de type prion (Cortey *et al.*, 2006).

### **II.2.5.2. Les réactions de type « allergique » et les manifestations à type hypersensibilité**

Elles sont inhérentes à tout produit introduit dans l'organisme. En matière d'Ig anti-RhD, ces risques concernent tous les patients même s'ils n'ont jamais présenté de réaction d'hypersensibilité aux Ig en général ou aux Ig anti-RhD. On s'attachera à identifier :

- Les patientes déjà connues comme porteuses d'une hypersensibilité aux Ig humaines.
- Les patientes déficitaires en IgA qui courent en théorie un risque de choc anaphylactique. Néanmoins, la concentration en IgA de Rhophylac<sup>®</sup>, principale Ig anti-RhD diffusée en France, est inférieure à 5 µg/ml, donc très faible.

Les effets indésirables à type hypersensibilité ont des manifestations diverse (prurit, urticaire, dyspnée, hypotension) et difficiles à chiffrer. Ils restent rares (Huchet *et al.*, 1970).

### II.2.5.3. Perturbations biologiques associées aux injections d'anti-rhésus D

Chez la mère, la persistance de taux circulants faibles d'anti-RhD passifs, à distance d'une injection d'Ig anti-RhD peut avoir plusieurs conséquences :

- Une sous-estimation d'une HFM qui peut survenir à distance de l'injection, par clairance partielle des GR. Ce risque, difficile à documenter, est réellement observé en cas d'HFM survenant dans un contexte d'incompatibilité ABO.
- Interférence avec le diagnostic d'immunisation anti-érythrocytaire : en cas d'injection de 300 µg d'Ig anti-RhD à 28 SA, la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) reste positive pendant une durée de 2 à 4 mois, selon la technique utilisée. Il faut donc s'attendre à ce que les RAI soient positives aux abords de l'accouchement sans que cela signifie pour autant la présence d'une immunisation mettant en jeu la sécurité transfusionnelle chez la mère. L'injection prénatale d'Ig anti-RhD peut retarder un diagnostic d'immunisation anti-RhD chez la femme enceinte RH : -1 par confusion entre anti-RhD passifs et anti-RhD d'immunisation. Ce retard peut avoir parfois des conséquences fœtales préjudiciables.

Chez le fœtus, la production d'IgG est nulle ou négligeable. Durant la grossesse, les IgG maternelles lui sont activement transmises par voie trans-placentaire. Le taux fœtal d'IgG représente 50 % de celui de la mère entre 28-32 SA et augmente pour dépasser le taux maternel à la naissance. Les IgG anti-RhD injectées à la mère sont elles aussi en partie transférées au fœtus (Thornton *et al.*, 1989). Une seule étude effectuée par l'institution Britannique Collège Royal des Obstétriciens et Gynécologues (*Royal College of Obstetricians and Gynaecologists RCOG*, 2002) s'attache spécifiquement à analyser le retentissement fœtal de l'exposition aux anti-RhD pendant la grossesse, sans mentionner de conséquence pathologique même si les critères choisis s'avèrent très imprécis : poids de naissance, survie à un mois. Peu de publications s'attachent aux effets à long terme sur l'enfant de l'exposition aux anti-RhD pendant la grossesse. Les différentes études de prophylaxie ne mentionnent aucune conséquence défavorable (*NICE*, 2002), (*RCOG*, 2002), (*Maayan et al.*, 2001), (*Maroni et al.*, 1975).

#### **II.2.5.4. Interférence avec la vaccination du post-partum (vaccins vivants)**

Le vaccin le plus fréquemment utilisé dans le post-partum est le vaccin contre la rubéole. Une diminution d'efficacité des vaccins vivants en cas d'injection simultanée des anti-RhD est suggérée par le *NICE*. Les recommandations d'autres pays concernant l'immunoprophylaxie Rh proposent de différer la vaccination par vaccins vivants à plusieurs semaines de l'injection d'Ig anti-RhD, donc loin du post-partum immédiat (Urbaniak, 1998, (Chilcott et al., 2003), (*NICE*, 2002), (Société Canadienne de Gynécologie-Obstétrique, 2003).

#### **II.2.6. Perspectives**

Actuellement, l'immunoprophylaxie Rh anténatale concerne toutes les femmes RH : -1 bien que seulement 30 à 40 % d'entre elles portent un enfant RH : -1.

La connaissance du génotype Rh fœtal permettrait de modifier une pratique de prophylaxie médicalement peu rationnelle, car exposant inutilement beaucoup de patientes à un médicament dérivé du sang.

Une autre perspective d'avenir est représentée par les tentatives de substitution des Ig polyclonales humaines par des anticorps monoclonaux anti-RhD.

##### **II.2.6.1. Couplage du génotypage fœtal RhD et de l'immunoprophylaxie Rh**

La mise en évidence par LO (Lo Ymd *et al.*, 1998), (Lo Ymd *et al.*, 1997) de quantités appréciables d'ADN fœtal dans le plasma maternel a ouvert la voie au génotypage fœtal RhD après extraction et concentration de l'ADN du plasma des femmes enceintes RH : -1 (Lo Ymd *et al.*, 1998), (Lo Ymd *et al.*, 1997), (Rouillac *et al.*, 2004). Le génotypage fœtal RhD sur sang maternel a une très bonne sensibilité au-delà de 10 SA, excellente au-delà de 15 SA. En cas de RhD fœtal négatif, il est proposé de valider ce résultat par un deuxième prélèvement maternel quelques semaines plus tard. En cas de confirmation, l'abstention d'immunoprophylaxie est alors licite (Brossard *et al.*, 2002), (Rouillac *et al.*, 2004), (Rouillac *et al.*, 2004). En cas de RhD fœtal positif, le résultat peut être considéré comme acquis.

### II.2.6.2. Anticorps monoclonaux IgG anti-RhD et immunoprophylaxie Rh

Les Ig polyclonales anti-RhD sont utilisées avec succès depuis plus de trente ans pour prévenir l'AIFM anti-RhD. Cependant, la préparation de ces Ig anti-RhD pose au moins, en plus des risques infectieux (Cf. II.2.5.1.), deux problèmes :

- L'approvisionnement en plasmas hyperimmuns anti-RhD qui n'est plus assuré en Europe. Les plasmas proviennent uniquement d'Amérique du Nord (Etats-Unis, Canada).
- Des soucis d'ordre éthique liés à l'immunisation de sujets volontaires sains.

Pour répondre à ces différentes limites et réserves, plusieurs équipes tentent de substituer les Ig polyclonales anti-RhD par des anticorps monoclonaux humains anti-RhD (Kumpel, 2007), (Miescher *et al.*, 2004).

Actuellement, au moins quatre anticorps monoclonaux anti-RhD ont été évalués en clinique.

L'anticorps Rhesoclone<sup>®</sup>, développé en Russie, est produit par une lignée lymphoblastoïde EBV. Pratiquement aucune information n'est disponible sur cet anticorps et sur son utilisation thérapeutique.

Le Laboratoire International de Classement des Groupes Sanguins (*International Blood Group Reference Laboratory: IBGRL*) (Royaume-Uni) a sélectionné deux anti-RhD, l'anticorps BRAD-3 (IgG3) et l'anticorps BRAD-5 (IgG1). Les études cliniques réalisées avec ces anticorps ont permis de montrer qu'ils étaient capables d'induire une immunosuppression, par lyse des GR due à l'action de l'ADCC, chez les sujets RH : -1 ayant reçu des GR RH : 1. En revanche, la clairance des GR observée avec ces anticorps est moins rapide qu'avec des Ig polyclonales anti-RhD de référence, donc présente plus de risque de sensibiliser les lymphocytes B et de déclencher une production d'anti-RhD (Kumpel *et al.*, 2003), (Kumpel, 2007).

L'institut d'immunologie de Berne (Suisse) a également sélectionné un anti-RhD recombinant MonoRho<sup>®</sup>. Cet anticorps testé chez les volontaires RH : -1, a montré une efficacité de prévention de l'immunisation, bien que la clairance des GR RH : 1 injectés chez des sujets RH : -1, soit beaucoup plus faible qu'avec l'anticorps polyclonal Rhophylac<sup>®</sup> utilisé comme témoin (Miescher *et al.*, 2004).

La faible clairance des GR RH : 1 induite par les trois anticorps cités ci-dessus pourrait être une limite à leur utilisation à grande échelle pour la prévention de l'AIFM. En effet, les Ig polyclonales anti-RhD sont capables d'induire l'élimination de plusieurs millilitres de GR RH : 1 en moins de 72 heures après leur injection par voie intraveineuse.

Le LFB (Laboratoire Français du fractionnement et des Biotechnologies) a récemment sélectionné un anticorps monoclonal humain recombinant (T125) sur la base de son activité fonctionnelle. Cet Ig présente une forte liaison aux récepteurs FcγRIII (CD16) et est capable d'induire une activation des cellules effectrices NK, avec comme conséquence la lyse des GR RH : 1. Une étude de spécificité de cet anticorps a été réalisée en comparaison avec un réactif de groupage de référence sur plus de 100 000 prélèvements de donneurs de sang bénévoles. Les résultats montrent une reconnaissance des GR RH : 1, similaire au réactif de groupage anti-RhD à l'exception de quelques GR de catégorie RhD partiel, faiblement représentés dans la population étudiée. Une première étude clinique réalisée chez des sujets volontaires RH : -1, a montré que la clairance des GR RH : 1, induite par cet anticorps est au moins aussi rapide et complète que celle obtenue avec l'Ig polyclonale anti-RhD Rhophylac<sup>®</sup> testée en parallèle comme témoin. Une deuxième étude clinique chez des sujets volontaires RH : -1 est actuellement en cours afin d'évaluer les capacités de clairance et d'immunosuppression de cet anticorps (Cortey *et al.*, 2006).

Ainsi, une nouvelle génération d'anticorps monoclonaux humains anti-RhD a été mise au point et les résultats cliniques obtenus permettent d'envisager qu'ils prendront bientôt place à côté des Ig polyclonales dans l'immunoprophylaxie Rh de la femme enceinte. On ne pourra cependant juger de cette place qu'après une évaluation à grande échelle de ces nouveaux produits (efficacité comparée, résistances éventuelles...) sur le long terme (Cortey *et al.*, 2006).

## **II.3. APPROCHES SPECIFIQUES POUR LE TRAITEMENT DES TUMEURS**

Le cancer est en France la première cause de mortalité chez l'homme, la deuxième chez la femme, immédiatement derrière les maladies cardiovasculaires. Comme il touche en moyenne des sujets plus jeunes que les affections cardiovasculaires, il est la première cause de pertes d'années de vie humaine et la première cause de mortalité entre 30 et 65 ans. Au total, il est à l'origine de plus d'un décès sur quatre en France.

### **II.3.1. Introduction**

L'apparition d'un cancer nécessite, au minimum, l'immortalité de la cellule, le dysfonctionnement de l'apoptose, la transformation en oncogène d'un gène silencieux se trouvant dans les cellules normales (proto-oncogène), et la disparition du gène suppresseur. Il faut, en outre, que la cellule échappe à la surveillance immunitaire et à l'influence de la matrice extracellulaire ou des cellules adjacentes.

La reconnaissance par le système immunitaire des tumeurs humaines a été démontrée par le groupe de BOON T. en 1992 (Boon *et al.*, 1992) grâce à des travaux menés sur des cultures de cellules tumorales de mélanome en présence des lymphocytes du même sujet. Ces recherches ont permis d'identifier les gènes MAGE (*melanoma antigen*) qui codent pour les peptides antigéniques dégradés par les lymphocytes et présentés à leurs surfaces par l'intermédiaire des molécules HLA de classe I.

On distingue plusieurs catégories d'antigènes de tumeurs. Ils peuvent être spécifiques des cellules tumorales ou simplement associés aux tumeurs.

#### **II.3.1.1. Les antigènes spécifiques des tumeurs**

Ils peuvent être le produit d'un gène normalement présent dans le génome mais qui ne s'exprime pas dans les cellules adultes saines. C'est le cas des gènes MAGE (Monte *et al.*, 2006), (Gudat *et al.*, 1996), (Nagel *et al.*, 2003), ( Akcakanat *et al.*, 2006) BAGE (*bladder antigen*) (Grunau *et al.*, 2005), (Nagel *et al.*, 2003), GAGE (*gastric antigen*) (Nagel *et al.*, 2003), (Akcakanat *et al.*, 2006), (Kong *et al.*, 2004), RAGE (*renal antigen*) (Gaugler *et al.*, 1996), (Oehlrich *et al.*, 2005) ou encore de l' $\alpha$ -foetoprotéine (marqueur tumoral du cancer du

foie) (Kamoshida *et al.*, 2006), (Kawai *et al.*, 2001). Aucune expression des gènes MAGE n'est détectable dans les tissus sains, à l'exception des testicules et du placenta, mais 75% des mélanomes expriment au moins un des quatre gènes MAGE. On peut citer également des antigènes partagés par plusieurs types de tumeurs et résultant d'un défaut de glycosylation. Dans les tumeurs mammaires, de l'ovaire ou du pancréas, une glycosylation anormale de la mucine MUC1 (Burdick *et al.*, 1997), (Cao *et al.*, 1997) engendre des déterminants antigéniques nouveaux. La protéine MUC1 peut être clivée et la fraction soluble devient l'antigène circulant CA 15.3, un marqueur très utilisé pour le suivi de certaines patientes atteintes de cancer du sein. Le CA 15.3 n'est décelé à des taux anormaux que pour des tumeurs mammaires déjà importantes. Son augmentation est moins nette pour les cancers génitaux ou digestifs (Bon *et al.*, 1996).

Une mutation ponctuelle peut également conduire à une protéine anormale donnant naissance à un peptide antigénique. Des oncogènes (Ras) ou des gènes suppresseurs (p53) mutés (Noro *et al.*, 2003), (Kusaka *et al.*, 2000), peuvent ainsi se révéler à la fois oncogéniques et antigéniques. Par exemple, dans 50% des cancers du côlon et 90% des adénocarcinomes pancréatiques, les mutations de Ras codent pour une protéine p21Ras connue pour son antigénicité (Mulligan *et al.*, 1999), (Gallick *et al.*, 1985). Il en va de même pour des mutations sur la  $\beta$ -caténine (protéine jouant un rôle important dans la voie de signalisation wnt, impliquée dans la progression tumorale) (Saha *et al.*, 2002) ou encore sur Cdk4 (*Cyclin-dependant protein kinase* : l'une des kinases permettant la phosphorylation de la rétinoblastine (Rb) à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire) (Barbacid *et al.*, 2005). Des protéines cellulaires anormales (et antigéniques) peuvent également provenir de gènes viraux intégrés dans le génome de la cellule tumorale (virus Epstein-Barr (Weinstein, 1991), des hépatites B et C (Tsai *et al.*, 1994), papillomes... (Zur Hausen, 2002)). De la même manière, la translocation observée dans les leucémies myéloïdes chroniques qui aboutit à la fusion des gènes *bcr/abl* est responsable d'une protéine chimérique antigénique ayant un rôle important dans le processus leucémogène (Johansson *et al.*, 2002).

### **II.3.1.2. Les antigènes associés aux tumeurs**

Ces antigènes peuvent être les produits de gènes de différenciation exprimés de façon limitée par les tissus sains, mais surexprimés ou amplifiés dans les tissus cancéreux correspondants. Il s'agit par exemple de protéines spécifiques des mélanomes comme la tyrosinase, la gp100, Melan-A/MART1, gp75 (Pittet *et al.*, 2001), (Van Den Eynde *et al.*,

1997) ou encore de protéines ubiquitaires associées à un état prolifératif comme la télomérase. L'antigène prostatique spécifique (APS) (Armstrong *et al.*, 2005) ainsi que l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) (Berinstein, 2002), (Zbar, 2004), peuvent être classés dans cette catégorie. C'est le cas également des gènes *RU2* et *alt-M-CSF* dans les cellules rénales ; certains transcrits de *RU2* (*RU2A*) ne sont exprimés que dans les cellules tumorales où ils sont antigéniques (Eynde *et al.*, 1999).

### **II.3.1.2.a. EXEMPLE DE L'ANTIGENE CARCINO-EMBRYONNAIRE**

Isolé en 1965 par GOLD et FREEDMAN, l'ACE est une protéine fortement glycosylée, de 180 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) (Gold *et al.*, 1965). Elle possède un domaine N-terminal de 108 aa, ainsi que des domaines A<sub>n</sub> (92 aa) et B<sub>n</sub> (86 aa), similaires, respectivement, aux domaines variables et constants des Ig (Fig. 13, page 33) (Hammarstrom, 1999). Son gène, *CEACAM5* (*CEA-related Cell Adhesion Molecule 5*) situé sur le chromosome 19, n'existe que chez les Primates (Beauchemin *et al.*, 1999). L'ACE est synthétisé principalement dans certaines portions du tube digestif. On le retrouve à la surface apicale des cellules de l'épithélium de la langue, de la portion distale de l'œsophage et de l'estomac (Nap *et al.*, 1988). Il est aussi présent à la surface des microvillosités des cellules cylindriques d'absorption, des cellules à gobelet de l'intestin grêle et du côlon ainsi que dans le mucus produit par ces cellules (Jothy *et al.*, 1993). L'ACE est impliqué dans la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse et dans la reconnaissance et la régulation de la flore bactérienne du côlon sain (Letourneau *et al.*, 1997). Chez l'adulte, il est normalement présent à des concentrations très faibles (<5ng/ml). En oncologie, le gène ACE est surexprimé. Le gradient de sécrétion vers le pôle apical est perturbé, l'antigène est alors distribué sur toute la surface de la cellule et dans l'espace intercellulaire (Benchimol *et al.*, 1989), (Jothys *et al.*, 1993). L'ACE est une molécule dotée de propriétés adhésives, capable d'adhésion homotypique (ACE-ACE) ou hétérotypique avec d'autres molécules de la famille des ACE (Oikawa *et al.*, 1991), le collagène de type I et certaines souches d'*Escherichia coli* (Thompson *et al.*, 1997). La clairance de l'ACE est essentiellement hépatique. Sa durée de demi-vie plasmatique est de quelques jours (Carl *et al.*, 1993). La participation active de l'ACE dans la cancérogenèse et la dissémination métastatique est actuellement clairement établie pour les cancers coliques (Johnson, 1991), (Nollau *et al.*, 1997), (Thompson *et al.*, 1997). De plus, des expériences *in vitro* montrent que l'expression par les cellules tumorales de la molécule d'ACE les protège de la lyse par les NK (Kammerer *et al.*, 1994). Enfin,

l'hyperexpression de l'ACE est impliquée dans des mécanismes de résistance aux chimiothérapies (Kawaharata *et al.*, 1997), (Ross *et al.*, 1997). Cliniquement, son dosage sérique est utilisé après l'intervention chirurgicale comme indicateur de récurrence locale des tumeurs du pancréas, du foie, des poumons, du sein et du côlon ou lors de l'apparition de métastases (Thompson *et al.*, 1991).

Plusieurs applications utilisant l'ACE ont été réalisées dans le but d'induire une réponse immune antitumorale. Deux groupes de stratégies se sont distingués ; le premier utilise, dans le cadre d'une approche vaccinale, des vecteurs viraux ou bactériens exprimant l'ACE (Kaufman *et al.*, 1991), (Xiang *et al.*, 2001) ou des cellules dendritiques chargées de cet antigène ou transfectées avec son ADN ou ARN (Sarobe *et al.*, 2004), (Nair *et al.*, 1998), (Eppler *et al.*, 2002). Le second groupe propose de coupler des fragments d'anticorps anti-ACE, à des scFv spécifiques des marqueurs des LT (exemple ; CD3) (Holliger *et al.*, 1999), à des ligands (exemple ; IL-2 pour les récepteurs IL-2 R des LT et NK) (Liao *et al.*, 2001), à des complexes HLA-peptide exogène, capables d'être reconnus par les LT (Robert *et al.*, 2001), (Kuroki *et al.*, 2005) ou à des enzymes permettant d'activer une prodrogue une fois le complexe fixé à la surface de la cellule cancéreuse (ex : couplage du fragment Fab de l'anticorps A5B7 de l'anti-CEA à la carboxypeptidase bactérienne G2 (CPG2). Ce complexe active une prodrogue de moutarde azotée (ZD2767P) qui entraîne l'apoptose de cellules cancéreuses en modèle *in vitro* (Monks *et al.*, 2001).

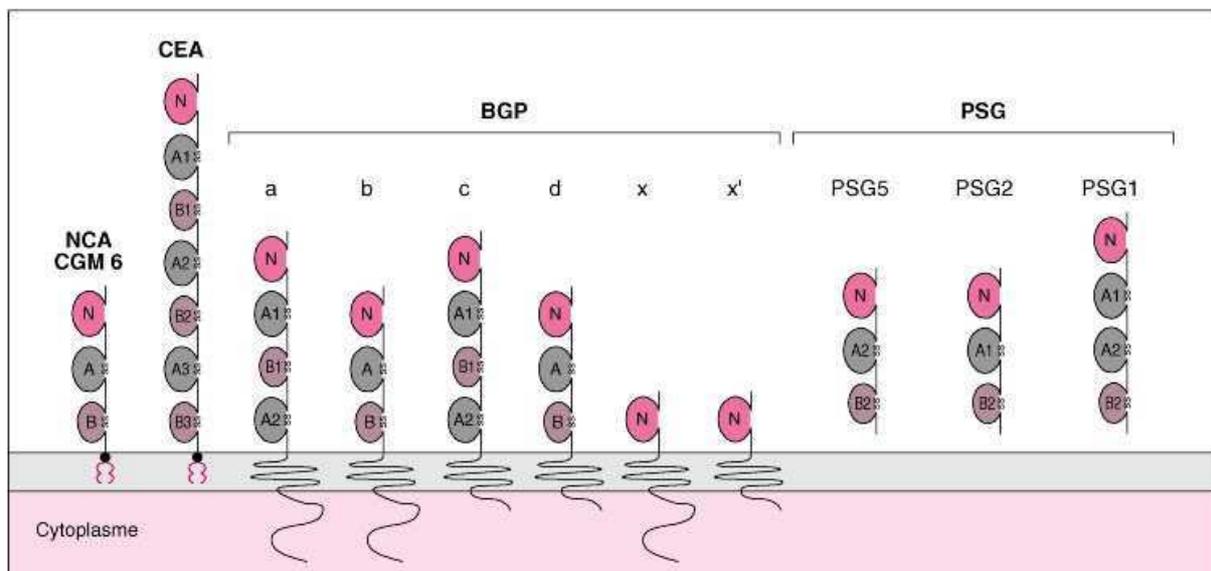


Figure 13. Représentation schématique des protéines de la famille CEA. Sont représentés NCA (*Normal Crossreacting Antigen*) CGM6 (*CEA Gene family Member 6*), CEA, six isoformes de BGP (*Biliary Glyco-proteins*) et trois des protéines PSG (*Pregnancy-Specific Glyco-proteins*). Ces protéines sont constituées de domaines immunoglobulines de type variables (A et B) et constant (N). Les CEA, NCA et CGM6 sont ancrés dans la membrane par un lien phosphatidyl inositol alors que les BGP ont des domaines cytoplasmiques. Les PSG sont sécrétées. (d'après Letourneau *et al.*, 1997).

### **II.3.2. Les mécanismes d'échappement de la cellule tumorale au système immunitaire**

La progression tumorale et son agressivité sont des processus complexes impliquant, dans la tumeur, des altérations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs et, chez l'hôte, un échappement tumoral à un système immunitaire inefficace ou altéré (Hanahan *et al.*, 2000).

La croissance de la tumeur en dépit de son antigénicité reste encore incomplètement comprise, mais de multiples mécanismes peuvent être mis en jeu dans cet échappement au contrôle par le système immunitaire. On peut dans un premier temps rappeler la faible immunogénicité des cellules tumorales qui participe au défaut d'induction ou de maintien de la réponse immunitaire. Celle-ci est, en partie, due à une densité de peptides à leur surface qui n'atteint pas le seuil suffisant pour une reconnaissance efficace par le récepteur du lymphocyte T (TCR). La faible immunogénicité des tumeurs peut également provenir de l'absence de molécules de co-stimulation à leur surface (molécules B7 se liant aux récepteurs CD28 du lymphocyte T), ce qui peut induire des phénomènes d'anergie des lymphocytes spécifiques qui ne répondent plus à l'antigène (Pardoll, 1998). Par ailleurs, contrairement aux agents infectieux, les cellules tumorales n'induisent pas de réaction inflammatoire ni de signaux de « danger », qui jouent un rôle majeur dans l'activation des cellules dendritiques (Matzinger, 2002). Dans ce cas la présentation des antigènes tumoraux, assimilés à des peptides du soi, est réalisée par des cellules présentatrices inductrices de tolérance (Fig. 14). Cette tolérance peut également résulter de la présence des lymphocytes T CD4 immunorégulateurs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), malheureusement activés par les cellules dendritiques (Sakaguchi, 2000), (Catros-Quemener *et al.*, 2003).

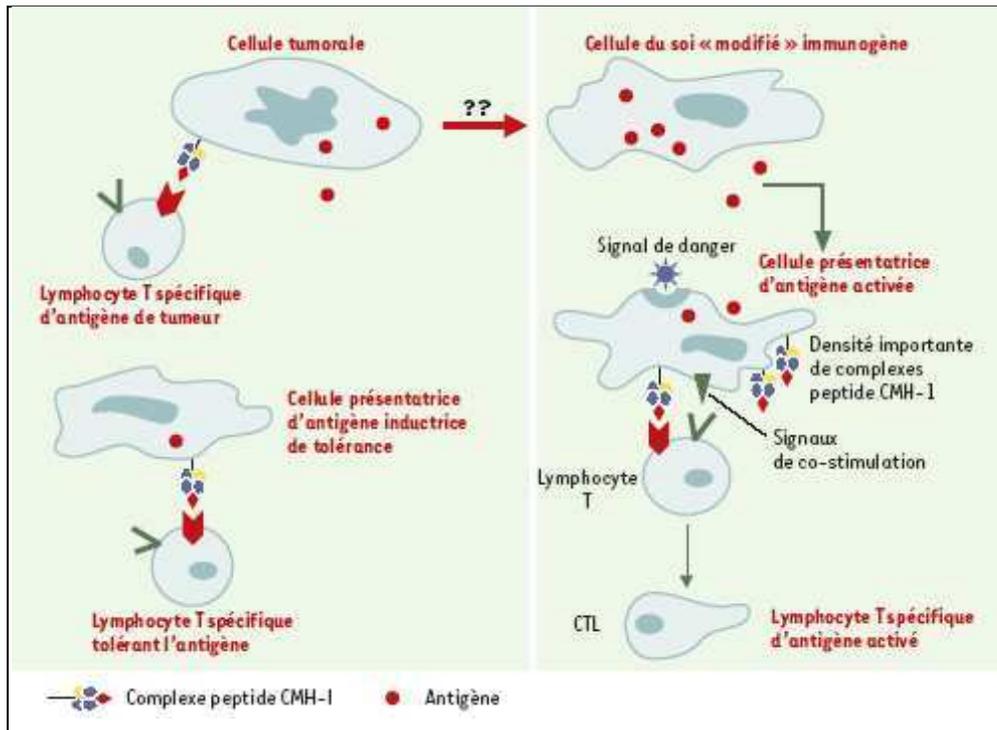


Figure 14. Activation des lymphocytes T spécifiques ou tolérance de l'antigène. La faible immunogénicité des cellules tumorales peut provenir de leur faible densité membranaire en complexes peptide-CMH-I ainsi que de leur incapacité à délivrer les signaux de co-stimulation. L'absence de second signal peut induire des phénomènes d'anergie des lymphocytes T qui deviennent non répondeurs à l'antigène. À l'inverse, en présence de signaux de danger, les mêmes antigènes peuvent être adressés à des CPA activées qui les présentent efficacement. Dans ce cas, les lymphocytes T spécifiques se différencient en CTL (d'après Catros-Quemener *et al.*, 2003).

La sécrétion locale de facteurs suppresseurs contribue également à l'établissement de la tolérance. En effet, des cytokines inhibitrices des réponses immunitaires peuvent être produites localement par les cellules tumorales et leur micro-environnement (Tumor Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), Interleukine 10 (IL-10) ou Prostaglandine E-2 (PGE-2)). Ce contexte peut alors favoriser la différenciation des lymphocytes T en Th2 sécréteurs de cytokines anti-inflammatoires ou encore en lymphocytes à fonction régulatrice (Th3) (Chouaib *et al.*, 1997). De plus, les cellules tumorales peuvent être également dépourvues de molécules d'adhérence aux lymphocytes telles que *Lymphocyte Function-associated Antigen* (LFA-3) ou *Inter Cellular Adhesion Molecule* (ICAM-1), évitant ainsi le contrôle du système immunitaire. Elles peuvent aussi exprimer des molécules anti-adhérentes telles que les mucines, échappant ainsi aux contacts avec les cellules immunocompétentes.

Des cellules résistantes à la lyse peuvent également se trouver progressivement sélectionnées au sein des populations cellulaires tumorales (Bodey *et al.*, 2000). Ces cellules peuvent par exemple exprimer *bcl-2*, un gène anti-apoptotique.

### **II.3.3. Les traitements**

#### **II.3.3.1. Traitements à caractère général**

Le premier traitement du cancer est la chirurgie. Son but est d'enlever la totalité de la tumeur ainsi que ses prolongements éventuels dans les tissus voisins. Comme les cellules cancéreuses peuvent s'essaimer et former ainsi des métastases, on enlève généralement, en même temps que la tumeur primitive, les ganglions des premiers relais ganglionnaires.

Comme la chirurgie, la radiothérapie constitue un traitement loco-régional. Elle utilise des rayonnements ionisants (rayons X et radioactivité) provoquant l'altération du système de multiplication des cellules, ce qui les rend incapables de se diviser ou entraîne la mort des cellules filles. Cependant, il faut à la fois stériliser la totalité des cellules de la tumeur et ne pas léser une proportion trop élevée de cellules saines pour éviter des complications (Poskitt, 1987), (Levitt *et al.*, 1984).

La chimiothérapie agit sur tout l'organisme par arrêt de la mitose en ciblant efficacement les cellules se divisant trop rapidement. Elle permet donc de tuer les cellules cancéreuses quelle que soit leurs emplacements, mais présente l'inconvénient d'agir sur l'ensemble des tissus sains, notamment sur la totalité des tissus hématopoïétiques. Aujourd'hui, on dispose d'une trentaine d'agents cytotoxiques efficaces (Sabharwal *et al.*, 2007).

L'hormonothérapie a fait d'immenses progrès et joue aujourd'hui un rôle majeur dans le traitement des cancers du sein, de la prostate et de la glande thyroïde.

Finalement, la greffe de moelle est utilisée pour traiter certaines leucémies aiguës, notamment celles ne réagissant pas, ou mal, à la chimiothérapie (Santos, 1988).

Ces différentes thérapies ont le même objectif : tuer la totalité des cellules cancéreuses, car quelques unes suffisent à causer une récurrence, tout en lézant aussi peu que possible les tissus sains environnants.

#### **II.3.3.2. Traitements ciblés**

A l'inverse des approches à caractère général pour le traitement du cancer, les connaissances récemment acquises sur l'immunité antitumorale nous laissent espérer, des approches spécifiques, une éradication des cellules néoplasiques sans affecter les cellules normales, et cela quelque soit leur localisation ou leur stade d'évolution.

On peut distinguer quatre démarches spécifiques : la thérapie cellulaire, la thérapie génique, les approches vaccinales et l'utilisation des anticorps monoclonaux.

#### ***II.3.3.2.a. La thérapie cellulaire***

Il faut rappeler les expériences pionnières de l'équipe de ROSENBERG qui, dès 1984 (Mulle *et al.*, 1984), obtenait avec des injections de lymphocytes activés une réduction du nombre et de la taille des métastases dans plusieurs modèles de tumeurs murines. Dans le modèle de macrométastases de l'adénocarcinome du côlon MC 38, c'est non seulement une disparition des métastases hépatiques ou pulmonaires qui était observée, mais une guérison de 100% des souris (Rosenberg *et al.*, 1986). De plus, les souris guéries par ce traitement étaient immunisées contre une nouvelle greffe des cellules provenant de la tumeur d'origine, car les lymphocytes transférés déclenchaient *in vivo* une cascade de sécrétions de cytokines et de coopérations cellulaires amplifiant la réponse spécifique antitumorale.

Plusieurs réponses complètes ont été apportées dans les essais menés par BELLDEGRUN en 1993 puis en 1997. Dans des essais cliniques de phase II, la moitié des patients ont reçu des suspensions cellulaires enrichies en T CD8, et c'est dans ce groupe que le plus grand nombre de réponses a été observé (Figlin *et al.*, 1997). Des essais cliniques de traitement des mélanomes par des lymphocytes activés ont également été menés en France. Un essai effectué à Nantes (INSERM, U463) (Dreno *et al.*, 2002) montre une augmentation significative de la survie sans rechute des patients traités par les lymphocytes activés, par rapport au groupe témoin. Une corrélation est observée entre l'efficacité clinique et le pourcentage de lymphocytes T spécifiques des antigènes de tumeur. Cependant, l'efficacité du traitement n'est observée que pour des patients en phase III.

#### ***II.3.3.2.b. La thérapie génique***

Contrairement à des maladies héréditaires où l'on cherche un fonctionnement permanent du gène, une expression transitoire du gène devrait être suffisante pour obtenir la disparition de la tumeur. A ce jour, la thérapie génique fait appel à deux types d'approches : la modification de la cellule tumorale elle-même de façon à la rendre plus immunogène ou la modification génétique des effecteurs.

- **Modification génique des cellules tumorales** : Le transfert dans les cellules malignes, par exemple, de molécules de co-stimulation (la molécule B7 se liant aux récepteurs CD28 du LT)

ou de molécules d'histocompatibilité HLA de classe I ou II allogéniques (Rosenthal *et al.*, 1996). Dans ces modèles animaux, le transfert de deux gènes (Putzer *et al.*, 1997) l'un qui augmente l'immunogénicité de la cellule maligne et l'autre qui favorise la prolifération des cellules immunocompétentes, s'est avéré plus efficace que le transfert d'un seul des deux gènes.

- **Transfert de gènes dans des cellules immunocompétentes** : Le transfert, par exemple, dans les cellules dendritiques présentatrices professionnelles, du gène codant pour un antigène tumoral avant réinjection de ces cellules au malade (Reeves *et al.*, 1996). Les études réalisées, par exemple, chez les patients atteints de mélanomes métastatiques vaccinés avec des cellules dendritiques chargées d'antigènes de mélanome retreints par les molécules CMH-I, ont permis à plus de 50% des patients de développer une réponse LT cytotoxiques spécifiques aboutissant à une régression tumorale (Marchand *et al.*, 1999), (Schdadendorf *et al.*, 2000).

Une récente étude de l'équipe de ROSENBERG SA, a montré la possibilité de conférer une identification tumorale spécifique par des lymphocytes autologues du sang périphérique en employant un rétrovirus portant l'ADN du TCR spécifique. L'injection de ces cellules transfectées à 15 patients atteints de mélanome métastatique a permis d'augmenter durablement le taux des lymphocytes à TCR spécifiques. Cependant, seulement deux patients ont présenté, un an après, une régression tumorale significative (Morgan *et al.*, 2006).

#### ***II.3.3.2.c. Les approches vaccinales***

Pendant la dernière décennie, la vaccination de patients atteints de cancers a été réalisée avec différentes formes de vaccins.

- **Vaccination avec des peptides** : les peptides des antigènes de mélanome appartenant au groupe des antigènes de différenciation (par exemple, MelanA/MART-1, gp100, tyrosinase) et à celui des antigènes du cancer des testicules (par exemple, MAGE-1 ou 3) ont été les premiers à être utilisés dans des études de phases I/II. Des résultats contradictoires ont été obtenus au sein d'un même groupe d'investigateurs (Marchand *et al.*, 1999). D'autres essais de vaccinations ont été pratiqués chez des patients atteints de cancer du côlon, de l'ovaire, du sein, du pancréas ou ayant des carcinomes cervicaux, en utilisant les peptides portant les mutations de l'oncogène K-RAS en association avec du GM-CSF. Une réponse T spécifique du peptide a été obtenue chez plus de 50% des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique (Gjertsen *et al.*, 2001).

- **Vaccination des tumeurs induites par des virus** : L'origine virale de plusieurs tumeurs est clairement établie. Ainsi l'identification des protéines virales permet-elle la préparation de vaccins susceptibles d'induire une forte réponse immune pouvant contrôler la croissance des cellules tumorales. A cet égard, l'analyse de la présence de protéines du virus HPV qui est à l'origine du cancer du col utérin, a permis d'identifier plusieurs peptides HPV capables d'induire une réponse lymphocytaire T suite à leur présentation par les CPA (Muderspach *et al.*, 2000).

En 2006, le vaccin Gardasil® a obtenu l'autorisation européenne de mise sur le marché. Ce vaccin protège des papillomavirus humain de types 6, 11, 16 et 18 (Koutsky *et al.*, 2006).

- **Vaccination avec des anticorps anti-idiotypiques** : Les anticorps peuvent générer une réponse immune dirigée contre leurs propres déterminants idiotypiques aboutissant à une réponse anti-idiotype. Les anticorps anti-idiotypiques peuvent mimer la structure de l'antigène externe et induire une réponse immune similaire à celle qui est développée contre les antigènes ayant servi à l'immunisation initiale (Bhattacharya *et al.*, 2000).

Une étude publiée par l'équipe de STEVENSON FK a montré que la fusion du gène codant le scFv correspondant à un anticorps anti-idiotypique des lymphomes B, avec la séquence codant le fragment C de la toxine tétanique (TTFgC), a permis d'augmenter de plus de 50% la réponse anti-idiotypique, comparée au vaccin contenant uniquement l'ADN du scFv de l'anticorps (Spellerberg *et al.*, 1997). Cette association faisant intervenir le TTFgC, un puissant recruteur des CPA, a contribué à affaiblir significativement la tolérance à l'égard des cellules cancéreuses dans un modèle murin, en augmentant leur immunogénicité.

#### ***II.3.3.2.d. Utilisation des anticorps monoclonaux***

Le premier essai clinique d'un anticorps monoclonal pour le traitement d'une néoplasie maligne (lymphome) a été décrit en 1980 (Nadler *et al.*, 1995). Le travail « pionnier » du groupe de MILLER R et LEVY R a permis de démontrer l'efficacité d'anticorps monoclonaux dirigés contre les lymphomes à cellules B (Miller *et al.*, 1982). Ces recherches ont permis de créer le Rituximab (IDEC-C2B8 ou Rituxan® ou MabThera®), devenu en 1997 le premier anticorps monoclonal accepté par les autorités américaines dans le traitement de certains lymphomes. Cet anticorps chimérique dirigé contre l'antigène CD20, trouvé dans plus de 95% des cas de lymphomes non Hodgkiniens à cellules B, stimule une réaction lytique conduisant à la mort de la cellule suite à la fixation des cellules effectrices (LT cytotoxiques

ou cellules NK) à sa portion Fc. Il active également la cascade du complément (Fig. 15, A, B, page 43). De plus, sa liaison au CD20 entraîne une augmentation du calcium intracellulaire des cellules cibles, les bloquant en phase G1 et conduisant à leur apoptose. Des rémissions complètes ont été obtenues dans près de 80% des cas pour certains sous-types.

Dans le but d'améliorer son efficacité, une étude récente a proposé d'associer le Rituximab à l'IL-2. Le produit obtenu a montré une activité ADCC améliorée dans des modèles murins de lymphomes non Hodgkiniens (Gillies *et al.*, 2005) (Fig. 15, G).

Cependant plusieurs effets secondaires ont été associés au Rituximab : syndrome de lyse tumorale, toxicité rénale, arythmie cardiaque, réactions mucocutanées sévères et immunogénicité (Tabrizi *et al.*, 2007).

D'autres anticorps ont été décrits pour le traitement des hémopathies malignes tels que le Tositumomab (Bexxar®), une IgG<sub>2a</sub> murine couplée à l'iode 131 et dirigée contre le CD20 (Kaminski *et al.*, 2001), ou l'Ibritumomab (Zevalin®) ; anticorps murin couplé à l'yttrium 90 (Witzig *et al.*, 2002) (Fig. 15, D). A cause de leur origine murine, ces anticorps sont immunogènes et sont neutralisés par les anticorps de certains patients. De plus, ils n'ont montré d'efficacité relative que pour les applications à caractère locorégional et les traitements des affections résiduelles (Zafir-Lavie *et al.*, 2007).

Des traitements remarquables des leucémies résistantes à la chimiothérapie ont été entrepris à l'aide des immunotoxines (Fig. 15, E) (Kreitman *et al.*, 2005). Dans cette thérapie dite « par les missiles guidés », les agents toxiques sont délivrés spécifiquement aux cellules tumorales. L'un des exemples les plus intéressants est celui de la molécule recombinante RFB4 (dsFv)-PE38, composée du domaine variable de l'anticorps monoclonal RBF4 dirigé contre l'antigène CD22 (une molécule d'adhésion très fortement exprimée sur les cellules B leucémiques). Ce domaine variable est fusionné au fragment PE38 de l'exotoxine de *Pseudomonas*, contenant des domaines responsables de la mort cellulaire.

Les essais cliniques de phase I ont permis d'obtenir 61% de rémissions complètes. Cependant une neutralisation de la molécule à cause de son immunogénicité, a été observée chez 24% des patients (Kreitman *et al.*, 2005).

Dans le but d'améliorer l'index thérapeutique de la chimiothérapie, la thérapie utilisant les prodrugs d'enzymes vectorisées par les anticorps (ADEPT : *Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy*), a vu le jour début des années 1990. Elle consiste à vectoriser, à l'aide d'un anticorps monoclonal, une enzyme à la surface de la cellule tumorale. L'enzyme joue le rôle de facteur multiplicateur par catalyse d'une réaction chimique se réalisant à la surface de la cellule cible et démasquant une prodrug non toxique en drug cytotoxique (Fig. 15).

Une variété d'enzymes et de prodrogues ont été utilisés. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus dans une étude clinique de phase I utilisant un Fab anti-CEA conjugué à la carboxypeptidase bactérienne G2. Ce complexe active une prodrogue : le glutamate de moutarde, entraînant l'apoptose des cellules cancéreuses (Napier *et al.*, 2000).

Malgré des résultats encourageants, cette approche est loin de présenter actuellement un traitement antitumoral standard. De nombreux obstacles liés à la réduction de l'immunogénicité des enzymes bactériennes et aux choix des prodrogues restent à surmonter.

Le premier anticorps autorisé pour le traitement d'une tumeur solide (cancer du côlon) est l'Edrecolomab (Panorex®), en 1996. Cet anticorps murin est dirigé contre l'antigène CD17-1A, surexprimé par de nombreuses tumeurs épithéliales et qui aurait un rôle dans l'adhésion cellulaire (Gambill, 2001). Cependant, ce traitement très bien toléré n'a pas montré d'efficacité chez les patients en phase II et phase III (Colacchio *et al.*, 2004).

Le Trastuzumab (Herceptin®), autorisé en 1998, est utilisé pour l'immunothérapie des cancers du sein métastatiques. C'est un anticorps humanisé dirigé contre le produit du proto-oncogène HER-2/neu/c-erb-B2. Ce produit, une glycoprotéine (p185 HER-2 ou HER-2) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de la famille des EGFR (Récepteurs des facteurs de croissance épidermiques), surexprimé notamment par les cellules du cancer du sein (Fig. 15, C, page 43).

La plupart des patientes présentent une résistance intrinsèque au traitement (65 à 85%) et celles qui y répondent ont une courte rémission inférieure à un an (Vogel *et al.*, 2002). L'association du Trastuzumab au Paclitaxel (Paxene®) (Seidman *et al.*, 2001) ou au Docetaxel (Taxotère®) (Esteva *et al.*, 2002) (agents inhibiteurs de la prolifération cellulaire utilisés en chimiothérapie), a permis d'augmenter le taux de rémission et de réduire significativement la mortalité due au cancer du sein.

Des résultats similaires ont été récemment obtenus en utilisant le Panitumumab (Vectibix®), anticorps monoclonal anti-EGFR, complètement humanisé, dans des essais cliniques de phase III sur des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques pour lesquels la chimiothérapie était inefficace (Gibson *et al.*, 2006).

Pour pallier à l'expression hétérogène d'un antigène tumoral et/ou éviter la sélection clonale de cellules tumorales n'exprimant plus l'antigène cible, un mélange d'anticorps dirigés contre plusieurs antigènes associés aux tumeurs sera utilisé. Par exemple une combinaison de trois anticorps a été testée pour éliminer avant une greffe, les cellules de

lymphomes résiduelles présentes dans la moelle osseuse, conduisant à diminuer de mille à un million de fois le nombre de cellules tumorales (Gribben *et al.*, 1991).

Les immunologistes cherchent également à sélectionner des anticorps dirigés contre des antigènes aussi spécifiques que possible des cellules tumorales et d'autres pouvant être actifs indirectement en stimulant des récepteurs clefs présents sur les cellules du système immunitaire. Parmi les anticorps les plus étudiés, on trouve les anti-CTLA-4, anti CD40 et anti-CD137 (Glennie *et al.*, 2000). Le but de ces anticorps est de stimuler les CPA ou les LT (anti-CD40 ou anti-CD137) ou de bloquer les signaux inhibiteurs délivrés à ces cellules par des récepteurs tels que CTLA-4, afin de stimuler les cellules T antitumorales ou les cellules inflammatoires et les rendre capables d'éradiquer les cellules cancéreuses.

L'une des approches les plus récentes pour le traitement des tumeurs est l'inhibition de l'angiogenèse dans le but de priver la masse cancéreuse des nutriments et de l'oxygène.

En 2004, les autorités Américaines ont approuvé le Bevacizumab (Avastin®), anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), pour le traitement du cancer colorectal métastatique (Liao *et al.*, 2001) (Fig. 15, H, page 43).

Cette approche présente l'avantage d'utiliser un seul agent anti-vasculaire pour traiter une grande variété de tumeurs (Eichhorn *et al.*, 2004). Cependant, malgré le faible niveau de prolifération vasculaire pour l'ensemble des tissus sains chez l'adulte, ce traitement ne peut être proposé dans certaines conditions notamment en cas de cicatrisation tissulaire. Son utilisation a entraîné également quelques effets secondaires : hémorragies, ulcères gastro-intestinaux, hypertension et immunogénicité (Tabrizi *et al.*, 2007).

D'autres nouvelles approches ont proposé d'utiliser les anticorps bispécifiques permettant de se lier à la fois à un antigène tumoral et aux cellules effectrices (CTL et NK). Les plus étudiées sont les molécules bispécifiques engageant les LT (BiTEs : *Bispecific T cell Engagers*) contenant une valence anti-CD3 (Hoffmann *et al.*, 2005) et dont le plus prometteur est un anti-HER2 x anti-CD3 Ertumaxomab (Rexomun®) (Gibson *et al.*, 2006) (Fig. 15, I). Leur utilisation en thérapeutique reste cependant confrontée à plusieurs obstacles tels que leur durée de demi-vie limitée (Schlereth *et al.*, 2005) et l'inefficacité des lymphocytes infiltrants tumoraux activés (TIL) dans certains cas (Whiteside, 1999).

En conclusion, les résultats obtenus après utilisation de ces anticorps étaient parfois encourageants. Cependant, des difficultés liées à la nature de la réponse immunitaire des patients, à l'adaptation aux stades de la maladie, ainsi qu'aux potentialités des anticorps restent à surmonter. De plus, à cause de leur origine murine, certains de ces anticorps sont immunogènes et ne peuvent donc pas être utilisés à plus de deux ou trois reprises.

Certains effets secondaires indésirables ont également été notés au cours des traitements avec certains de ces anticorps : réactions mucocutanées sévères, toxicité rénale, toxicité et arythmie cardiaques, hémorragies, ulcères gastro-intestinaux, hypertension ... (Tabrizi *et al.*, 2007).

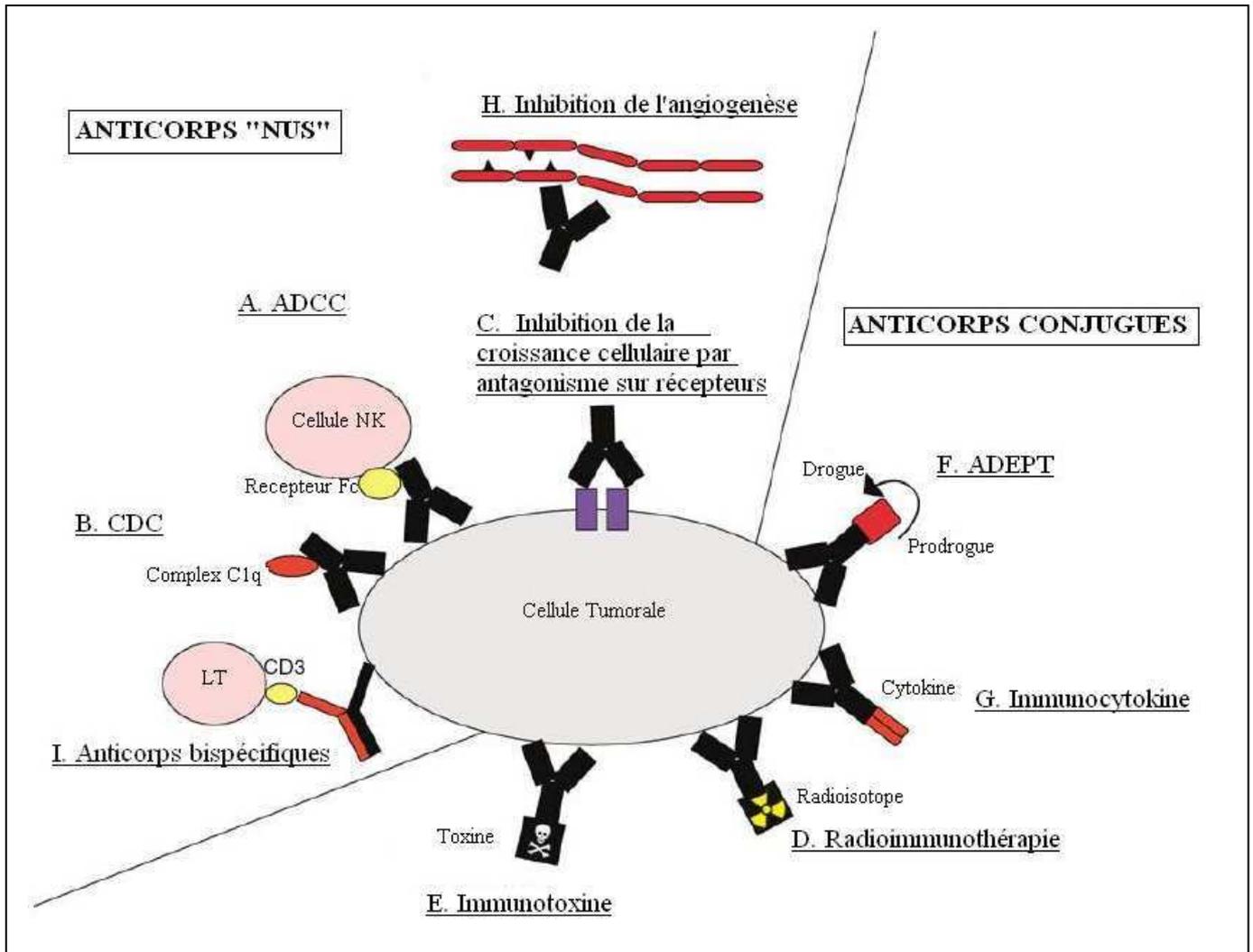


Figure 15. Mécanismes d'actions antitumorales des anticorps monoclonaux (AcM). La plupart des AcM activent le système immunitaire via la cytotoxicité cellulaire dépendant des cellules (ADCC) (A) et la cytotoxicité dépendant du complément (CDC) (B). Les AcM peuvent également agir en altérant la transduction du signal pour induire l'apoptose et / ou l'inhibition de la croissance de la cellule tumorale en agissant comme antagonistes sur les récepteurs (C). Couplés aux radioisotopes (D) ou aux toxines (E), les AcM peuvent tuer les cellules tumorales directement ou en activant les prodrugs selon le concept ADEPT (F). Le couplage des AcM aux cytokines peut stimuler directement la réponse immunitaire antitumorale (G). Les AcM spécifiques des antigènes des nouveaux vaisseaux sanguins peuvent empêcher l'angiogenèse (H). Les molécules bispécifiques engageant les LT (BiTEs) peuvent rediriger les LT cytotoxiques contre les cellules cibles (I). (d'après Zafir-Lavie *et al.*, 2007).

### **III. SYSTEMES DE CIBLAGE CELLULAIRE**

#### **III.1. Structure, spécificité et différentes classes d'anticorps**

Les anticorps ou immunoglobuline (Ig) sont des glycoprotéines de 150 kDa, composées de deux chaînes lourdes identiques (H : *heavy chain*) et deux chaînes légères identiques (L : *light chain*). Les chaînes L possèdent deux formes différentes kappa ( $\kappa$ ) et lambda ( $\lambda$ ). Les résidus cystéine forment des ponts entre les chaînes d'une Ig (Fig. 16, A2, page 46). Le clivage d'une molécule d'Ig par la papaine produit deux fragments identiques capables de fixer l'antigène (fragments Fab : fragment antigen-binding) et un fragment Fc (fragment cristallisable) responsable de la liaison aux récepteurs de certaines cellules immunitaires (phagocytes, granulocytes, macrophages...), ainsi qu'au facteur C1q du complément (Fig. 16, A1). Les chaînes L sont composées de deux domaines de taille similaire : la partie constante CL montre peu de variabilité entre les diverses Ig, alors que la partie variable VL est caractérisée par une variabilité extrême de la séquence primaire. Les deux domaines sont composés d'environ 110 aa. Les chaînes H sont également composées d'un domaine variable VH et de trois domaines constants CH excepté les IgM et les IgE qui comportent quatre CH. L'association entre les chaînes L et H se fait par l'intermédiaire de liaisons covalentes (pont disulfure entre les extrémités C-terminales des modules CL et CH1) (Fig. 16, A2) et non covalentes (interactions aux interfaces VL-VH et CL-CH1). L'assemblage des chaînes H implique également des interactions covalentes (ponts disulfure dans la région charnière) et non covalentes (entre les modules CH2 et CH3). Chaque module possède un pont disulfure, nécessaire à son repliement correct (Fig. 16, A2). Les divers domaines des Ig possèdent des structures globulaires similaires avec plusieurs feuilletts anti-parallèles et des ponts disulfure (Fig. 16, B). Ces domaines caractérisent la superfamille des Ig. Outre les Ig, de nombreuses molécules font partie de cette famille : le récepteur des cellules T (TCR), les molécules du CMH de classe I et II, certaines molécules impliquées dans les interactions cellulaires telles que CD4, CD8, CD19, et CD22, le récepteur des Ig polymériques qui permet le passage d'IgA et d'IgM à travers les cellules épithéliales et, enfin, des molécules d'adhésion telles que CD56.

Les domaines variables des chaînes H et L contiennent des régions avec une variabilité extrême de la séquence des aa : les régions hypervariables. Il s'agit de segments de 6 à 8 aa

localisés respectivement autour des positions 30, 50 et 93 des chaînes L ou des positions 32, 55 et 98 des chaînes H. Ils déterminent la spécificité de la liaison de l'antigène et sont appelés régions déterminant la complémentarité (CDR) (Fig. 16, C, page 46). La substitution d'un seul aa dans ces régions peut altérer la fixation d'un antigène.

On distingue cinq classes d'Ig :

- Les IgG : fournissent la plupart des Ig du sérum (80%). Sont composées de quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Sont toujours monomériques et interviennent au cours de la réponse immunitaire secondaire (Fig. 17, B, Page 47).
- Les IgA : représentent 13% des Ig, sont composés de deux sous-classes IgA1 et IgA2 possédant un nombre différent de ponts disulfure dans la région charnière. Les IgA sont généralement monomériques à l'exception de 15% sous forme de dimères. Ils sont fortement glycosylés et ne peuvent pas fixer le complément mais interviennent dans la protection des muqueuses (Fig. 17, A).
- Les IgM : 6% des Ig, forment majoritairement des complexes pentamériques. L'association des monomères se fait à l'aide de chaînes J reliant les CH4 et de ponts disulfure entre les CH3. Les IgM fixent le complément avec une haute affinité et sont la première classe d'Ig produite dans la réponse immunitaire primaire (Fig. 17, A).
- Les IgD : 0,1% des Ig, sont monomériques et fréquemment trouvées à la surface des cellules B. Leur fonction précise dans le sérum est inconnue (Fig. 17, A).
- Les IgE : seulement 0,002% des Ig, sont monomériques, se lient aux granulocytes basophiles et aux mastocytes. Ils sont importants dans la défense contre les parasites et jouent un rôle crucial dans les réactions d'hypersensibilité immédiate (Fig. 17, A).

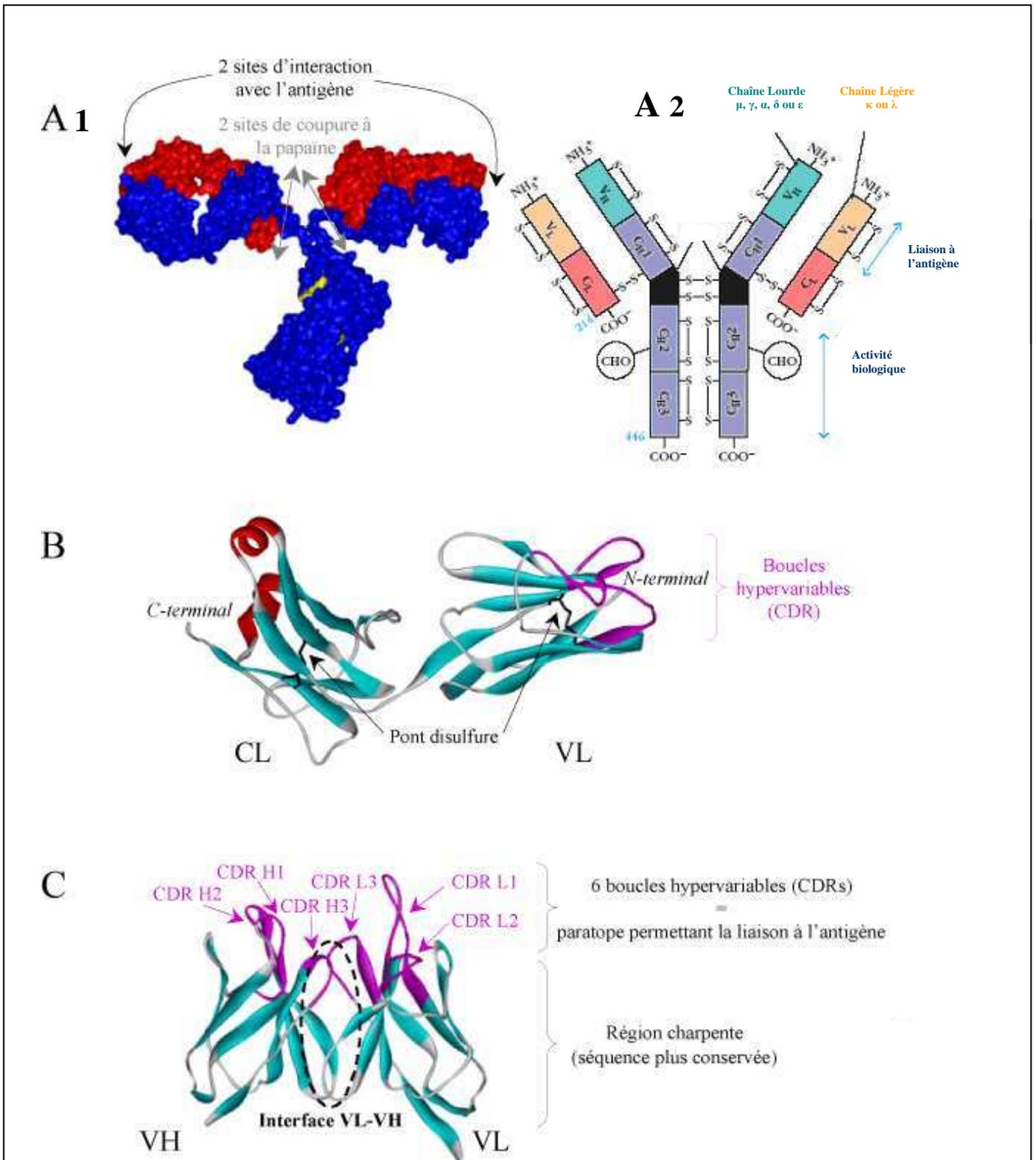


Figure 16 : Structures générale et détaillée d'une Immunoglobuline. **A1**, Structure schématique d'une Ig montrant les sites d'action de la papaïne, aboutissant à un fragment Fc et deux fragments Fab capables de fixer l'antigène. **A2**, Représentation schématique de la structure d'une Ig. Chaque chaîne lourde et chaque chaîne légère contient une région N-terminale variable constituée de 100-110 aa. Le reste de chaque chaîne de la molécule, les régions constantes (rouge et violet), présente une variation limitée qui définit les deux sous-types des chaînes L et les cinq sous-classes des chaînes H. Certaines chaînes H ( $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\alpha$ ) contiennent aussi une région charnière riche en proline (noire). Les chaînes L et H sont repliées en domaines maintenus par une liaison disulfure intrachaîne. Les chaînes H  $\mu$  et  $\epsilon$  qui n'ont pas de région charnière, contiennent un domaine supplémentaire dans le milieu de la molécule. Un groupement carbohydrate est lié à chacun des modules CH2. **B**, Représentation sous forme de ruban de la chaîne légère d'une IgG. **C**, Représentation sous forme de ruban d'un fragment variable (Fv). Le site de liaison à l'antigène, ou paratope, est partagé entre les modules VH et VL. L'association des deux modules forme une structure en tonneau de feuillets  $\beta$ , dont les extrémités sont constituées par 6 boucles : boucles hypervariables ou CDRs (complementarity determining region) qui permettent la reconnaissance de l'antigène de manière spécifique. (d'après <http://www.ibs.fr/ext/labs/LIM>).

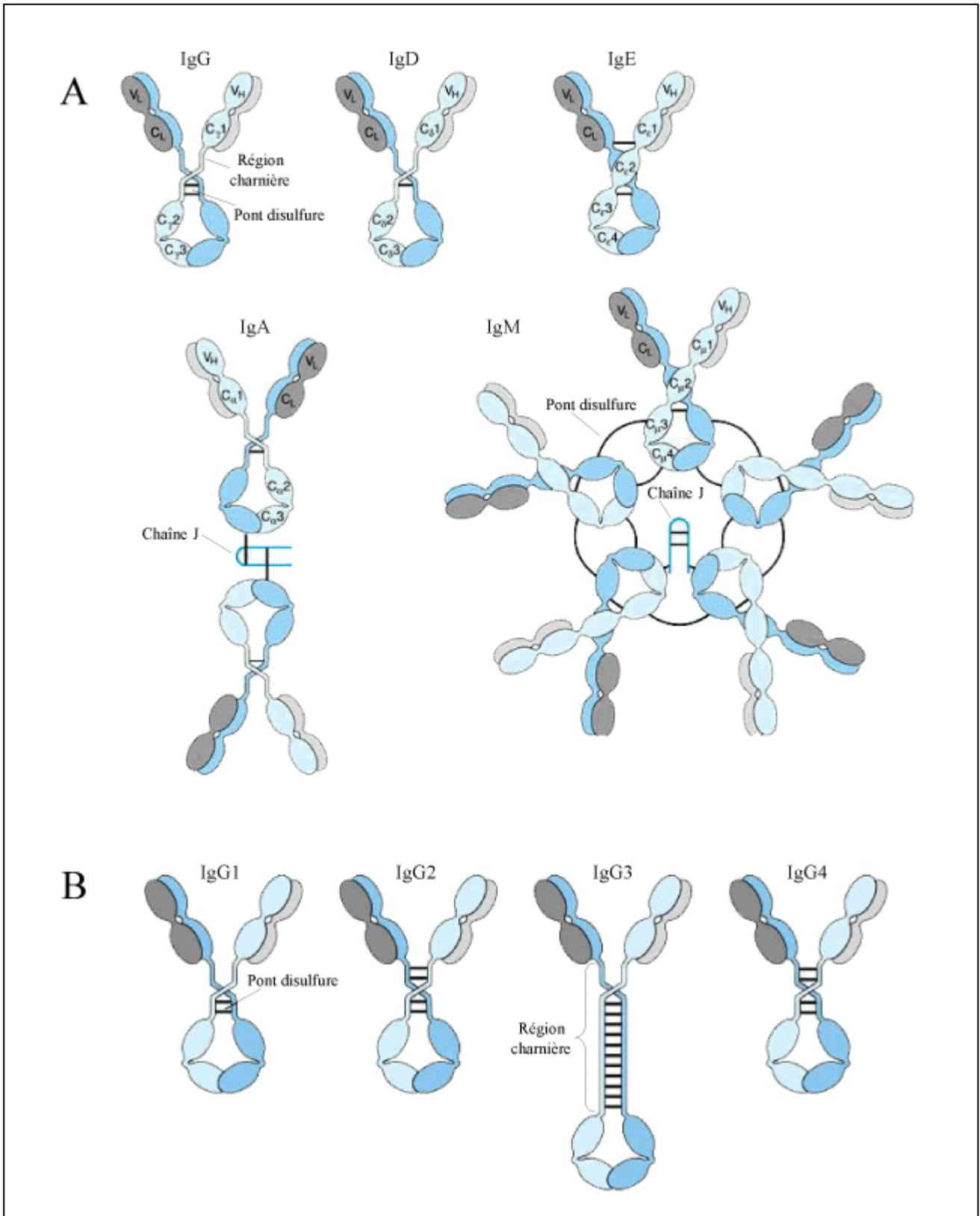


Figure 17 : Structure générale des différentes classes d'immunoglobulines. Les chaînes légères sont représentées en gris et les chaînes lourdes en bleu. Les ponts disulfures inter-chaînes sont indiqués par des lignes noires. **A**, Les différentes classes d'immunoglobulines. Les IgG, IgD et IgE sont toujours présentes sous forme de monomères dans le sérum, alors que les IgA sont majoritairement sous forme de dimères et les IgM sont presque toujours pentamériques. Les oligomères d'IgA et d'IgM comportent un polypeptide, la chaîne J, permettant de relier entre elles les régions Fc à l'aide de 2 ponts disulfures. **B**, les 4 sous-classes d'IgG humaines. (d'après <http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm>).

## **III.2. Ingénierie des anticorps**

### **III.2.1. Anticorps recombinants**

En 1975, KOHLER et MILSTEIN ont développé la technologie des anticorps monoclonaux (AcM) (Kohler *et al.*, 1975), en immortalisant des lignées de cellules murines sécrétant un seul type d'anticorps avec une spécificité antigénique unique. Grâce à cette technologie, l'isolement et la production des AcM dirigés contre des protéines, des hydrates de carbone, des acides nucléiques, et des haptènes ont été réalisés.

En raison de la difficulté de produire des AcM humains et des complications qui résultent de l'utilisation de AcM de souris chez l'Homme (production d'anticorps humains anti-souris : HAMA et clairance rapide), des efforts en vue de produire des AcM hybrides et des sites de liaison d'anticorps par la technologie de l'ADN recombinant ont été entrepris. Il est possible de concevoir et de construire des gènes qui codent des molécules d'Ig dans lesquelles les régions variables viennent d'une espèce et les régions constantes d'une autre. Ainsi des AcM chimériques ou hybrides ont été obtenus, tels que les anticorps humanisés dont la spécificité antigénique (VH et VL) dérive de l'ADN de souris, et l'isotype (CH et CL) est issu de l'ADN humain (Boulianne *et al.*, 1984). Ces AcM présentent une immunogénicité réduite, un bon recrutement des effecteurs de l'immunité cellulaire par le Fc et une demi-vie plasmatique plus importante que les AcM de souris (Bitella *et al.*, 1992). Cependant, les AcM chimériques peuvent induire la production d'anticorps anti-chimériques (HACA) en réponse aux domaines variables murins.

Cette immunogénicité a pu être réduite grâce à l'insertion des CDR des anticorps murins dans la charpente de l'anticorps humain. Les anticorps obtenus sont humanisés à 90%. Dans ce cas les réponses HAMA sont très rares (Riechmann *et al.*, 1988).

### **III.2.2. Fragments d'anticorps recombinants**

PORTER a démontré, en 1959, qu'il était possible d'obtenir des fragments d'anticorps en réalisant des digestions enzymatiques. On peut ainsi obtenir des fragments Fab et Fc par digestion avec la papaine (Fig. 16, A1). Le fragment Fab (50 kDa) conserve la capacité de lier l'antigène alors que le fragment Fc (50 kDa) conserve toutes les autres fonctions de l'anticorps (activation du complément, ADCC, fixation aux récepteurs...).

Malgré le développement de la technologie des AcM, de nombreuses applications spécifiques se sont heurtées à une faible stabilité ou à une spécificité insuffisante de ces derniers. Le développement de l'ingénierie des fragments d'anticorps a donc été entrepris, afin de tenter de résoudre ces problèmes.

Divers fragments d'anticorps recombinants Fab, Fv (fragments variables), scFv (*single chain Fv*) et dsFv (*disulfide bond stabilised Fv*), contenant tous, les sites de reconnaissance spécifique des anticorps ont été utilisés dans un but thérapeutique, en raison de leur propriétés de ciblage spécifique d'antigènes (Better *et al.*, 1988), (Hoogenboom *et al.*, 1991).

### **III.2.2.1. Les fragments variables (Fv)**

Les fragments Fv sont les plus petites entités capables de lier l'antigène. Elles sont constituées par les deux modules variables VH et VL assemblés sous forme fonctionnelle, et interagissent de façon monovalente avec leur antigène. Cependant, l'interaction entre les deux modules est très faible, la structure du Fv est donc peu stable. En effet, dans le fragment Fab, les deux chaînes sont maintenues sous forme d'hétérodimères par les interactions entre domaines VH et VL, mais surtout entre les domaines CH1 et CL. Les domaines variables ont tendance à se dissocier une fois dilués car le fragment Fv est dépourvu des domaines CH1 et CL.

BIRD a proposé, en 1988, une solution consistant à relier les ADN des deux domaines, par une séquence flexible de liaison de 10 à 25 aa (*Linker*). Le résultat est une molécule de fragment variable en chaîne unique (scFv) (Bird *et al.*, 1988), (Worn *et al.*, 2001), (Raag *et al.*, 1995).

#### ***III.2.2.1.a. Les fragments variables en chaîne unique (scFv)***

Le fragment scFv (28 kDa), possède une affinité élevée pour son antigène et peut être aisément exprimé dans plusieurs systèmes de productions (Verma *et al.*, 1998) (Fig. 18, page 53). Le peptide de liaison (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> est le « *linker* » le plus classiquement utilisé pour joindre les deux modules VH et VL, mais d'autres séquences peuvent être également utilisées (Bird *et al.*, 1988), (Huston *et al.*, 1988), tableau (III).

<b>VH-Linker-VL</b>		
H113 (S)	-GGGSGGGSGGGGS-	L1 (D)
H113 (S)	-GGGSGGGSGGGGS-	L1 (Q)
H113 (S)	-SGGGSGGGSGGGGSQ-	L1 (Q)
<b>VL-Linker-VH</b>		
L105 (L)	-KESGSVSSEQLAQFRSLD-	H2 (V)
L105 (K)	-EGKSSGSGSESKST-	H1 (Q)
L107 (K)	-GSTSGSGKSSEGKG-	H1 (Q)

Tableau III : Séquences protéiques et points d'ancrage des *linkers* permettant la construction des scFv. Les *linkers* sont insérés entre la chaîne lourde (H) et la chaîne légère (L). Le chiffre suivant H ou L indique la position où est inséré le *linker*, la lettre entre parenthèses indique l'acide aminé au point d'ancrage du linker. Les *linkers* les plus utilisés contiennent des glycines (G) et des sérines (S) qui donnent de la flexibilité. D'autres comportent des glutamines (E) et des lysines (K), importantes pour la solubilité de la molécule. (d'après Pantoliano *et al.*, 1991).

Selon le *linker* utilisé, les fragments scFv peuvent être plus ou moins facilement dégradés par protéolyse (Whitlow *et al.*, 1993). Avec le développement des techniques de l'ingénierie génétique, ces limitations ont été surmontées, grâce aux recherches portant sur l'amélioration de la stabilité, la solubilité et de la fonctionnalité des scFv (Worn *et al.*, 2001).

Une alternative intéressante propose de lier de façon covalente les deux domaines variables, en rajoutant une cystéine par domaine au niveau de l'interface VH-VL. L'établissement du pont disulfure a permis de stabiliser la structure du scFv (Glockshuber *et al.*, 1990), (Reiter *et al.*, 1996) et a donné naissance aux dsFv. Cette technique permet la plupart du temps d'obtenir des produits plus stables mais ajoute une difficulté lors du repliement de la protéine. De plus, il est souvent nécessaire de connaître la résolution de la structure du fragment pour pouvoir placer correctement les cystéines.

L'orientation VH linker VL ou VL linker VH peut influencer le taux d'expression. La longueur du peptide de liaison est aussi importante, elle doit être comprise entre 35 et 40 Å (Bird *et al.*, 1988). Sa valeur influence l'état d'oligomérisation des scFv (Kortt *et al.*, 1997). Un peptide plus court (moins de 12 aa) entraîne la formation de fragments bivalents, trivalents ou tétravalents, car l'encombrement stérique empêche l'association du domaine VH au VL (Sawyer *et al.*, 1994). Par conséquent, le domaine VH peut s'associer à un domaine VL d'une autre molécule (et réciproquement pour le domaine VL).

Les scFv retiennent généralement la même affinité que le fragment Fv parental (Hudson, 1998). Du fait de leur taille réduite, ils présentent des propriétés pharmacocinétiques particulières et pénètrent mieux dans les tissus, d'où leur grand intérêt dans les thérapies antitumorales (Raag *et al.*, 1995).

### **III.2.2.1.b. Les bi-anticorps**

Souvent rencontrés lors de la production de fragments scFv, ces dimères ont fait l'objet de plusieurs études dans le but d'exploiter ce phénomène pour créer de nouvelles molécules bivalentes formées par l'association non covalente de deux scfv (Essig *et al.*, 1993), (Holliger *et al.*, 1993).

Grâce au couplage VL-VH intermoléculaire, les bi-anticorps (ou *diabodies*) peuvent être unispécifiques (donc à avidité accrue) ou bispécifiques. La petite taille du peptide de liaison (1 à 12 aa) est une condition nécessaire à l'obtention de telles molécules (50 kDa) (Fig. 18, page 53).

Les bi-anticorps bivalents présentent un grand potentiel et ont déjà été utilisées dans diverses applications.

KONTERMANN *et al.* ont construit des bi-anticorps (anti-lysozyme / anti-C1q) capables de recruter les composantes du complément, et ont pu observer une lyse efficace d'érythrocytes recouverts de lysozyme (Kontermann *et al.*, 1997). De même, une étude de HOLLIGER, a montré la possibilité de cibler et détruire les lymphomes par les cellules T cytotoxiques, en utilisant un bi-anticorps anti-marqueur de lymphome B / anti-CD3 (Holliger *et al.*, 1996). La grande efficacité observée peut s'expliquer par la courte distance de 65 Å qui sépare les cellules interagissant par l'intermédiaire du bi-anticorps (moins de la moitié de la distance par rapport aux IgG). D'autres travaux de la même équipe, ont permis d'obtenir des bi-anticorps capables de recruter le complément, les cellules T cytotoxiques et les phagocytes. Ces molécules bispécifiques anti-cible / anti-chaîne d'IgG sont capables de lier toutes les IgG circulantes du sérum et donc toutes les fonctions qui leurs sont associées (Holliger *et al.*, 1997).

Ces exemples d'applications montrent le grand intérêt thérapeutique des bi-anticorps qui s'ajoute à leur utilité évidente pour les diagnostics immunologiques.

Le bi-anticorps (anti-cible / anti-β galactosidase) a été utilisé en microplaque pour détecter le lysozyme. Il a permis de mettre en évidence la gp120 par immunorévélation sur des extraits

cellulaires, ou encore de révéler le CEA par coloration immunocytochimique de cellules Hela (Kontermann *et al.*, 1997).

### **III.2.2.1.c. Les tri-anticorps et les tétra-anticorps**

Dans certaines conditions (absence de peptide de liaison ou peptide de liaison de 1 à 2 aa), les fragments scFv peuvent former des trimères (tri-anticorps : 75 kDa) ou des tétramères (tétra-anticorps : 100 kDa) non covalents possédant respectivement trois ou quatre sites de liaison fonctionnels pour l'antigène (Pei *et al.*, 1997), (Wittel, 2005) (Fig. 18, page 53).

Il est important de noter que l'assemblage des scFv en tri ou tétra-anticorps peut aussi être obtenu par utilisation des motifs « Leucine zipper » (Muller *et al.*, 1998), (Pluckthun *et al.*, 1997) (Cf. chapitre IV).

Etant plus petites qu'un anticorps entier, ces molécules s'infiltrant mieux dans les tissus et présentent une clairance plus rapide. Elles sont de ce fait, des outils intéressants pour l'imagerie et la radiothérapie ciblée des cancers. En effet, plusieurs exemples de tétra-anticorps, tel que l'anti-TAG72, ont été utilisés pour le traitement radio-immunothérapeutique de tumeurs gastro-intestinales (Shen, 2005). Des molécules trispécifiques ont été conçues et produites pour permettre une co-activation optimale des LT cytotoxiques (anti-marqueur de tumeur / anti-CD3 / anti-CD28) (Ito *et al.*, 2003). Dans d'autres applications, des tri-anticorps bivalents ont été proposés dans le but d'accroître l'avidité et par conséquent l'affinité.

Finalement, l'une des principales utilisations des fragments d'anticorps bispécifiques est la génération d'immunotoxines, agents thérapeutiques très actifs contre les tumeurs (Kreitman, 2006) (Cf. chapitre II.3).

L'utilisation des fragments d'anticorps offre plusieurs avantages : une meilleure pénétration dans les tissus grâce à leur petite taille, une bi-spécificité très appréciée pour les modèles de ciblage et une augmentation d'avidité pour les formes homomultimériques. Cependant l'un des inconvénients majeurs est la clairance beaucoup plus rapide de ces fragments d'anticorps par rapport aux anticorps-mère. Leur efficacité peut alors être très affectée (Holliger *et al.*, 2005).

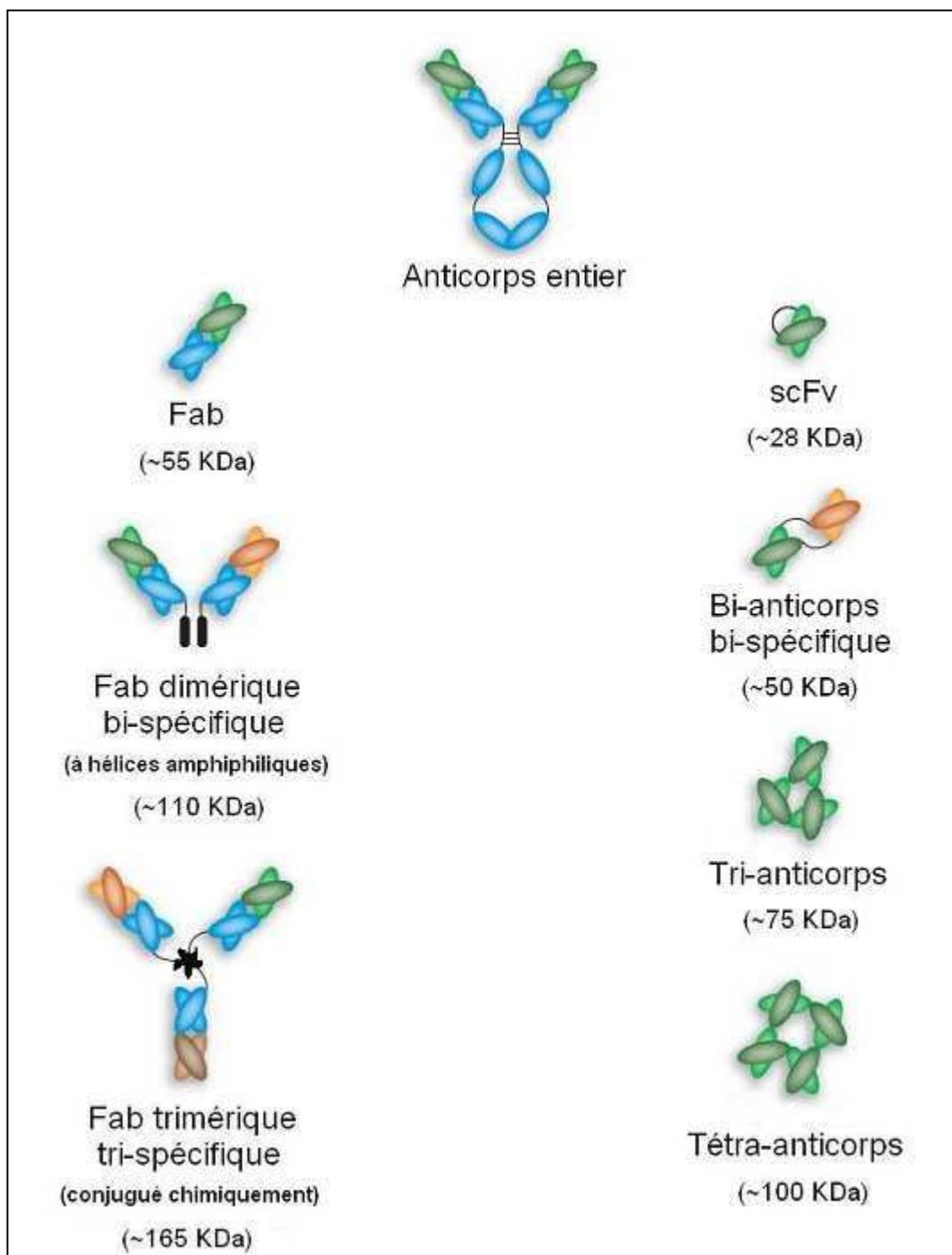


Figure 18. Représentation schématique des différents fragments d'anticorps. ( Holliger *et al.*, 2005).

### III.2.2.1.d. LES FRAGMENTS VHH

En 1993, HAMERS-CASTERMAN a découvert une nouvelle classe d'IgG chez les Camélidés (Hamers *et al.*, 1993). Chez ces animaux, 75% des IgG résultent de l'association des deux chaînes lourdes dont le domaine CH1 est remplacé par une région charnière étendue. Malgré l'absence du domaine VL, ces anticorps sont capables de lier des antigènes très divers,

simplement par le domaine variable de la chaîne lourde dénommé VHH (pour le distinguer du VH classique) (Muyldermans *et al.*, 1994). C'est le plus petit fragment d'anticorps liant l'antigène et dérivant d'une immunoglobuline fonctionnelle (15 kDa). Ces fragments possèdent des CDR plus longs que tous les anticorps connus, particulièrement dans le cas du CDR3 qui peut atteindre une longueur exceptionnelle de 24 résidus. Cette caractéristique permettrait de fournir à l'anticorps une surface de contact suffisante malgré l'absence du domaine VL.

En 1996, les travaux de DESMYTER ont permis de caractériser puis cristalliser un VHH anti-lysozyme (Desmyter *et al.*, 1996). Sa structure révèle des caractéristiques très intéressantes. Notre conception habituelle est qu'un récepteur enrobe son ligand, cependant dans le cas du VHH anti-lysozyme / lysozyme les rôles sont inversés et le fragment VHH se sert de son CDR3 extrêmement long pour insérer des acides aminés profondément dans le site actif de l'enzyme. Cette propriété pourrait être mise à profit pour obtenir facilement des inhibiteurs d'enzymes.

Grâce aux avancées des technologies des ADN recombinants permettant un clonage rapide et efficace des VHH de Camélidés immunisés, ainsi qu'avec le développement des stratégies de sélection de spécificité basées sur le « phage display », il est désormais possible d'acquérir une large gamme de ces entités fixatrices d'antigènes, aussi bien spécifiques que variées. Comparé aux fragments d'anticorps conventionnels (scFv, Fab, dsFv), l'utilisation des VHH recombinants présente de nombreux avantages pour les applications en biotechnologie et en thérapeutique :

- Le VHH se distingue par une grande stabilité thermique et chimique (certains conservent encore leurs propriétés structurales et fonctionnelles à 90 °C et en présence de dénaturants) (Van Der Linden *et al.*, 1999), (Dumoulin *et al.*, 2002).
- Il présente la plus petite taille de fragment d'anticorps fonctionnel (15 kDa, contre 30 kDa pour le scFv).
- A l'inverse des anticorps conventionnels, le VHH peut cibler des épitopes alternatifs. Il pourrait avoir des applications dans l'inhibition enzymatique (Desmyter *et al.*, 1996), (Van Der Linden *et al.*, 1999), (Saerens *et al.*, 2004).
- Il possède une grande spécificité et une forte affinité pour son antigène, de l'ordre du nanomolaire (Van Der Linden *et al.*, 1999), (Dumoulin *et al.*, 2002).
- Le VHH est capable de se fixer à des haptènes de faible poids moléculaire tels que la méthotrexate (Alvarez-Rueda *et al.*, 2007).

- Il est plus facilement exprimé, que les autres fragments d'anticorps, dans les systèmes de production bactériens et fongiques. Des taux de quelques mg/l ont été obtenus en cultures de *Saccharomyces cerevisiae* (Frenken *et al.*, 2000) et d'*Escherichia coli* (Alvarez-Rueda *et al.*, 2007).
- La structure en chaîne variable unique, fait du VHH un meilleur candidat pour le développement d'anticorps bispécifiques ou immunoconjugués, en joignant les gènes d'un premier VHH à ceux d'un deuxième, d'une enzyme ou d'une toxine, au sein d'une même unité d'expression (Conrath *et al.*, 2001), (Cortez *et al.*, 2004).
- Les gènes exprimés dans le domaine VHH possèdent une grande homologie avec la famille des gènes du VH3 des Ig humaines. Les applications chez l'homme des VHH devraient donc rencontrer moins de problèmes d'immunogénicité (Conrath Ke *et al.*, 2003).

Dans le but d'accroître l'avidité et par conséquent l'affinité ou d'augmenter la spécificité, des VHH bivalents et bispécifiques ont été produits (Conrath Ke *et al.*, 2001). Une étude de l'équipe de McKENZIE a proposé un système pentavalent fondé sur les propriétés multimérisantes de l'unité bêta de la vérotoxine d'*Escherichia coli*. Ce système a permis d'obtenir des multi-VHH. Cependant leur utilisation est restreinte aux applications diagnostiques à cause de l'immunogénicité de la vérotoxine (Zhang (A) *et al.*, 2004), (Zhang (B) *et al.*, 2004).

Les domaines d'applications thérapeutiques des VHH restent très diversifiés. Grâce à leur petite taille permettant une meilleure infiltration dans les tissus denses pour la neutralisation de l'antigène, les VHH ont été utilisés contre les infections (Conrath *et al.*, 2001) et les tumeurs (Cortez *et al.*, 2004).

Une étude de CORTEZ-RETAMOZO (Cortez *et al.*, 2004), a montré l'effet antitumoral d'un VHH anti-CEA couplé à une bêta-lactamase bactérienne capable d'induire la dégradation de la membrane des cellules cancéreuses.

La faible taille des VHH leur permet aussi de traverser la barrière hémato-méningée infranchissable par les autres anticorps. Cette propriété confirmée par les travaux de MURUGANANDAM (Murugandam *et al.*, 2002), peut être exploitée pour le développement de traitements pour des maladies neurologiques.

Cependant, la clairance rapide à cause de la petite taille du VHH peut diminuer son efficacité dans les essais *in vivo*.

## ***IV. LES DIFFERENTS SYSTEMES DE MULTIMERISATION PROTEIQUE***

### ***IV.1. Théorie de la multivalence***

La multivalence est un principe général naturel rencontré dans de nombreux systèmes biologiques permettant d'augmenter les interactions entre les biomolécules. Dans la plupart des interactions cellulaires, que ce soit au cours des phénomènes d'adhésion nécessitant une simple identification, ou au cours par exemple, de la reconnaissance d'antigènes du non soi par le système immunitaire, la nature des interactions est essentiellement multivalente et multifonctionnelle.

Les réactions de type ligands/récepteurs (L/R) sont des associations non covalentes réversibles, dont la force de liaison, appelée affinité, représente la somme des forces attractives et des forces répulsives résultant des interactions de faible énergie de type hydrogène, Van der Waals, hydrophobes, etc...entre le ligand et son récepteur. La relation spécifique de fixation entre un récepteur et son ligand constitue un équilibre de fixation dynamique entre les formes libres et liées. L'affinité du système ou constante d'affinité intrinsèque ( $K_1$ ) est le rapport de la constante de la vitesse d'association ( $K_{\text{ass.}}$ ) sur la constante de vitesse de dissociation ( $K_{\text{diss.}}$ ) du système, ou encore le rapport entre la concentration de formes liées [L-R] sur le produit de la concentration des formes libres [L] x [R]. D'où  $K_1 = K_{\text{ass.}} / K_{\text{diss.}}$  ou  $K_1 = [L-R] / ([L] \times [R])$ . L'illustration de l'effet "bonus" de la bivalence est présenté au travers de l'exemple antigène-anticorps (Ag-Ac) (Fig. 19) (Crothers *et al.*, 1972). Dans le cas des interactions de type (Ag-Ac), les antigènes présentent en général plusieurs épitopes, et les anticorps sont au moins divalents. L'affinité dans ce cas ( $K_{\text{obs.}}$ ) peut être considérablement augmentée par la formation de deux ou plusieurs sites de fixation (Ag-Ac). Elle est égale au produit des deux constantes d'affinité intrinsèques prises séparément. La seconde fixation, réaction monomoléculaire, est restreinte à la proximité du second antigène (ou épitope) et/ou à la flexibilité existant entre la première valence de l'anticorps engagée dans une interaction (de constante  $K_1$ ), et la deuxième valence libre du même anticorps (de constante  $K_2$ ). D'autres facteurs additionnels modulent la dynamique du système, tels que la vitesse de circulation des anticorps dans les fluides sanguins (Mattes, 1997).

L'effet de multivalence est fortement dépendant de la surface solide. A forte concentration d'antigènes (ou d'épitopes), la fixation bivalente d'anticorps monoclonaux peut

augmenter l'affinité fonctionnelle de 1000 fois, comparée à l'affinité intrinsèque du complexe (Ag-Ac) monovalent (Rheinnecker *et al.*, 1996).

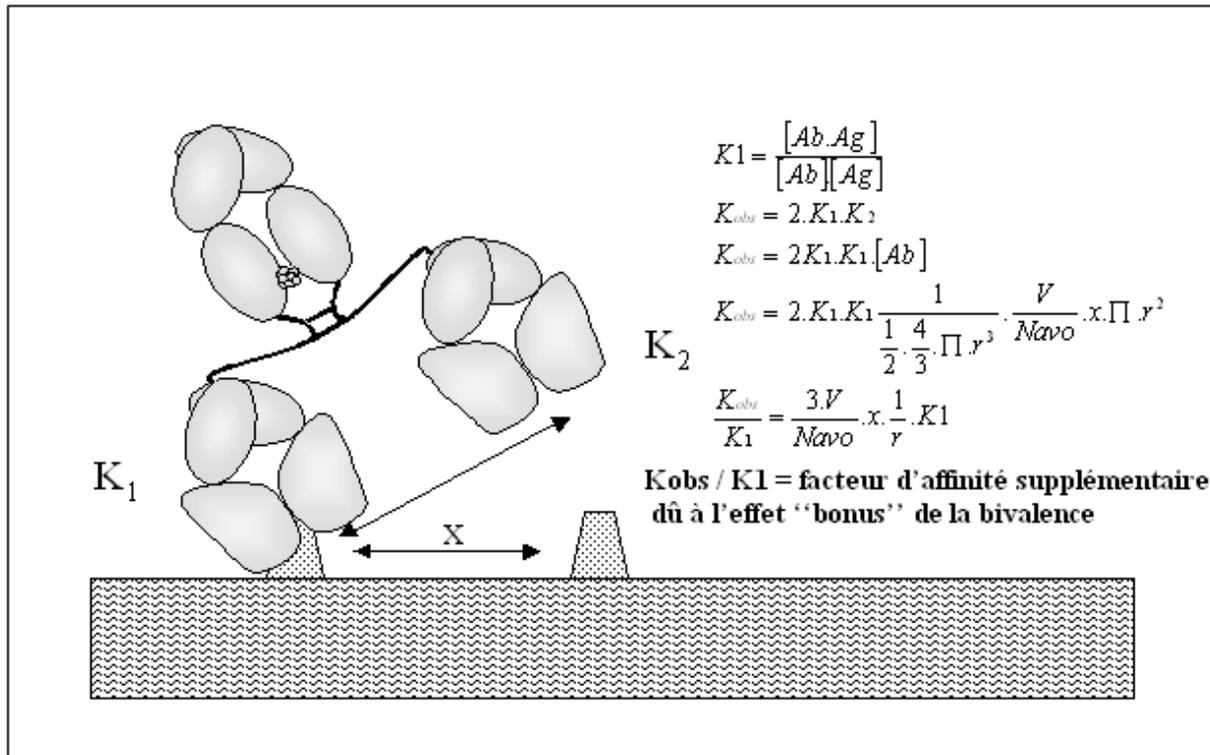


Figure 19. Augmentation de la constante d'équilibre apparente due à l'effet "bonus" de la bivalence, selon la loi de CROTHERS et METZGER :  $K_1$  est la constante d'affinité intrinsèque de fragments monovalents.  $K_2$  est la constante d'affinité du second site de fixation.  $K_{obs}$  est la constante d'affinité fonctionnelle de fragments bivalents.  $[Ab]$ ,  $[Ag]$  et  $[Ab \cdot Ag]$  sont des concentrations molaires d'anticorps, d'antigènes et de complexes immuns respectivement. La densité d'haptène  $X$  est une concentration bidimensionnelle (molécule / surface).  $V$  est le volume utilisé.  $N_{avo}$  est le nombre d'Avogadro =  $6,023 \times 10^{23}$ .  $r$  : rayon entre les 2 valences. (d'après Crothers *et al.*, 1972).

#### ***IV.2. Intérêts de l'utilisation de systèmes multivalents multifonctionnels en thérapie humaine***

Les protéines recombinantes multimériques solubles permettent d'obtenir un effet de multivalence au sein d'une molécule homomultimérique, lorsqu'une même fonction est présente en plusieurs exemplaires dans la même molécule. Il est possible de maintenir l'effet "bonus" de la multivalence, tout en associant diverses fonctions au sein d'une même molécule hétéro-multivalente multifonctionnelle. Les applications thérapeutiques potentielles de ces biotechnologies des protéines recombinantes homo/hétéromultimériques multifonctionnelles peuvent être développées dans divers domaines :

- 1- Le ciblage cellulaire de principes actifs (antitumoraux par exemple).
- 2- L'inhibition d'infections virales par association de divers mécanismes de blocages et/ou effecteurs antiviraux.
- 3- Le ciblage de l'action de molécules effectrices (récepteurs, enzymes ...) vers un lieu d'intérêt, ou encore d'utiliser un type cellulaire circulant comme vecteur passif assurant le « routage » de molécules à activités biologiques thérapeutiques.
- 4- La production de molécules antagonistes dont le rôle est d'inhiber par compétition l'interaction de systèmes ligands/récepteurs et d'empêcher par exemple l'entrée de micro-organismes pathogènes dans une cellule cible. Dans ces conditions, la multimérisation permet d'améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques de la molécule, son avidité, son espace de distribution et sa durée de vie plasmatique.

### ***IV.3. Cahier des charges d'un bon système multimérisant***

L'utilisation de systèmes biologiques à visée thérapeutique chez l'homme impose la prise en considération de plusieurs contraintes :

- Le système multimérisant doit comporter des constituants humains plutôt plasmatiques que cellulaires pour éviter toute immunisation xénogénique ou activation du complément, sauf fonction spécifique ajoutée intentionnellement dans ce sens.
- Les systèmes multimérisants doivent éviter de faire intervenir des technologies de multimérisation trop complexes et lourdes, en plusieurs étapes, en restant le plus fidèle possible aux modèles de multivalence naturellement rencontrés au sein des systèmes biologiques. Multiplier les étapes de synthèse revient à augmenter les paramètres de contrôle de la conservation des propriétés fonctionnelles des protéines recombinantes mises en jeu au cours du développement des étapes de la multimérisation. En outre, il est judicieux de choisir un système multimérisant dérivant d'un système naturel simple, dont l'assemblage des divers monomères ou la formation de la structure quaternaire de la protéine recombinante multimérique sont réalisés au sein du réticulum endoplasmique de la cellule hôte, puis sécrétée à l'extérieur de la cellule.
- Le système multimérisant peut associer des fonctions identiques au sein d'homomultimères. Un tel système multimérisant ne doit pas interférer avec la fonction et/ou l'activité biologique de chaque monomère pris séparément au sein du multimère, par encombrement stérique, en masquant le ou les sites actifs de la molécule recombinante multimérique. Aussi le système multimérisant doit être assez

« souple » pour permettre une action synergique de l'ensemble des monomères. Par exemple, s'il s'agit de la multimérisation de peptides recombinants dérivant de molécules de surface de micro-organismes, dans le but de développer un vaccin, le système multimérisant doit associer les différents peptides en des sites suffisamment éloignés de leurs épitopes immunogènes, afin de ne pas gêner leur accessibilité aux anticorps et molécules du complément.

- La biotechnologie développée pour la réalisation de molécules recombinantes multimériques solubles ne doit pas modifier les caractéristiques physico-chimiques des différentes fonctions associées, comme les caractéristiques de solubilité dans les fluides biologiques et la stabilité thermique.

En conclusion, la molécule recombinante multimérique idéale est une protéine glycosylée et assemblée en cellule eucaryote, puis secrétée dans le milieu de culture sous une seule espèce moléculaire multivalente. Les éléments constituant la molécule multimérique doivent être parfaitement solubles, dépourvus de fonctions biologiques et n'associant que des constituants humains plasmatiques, donc non immunogènes. Le système multimérisant doit enfin, respecter l'activité biologique des différents monomères associés, permettant une action combinatoire synergique dans le cas d'homomultimères ou autorisant une activité fonctionnelle optimale de chacun des constituants au sein d'hétéromultimères.

#### ***IV.4. Systèmes biologiques multivalents naturels et leurs applications***

##### **IV.4.1. Les immunoglobulines bivalentes**

La bivalence des Igs est imputable à la formation de ponts disulfure entre les deux chaînes lourdes. La structure d'une Ig (IgG, IgD et IgE) présente une symétrie dont les ponts disulfure rapprochent les divers domaines identiques deux à deux. La région charnière définit le domaine des chaînes lourdes portant ces ponts disulfure (Cf. chapitre III, Fig. 16, A2, page 46). Plusieurs molécules ont déjà été dimérisées en utilisant les propriétés des chaînes lourdes, notamment l'IL-2 (Landolfi, 1991) et le CD4 (Capon *et al.*, 1989). Ce système apporte deux avantages ; il est dimérisant et il permet d'activer la voie classique du complément via sa partie Fc. Cet avantage devient un inconvénient majeur quand seule la dimérisation est nécessaire.

La production de ce type de molécule est limitée aux systèmes eucaryotes ; les seuls capables de produire les structures des Ig.

Bien qu'il ne permette qu'un faible niveau de multimérisation, ce système simple permet d'orienter la lyse spécifique de certains types cellulaires. De plus, l'augmentation de la demi-vie de la molécule constitue un facteur pharmacocinétique important.

#### **IV.4.2. Les immunoglobulines de valence supérieure**

- Les IgA se présentent sous deux formes ; plasmatique bivalente et sécrétoire tétravalente (Cf. chapitre III).
- L'unité de base de l'IgM est une Ig bivalente. Cependant, par opposition aux autres Igs, les IgM ne sont efficacement sécrétées que lorsqu'elles sont constituées de cinq à six sous-unités identiques associées de manière covalente, possédant alors de 10 à 12 valences. Les IgM pentamériques contiennent la chaîne J. Elle n'est pas nécessaire à la polymérisation mais semble être impliquée dans le degré de polymérisation des IgM, car sa présence favorise la présence de pentamères et son absence, celle des hexamères (Cf. chapitre III, Fig. 17, page 47). Les domaines CH3 et CH4 seuls sont responsables de la multimérisation (Bornemann *et al.*, 1995), d'où l'idée de se servir de ces domaines comme base d'un système permettant la polymérisation.

La première molécule produite grâce à ce système était l'IL-2 multimérique (Vie *et al.*, 1993). Ces molécules sont capables de stimuler la croissance des LT et sont aussi fortement cytotoxiques car activatrices du complément via leur domaine IgM.

#### **IV.4.3. Les systèmes multimérisants de type « Leucine zipper » à interactions interchaînes hydrophobes**

##### **IV.4.3.1. Les facteurs de transcription de l'ADN**

Certaines protéines ayant pour rôle la régulation de fonctions ou de métabolismes cellulaires, interagissent directement avec l'ADN en se fixent sur certaines de ses séquences. Les plus étudiées de ces protéines sont les facteurs régulateurs de la transcription (GCN4 et C/EBR) (Hope *et al.*, 1987), (Hope *et al.*, 1987), (Landschulz *et al.*, 1989) et les facteurs proto-oncogènes (Jun, Fos et Myc) (Landschulz *et al.*, 1988) . Les caractéristiques structurales communes à ces protéines sont l'existence d'une région appelée selon la terminologie anglo-

saxonne « Leucine zipper », littéralement Fermeture Eclair à leucines, constituée d'une trentaine d'acides aminés à structure secondaire hélicoïdale. Elles contiennent des séquences périodiques répétitives de résidus leucine, régulièrement réparties tous les sept aa. Les résidus leucine hydrophobes sont disposés d'un côté de l'hélice  $\alpha$ , constituant ainsi une arête hydrophobe sur une tranche de l'hélice. Les surfaces hydrophobes de deux hélices  $\alpha$  de deux peptides, peuvent interagir par interdigitation des leucines de chaque hélice, telle que l'assemblage de deux parties d'une fermeture à glissière ou Fermeture Eclair. Ces interactions intermoléculaires stables sont non covalentes.

La séquence codant pour la partie « Leucine zipper » de GCN4 est couramment utilisée pour dimériser ou tétramériser des scFv ou d'autres molécules. Les valences de ces protéines sont rassemblées du même côté de la molécule car les « Leucine zipper » induisent un agencement parallèle des différentes valences du multimère (nommé scZIP) (O'shea *et al.*, 1991). La structure de ces protéines est rigide, et la distance entre les valences dépend directement de la longueur du bras inséré entre la molécule à multimériser et la structure « Leucine zipper ». Dans le cas des scFv, un bras trop court peut conduire à la formation de bi-anticorps entre deux scFv d'un même multimère et réduire encore la flexibilité de la protéine (Pluckthun *et al.*, 1997). Une forme modifiée de la partie « Leucine zipper » de GCN4 permet la tétramérisation des protéines nommées scTETRAZIP (Harbury *et al.*, 1993) (Tableau IV) (Fig. 20).

Nom de la construction	Charnière	Peptide permettant l'association
Forme bivalente		
<u>ScHLX</u>	PKPSTPPGSS IgG3 de souris	GELEELKHKELKLG Hélice
<u>ScdHLX</u>	PKPSTPPGSS IgG3 de souris	<u>GELEELKHKELKLG-PRK-GELEELKHKELKLG</u> Hélice 1 Hélice 2
<u>ScZIP</u>	PKPSTPPGSS IgG3 de souris	RMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER <i>Leucine zipper</i> dérivant de GCN4
Forme tétravalente		
<u>ScTETRAZIP</u>	PKPSTPPGSS IgG3 de souris	RLKQIEDKLEEILSKLYHIENELARIKLLGER <i>Leucine zipper</i> dérivant de GCN4
Scp53	PKPSTPPGSS IgG3 humaine	KPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKAQAGK EP Domaine permettant la multimérisation de p53

Tableau IV. Caractéristique des systèmes multimérisant utilisant des structures protéiques hélicoïdales. Les leucines impliquées dans la multimérisation sont indiquées en gras. (d'après Pluckthun *et al.*, 1997).

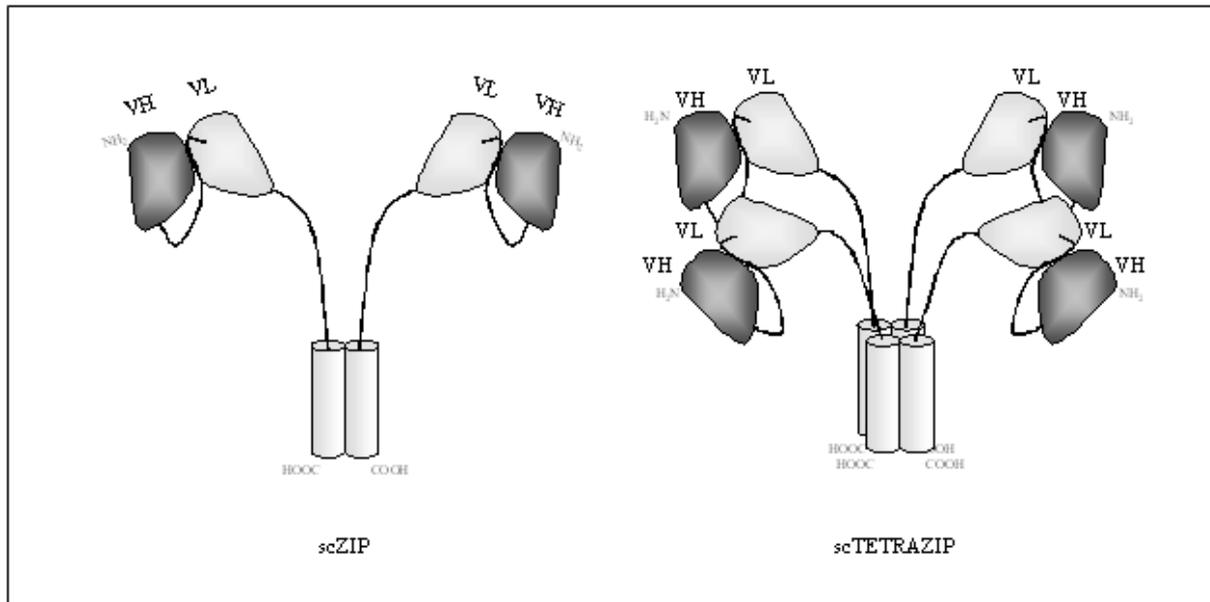


Figure 20. ScFv dimérisé ou tétramérisé par insertion de structures *leucines zippers* à l'extrémité C-terminale. (d'après Pluckthun *et al.*, 1997).

#### IV.4.3.2. Le paquet de quatre hélices « four helix bundle »

Certaines protéines à structure hélicoïdale sont connues pour s'assembler spontanément. L'équipe de DEGRADO a fabriqué une séquence codant pour un fragment protéique imitant les propriétés de la protéine ROP d'*Escherichia coli* (Betz *et al.*, 1997). Cette structure présente la qualité de s'assembler par groupe de quatre, ce qui permet de multimériser des protéines insérées à l'extrémité N-terminale de l'hélice.

Contrairement à ce qui était attendu, la protéine de fusion constituée d'un scFv, d'une chaîne peptidique de liaison dérivant de la région charnière des IgG3 de souris, et d'une hélice, ne forme pas de tétramères, mais des dimères et des monomères. Cette construction, nommée scHLX, n'était donc pas satisfaisante, les auteurs ont alors eu l'idée de fusionner le scFv à deux hélices (reliées par trois aa). Ce scdHLX forme spontanément des dimères très stables. Ces protéines ont une affinité fonctionnelle identique à celle de l'anticorps dont dérive le scFv. Il est important de noter que contrairement à la structure des scZIP, les scdHLX ont une structure anti-parallèle qui évite la formation de bi-anticorps (Fig 21).

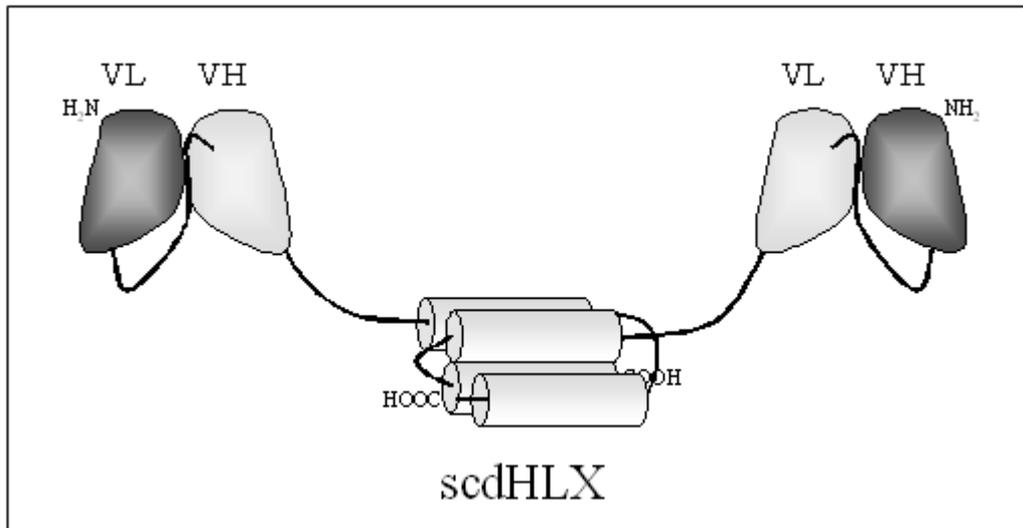


Figure 21. Structure schématique d'un ScdHLX. Le scFv est dimérisé par insertion de deux hélices à son extrémité C-terminale. (d'après Betz *et al.*, 1997).

#### IV.4.3.3. Le facteur de transcription p53

Les systèmes multimérisants précédemment décrits sont d'utilisation limitée. Les scHLX et scdHLX sont dimérisants au meilleur des cas, recombinants et potentiellement immunogènes. Les « leucines zipper » peuvent être d'origine eucaryote mais posent des problèmes de rigidité qui annihilent l'avantage de la dimérisation ou la tétramérisation (scTETRAZIP).

En 1996, l'équipe de PACK a exploité la qualité tétramérisante de la protéine p53 (Rheinnecker *et al.*, 1996).

Cette protéine est un facteur de transcription à structure quaternaire tétramérique. Elle se lie à des séquences spécifiques de l'ADN pour activer l'expression de certains gènes et joue un rôle central dans la prévention de l'apparition de lignées cellulaires transformées néoplasiques (Funk *et al.*, 1992).

Le système tétramérisant fondé sur la p53 est non immunogène, il consiste à associer un scFv, la chaîne charnière des IgG3 humaines, et la partie hélicoïdale de la p53. La protéine produite, nommée scp53, forme spontanément un tétramère (Rheinnecker *et al.*, 1996). (Fig. 22).

La comparaison entre un scFv, un scdHLX et un scp53 dirigés contre la même molécule indique que ce dernier se dissocie sept fois moins vite de son ligand que le scdHLX et plus de cent fois moins vite que le scFv monomérique (Pluckthun *et al.*, 1997).

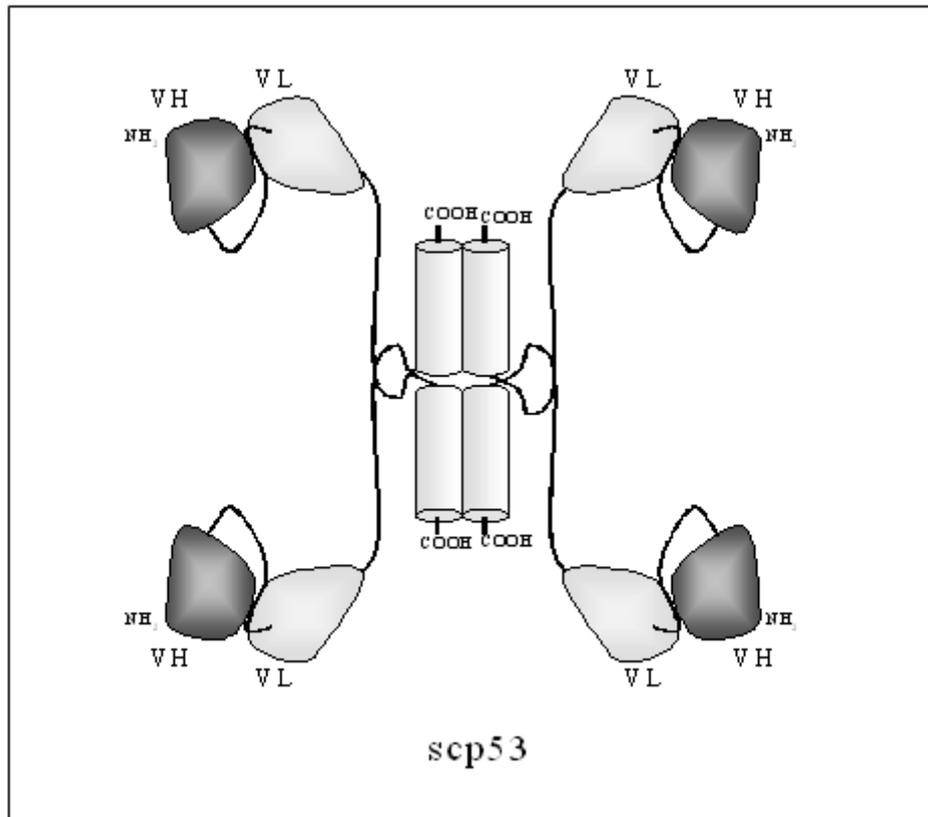


Figure 22. Structure schématique d'un Scp53. Le scFv est multimérisé, par l'insertion, à son extrémité C-terminale, d'une structure protéique hélicoïdale dérivant du p53. (Rheinhecker *et al.*, 1996).

#### IV.4.4. La vérotoxine : système multimérisant décavalent

*Escherichia coli* 0157 produit deux vérotoxines (VT-1 et VT-2), également appelées «*shiga-toxins* ». Chaque vérotoxine est constituée d'une entité toxique A (VTA) et d'une unité pentamérique B (VTB) (Fig. 23). L'utilisation de cette unité a permis de produire des homopentamères de fragments d'anticorps VHH. Ces penta-anticorps ont présenté une avidité 100 fois plus élevée que celle de leurs équivalents monomériques, une excellente thermostabilité et une résistance aux protéases (Zhang *et al.*, 2004).

Dans une étude menée par la même équipe en 2007, ce modèle multimérisant a servi pour produire des molécules décavales de VHH liées aux parties C et N-terminales de l'unité VTB (Stone *et al.*, 2007).

Cependant l'immunogénicité de ce système multimérisant fondé sur une protéine bactérienne, ne permet que des applications en diagnostic.

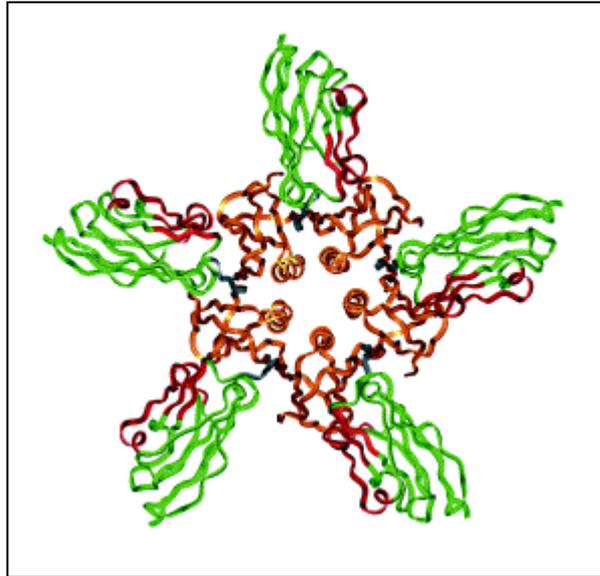


Figure 23. Structure de la VTB. Les parties N et C-terminales permettant de fixer les monomères sont exposées à la périphérie, du côté opposé à celui du plan de la molécule. (d'après Zhang *et al.*, 2004).

En conclusion, aucun des systèmes multimérisants décrits ne répond à l'ensemble des critères constituant le cahier des charges d'un système multimérisant à usage thérapeutique chez l'homme.

#### **IV.4.5. Le système multimérisant utilisant la partie C-terminale de la *C4-Binding Protein* (C4BP)**

##### **IV.4.5.1. Structure, organisation génomique et rôles physiologiques de la C4BP**

###### ***IV.4.5.1.a. Structure***

La C4-Binding Protein (C4BP) humaine est une glycoprotéine plasmatique multimérique et hétérogène de haut poids moléculaire (570 kDa). Elle est synthétisée par les cellules hépatiques. Sa concentration plasmatique est de 200 µg/ml (Dahlback, 1983), elle peut augmenter de quatre fois pendant la phase aiguë de l'inflammation (Barnum *et al.*, 1990). Sa forme majeure (75 à 80% de la C4BP totale) se compose d'un octamère comprenant sept chaînes  $\alpha$  identiques et une chaîne  $\beta$  ( $7\alpha$ ,  $1\beta$ ) reliées entre elles par des ponts disulfure (Scharfstein *et al.*, 1978). Deux autres formes ( $6\alpha$ ,  $1\beta$  et  $6\alpha$ ,  $0\beta$ ) circulent également dans le plasma (Sanchez-Corral *et al.*, 1995).

La structure de la C4BP en microscopie électronique apparaît sous forme d'araignée constituée de huit membres (Hessing *et al.*, 1991) (Fig. 24).

Chaque chaîne  $\alpha$  (C4BP $\alpha$ ), de 70 kDa de poids moléculaire apparent, est composée de 549 aa dont les 491 N-terminaux forment huit unités répétitives identiques appelées protéines de contrôle du complément (*Complement Control Proteins* : CCP) ou courtes consensus répétées (Sequence consensus repeats : SCR) (Chung *et al.*, 1985), (Villoutreix *et al.*, 1998) (Fig. 24) et d'une terminaison C-terminale «non CCP» de 59 aa contenant deux cystéines responsables de la multimérisation de la molécule et n'ayant aucune activité biologique.

Chaque CCP contient 60 aa, dont les plus conservés sont quatre cystéines responsables de l'aspect en triple boucle de la CCP (Fig. 24).

La chaîne  $\beta$  (C4BP $\beta$ ), de 45 kDa de masse moléculaire apparente, se compose de 235 aa, dont les 175 N-terminaux se répartissent en trois CCP identiques à celles de la chaîne  $\alpha$  (Hilarp, 1991), (Hilarp *et al.*, 1990) (Fig. 24). Les 61 aa C-terminaux constituent la partie «non CCP», présentant également plusieurs homologies avec celle de la chaîne  $\alpha$  et comprenant notamment deux résidus cystéine impliqués dans l'assemblage des monomères.

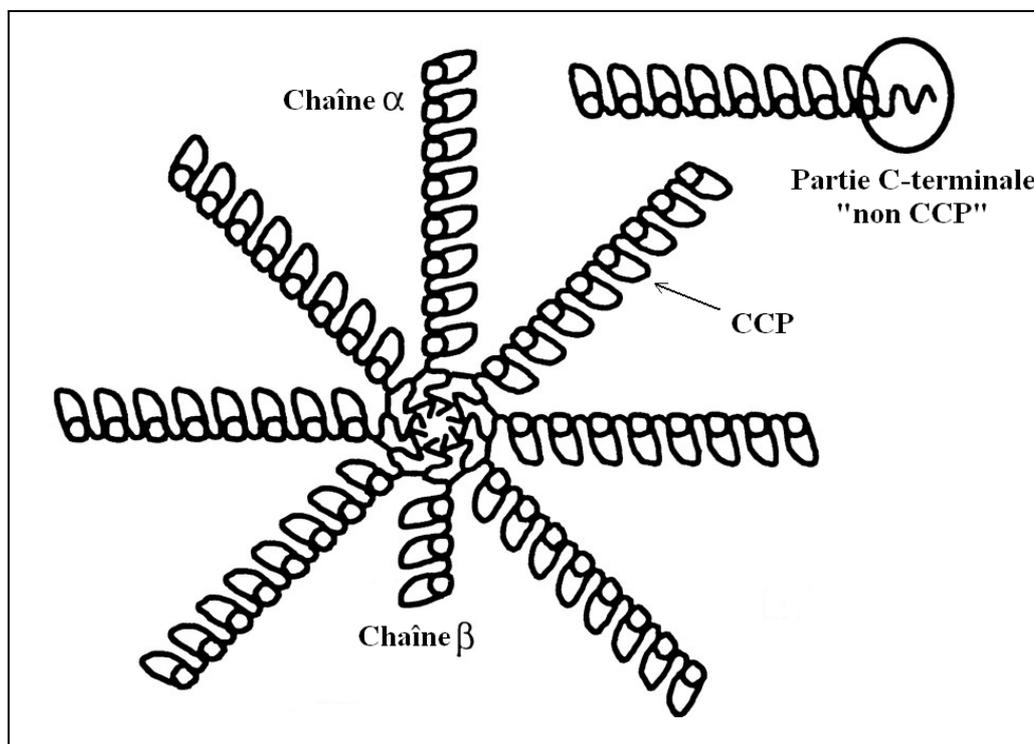


Figure 24. Structure octamérique simplifiée de la C4BP et détail d'une chaîne  $\alpha$  montrant la partie CCP et la région C-terminale renfermant notamment deux résidus cystéines responsables de l'assemblage des différentes unités (d'après Oudin *et al.*, 2000).

#### IV.4.5.1.b. Organisation génomique

Les gènes codant pour la C4BP $\alpha$  et la C4BP $\beta$  se présentent en tandem. Quatre mille cent soixante dix-huit nucléotides séparent les extrémités 3' du gène de la C4BP $\beta$  et 5' du gène de la C4BP $\alpha$  (Rodriguez *et al.*, 1991). Ils appartiennent au groupe de gènes codant les CRP (protéines régulatrices du complément) (Rodriguez *et al.*, 1985), localisés sur le bras long du chromosome 1 (1q32) (Weis *et al.*, 1987), (Lublin *et al.*, 1987), (Pardo-Manuel *et al.*, 1990) (Fig. 25).

Les gènes de la C4BP $\alpha$  et la C4BP $\beta$  sont liés aux gènes codant pour les protéines cofacteur des membranes (MCP ; CD46), le récepteur 1 du complément (CR1 ; CD35), le CR2 (CD21), le facteur accélérateur de la dissociation (DAF ; CD55), le facteur H et la sous unité F du facteur de coagulation XIII B (Rodriguez *et al.*, 1985), (Rey-Campos *et al.*, 1990). Toutes ces protéines partagent la même organisation structurale fondée sur la présence de multiples unités CCP. De plus la plupart d'entre elles sont des composants régulateurs du complément.

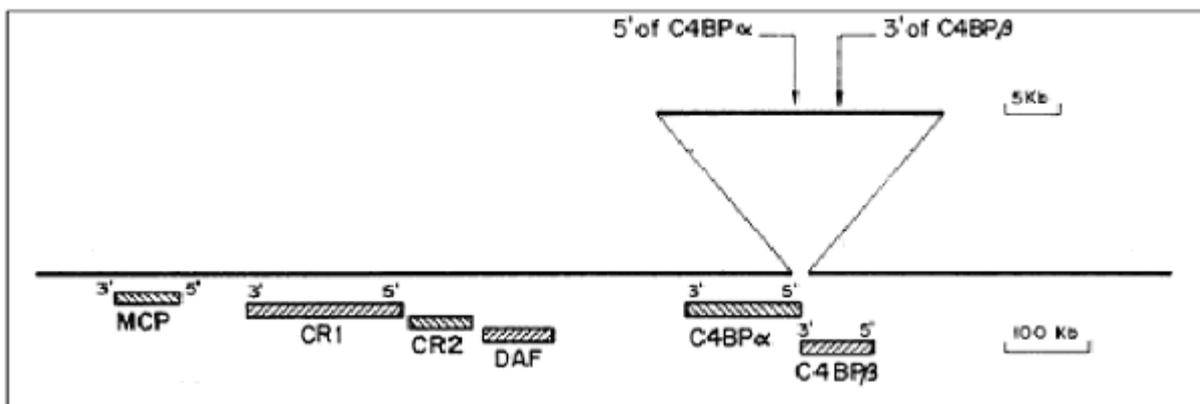


Figure 25. Carte du gène humain du groupe des protéines régulatrices du complément (RCA) localisé sur le bras long du chromosome 1, montrant les positions des gènes C4BP $\alpha$  et C4BP $\beta$  (d'après Rey-Campos *et al.*, 1990)

#### IV.4.5.1.c. Rôles physiologiques de la C4BP

La C4BP réunit deux fonctions distinctes : l'une impliquée dans la régulation de l'activation du complément par ses chaînes  $\alpha$ , l'autre dans la régulation du processus de coagulation via sa chaîne  $\beta$ .

La partie C-terminale «non CCP» des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  est responsable de l'assemblage des différents monomères. Elle n'a aucune activité biologique et ne lie aucune molécule présente dans le plasma.

### ❖ Fonction inhibitrice du complément

Faisant partie de la famille des régulateurs de l'activation du complément, la C4BP inhibe efficacement l'activation de la voie classique et de la voie des lectines en intervenant à trois niveaux :

- 1- Elle agit comme cofacteur du facteur I (FI) sérine protéinase responsable de l'inactivation protéolytique du C4b (produit de dégradation du C4 par le complexe C1qrs-CI), empêchant ainsi la formation et la reconstitution de la C3-convertase (C4bC2a) de la voie classique, précurseur de la C5-convertase (C4b2a3b), amorçant la formation du CAM (Mollnes *et al.*, 2006).
- 2- Elle accélère la dégradation naturelle de la C3-convertase (Gigli *et al.*, 1979).
- 3- Elle empêche l'assemblage du complexe de la C3-convertase classique en fixant le C4b naissant (Gigli *et al.*, 1979).

La C4BP agit aussi comme cofacteur du FI pour le clivage du C3b en phase liquide, inhibant ainsi dans une certaine mesure, la voie alterne du complément, mais ne semble pas inhiber l'assemblage de la C3-convertase de cette voie (C3bBb) (Blom *et al.*, 2003).

Chaque molécule de C4BP est composée de six à sept chaînes  $\alpha$ , cependant à cause de l'encombrement stérique, un maximum de quatre molécules de C4b peuvent s'y fixer (Ziccardi *et al.*, 1984). Cette liaison s'établit à l'interface des CCP1 et CCP2 de la chaîne  $\alpha$ , au niveau du groupement d'acides aminés à charge positive : Arg<sup>39</sup>, Lys<sup>63</sup>, Arg<sup>64</sup>, et His<sup>67</sup> (Blom *et al.*, 1999), (Blom *et al.*, 2000), (Blom *et al.*, 2000) (Fig. 26, page 71).

Une étude menée par l'équipe d'ISENMAN DE., publiée en 2006, a permis de montrer la fixation à la C4BP, des sous-unités C4c et C4dg de C4b, au niveau de sites distincts et adjacents, dont l'occupation est marquée par une synergie (Leung *et al.*, 2006).

L'interaction C4BP-C4b est inhibée par l'héparine, anticoagulant qui agit en augmentant l'activité de l'anti-thrombine III (Mourey *et al.*, 1990) et dont le site de fixation à la C4BP se chevauche avec celui de C4b (Villoutreix *et al.*, 1999), (Blom, 2002) (Fig. 26).

Une étude menée par l'équipe de BLOM AM, publiée en 2005, a montré que le complexe C4BP-C4b / Protéine S (protéine anticoagulante), se fixe à la surface des cellules en apoptose et à leurs ADN et est responsable de la régulation du complément. Cette inhibition de la voie classique du complément évite la formation des opsonines C3b et des anaphylatoxines C5a et C3a ainsi que la génération du CAM (C5b9) (Trouw *et al.*, 2005). Les

cellules sont donc éliminées uniquement par phagocytose, évitant ainsi la libération de l'ADN, cible potentielle des auto-anticorps (Rahman, 2004).

Exploitant la propriété inhibitrice de l'activation du complément de la C4BP, plusieurs agents pathogènes tentent d'échapper à l'action du système immunitaire en fixant la C4BP et le facteur H (FH) : membre puissant de la famille des protéines de régulation du complément (RCA).

La fixation de la C4BP à la surface des bactéries entraîne la diminution de leur opsonisation par le C3b, provoquant ainsi une réduction de leur phagocytose.

En effet, dans ce but, la protéine M membranaire de *Streptococcus pyogenes* se fixe avec haute affinité aux CCP1-2 de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP (Jerkins *et al.*, 2006), (Persson *et al.*, 2005), (Andre *et al.*, 2006) (Fig. 26, page 71). *Bordetella pertussis* accroche la C4BP (CCP1-2) à l'aide de ses hémagglutinines filamenteuses. Cette liaison de nature ionique est très similaire à celle établie avec le C4b et constitue un exemple de mimétisme moléculaire (Berrgard *et al.*, 2001) (Fig. 26). Quand à *Neisseria gonorrhoeae*, elle utilise ses porines pour attacher la C4BP au niveau de la CCP1 de la chaîne  $\alpha$  (Blom *et al.*, 2001) (Fig. 26). *Candida albicans* capture les régulateurs de la voie alterne du complément ; FH, facteur H-Like 1 (FHL-1) ainsi que la C4BP (Meri *et al.*, 2004). *Escherichia coli* K1 se sert de sa protéine A de la membrane externe (Omp A) pour fixer la C4BP (CCP3 de la chaîne  $\alpha$ ) (Nemani *et al.*, 2002), (Wooster *et al.*, 2006) (Fig. 26), alors que *Moraxella catarrhalis* interagit avec les CCP2 et CCP7 de la chaîne  $\alpha$  à l'aide de ses protéines ubiquitaires de surface (Usp2) (Nordstrom *et al.*, 2004) (Fig. 26).

#### ❖ Fonction régulatrice de la coagulation

La C4BP intervient également dans la régulation de la coagulation à travers son interaction avec la Protéine S.

La protéine S vitamine K dépendante est un cofacteur de la protéine C activée (APC) dans la dégradation des facteurs procoagulants V et VIII (Walker, 1980), (Walker *et al.*, 1987). Elle possède aussi à elle seule une activité anticoagulante indépendante de l'APC (Mitchell *et al.*, 1988), (Koppelman *et al.*, 1995) et circule dans le plasma (0,3  $\mu$ M) sous forme libre ou complexée à la C4BP (CCP1-2 de la chaîne  $\beta$ ) au ratio 1:1 et avec une très forte affinité ( $K_D = 0.1$  nM) (Linse *et al.*, 1997) (Fig. 26).

Près de 60% de la PS totale se trouve complexée à la C4BP, et seulement la proportion libre conserve ses propriétés anticoagulantes (Linse *et al.*, 1997),(Dahlback, 1986). Le maintien de cet équilibre est donc primordial pour éviter les accidents thrombo-emboliques.

La stabilité du taux plasmatique de la PS pendant la phase aiguë de l'inflammation, au cours de laquelle la concentration de la C4BP augmente considérablement (Jerkins *et al.*, 2006), est due à la régulation différentielle des taux des molécules C4BP contenant ou déficientes en chaîne  $\beta$  (Garcia De Frutos *et al.*, 1994).

En plus de son implication dans la régulation de la coagulation, l'interaction entre la PS et la C4BP permet également la fixation du complexe C4BP/C4b aux phospholipides membranaires au niveau du site de la lésion. A ce niveau, les protéines procoagulantes et anticoagulantes sont attachées via leurs domaines d'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla), dans le but d'empêcher l'inflammation (Linse *et al.*, 1997).

#### ❖ Interactions de la C4BP avec d'autres protéines

La chaîne  $\alpha$  de la C4BP interagit aussi avec la *Low Density Lipoprotein Receptor related Protein* (LRP). La LRP est un récepteur de l' $\alpha_2$  macroglobuline. Elle est impliquée dans la clairance hépatique de plusieurs protéines et contribue également au processus de signalisation cellulaire et au transport puis dégradation intracellulaire de la C4BP. Sa liaison à cette dernière est de nature ionique et son site de fixation se chevauche avec celui de l'héparine et du C4b (Westein *et al.*, 2002) (Fig. 26, page 71).

La C4BP permet aussi l'activation des cellules B par interaction avec leur récepteur de surface CD40. Appartenant à la famille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (TNF), ce récepteur est présent à la surface des lymphocytes B, des monocytes, des cellules dendritiques, des cellules endothéliales et des cellules épithéliales ; il se lie directement à la chaîne  $\alpha$  de la C4BP. Cette interaction induit la prolifération et l'augmentation du nombre de récepteurs CD54 (ICAM-1), CD86 et des IgE – interleukine 4 dépendantes (Brodeur, 2003).

En conclusion, la C4BP est un puissant inhibiteur des voies classique et des lectines du complément. Son pouvoir inhibiteur est bénéfique pour l'organisme car elle permet d'éviter une activation excessive du complément conduisant à certaines maladies auto-immunes. Cette propriété devient un inconvénient quand elle est exploitée par quelques bactéries liant la C4BP pour échapper à l'action du complément.

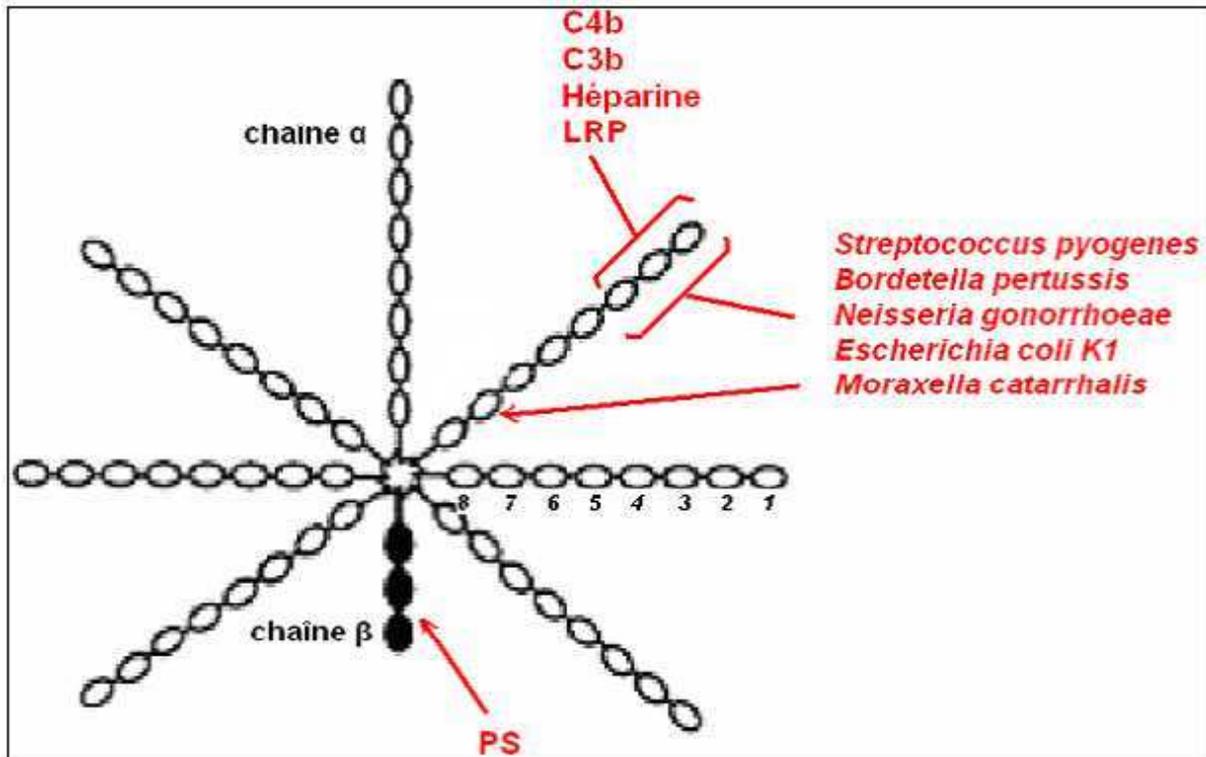


Figure 26 : Représentation schématique de la C4BP indiquant les sites de fixation de différents ligands.

#### IV.4.5.2. Système multimérisant dérivant de la C4BP

##### IV.4.5.2.a. Avantages de ce système

La C4BP est une molécule soluble du plasma humain, elle peut donc être utilisée en immuno-intervention sans risque d'éventuelles réactions immunologiques de l'organisme.

Les parties C-terminales «non CCP» de la chaîne α (59 aa) et de la chaîne β (61 aa), n'ont aucune fonction biologique intrinsèque au sein de la C4BP, elles n'activent pas le complément et ne lient aucune molécule présente dans le plasma.

Elles possèdent chacune deux résidus cystéines permettant la formation de ponts disulfure interchaînes pour l'assemblage des monomères en multimères (7α, 1β) en majorité rencontrés (Fig. 24, page 66). Ces liaisons de nature covalente confèrent une forte stabilité au multimère.

En résumé, ce système multimérisant fondé sur les propriétés de la partie C-terminale de la C4BP ne devrait pas avoir les inconvénients des systèmes précédemment décrits (immunogénicité, activation du complément, structure anti-parallèle).

Il permet d'obtenir des heptamères voir des octamères liées au travers d'associations covalentes stables.

Ce degré de multimérisation permet d'accroître considérablement l'avidité de la molécule.

Il permet également d'augmenter la durée de la demi-vie plasmatique par augmentation du poids moléculaire de la molécule.

Il permet l'obtention des molécules homomultimériques à activité fonctionnelle unique ou hétéromultimériques bi-fonctionnelles.

#### ***IV.4.5.2.b. Applications***

Ce système multimérisant de la C4BP, d'usage général et d'ingénierie aisée, a été développé et plusieurs applications ont été réalisées au cours de ces dernières années.

Ainsi, des protéines homomultimériques ont été produites, tel que le mini anticorps scFv anti-RhD – C4BP $\alpha$ , molécule permettant d'agglutiner les GR RhD comme l'anticorps polyclonal humain dont il dérive (Libyh *et al.*, 1997).

Une molécule CD46 multimérique soluble a été également développée à l'aide de l'extrémité C-terminale de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP. Elle a permis de neutraliser *in vitro* et *in vivo* le virus de la rougeole en se fixant aux hémagglutinines virales (Christiansen *et al.*, 2000).

Des protéines hétéromultimériques ont aussi été produites grâce à ce système tel que le multi-scfv anti-RhD – C4BP $\alpha$  / multi-CR1 – C4BP $\alpha$ . Cette molécule a permis de restaurer, *in vitro*, une densité physiologique (voir supra-physiologique) de CR1 à la surface de GR RhD qui en sont déficients (phénomène associé à certaines maladies auto-immunes) (Oudin *et al.*, 2000).

# **MATERIELS ET METHODES**

# ***I. PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES HOMOMULTIMERIQUES ET HETEROMULTIMERIQUES***

## ***I.1. Amplification des ADN codant les protéines d'intérêt***

### **I.1.1. Amplification des parties C-terminales des chaînes $\alpha$ et $\beta$ de la C4BP**

#### **I.1.1.1. Partie C-terminale minimale courte de la chaîne $\alpha$ de la C4BP (C4BP $\alpha$ C)**

L'ADN codant les 59 derniers aa de la partie C-terminale de la C4BP $\alpha$  a déjà été produit et cloné au laboratoire. Il nous a servi de matrice pour l'amplification en utilisant les amorces suivantes :

Amorce en 5' : 5'-CGCGAGTCCGGAGGCGGTGGCTCGACCGGA-3'

Amorce en 3' : 5'-CGCGAGTTCTAGATCATCAGTGATGGTGATGGTGATGGTG  
**GTGGATTAGTTCTTTATC**-3'

Les séquences soulignées sont spécifiques des enzymes de restrictions *BspEI* et *XbaI*, pour les amorces en 5' et en 3' respectivement.

Une séquence codant pour 8 histidines dans l'amorce en 3' (en gras) a été ajoutée pour faciliter par la suite la détection et la purification de la protéine.

Deux codons stop (en italique) ont été placés à la fin de la séquence pour arrêter la traduction.

Cent  $\mu$ l de volume total par tube ont été préparés à partir de 500 ng d'ADN codant la C4BP $\alpha$ , 500 ng d'amorces en 5' et en 3', 16 nM de désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP), 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 2 U d'ADN Polymérase (Amplitaq, Perkin Elmer, Roissy, France). Après une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, trente cycles d'amplification ont été réalisés (30 s à 94°C, 30 s à 60°C, 30 s à 72°C), suivis d'une étape d'élongation de 7 min à 72°C. La PCR a été réalisée sur thermocycleur (Gen Amp PCR system 9600, Perkin Elmer). Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.2 %. Après vérification de la taille, l'ADN a été purifié sur colonne à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) puis dosé à 260 nm par spectrophotométrie (GeneQuant, Pharmacia, Saclay, France). Une double digestion a été ensuite effectuée successivement à l'aide des enzymes *BspEI* et *XbaI* (Biolabs, Montigny Le Bretonneux, France). Trente microgrammes d'ADN ont été incubés à

37°C pendant 4 heures en présence de 40 unités d'enzyme *BspEI* et 10 % (v/v) de tampon 3 (Biolabs). Après purification sur colonne à l'aide du Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), la concentration d'ADN a été déterminée par lecture au spectrophotomètre. L'ADN purifié (25 µg) a été ensuite digéré, à 37 °C pendant 4 heures, par 30 unités d'enzyme *XbaI*, en présence de 10 % (v/v) de tampon 2 et 1 % (v/v) de sérum albumine bovine (SAB) 100x. Le produit de la digestion a été finalement purifié à l'aide du même kit puis dosé.

#### **I.1.1.2. Partie C-terminale minimale courte de la chaîne β de la C4BP (C4BPβC)**

L'ADN codant les 59 derniers aa de la partie C-terminale de la C4BPβ a déjà été produit et cloné au laboratoire. Il nous a servi de matrice pour l'amplification en utilisant les amorces suivantes :

Amorce en 5' : 5'-CGCGAGGCGGCCGCACAGGAAGCTCCCAAACC-3'

Amorce en 3' : 5'-CGCGAGTCTAGATCATCAGTGATGGTGATGGTGATGG  
ATCAACAATTTTGC-3'

Les séquences soulignées sont spécifiques des enzymes de restrictions *NotI* et *XbaI*, pour les amorces en 5' et en 3' respectivement.

Une séquence codant pour 6 histidines dans l'amorce en 3' (en gras) a été ajoutée pour faciliter par la suite la détection et la purification de la protéine.

Deux codons stop (en italique) ont été placés à la fin de la séquence pour arrêter la traduction.

Cent µl de volume réactionnel total par tube ont été préparés. Ils contiennent 500 ng d'ADN codant la C4BPβC, 500 ng de chacune des amorces en 5' et en 3', 200 µM de dNTP, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.8, 25 mM de KCl, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM de MgSO<sub>4</sub> et 2.5 U d'ADN polymérase Pwo (Roche, Mannheim, Germany). Après une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, trente cycles d'amplifications ont été réalisés (30 s à 94°C, 30 s à 61°C, 30 s à 72°C), suivis d'une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les étapes de vérification de la taille, de purification et du dosage de l'ADN ont été suivies par une double digestion enzymatique par *NotI* et *XbaI* (Biolabs). Trente microgrammes d'ADN ont été incubés à 37°C pendant 4 heures en présence de 40 unités d'enzyme *NotI*, 10 % (v/v) de tampon 3 et 1 % (v/v) de SAB 100x. Après purification, l'ADN a été dosé puis digéré par *XbaI* dans les mêmes conditions précédemment décrites pour l'ADN codant la C4BPαC. Le produit des digestions a été finalement purifié puis dosé.

### I.1.1.3. Partie C-terminale minimale longue de la chaîne $\beta$ de la C4BP (C4BP $\beta$ L)

L'ADN codant les 117 derniers aa de la partie C-terminale de la C4BP $\beta$  a déjà été produit et cloné au laboratoire. Il nous a servi de matrice pour l'amplification en utilisant les amorces suivantes :

Amorce en 5' : 5'-CGCGAGGCGGCCGCATCCGGAGACTGTGACCCTCCT-3'

Amorce en 3' : 5'-CGCGAGTCTAGATCATCAGTGATGGTGATGGTGATG  
GATCAACAATTTGCCTTCAA -3'

Les séquences soulignées sont spécifiques des enzymes de restrictions *NotI* et *XbaI*, pour les amorces en 5' et en 3' respectivement.

Une séquence codant pour 6 histidines dans l'amorce en 3' (en gras) a été ajoutée pour faciliter par la suite la détection et la purification de la protéine.

Deux codons stop (en italique) ont été placés à la fin de la séquence pour arrêter la traduction.

Cent  $\mu$ l de volume réactionnel total par tube ont été préparés. Ils contiennent 50 ng d'ADN codant la C4BP $\beta$ L, 500 ng de chacune des amorces en 5' et en 3', 200  $\mu$ M de dNTP, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.8, 25 mM de KCl, 5 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM de  $\text{MgSO}_4$  et 2.5 U d'ADN polymérase Pwo (Roche). Après une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, trente cycles d'amplifications ont été réalisés (30 s à 94°C, 30 s à 61°C, 30 s à 72°C), suivis d'une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les étapes de vérification de la taille, de purification et du dosage de l'ADN ont été suivies par une double digestion enzymatique par *NotI* et *XbaI* (Biolabs) dans les mêmes conditions précédemment décrites pour l'ADN codant la C4BP $\beta$ C.

### I.1.2. Clonage de l'ADN codant le fragment C de la toxine tétanique (TTFgC)

L'ADN codant le TTFgC a été gracieusement donné par Monsieur le Dr. P MUNRO (Unité INSERM U 452, Faculté de Médecine de Nice, France). Les 1353 paires de bases (pb) constituant cet ADN ont été amplifiées par la suite à l'aide des amorces suivantes :

Amorce en 5' : 5'-CGCGAGAGATCTCTGGATTGTTGGGTTGATAAT-3'

Amorce en 3' : 5'-CGCGAGTCCGGAATCATTTTGTCCATCCTTCATC-3'

Les séquences soulignées sont spécifiques des enzymes de restrictions *BglII* et *BspEI*, pour les amorces en 5' et en 3' respectivement.

La PCR a été effectuée dans les mêmes conditions de molarités précédemment décrites pour l'ADN codant la C4BP $\alpha$ C. Après une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, trente cycles de PCR ont été programmés (30 s à 94°C, 30 s à 42 °C, 2 min à 72°C), suivis d'une

étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les étapes de vérification de la taille, de purification et du dosage de l'ADN ont été suivies par une double digestion enzymatique par *BglIII* et *BspEI* (Biolabs). Trente microgrammes d'ADN ont été incubés à 37°C pendant 4 heures en présence de 40 unités d'enzyme *BglIII*, 40 unités d'enzyme *BspEI* et 10 % (v/v) de tampon 3. Le produit des digestions a été finalement purifié puis dosé.

### **I.1.3. Clonage de l'ADN codant le scFv anti-Glycophorine A (GPA)**

#### **I.1.3.1. Génération du scFv anti-GPA**

La génération du scFv anti-GPA et l'amplification de l'ADN codant le scFv anti-GPA, ont été réalisées au laboratoire par Madame Annelise GIMENEZ-MAITRE.

L'ARN total issu d'hybridomes de lignées de cellules sécrétant l'anticorps monoclonal R18 (IgG<sub>2b</sub> de souris anti-GPA), a été extrait à l'aide du QIAamp RNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany). L'ADNc correspondant aux chaînes variables lourde (VH) et légère (VL) a été par la suite synthétisé puis amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques du (Mouse scFv Module kit, Amersham). Les ADNc correspondant aux chaînes VH et VL ont été assemblés en scFv à l'aide d'un linker (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> selon les instructions du même kit.

#### **I.1.3.2. Amplification de l'ADN codant le scFv anti-GPA**

L'ADN codant le scFv anti-GPA (747 pb) a été amplifié à l'aide des amorces suivantes :

Amorce en 5' : 5'-CGCGAGAGATCTCAGGTGAAACTGCAGCAG-3'

Amorce en 3' : 5'-CGCGAGTCCGGACCGTTTTATTCCAGCTT-3'

Les séquences soulignées sont spécifiques des enzymes de restrictions *BglIII* et *BspEI*, pour les amorces en 5' et en 3' respectivement.

La PCR a été effectuée dans les mêmes conditions de molarité précédemment décrites pour l'ADN codant la C4BPβC. Après une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, dix premiers cycles d'amplification ont été réalisés (15 s à 94°C, 30 s à 58°C, 45 s à 72°C), suivies par 20 cycles (15 s à 94°C, 30 s à 58°C, 45 s + 5 s pour chaque cycle à 72°C), suivis d'une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les étapes de vérification de la taille, de purification et du dosage de l'ADN ont été suivies par une double digestion enzymatique par

*BglIII* et *BspEI*, effectuée dans les mêmes conditions précédemment décrites pour l'ADN codant la TTFgC. Le produit des digestions a été finalement purifié puis dosé.

#### **I.1.4. Isolement et clonage des régions codant les chaînes lourdes et légères de l'anticorps anti-Rhésus D**

##### **I.1.4.1. Génération du scFv anti-RhD**

Le scFv anti RhD a été construit au laboratoire par Madame le Dr. M TONYE LIBYH et Madame le Dr. D GOOSSENS (INTS, Paris, France) (Libyh *et al.*, 1997), suivant la méthode décrite par MARKS *et al.* (Marks *et al.*, 1991).

##### **I.1.4.2. Amplification de l'ADN codant le scFv anti-RhD**

L'ADN codant le scFv anti-RhD (780 pb) a été amplifié à l'aide des amorces suivantes :

Amorce en 5' : 5'-CGCGAGGCGGCCAGCCGCGCCGCCCAGG-3'

Amorce en 3' : 5'-CGCGAGTCCGGAACTAGGACGGTCAGCTT-3'

Les séquences soulignées sont spécifiques des enzymes de restrictions *SfiI* et *BspEI*, pour les amorces en 5' et en 3' respectivement.

La PCR a été effectuée dans les mêmes conditions de molarités précédemment décrites pour l'ADN codant la C4BP $\alpha$ . Après une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, trente cycles de PCR ont été programmés (30 s à 94°C, 1 min à 60 °C, 1 min à 72°C), suivis d'une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les étapes de vérification de la taille, de purification et du dosage de l'ADN ont été suivies par une double digestion enzymatique par *SfiI* et *BspEI* (Biolabs). Trente microgrammes d'ADN ont été incubés à 50°C pendant 4 heures en présence de 40 unités d'enzyme *SfiI*, 10 % (v/v) de tampon 2 et 1 % (v/v) de SAB 100x. Après purification, l'ADN a été dosé puis digéré par *BspEI* dans les mêmes conditions précédemment décrites pour l'ADN codant la C4BP $\alpha$ . Le produit des digestions a été finalement purifié puis dosé.

#### **I.1.5. Clonage de l'ADN codant le VHH anti-antigène carcino-embryonnaire (CEA)**

Le clonage de l'ADN codant le VHH anti-CEA a été réalisée au laboratoire par Mademoiselle Nathalie GODIN.

L'ADN codant le VHH anti-CEA a été gracieusement donné par Monsieur le Pr. D BATY (CNRS, UPR9027, Laboratoire des Systèmes Macromoléculaires, Marseille, France). Les 372 pb constituant cet ADN ont été amplifiées par la suite à l'aide des amorces suivantes :

Amorce en 5' : 5'- CGCGAGAGATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG -3'

Amorce en 3' : 5'- CGCGAGTCCGGATGAGGAGACAGTGACCTG - 3'

Les séquences soulignées sont spécifiques des enzymes de restrictions *BglIII* et *BspEI*, pour les amorces en 5' et en 3' respectivement.

La PCR a été effectuée dans les mêmes conditions de molarités précédemment décrites pour l'ADN codant la C4BP $\alpha$ C. Après une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, trente cycles de PCR ont été programmés (30 s à 94°C, 45 s à 64 °C, 1 min à 72°C), suivis d'une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les étapes de vérification de la taille, de purification et du dosage de l'ADN ont été suivies par une double digestion enzymatique par *BglIII* et *BspEI*, effectuée dans les mêmes conditions précédemment décrites pour l'ADN codant la TTFgC. Le produit des digestions a été finalement purifié puis dosé.

## ***I.2. Construction des vecteurs d'expressions protéiques***

### **I.2.1. Construction du vecteur pEFIRES / TTFgC - C4BP $\alpha$**

Le vecteur pEFIRES nous a été gracieusement donné par Monsieur le Dr. X DERVILLEZ (UMR 7087 CNRS, Laboratoire de Biologie et Thérapeutique des Pathologies Immunitaires, Paris).

Ce vecteur permet une transcription simultanée de l'ADN d'intérêt et du gène de résistance à la puromycine, grâce au promoteur 1 $\alpha$  du facteur d'élongation de chaîne (EF). Les sites IRES (Internal Ribosome Entry Sites) favorisent une meilleure traduction chaperonne-indépendante. Ce vecteur de 5.3 Kb réunit les avantages d'une expression bicistronique à un bon rendement protéique. Il a été décrit et utilisé dans la littérature, par HOBBS *et al* (Hobbs *et al.*, 1998) (Fig.27). Une séquence signal (NGF) a été insérée pour permettre la sécrétion de la protéine dans le milieu de culture.

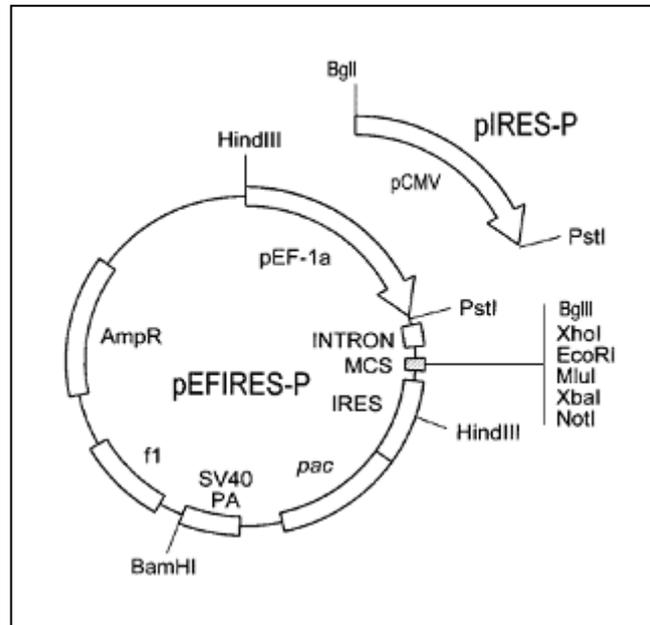
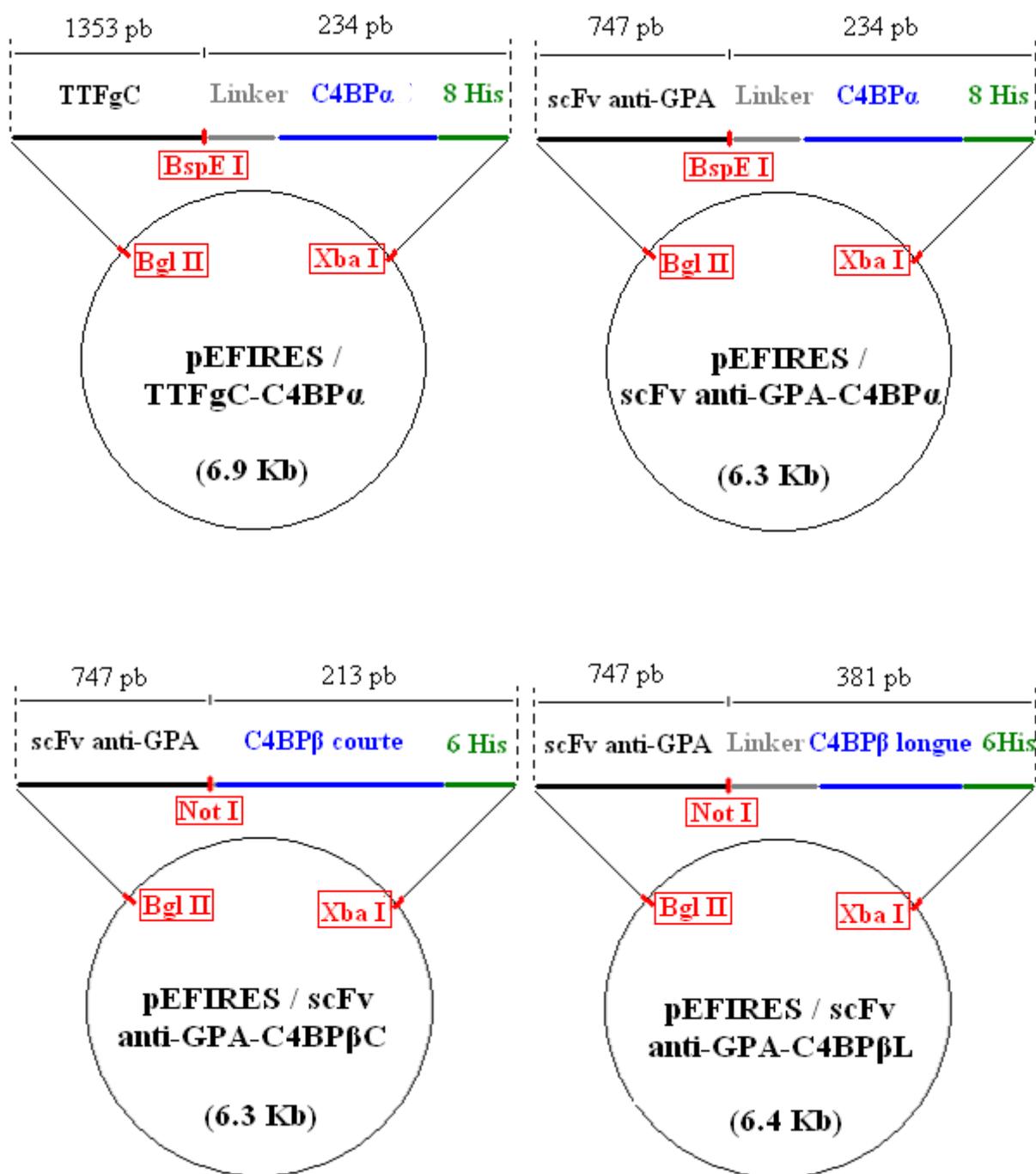


Figure 27. Structure du vecteur d'expression eucaryote pEFIRES. Les ADN codants les protéines d'intérêts ont été insérés au niveau du multisite de clonage (MCS).

Après digestions enzymatiques par *BglIII* et *XbaI*, puis purification et dosage selon le protocole expérimental décrit précédemment, le vecteur pEFIRES a été déphosphorylé. Vingt microgrammes d'ADN ont été incubés pendant 1 heure à 37°C, en présence de 10% (v/v) de phosphatase alcaline et 10% (v/v) de tampon 10x (Boehringer Mannheim, Paris, France). La réaction a été arrêtée par 0.5% (v/v) d'EDTA 0.5 M, pH 8, suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 min. Le plasmide a été ensuite purifié puis dosé.

Les ADNs codant le TTFgC et la C4BP $\alpha$  ont été ligués dans le vecteur pEFIRES à l'aide de la T4 ligase (Stratagene, Ozyme, S<sup>t</sup> Quentin, France) (Fig. 28, page 82).

Les ligations des différentes constructions dans le vecteur pEFIRES ont été réalisées selon le protocole expérimental précédemment décrit pour la construction pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$ , en utilisant les enzymes de digestions adéquates (Fig. 28).



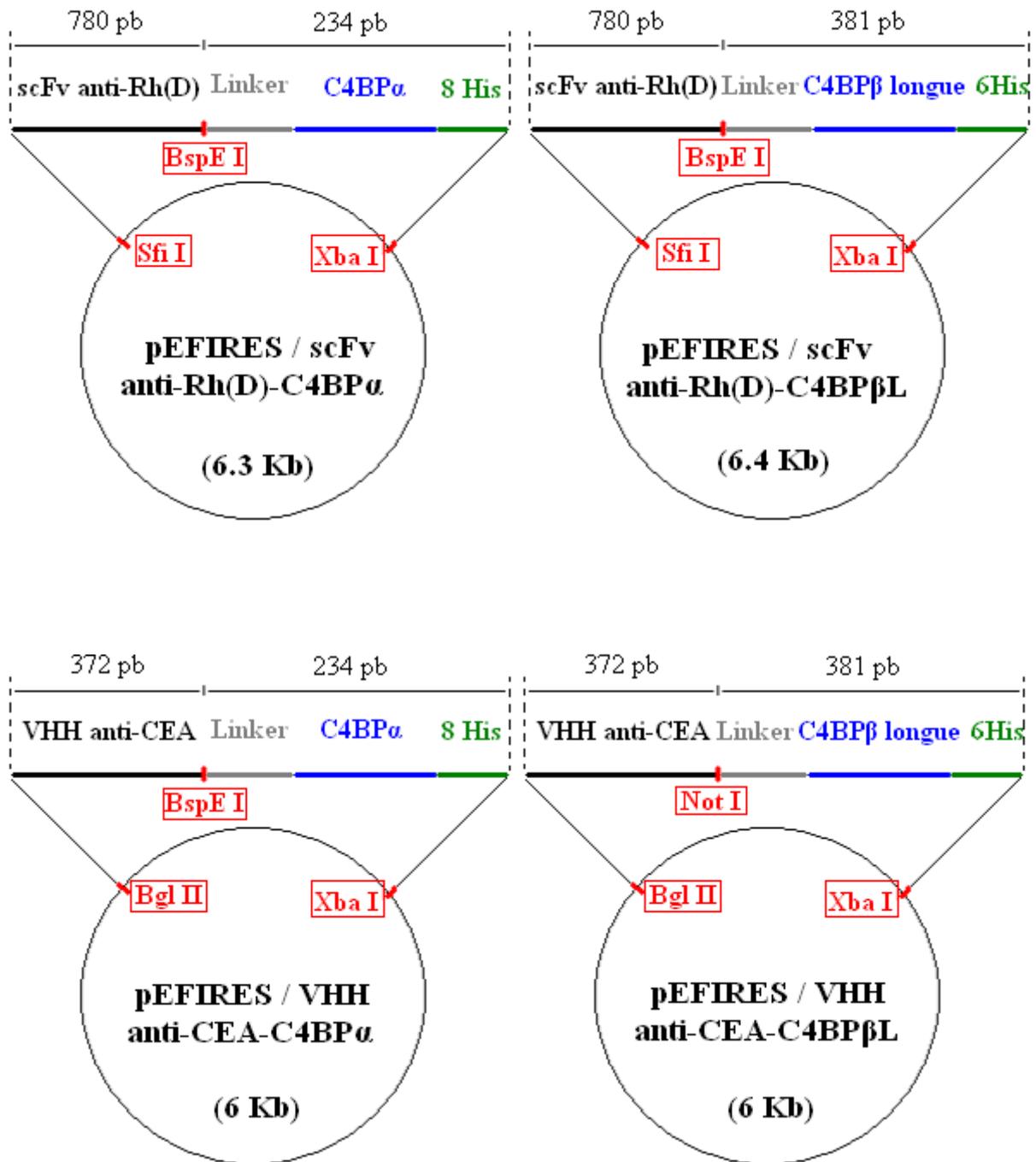


Figure 28. Représentations schématiques du vecteur pEFIREs contenant les différentes constructions à base du fragment C-terminal de la C4BP. Les sites de digestions enzymatiques et les tailles des différents fragments sont indiqués.

## **I.2.2. Sélection des clones bactériens**

Après ligations, les plasmides pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$ , pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ , pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  longue, pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  courte, pEFIRES / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ , pEFIRES / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$  longue, pEFIRES / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et pEFIRES / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$  ont été transformés dans des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Eragny sur Oise, France) rendues compétentes. Elles ont été ensuite ensemencées sur gélose avec agent sélectif (ampicilline). Des clones ont été sélectionnés. Une fois extraits par technique de lyse alcaline, les plasmides ont été digérés par les enzymes de restriction adéquates afin de vérifier les tailles des fragments d'intérêts. Des grandes cultures bactériennes ont été réalisées à partir des clones choisis et les plasmides extraits à l'aide du kit Hispeed plasmid maxi (Qiagen). Les ADN ont été ensuite séquencés (Genome express, Meylan, France).

## **I.2.3. Transfection des plasmides en cellules eucaryotes**

La lignée cellulaire 293T a été utilisée. Ces cellules adhérentes résultent de la transformation de cellules primaires de rein d'embryon humain (ATCC, CRL-11268). Elles ont été cultivées en milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Biowest, Paris, France), 1% de L-Glutamine (Gibco BRL) et des antibiotiques PSF (pénicilline, streptomycine et fungizone, respectivement à, 1000 U/ml, 1000  $\mu$ g/ml et 2.5  $\mu$ g/ml) (Gibco BRL). Les cellules ont été maintenues en culture à 37°C, en humidité, 5% CO<sub>2</sub>.

Trois millions et demi de cellules ont été transfectées avec 10  $\mu$ g d'ADN, en présence de 20  $\mu$ l de lipofectamine 2000 (Invitrogen). Le lendemain, 20  $\mu$ g/ml de puromycine (Sigma, St Quentin Fallavier, France) ont été ajoutées pour sélectionner les clones transfectés résistants.

Des transfections ont été réalisées, respectivement, avec les plasmides :

- pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$ .
- pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .
- pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  longue.
- pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  courte.
- pEFIRES / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ .
- pEFIRES / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$  longue.

- pEFIRES / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .
- pEFIRES / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$  longue.

Des co-transfections ont également été effectuées avec les plasmides :

- pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$  et pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .
- pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$  et pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  longue.
- pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$  et pEFIRES / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  courte.
- pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$  et pEFIRES / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ .
- pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$  et pEFIRES / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$  longue.
- pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$  et pEFIRES / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .
- pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$  et pEFIRES / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$  longue.

Une fois les transfections effectuées, les cellules ont été clonées par dilutions limitantes en plaques stériles de 96 puits (200  $\mu$ l) à fonds plats (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, France). Après une douzaine de jours, les puits ne comportant qu'un seul clone ont été sélectionnés. Les clones ont été transférés en plaques de 24 puits puis en plaques de 6 puits (5 ml) (Becton Dickinson).

## **I.2.4. Sélection des clones d'intérêt**

### **I.2.4.1. Immunofluorescence sur lame**

Les clones ont été cultivés en parallèle sur des lames d'immunofluorescence (IF) à 8 puits (Nunc). Elles ont été ensuite testées en marquage immunofluorescent :

Les cellules ont été lavées avec du PBS (Biomérieux, Lyon, France), 1% SAB (Sigma, Val-de-Fontenay, France) puis fixées à -20°C dans une solution aqueuse d'acétone 85%, pendant 7 min. Après 3 lavages au PBS, 1% SAB, les cellules ont été incubées, pendant 45 min à 4°C, avec un anticorps de mouton biotinylé anti-C4BP humaine (10  $\mu$ g/ml) (The Binding Site, St. Egrève, France), suivi après lavages, par 2  $\mu$ g/ml de streptavidine couplée à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen). Les cellules ont été ensuite observées au microscope à fluorescence (Olympus, Paris, France).

Seuls les clones homogènes ont été conservés pour une étude par Western blotting.

Cette technique a permis à la fois le criblage des clones et l'analyse de l'homogénéité de la population au sein de chaque clone.

### **I.2.4.2. Western blotting**

Les surnageants de cultures d'une vingtaine de clones ayant été présélectionnés par IF ont été récupérés puis concentrés 5 fois par tamisage moléculaire sur des centricons 20 (cut-off = 20 KDa) ou 100 (cut-off = 100 KDa) (Millipore, Molsheim, France) selon la taille attendue des protéines. Sur un gel SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel) : gel de concentration à 5% d'acrylamide et gel de séparation à 10%, 20 µl de chaque échantillon ont été déposés en présence de 10 µl de tampon d'inclusion réducteur (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.5, 6 M d'urée, 2% de SDS, 25% β2-mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol). La migration s'est effectuée à température ambiante pendant 1h30 sous une intensité de 25 mA/gel dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 25 mM, SDS 10%). Les protéines séparées ont été transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidènefluoride) par application d'un voltage constant (100 volts, 3 heures, 4°C). Le tampon de transfert est composé de 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 15% (v/v) de méthanol.

Après transfert, la membrane a été saturée une nuit à 4°C dans du tampon PBS, 5% de lait écrémé, 0.1% de Tween 20. La membrane a été ensuite incubée sous agitation durant une heure à 4°C dans un tampon PBS, 1% de lait écrémé, 0,1% de Tween 20, en présence de 100 mU/ml d'anticorps de souris anti-(histidine)<sub>6</sub> peroxydase (Roche). Après lavages de la membrane avec le tampon PBS, 1% de lait écrémé, les protéines ont été révélées par chimiluminescence grâce au kit ECL (Amersham).

### **I.2.4.3. Test d'hémagglutination**

#### ***I.2.4.3.a. Clones transfectés par l'ADN codant le scFv anti-GPA***

La GPA étant un antigène abondant à la surface des GR, sa présence est facilement identifiée par une réaction d'hémagglutination en présence d'anticorps ou scFv anti-GPA.

Les surnageants de culture d'une vingtaine de clones ayant été transfectés ont été récupérées puis concentrés 5 fois par tamisage moléculaire sur des centricons 20 ou 100 (Millipore) selon la taille attendue des protéines. Vingt cinq µl de culot de GR préalablement lavés 3 fois avec du PBS, ont été diluées au 1/40 dans du PBS. Vingt µl de cette dilution ont été ajoutés à 80 µl de surnageant concentré. Après incubation d'une heure à 37°C, les suspensions ont été déposées sur colonnes d'hémagglutination (DiaMed, Paris, France) puis centrifugées à 80 g pendant 10 min à température ambiante.

Les surnageants des clones positifs ont été testés par la suite en western blotting avec immunorévélation à l'aide de l'anti-His<sub>6</sub> peroxydase (Roche), pour vérifier la présence des deux protéines dans le cas d'une co-transfection.

#### ***I.2.4.3.b. Clones transfectés par l'ADN codant le scFv anti-RhD***

A cause de la faible accessibilité à l'antigène RhD onze fois transmembranaire et enfuis dans le glycocalyx, les GR ont été papainés (glycocalyx décapé) avant d'effectuer un test d'hémagglutination avec les surnageants de culture d'une vingtaine de clones ayant été transfectés.

Un ml de culot de GR RhD préalablement lavé 3 fois avec du PBS a été ajouté à 500 µl de papaines à 1% (Merck, Fontenay-sous-Bois, France). Après incubation pendant 7 min à 37°C, les GR ont été de nouveau lavés 3 fois. L'hémagglutination des GR RhD a été ensuite visualisée sur colonne après centrifugation comme décrit précédemment au paragraphe I.2.4.3.a.

Les surnageants des clones positifs ont été testés par la suite en western blotting avec immunorévélation à l'aide de l'anti-His<sub>6</sub> peroxydase (Roche), pour vérifier la présence des deux protéines dans le cas d'une co-transfection.

### **I.2.5. Caractérisation des différentes formes moléculaires produites et détermination des valences**

#### **I.2.5.1. Marquage biosynthétique par le <sup>35</sup>S**

Les clones ont été cultivés jusqu'à 70% de confluence dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France). Dix ml de milieu RPMI 1640 déficient en Méthionine et Cystéine (Sigma) avec des antibiotiques (PSF) (Gibco BRL), 10% de SVF (Biowest) et 1% de L-Glutamine (Gibco BRL) ont été ajoutés. Après 30 min, 100 µCi/ml de <sup>35</sup>S-Méthionine et <sup>35</sup>S-Cystéine (Amersham) ont été ajoutés.

Les surnageants de culture ont été collectés et immunoprécipités selon la procédure suivante :

Cinquante µl de billes magnétiques (4.10<sup>5</sup> billes/µl) recouvertes d'IgG de chèvre anti-IgG de souris (Dynabeads, Dynal, Compiègne, France), préalablement lavées 3 fois dans du PBS, 0.1% SAB, ont été utilisés par boîte de culture. Ils ont été incubés une nuit à 4°C sous agitation rotatoire avec 2 µg d'anticorps de souris anti-TTFgC (Roche) dans 8 ml de PBS,

0.1% SAB. Après 3 lavages en PBS, 0.1% SAB, les billes ont été incubées une nuit à 4°C sous agitation rotatoire avec les milieux contenant les protéines les protéines à immuno-précipiter. Après lavages, les billes ont été reprises par 20 µl de tampon réducteur ou non. Elles ont été ensuite mises à bouillir pendant 5 min puis centrifugés à 650 g pendant 5 min.

Les surnageants ont été déposés sur gels d'acrylamide à :

- 5%, pour les échantillons non réduits, dans le but d'identifier les formes multimériques.
- 10%, pour les échantillons réduits, dans le but d'identifier les protéines sous leurs formes monomériques et de démontrer l'assemblage des deux entités au sein d'une seule molécule hétérochimérique en cas de co-transfection.

La séparation a eu lieu dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe (I.5.1). Les gels ont été ensuite incubés dans un milieu fixateur (25% d'isopropanol, 10% d'acide acétique) pendant 30 min, puis dans l'Amplify (Amersham) pendant 1 heure. Après un court lavage à l'eau distillée, les gels ont été séchés à 60-80°C pendant 2 heures. Ils ont été par la suite exposés en autoradiographie en présence de films Kodak X-Omat AR (Kodak, Paris, France) pendant des temps variables, de 6 heures à 3 jours selon l'intensité du signal.

### **I.2.5.2. Estimation des valences des entités produites en co-transfection**

Une analyse quantitative de l'intensité des bandes a été effectuée par le logiciel BIOCAPT (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) à partir des profils de bandes protéiques obtenus en co-transfection, en western blotting.

Les ratios obtenus ont permis de déterminer le nombre de valences de chaque entité protéique d'une molécule hétéromultomérique.

### **I.2.6. Quantification des protéines par ELISA**

Les concentrations des protéines recombinantes dans les surnageants de culture ont été déterminées par ELISA.

Cent nanogramme par puits d'anticorps polyclonal de lapin anti-His<sub>6</sub> (ABR, St Quentin En Yvelines, France) ont été incubés une nuit à 4°C dans du PBS, dans une plaque ELISA Nunc Maxisorb 96 puits (Nunc). Les incubations suivantes ont été effectués pendant une heure à 37°C, séparées à chaque fois par 3 lavages avec 120µl / puits de PBS, SAB 1%. La plaque a été bloquée ensuite par 200 µl / puits de PBS, SAB 5%. Les dilutions de l'échantillon standard à concentration connue ainsi que les dilutions des surnageants à doser ont été

ajoutées. Un anticorps monoclonal de souris anti-C4BP $\alpha$  humaine (2F12) (0.5  $\mu$ g/ml) gracieusement fournie par Monsieur le Pr. BN BOUMA (CHU d'Utrecht, Département d'Hématologie, Pays-Bas), puis un anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase (Jackson Immunosciences, Marseille, France) (1  $\mu$ g / ml), ont été consécutivement ajoutés. La plaque a été finalement lavée 5 fois et les colorations révélées après ajout de 100  $\mu$ l de tampon citrate 100 mM, pH 5 (Sigma) / o-phenylènediamine (4 mM) (Sigma) / eau oxygénée (0.03%). La réaction a été arrêtée au bout de 6 min avec 100  $\mu$ l d'acide sulfurique (0.5 N) et les absorbances mesurées à 492 nm à l'aide du lecteur des microplaques (SLT, Labinstruments, Viotech, St Bonnet De Mure, France). Une courbe standard a été tracée à partir des densités optiques correspondant aux dilutions d'homomultimères C46-C4BP $\alpha$  (His) à concentration connue, gracieusement donné par Monsieur le Dr. X DERVILLEZ.

### **I.2.7. Purification des protéines par chromatographie d'exclusion**

Une étape préliminaire de calibrage de la colonne d'exclusion a été effectuée à l'aide de protéines standards colorées, de poids moléculaires connus : thyroglobuline (669 KDa), ferritine (440 KDa), catalase (232 KDa) et aldolase (158 KDa).

Une courbe correspondant aux poids moléculaires des protéines en fonction du volume d'élution a été tracée dans le but de déterminer les poids moléculaires des protéines à purifier.

Trois cents ml de surnageants de cultures de cellules produisant les protéines TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ , TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$  et TTFgC-C4BP $\alpha$ , ont été concentrés 100 fois sur centricon 100 (Millipore) puis migrés à travers une colonne de Sephacryl S-300HR (2,6 x 70 cm) (Pharmacia) en présence d'un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl, 150 mM, NaN<sub>3</sub> 1%, équilibré à pH 7.4. La chromatographie a été effectuée à 4°C avec un débit de 200  $\mu$ l/minute. Les fractions collectées toutes les 10 min ont été analysées au spectrophotomètre à 280 nm (Pharmacia). Celles correspondant à la phase d'élution de la protéine d'intérêt ont été mélangées.

## ***II. ANALYSE DE LA FIXATION DES PROTEINES PRODUITES A LEURS CIBLES***

### ***II.1. Hémagglutination directe***

Cette technique a permis de sélectionner les clones positifs dans un premier temps, en utilisant le surnageant de culture issu d'une faible pression de sélection (20 µg/ml de puromycine) puis concentré 5 fois. Elle nous a permis à ce stade d'analyser l'activité des protéines en utilisant le surnageant de culture natif, dont les clones sélectionnés ont été montés en puromycine (100 µg/ml) dans le but d'augmenter la production protéique.

#### **II.1.1. Protéines homomultimériques et hétéromultimériques contenant le scFv anti-GPA**

L'activité agglutinante des protéines contenant le scFv anti-GPA, a été analysée selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe (I.5.2.1) :

#### **II.1.2. Protéines homomultimériques et hétéromultimériques contenant le scFv anti-RhD**

A cause de la faible accessibilité de l'antigène RhD, la fonctionnalité des protéines contenant le scFv anti-RhD a été démontrée par hémagglutination sur GR RhD papainés.

Nous savons que les GR sont chargés négativement et entourés d'un nuage d'ions positifs qui entretiennent avec leur surface un potentiel électrique « Zéta ». On peut augmenter le pouvoir agglutinant de certains anticorps en diminuant ce potentiel par addition de macromolécules au milieu telle que la SAB.

Vingt µl d'une dilution au 1/40 de culot de GR RhD préalablement lavés 3 fois avec du PBS, ont été incubés pendant 1 heure en présence de 100 µl de surnageant de culture natif et 100 µl de SAB à 30% (Sigma).

Les suspensions ont été déposées sur colonnes d'hémagglutination (DiaMed) puis centrifugées à 80 g pendant 10 min à température ambiante.

### ***II.2. Cytométrie de flux***

La cytométrie de flux a été utilisée pour nous permettre une analyse quantitative de l'efficacité de la fixation des protéines produites sur leurs cibles : GR ou cellules cancéreuses.

### **II.2.1. Sur globules rouges**

Deux millions et demi de GR d'un individu récemment vacciné contre le tétanos, ont été lavés puis incubées avec 100 µl de surnageant de culture cellulaire pendant 1 heure à 37°C. Toutes les dilutions et lavages ont été faits en PBS, 1% SAB.

Les GR ont été ensuite lavés puis resuspendus dans 100 µl de sérum décomplémenté provenant de la même personne ou 100 µl (1µg) d'anticorps de souris anti-TTFgC (Roche). Après incubation pendant 1 heure à température ambiante puis lavages, 1 µg d'anticorps de chèvre biotinilé anti-Ig (H+L) humaine (Southern Biotechnology Associates, Montrouge, France) ou 1 µg d'anticorps de mouton biotinilé anti-Ig de souris (Amersham) ont été ajoutés puis incubés avec les GR pendant 45 min à 4°C. Après lavages, 1.5 µg de streptavidine marquée à la phycoérythrine (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) a été ajouté aux GR et incubés pendant 45 min à 4°C. Les cellules ont été ensuite fixées par 500 µl de formaldéhyde à 0.37% (Merck, Nogent Sur Marne, France).

Les GR marqués ont été analysés avec un cytomètre FACStar Plus (Becton Dickinson, CA, USA). Au moins 10000 événements ont été enregistrés pour chaque échantillon contenant les valences TTFgC et scFv anti-GPA.

La fixation des protéines contenant les valences TTFgC et scFv anti-RhD a été également analysée dans les mêmes conditions sur des GR RhD, en présence de SAB à 15%.

Dans les deux cas, l'analyse quantitative par cytométrie de flux a été suivie par un examen qualitatif de la répartition de la fixation des chimères sur les GR, par microscopie à fluorescence (Olympus).

### **II.2.2. Sur cellules cancéreuses**

La fixation des protéines contenant les valences TTFgC et VHH anti-CEA, a été testée sur des cellules adhérentes d'adénocarcinome de colon humain (LS 174T) (ATCC CCL 188) ( $2,5 \cdot 10^5$  cellules). Les cellules ont été cultivées en milieu MEM (Invitrogen) supplémenté avec 10% de SVF (Biowest), 1% de L-Glutamine (Gibco BRL) et des antibiotiques PSF

(pénicilline, streptomycine et fungizone, respectivement à, 1000 U/ml, 1000 µg/ml et 2.5 µg/ml) (Gibco BRL). Les cellules ont été maintenues en culture à 37°C, en humidité, 5% CO<sub>2</sub>.

Le même protocole expérimental de l'analyse, par cytométrie, de la fixation des chimères sur les cellules, décrit dans le paragraphe précédent a été suivi.

### ***II.3. Test de compétition de fixation sur cellules cancéreuses***

Dans le but de vérifier la fixation des hétéromultimères TTFgC-C4BPα / VHH anti-CEA-C4BP à l'antigène carcino-embryonnaire, un test de compétition de fixation sur cellules LS174T entre protéines recombinantes et anticorps monoclonal anti-CEA a été réalisé.

Deux cents cinquante mille cellules LS174T ont été incubées pendant 1 heure à 4°C, en présence de 2 µg d'anticorps monoclonal de souris anti-CEA (Clone C6G9) (Sigma) et 100 µl de plusieurs dilutions de surnageants de culture de cellules transfectées. Après deux lavages avec du PBS, 1% SAB, 1 µg d'anticorps de mouton biotinilé anti-Ig de souris (Amersham) a été ajouté. Après incubation de 45 min à 4°C suivie de trois lavages, 1.5 µg de streptavidine marquée à la phycoérythrine (Tebu-bio) ont été ajoutés aux cellules et incubés pendant 45 min à 4°C. Après lavages, les cellules ont été fixées par 500 µl de formaldéhyde à 0.37% (Merck) puis analysées avec un cytomètre FACStar Plus (Becton Dickinson).

### ***III. ANALYSE, IN VITRO, DE L'ACTIVATION DU COMPLEMENT PAR LES PROTEINES HETEROMULTIMERIQUES***

#### ***III.1. Analyse par cytométrie de flux et microscopie à fluorescence du dépôt de C3b et C4d du complément sur GR***

Dans le but d'évaluer la capacité des protéines recombinantes à activer le complément, le dépôt de certains éléments de la cascade du complément sur les GR a été recherché après fixation des protéines recombinantes.

Le même protocole expérimental décrit dans le paragraphe (II.2.1) a été suivi, en remplaçant l'anticorps de chèvre biotinylé anti-Ig (H+L) humaine (Southern Biotechnology Associates) par 50 µl de sérum humain déficient en C5, dilué au 1/2 dans du tampon de basse force ionique (LISS). Ce tampon contenant notamment des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (0.15 mM) et  $\text{Mg}^{2+}$  (0.5 mM), indispensables à l'activation du complément, est composé de 0.24 M de glycine, 3 mM de phosphate de sodium (pH 6.8), 31 mM de chlorure de sodium, 0.15 mM de chlorure de calcium et 0.5 mM de chlorure de magnésium. Les dépôts de C3b et C4d ont été ensuite révélés respectivement par un anticorps de chèvre FITC anti-C3b humain (Cappel, Cochranville, USA) et un anti-C4d humain biotinylé (Quidel, San Diego, USA) suivi par la streptavidine marquée à la phycoérythrine (Tebu-bio). Les GR marqués ont été analysés par cytométrie de flux et observées en microscope à fluorescence (Olympus).

#### ***III.2. Test hémolytique sur GR avec sérum autologue***

Quinze microlitre d'une suspension de GR à 2.5% dans le tampon LISS ont été incubés pendant 1 heure à 37°C avec chacune des chimères contenant les valences TTFgC / scFv anti-GPA ou TTFgC / scFv anti-RhD. Après centrifugation à 160 g pendant 5 min à température ambiante, le surnageant a été éliminé et 100 µl de sérum du sujet dont proviennent les GR RhD, récemment vacciné contre le tétanos, ont été ajoutés puis laissés incubés pendant 1 heure à 37°C. Les tubes ont été finalement centrifugés comme précédemment et les densités optiques des surnageants relevées à 405 nm avec correction à 630 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaques (SLT, Labinstruments, Vietech, St Bonnet De Mure, France).

L'efficacité de la lyse des GR est traduite par la valeur de la densité optique de l'absorbance de l'hémoglobine.

### ***III.3. Analyse par cytométrie de flux et microscopie à fluorescence du dépôt de C3b et C4d du complément sur cellules LS174T***

La capacité des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP à induire l'activation du complément sur cellules LS174T a été analysée.

Deux cents cinquante mille cellules LS174T ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante en présence de 10  $\mu$ g de protéines recombinantes purifiées. Après trois lavages avec du PBS 1% SAB, 100  $\mu$ l de sérum humain décomplémenté provenant d'une personne récemment vaccinée contre le tétanos ont été ajoutés. Cinquante microlitre de sérum humain déficient en C5, dilué au 1/2 dans du tampon LISS ont été ensuite ajoutés après lavages. Après 1 heure d'incubation à 37 °C puis lavages, les dépôts de C3b et C4d ont été révélés comme précédemment décrit dans le paragraphe III.1.

Les seules espèces dont les GR peuvent présenter l'antigène de la Glycophorine A sont les Primates supérieurs : Homme et gorille. De plus le modèle des chimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP, nous a servi seulement d'outil de démonstration de la possibilité d'entraîner une lyse complément – dépendante des GR *in vitro* en utilisant la réponse immune vaccinale.

L'application de ce système pour le ciblage et la lyse des GR RhD dans l'optique d'une prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle, ne peut à ce stade d'avancement passer aux essais *in vivo*.

La validation *in vivo* de ce système de ciblage et destruction des cellules par déviation de la réponse immune vaccinale a été illustrée par les chimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP.

## ***IV. ANALYSE DE LA FIXATION IN VIVO DES CHIMERES SUR DES TUMEURS PROVOQUEES CHEZ LES SOURIS NUDE***

Les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP sont des macromolécules (430 – 500 KDa). Leur capacité à franchir la paroi des vaisseaux sanguins pour atteindre la tumeur n'est pas encore identifiée à ce stade.

Une étape préliminaire d'analyse de la fixation de ces protéines recombinantes sur des coupes de tumeurs a été donc réalisée avant d'évaluer leur efficacité de fixation, *in vivo*, sur des tumeurs provoquées chez les souris Nude.

### ***IV.1. Fixation des chimères sur des coupes de tumeurs***

Cinq millions de cellules LS174T ont été injectées par voie sous-cutanée au niveau des flancs de 3 souris Nude (nu/nu) (Charles River, L'Arbresle, France). Après deux semaines, les tumeurs ont atteint un centimètre de diamètre, les souris ont été alors sacrifiées et leurs tumeurs prélevées puis congelées à -80°C. Des coupes à congélation de 5  $\mu$ m d'épaisseur ont été effectuées (Frigocut 2800, Reichert-Jung, Paris, France). Une étape de cryo-fixation des coupes à l'acétone (80%) à -20°C pendant 7 min a été suivie par une incubation à température ambiante pendant 1 heure, en présence des surnageants de culture contenant les protéines recombinantes TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP.

Après lavages avec du PBS, 1% SAB, un anticorps de mouton biotinylé anti-C4BP humaine (10  $\mu$ g/ml) (The Binding Site) a été appliqué pendant 1 heure, suivi de lavages, puis ajout de streptavidine couplée à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen) (2  $\mu$ g/ml). Les coupes ont été ensuite observées au microscope à fluorescence (Olympus).

### ***IV.2. Fixation aux tumeurs des chimères injectées par voie intraveineuse***

Dans le but d'évaluer la capacité de ces hétéromultimères à atteindre la tumeur, d'y pénétrer et s'y fixer, 300  $\mu$ g de chaque protéine purifiée ont été injectées pendant 3 jours par voie intraveineuse (veine caudale) à des souris Nude ayant développé des tumeurs provoquées de 1 cm de diamètre, selon le protocole précédemment décrit (paragraphe IV.1). Les tumeurs ont été prélevées au bout des 3 jours puis traitées par immunofluorescence pour détecter la présence des hétérochimères suivant le même mode opératoire décrit au paragraphe précédant.

### ***IV.3. Analyse de la biodistribution***

L'analyse de la spécificité de fixation des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP au niveau de la tumeur a été effectuée.

En effet, après avoir prélevé les tumeurs des souris Nude ayant subi des injections intraveineuses des protéines recombinantes (paragraphe précédent), plusieurs organes ont été également prélevés. Foie, rate, rein, muscle, cœur, poumon et cerveau ont été traitées par immunofluorescence pour détecter la présence des hétérochimères en suivant le même mode opératoire décrit au paragraphe (IV. 1).

## ***V. ANALYSE DE L'ACTIVITE ANTI-TUMORALE DES CHIMERES CHEZ LES SOURIS NUDE***

Un mélange a été préparé à partir de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules LS174 T, 300  $\mu\text{g}$  de protéines recombinantes purifiées et 250  $\mu\text{l}$  de sérum décomplémenté de souris Balb/C immunisées par l'anatoxine tétanique (Aventis Pasteur MSD, Paris, France) (4 injections de 4 UI par souris, séparées de 14 jours chacune). L'efficacité de l'immunisation ayant été vérifiée à l'aide d'un kit ELISA pour dosage des IgG antitétaniques (Ingen, Chilly-Mazarin, France). Le mélange a été immédiatement injectés en sous-cutané sur le flanc de souris Nude. Le développement des tumeurs a été suivi par calcul de la taille des masses tumorales selon la formule :  
 $\text{volume} = 1/2 \times \text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{épaisseur}$ .

# **RESULTATS**

## ***VI. PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES HOMOMULTIMERIQUES ET HETEROMULTIMERIQUES***

Le séquençage des ADN codant les différentes protéines d'intérêt insérés dans les plasmides pEFIRES a montré :

- Une identité entre les séquences théoriques et obtenues.
- Un agencement correct des inserts dans les vecteurs et conservation des cadres de lecture (voir Annexe).

### ***VI.1. Criblage des clones exprimant les protéines recombinantes***

Le marquage en immunofluorescence a permis de sélectionner les clones produisant la protéine d'intérêt et d'analyser leurs homogénéités (Fig. 29).

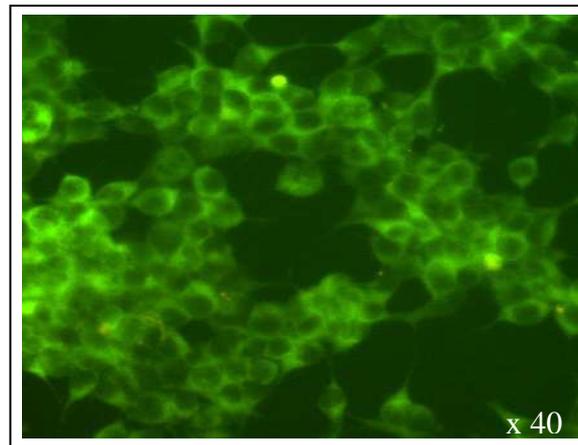


Figure 29. Immunomarquage sur lame de cellules 293T transfectées par le plasmide pEFIRES / TTFgC-C4BP $\alpha$ . Les protéines sont reconnues par l'anticorps polyclonal biotinylé anti-C4BP, révélé par la streptavidine couplée à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488.

L'immunomarquage montre l'homogénéité du clone cellulaire.

### ***VI.2. Analyses structurales des protéines recombinantes***

#### **VI.2.1. Western Blotting**

L'électrophorèse des protéines en conditions réductrices sur SDS PAGE (10% d'acrylamide) suivie de l'immunorévélacion par l'anti-His<sub>6</sub> peroxydase, a permis d'identifier les formes monomériques et de déterminer leurs poids moléculaires apparents (PMa).

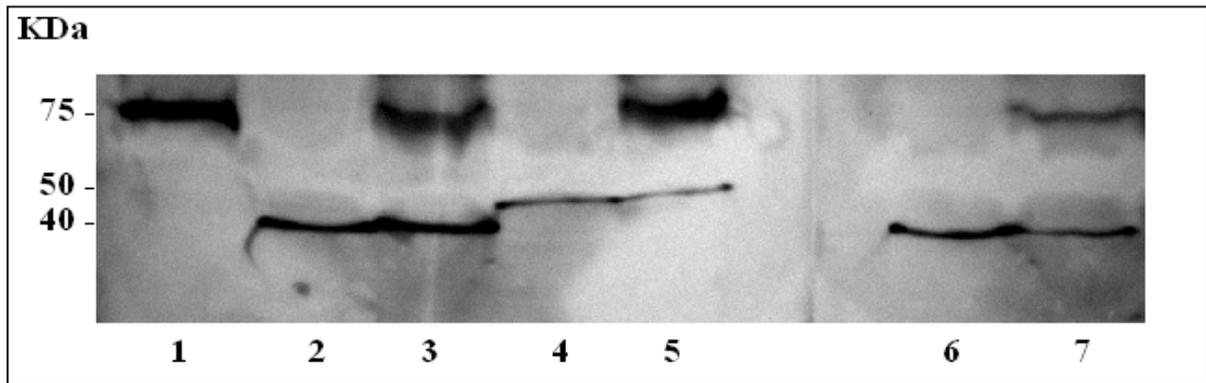


Figure 30. Analyse en SDS PAGE (10% d'acrylamide) de molécules recombinantes en conditions réductrices. Immunorévélation effectuée par l'anti-His<sub>6</sub> peroxydase.

Surnageants de cultures de cellules transfectées par :

1. La construction TTFgC-C4BP $\alpha$ .
2. La construction scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .
3. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .
4. La construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L.
5. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L.
6. La construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C.
7. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C.

Le monomère TTFgC-C4BP $\alpha$  est de P<sub>Ma</sub> d'environ 75 KDa.

Le monomère scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  est de P<sub>Ma</sub> d'environ 40 KDa.

Le monomère scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L est de P<sub>Ma</sub> d'environ 50 KDa.

Le monomère scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C est de P<sub>Ma</sub> d'environ 40 KDa.

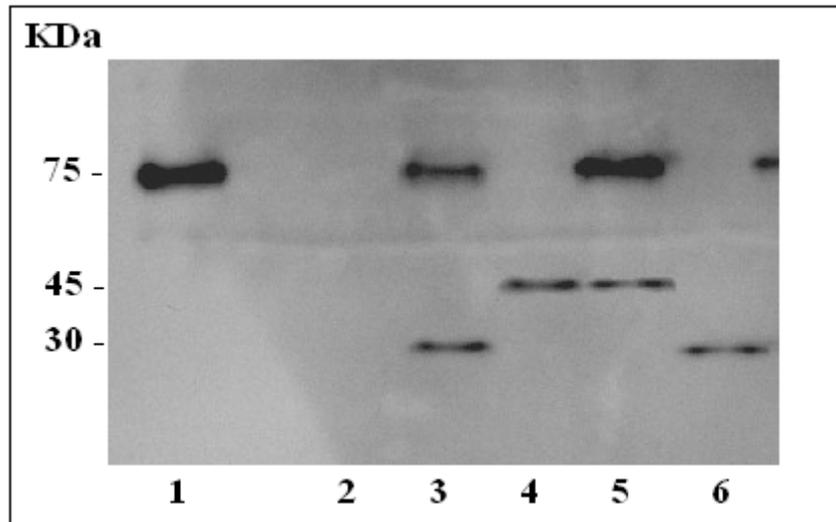


Figure 31. Analyse en SDS PAGE (10% d'acrylamide) de molécules recombinantes en conditions réductrices. Immunorévélation effectuée par l'anti-His<sub>6</sub> peroxydase.

Surnageants de cultures de cellules transfectées par :

1. La construction TTFgC-C4BP $\alpha$ .
2. Surnageants de cultures de cellules non transfectées.
3. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .
4. La construction VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L.
5. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L.
6. La construction VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .

Le monomère VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  est de P<sub>Ma</sub> d'environ 30 KDa.

Le monomère VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L est de P<sub>Ma</sub> d'environ 45 KDa

## VI.2.2. Marquage biosynthétique au $^{35}\text{S}$ et migration des protéines en conditions réductrices

Le marquage biosynthétique des protéines a été suivi d'une immuno-précipitation avec un anticorps anti-TTFgC des surnageants de culture de cellules 293T transfectées par les différentes constructions. Les multimères contenant la valence TTFgC sont alors accrochés. L'électrophorèse en conditions réductrices permet d'identifier, en cas de co-transfection, les deux entités protéiques et de démontrer ainsi leur association en une seule molécule hétérochimérique (Fig. 32).

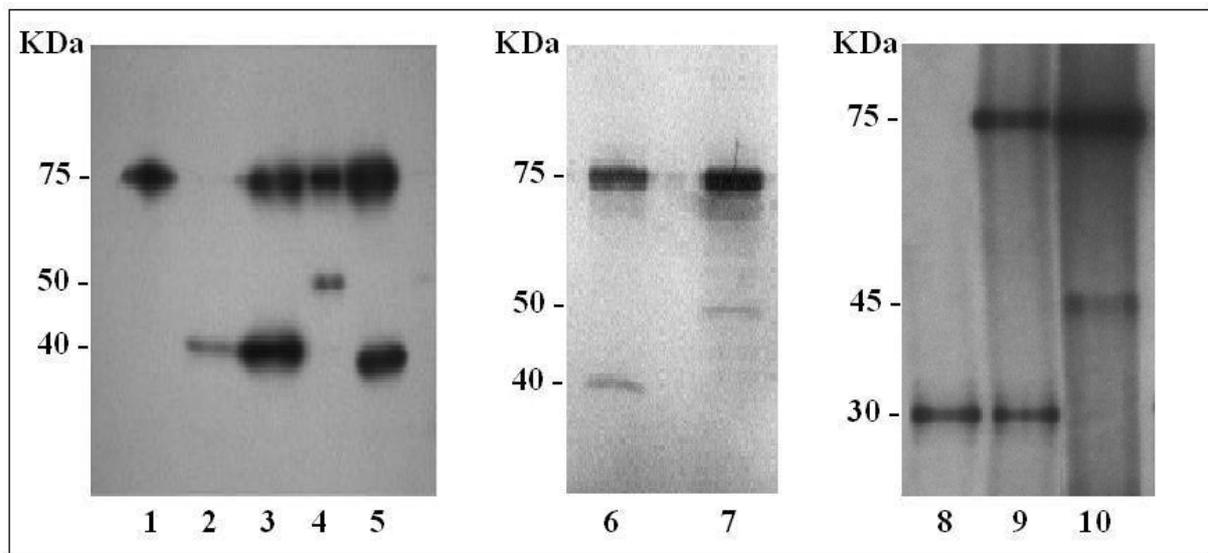


Figure 32. Analyse en SDS PAGE en conditions réductrices (10% d'acrylamide) de diverses molécules recombinantes chimériques après marquage biosynthétique au  $^{35}\text{S}$  Met./Cys. puis immuno-précipitation avec l'anti-TTFgC (sauf pistes 2 et 8 : immuno-précipitation avec l'anti-His<sub>6</sub>).

Immuno-précipitation des surnageants de cultures des cellules transfectées par :

1. La construction TTFgC-C4BP $\alpha$ .
2. La construction scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .
3. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .
4. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L.
5. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C.
6. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ . Le PMa du monomère scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  est d'environ 40 KDa.
7. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L. Le PMa du monomère scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  est d'environ 50 KDa.
8. La construction VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .
9. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .
10. Les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  et VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L.

L'immuno-précipitation des surnageants de culture avec l'anticorps monoclonal anti-TTFgC a permis de montrer l'assemblage des protéines au sein de la même molécule hétéromultimérique pour les entités :

- TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .
- TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L.
- TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C.
- TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ .
- TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L.
- TTFgC-C4BP $\alpha$  et VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .
- TTFgC-C4BP $\alpha$  et VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L.

### VI.2.3. Estimation des valences des entités produites en co-transfection

L'estimation des valences de chaque entité protéique d'une molécule hétéromultomérique a été réalisée à partir des profils, obtenus en western blot, des bandes protéiques issues de co-transfection.

L'analyse à l'aide du logiciel BIOCAPT, des volumes des bandes TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ , a permis de trouver un rapport de 2,32 (Fig. 33). Cette valeur se situe entre les ratios 2 et 2,5. Elle peut s'accorder avec une configuration combinatoire de 4 à 5 valences TTFgC-C4BP $\alpha$  pour 2 valences scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .

La même analyse a permis de déterminer les ratios des autres hétéromultimères et d'en déduire les valences :

Hétérochimères	Rapport	valences
TTFgC-C4BP $\alpha$ / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L	5,82	6 / 1
TTFgC-C4BP $\alpha$ / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C	5,78	6 / 1
TTFgC-C4BP $\alpha$ / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$	2,29	4 / 2 et 5 / 2
TTFgC-C4BP $\alpha$ / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L	6,11	6 / 1
TTFgC-C4BP $\alpha$ / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$	2,37	4 / 2 et 5 / 2
TTFgC-C4BP $\alpha$ / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L	6,18	6 / 1

Les ratios trouvés pour les hétéromultimères  $\alpha / \alpha$  et  $\alpha / \beta$  sont en adéquation avec les données structurales relatives à la C4BP naturelle, présente dans le sérum sous trois formes (7 $\alpha$ , 1 $\beta$ ), (6 $\alpha$ , 1 $\beta$ ) et (6 $\alpha$ , 0 $\beta$ ).

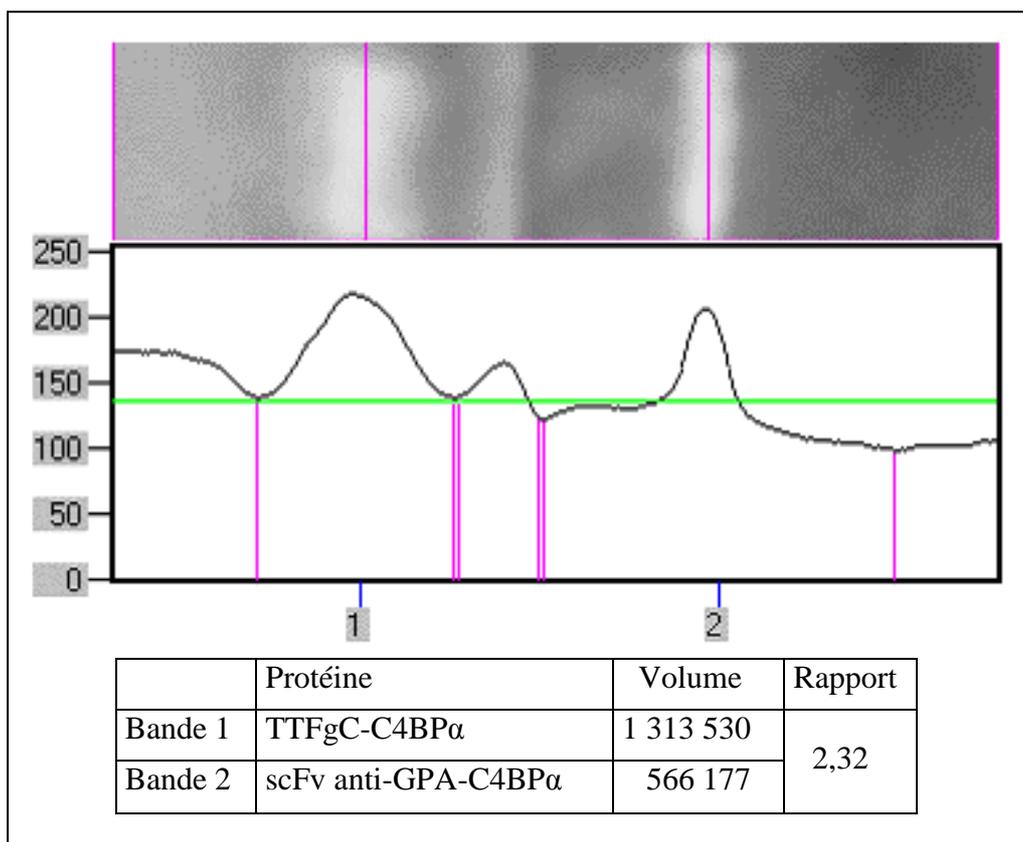


Figure 33. Analyse par le logiciel BIOCAPT, des volumes des bandes protéiques TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  obtenues en co-transfection.

## VI.2.4. Marquage biosynthétique au <sup>35</sup>S et migration des protéines en conditions partiellement réductrices

Le marquage biosynthétique des protéines a été suivi d'une immuno-précipitation des surnageants de culture avec un anticorps anti-TTFgC. Les multimères contenant la valence TTFgC sont alors accrochées. L'électrophorèse en conditions partiellement réductrices ( $\beta$ -mércaptoéthanol 7 mM) permet d'identifier les formes multimériques (Fig. 34).

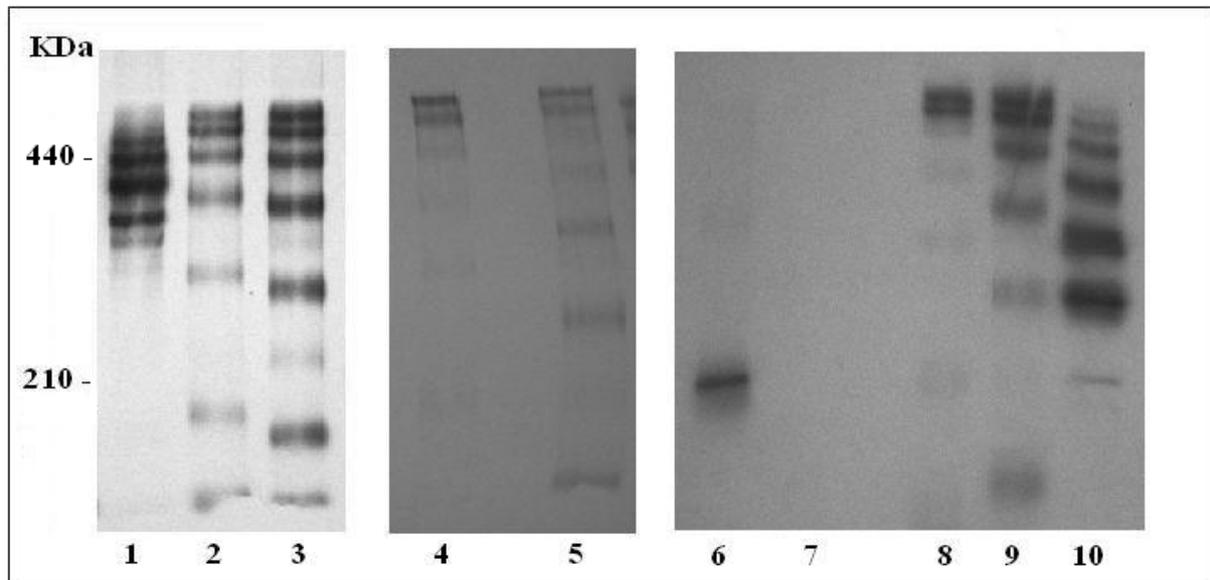


Figure 34. Analyse en SDS PAGE en conditions partiellement réductrices (5% d'acrylamide) de diverses molécules recombinantes chimériques après marquage biosynthétique au <sup>35</sup>S Met./Cys. puis immuno-précipitation avec l'anti-TTFgC (sauf piste 6 : immuno-précipitation avec l'anti-His<sub>6</sub>).

Surnageants immuno-précipités de cultures de cellules transfectées par :

1. TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .
2. TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L.
3. TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C.
4. TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ .
5. TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L.
6. VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .
7. Surnageant de culture de cellules non transfectées.
8. TTFgC-C4BP $\alpha$ .
9. TTFgC-C4BP $\alpha$  et VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L.
10. TTFgC-C4BP $\alpha$  et VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ .

L'analyse des surnageants de culture après marquage biosynthétique et migration en conditions partiellement réductrices a permis de montrer que:

- La protéine TTFgC-C4BP $\alpha$  est présente sous deux formes majoritaires de haut P<sub>Ma</sub>, pouvant correspondre à des hexamères et heptamères (Fig 34, piste 8).
- La protéine VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  est présente sous une forme multimérique unique de P<sub>Ma</sub> d'environ 210 KDa pouvant correspondre à un heptamère (Fig. 34, piste 6).
- La protéine TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  est présente sous deux formes majoritaires de haut P<sub>Ma</sub> (Fig 34, piste 4). Elles peuvent correspondre aux combinaisons :  
5 x (TTFgC-C4BP $\alpha$ ) / 2 x (scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ ) et  
4 x (TTFgC-C4BP $\alpha$ ) / 2 x (scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ ).
- La protéine TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  est présente sous trois formes majoritaires de hauts P<sub>Ma</sub> (Fig 34, piste 1). Elles peuvent correspondre aux combinaisons :  
5 x (TTFgC-C4BP $\alpha$ ) / 2 x (scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ ),  
4 x (TTFgC-C4BP $\alpha$ ) / 2 x (scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ ) et  
5 x (TTFgC-C4BP $\alpha$ ) / 1 x (scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ ).
- Les protéines TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L (Fig 34, piste 2), TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C (Fig 34, piste 3), TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L (Fig 34, piste 5), TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (Fig 34, piste 9) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (Fig 34, piste 10), sont présentes chacune sous plusieurs formes moléculaires. Elles correspondent à des espèces combinatoires à valences variées.

### VI.3. Quantification des protéines par ELISA

Une courbe d'étalonnage a été tracée à partir des absorbances correspondant aux dilutions d'homomultimère C46-C4BP $\alpha$  (His) à concentration connue (Fig. 35).

La courbe obtenue présente une régression logarithmique dont la courbe de tendance (en rouge) a pour équation  $Y = 0,785 \text{ Log}(X) - 1,6178$  et de coefficient de détermination  $R^2 = 0,9864$ .

Le calcul des concentrations en protéines recombinantes des surnageants de cultures des différentes constructions a donné des valeurs moyennes de 2,5 à 3,6  $\mu\text{g/ml}$ .

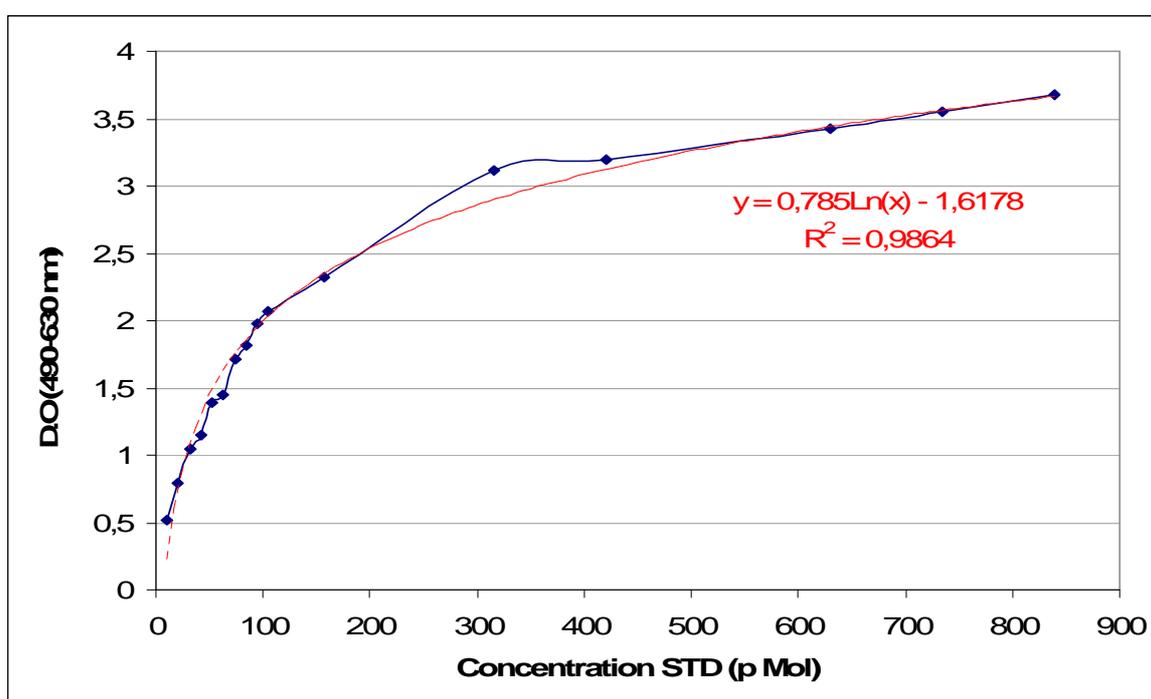


Figure 35. Courbe d'étalonnage établie avec la protéine homomultimérique C46-C4BP $\alpha$  (His).

### VI.4. Purification des protéines par chromatographie d'exclusion

Une étape préliminaire de calibrage de la colonne d'exclusion a été effectuée à l'aide de protéines standards colorées, de poids moléculaires (PM) connus : thyroglobuline (669 KDa), ferritine (440 KDa), catalase (232 KDa) et aldolase (158 KDa).

Une courbe correspondant aux absorbances  $(D.O)_{280 \text{ nm}}$  des fractions en fonction du volume d'élution ( $V_e$ ) a été tracée (Fig. 36). Elle nous a permis de dresser la droite correspondant aux Logarithmes des PM des protéines en fonction du ( $V_e$ ).

Cette droite présente une régression linéaire dont la courbe de tendance a pour équation :  
 $Y = -365,21 X + 1124,2$  et de coefficient de détermination  $R^2 = 0,9858$ .

Ces données nous ont permis de déduire les PM des protéines recombinantes purifiées (Tableau IV).

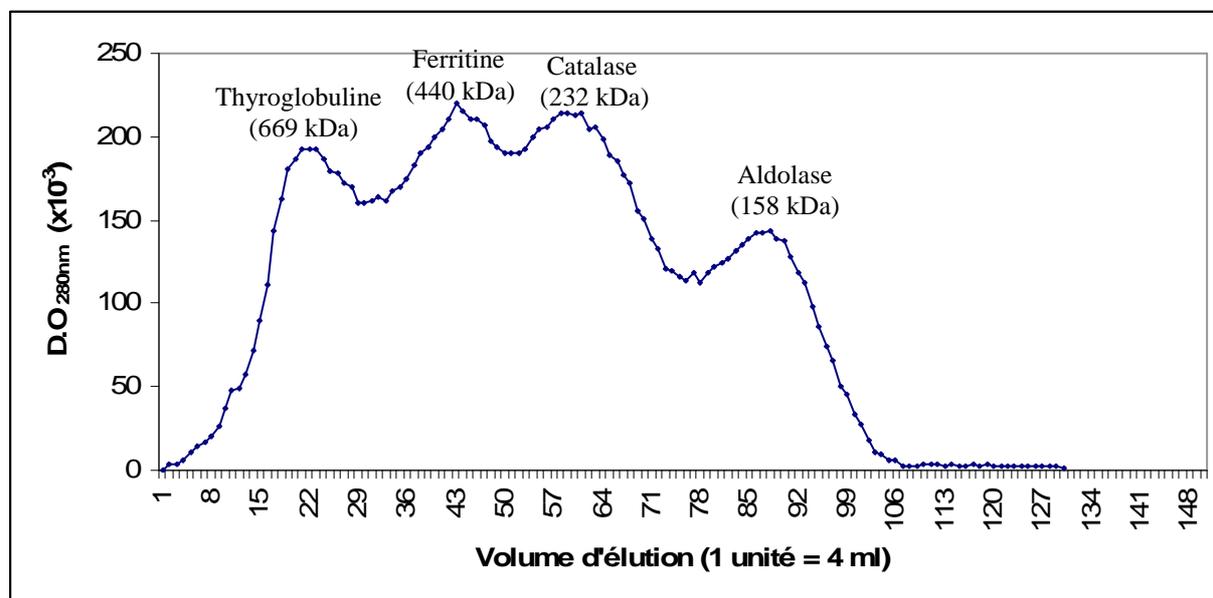


Figure 36. Courbe de l'absorbance des protéines standards en fonction du volume d'élution (Ve).

	TTFgC-C4BP $\alpha$	TTFgC-C4BP $\alpha$ / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$	TTFgC-C4BP $\alpha$ / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L
Ve	142 ml	162 ml	138 ml
PM	490 KDa	430 KDa	500 KDa

Tableau IV. Poids moléculaires des protéines recombinantes purifiées calculés à partir des Ve.

Seules les chimères TTFgC-C4BP $\alpha$ , TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L, ont été purifiées sur colonne d'exclusion pour évaluer leurs activités *in vivo*.

Le PM de l'homomultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  calculé à partir de la Ve est de 490 KDa.

Le calcul des PMa de ces formes multimériques à partir de la valeur de la taille du monomère (75 KDa) obtenue en SDS PAGE (Fig. 30, piste 1, page 99), (Fig. 31, piste 1, page 100), donne 525 KDa pour l'heptamère et 450 KDa pour l'hexamère.

La valeur obtenue par chromatographie d'exclusion correspond approximativement à la moyenne des tailles des heptamère et hexamère (Fig. 37). La protéine est donc secrétée sous forme d'homomultimères de 6 valences et 7 valences.

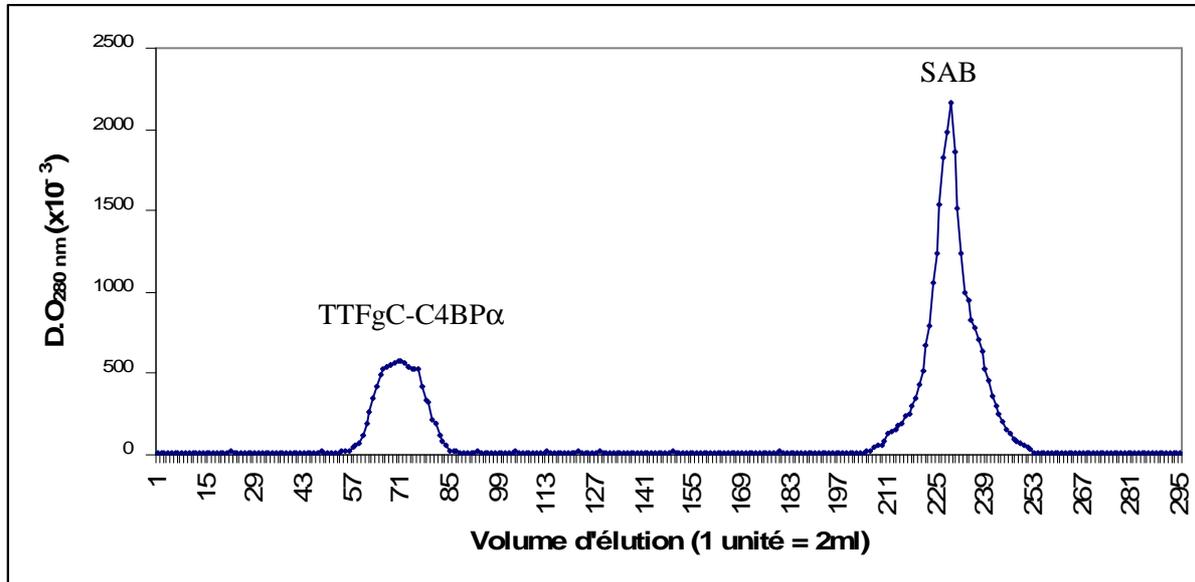


Figure 37. Courbe de l'absorbance en fonction du  $V_e$  correspondant à la purification sur colonne d'exclusion du surnageant de culture concentré de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$ .

Des profils similaires des courbes d'absorbance en fonction du  $V_e$ , ont été obtenus lors de la purification des hétérochimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (Figures non présentées).

La chromatographie d'exclusion a permis de purifier les protéines produites en les débarrassant de la SAB ajoutée au milieu de culture des cellules transfectées. Elle a permis également de déterminer leurs PM.

## VII. ANALYSE DE LA FIXATION DES PROTEINES PRODUITES SUR LEURS CIBLES

### VII.1. Hémagglutination directe des GR par les protéines homomultimériques et hétéromultimériques contenant le scFv anti-GPA

Les surnageants de culture natifs contenant les protéines scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ , scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L, TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ , et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L, agglutinent directement les GR (Fig. 38, colonnes 3 à 6).

Le surnageant de culture natif contenant la protéine scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C agglutine faiblement les GR (Fig. 38, colonnes 7).

Le surnageant de culture natif contenant la protéine et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C n'agglutinent pas les GR (Fig. 38, colonnes 8).

La réaction d'hémagglutination montre que les protéines sont secrétées sous forme active très stable. Conservées à 4°C, elles ont gardées leur activité agglutinante plus d'un an après leur production.

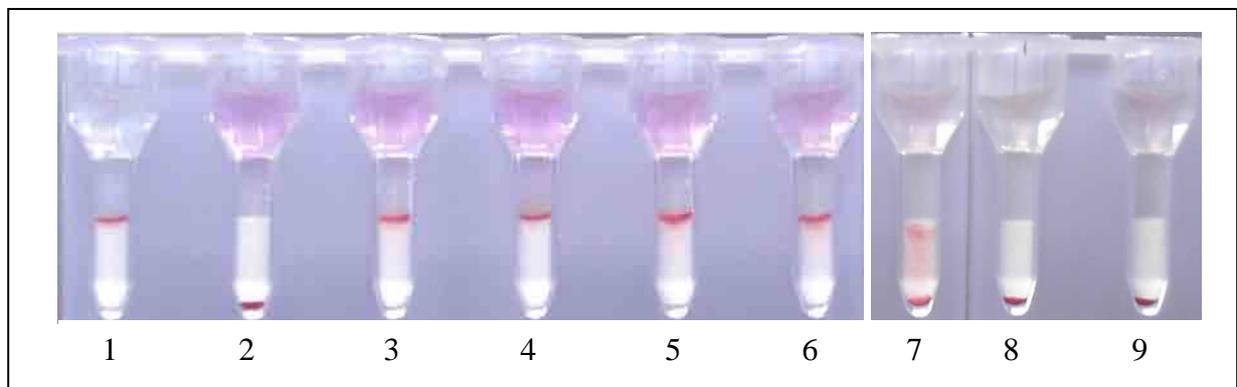


Figure 38. Hémagglutination directe des GR sur colonnes. Les GR sont incubés avec :

1. Anticorps R18 anti-GPA (témoin positif)
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
3. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$
4. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$
5. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L
6. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L
7. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C

8. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C
9. Surnageant de cellules non transfectées (témoin négatif)

## ***VII.2. Hémagglutination directe des GR Rh (D) par les protéines homomultimériques et hétéromultimériques contenant le scFv anti-RhD***

Dans le but de palier la faible accessibilité de l'antigène RhD, les surnageants de culture ont été incubés avec les GR RhD en présence de BSA à 15%.

Dans ces conditions, les surnageants de culture contenant les protéines scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ , scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L, TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L, agglutinent directement les GR (Fig. 39).

La stabilité des protéines a été vérifiée par un deuxième test d'hémagglutination un an après.

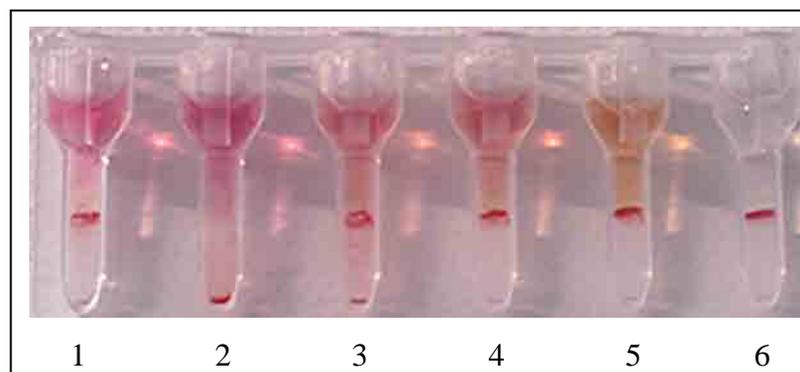


Figure 39. Hémagglutination directe des GR sur colonnes. Les GR RhD sont incubés, en présence de SAB à 15%, avec :

1. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
3. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L
4. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$
5. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L
6. Surnageant de cellules transfectées par les constructions scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  / CR1-C4BP $\alpha$  (témoin positif)

### VII.3. Analyse quantitative par cytométrie de flux de la fixation des chimères sur cellules

La cytométrie de flux a permis une analyse de l'efficacité de la fixation des protéines produites sur leurs cibles : GR ou cellules cancéreuses.

#### VII.3.1. Cytométrie de flux sur GR

L'efficacité de la fixation de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  (Fig. 40, 4) est supérieure à celle de TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L (Fig. 41, 3).

L'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C ne se fixe que très faiblement aux GR (Fig. 42, 3).

Les homomultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  ont servi de contrôles négatifs. Le TTFgC-C4BP $\alpha$  ne se fixe pas aux GR. Le scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  se lie aux GR mais n'est pas détecté en cytométrie de flux car l'anticorps utilisé pour révéler les chimères est l'anti-TTFgC.

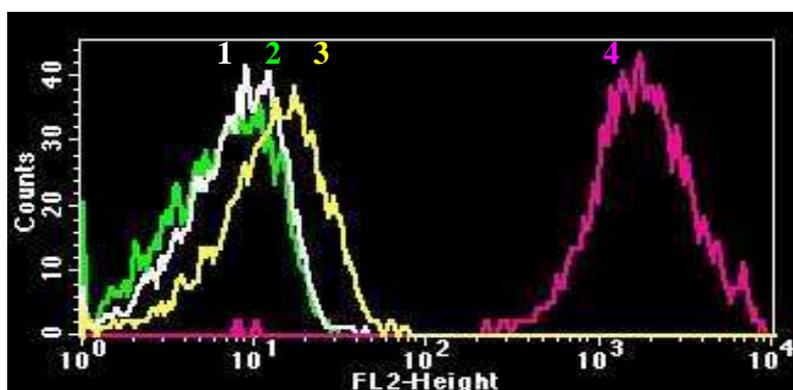


Figure 40. Analyse par cytométrie de flux de la fixation du TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  sur les GR, révélée par l'anticorps monoclonal anti-TTFgC.

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$
3. Surnageant de cellules non transfectées
4. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$

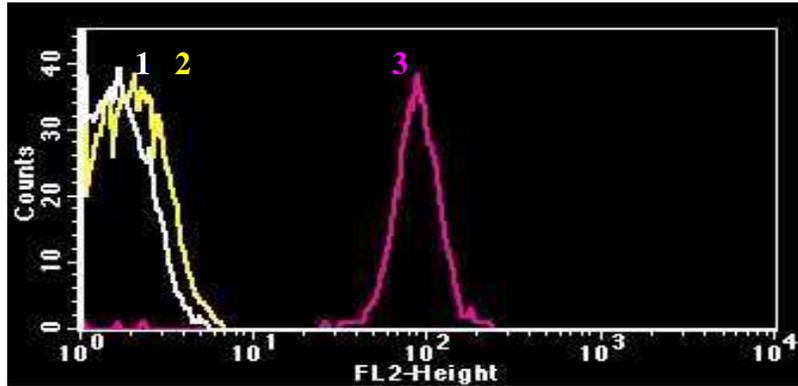


Figure 41. Analyse par cytométrie de flux de la fixation du TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L sur GR, révélée par l'anticorps monoclonal anti-TTFgC.

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L
3. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L

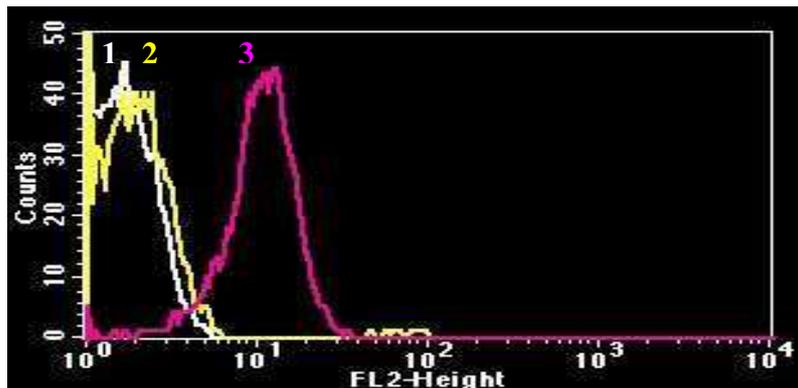


Figure 42. Analyse par cytométrie de flux de la fixation du TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C sur GR, révélée par l'anticorps monoclonal anti-TTFgC.

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C
3. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C

L'examen qualitatif de la répartition de la fixation des chimères sur les GR a été effectué par microscopie à fluorescence (Fig. 43).

La valence scFv anti-GPA permet d'accrocher la grappe de TTFgC à la surface des GR. Dans le cas des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ , la répartition est uniforme (Fig. 43, A).

Les distributions des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L (Fig. 43, B) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C (Fig. 43, C) sont granulaires.

La fixation aux GR, des molécules TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L est plus importante de celle des molécules TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C.

En effet, la valence scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C est par définition plus courte que la valence scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L. Cette différence de taille pourrait être à l'origine d'une plus faible accessibilité du fragment scFv anti-GPA, entouré par la grappe de TTFgC.

Contrairement à l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  possédant deux valences scFv anti-GPA, les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  n'en possèdent qu'une seule. L'avidité est donc diminuée, ce qui pourrait expliquer les différences d'efficacité de fixations et de répartitions entre les formes contenant les valences scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  et scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ .

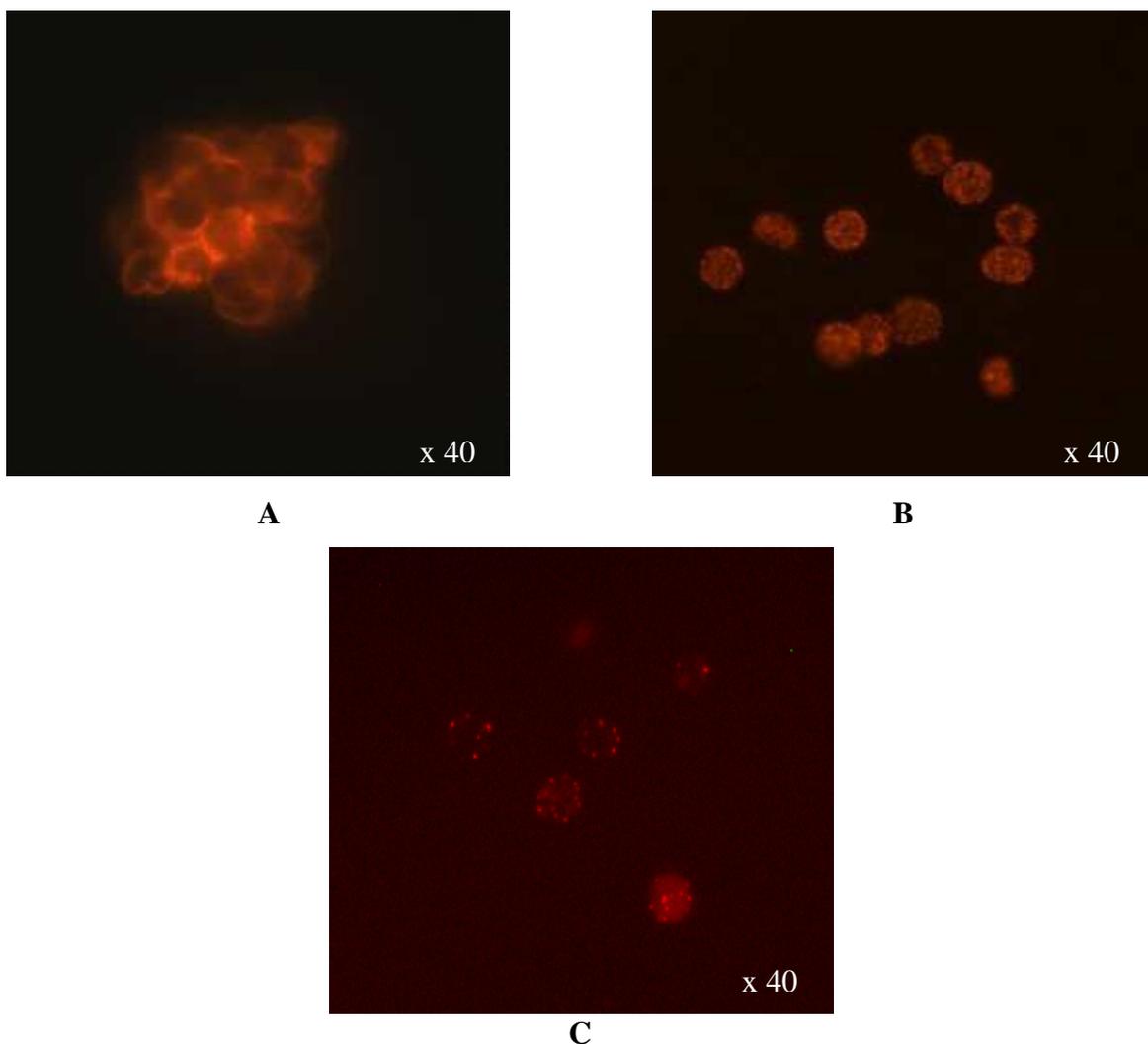


Figure 43. Analyse par microscopie à fluorescence de la répartition sur GR des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  (A), TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L (B) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C (C).

### VII.3.2. Cytométrie de flux sur GR RhD

A cause de la faible accessibilité de l'antigène RhD, les chimères contenant la valence scFv anti-RhD se fixent très faiblement à la surface des GR RhD natifs (Fig. 44, 1). La papaination permet de décaper la surface des GR et de rendre l'antigène RhD accessible aux protéines recombinantes (Fig. 44, 3).

La fixation des molécules recombinantes sur GR RhD natifs a été améliorée à l'aide de la BSA 15%. Les chimères se fixent dans ces conditions plus efficacement à leur cible (Fig. 44, 2). Le rendement reste cependant inférieur à celui obtenu sur GR RhD papainés.

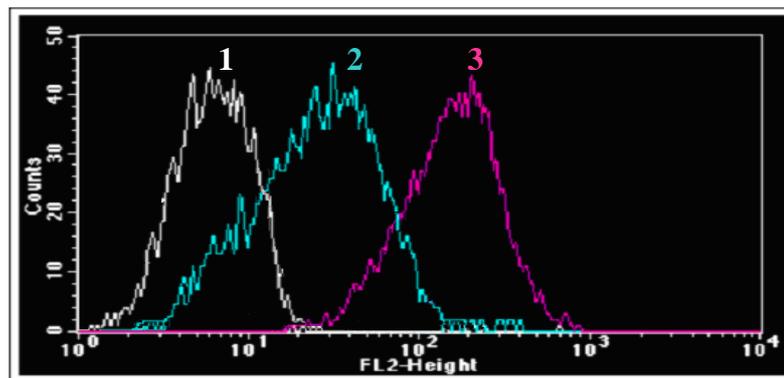


Figure 44. Analyse par cytométrie de flux de la fixation du TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  sur les GR RhD, révélée par l'anticorps monoclonal anti-TTFgC

1. GR RhD natifs incubés avec le surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ .
2. GR RhD natifs incubés, en présence de SAB 15%, avec le surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ .
3. GR RhD papainés incubés avec le surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ .

L'examen qualitatif de la répartition de la fixation des chimères sur les GR RhD a été effectué par microscopie à fluorescence (Fig. 45).

La valence scFv anti-RhD permet d'accrocher la grappe de TTFgC à la surface des GR RhD natifs en présence de SAB 15%.

La répartition des hétéromultimères est granulaire. Elle est plus dense pour la TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  (Fig. 45, A) que pour la TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L (Fig. 45, B).

La différence entre le nombre de valences scFv anti-RhD dans chaque hétéromultimère (2 pour TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  et 1 pour TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L) permet d'expliquer les disparités obtenues dans l'efficacité de fixation (résultat non présenté) et de répartition.

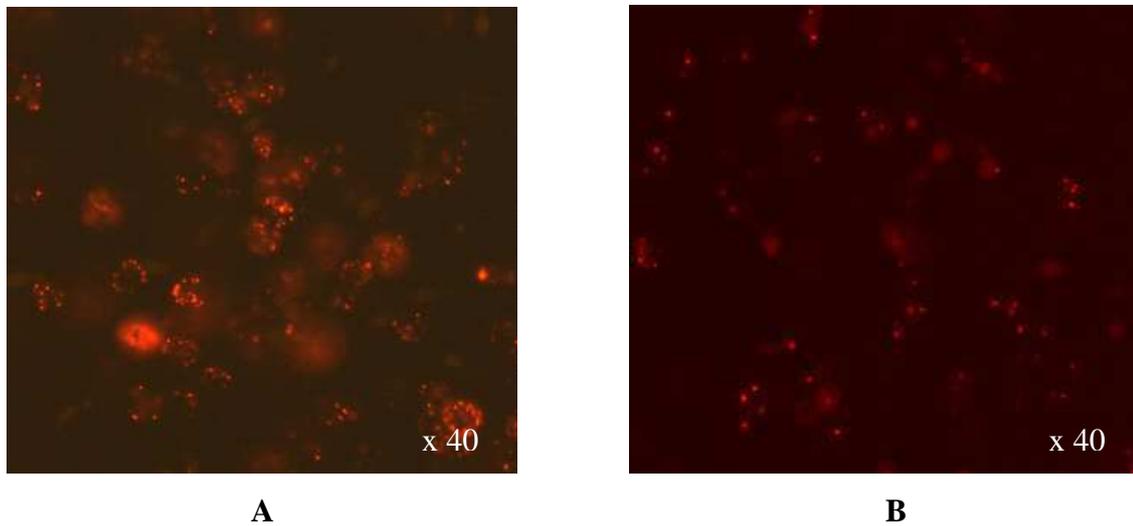


Figure 45. Analyse par microscopie à fluorescence de la répartition sur GR RhD des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  (A) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L (B).

### VII.3.3. Cytométrie de flux sur cellules LS174T

L'efficacité de la fixation de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (Fig. 46, 4) est légèrement supérieure à celle de TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (Fig. 47, 4).

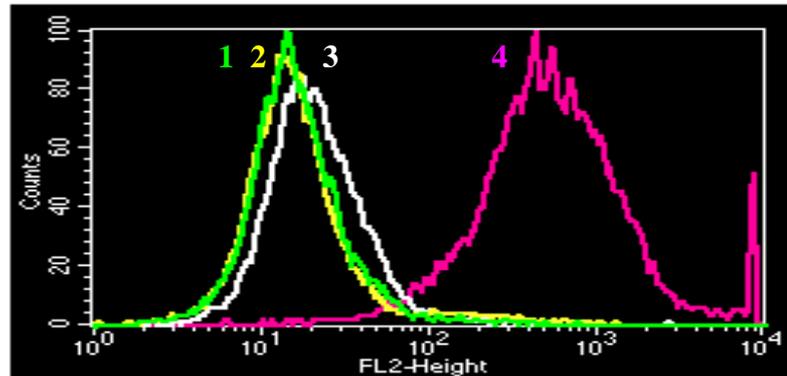


Figure 46. Analyse par cytométrie de flux de la fixation du TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  sur cellules LS174T, révélée par l'anticorps monoclonal anti-TTFgC.

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$
3. Surnageant de cellules non transfectées
4. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$

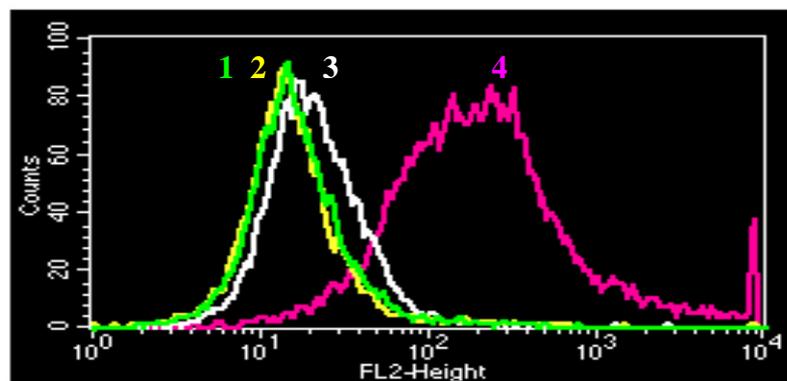


Figure 47. Analyse par cytométrie de flux de la fixation du TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L sur cellules LS174T, révélée par l'anticorps monoclonal anti-TTFgC.

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L
3. Surnageant de cellules non transfectées

#### 4. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$ / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L

L'examen qualitatif de la répartition de la fixation des chimères sur les cellules LS174T a été effectué par microscopie à fluorescence (Fig. 48).

La répartition des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (Fig. 48, A) est plus dense que celle de la TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (Fig. 48, B).

La différence entre le nombre de valences VHH anti-CEA dans chaque hétéromultimère (2 pour TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et 1 pour TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L) permet d'expliquer les disparités obtenues dans l'efficacité de fixation et de répartition.

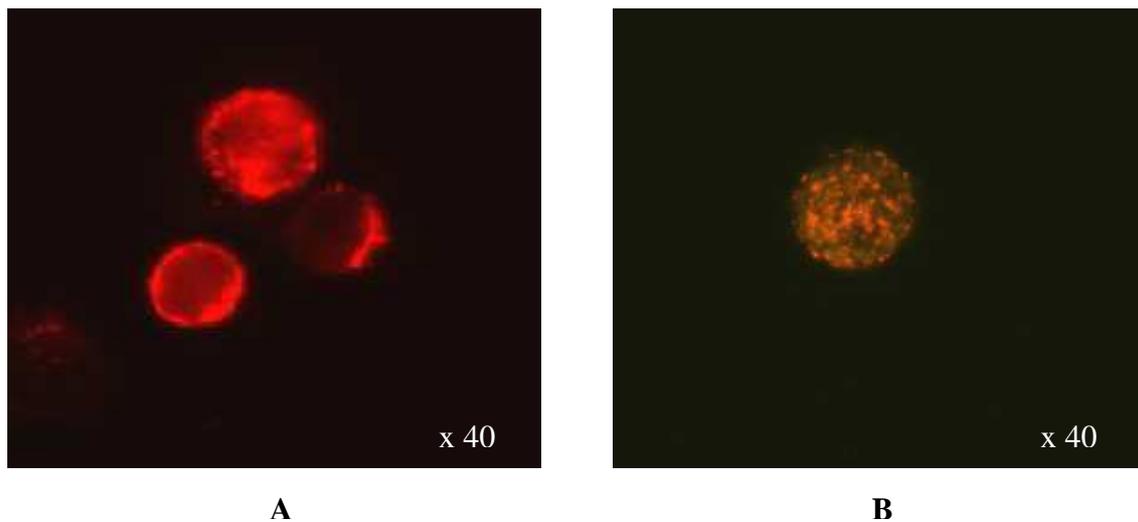


Figure 48. Analyse par microscope à fluorescence de la répartition sur cellules LS174T des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (A) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (B).

### VII.3.4. Test de compétition de fixation sur cellules cancéreuses

La fixation des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  à l'antigène carcino-embryonnaire a été vérifiée par un test de compétition de fixation sur cellules LS174T, entre protéines recombinantes et anticorps monoclonal anti-CEA.

La dilution du surnageant de culture des cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  permet une augmentation de la fixation de l'anticorps monoclonal de souris anti-CEA à l'antigène carcino-embryonnaire (Fig. 49).

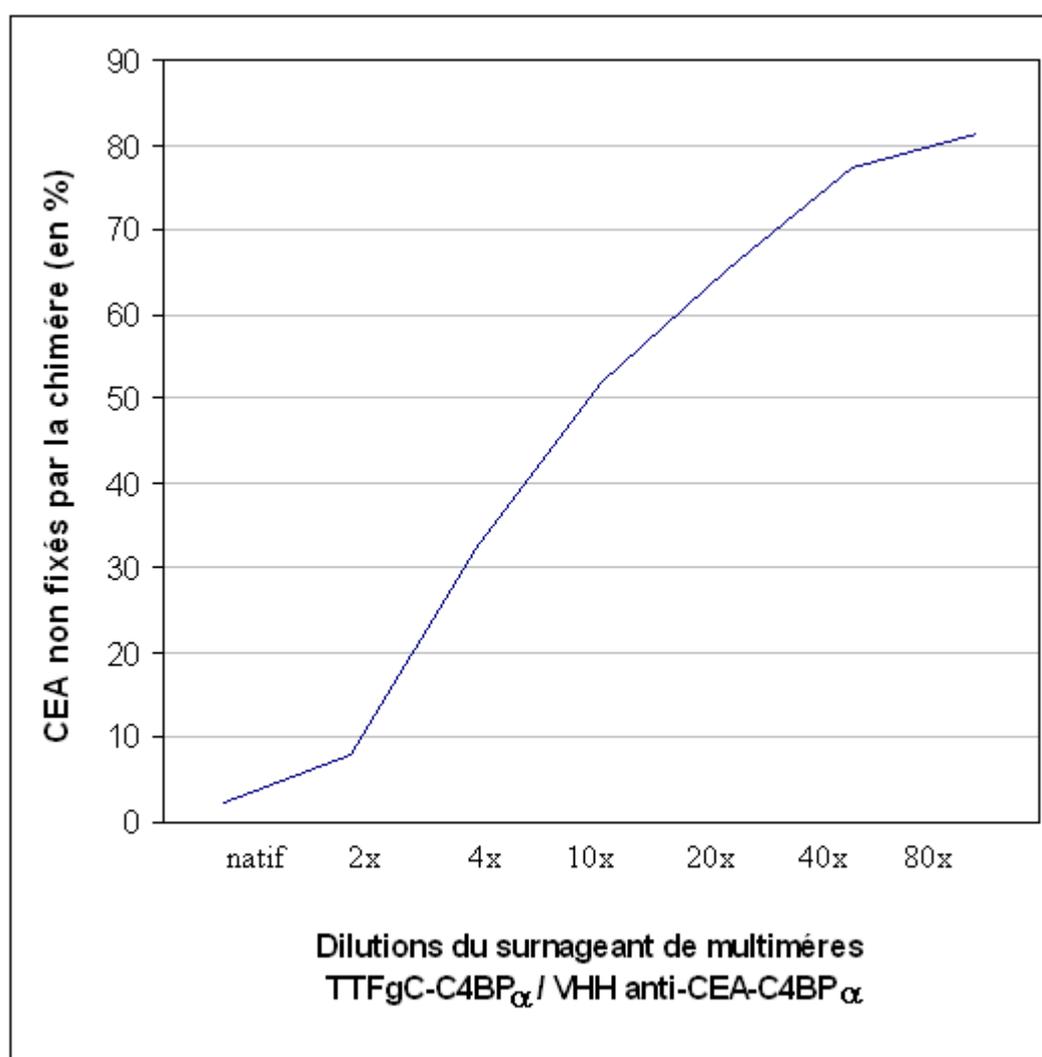


Figure 49. Compétition de fixation sur cellules LS174T entre l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et l'anticorps monoclonal de souris anti-CEA (Clone C6G9) (Sigma).

## VIII. ANALYSE, IN VITRO, DE L'ACTIVATION DU COMPLEMENT PAR LES PROTEINES HETEROMULTIMERIQUES

### VIII.1. Analyse par cytométrie de flux et microscopie à fluorescence du dépôt de C3b et C4d du complément

#### VIII.1.1. Sur globules rouges

La capacité des hétéromultimères à induire l'activation du complément a été testée sur des GR en présence d'anticorps antitétaniques et de sérum déficient en C5.

Ce sérum permet d'activer les premières cascades du complément sans aboutir à la lyse des GR. Les dépôts de C3b et C4d sur GR ont été détectés par cytométrie de flux (Fig. 50) et microscopie à fluorescence (Fig. 51).

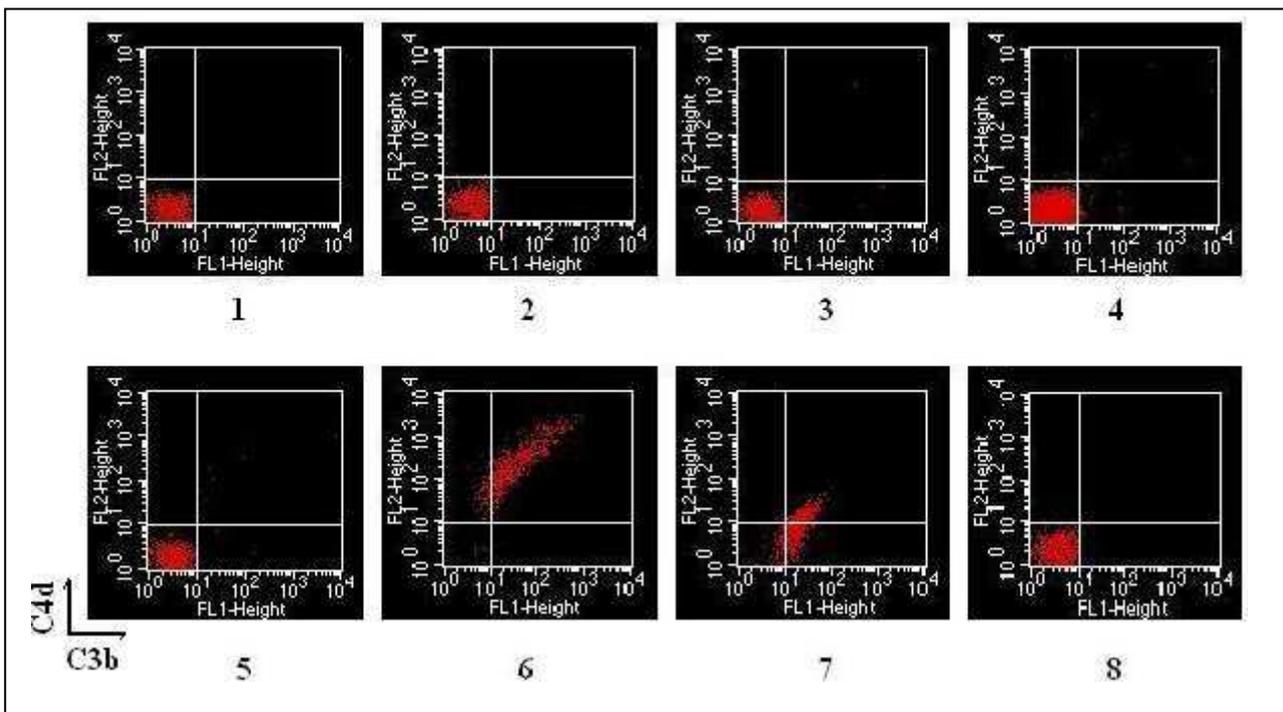


Figure 50. Analyse de l'activation de la cascade du complément révélée par les anticorps monoclonaux anti-C3b et anti-C4d.

Les GR sont incubés avec:

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$
3. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L
4. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C
5. Surnageant de cellules non transfectées

6. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$
7. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L
8. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C

Les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  (Fig 50, 6) entraînent un dépôt plus important sur GR de molécules C3b et C4d que les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L (Fig 50, 7). Les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C (Fig 50, 8) n'induisent aucun dépôt de molécules C3b et C4d.

L'analyse qualitative, par microscopie à fluorescence, de la répartition des dépôts de C3b et C4d à la surface des GR a permis de montrer un marquage plus intense et plus homogène dans le cas de la chimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  (Fig 51, A) que celui de la chimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L (Fig 51, B).

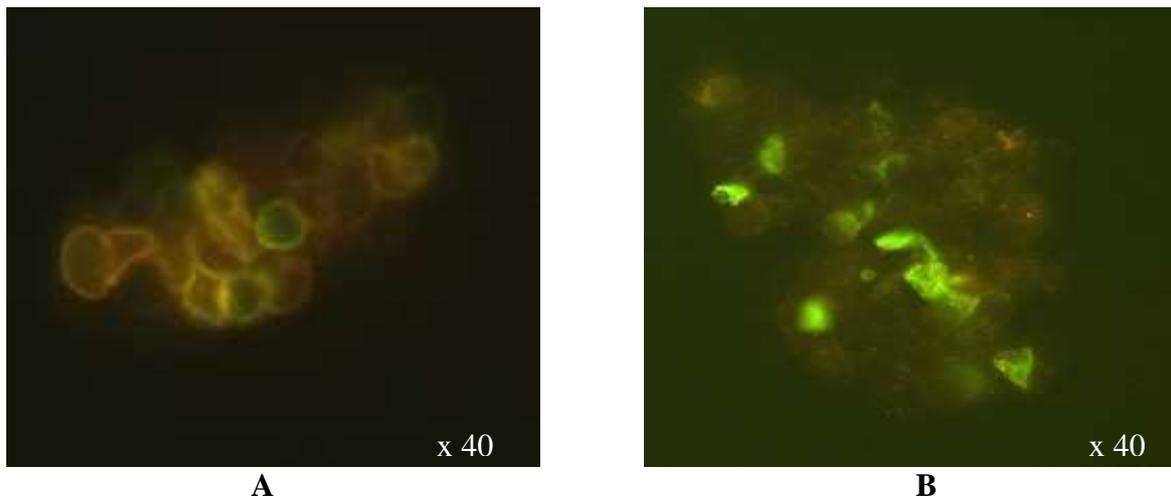


Figure 51. Analyse par microscope à fluorescence de la répartition sur GR des dépôts de C3b (vert) et C4d (rouge) induits par les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  (A), TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L (B).

## VIII.1.2. Sur globules rouges RhD

La capacité des hétéromultimères à induire l'activation du complément a été testée sur des GR RhD, en présence de SAB 15%, anticorps antitétaniques et sérum déficient en C5.

Les dépôts de C3b et C4d sur GR RhD ont été détectés par cytométrie de flux (Fig. 52) et microscopie à fluorescence (Fig. 53).

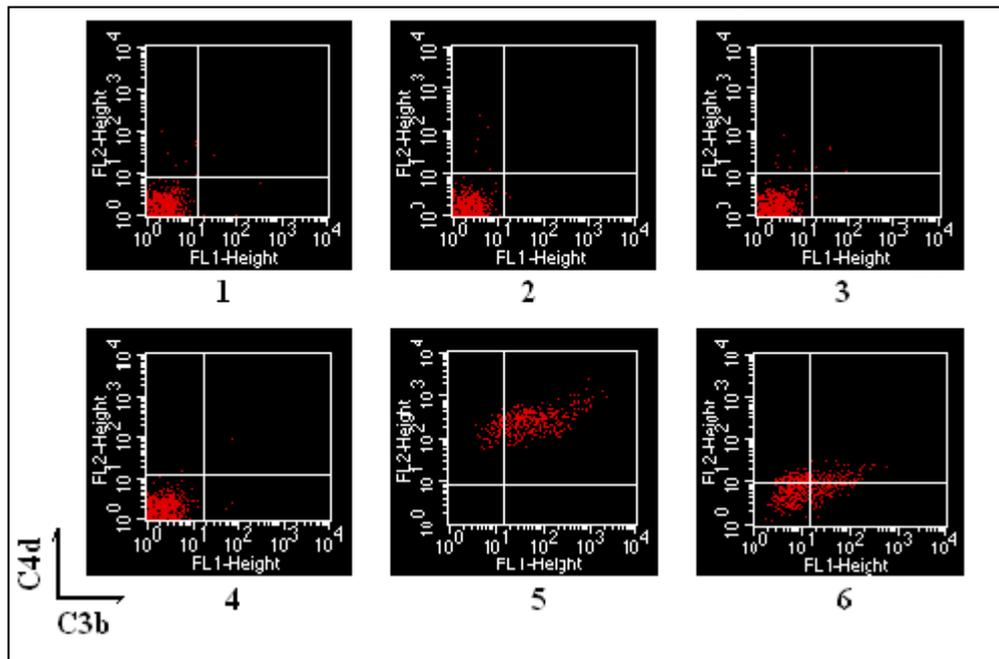


Figure 52. Analyse de l'activation de la cascade du complément révélée par les anticorps monoclonaux anti-C3b et anti-C4d.

Les GR RhD sont incubés, en présence de SAB 15% et de:

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$
3. Surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L
4. Surnageant de cellules non transfectées
5. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$
6. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L

Les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  (Fig. 52, 5) entraînent un dépôt plus important sur GR RhD de molécules C3b et C4d que les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L (Fig. 52, 6).

Les dépôts de C3b et C4d à la surface des GR RhD, analysés par microscopie à fluorescence, montrent un marquage diffus plus intense dans le cas de la chimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  (Fig. 53, A) que celui de la chimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L (Fig. 53, B).

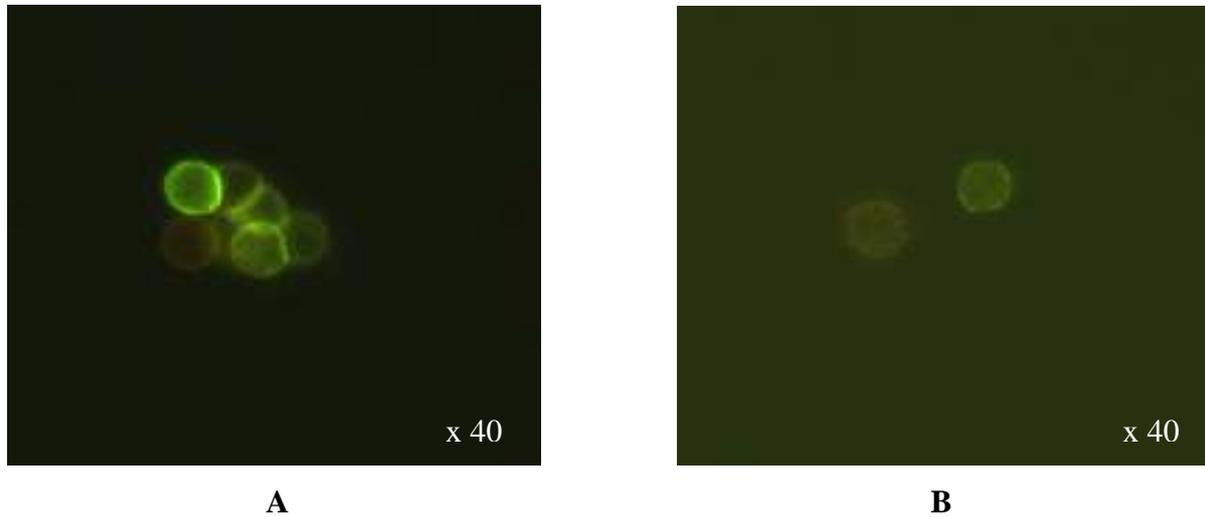


Figure 53. Analyse par microscopie à fluorescence de la répartition des dépôts de C3b (vert) et C4d (rouge) induits par les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  (**A**) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L (**B**).

### VIII.1.3. Sur cellules LS174T

La capacité des hétéromultimères à induire l'activation du complément a été testée sur cellules LS174T en présence d'anticorps antitétaniques et de sérum déficient en C5.

Les dépôts de C3b (résultat non présenté) et C4d sur cellules LS174T ont été détectés par cytométrie de flux (Fig. 54), (Fig. 55) et microscopie à fluorescence (Fig. 56).

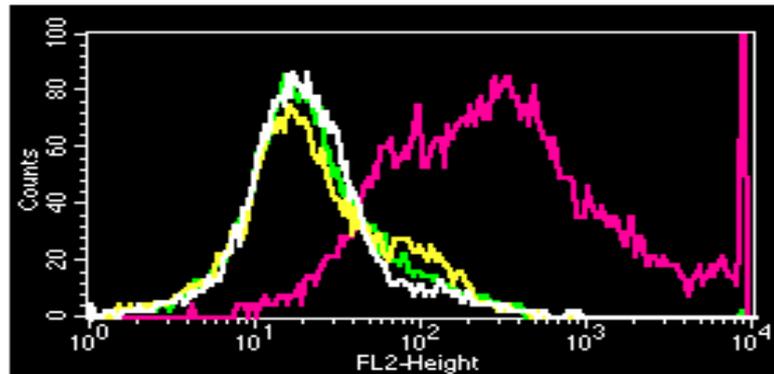


Figure 54. Analyse de l'activation de la cascade du complément révélée par l'anticorps monoclonal anti-C4d

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$
3. Surnageant de cellules non transfectées
4. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$

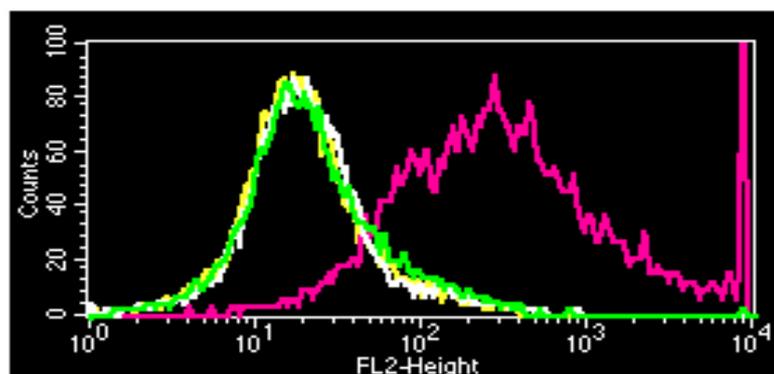


Figure 55. Analyse de l'activation de la cascade du complément révélée par l'anticorps monoclonal anti-C4d

1. Surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
2. Surnageant de cellules transfectées par la construction VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L
3. Surnageant de cellules non transfectées

#### 4. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$ / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L

Les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (Fig. 54, 4) entraînent le dépôt sur cellules LS174T de C4d, aussi efficacement, que les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (Fig. 55, 4).

Des résultats similaires ont été obtenus pour le dépôt de C3b sur cellules LS174T induit par les deux hétéromultimères (résultats non présentés).

L'analyse par microscopie à fluorescence montre les mêmes intensités de marquage par les anticorps anti-C3b et anti-C4d pour les cellules incubées en présence des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  (Fig. 55, A) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L (Fig. 55, B).

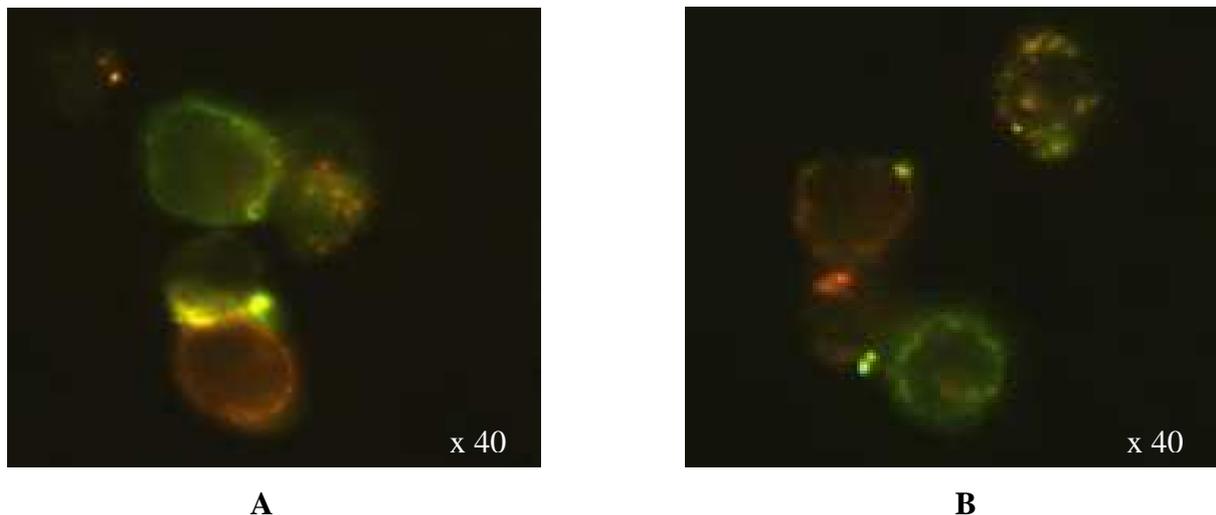


Figure 55. Analyse par microscopie à fluorescence de la répartition des dépôts de C3b (vert) et C4d (rouge) induits par les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (A) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (B).

## **VIII.2. Test hémolytique avec sérum autologue**

La capacité des protéines recombinantes à entraîner la lyse complément-dépendante des GR d'une personne récemment vaccinée contre le tétanos, en présence de son sérum, a été évaluée *in vitro*.

### **VIII.2.1. Sur globules rouges**

Les anticorps antitétaniques sériques reconnaissent l'entité TTFgC de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP fixé aux GR. Cette opsonisation entraîne l'activation de la cascade du complément. Dans ces conditions, le complexe d'attaque membranaire se forme et provoque la lyse des GR.

Seul l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  est capable d'induire la lyse totale des GR (Fig. 56, 11). Ces résultats sont en adéquation avec la meilleure efficacité de fixation de cet hétéromultimère sur GR ainsi que sa plus forte capacité à induire le dépôt des composants C3b et C4d du complément, comparées aux hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C.

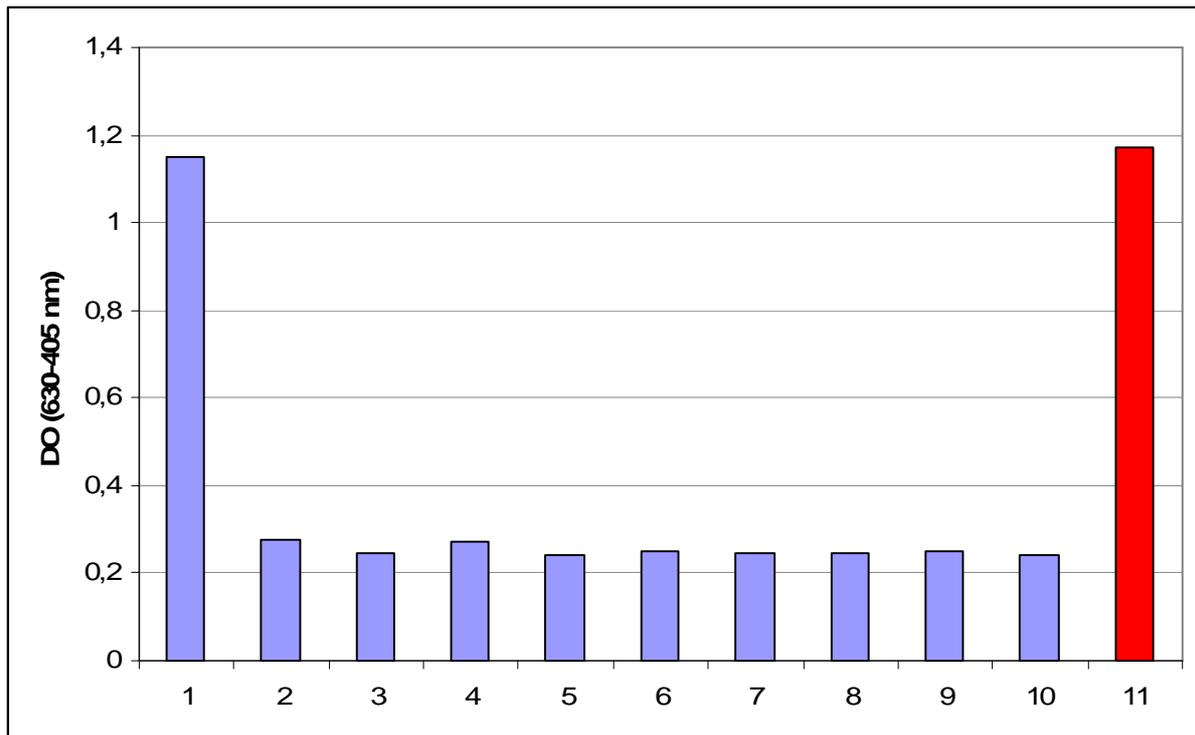


Figure 56. Histogramme de l'absorbance de l'hémoglobine traduisant la lyse des GR.

1. GR complètement lysés par des cycles répétés de congélation / décongélation
2. Surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ , sans GR
3. GR avec surnageant de cellule non transfectées
4. GR avec PBS
5. GR avec surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
6. GR avec surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$
7. GR avec surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L
8. GR avec surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C
9. GR avec surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L
10. GR avec surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C
11. GR avec surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$

## VIII.2.2. Sur globules rouges RhD

Les anticorps antitétaniques sériques reconnaissent l'entité TTFgC de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP fixé au GR RhD. Cette opsonisation entraîne l'activation de la cascade du complément et aboutit à la lyse de la cellule.

Seul l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  est capable d'induire une faible lyse des GR RhD (18%) (Fig. 57, 8). L'hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L n'entraîne pas de lyse. En effet, il a montré une très faible capacité à induire le dépôt des composants C3b et C4d sur GR RhD (Fig. 52, page 121).

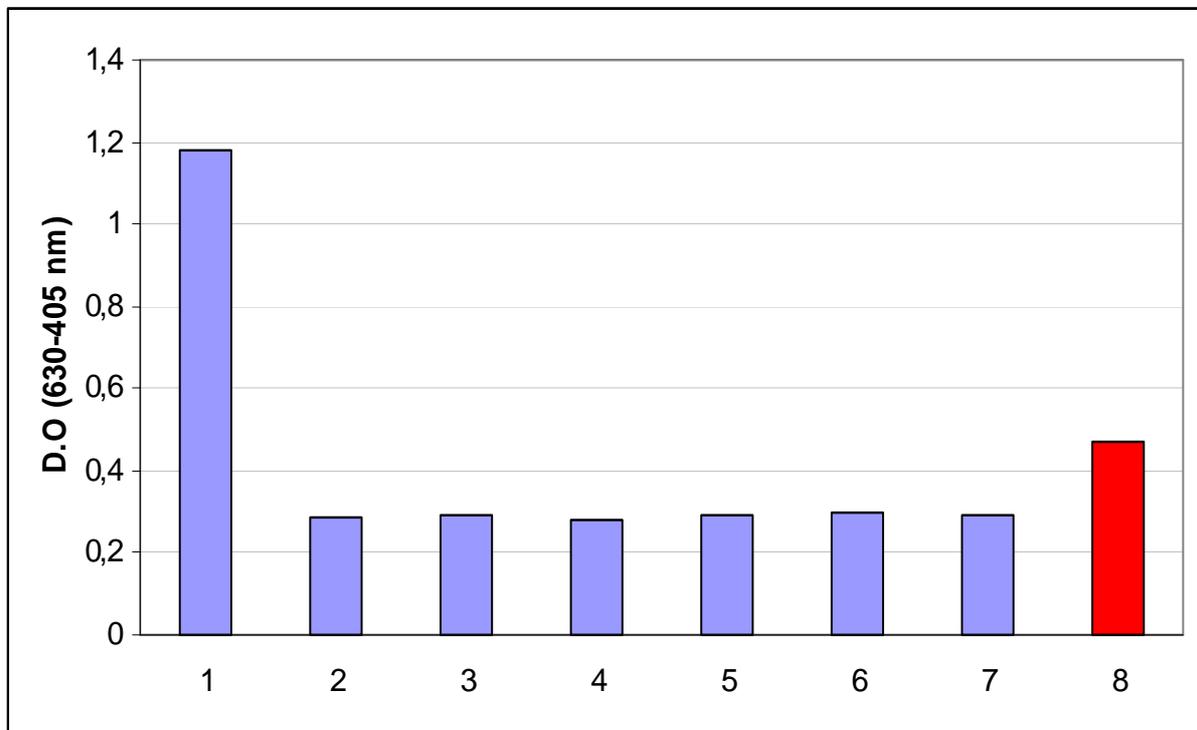


Figure 57. Histogramme de l'absorbance de l'hémoglobine traduisant la lyse des GR RhD.

1. GR complètement lysés par des cycles répétés de congélation / décongélation
2. GR avec surnageant de cellule non transfectées
3. GR avec PBS
4. GR avec surnageant de cellules transfectées par la construction TTFgC-C4BP $\alpha$
5. GR avec surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L
6. GR avec surnageant de cellules transfectées par la construction scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$
7. GR avec surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L
8. GR avec surnageant de cellules transfectées par les constructions TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$

## ***IX. ANALYSE DE LA FIXATION IN VIVO, CHEZ LES SOURIS NUDE, DES CHIMÈRES SUR DES TUMEURS PROVOQUÉES***

Une étape préliminaire d'analyse de la fixation des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP sur des coupes de tumeurs a été réalisée avant d'évaluer leur efficacité de fixation, *in vivo*, sur des tumeurs provoquées chez les souris Nude.

### ***IX.1. Fixation des chimères sur des coupes de tumeurs***

Les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (Fig. 58, A) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (Fig. 58, B) présentent un marquage intense et homogène sur le tissu tumoral. Aucun marquage n'a été observé dans les coupes de tumeurs ayant été incubées avec les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  car incapables de se fixer aux cellules tumorales.

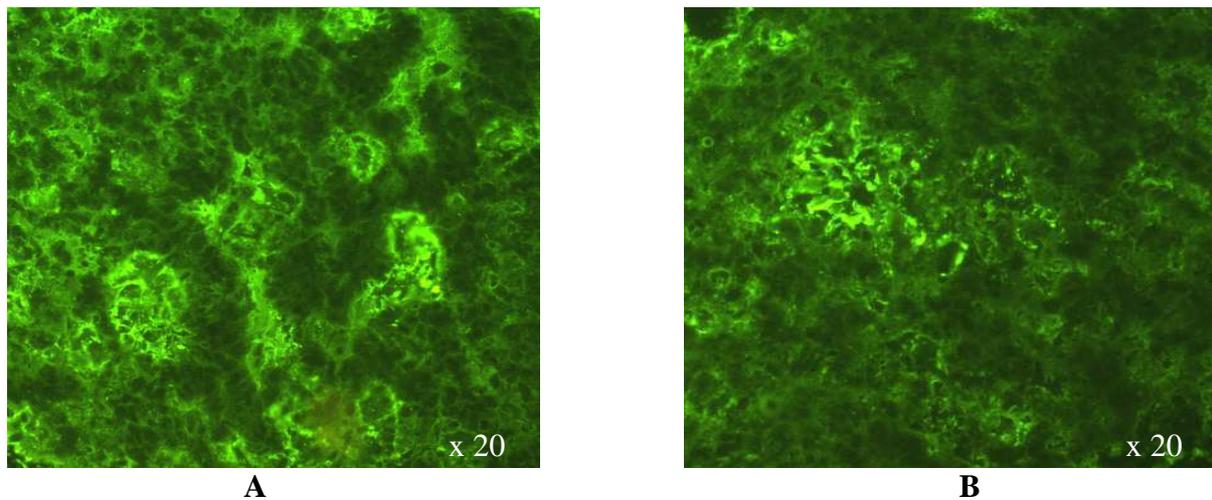


Figure 58. Immunomarkage sur lames de coupes de tumeurs incubées avec les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (**A**) ou TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (**B**). Les protéines sont reconnues par l'anticorps polyclonal biotinylé anti-C4BP, révélé par la streptavidine couplée à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488.

## ***IX.2. Fixation aux tumeurs des chimères injectées par voie intraveineuse et analyse de la biodistribution***

La capacité des hétéromultimères à atteindre la tumeur, d'y pénétrer et y rester a été évaluée après injection intraveineuse des protéines recombinantes aux souris Nudes.

Une nette répartition homogène et diffuse est observée pour l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (Fig. 59, A). L'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L présente également une large répartition tissulaire (Fig. 59, B).

Ce résultat montre la capacité de ces hétéromultimères, malgré leurs poids moléculaires élevés, à franchir la paroi des vaisseaux sanguins pour atteindre la tumeur et s'y fixer.

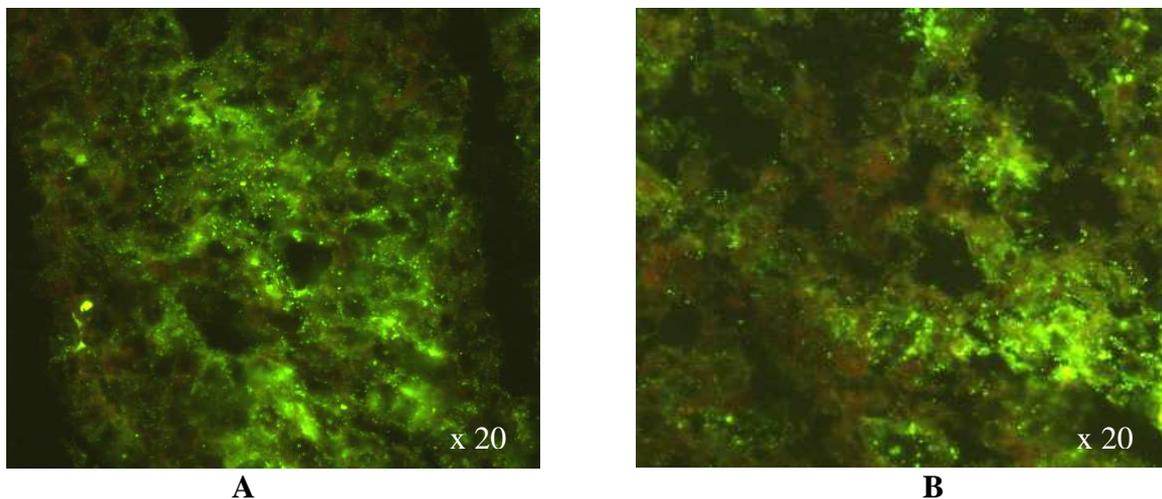


Figure 59. Immunomarkage sur lames de coupes de tumeurs après injection intraveineuse des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (A) ou TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L (B). Les protéines sont reconnues par l'anticorps polyclonal biotinylé anti-C4BP, révélé par la streptavidine couplée à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488.

La spécificité de la fixation des hétéromultimères au niveau de la tumeur a été évaluée par l'analyse de la biodistribution.

Aucun des organes prélevés, foie, rate, rein, cerveau, poumon et muscle, ne présente de marquage (Fig. 60).

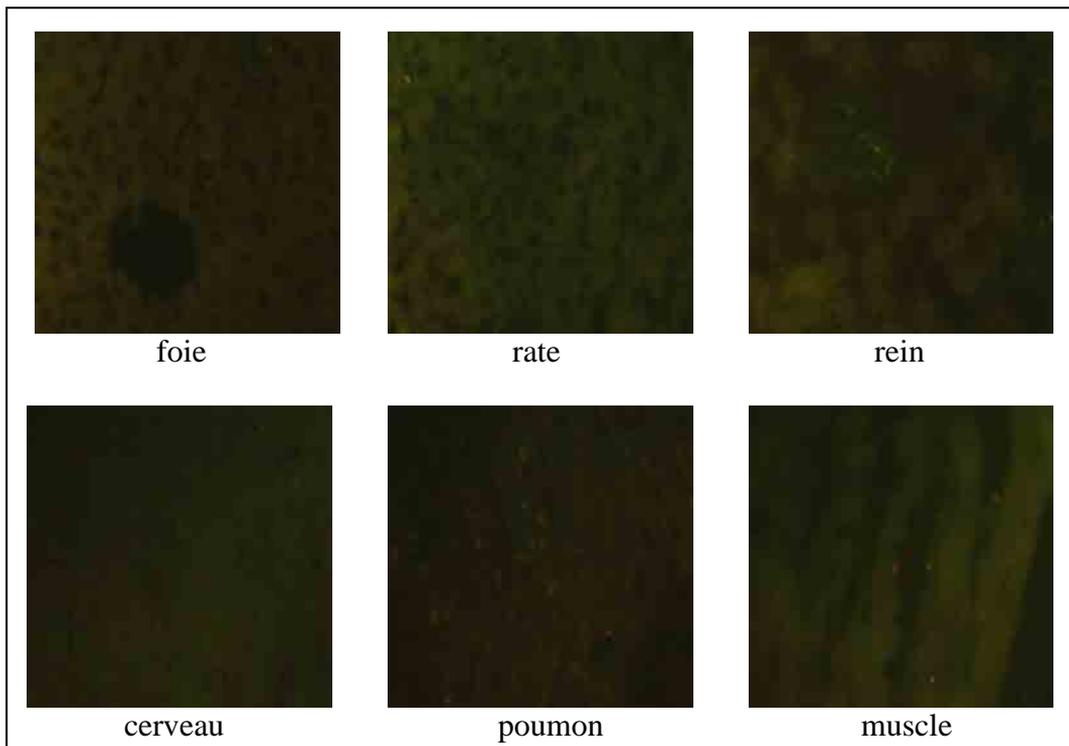


Figure 60. Immunomarquage sur lames de coupes d'organes après injection intraveineuse des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP. Les coupes ont été incubées avec l'anticorps polyclonal biotinylé anti-C4BP puis révélées par la streptavidine couplée à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488.

## ***X. ANALYSE DE L'ACTIVITE ANTI-TUMORALE DES CHIMERES CHEZ LES SOURIS NUDE***

Après injection à trois groupes de souris *nude* de cellules LS174T, sérums antitétaniques murins et hétéromultimères purifiées, le développement des tumeurs a été suivi.

Aucune des quatre souris du groupe ayant reçu l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$ , n'a développé de tumeurs pendant les quatre mois de la durée du suivi.

Aucune des quatre souris du groupe ayant reçu l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L, n'a développé de tumeurs pendant les quatre mois de la durée du suivi.

Les quatre souris du groupe témoin, ayant reçu l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$ , ont toutes développé des tumeurs trois semaines après l'injection (Fig. 61). La croissance des masses tumorales a été suivie jusqu'à la taille critique (15% du poids de la souris) (Fig. 62).

L'analyse, trois semaines après, des coupes histologiques aux emplacements des injections des cellules cancéreuses, du sérum antitétanique décomplémenté et des molécules recombinantes, n'a montré aucun foyer tumoral chez les souris *nude* ayant reçu les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (Fig. 63, A) et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L. Des masses tumorales importantes apparaissent chez les souris ayant reçu les homomultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  (Fig. 63, B).



Figure 61. Souris du groupe témoin présentant une tumeur de 1 cm de diamètre.

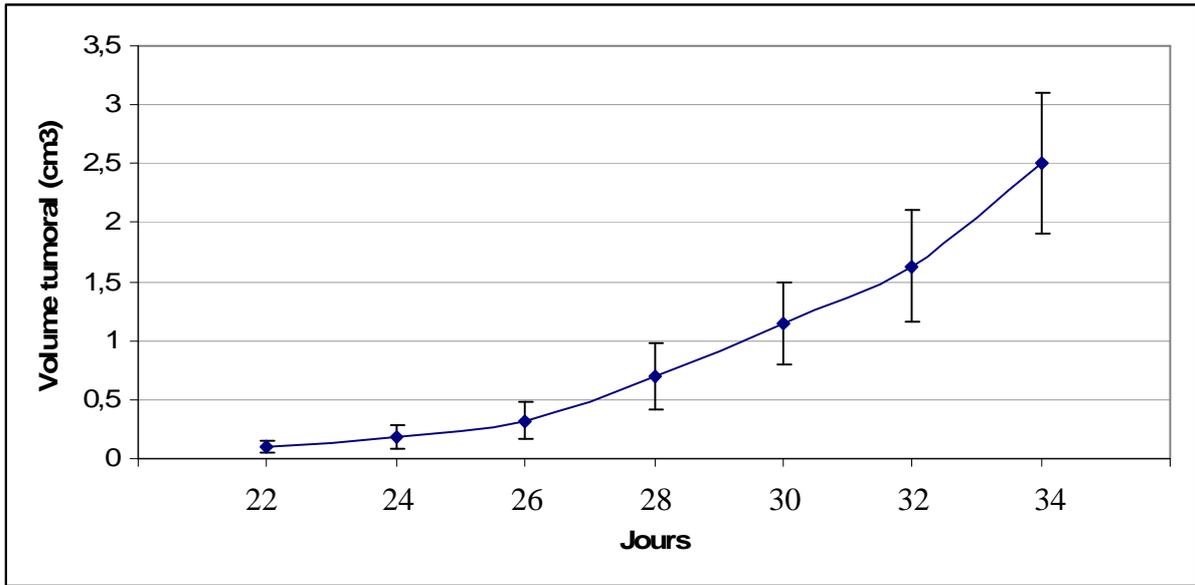


Figure 62. Suivi du développement des tumeurs chez les souris du groupe témoin.

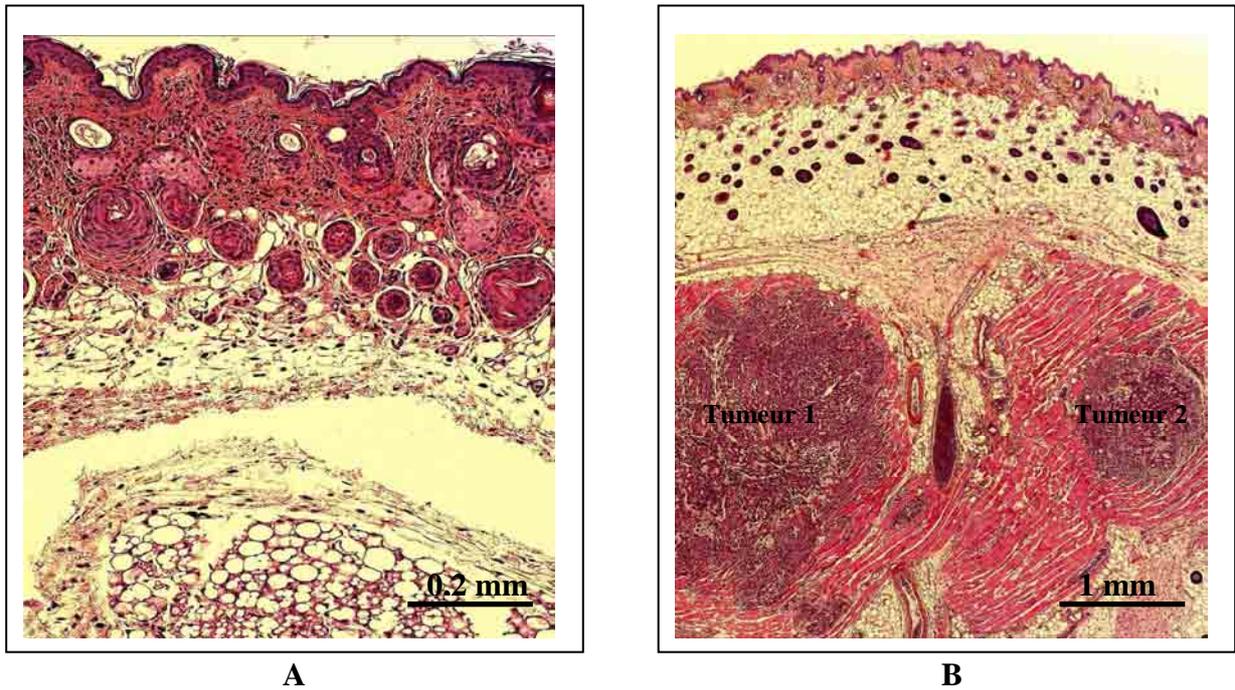


Figure 63. Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES), aux emplacements des injections chez une souris du groupe ayant reçu l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  (A) et une souris du groupe témoin (B).

# DISCUSSION

## DISCUSSION

Le but de ce travail de recherche est de proposer un modèle de ciblage et de destruction des cellules par déviation de la réponse immune vaccinale, à l'aide de protéines recombinantes hétérofonctionnelles.

Quatre parties ont été traitées au cours de ce travail :

- 1- Production de protéines recombinantes.
- 2- Développement, *in vitro*, d'un modèle de démonstration-évaluation du concept par ciblage d'un antigène erythrocytaire de haute densité (glycophorine A) et lyse des globules rouges.
- 3- Validation, *in vitro* du concept, par ciblage et lyse des GR RhD dans la perspective d'un outil prophylactique pour la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle rhésus D.
- 4- Validation, *in vivo* puis *in vitro* puis *in vivo* du concept, pour la destruction de cellules tumorales dans un modèle murin de xéno greffe.

### **PARTIE I.**

#### **PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES HOMOMULTIMERIQUES ET HETEROMULTIMERIQUES**

La production de protéines recombinantes hétérofonctionnelles nécessite l'utilisation d'un système multimérisant capable à la fois d'assembler deux entités à activités différentes et de répondre au cahier des charges imposant la prise en compte de plusieurs contraintes liées à son utilisation en thérapie humaine.

Aucun des systèmes multimérisants existants utilisés (Leucine Zipper, paquet de quatre hélices, p53 (Pluckthun *et al.*, 1997), vérotoxine (Stone *et al.*, 2007) ...) ne répond à l'ensemble de ces critères.

La C4BP est une protéine plasmatique humaine régulatrice de l'activation du complément et de structure naturellement multimérique.

Nous avons développé un système multimérisant fondé sur l'utilisation des parties C-terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la C4BP. Ce système présente l'avantage d'être d'ingénierie aisée, dépourvu intrinsèquement d'activité biologique, non immunogène et permettant la synthèse de molécules homomultimériques et hétéromultimériques en assurant un nombre

élevé de valences reliées de façon covalente. De plus, la multimérisation permet d'améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques de la molécule en augmentant son avidité et sa durée de vie plasmatique.

Ainsi, des protéines homomultimériques ont été produites, tel que le mini anticorps scFv anti-RhD – C4BP $\alpha$ , molécule permettant d'agglutiner les GR RhD comme l'anticorps polyclonal humain dont il dérive (Libyh *et al.*, 1997).

Une molécule CD46 multimérique soluble a été également développée à l'aide de l'extrémité C-terminale de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP. Elle a permis de neutraliser *in vitro* et *in vivo* le virus de la rougeole en se fixant aux hémagglutinines virales (Christiansen *et al.*, 2000).

Des protéines hétéromultimériques ont aussi été produites grâce à ce système tel que le multi-scfv anti-Rhésus D – C4BP $\alpha$  / multi-CR1 – C4BP $\alpha$ . Cette molécule a permis de restaurer, *in vitro*, une densité physiologique (voir supra-physiologique) de CR1 à la surface de GR RhD qui en sont déficients (phénomène associé à certaines maladies auto-immunes) (Oudin *et al.*, 2000).

### **1. Production de protéines recombinantes homomultimériques**

Au cours de ce travail, huit molécules homomultimériques ont été produites à l'aide de ce système :

- TTFgC-C4BP $\alpha$
- scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$
- scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  courte
- scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  longue
- scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$
- scFv anti-RhD-C4BP $\beta$  longue
- VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$
- VHH anti-CEA-C4BP $\beta$  longue

Les études structurales et biochimiques des protéines associées à la partie C-terminale minimale courte de la chaîne  $\alpha$  (dépourvue de courtes consensus répétées (SCR)) ont montré que :

- Ces homomultimères sont sécrétés sous forme d'une à deux espèces moléculaires correspondant aux heptamères et hexamères ; résultat en adéquation avec les

caractéristiques structurales de la C4BP plasmatique contenant 6 à 7 monomères C4BP $\alpha$ .

- Ces molécules sont solubles et fonctionnelles. Leur activité a été analysée par un test d'héماغglutination et / ou par cytométrie de flux.
- Ces molécules présentent une grande stabilité. En effet, conservées à 4°C, elles ont gardé leur activité plus d'un an après leur production.

La capacité multimérisante de la C4BP réside dans l'extrémité C-terminale de la chaîne  $\alpha$ . La partie C-terminale de la chaîne  $\beta$  conduit tout au plus à un dimère. Les analyses structurales et biochimiques des protéines associées à la partie C-terminale minimale courte (dépourvue de SCR) ou longue (avec 1 SCR) de la chaîne  $\beta$ , nous ont permis de montrer que ces molécules sont secrétées sous forme de monomères et dimères solubles, stables et fonctionnels.

## **2. Production de protéines recombinantes hétéromultimériques**

Le contrôle de la proportion de chaque espèce moléculaire au sein du complexe hétéromultimérique s'avère difficile à maîtriser, voire impossible lorsque sont utilisées uniquement les régions C-terminales minimales des chaînes  $\alpha$  de la C4BP pour la production d'hétéromultimères bifonctionnels. Cependant, au regard de la structure native de la C4BP (majoritairement 7 chaînes  $\alpha$  et 1 chaîne  $\beta$ ), la proportion de chaque entité au sein d'une molécule hétéromultimérique bifonctionnelle peut être partiellement contrôlée en utilisant respectivement la partie C-terminale de la chaîne  $\alpha$  pour l'espèce moléculaire à valences multiples et la région C-terminale de la chaîne  $\beta$  pour la fonction à valence unique.

Sept molécules hétéromultimériques ont été produites :

- TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$
- TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  courte
- TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$  longue
- TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$
- TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$  longue
- TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$
- TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$  longue

Les études structurales ont montré que :

- Les hétéromultimères  $\alpha / \alpha$  sont majoritairement secrétés sous forme de deux espèces moléculaires dont les valences sont dans un rapport de 5 / 2 et 4 / 2.
- Les hétéromultimères  $\alpha / \beta$  sont produites majoritairement sous forme d'un heptamère avec 6 valences  $\alpha$  et 1 valence  $\beta$ .
- Comparée aux hétéromultimères  $\alpha / \beta$ , l'utilisation de la partie C-terminale minimale de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP pour la production des deux entités protéiques d'un hétéromultimère, a permis d'augmenter de 1 à 2, le nombre de valences de la fonction fixatrice de la molécule (scFv anti-GPA ou scFv anti-RhD ou VHH anti-CEA).

## **PARTIE II.**

### **MODELE DE DEMONSTRATION-EVALUATION DU CONCEPT**

La lyse des cellules par déviation de la réponse immune repose sur le ciblage cellulaire par des anticorps couplés à des antigènes naturels ou vaccinaux. L'efficacité de la lyse dépend de la formation de complexes avec les cellules cibles et l'activation subséquente de mécanismes biologiques effecteurs comme le système du complément et / ou la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) aboutissant à l'élimination de la cellule cible.

En dehors de l'application du complément pour le ciblage et la destruction des cellules tumorales, très peu de recherches se sont intéressées à son utilisation contre d'autres types cellulaires. Dans ce cas, les cellules ont essentiellement servi de modèles de faisabilité et d'évaluation du concept du ciblage (Muzykantov *et al.*, 1996), (Spitzer *et al.*, 2007).

Nous décrivons dans cette partie un modèle de démonstration-évaluation de ce concept en utilisant des molécules hétérofonctionnelles se liant aux GR et permettant d'induire, *in vitro*, leur lyse complément-dépendante par un sérum autologue.

L'étude fonctionnelle des hétéromultimères a montré que :

- Les protéines TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L, agglutinent directement les GR.
- La protéine TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C ne présente pas cette activité.

- A molarités égales, l'efficacité de la fixation de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  est supérieure à celle de la molécule TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L. L'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C ne se fixe que très faiblement aux GR.
- La répartition de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ , à la surface des GR est uniforme. Elle est granulaire dans les cas des protéines TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C, et d'avantage plus faible pour cette dernière.
- L'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  entraîne un dépôt plus important sur les GR de molécules C3b et C4d, que l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L. La protéine TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C n'induit aucun dépôt de molécules C3b et C4d.
- Seul l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  est capable d'induire la lyse totale des GR par activation du complément d'un sérum autologue contenant des anticorps antitétaniques.

En effet, les anticorps antitétaniques sériques reconnaissent l'entité TTFgC de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  fixé au GR. Cette opsonisation entraîne l'activation de la cascade du complément. Dans ces conditions, le complexe d'attaque membranaire se forme et provoque la lyse des GR.

Les disparités obtenues dans l'activité d'hémagglutination, l'efficacité de fixation et la nature de répartition à la surface des GR ainsi que le pouvoir lytique de chaque hétéromultimère, peuvent s'expliquer par les différences structurales des formes moléculaires. En effet, contrairement à l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  possédant deux valences de fixation au GR, les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C n'en possèdent qu'une seule. L'avidité est donc diminuée, la fixation se trouve alors réduite. Dans ces conditions, le seuil d'occupation antigénique permettant une activation efficace de la cascade du complément pour aboutir à la formation du complexe d'attaque membranaire, ne peut être atteint.

Les différences d'efficacité de fixation entre hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ C pourraient être dues à la

différence de taille des entités de fixation au GR. En effet, la partie C-terminale minimale longue de la chaîne  $\beta$  possède 1 SCR alors que la partie C-terminale minimale courte, en est dépourvue. Cette différence de taille (60 aa) représente pratiquement la taille de la partie C-terminale minimale courte des chaînes  $\beta$  (61 aa).

La valence scFv anti-GPA double donc de taille lorsqu'elle est associée à la partie C-terminale minimale longue de la chaîne  $\beta$ , comparé à la partie C-terminale minimale courte. Elle est également plus flexible. La valence scFv anti-GPA-C4BP $\beta$ L, entourée d'une grappe de six valences TTFgC, bénéficie dans ce cas d'une plus grande accessibilité à son antigène.

Ce premier modèle nous a permis d'évaluer et de démontrer la faisabilité du concept de la redirection de la réponse immune vaccinale pour le ciblage et la lyse complément-dépendante des cellules, à l'aide de protéines recombinantes hétérofonctionnelles.

### **PARTIE III.**

#### **MODELE IN VITRO DE VALIDATION DU CONCEPT SUR GR RhD**

Le problème posé par l'allo-immunisation fœto-maternelle rhésus est qu'il s'agit non pas d'obtenir une immunisation ou une potentialisation d'immunisation mais à l'inverse, une absence d'immunisation. Elle doit être assurée par l'élimination sélective des GR RhD fœtaux dans la rate de la mère ou leur destruction dans la circulation en évitant en tout cas leur routage normal vers le foie où les cellules de Kupffer relayeraient vers une réponse immune.

La prévention de l'immunisation rhésus repose encore sur l'utilisation de gammaglobulines polyclonales humaines devant l'incapacité des anticorps monoclonaux à assurer ce rôle. En effet, le routage par les anticorps murins est préférentiel vers le foie tandis qu'ils sont incapables d'assurer la destruction des GR RhD dans la circulation à cause des faibles densité et accessibilité de l'antigène rhésus.

Les études les plus récentes cherchent à développer une nouvelle génération d'anticorps monoclonaux humains anti-RhD agissant par le principe de l'activation des cellules NK grâce à leurs fragments Fc. Ils ont montré des premiers résultats cliniques encourageants. On ne pourra cependant juger de leur efficacité qu'après une évaluation à grande échelle et sur le long terme (Kumpel, 2007).

Notre système vise à augmenter le recouvrement des GR RhD par les anticorps grâce à la déviation des Ig antitétaniques attirés sur une grappe d'antigènes téτανiques pour chaque site de fixation reconnu par le scFv anti-RhD. Une telle amplification devrait permettre la destruction dans la circulation des GR RhD par le système du complément, évitant ainsi toute immunisation.

A cause de la faible accessibilité de l'antigène RhD, les hétéromultimères se fixent très faiblement aux GR RhD natifs. La papaination (décapage du glycocalyx) a permis une bonne fixation des molécules et une hémagglutination directe des GR RhD en présence des hétéromultimères.

Partant du fait que les GR sont chargés négativement et entourés d'un nuage d'ions positifs qui entretiennent avec leur surface un potentiel électrique « Zéta ». On peut augmenter le pouvoir agglutinant de certains anticorps en diminuant ce potentiel par addition de macromolécules au milieu telle que la SAB.

L'étude fonctionnelle des hétéromultimères en présence de SAB (15%), a montré que :

- L'efficacité de la fixation de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  sur les GR RhD est supérieure à celle de la molécule TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L. Les rendements des deux protéines sur GR RhD non papainés restent cependant inférieurs à ceux obtenus sur GR RhD papainés.
- La répartition des hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L, à la surface des GR RhD est granulaire. La répartition est plus faible pour la deuxième molécule.
- L'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  entraînent le dépôt sur les GR RhD, de molécules C3b et C4d, alors que l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L n'induisent qu'un très faible dépôt de ces molécules.
- Seul l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  est capable d'entraîner une lyse partielle des GR RhD par activation du complément d'un sérum autologue contenant des anticorps antitétaniques.

Contrairement à la molécule TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  ayant servi au modèle de démonstration-évaluation du concept, le ciblage des GR RhD par la protéine TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  n'a pas permis d'entraîner la lyse totale des cellules.

Ce résultat pourrait s'expliquer par les facteurs de densité et d'accessibilité antigénique.

En effet, comparée à la densité de l'antigène GPA ( $3.10^5$  à  $1,2.10^6$  sites par GR), celle de l'antigène rhésus ( $10^4$  à  $3.10^4$  sites par GR) est 30 à 40 fois plus faible. De plus, à cause de sa structure onze fois transmembranaire et enfuie dans la glycocalyx, l'accessibilité à l'antigène rhésus reste très limitée même en présence de SAB (la fixation des hétéromultimères étant inférieure à celle obtenue sur des GR RhD papainés).

Outre les différences d'affinités de chaque scFv à son antigène, la prise en compte à la fois des paramètres densité et accessibilité antigénique fait diminuer la capacité de fixation sur GR RhD en présence de SAB, de la chimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ , de plus de 60 fois, comparé à la protéine TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$ .

Par ailleurs, les différences des capacités de fixation des deux hétérochimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L peuvent s'interpréter par la plus forte avidité conférée par la présence de deux valences scFv anti-RhD dans le cas de la première molécule lui permettant une meilleure fixation au GR RhD. L'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\beta$ L, n'ayant qu'une seule valence de fixation.

## **PARTIE VI.**

### **MODELE DE VALIDATION, *IN VITRO* PUIS *IN VIVO*, DU CONCEPT SUR CELLULES TUMORALES**

Les applications de l'activation du complément en thérapie sont essentiellement tournées vers l'élimination des cellules cancéreuses. Cependant, la surexpression des protéines régulatrices du complément (CRP) à la surface des cellules tumorales, n'a cessé de présenter un sérieux obstacle à des avancées significatives de cette approche, malgré les dernières démarches proposant l'utilisation d'anticorps neutralisants les CRP en supplément des anticorps antitumoraux (Macor *et al.*, 2007).

Le concept de la redirection de la réponse immune vaccinale, à l'aide de protéines recombinantes hétérofonctionnelles est testé, *in vitro* puis *in vivo*, sur des cellules tumorales dans un modèle murin de xénogreffe.

Notre approche repose sur l'amplification de la réponse immune en augmentant le recouvrement des cellules cancéreuses par les grappes multivalentes d'antigènes tétaniques ; agent efficace de l'activation du complément et puissant recruteur des cellules présentatrices d'antigène (Spellerberg *et al.*, 1997).

Les analyses fonctionnelles des hétéromultimères ont montré que :

- Les protéines TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L se fixent spécifiquement à l'antigène carcino-embryonnaire exprimé à la surface des cellules d'adénocarcinome de colon humain (LS 174T), dans un test de compétition avec un anticorps monoclonal anti-CEA.
- L'efficacité de la fixation ainsi que la qualité de la répartition à la surface des cellules LS174T, de la molécule TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  sont très comparables à celles de la molécule TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L.
- Ces protéines entraînent le dépôt, sur les cellules LS174T, des molécules C3b et C4d du complément humain en présence d'anticorps antitétaniques.
- Injectées par voie veineuse, ces protéines sont capables, malgré leurs poids moléculaires élevés, de franchir la barrière vasculaire pour atteindre la tumeur et s'y fixer.
- Elles présentent une grande spécificité de fixation au tissu tumoral, démontrée par un test de biodistribution.
- Les molécules TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L ont permis d'inhiber le développement des cellules cancéreuses injectées aux souris nude, en présence d'anticorps murins antitétaniques.

Les deux hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L ont la même capacité d'inhiber le développement des cellules LS174T injectées aux souris nude.

La différence du nombre de valences de fixation dans les deux molécules n'a pas eu d'influence sur leurs pouvoirs antitumoraux respectifs.

En effet, la haute affinité du VHH anti-CEA pour son antigène ( $K_D = 8.3$  nM) permet d'accorder une fixation optimale même sans le gain d'avidité conféré par une deuxième valence

La redirection de la réponse immune vaccinale a permis la destruction des cellules cancéreuses dans ce modèle d'inhibition du développement tumoral.

Le choix du modèle murin nude n'est pas seulement dû à des raisons évidentes d'absence de rejet des cellules cancéreuses à cause du déficit profond de l'immunité à médiation cellulaire chez ces souris, mais également dans le but de valider ce concept dans des conditions de prédominance de l'immunité humorale comme principal acteur du système immunitaire.

Cependant, l'hypothèse d'une contribution des cellules dendritiques, des macrophages, des cellules Natural Killer et de la rare population thymo-indépendante de lymphocytes T CD8+, ne peut être complètement écartée.

# **CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail de recherche est de proposer un modèle de ciblage et de destruction des cellules par déviation de la réponse immune vaccinale, à l'aide de protéines recombinantes hétérofonctionnelles.

L'application de ce concept s'est déroulée en quatre étapes :

Nous avons conçu et produit des protéines recombinantes homomultimériques et hétéromultimériques fondées sur le système multimérisant de la C4BP.

Nous avons réussi à démontrer, dans un premier temps, la faisabilité du concept de ciblage et de destruction des cellules par redirection de la réponse immune vaccinale, sur des GR à l'aide de protéines recombinantes hétérofonctionnelles.

L'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$  a montré une efficacité de fixation aux GR grâce à ses valences scFv anti-GPA. La reconnaissance des antigènes TTFgC par les anticorps post-vaccinaux d'un sérum autologue a permis l'activation de la cascade du complément aboutissant à la lyse des GR.

L'essai de validation de ce concept sur GR RhD dans la perspective d'un outil prophylactique pour la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle rhésus D, n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés.

A cause des faibles accessibilité et densité de l'antigène RhD, seulement une lyse partielle des GR RhD a été obtenue à l'aide de l'hétéromultimère TTFgC-C4BP $\alpha$  / scFv anti-RhD-C4BP $\alpha$ . Face à ces deux contraintes et à cause de l'impossibilité d'agir sur la structure de la membrane cellulaire (papaination) dans un modèle préparé en vue d'une utilisation en thérapeutique, la recherche d'autres anticorps anti-RhD à plus haute affinité ou ciblant d'autres épitopes reste la seule possibilité pouvant améliorer l'efficacité de cette démarche.

Des hétéromultimères impliquant différents scFv anti-RhD sont actuellement en cours de développement au laboratoire.

Nous avons validé avec succès le concept de la déviation de la réponse immune vaccinale sur un modèle *in vivo* de ciblage et destruction de cellules tumorales en xélogreffe murine.

Les hétéromultimères TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$  et TTFgC-C4BP $\alpha$  / VHH anti-CEA-C4BP $\beta$ L ont permis de détruire, en présence d'anticorps antitétaniques, les cellules d'adénocarcinome de colon humain (LS174T) injectées aux souris nude.

Ce modèle d'inhibition du développement tumoral pourrait servir de base à des applications thérapeutiques de prévention de récurrences dues aux cellules métastatiques. Il est cependant nécessaire d'évaluer l'étendue de l'efficacité de ce concept sur d'autres types cellulaires tumoraux plus agressifs.

Il serait également très intéressant d'étudier l'efficacité de ce concept dans un modèle de régression de tumeur solide. Cependant l'optimisation des outils moléculaires serait nécessaire.

Le développement d'hétéromultimères trispécifiques par l'association des valences TTFgC et VHH anti-CEA à une fonction cytokine pro-inflammatoire (TNF, IL-6,...), ou un antigène reconnue par les des cellules immunitaires tel que le CD16 pour les cellules NK, est une approche envisageable.

# ANNEXE

## Séquences nucléotidique et protéique du TTFgC-C4BP $\alpha$

Fin du peptide signal					<i>Bgl</i> III	TTFgC												
S	L	G	G	A	R	S	L	D	C	W	V	D	N	E	E	D	I	18
AGC	CTG	GGC	GGC	GCC	AGA	TCT	CTG	GAT	TGT	TGG	GTT	GAT	AAT	GAA	GAA	GAT	ATA	54
D	V	I	L	K	K	S	T	I	L	N	L	D	I	N	N	D	I	36
GAT	GTT	ATA	TTA	AAA	AAG	AGT	ACA	ATT	TTA	AAT	TTA	GAT	ATT	AAT	AAT	GAT	ATT	108
I	S	D	I	S	G	F	N	S	S	V	I	T	Y	P	D	A	Q	54
ATA	TCA	GAT	ATA	TCT	GGG	TTT	AAT	TCA	TCT	GTA	ATA	ACA	TAT	CCA	GAT	GCT	CAA	162
L	V	P	G	I	N	G	K	A	I	H	L	V	N	N	E	S	S	72
TTG	GTG	CCC	GGA	ATA	AAT	GGC	AAA	GCA	ATA	CAT	TTA	GTA	AAC	AAT	GAA	TCT	TCT	216
E	V	I	V	H	K	A	M	D	I	E	Y	N	D	M	F	N	N	90
GAA	GTT	ATA	GTG	CAT	AAA	GCT	ATG	GAT	ATT	GAA	TAT	AAT	GAT	ATG	TTT	AAT	AAT	270
F	T	V	S	F	W	L	R	V	P	K	V	S	A	S	H	L	E	108
TTT	ACC	GTT	AGC	TTT	TGG	TTG	AGG	GTT	CCT	AAA	GTA	TCT	GCT	AGT	CAT	TTA	GAA	324
Q	Y	G	T	N	E	Y	S	I	I	S	S	M	K	K	H	S	L	126
CAA	TAT	GGC	ACA	AAT	GAG	TAT	TCA	ATA	ATT	AGC	TCT	ATG	AAA	AAA	CAT	AGT	CTA	378
S	I	G	S	G	W	S	V	S	L	K	G	N	N	L	I	W	T	144
TCA	ATA	GGA	TCT	GGT	TGG	AGT	GTA	TCA	CTT	AAA	GGT	AAT	AAC	TTA	ATA	TGG	ACT	432
L	K	D	S	A	G	E	V	R	Q	I	T	F	R	D	L	P	D	162
TTA	AAA	GAT	TCC	GCG	GGA	GAA	GTT	AGA	CAA	ATA	ACT	TTT	AGG	GAT	TTA	CCT	GAT	486
K	F	N	A	Y	L	A	N	K	W	V	F	I	T	I	T	N	D	180
AAA	TTT	AAT	GCT	TAT	TTA	GCA	AAT	AAA	TGG	GTT	TTT	ATA	ACT	ATT	ACT	AAT	GAT	540
R	L	S	S	A	N	L	Y	I	N	G	V	L	M	G	S	A	E	198
AGA	TTA	TCT	TCT	GCT	AAT	TTG	TAT	ATA	AAT	GGA	GTA	CTT	ATG	GGA	AGT	GCA	GAA	594
I	T	G	L	G	A	I	R	E	D	N	N	I	T	L	K	L	D	216
ATT	ACT	GGT	TTA	GGA	GCT	ATT	AGA	GAG	GAT	AAT	AAT	ATA	ACA	TTA	AAA	CTA	GAT	648
R	C	N	N	N	N	Q	Y	V	S	I	D	K	F	R	I	F	C	234
AGA	TGT	AAT	AAT	AAT	AAT	CAA	TAC	GTT	TCT	ATT	GAT	AAA	TTT	AGG	ATA	TTT	TGC	702
K	A	L	N	P	K	E	I	E	K	L	Y	T	S	Y	L	S	I	252
AAA	GCA	TTA	AAT	CCA	AAA	GAG	ATT	GAA	AAA	TTA	TAC	ACA	AGT	TAT	TTA	TCT	ATA	756
T	F	L	R	D	F	W	G	N	P	L	R	Y	D	T	E	Y	Y	270
ACC	TTT	TTA	AGA	GAC	TTC	TGG	GGA	AAC	CCT	TTA	CGA	TAT	GAT	ACA	GAA	TAT	TAT	810
L	I	P	V	A	S	S	S	K	D	V	Q	L	K	N	I	T	D	288
TTA	ATA	CCA	GTA	GCT	TCT	AGT	TCT	AAA	GAT	GTT	CAA	TTG	AAA	AAT	ATA	ACA	GAT	864
Y	M	Y	L	T	N	A	P	S	Y	T	N	G	K	L	N	I	Y	306
TAT	ATG	TAT	TTG	ACA	AAT	GCG	CCA	TCG	TAT	ACT	AAC	GGA	AAA	TTG	AAT	ATA	TAT	918
Y	R	R	L	Y	N	G	L	K	F	I	I	K	R	Y	T	P	N	324
TAT	AGA	AGG	TTA	TAT	AAT	GGA	CTA	AAA	TTT	ATT	ATA	AAA	AGA	TAT	ACA	CCT	AAT	972
N	E	I	D	S	F	V	K	S	G	D	F	I	K	L	Y	V	S	342
AAT	GAA	ATA	GAT	TCT	TTT	GTT	AAA	TCA	GGT	GAT	TTT	ATT	AAA	TTA	TAT	GTA	TCA	1026
Y	N	N	N	E	H	I	V	G	Y	P	K	D	G	N	A	F	N	360
TAT	AAC	AAT	AAT	GAG	CAC	ATT	GTA	GGT	TAT	CCG	AAA	GAT	GGA	AAT	GCC	TTT	AAT	1080

N	L	D	R	I	L	R	V	G	Y	N	A	P	G	I	P	L	Y	378
AAT	CTT	GAT	AGA	ATT	CTA	AGA	GTA	GGT	TAT	AAT	GCC	CCA	GGT	ATC	CCT	CTT	TAT	1134
K	K	M	E	A	V	K	L	R	D	L	K	T	Y	S	V	Q	L	396
AAA	AAA	ATG	GAA	GCA	GTA	AAA	TTG	CGT	GAT	TTA	AAA	ACC	TAT	TCT	GTA	CAA	CTT	1188
K	L	Y	D	D	K	N	A	S	L	G	L	V	G	T	H	N	G	414
AAA	TTA	TAT	GAT	GAT	AAA	AAT	GCA	TCT	TTA	GGA	CTA	GTA	GGT	ACC	CAT	AAT	GGT	1242
Q	I	G	N	D	P	N	R	D	I	L	I	A	S	N	W	Y	F	432
CAA	ATA	GGC	AAC	GAT	CCA	AAT	AGG	GAT	ATA	TTA	ATT	GCA	AGC	AAC	TGG	TAC	TTT	1296
N	H	L	K	D	K	I	L	G	C	D	W	Y	F	V	P	T	D	450
AAT	CAT	TTA	AAA	GAT	AAA	ATT	TTA	GGA	TGT	GAT	TGG	TAC	TTT	GTA	CCT	ACA	GAT	1350
								<i>BspEI</i>	<b>linker</b>									
E	G	W	T	N	D	S	G	G	G	G	S	T	G	W	E	T	P	468
GAA	GGA	TGG	ACA	AAT	GAT	TCC	GGA	GGC	GGT	GGC	TCG	ACC	GGA	TGG	GAG	ACC	CCC	1404
E	G	C	E	Q	V	L	T	G	K	R	L	M	Q	C	L	P	N	486
GAA	GGC	TGT	GAA	CAA	GTG	CTC	ACA	GGC	AAA	AGA	CTC	ATG	CAG	TGT	CTC	CCA	AAC	1458
P	E	D	V	K	M	A	L	E	V	Y	K	L	S	L	E	I	E	504
CCA	GAG	GAT	GTG	AAA	ATG	GCC	CTG	GAG	GTA	TAT	AAG	CTG	TCT	CTG	GAA	ATT	GAA	1512
Q	L	E	L	Q	R	D	S	A	R	Q	S	T	L	D	K	E	L	522
CAA	CTG	GAA	CTA	CAG	AGA	GAC	AGC	GCA	AGA	CAA	TCC	ACT	TTG	GAT	AAA	GAA	CTA	1566
I	H	H	H	H	H	H	H	H	H	*	*	S	R					535
ATC	CAC	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA	TGA	TCT	AGA						1606

Tag 8 histidines

*XbaI*

## Séquences nucléotidique et protéique du scFv anti-GPA-C4BP $\alpha$

### Peptide signal

N	S	P	V	A	A	M	G	A	G	A	T	G	R	A	15			
AAT	TCA	CCG	GTC	GCC	GCC	ATG	GGC	GCC	GGC	GCC	ACC	GGC	CGC	GCC	45			
M	D	G	P	R	L	L	L	L	L	L	G	V	S	L	G	G	33	
ATG	GAC	GGC	CCC	CGC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	GGC	GTG	AGC	CTG	GGC	GGC	99	
<b>scFv anti-GPA</b>																		
<u>A</u>	R	S	Q	V	K	L	Q	Q	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	51
GCC	AGA	TCT	CAG	GTG	AAA	CTG	CAG	CAG	TCA	GGG	GGA	GGC	TTA	GTG	CAG	CCT	GGA	153
G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	69
GGG	TCC	CTG	AAA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACT	TTC	AGT	AGC	TAT	GGC	207
M	S	W	F	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	I	I	87
ATG	TCT	TGG	TTT	CGC	CAG	ACT	CCA	GAC	AAG	AGG	CTG	GAG	TTG	GTC	GCA	ATC	ATT	261
N	S	N	G	G	T	T	Y	Y	P	D	S	V	K	G	R	F	T	105
AAT	AGT	AAT	GGT	GGT	ACT	ACC	TAT	TAT	CCA	GAC	AGT	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	315
I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	123
ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	GCC	AAG	AAC	ACC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AGC	AGT	CTG	AAG	369
S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	G	G	G	R	W	L	L	141
TCT	GAG	GAC	ACA	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	GGA	GGA	GGG	AGA	TGG	TTA	CTG	423
D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	G	G	G	G	S	159
GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGG	TCA	477
G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	D	I	E	L	T	Q	S	P	177
GGC	GGA	GGT	GGC	TCT	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	GAC	ATC	GAG	CTC	ACT	CAG	TCT	CCA	531
S	S	L	A	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	195
TCA	TCT	CTG	GCT	GTG	TCT	GCA	GGA	GAA	AAG	GTC	ACT	ATG	AGC	TGT	AAG	TCC	AGT	585
Q	S	V	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	213
CAA	AGT	GTT	TTA	TAC	AGT	TCA	AAT	CAG	AAG	AAC	TAC	TTG	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	639
K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	231
AAA	CCA	GGG	CAG	TCT	CCT	AAA	CTG	CTG	ATC	TAC	TGG	GCA	TCC	ACT	AGG	GAA	TCT	693
G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	249
GGT	GTC	CCT	GAT	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAT	TTT	ACT	CTT	ACC	747
I	S	S	V	Q	A	E	D	L	A	V	Y	Y	C	H	Q	Y	L	267
ATC	AGC	AGT	GTA	CAA	GCT	GAA	GAC	CTG	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAT	CAA	TAC	CTC	801
<b>linker</b>																		
S	S	S	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R	S	G	G	385
TCC	TCG	TCG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA	CGG	TCC	GGA	GGC	855
<b>C4BP<math>\alpha</math></b>																		
<b>G</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	T	G	W	E	T	P	E	G	C	E	Q	V	L	T	G	303
GGT	GGC	TCG	ACC	GGA	TGG	GAG	ACC	CCC	GAA	GGC	TGT	GAA	CAA	GTG	CTC	ACA	GGC	909
K	R	L	M	Q	C	L	P	N	P	E	D	V	K	M	A	L	E	321
AAA	AGA	CTC	ATG	CAG	TGT	CTC	CCA	AAC	CCA	GAG	GAT	GTG	AAA	ATG	GCC	CTG	GAG	963
V	Y	K	L	S	L	E	I	E	Q	L	E	L	Q	R	D	S	A	339
GTA	TAT	AAG	CTG	TCT	CTG	GAA	ATT	GAA	CAA	CTG	GAA	CTA	CAG	AGA	GAC	AGC	GCA	1017

R	Q	S	T	L	D	K	E	L	I	H	H	H	H	H	H	H	H	357
AGA	CAA	TCC	ACT	TTG	GAT	AAA	GAA	CTA	ATC	CAC	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	1071
* TGA	* TGA	S TCT	R AGA															361
																		1083

*XbaI*

Tag 8 histidines

## Séquences nucléotidique et protéique du scFv anti-GPA-C4BPβC

Peptide signal																		<i>Bgl</i> II		
R	L	L	L	L	L	L	L	L	G	V	S	L	G	G	A	R	S	Q	18	
CGC	CTG	GGC	GTG	AGC	CTG	GGC	GGC	GCC	AGA	TCT	CAG	54								
<i>scFv anti-GPA</i>																				
V	K	L	Q	Q	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	36		
GTG	AAA	CTG	CAG	CAG	TCA	GGG	GGA	GGC	TTA	GTG	CAG	CCT	GGA	GGG	TCC	CTG	AAA	108		
L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	S	W	F	54		
CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACT	TTC	AGT	AGC	TAT	GGC	ATG	TCT	TGG	TTT	162		
R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	I	I	N	S	N	G	72		
CGC	CAG	ACT	CCA	GAC	AAG	AGG	CTG	GAG	TTG	GTC	GCA	ATC	ATT	AAT	AGT	AAT	GGT	216		
G	T	T	Y	Y	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	90		
GGT	ACT	ACC	TAT	TAT	CCA	GAC	AGT	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	270		
N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D	T	108		
AAT	GCC	AAG	AAC	ACC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AGC	AGT	CTG	AAG	TCT	GAG	GAC	ACA	324		
A	M	Y	Y	C	A	R	G	G	G	R	W	L	L	D	Y	W	G	126		
GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	GGA	GGA	GGG	AGA	TGG	TTA	CTG	GAC	TAC	TGG	GGC	378		
Q	G	T	T	V	T	V	S	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	144		
CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGG	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	432		
S	G	G	G	G	S	D	I	E	L	T	Q	S	P	S	S	L	A	162		
TCT	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	GAC	ATC	GAG	CTC	ACT	CAG	TCT	CCA	TCA	TCT	CTG	GCT	486		
V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	V	L	180		
GTG	TCT	GCA	GGA	GAA	AAG	GTC	ACT	ATG	AGC	TGT	AAG	TCC	AGT	CAA	AGT	GTT	TTA	540		
Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	198		
TAC	AGT	TCA	AAT	CAG	AAG	AAC	TAC	TTG	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	CAG	594		
S	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	216		
TCT	CCT	AAA	CTG	CTG	ATC	TAC	TGG	GCA	TCC	ACT	AGG	GAA	TCT	GGT	GTC	CCT	GAT	648		
R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	V	234		
CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAT	TTT	ACT	CTT	ACC	ATC	AGC	AGT	GTA	702		
Q	A	E	D	L	A	V	Y	Y	C	H	Q	Y	L	S	S	S	T	252		
CAA	GCT	GAA	GAC	CTG	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAT	CAA	TAC	CTC	TCC	TCG	TCG	ACG	756		
																		<i>Not</i> I	<i>C4BPβC</i>	
F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R	A	A	A	Q	E	A	P	270		
TTC	GGT	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA	CGG	GCG	GCC	GCA	CAG	GAA	GCT	CCC	810		
K	P	E	C	E	K	A	L	L	A	F	Q	E	S	K	N	L	C	288		
AAA	CCA	GAG	TGT	GAG	AAG	GCA	CTT	CTT	GCC	TTT	CAG	GAG	AGT	AAG	AAC	CTC	TGC	864		
E	A	M	E	N	F	M	Q	Q	L	K	E	S	G	M	T	M	E	306		
GAA	GCC	ATG	GAG	AAC	TTT	ATG	CAA	CAA	TTA	AAG	GAA	AGT	GGC	ATG	ACA	ATG	GAG	918		
E	L	K	Y	S	L	E	L	K	K	A	E	L	K	A	K	L	L	324		
GAG	CTA	AAA	TAT	TCT	CTG	GAG	CTG	AAG	AAA	GCT	GAG	TTG	AAG	GCA	AAA	TTG	TTG	972		
I	H	H	H	H	H	H	*	*	S	R								335		
ATC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA	TGA	TCT	AGA								1005		

Tag 6 histidines

## Séquences nucléotidique et protéique du scFv anti-GPA-C4BPβL

	<i>Bgl</i> II	
L L L L L L L G V S L G G A R S Q V		18
CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG GGC GTG AGC CTG GGC GGC GCC AGA TCT CAG GTG		54
<u>scFv anti-GPA</u> →		
K L Q Q S G G G L V Q P G G S L K L		36
AAA CTG CAG CAG TCA GGG GGA GGC TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC		108
S C A A S G F T F S S Y G M S W F R		54
TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG TTT CGC		162
Q T P D K R L E L V A I I N S N G G		72
CAG ACT CCA GAC AAG AGG CTG GAG TTG GTC GCA ATC ATT AAT AGT AAT GGT GGT		216
T T Y Y P D S V K G R F T I S R D N		90
ACT ACC TAT TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT		270
A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A		108
GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC		324
M Y Y C A R G G G R W L L D Y W G Q		126
ATG TAT TAC TGT GCA AGA GGA GGA GGG AGA TGG TTA CTG GAC TAC TGG GGC CAA		378
G T T V T V S S G G G S G G G S		144
GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGG TCA GGC GGA GGT GGC TCT		432
G G G G S D I E L T Q S P S S L A V		162
GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA TCA TCT CTG GCT GTG		486
S A G E K V T M S C K S S Q S V L Y		180
TCT GCA GGA GAA AAG GTC ACT ATG AGC TGT AAG TCC AGT CAA AGT GTT TTA TAC		540
S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S		198
AGT TCA AAT CAG AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT		594
P K L L I Y W A S T R E S G V P D R		216
CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGT GTC CCT GAT CGC		648
F T G S G S G T D F T L T I S S V Q		234
TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTT ACT CTT ACC ATC AGC AGT GTA CAA		702
A E D L A V Y Y C H Q Y L S S S T F		252
GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAT CAA TAC CTC TCC TCG TCG ACG TTC		756
G G G T K L E I K R A A A S G <i>linker</i> G		270
GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCC GGA GGC GGT GGC		810
<u>C4BPβL</u> →	<i>Not</i> I	
S R D C D P P G N P V H G Y F E G N		288
TCG CGG GAC TGT GAC CCT CCT GGG AAT CCA GTT CAT GGC TAT TTT GAA GGA AAT		864
N F T L G S T I S Y Y C E D R Y Y L		306
AAC TTC ACC TTA GGA TCC ACC ATT AGT TAT TAC TGT GAA GAC AGG TAC TAC TTA		918
V G V Q E Q Q C V D G E W S S A L P		324
GTG GGC GTG CAG GAG CAG CAA TGC GTT GAT GGG GAG TGG AGC AGT GCA CTT CCA		972
V C K L I Q E A P K P E C E K A L L		342
GTC TGC AAG TTG ATC CAG GAA GCT CCC AAA CCA GAG TGT GAG AAG GCA CTT CTT		1026

A	F	Q	E	S	K	N	L	C	E	A	M	E	N	F	M	Q	Q	360
GCC	TTT	CAG	GAG	AGT	AAG	AAC	CTC	TGC	GAA	GCC	ATG	GAG	AAC	TTT	ATG	CAA	CAA	1080
L	K	E	S	G	M	T	M	E	E	L	K	Y	S	L	E	L	K	378
TTA	AAG	GAA	AGT	GGC	ATG	ACA	ATG	GAG	GAG	CTA	AAA	TAT	TCT	CTG	GAG	CTG	AAG	1134
K	A	E	L	K	A	K	L	L	I	H	H	H	H	H	H	*	*	396
AAA	GCT	GAG	TTG	AAG	GCA	AAA	TTG	TTG	ATC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA	TGA	1188
S	R																397	
TCT	AGA																1191	

Tag 6 histidines

*Xba* I

## Séquences nucléotidique et protéique du scFv anti-Rh(D)-C4BPα

Peptide signal																			
L	L	L	L	L	L	L	L	G	V	S	L	G	G	A	A	Q	P	A	18
CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG GGC GTG AGC CTG GGC GGC CCG <span style="color: red;">GCC CAG CCG GCC</span>																	54		
<span style="color: green;">scFv anti-Rh(D)</span> <span style="color: red;">Sfi I</span>																			
M	A	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	36	
ATG	GCC	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	CCT	GGG	GCC	108	
S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	A	M	Y	A	I	54	
TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	ACC	TTC	GCT	ATG	TAT	GCT	ATA	162	
H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	S	L	E	W	M	G	W	I	S	72	
CAT	TGG	GTG	CGC	CAG	GCC	CCC	GGA	CAG	AGT	CTT	GAG	TGG	ATG	GGA	TGG	ATC	AGC	216	
V	A	D	G	K	T	K	Y	S	Q	K	F	Q	D	R	V	T	I	90	
GTT	GCC	GAT	GGT	AAG	ACA	AAG	TAT	TCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GAC	AGA	GTC	ACC	ATT	270	
T	R	D	T	S	A	T	T	A	Y	M	E	V	R	G	L	R	S	108	
ACC	AGG	GAC	ACA	TCC	GCG	ACC	ACA	GCC	TAC	ATG	GAG	GTG	AGG	GGC	CTG	AGA	TCT	324	
E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	P	R	I	N	M	V	R	126	
GAA	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGG	TCA	CCC	CGT	ATT	AAT	ATG	GTT	CGG	378	
G	V	L	I	T	T	P	P	W	F	D	S	W	G	Q	G	T	L	144	
GGA	GTT	CTT	ATA	ACG	ACT	CCC	CCC	TGG	TTC	GAC	TCC	TGG	GGA	CAG	GGA	ACC	CTG	432	
V	T	V	S	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	162	
GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGC	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	TCT	GGC	GGC	GGC	486	
G	S	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	V	S	G	A	P	G	Q	180	
GGA	TCG	CAG	TCT	GTG	TTG	ACG	CAG	CCG	CCC	TCA	GTG	TCT	GGG	GCC	CCA	GGG	CAG	540	
R	V	T	I	S	C	T	G	S	S	S	N	I	G	A	R	Y	D	198	
AGG	GTC	ACC	ATC	TCC	TGC	ACT	GGG	AGC	AGC	TCC	AAC	ATC	GGG	GCA	CGT	TAT	GAT	594	
V	N	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	G	216	
GTA	AAT	TGG	TAC	CAG	CAG	CTT	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GGT	648	
N	T	I	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	234	
AAC	ACC	ATT	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	GGC	702	
T	S	A	S	L	A	I	T	G	L	Q	A	E	D	E	G	D	Y	252	
ACC	TCA	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	ACT	GGG	CTC	CAG	GCT	GAG	GAT	GAG	GGT	GAT	TAT	756	
Y	C	Q	T	Y	D	I	S	L	T	V	V	F	G	G	G	T	K	270	
TAC	TGC	CAG	ACG	TAT	GAC	ATC	AGC	CTG	ACT	GTG	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	810	
<span style="color: red;">BspEI</span> <span style="font-weight: bold;">linker</span> <span style="color: green;">C4BPαC</span>																			
L	T	V	L	G	A	A	A	S	G	G	G	G	S	T	G	W	E	288	
CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	GCG	GCC	GCA	<span style="color: red;">TCC</span>	<span style="color: red;">GGA</span>	<span style="color: red;">GGC</span>	<span style="color: red;">GGT</span>	<span style="color: red;">GGC</span>	<span style="color: red;">TCG</span>	ACC	GGA	TGG	GAG	864	
T	P	E	G	C	E	Q	V	L	T	G	K	R	L	M	Q	C	L	306	
ACC	CCC	GAA	GGC	TGT	GAA	CAA	GTG	CTC	ACA	GGC	AAA	AGA	CTC	ATG	CAG	TGT	CTC	918	
P	N	P	E	D	V	K	M	A	L	E	V	Y	K	L	S	L	E	324	
CCA	AAC	CCA	GAG	GAT	GTG	AAA	ATG	GCC	CTG	GAG	GTA	TAT	AAG	CTG	TCT	CTG	GAA	972	
I	E	Q	L	E	L	Q	R	D	S	A	R	Q	S	T	L	D	K	342	
ATT	GAA	CAA	CTG	GAA	CTA	CAG	AGA	GAC	AGC	GCA	AGA	CAA	TCC	ACT	TTG	GAT	AAA	1026	

E L I H H H H H H H \* \* S R  
GAA CTA ATC CAC CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC TGA TGA TCT AGA

357  
1071

Tag 8 histidines

*XbaI*

## Séquences nucléotidique et protéique du scFv anti-Rh(D)-C4BPβL

Peptide signal																			
L	L	L	L	L	L	L	L	G	V	S	L	G	G	A	A	Q	P	A	18
CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG GGC GTG AGC CTG GGC GGC CCG <span style="color: red;">GCC CAG CCG GCC</span>																	54		
<span style="color: green;">scFv anti-Rh(D)</span>																			
<span style="color: red;">Sfi I</span>																			
M	A	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	36	
ATG	GCC	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	CCT	GGG	GCC	108	
S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	A	M	Y	A	I	54	
TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	ACC	TTC	GCT	ATG	TAT	GCT	ATA	162	
H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	S	L	E	W	M	G	W	I	S	72	
CAT	TGG	GTG	CGC	CAG	GCC	CCC	GGA	CAG	AGT	CTT	GAG	TGG	ATG	GGA	TGG	ATC	AGC	216	
V	A	D	G	K	T	K	Y	S	Q	K	F	Q	D	R	V	T	I	90	
GTT	GCC	GAT	GGT	AAG	ACA	AAG	TAT	TCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GAC	AGA	GTC	ACC	ATT	270	
T	R	D	T	S	A	T	T	A	Y	M	E	V	R	G	L	R	S	108	
ACC	AGG	GAC	ACA	TCC	GCG	ACC	ACA	GCC	TAC	ATG	GAG	GTG	AGG	GGC	CTG	AGA	TCT	324	
E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	P	R	I	N	M	V	R	126	
GAA	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGG	TCA	CCC	CGT	ATT	AAT	ATG	GTT	CGG	378	
G	V	L	I	T	T	P	P	W	F	D	S	W	G	Q	G	T	L	144	
GGA	GTT	CTT	ATA	ACG	ACT	CCC	CCC	TGG	TTC	GAC	TCC	TGG	GGA	CAG	GGA	ACC	CTG	432	
V	T	V	S	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	162	
GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGC	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	TCT	GGC	GGC	GGC	486	
G	S	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	V	S	G	A	P	G	Q	180	
GGA	TCG	CAG	TCT	GTG	TTG	ACG	CAG	CCG	CCC	TCA	GTG	TCT	GGG	GCC	CCA	GGG	CAG	540	
R	V	T	I	S	C	T	G	S	S	S	N	I	G	A	R	Y	D	198	
AGG	GTC	ACC	ATC	TCC	TGC	ACT	GGG	AGC	AGC	TCC	AAC	ATC	GGG	GCA	CGT	TAT	GAT	594	
V	N	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	G	216	
GTA	AAT	TGG	TAC	CAG	CAG	CTT	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GGT	648	
N	T	I	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	234	
AAC	ACC	ATT	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	GGC	702	
T	S	A	S	L	A	I	T	G	L	Q	A	E	D	E	G	D	Y	252	
ACC	TCA	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	ACT	GGG	CTC	CAG	GCT	GAG	GAT	GAG	GGT	GAT	TAT	756	
Y	C	Q	T	Y	D	I	S	L	T	V	V	F	G	G	G	T	K	270	
TAC	TGC	CAG	ACG	TAT	GAC	ATC	AGC	CTG	ACT	GTG	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	810	
<span style="color: red;">Not I</span> <span style="margin-left: 100px;"><b>linker</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><span style="color: green;">C4BPβL</span> </span>																			
L	T	V	L	G	A	A	A	S	G	G	G	G	S	R	D	C	D	288	
CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	<span style="color: red;">GCG</span>	<span style="color: red;">GCC</span>	<span style="color: red;">GCA</span>	TCC	GGA	GAC	TGT	GAC	CCT	CCT	GGG	AAT	CCA	864	
P	P	G	N	P	V	H	G	Y	F	T	L	G	S	T	I	S	Y	306	
GTT	CAT	GGC	TAT	TTT	GAA	GGA	AAT	AAC	TTC	ACC	TTA	GGA	TCC	ACC	ATT	AGT	TAT	918	
Y	C	E	D	R	Y	Y	L	V	G	V	Q	E	Q	Q	C	V	D	342	
TAC	TGT	GAA	GAC	AGG	TAC	TAC	TTA	GTG	GGC	GTG	CAG	GAG	CAG	CAA	TGC	GTT	GAT	972	
G	E	W	S	S	A	L	P	V	C	K	L	I	Q	E	A	P	K	360	
GGG	GAG	TGG	AGC	AGT	GCA	CTT	CCA	GTC	TGC	AAG	TTG	ATC	CAG	GAA	GCT	CCC	AAA	1026	

P	E	C	E	K	A	L	L	A	F	Q	E	S	K	N	L	C	E	378	
CCA	GAG	TGT	GAG	AAG	GCA	CTT	CTT	GCC	TTT	CAG	GAG	AGT	AAG	AAC	CTC	TGC	GAA	1080	
A	M	E	N	F	M	Q	Q	L	K	E	S	G	M	T	M	E	E	396	
GCC	ATG	GAG	AAC	TTT	ATG	CAA	CAA	TTA	AAG	GAA	AGT	GGC	ATG	ACA	ATG	GAG	GAG	1134	
L	K	Y	S	L	E	L	K	K	A	E	L	K	A	K	L	L	I	414	
CTA	AAA	TAT	TCT	CTG	GAG	CTG	AAG	AAA	GCT	GAG	TTG	AAG	GCA	AAA	TTG	TTG	ATC	1188	
H	H	H	H	H	H	*	*	S	R										424
CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA	TGA	TCT	AGA										1218

**Tag 6 histidines**

*Xba I*

## Séquences nucléotidique et protéique du VHH anti-CEA-C4BP $\alpha$

Peptide signal																		
N	S	P	V	A	A	M	G	A	G	A	T	G	R	A	M	D	17	
AAT	TCA	CCG	GTC	GCC	GCC	ATG	GGC	GCC	GGC	GCC	ACC	GGC	CGC	GCC	ATG	GAC	51	
G	P	R	L	L	L	L	L	L	L	G	V	S	L	G	G	A	R	35
GGC	CCC	CGC	CTG	GGC	GTG	AGC	CTG	GGC	GGC	GCC	AGA	105						
<b>VHH anti-CEA</b> <span style="color: green;">→</span> <span style="float: right;"><b>Bgl II</b></span>																		
S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	F	V	Q	A	G	E	S	53
TCT	GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTC	GTG	CAG	GCG	GGG	GAA	TCT	159
L	T	L	S	C	T	S	S	T	L	T	F	T	P	Y	R	M	A	71
CTG	ACG	CTC	TCC	TGT	ACA	AGT	TCT	ACA	CTG	ACC	TTC	ACT	CCG	TAT	CGC	ATG	GCC	213
W	Y	R	Q	A	P	G	K	Q	R	D	L	V	A	D	I	S	S	89
TGG	TAC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	CAG	CGT	GAT	TTA	GTC	GCG	GAT	ATT	AGT	AGT	267
G	D	G	R	T	T	N	Y	A	D	F	A	K	G	R	F	T	I	107
GGT	GAT	GGT	AGG	ACC	ACA	AAC	TAT	GCG	GAC	TTC	GCG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	321
S	R	D	N	I	K	N	T	V	F	L	R	M	T	N	L	K	P	125
TCC	AGA	GAC	AAC	ATC	AAG	AAC	ACG	GTC	TTT	CTG	CGA	ATG	ACT	AAC	CTG	AAA	CCT	375
E	D	T	A	V	Y	Y	C	N	T	F	V	S	F	V	G	I	A	143
GAG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAC	TAC	TGT	AAC	ACC	TTC	GTT	TCG	TTT	GTG	GGG	ATT	GCG	429
R	S	W	G	Q	G	T	Q	V	T	V	S	S	S	G	G	G	G	161
CGT	TCT	TGG	GGC	CAG	GGG	ACC	CAG	GTC	ACT	GTC	TCC	TCA	TCC	GGA	GGC	GGT	GGC	483
<b>C4BP<math>\alpha</math></b> <span style="color: green;">→</span> <span style="float: right;"><b>BspEI linker</b></span>																		
S	T	G	W	E	T	P	E	G	C	E	Q	V	L	T	G	K	R	179
TCG	ACC	GGA	TGG	GAG	ACC	CCC	GAA	GGC	TGT	GAA	CAA	GTG	CTC	ACA	GGC	AAA	AGA	537
L	M	Q	C	L	P	N	P	E	D	V	K	M	A	L	E	V	Y	197
CTC	ATG	CAG	TGT	CTC	CCA	AAC	CCA	GAG	GAT	GTG	AAA	ATG	GCC	CTG	GAG	GTA	TAT	591
K	L	S	L	E	I	E	Q	L	E	L	Q	R	D	S	A	R	Q	215
AAG	CTG	TCT	CTG	GAA	ATT	GAA	CAA	CTG	GAA	CTA	CAG	AGA	GAC	AGC	GCA	AGA	CAA	645
S	T	L	D	K	E	L	I	H	H	H	H	H	H	H	H	*	*	233
TCC	ACT	TTG	GAT	AAA	GAA	CTA	ATC	CAC	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA	TGA	699
S	R															235		
TCT	AGA															705		
<b>Tag 8 histidines</b>																		
<i>XbaI</i>																		

**Séquences nucléotidique et protéique du VHH anti-CEA-C4BPβL**

Peptide signal

N	S	P	V	A	A	M	G	A	G	A	T	G	R	A	M	D	17		
G	AAT	TCA	CCG	GTC	GCC	GCC	ATG	GGC	GCC	GGC	GCC	ACC	GGC	CGC	GCC	ATG	GAC	52	
G	P	R	L	L	L	L	L	L	L	G	V	S	L	G	G	A	R	35	
GGC	CCC	CGC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	GGC	GTG	AGC	CTG	GGC	GGC	GCC	AGA	106	
	<b>VHH anti-CEA</b> →																<i>Bgl II</i>		
S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	F	V	Q	A	G	E	S	53	
TCT	GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTC	GTG	CAG	GCG	GGG	GAA	TCT	160	
L	T	L	S	C	T	S	S	T	L	T	F	T	P	Y	R	M	A	71	
CTG	ACG	CTC	TCC	TGT	ACA	AGT	TCT	ACA	CTG	ACC	TTC	ACT	CCG	TAT	CGC	ATG	GCC	214	
W	Y	R	Q	A	P	G	K	Q	R	D	L	V	A	D	I	S	S	89	
TGG	TAC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	CAG	CGT	GAT	TTA	GTC	GCG	GAT	ATT	AGT	AGT	268	
G	D	G	R	T	T	N	Y	A	D	F	A	K	G	R	F	T	I	107	
GGT	GAT	GGT	AGG	ACC	ACA	AAC	TAT	GCG	GAC	TTC	GCG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	322	
S	R	D	N	I	K	N	T	V	F	L	R	M	T	N	L	K	P	125	
TCC	AGA	GAC	AAC	ATC	AAG	AAC	ACG	GTC	TTT	CTG	CGA	ATG	ACT	AAC	CTG	AAA	CCT	376	
E	D	T	A	V	Y	Y	C	N	T	F	V	S	F	V	G	I	A	143	
GAG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAC	TAC	TGT	AAC	ACC	TTC	GTT	TCG	TTT	GTG	GGG	ATT	GCG	430	
R	S	W	G	Q	G	T	Q	V	T	V	S	S	A	A	A	S	G	linker	161
CGT	TCT	TGG	GGC	CAG	GGG	ACC	CAG	GTC	ACT	GTC	TCC	TCA	GCG	GCC	GCA	TCC	GGA	484	
				<b>C4BPβL</b> →											<i>Not I</i>				
G	G	G	S	R	D	C	D	P	P	G	N	P	V	H	G	Y	F	179	
GAC	TGT	GAC	CCT	CCT	GGG	AAT	CCA	GTT	CAT	GGC	TAT	TTT	GAA	GGA	AAT	AAC	TTC	594	
T	L	G	S	T	I	S	Y	Y	C	E	D	R	Y	Y	L	V	G	216	
ACC	TTA	GGA	TCC	ACC	ATT	AGT	TAT	TAC	TGT	GAA	GAC	AGG	TAC	TAC	TTA	GTG	GGC	648	
V	Q	E	Q	Q	C	V	D	G	E	W	S	S	A	L	P	V	C	234	
GTG	CAG	GAG	CAG	CAA	TGC	GTT	GAT	GGG	GAG	TGG	AGC	AGT	GCA	CTT	CCA	GTC	TGC	702	
K	L	I	Q	E	A	P	K	P	E	C	E	K	A	L	L	A	F	252	
AAG	TTG	ATC	CAG	GAA	GCT	CCC	AAA	CCA	GAG	TGT	GAG	AAG	GCA	CTT	CTT	GCC	TTT	756	
Q	E	S	K	N	L	C	E	A	M	E	N	F	M	Q	Q	L	K	270	
CAG	GAG	AGT	AAG	AAC	CTC	TGC	GAA	GCC	ATG	GAG	AAC	TTT	ATG	CAA	CAA	TTA	AAG	810	
E	S	G	M	T	M	E	E	L	K	Y	S	L	E	L	K	K	A	288	
GAA	AGT	GGC	ATG	ACA	ATG	GAG	GAG	CTA	AAA	TAT	TCT	CTG	GAG	CTG	AAG	AAA	GCT	864	
E	L	K	A	K	L	L	I	H	H	H	H	H	H	*	*	S	R	306	
GAG	TTG	AAG	GCA	AAA	TTG	TTG	ATC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA	TGA	TCT	AGA	918	

Tag 6 histidines

*Xba I*

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

ABOMOELAK B, HUYGEN K, KREMER L, TURNEER M, LOCHT C

Humoral and cellular immune responses in mice immunized with recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein.

Infect. Immun. 1999, 67, 5100-5105.

ACOG Practice bulletin.

Prevention of Rh D alloimmunization.

Int. J. Gynaecol. Obstet. 1999, 66, 63-70.

AFSSAPS.

Analyse du risque de transmission de la variante de la maladie de Creutzfeld-Jacob par les produits de santé et par les tissus et fluides d'origine humaine: actualisation des données du groupe ad hoc de décembre 2000.

Rapport de février 2004.

AKCAKANAT A, KANDA T, TANABE T, OHASHI M, HATAKEYAMA K.

Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX proteins in esophageal cancer: Implications for immunotherapy.

Int. J. Cancer. 2006, 118, 123-128.

ALVAREZ-RUEDA N, BEHAR G, FERRE V, PUQNIERE M, ROQUET F, GASTINEL L, JACQUOT C, AUBRY J, BATY D, BARBET J, BIRKLE S.

Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical haptén.

Mol. Immunol. 2007, 44, 1680-1690.

ANDRE I, PERSSON J, BLOM AM, NILSSON H, DRAKENBERG T, LINDAHL G, LINSE S

Streptococcal M protein: structural studies of the hypervariable region, free and bound to human C4BP.

Biochem, 2006, 45, 4559-4568.

ANSART-PIRENNE H.

Stratégie d'identification des variants du gène RHCE au centre national de référence pour les groupes sanguins : impact sur la sécurité transfusionnelle.

Transfus. Clin. Biol. 2006, 13, 13-18.

ARMSTRONG AJ, CARDUCCI MA.

Advanced prostate cancer: the future.

Can. J. Urol. 2005, 12, 42-47.

ATWELL JL, PEARCE LA, LAH M, GRUEN LC, KORTT AA, HUDSON PJ.

Design and expression of a stable bispecific scFv dimer with affinity for both glycophorin and N9 neuraminidase.

Mol. Immunol. 1996, 33, 1301-1312.

AUBIN J, LE VAN KIM C, MOURO I, COLIN Y, BROSSARD Y, CARTRON JP.  
Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification.  
Br. J. Haematol. 1997, 98, 356-364.

## - B -

BAILLY P, HERMAND P, CALLEBAUT I, SONNEBORN HH, CARTRON JP.  
The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91, 5306-5310.

BARBACID M, ORTEGA S, SOTILLO R, DUBUS P, MALUMBRES M.  
Cell cycle and cancer: genetic analysis of the role of cyclin-dependent kinases.  
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2005, 70, 233-240.

BARNUM SR, DAHLBACK B.  
C4b-binding protein, a regulatory component of the classical pathway of complement, is an  
acute phase-protein and elevated in systemic lupus erythematosus.  
Complement Inflamm. 1990, 7, 71-77.

BARRY EM, GOMEZ-DUARTE O, CHATFIELD S, RAPPUOLI R, LOSONSKY G  
Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C  
fusions in Salmonella typhi vaccine strain CVD 908.  
Infect. Immun. 1996, 64, 4172-4181.

BARRY M, BLEACKLEY RC  
Cytotoxic lymphocytes: all roads lead to death.  
Nat. Immunol. 2002, 2, 401-409.

BEAUCHEMIN N, DRABER P, DVEKSLER G, GOLD P, GRUNERT F.  
Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family.  
Exp. Cell. Res. 1999, 252, 243-249.

BENCHIMOL S, FUKS A, JOTHY S, BEAUCHEMIN N, SHIROTA K, STANNERS C.  
Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion  
molecule.  
Cell, 1989, 57, 327-334.

BENNETT PR, LE VAN KIM C, COLIN Y, WARWICK RM, FISK NM.  
Prenatal determination of foetal RhD type by DNA amplification.  
N. Engl. J. Med. 1993, 329, 607-610.

BERINSTEIN NL.  
Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines.  
J. Clin. Oncol. 2002, 20, 2197-2207.

BERNARD J.  
Le sang et l'histoire.  
Buchet-Castel, 1983.

- BERRGARD K, LINDAHL G, DAHLBACK B, BLOM AM  
 Bordetella pertussis binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b  
 Eur. J. Immunol. 2001, 31, 2771-2780
- BETTER M, CHANG CP, ROBINSON RR, HORWITZ AH.  
 Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment.  
 Science, 1988, 240, 1041-1043
- BETZ SF, LIEBMAN PA, DEGRADO WF.  
 De novo design of native proteins: characterization of proteins intended to fold into antiparallel, rop-like, four-helix bundles.  
 Biochem, 1997, 36, 2450-2458.
- BHATTACHARYA-CHATTERJEE M, CHATTERJEE SK, FOON KA.  
 Anti-idiotypic vaccine against cancer.  
 Immunol. Lett. 2000, 74, 51-58.
- BIRD RE, HARDMAN KD, JACOBSON JW, JOHNSON S, WHITLOW M.  
 Single-chain antigen binding proteins.  
 Science, 1988, 242, 423-426.
- BITELLA R, LOBUGLIO AF  
 Chimeric antibodies.  
 Int. J. Immunol. 1992, 10, 165-176.
- BIZZINI B  
 Etude de l'immunité antitétanique d'une population d'ouvriers des usines Renault.  
 Ann. Microbiol. 1978, 129B, 437-440.
- BLACK NA, PARSONS A, KURTZ JB, LACEY A, MAYON-WHITE RT.  
 Post-partum rubella immunisation: a controlled trial of two vaccines.  
 Lancet, 1983, 29, 990-992
- BLOM AM  
 Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein  
 Biochem. Soc. Transac. 2002, 30, 6, 978-982
- BLOM AM, BERGGARD K, WEBB JH, VILLOUTREIX BO, DAHLBACK B  
 Human C4b-binding protein has overlapping, but not identical, binding sites for C4b and streptococcal M proteins  
 J. Immunol. 2000, 164, 5328-5336
- BLOM AM, KASK L, DAHLBACK B  
 CCP1-4 of the C4b-binding protein a chain are required for factor I mediated cleavage of C3b.  
 Mol. Immunol. 2003, 39, 547-556
- BLOM AM, RYTKONEN A, VASQUEZ P, DAHLBACK B, JONSSON BA.  
 A novel interaction between type IV Pili of *Neisseria gonorrhoeae* and the human complement regulator C4b-Binding Protein  
 J. Immunol, 2001, 166, 6764-6770.

BLOM AM, ZADURA AF, VILLOUTERIX BO, DAHLBACK B  
positively charged amino acids at the interface between alpha-chain CCP1 and CCP2 of C4BP are required for the regulation of the classical C3-convertase  
Mol. Immunol. 2000, 37, 445-453.

BLOM AM, WEBB J, VILLOUTREIX BO, DAHLBACK B  
A cluster of positively charged amino acids in the C4BP alpha-chain is crucial for C4b-binding and factor I cofactor function  
J. Biol. Chem. 1999, 274, 19237-19245

BODEY B, BODEY BJr, SIEGEL SE, KAISER HE.  
Failure of cancer vaccines: the significant limitations of this approach to immunotherapy.  
Anticancer. Res. 2000, 20, 2665-2676.

BON GG, VERHEIJEN RH, ZUETENHORST JM, VAN KAMP GJ, KENEMANS P.  
Mucin-like carcinoma-associated antigen serum levels in patients with adenocarcinomas originating from ovary, breast and colon.  
Gynecol. Obstet. Invest. 1996, 42, 58-62.

BOON T, DE PLAEN E, LURQUIN C, AMAR-COSTESECC A, VAN PEL A.  
Identification of tumour rejection antigens recognized by T lymphocytes.  
Cancer. Surv. 1992, 13, 23-37.

BORDET T, CASTELNAU-PTAKHINE L, FAUCHEREAU F, KAHN A, HAASE G  
Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment.  
Mol. Cell. Neurosci. 2001, 17, 842-854.

BORNEMANN KD, BREWER JW, BECK-ENGESER GB, CORLEY RB, JACK HM.  
Roles of heavy and light chains in IgM polymerization.  
Proc. Natl. Sci. USA. 1995, 92, 4912-4916.

BOULIANNE GL, HOZUMI N, SHULMAN MJ.  
Production of functional chimaeric mouse/human antibody.  
Nature, 1984, 312, 643-646.

BOWMAN JM  
The prevention of Rh immunization.  
Transfus. Med. Rev. 1988, 2, 129-150.

BOWMAN JM, CHOWN B, LEWIS M, POLLOCK JM.  
Rh isoimmunization during pregnancy: antenatal prophylaxis.  
Can. Med. Assoc. J. 1978, 118, 623-627.

BOWMAN JM, POLLOCK JM.  
Antenatal prophylaxis of Rh iso-immunization: 28 weeks-gestation service program.  
Can. Med. Assoc. J. 1978, 118, 627-630.

BOWMAN JM, POLLOCK JM.  
Failures of intravenous Rh immune globulin prophylaxis: an analysis of the reasons for such failures.  
Transfus. Med. Rev. 1987, 1, 101-112.

BRANGER B, WINER N.

Epidémiologie de l'allo-immunisation anti-D pendant la grossesse.  
J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 2006, 35, 1S87-1S92.

BRINKMANN U, REITER Y, JUNG SH, LEE B, PASTAN I.

A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993, 90, 7538-7542.

BRODEUR R.

C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor.  
Immunity, 2003, 18, 837-848.

BROSSARD Y, PARNET-MATHIEU F, LARSEN M.

Incompatibilité foeto-maternelle érythrocytaire. In : Transfusion Sanguine : vers une approche sécuritaire.  
John Libbey Editeur, 2000, p. 290-318.

BROSSARD Y, PARNET-MATHIEU F, LARSEN M.

Diagnostic et suivis prénatals des allo-immunisations érythrocytaires.  
Feuillets de Biologie, 2002, 43, 11-17.

BROSSARD Y, POISSONNIER MH.

Allo-immunisation foeto-maternelle anti-D. A propos d'une enquête nationale d'observation des pratiques de prévention par immunoglobulines anti-D dans le pré-partum.  
Gynecol. Obstet. 2003, 473, 19-24.

BROWN EJ.

Complement Receptors and phagocytosis.  
Curr. Opin. Immunol. 1991, 3, 76-82.

BRUTKIEWICZ RR, SRIRAM V.

Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity.  
Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2002, 41, 287-298.

BUCHAN S, GRONEEVIK E, RICE J.

Electroporation as a "prime/boost" strategy for naked DNA vaccination against a tumor antigen.  
J. Immunol. 2005, 174, 6292-6298.

Bulletin épidémiologique hebdomadaire.

24 Juillet 2007, 31-32, 277.

BURDICK MD, HARRIS A, REID CJ, IWAMURA T, HOLLINGSWORTH MA.

Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines.  
J. Biol. Chem. 1997, 272, 24198-24202.

**-C-**

CAO Y, BLOHM D, GHADIMI BM, STOSIEK P, XING PX, KARSTEN U.  
Mucins (MUC1 and MUC3) of gastrointestinal and breast epithelia reveal different and heterogeneous tumor-associated aberrations in glycosylation.  
J. Histochem. Cytochem. 1997, 45, 1547-1557.

CAPON DJ, CHAMOW SM, MORDENTI J, GREGORY T, GROOPMAN JE.  
Designing CD4 immunoadhesins for aids therapy.  
Nature, 1989, 337, 525-531.

CARL J, BENTZEN SM, NORGAARD-PEDERSEN B, KRONBORG O.  
Modelling of serial carcinoembryonic antigen changes in colorectal cancer.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1993, 53, 751-755.

CARROLL MC.  
The role of complement in B cell activation and tolerance.  
Adv. Immunol. 2000, 74, 61-88.

CARTRON JP.  
Defining the Rh blood group antigens.  
Blood Reviews, 1994, 8, 199-212.

CARTRON JP, AGRE P.  
Rh blood group antigens: protein and gene structure.  
Sem. Hématol. 1993, 30, 193-208.

CARTRON JP, RAHUEL C.  
Human erythrocyte glycophorins : protein and gene structure analysis.  
Transf. Med. Reviews 1992, 6, 63-92.

CARTRON JP, RAHUEL C.  
Human erythrocyte glycophorins : protein and gene structure analyses.  
Transfus. Med. Rev. 1992, 6, 63.

CATROS-QUEMENER V, BOUET F, GENETET N.  
Immunité anti-tumorale et thérapies cellulaires du cancer.  
Med. Sci. 2003, 19, 43-53.

CHALOU N, GOORMAGHTIGH E, CONRATH K, RUYSSCHAERT JM.  
Sequence and structure of the membrane-associated peptide of glycophorin A.  
Biochem. 1994, 33, 6902-6910.

CHASIS JA, MOHANDAS N, SOHET SB.  
Erythrocyte membrane rigidity induced by glycophorin A-ligand interaction.  
J. Clin. Invest. 1985, 75, 1919-1926.

CHERIF-ZAHAR B, MATTEI MG, LE VAN KIM C, CARTRON JP, COLIN Y.  
Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization.  
Hum. Genet. 1991, 86, 398-400.

- CHILCOTT J, LLOYD JM, WIGHT J, FORMAN K, WRAY J, TAPPENDEN P.  
A review of the clinical and effectiveness and cost-effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus-negative.  
Health. Technol. Assess. 2003, 7, 62.
- CHOI C, BENVENISTE EN.  
Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses.  
Brain Res. Rev. 2004, 44, 65-81.
- CHOUAIB S, ASSELIN PC, MAMI CF.  
The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction.  
Immunol. Today. 1997, 18, 493-497.
- CHRISTIANSEN D, DEVAUX P, EVLASHEV A, COHEN JH, GERLIER D  
Octamerisation enables soluble CD46 receptor to neutralise measles virus in vitro and in vivo  
J. VIROL. 2000, 74, 4672-4678
- CHUNG LP, BENTLEY DR, REID KBM  
Molecular cloning and characterisation of the cDNA coding for the C4b-binding protein, a regulatory protein of the classical pathway of the human complement system  
Biochem J, 1985, 230, 133-141.
- COLACCHIO TA, NIEDZWICKI D, COMPTON C  
Phase III trial of adjuvant immunotherapy with MoAb 17-1A following resection for stage II adenocarcinoma of the colon (CALGB 9581).  
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2004, 23, 251.
- CONRATH KE, LAUWEREYS M, WYNS L, MUYLDERMANS S.  
Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs.  
J. Biol. Chem. 2001, 276, 7346-7350.
- CONRATH KE, LAUWEREYS M, WYNS L, MUYLDERMANS S.  
Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs.  
J. Biol. Chem. 2001, 276, 7346-7350.
- CONRATH KE, WERNERY U, MUYLDERMANS S, NGUYEN VK.  
Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae.  
Dev. Comp. Immunol. 2003, 27, 87-103.
- CORRADIN G, WATTS C.  
Cellular Immunology of tetanus toxoid.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1995, 195, 77.
- CORTEY A, BROSSARD Y, BELIARD R, BOUREL D.  
Recommandations pour la pratique clinique. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D foeto-maternelle. Perspectives.  
J. Gynécol. Obstét. Biol. Reprod. 2006, 35, 1S119-1S122.

CORTEZ-RETAMOZO V, BACKMANN N, SENTER PD, WERNERY U, REVETS H.  
Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate.  
Cancer Res. 2004, 64, 2853-2857.

CROTHERS DM, METZGER H.  
The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies.  
Immunochem. 1972, 9, 341-357.

CROWTHER CA, MIDDLETON P.  
Anti-D administration after child-birth for preventing Rhesus alloimmunisation.  
Cochrane Database Syst. Rev. 2000, 2, CD000021.

## **-D-**

DAHLBACK B.  
Purification of human C4b-binding protein and formaton of its complex with vitamin K-  
dependent protein S.  
Bioch. J. 1983, 209, 847-856.

DAHLBACK B.  
Inhibition of protein Ca cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding  
protein.  
J. Biol. Chem. 1986, 261, 12022-12027.

DE ALMEIDA V, BOWMAN JM.  
Massive fetomaternal hemorrhage: Manitoba experience.  
Obstet. Gynecol. 1994, 83, 323-328.

DE SILVA.  
Management of large feto-maternal haemorrhages in D negatives women.  
Blood Matters 2003, 13, 8-9.

DE SILVA M, ENGELFRIET CP, REESINK HW.  
Current status of immunoprophylaxis with anti-D immunoglobulin.  
Vox Sanguinis, 2003, 85, 328-337.

DESMYTER A, TRANSUE TR, GHAIROUDI MA, MUYLDERMANS S, WYNS L.  
Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme.  
Nat. Struc. Biol. 1996, 3, 803-811.

DOLEZAL O.  
Single chain Fv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: the residue at the  
position 15 in the V(L) domain of the scFv-0 (V(L)-V(H)) molecule is primarily responsible  
for formation of a tetramer-trimer equilibrium.  
Protein Eng. 2003, 16, 47-56.

DRENO B, NGUYEN JM, KHAMMARI A.  
Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as  
adjuvant therapy for stage III melanoma.  
Cancer. Immunol. Immunother. 2002, 51, 539-546.

DUMOULIN M, CONRATH K, VAN MEIRHAEGHE A, FRENKEN LG.  
Single-domain antibody fragments with high conformational stability.  
Prot. Sci. 2002, 11, 500-515.

**-E-**

EDGAR WM, HAMBLING MH.  
Rubella vaccination and anti-D immunoglobulin administration in the puerperium.  
Br. J. Obstet. Gynaecol. 1977, 84, 754-757.

EDWARDS KM  
Evaluation of a new highly purified pertussis vaccine in infants and children.  
J. Infect. Dis. 1989, 160, 832-837.

EDWARDS PWA.  
Monoclonal antibodies that bind to human erythrocyte-membrane glycoproteins glycophorin A and Band 3.  
Biochem. Soc. Transac. 1980, 8, 334.

EISEL U, JARAUSCH W, GORETZK K, HABERMANN E, NIEMANN H  
Tetanus toxin: Primary structure, expression in E. coli, and homology with botulinum toxins.  
EMBO J. 1986, 5, 2495-2502.

EMSLEY P, FOTINO C, BLACK I, FAIRWEATHER NF, ISAACS NW  
The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding.  
J. Biol. Chem. 2000, 275, 8889-8894.

EPPLER E, HORIG H, KAUFMAN HL, GROSCURTH P, FILGUEIRA L.  
Carcinoembryonic antigen (CEA) presentation and specific T cell-priming by human dendritic cells transfected with CEA-mRNA.  
Eur. J. Cancer, 2002, 38, 184-193.

ESSIG NZ, WOOD JF, HOWARD AJ, RAAG R, WHITLOW M.  
Crystallization of single-chain Fv proteins.  
J. Mol. Biol. 1993, 234, 897-901.

ESTEVA FJ, VALERO V, BOOSER D, GUERRA LT, MURRAY JL, PUSZTAI L.  
Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer.  
J. Clin. Oncol. 2002, 20, 1800-1808.

EYNDE BVD, GAUGLER B, PROBST MK.  
A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription.  
J. Exp. Med. 1999, 190, 1793-1800.

## -F-

Facciponte JG, MacDonald IJ, Wang XY, Kim H, Manjili MH, Subjeck JR.  
Heat shock proteins and scavenger receptors: role in adaptive immune responses.  
*Immunol. Invest.* 2005, 34, 325-342.

FAIRWWEATHER NF, LYNESS VA  
The complete nucleotide sequence of tetanus toxin.  
*Nucleic Acids. Res.* 1986, 14, 7809-7812.

Fan g, Senes A, Cristian L, DeGrado WF, Hochstrasser RM.  
Amide vibrations are delocalized across the hydrophobic interface of a transmembrane  
helix dimer.  
*Proc. Natl. Sci. Acad. USA.* 2006, 103, 16740-16745.

FAUCHET R, IFRAH N.  
*Hématologie. EM Inter éditions,* 1995, 326.

Fifteen Year follow up trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention.  
Tuberculosis research center.  
*Indian J. Med. Res.* 1999, 110, 56-69.

FIGLIN R, PIERCE W, KABOO R.  
Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-  
primed for CD8+ selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor.  
*J. Urol.* 1997, 158, 740-745.

FIGUEIREDO D, TURCOTTE C, FRANKEL G, LI Y, DOUGAN G  
Characterization of recombinant tetanus toxin derivatives suitable for vaccine development.  
*Infect. Immun.* 1995, 63, 3218-3221.

FINNING K.  
Management of large (D+ve) foeto-maternal hemorrhages in D negative women.  
*Blood Matters,* 2003, 13, 8-9.

FLEMING SD, SHEA-DONOHUE T, GUTHRIDGE JM, KULIK L, HOLERS VM.  
Mice deficient in complement receptors 1 and 2 lack a tissue injury-inducing subset of the  
natural antibody repertoire.  
*J. Immunol.* 2002, 169, 2126-2133.

FOTINO C, EMSLEY P, BLACK I, ANDO H, ISHIDA H, ISAACS NW  
The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue  
suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin.  
*J. Biol. Chem.* 2001, 276, 32274-32281.

FRANCIS JW, HOSLER BA, BROWN RH, FISHMAN PS  
CuZn superoxide dismutase (SOD-1): Tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted  
delivery of SOD-1 to neuronal cells.  
*J. Biol. Chem.* 1995, 270, 15434-15442.

FRENKEN L, VAN DER LINDEN RHJ, HERMANS PWJJ, RUULS RC, DE GREUS B.  
Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*.  
J. Biotechnol. 2000, 78, 11-21.

FUNG KEE KUNG K, EASON E, CRANE J, DE LA RONDE S, FARINE D.  
Maternal-fetal medicine committee, genetics committee. Prevention of Rh alloimmunization.  
J. Obstet. Gynaecol. Can. 2003, 25, 765-773.

FUNK WD, PAK DT, KARAS RH, WRIGHT WE, SHAY JW.  
A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes.  
Mol. Cell. Biol. 1992, 12, 2866-2871.

FURTHMAYR H, MARCHESI VT.  
Subunit structure of human erythrocyte glycophorin A.  
Biochem. 1976, 15, 1137-1144.

## -G-

GALAZKA AM.  
Les bases immunologiques de la vaccination, module 3: le tétanos.  
1993, 1.

GALLICK GE, KURZROCK R, KLOETZER WS, ARLINGHAUS RB, GUTTERMAN JU.  
Expression of p21ras in fresh primary and metastatic human colorectal tumors.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985, 82, 1795-1799.

GAMBILL BD.  
Edrecolomab (Panorex) as adjuvant therapy for stage II colon cancer.  
Clin. Colorectal Cancer, 2001, 1, 16-17.

GARCIA DE FRUTOS P, RIHAB IBRAHIM MA, ZOLLER B, DAHLBACK B  
Differential regulation of  $\alpha$  and  $\beta$  chains of C4b-binding protein during acute-phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S  
Blood. 1994, 84, 815-822

GAUGLER B, BROUWENSTIJN N, BOON T, SCHRIER P, VAN DEN EYNDE BJ.  
A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma.  
Immunogenetics. 1996, 44, 323-330.

GIBSON TB, RANGANATHAN A, GROTHEY A.  
Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer.  
Clin. Colorectal cancer, 2006, 6, 29-31.

GIGLI I, FUJITA T, NUSSENZWEIG V  
Modulation of the classical pathway C3-convertase by plasma protein C4b binding and C3b inactivator.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, 76, 6596-6600

GILLIES SD, LAN Y, WILLIAMS S, CARR F, FORMAN S, RAUBITSCHKEK A.  
An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in SCID mouse model of established human B lymphoma.  
Blood, 2005, 105, 3972-3978.

GJERTSEN MK, BUANES T, ROSSELAND AR.  
Intradermal RAS peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma.  
Int. J. Cancer. 2001, 92, 3, 441-450.

GLENNIE MJ, JOHNSON PWM.  
Clinical trials of antibody therapy.  
Immunol. Today, 2000, 21, 403-410.

GLOCKSHUBER R, MALIA M, PFITZINGER I, PLUCKTHUN A.  
A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv fragments.  
Biochem. 1990, 29, 1362-1367.

GOLD P, FREEDMAN SO.  
Demonstration of tumor-specific antigens in human colon carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques.  
J. Exp. Med. 1965, 122, 467-481.

GOLDBERG RL, COSTA T, HABIG WH, KOHN LD, HARDEGREE MC  
Characterization of fragment C and tetanus toxin binding to rat brain membranes.  
Mol. Pharmacol. 1981, 20, 565-570.

GRIBBEN JG, FREEDMAN AS, NEUBERG D.  
Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma.  
N. Engl. J. Med. 1991, 325, 1525-1533

GRUNAU C, SANCHEZ C, EHRLICH M, DUBEAU L, FIALA E, DE SARIO A.  
Frequent DNA hypomethylation of human juxtacentromeric BAGE loci in cancer.  
Genes Chromosomes Cancer. 2005, 43, 11-24.

GUDAT F, ZUBER M, DURMULLER U, SCHAEFER C, NOPPEN C, SPAGNOLI G.  
The tumour-associated antigen MAGE-1 is detectable in formalin-fixed paraffin sections of a malignant melanoma.  
Virchows. Arch. 1996, 429, 77-81.

## **-H-**

HALPERN JL, LOFTUS A  
Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin.  
J. Biol. Chem. 1993, 268, 11188-11192.

HALPERN JL, NEALE EA  
Neurospecific binding, internalisation, and retrograde axonal transport.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1995, 195, 221-241.

HAMERS-CASTERMAN C.

Naturally occurring antibodies devoid of light chains.  
Nature, 1993, 363, 446-448.

HAMMARSTROM S.

The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues.  
Semin. Cancer Biol. 1999, 9, 67-81.

HANAHAH D, WEINBERG RA.

The hallmarks of cancer.  
Cell, 2000, 10, 57-70.

HARADA M, KIMURA G, NOMOTO K.

Heat shock proteins and the antitumor T cell response.  
Biotherapy, 1998, 10, 229-235.

HARBURY PB, ZHANG T, KIM PS, ALBER T.

A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine mutants.  
Science, 1993, 262, 1401-1407.

HERMANN M, KJELLMAN H, LJUNGGREN C.

Antenatal prophylaxis of Rh immunization with 250 micrograms anti-D.  
Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 1984, 124, 1-15.

HERREROS J, LALLI G, MONTECUCCO C, SCHIAVO G

Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in a neuronal cell lines and motoneurons.  
J. Neurochem. 2000, 74, 1941-1950.

HESSING M, KANTERS D, HEIJNEN HF, HACKENG TM, SIXMA JJ, BOUMA B

Structure-function studies in human C4b-binding protein using monoclonal antibodies.  
Eur. J. Immunol. 1991; 21 (9): 2077-85

HILARP A

Molecular analysis of the  $\beta$  chain of human C4b-binding protein  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1991, 51, Suppl 204, 57-69

HILLARP A, DAHLBACK B

Cloning of cDNA coding for the  $\beta$  chain of C4b-binding protein, sequence homology with the  $\alpha$  chain.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 1183-1187.

HOBBS S, JITRAPAKDEE S, WALLACE JC.

Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1 $\alpha$  promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998, 252, 368-372.

- HOFFMANN P, HOFMEISTER R, BRISCHWEIN K, BRANDL C, BARGOU R.  
Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3- bispecific single-chain antibody construct.  
Int. J. Cancer, 2005, 115, 98-104.
- HOLLERS VM.  
The complement system as a therapeutic target in autoimmunity.  
Clin. Immunol. 2003, 107, 140-151.
- HOLLIGER P, HUDSON PJ.  
Engineered antibody fragments and the rise of single domains.  
Nature Biotechnol. 2005, 23, 1126-1136.
- HOLLIGER P, BRISSINCK J, WILLIAMS RL, THIELEMANS K, WINTER G.  
Specific killing of lymphoma cells by cytotoxic T-cells mediated by a specific diabody.  
Prot. Eng. 1996, 9, 299-305.
- HOLLIGER P, MANZKE O, SPAN M, HAWKINS R, WINTER G, BOHLEN H.  
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. 1999, 59, 2909-2916.
- HOLLIGER P, WINTER G.  
Engineering bispecific antibodies.  
Curr. Opin. Biotechnol. 1993, 4, 446-449.
- HOLLIGER P, WING M, POUND JD, BOHLEN H, WINTER G.  
Retargeting serum immunoglobulin with bispecific diabodies.  
Nat. Biotechnol. 1997, 15, 632-636.
- HOOGENBOOM HR, GRIFFITHS AD, JOHNSON KS, CHRISWELL DJ, WINTER G.  
Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fa,b) heavy and light chains.  
Nucl. Acids. Res. 1991, 19, 4133-4137.
- HOPE IA, STRUHL K.  
Functional dissection of an eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast.  
Cell, 1986, 46, 885-894.
- HOPE IA, STRUHL K.  
GCN4, an eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA.  
EMBO J. 1987, 6, 2781-2794.
- HUCHET J, CREGUT R, PINON F.  
Immunoglobulines anti-D, efficacité comparée des voies intramusculaire et intraveineuse.  
Rev. Franç. Transfus. 1970, 13, 231-242.
- HUCHET J, DALLEMAGNE S, HUCHET S, BROSSARD Y, LARSEN M, PARNET-MATHIEU F.  
Ante-partum administration of preventive treatment of Rh-D immunization in rhesus-negative women. Parallel evaluation of transplacental passage of fetal blood cells. Results of a multicenter study carried out in the Paris region.  
J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 1987, 16, 101-111.

HUDSON PJ.

Recombinant antibody fragments.

Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9, 395-402.

HUGHES RG, CRAIG JIO, MURPHY WG, GREER IA.

Causes and clinical consequences of Rhesus (D) haemolytic disease of the newborn: a study of a scottish population, 1985-1990.

Br. J. Obstet. Gynaecol. 1998, 105, 38.

HUSTON JS, LEVINSON D, TAI MS, NOVOTNY J, RIDGE RG, HABER E, CREA R.

Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988, 85, 5879-5883

## **-J-**

JERKINS HT, MARK L, BALL G, PERSSON J, BLOM AM, BARLOW PN

Human C4b-binding protein-structural basis for interaction with streptococcal M protein, a major bacterial virulence factor

J. Biol. Chem. 2006, 281, 3690-3697

JOHANSSON B, FIORETOS T, MITELMAN F.

Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia

Acta. Haematol. 2002, 107, 76-94.

JOHNSON JP.

Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease.

Cancer Metastasis Rev. 1991, 10, 11-22.

JONES BF, TREVILIAN PR, NANRA RS.

Serum sickness due to Rh (anti-D) immunoglobulin.

Austr. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. 1984, 24, 49-50.

JOTHY S, YUAN SY, SHIROTA K.

Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma.

Am. J. Pathol. 1993, 143, 250-257

JOTHY S, YUAN SY, SHIROTA K.

Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma. In situ hybridization study and implication for a new in vivo functional model.

Am. J. Pathol. 1993, 143, 250-257.

JUAREZ J, BENDALL L, BRADSTOCK K.

Chemokines and their receptors as therapeutic targets: the role of the SDF-1/CXCR4 axis.

Curr. Pharm. Des. 2004, 10, 1245-1259.

JU ST, MATSUKI K, OZDEMIRLI M.

Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction.

Int. Rev. Immunol. 1999, 18, 485-513.

## **-K-**

KABELITZ D, WESCH D, OBERG HH.

Regulation of regulatory T cells: role of dendritic cells and toll-like receptors. Crit. Rev. Immunol. 2006, 26, 291-306.

KAMINSKI MS, ZELENETZ AD, PRESS OW, SALEH M, FEHRENBACHER L.

Pivotal study of iodine I131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas.

J. Clin. Oncol. 2001, 3918-3928.

KAMMERER R, VON KLEIST S.

CEA expression of colorectal adenocarcinomas is correlated with their resistance against LAK- cell lysis.

Int. J. Cancer, 1994, 57, 341-347.

KAMOSHIDA S, SUZUKI M, SAKURAI Y, FUKUSHIMA M, TSUTSUMI Y.

Expression of chemoresistance-related proteins in alpha-fetoprotein-producing adenocarcinoma of the digestive organs.

Oncol. Rep. 2006, 16, 721-727.

KARRE K, KLEIN GO, KIESSLING R, KLEIN G.

Genetic control of in vitro NK-activity and in vivo resistance to tumors. Tokai. J. Exp. Clin. Med. 1983, 8, 429-448.

KAUFMAN H, SCHLOM J, KANTOR J.

A recombinant vaccinia virus expressing human carcinoembryonic antigen (CEA).

Int. J. Cancer, 1991, 48, 900-907.

KAWAHARATA H, HINODA Y, ITOH F, ENDO T, OIKAWA S, NAKAZATO H.

Decreased sensitivity of carcinoembryonic antigen cDNA-transfected cells to adriamycin.

Int. J. Cancer, 1997, 72, 377-382.

KAWAI HF, KANEKO S, HONDA M, SHIROTA Y, KOBAYASHI K.

Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis.

Hepatology. 2001, 33, 676-691.

KAYA Z, AFANASYEVA M, WANG Y, DOHMEN KM, SCHLICHTING J, ROSE NR.

Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement.

Nat. Immunol. 2001, 2, 739-745.

KIEWE P, HASMULLER S, KAHLERT S, HEINRIGS M, RACK B, MARME A.  
Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer.  
Clin. Cancer Res. 2006, 12, 3085-3091.

KOHLER G, MILSTEIN C.  
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.  
Nature, 1975, 256, 495-497.

KONG U, KOO J, CHOI K, PARK J, CHANG H.  
The expression of GAGE gene can predict aggressive biologic behavior of intestinal type of stomach cancer.  
Hepatogastroenterology. 2004, 51, 1519-1523.

KONTERMANN RE, MARTINEAU P, CUMMINGS CE, WINTER G.  
Enzyme immunoassays using bispecific diabodies.  
Immunotechnol. 1997, 3, 137-144.

KONTERMANN RE, WING MG, WINTER G.  
Complement recruitment using bispecific diabodies.  
Nat. Biotechnol. 1997, 15, 629-631.

KOPPELMAN SJ, VEER C, SIXMA JJ, BOUMA BN  
Inhibition of the intrinsic factor X activation by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII  
Blood. 1995, 86, 2653-2660

KORTT AA, LAH M, ODDIE GW, GRUEN CL, BURNS JE, HUDSON PJ.  
Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer.  
Prot. Eng. 1997, 10, 423-433.

KOUTSKY LA, HARPER DM.  
Current findings from prophylactic HPV vaccine trials.  
Vaccine 2006, 24, S114-S121.

KREITMAN RJ  
Immunotoxins for targeted cancer therapy  
AAPS J. 2006, 8, E532-E551.

KREITMAN RJ, SQUIRES DR, STETLER-STEVENSON M, WILSON WH.  
Phase I trial recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies.  
J. Clin. Oncol. 2005, 23, 6719-6729.

KUMPEL BM.  
Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers.  
Vox. Sang. 2007, 93, 99-111.

KUMPEL BM, DE HAAS M, KOENE HR, VAN DE WINKEL JG, GEODRICK MJ.  
Clearance of red cells by monoclonal IgG3 anti-D in vivo is affected by the VF polymorphism of Fc gamma RIIIa (CD16).  
Clin. Exp. Immunol. 2003, 132, 81-86.

KUROKI M, HACHIMINE K, HUANG J, SHIBAGUCHI H, KUROKI M.  
Re-targeting of cytotoxic T lymphocytes and/or natural killer to CEA-expressing tumor cells with anti-CEA antibody activity.  
Anticancer Res. 2005, 25, 3725-3732.

KUSAKA T, FUKUI H, SANO Y, UEDA Y, CHIBA T, FUJIMORI T.  
Analysis of K-ras codon 12 mutations and p53 overexpression in colorectal nodule-aggregating tumors.  
J. Gastroenterol. Hepatol. 2000, 15, 1151-1157.

KUSTU S, INWOOD W.  
Biological gas channels for NH<sub>3</sub> and CO<sub>2</sub> : evidence that Rh proteins are CO<sub>2</sub> channels.  
Transf. Clin. Biol. 2006, 13, 103-110.

## -L-

LALLI G, HERREROS J, OSBORNE SL, MONTECUCCO C, SCHIAVO G  
Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains.  
J. Cell. Sci. 1999, 112, 2715-2724.

LANDOLFI NF.  
A chimeric IL-2/Ig molecule possesses the functional activity of both proteins.  
J. Immunol. 1991, 146, 915-919.

LANDSCHULZ WH, JOHNSON PF, ADASHI EY, GRAVES BJ, McKNIGHT SL.  
Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP.  
Genes Dev. 1988, 2, 786-800.

LANDSCHULZ WH, JOHNSON PF, McKNIGHT SL.  
The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite.  
Science, 1989, 243, 1681-1688.

LAUWEREYS M, ARBABI GHAHROUDI M, WYNS L, MUYLDERMANS S.  
Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies.  
EMBO J. 1998, 17, 3512-3520.

Le choléra : sur le site de l'institut Pasteur  
<http://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/cholera.htm>.

LEE D, CONTRERAS M, ROBSON SC, RODECK CH, WHITTLE MJ.  
Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis.  
Transfus. Med. 1999, 9, 93-97.

LEE D, RAWLINSON VI.

Multicenter trial of antepartum low-dose anti-D immunoglobulin.  
Transfus. Med. 1995, 5, 15-19.

LEE JJ, SINHA K, HARRISON JA, DE HORAECHE RD, RIVEAU G, PIERCE RJ  
Tetanus toxin fragment C expressed in live salmonella vaccines enhances antibody responses to its fusion partner Schistosoma haematobium glutathione S-transferase.  
Infect. Immun. 2000, 68, 2503-2512.

LETOURNEAU S, BEAUCHEMIN N.

Rôle des antigènes carcino-embryonnaires dans la cancérisation et la progression tumorale.  
Médecine/Sciences, 1997, 13, 483-491.

LEUNG E, BLOM AM, CLEMENZA L, ISENMAN DE

The complement regulator C4b-binding protein (C4BP) interacts with both the C4c and C4dg subfragments of the parent C4b ligand: Evidence for synergy in C4BP subsite binding  
Biochem, 2006, 45, 8378-8392

LEVINE P, KATZIN EM, BURNHAM L.

Isoimmunization in pregnancy, its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis.  
Am. J. Med. Assoc. 1941, 116, 825-827.

LEVITT SH, MANDEL J.

Benefits versus risks in conservation surgery with irradiation for breast cancer.  
Am. J. Med. 1984, 77, 93-100.

LIAO S, KHARE PD, ARAKAWA F, KUROKI M, TOMITA Y, KUROKI M.

Targeting of LAK activity to CEA-expressing tumor cells with an anti-CEA scFv/IL-2 fusion protein.  
Anticancer Res. 2001, 21, 1673-1680.

LIBYH MT, GOOSSENS D, OUDIN S, GUPTA N, DERVILLEZ X, COHEN JHM

A recombinant human scFv anti-Rh(D) antibody with multiple valences using a C-terminal fragment of C4b-binding protein  
Blood. 1997, 90, 3978-3983.

LILLEY GG, DOLEZAL O, HILLYARD CJ, BERNADR C, HUDSON PJ.

Recombinant single-chain antibody peptide conjugates expressed in Escherichia coli for the rapid diagnosis of HIV.  
J. Immunol. Methods, 1994, 171, 211-226.

LINSE S, HARDIG Y, SCHULTZ D, DAHLBACK B

A region of vitamin K-dependant protein S that binds to C4b-binding protein (C4BP) identified using bacteriophage peptide display libraries  
J. Biol. Chem. 1997, 272, 6, 14658-14665

LLIADES P, KORTT AA, HUDSON PJ.

Triabodies: single chain Fv fragments without a linker from trivalent trimers.  
FEBS Lett. 1997, 409, 437-441.

LO YMD, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PF, RAI V, SARGENT IL, REDMAN CW  
Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.  
Lancet, 1997, 350, 485-487.

LO YMD, HEJELM NM, FIDIER C, MURPHY MF, CHAMBERLAIN PF.  
Prenatal diagnosis of foetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma.  
N. Engl. J. Med. 1998, 339, 1734-1738.

LUBLIN D, LEMONS RS, LE BEAU MM, HOLERS VM, TYKOCINSKI ML, MEDOF ME, ATKISON JP  
The gene coding decay accelerating factor (DAF) is located in the complement regulatory locus on the long arm of chromosome 1.  
J. Exp. Med. 1987, 165, 1731.

## -M-

MAAYAN-METZGER A, SCHWARTZ T, SULKES J, MERLOB P.  
Maternal anti-D prophylaxis during pregnancy does not cause neonatal haemolysis.  
Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed. 2001, 84, F60-F62.

MAC KENZIE IZ, BOWELL P, GREGORY H, PRATT G, GUEST C, ENTWISTLE CC  
Routine antenatal Rhesus D immunoglobulin prophylaxis: the results of a prospective 10 year study.  
Br. J. Obstet. Gynaecol. 1999, 106, 492-497.

MACGEOCH C, MITCHELL CJ, CARRITT B.  
Assignment of the chromosomal locus of the human 30-KDa Rh (Rhesus) blood group-antigen-related protein (Rh30A) to chromosome region 1p36.13-p34.  
Cytogenet. Cell. Genet. 1992, 59, 261-263.

MACOR P, TEDESCO F.  
Complement as effector in cancer immunotherapy.  
Immunol. Letters, 2007, 111, 6-13.

MANNESSIER L, ALIE-DARAM S, ROUBINET F, VALAT AS, DEPOORTERE MH, FOURNIE A, PUECH F.  
Prevention of hemolytic disease of the fetus and the newborn: it is necessary to act.  
J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 2000, 29, 441-444.

MARCHAND M, VAN BAREN N, WEYNANTS P.  
Tumor regression observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigen peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1.  
Int. J. Cancer. 1999, 80, 219-230.

MARKS JD, HOOGENBOOM HR, MC CAFFERTY AD, GRIFFITHS J, WINTER G.  
Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage.  
J. Mol. Biol. 1991, 222, 581-597.

MARONI E, MUTZINGER J.

Postpartum rubella vaccination and anti-D prophylaxis.  
Br. Med. J. 1975, 7, 541-542.

MATTES MJ.

Binding parameters of antibodies reacting with multivalent antigens: functional affinity or pseudo-affinity.  
J. Immunol. Methods. 1997, 202, 97-101.

MATTHEWS CC

Protective effect of supplemental superoxide dismutase on survival of neuronal cells during starvation: requirement for cytosolic distribution.  
J. Mol. Neurosci. 2000, 14, 155-166.

MATZINGER P.

The danger model: a renewed sense of self.  
Science, 2002, 296, 301-305.

MAWBY WJ, HOLMES CH, ANSTEE DJ, SPRING FA, TANNER MJA.

Isolation and characterization of CD47 glycoprotein: a multispanning membrane protein which is the same as integrin-associated protein (IAP) and the ovarian tumour marker OA3.  
Biochem. J. 1994, 304, 525-530.

McKENZIE KR, PRESTEGARD JH, ENGELMAN DM.

A transmembrane helix dimer: structure and implications.  
Science, 1997, 276, 131-133.

MEDAGLINI D, CIABATTINI A, SPINOSA MR, MAGGI T, MARCOTTE H, GIANNI P.

Immunization with recombinant Streptococcus gordonii expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice.  
Vaccine, 2001, 19, 1931-1939.

MELIEF CJ, VAN DER BURG SH, TOES RE, OSSENDORP F, OFFRINGA R.

Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes.  
Immunol. Rev. 2002, 188, 177-182.

MERI T, BLOM AM, HARTMANN A, LENK D, MERI S, ZIPFEL PF

The hyphal and yeast forms of candida albicans bind the complement regulator C4b-binding protein  
Infect. Immun. 2004, 11, 6633-6641

MERRY AH, THOMSON EE, ANSTEE DJ, STRATTON F.

The quantification of erythrocyte antigen sites with monoclonal antibodies.  
Immunol. 1984, 51, 793-800.

MESNAGE S, WEBER-LEVY M, HAUSTANT M, MOCK M, FOUET A

Cell surface-exposed tetanus toxin fragment C produced by recombinant Bacillus anthracis protects against tetanus toxin.  
Infect. Immun. 1999, 67, 4847-4850.

- MIESCHER S, SPYCHER MO, AMSTUTZ H, DE HAAS M, KLEIJER M, KALUS UJ.  
A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIA genes.  
Blood, 2004, 103, 4028-4035.
- MILLER RA, MALONEY DG, WARNKE R, LEVY R.  
Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody.  
N. Engl. J. Med. 1982, 306, 517-522.
- MITCHELL CA, KELEMEN SM, SALEM HH  
The anticoagulant properties of a modified form of protein S  
Thromb. Haemost. 1988, 60, 298-304
- MOCHIDA S, POULAIN B, HABERMANN E, TAUC L  
Light chain of tetanus toxin intracellularly inhibits acetylcholine release at neuro-neuronal synapses, and its internalization is mediated by heavy chain.  
FEBS Lett. 1989, 253, 47-51.
- MOFFITT MC, FRANK MM.  
Complement resistance in microbes.  
Springer Semin. Immunopathol. 1994, 15, 327-344.
- MOLINA H, HOLERS VM, LI B, FUNG Y, MARIATHASAN S, CHAPLIN D.  
Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 3357-3361.
- MOLLNES TE, KIRSCHFINK M.  
Strategies of therapeutic complement inhibition.  
Mol. Immunol. 2006, 43, 107-121.
- MOLLNES TE, SONG WC, LAMBRIS JD.  
Complement in inflammatory tissue damage and disease.  
Trends Immunol. 2002. 23, 61-64.
- MONKS NR, BLAKEY DC, CURTIN NJ, EAST SJ, HEUZE SA, NEWELL DR.  
Induction of apoptosis by the ADEPT agent ZD2767: comparison with the classical nitrogen mustard chlorambucil and a monofunctional ZD2767 analogue.  
Br. J. Cancer, 2001, 85, 764-771.
- MONTE M, SIMONATTO M, PECHE LY, RODOLFO M, SCHNEIDER C.  
MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006, 103, 11160-11165.
- MOORE S, GREEN C.  
The identification of specific Rhesus polypeptide blood group ABH active glycoprotein complexes in the human red cell membranes.  
Biochem. J. 1987, 244, 735-741.

- MORGAN BP, MJ WALPORT.  
Complement deficiency and disease.  
Immunol. Today, 1991, 12, 301-306.
- MORGAN RA, DUDLEY ME, WUNDERLICH JR, ROSENBERG SA.  
Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.  
Science, 2006, 314, 126-129.
- MORRIS NP, CONSIGLIO E, KOHN L, HELTING T  
Interaction of fragments B and C of tetanus toxin with neural and thyroid membranes and with gangliosides.  
J. Biol. Chem. 1980, 255, 6071-6076.
- MOUREY L, SAMAMA JP, DELARUE M, CHOAY J, LORMEAU JC, PETITOU M, MORAS D  
Biochimie, 1990, 72, 599-608
- MUELLER-ORTIZ SL, DROUIN SM, WETSEL RA.  
The alternative activation pathway and complement component C3 are critical for a protective immune response against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia.  
Infect. Immun. 2004, 72, 2899-2906.
- MUDERSPACH L, WILCZINSKI S, ROMAN L.  
A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV-16 positive.  
Clin. Cancer. Res. 2000, 6, 3406-3416.
- MULLE JJ, SHU S, SCHWARZ SL, ROSENBERG SA.  
Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2.  
Science, 1984, 225, 1487-1489.
- MULLER KM, ARNDT KM, PLUCKTHUN A.  
A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity.  
FEBS Lett. 1998, 432, 45-49.
- MULLIGAN NJ, YANG S, ANDRY C, KLEIN M, O'BRIEN MJ.  
The role of p21ras in pancreatic neoplasia and chronic pancreatitis.  
Hum. Pathol. 1999, 30, 602-610.
- MURUGANANDAM A, TANHA J, NARANG S, STANIMIROVIC D.  
Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transigrate across human blood-brain barrier endothelium.  
FASEB J. 2002, 16, 240-242.
- MUYLDERMANS S, ATARHOUCHE T, SALDANHA J, BARBOSA JA, HAMERS R.  
Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains.  
Prot. Eng. 1994, 7, 1129-1135.

MUZYKANTOV VR, ZALTSMAN AB, SMIRNOV MD, MORGAN BP.

Target-sensitive immunoerythrocytes: interaction of biotinylated red blood cells with immobilized avidin induces their lysis by complement.  
Biochim. Biophys. Acta. 1996, 13, 137-143.

**-N-**

NADLER LM, STASHENKO P, HARDY R.

Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen.  
Cancer. Res. 1980, 40, 3147-3154.

NAGATA S, SUDA T.

Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations.  
Immunol. Today. 1995, 16, 39-43.

NAGEL H, LASKAWI R, EIFFERT H, SCHLOTT T.

Analysis of the tumour suppressor genes, FHIT and WT-1, and the tumour rejection genes, BAGE, GAGE-1/2, HAGE, MAGE-1, and MAGE-3, in benign and malignant neoplasms of the salivary glands.  
Mol. Pathol. 2003, 56, 226-231.

NAIR SK, BOCZKOWSKI D, MORSE M, CUMMING RI, LYERLY HK, GILBOA E.

Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA.  
Nat. Biotechnol. 1998, 16, 364-369.

NAPIER MP, SHARMA SK, SPRINGER CJ, BAGSHAWE KD, MARTIN J.

Antibody-directed enzyme prodrug therapy: efficacy and mechanism of action in colorectal carcinoma.  
Clin. Cancer Res. 2000, 6, 765-772.

NAP M, MOLLGARD K, BURTIN P, VAN FLEUREN G.

Immunohistochemistry of carcinoembryonic antigen in the embryo, fetus and adult.  
Tumor Biol. 1988, 9, 145-153.

National Institute for Clinical Excellence (NICE).

Anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus negative.  
Revised in May 2002.

NEMANI VP, BLOM AM, VILLOUTREIX BO, LINSANGAN LC

A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of Escherichia coli K1  
J. Immunol. 2002, 169, 6352-6360.

NOLLAU P, PRALL F, HELMCHEN U, WAGENER C, NEUMAIER M.

Dysregulation of carcinoembryonic antigen group members CGM2, CD66a (biliary glycoprotein), and nonspecific cross-reacting antigen in colorectal carcinomas. Comparative analysis by northern blot and in situ hybridization.  
Am. J. Pathol. 1997, 151, 521-530.

NORDSTROM T, BLOM AM, FORSGREN A

The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor Cb-binding protein through ubiquitous surface protein A1 and A2  
J. Immunol. 2004, 173, 4598-4606

NORO A, SUGAI T, HABANO W, NAKAMURA S.

Analysis of Ki-ras and p53 gene mutations in laterally spreading tumors of the colorectum.  
Pathol. Int. 2003, 53, 828-836.

## **-O-**

OEHLRICH N, DEVITT G, LINNEBACHER M, STEVANOVIC S, ZOLLER M.

Generation of RAGE-1 and MAGE-9 peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte lines for transfer in patients with renal cell carcinoma.  
Int. J. Cancer. 2005, 1, 256-264.

OIKAWA S, INUSUKA C, KUROKI M, MATSUOKA Y, NAKAZATO H.

A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains.  
J. Biol. Chem. 1991, 266, 7995-8001.

OPPENHEIMER-MARKS N, LIPSKY PE.

Migration of naive and and memory T cells.  
Immunol. Today. 1997, 18, 456-457.

O'SHEA EK, KLEMM JD, KIM PS, ALBER T.

X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil.  
Science, 1991, 254, 539-544.

LOUDIN S, LIBYH MT, GOOSSENS D, KLATZMAN D, COHEN JHM

A soluble recombinant multimeric anti Rh(D) Single-Chain FV/CR1 molecule restores the immune complex binding ability of CR1-deficient erythrocytes  
J. Immunol. 2000, 164, 1505-1511

## **-P-**

PARDOLL DM.

Cancer vaccines.  
Nat. Med. 1998, 4, 525-531.

PARDO-MANUEL F, REY-CAMPOS J, HILLARP A, DAHLBACK B

Human genes for the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of complement C4b-binding protein are closely linked in a head-to-tail arrangement.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990, 87, 4529-32.

PARSONS ML, VAN DEN HOF MC, ARMSON BA, LISTON RM, PEDDLE LJ.

A comparison of the rate of Rh (D) alloimmunisation between Nova Scotia and Scotland.  
Br. J. Obstet. Gynaecol. 1998, 105, 39.

PAULITSCHKE M, NASH GB, ANSTEE DJ, TANNER MJ, GRATZER WB.  
Perturbation of red blood cell membrane rigidity by extracellular ligands.  
*Blood*, 1995, 86, 342-348.

PAYNE AM, ZHANG Z, MESSI ML, MILLIGAN CE, GONZALEZ E, DELBONO O  
Motor neurone targeting of IGF-1 prevents specific force decline in ageing mouse muscle.  
*J. Physiol.* 2006, 570, 283-294.

PEI XY, HOLLIGER P, MURZIN AG, WILLIAMS RL.  
The 2.0-Å resolution crystal structure of a trimeric antibody fragment with noncognate VH-VL domain pairs shows a rearrangement of VH CDR3.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, 94, 9637-9642.

PERSSON J, LINDAHL G  
Single step purification of human C4b-binding protein (C4BP) by affinity chromatography on a peptide derived from a streptococcal surface protein  
*J. Immunol. Method.* 2005, 297, 83-95

PICHICHERO ME, BARKIN RM, SAMUELSON JS  
Pediatric diphtheria and tetanus toxoids-adsorbed vaccine: immune response to the first booster following the diphtheria and tetanus toxoid vaccine primary series.  
*Pediatr. Infect. Dis. J.* 1986, 5, 428-430.

PITTET MJ, SPEISER DE, VALMORI D.  
Ex vivo analysis of tumor antigen specific CD8<sup>+</sup> T cell responses using MHC/peptide tetramers in cancer patients.  
*Int. Immunol. pharmacol.* 2001, 1, 1235-1247.

PLUCKTHUN A, PACK P.  
New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments.  
*Immunotechnol.* 1997, 3, 83-105.

PLUCKTHUN A, PACK P.  
New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments.  
*Immunotechnol.* 1997, 3, 83-105.

POSKITT TR.  
Radiation therapy and the role of red blood cell transfusion.  
*Cancer Invest.* 1987, 5, 231-236.

POWER BE, KORTT AA, HUDSON PJ.  
Generation of recombinant multimeric antibody fragments for tumor diagnosis and therapy.  
*Methods Mol. Biol.* 2003, 207, 335-350.

PRIETO MC, WHITTAL RM, BALDWIN MA, BALHORN R, BURLINGAME AL  
Electrospray mass spectrometry of NeuAc oligomers associated with the C fragment of the tetanus toxin.  
*J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2006, 17, 967-976.

PRODEUS AP, GOERG S, SHEN LM, POZDNYAKOVA OO, CHU L, CARROLL MC  
A critical role for complement in maintenance of self-tolerance.  
*Immunity*, 1998, 9, 721-731.

PUTZER BM, HITT M, MUELLER WJ.

Interleukin-12 and B7.1 costimulatory molecule expressed by an anti-viral vector act synergistically to facilitate tumor regression.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997, 94, 10889-10894.

## **-R-**

RAAG R, WHITLOW M.

Single-chain Fv s.

Faseb. J. 1995, 9, 73-80.

RAHMAN A

Autoantibodies, lupus and the science of sabotage

Rheumat. 2004, 43, 1326-1336

RATSIMBASAFY V, ALBA J, COHEN J.

L'allo-immunisation foeto-maternelle anti-D.

Gynecol. Obstet. 2002, 450, 20-23.

REEVES ME, ROYALO RE, LAM JS.

Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene.

Cancer. Res. 1996, 56, 5672-5677.

REID ME, LOMAS-FRANCIS C.

The blood group antigen-facts book.

Elsevier, Academic Press, New York, 2004, 114.

REY-CAMPOS J, BAEZA-SANZ, RODRIGUEZ DE CORDOBA S

Physical linkage of the human genes coding for complement factor H and coagulation factor XIII B subunit.

Genomics, 1990, 7, 644.

REITER Y, BRINKMANN U, KREITMANN RJ, JUNG SH, LEE B, PASTAN I.

Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions.

Biochem, 1994, 33, 5451-5459.

REITER Y, BRINKMANN U, LEE B, PASTAN I.

Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide stabilized Fv fragments.

Nat. Biotechnol. 1996, 14, 1239-1245.

RHEINNECKER M, HARDT C, ILAG LL, KUFER P, ROTTENBERGER C, PACK P.

Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen.

J. Immunol. 1996, 157, 2989-2997.

RIECHMANN L, CLARK M, WATDMANN H, WINTER G.

Reshaping human antibodies for therapy.

Nature Lond. 1988, 332, 323-327.

RIPOCHE P, GOOSSENS D, DEVUYST O, GANE P, COLIN Y, CARTRON JP.

Role of RhAG and AQP1 in NH<sub>3</sub> and CO<sub>2</sub> gas transport in red cell ghosts : a stopped-flow analysis.

Transf. Clin. Biol. 2006, 13, 117-122.

ROBERT B, GUILLAUME P, LUESCHER I, DOUCEY MA, ROMERO P, MACH JP.

Redirecting anti-viral CTL against cancer cells by surface targeting of monomeric MHC class I-viral peptide conjugated to antibody fragments.

Cancer Immunity, 2001, 1, 2-13.

ROBINSON K, CHAMBERLAIN LM, LOPEZ MC, RUSH CM, MARCOTTE H, LE PAGE RWF, WELLS JM

Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant lactococcus lactis strains expressing tetanus toxin fragment C.

Infect. Immun. 2004, 72, 2753-2761.

RODRIGUEZ DE CORDOBA S, LUBLIN D, RUBINSTEIN P, ATKINSON JP

Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked.

J. Exp. Med. 1985, 161, 1187

RODRIGUEZ DE CORDOBA S, SANCHEZ-CORRAL P, REY-CAMPOS J

Structure of the gene coding for the  $\alpha$  polypeptide chain of the human complement component C4b-binding protein

J. Exp. Med. 1991. Vol. 173, pp. 1073-1082.

ROSENBERG S, SPIESS P, LAFRENIERE R.

A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes.

Science, 1986, 233, 1318-1321.

ROSENTHAL FM, ZIEN KS, GANSBACHER B.

Human tumor vaccines and genetic engineering of tumors with cytokines and histocompatibility genes to enhance immunogenicity.

Curr. Opin. Oncol. 1996, 6, 611-615.

ROSS DD, GAO Y, YANG W, LESZYK J, SHIVELY J, DOYLE LA.

The 95-Kilodalton membrane glycoprotein overexpressed in novel multidrug-resistant breast cancer cells is NCA, the nonspecific cross-reacting antigen of carcinoembryonic antigen.

Cancer Res. 1997, 57, 5460-5464.

ROUILLAC-LE SCIELLOUR C, PUILLANDRE P, BOULARD C, LE VAN KAM C.

Large Scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD negative pregnant women.

Mol. Diagn. 2004, 8, 23-31.

ROUILLAC-LE SCIELLOUR C, CARTRON JP, COLIN Y, BROSSARD Y.  
Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women.  
Mol. Diagn. 2004, 8, 23-31.

Royal college of obstetricians and gynaecologists.  
Use of anti-D for Rh prophylaxis.  
May 2002. <http://www.rcog.org.uk>

## **-S-**

SABHARWAL A, KERR D.  
Chemotherapy for colorectal cancer in the metastatic and adjuvant setting: past, present and future.  
Expert. Rev. Anticancer Ther. 2007, 7, 477-487.

SAERENS D, KINNE J, BOSMANS E, MUYLDERMANS S, CONRATH K.  
Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen.  
J. Biol. Chem. 2004, 279, 51965-51972.

SAHA D, ROMAN C, BEAUCHAMP RD.  
New strategies for colorectal cancer prevention and treatment.  
World J. Surg. 2002, 26, 762-766.

SAHIN U, TURECI O, SCHMITT H.  
Human neoplasm elicit multiple specific immune responses in the autologous host.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995, 92, 11810-11813.

SAKAGUCHI S.  
Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance.  
Cell. 2000, 101, 455-458.

SANCHEZ-CORRAL P, GARCIA OC, RODRIGUEZ DE CORDOBA S  
Isoforms of human C4b –binding protein, molecular basis of the C4BP isoform pattern and its variations in human plasma  
J. Immunol. 1995; 155: 4030-6

SANTOS GW.  
Problems and strategies for bone marrow transplantation in acute leukemia and chronic myelogenous leukemia.  
Cancer Detect Prev. 1988, 12, 589-596.

SAROBE P, HUARTE E, LASARTE JJ, BORRAS-CUESTA F.  
Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumor immune responses.  
Curr. Cancer Drug Targ. 2004, 4, 443-454.

SAWYER JR, SCHLOM J, KASHMIRI SV

The effects of induction conditions on production of a soluble anti-tumor sFv in *Escherichia coli*.

Prot. Eng. 1994, 7, 1401-1406.

SCHADENDORF D, BELARDELLI F, FERRANTINI M.

Conference on cancer vaccines.

Cancer. Immunol. Immunother. 2000, 49, 281-284.

SCHARFSTEIN J, FERREIRA A, GIGLI I, NUSSENZWEIG V

Human C4b-binding protein, isolation and characterization.

J. Exp. Med. 1978, 148, 207-222.

SCHLERETH B, FICHTNER I, LORENCZEWSKI, DA SILVA A.

Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct.

Cancer Res. 2005, 65, 2882-2889.

SCHROIT AJ, BLOY C, CONNOR J, CARTRON JP.

Involvement of Rh blood group polypeptides in the maintenance of aminophospholipid asymmetry.

Biochem. 1990, 29, 10303-10306.

SEIDMAN AD, FORNIER MN, ESTEVA FJ, TAN L, KAPTAIN S, BACH A.

Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification.

J. Clin. Oncol. 2001, 19, 2587-2595.

SHAPIRO RE, SPECHT CD, COLLINS BE, WOODS AS, COTTER RJ, SCHNAAR RL

Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand.

J. Biol. Chem. 1997, 48, 30380-30386.

SHEN S.

Patient-specific dosimetry of pretargeted radioimmunotherapy using CC49 fusion protein in patients with gastrointestinal malignancies.

J. Nucl. Med. 2005, 46, 642-651.

SHRESTA S, PHAM CT, THOMAS DA, GRAUBERT TA, LEY TJ.

How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?

Curr. Opin. Immunol. 1998, 10, 581-587.

SIENA S, DI NICOLA M, BREGNI M.

Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy.

Exp. Hematol. 1995, 23, 1463-1471.

SIMONSEN O

The fall-off in serum concentration of tetanus antitoxin after primary and booster vaccination.

Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. 1986, 94, 77-82.

SINGLETON BK, GREEN CA, AVENT ND, MARTIN PG, SMART E, DAKA A.  
The presence of an RhD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nosense mutation in africans with the RhD-negative blood group phenotype.  
Blood, 2000, 95, 12-18.

SMITH SO, BORMANN BJ.  
Determination of helix-helix interactions in membranes by rotational resonance NMR.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995, 92, 488-491.

Société Canadienne de Gynécologie-Obstétrique.  
Prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle Rh.  
J. Obstet. Gynaecol. Can. 2003, 25, 716-719.

SPELLERBERG MB, ZHU D, THOMPSETT A, STEVENSON FK.  
DNA vaccines against lymphoma. Promotion of anti-idiotypic antibody responses induced by single chain Fv genes by fusion to tetanus toxin fragment C.  
J. Immunol. 1997, 159, 1885-1892.

SPITZER D, MITCHELL LM, ATKINSON JP, HOURCADE DE.  
Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly.  
J. Immunol. 2007, 179, 2600-2608.

STEINSSON K, ERLENDSSON K, VALDIMARSSON H.  
Infusion treatment of a patient with C2 deficiency and systemic lupus erythematosus: clinical experience over forty-five months.  
Arthritis Rheum. 1989, 32, 906-913.

STIJLEMANS B, CONRATH K, CORTEZ-RETAMOZO V, SENTER PD.  
Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single-domain antibodies: African trypanosomes as paradigm.  
J. Biol. Chem. 2004, 279, 1256-161.

STONE E, HIRAMA T, TANHA J, TONG-SEVIN H, McKENZIE R, ZHANG J.  
The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules.  
J. Immunol. Meth. 2007, 318, 88-94.

STOVER CK, DE LA CRUZ VF, FUERST TR, BURLEIN JE, BENNETT LT  
New use of BCG for recombinant vaccines.  
Nature, 1991, 351, 456-460.

SULAKVELIDZE I, EVANS S, SWITZER I, GREENBAUM J, DOLOVICH J.  
Urticaria from allergy to purified human anti-rh antibody preparation.  
Allergy, 1995, 50, 981-983.

**-T-**

TABRIZI MA, ROSKOS LK.  
Preclinical and clinical safety of monoclonal antibodies.  
Drug Disc. Today, article en presse, 2007.

- THOMPSON JA, GRUNERT F, ZIMMERMANN W.  
Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives.  
J. Clin. Lab. Anal. 1991, 5, 344-366.
- THOMPSON J, SEITZ M, CHASTRE E, DITTER M, ALDRIAN C, GESPACH C.  
Down-regulation of carcinoembryonic antigen family member 2 expression is an early event  
in colorectal tumorigenesis.  
Cancer res. 1997, 57, 1776-1784.
- THOMPSON J, SEITZ M, CHASTRE E, DITTER M, ALDRIAN C, GESPACH C.  
Down-regulation of carcinoembryonic antigen family member 2 expression is an early event  
in colorectal tumorigenesis.  
Cancer Res. 1997, 57, 1776-1784.
- THORNTON AM, SHEVACH EM.  
CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by  
inhibiting interleukin 2 production.  
J. Exp. Med. 1998, 188, 287-296.
- THORNTON JG, PAGE C, FOOTE G, ARTHUR GR, TOVEY LA, SCOTT JS.  
Efficacy and long term effects of antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin.  
BMJ, 1989, 298, 1671-1673.
- TOMITA M, FURTHMAYR H, MARCHESI VT.  
Primary structure of human erythrocyte glycophorin A. Isolation and characterization of  
peptides and complete amino acid sequence.  
Biochem. 1978, 17, 4756-4770.
- TOMITA A, RADIKE EL, PARKER CJ.  
Isolation of erythrocyte membrane inhibitor of reactive lysis type II.  
J. Immunol. 1993, 151, 3308-3323.
- TOVEY LA, TOWNLEY A, STEVENSON BJ, TAVERNER J.  
The Yorkshire antenatal anti-D immunoglobulin trial in primigravidae.  
Lancet, 1983, 2, 244-246.
- TROLLE B.  
Prenatal Rh-immune prophylaxis with 300 micrograms immune globulin anti-D in the 28th  
week of pregnancy.  
Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 1989, 68, 45-47.
- TROUW LA, NILSSON SC, GONCALVES I, LANDBERG G, BLOM AM  
C4b-binding protein binds to necrotic cells and DNA, limiting DNA release and inhibiting  
complement activation  
J. Exp. Med. 2005, 201, 1937-1948
- TSAI JF, CHANG WY, JENG JE, HO MS, LIN ZY, TSAI JH.  
Effects of hepatitis C and B viruses infection on the development of hepatocellular carcinoma.  
J. Med. Virol. 1994, 44, 92-95.

TSUDA H, MATSUMOTOM, SUTOH Y, HIDAKA A, IMANAKA M, MIYAZAKI A.  
Massive fetomaternal hemorrhage.  
Int. J. Gynecol. Obstet. 1995, 50, 47-49.

## -U-

UMLAND TC, WINGERT LM, SWAMINATHAN S, SAX M  
Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin.  
Nat. Struct. Biol. 1997, 10, 788-792.

URBANIAK SJ.  
The scientific basis of antenatal prophylaxis.  
Br. J. Obstet. Gynaecol. 1998, 105 (Suppl 18), 11-18.

## -V-

VAN DEN EYNDE BJ, BOON T.  
Tumor antigens recognized by T lymphocytes.  
Int. J. Clin. Lab. Res. 1997, 27, 81-86.

VAN DER LINDEN RHJ, FRENKEN L, DE GEUS B, HARMSSEN MM, STOK W.  
Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies.  
Biochem. Biophys. Acta. 1999, 1431, 37-46.

VERMA R, BOLETI E, GEORGE AJ.  
Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems.  
J. Immunol. Methods. 1998, 216, 165-181.

VIE H, GAUTHIER T, BREATHNACH R, BONNEVILLE M, JACQUES Y.  
Human interleukin-2-IgM heavy chain-fusion proteins are cytotoxic for cells expressing the IL-2 receptor.  
Trans. Proc. 1993, 25, 741-742.

VILLOUTREIX BO, BLOM AM, WEBB J, DAHLBACK B  
The complement regulator C4b-binding protein analysed by molecular modeling, bioinformatics and computer-aided experimental design  
Immunopharmacology, 1999, 42, 121-134

VILLOUTREIX BO, HARDIG Y, WALLQVIST A, COVELL DG, GARCIA DE FRUTOS P, DAHLBACK B  
Structural investigation of C4b-binding protein by molecular modeling: localization of putative binding sites.  
Proteins: structure, function, and genetics, 1998, 31, 391-405

VOGEL CL, COBLEIGH MA, TRIPATHY D, GUTHEIL JC, FEHRENBACHER L.  
Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer.  
J. Clin. Oncol. 2002, 20, 719-726.

**-W-**

WITTEL UA.

The in vivo characteristics of genetically engineered divalent and tetravalent single-chain antibody constructs.

Nucl. Med. Biol. 2005, 32, 157-164.

WORN A, PLUCKTHUN A.

Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments.

J. Mol. Biol. 2001, 305, 989-1010.

WAGNER FF, FROHMAJER A, FLEGER WA.

RHD. Positive haplotypes in D negative Europeans.

BMC Genet. 2001, 2, 10.

WALKER FJ

Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S

J. Biol. Chem. 1980, 255, 5521-5524.

WALKER FJ, CHAVIN SI, FAY PJ.

Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S.

Arch. Biochem. Biophys. 1987, 252, 322-328

WEBER J.

Tumor vaccine.

Medscape. Oncol. 2000, 3, 1-6.

WEINSTEIN IB.

Cancer prevention: recent progress and future opportunities.

Cancer Res. 1991, 51(18 Suppl), 5080s-5085s.

WEIS JH, MORTON CC, BRUNS GA, WEIS JJ, WONG WW, FEARON DT

A complement receptor locus: genes coding C3b/C4b receptor and C3d/Epstein-Barr virus receptor map to 1q32.

J. Immunol. 1987, 138, 312.

WESTEIN E, DENIS CV, BOUMA BN, LENTING PJ.

The alpha -chains of C4b-binding protein mediate complex formation with low density lipoprotein receptor-related protein.

J. Biol. Chem. 2002, 277, 2511-2516.

WHITESIDE TL.

Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy.

Cancer Immunol. Immunother. 1999, 48, 346-352.

WINZLER RJ.

In red cell membranes structure and function.

FA Jamieson and PJ Greenwalt ed., p. 157, Philadelphia, Lippincot, 1969.

WITZIG TE, GORDON LI, CABANNILAS F, CZUCZMAN MS, JOYCE R.

Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma.

J. Clin. Oncol. 2002, 20, 2453-2463.

WOOSTER DG, MARUVADA R, BLOM AM, NEMANI VP

Logarithmic phase Escherichia coli K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4bp-mediated C3b and C4b degradation.

Immunol. 2006, 117, 482-493.

**-X-**

XIANG R, SILLETTI S, LODE HN, DOLMAN CS, RUCHLMANN JM, REISFELD R.

Protective immunity against human carcinoembryonic antigen (CEA) induced by an oral DNA vaccine in CEA-transgenic mice.

Clin. Cancer, Res. 2001, 7, 856s-864s.

**-Z-**

ZAFIR-LAVIE I, MICHAELI Y, REITER Y.

Novel antibodies as cancer agents.

Oncogene, 2007, 26, 3714-3733.

ZBAR AP.

The immunology of colorectal cancer.

Surg. Oncol. 2004, 13, 45-53.

ZHANG J (A), LI Q, NGUYEN TD, TREMBLAY TL, KELLY J, ROGER MACKENZIE C.

A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents.

J. Mol. Biol. 2004, 341, 161-169.

ZHANG J (B), TANHA J, HIRAMA T, TO R, STONE E, BRISSON JR, MCKENZIE CR.

Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents.

J. Mol. Biol. 2004, 335, 49-56.

ZHOU H, LUO Y, MIZUTANI M, MIZUTANI N, REISFELD RA, XIANG R.

T cell-mediated suppression of angiogenesis results in tumor protective immunity.

Blood, 2005, 106, 2026-2032.

ZHU MZ, MARSHALL J, COLE D.

Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine.

Clin. Cancer. Res. 2000, 6, 24-33.

ZICCARDI RJ, DAHLBACK B, MULLER-EBERHARD HJ

Characterization of the interaction of human C4b-binding protein with physiological ligands.

J. Biol. Chem. 1984, 259, 13674-13679

ZIPURSKY A.

Rh hemolytic disease of the newborn. The disease eradicated by immunology.

Clin. Obstet. Gynecol. 1977, 20, 759-772.

ZIPURSKY A, ISRAELS LG.

The pathogenesis and prevention of Rh immunization.

Can. Med. Assoc. J. 1967, 97, 1245-1257.

Zur Hausen H.

Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.

Nat. Rev. Cancer. 2002, 5, 342-450.

# **PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES**

## Conférences

International conference on Rh protein superfamily, Institut national de la transfusion sanguine, Paris – May 4-5, 2006.

M. Tonye Libyh, **W. Mahmoud**, A. Gimenez, N. Godin, B. Donvito, A. Kisserli, V. Duret, B. Réveil and J.H.M. Cohen. A Bifunctional anti-rhesus D/Tetanus Toxoid (TT) antigen recombinant multimer for RhD erythrocytes (E) destruction at aim of Rhesus iso-immunization.

Transfusion Clinique et Biologique, 2006, 13, 1-2, 171.

Xth European meeting on complement in human disease, September 9-13, 2005, Heidelberg, Germany.

Donvito B, Kisserli A, Gimenez A, Godin N, **Mahmoud W**, Tonye Libyh M, Vuret V, Réveil B, Tabary T and Cohen J.H.M.

Evolution of the SI(a) region of Complement Receptor type 1 (CR1) in Primates from old and new worlds.

Molecular Immunology, 2006, 43, 147.

Xth European meeting on complement in human disease, September 9-13, 2005, Heidelberg, Germany.

Kisserli A, Donvito B, Tonye Libyh M, Gimenez A, Godin N, **Mahmoud W**, Vuret V, Vittier M, Réveil B, Tabary T and Cohen J.H.M.

Activity of CR1 and CR1-like (CR1L) gene promoter regions in Human and Macaque (*Macaca mulatta*).

Molecular Immunology, 2006, 43, 159.

XIth European meeting on complement in human disease, September 8-11, 2007, Cardiff, UK.

A. Gimenez Maitre, **W. Mahmoud**, N. Godin, B. Donvito, M. Tonye libyh, A. Kisserli, V. Duret, S. Yaiche, B. Réveil, M. Vittier, X. Dervillez, Th. Tabary and J.H.M. COHEN. Vectoring antibody mediated anti-Tetanus Toxoid immune response using bifunctional heteromultimeric molecules: low efficiency of autologous Complement for lysis of coated targets.

Molecular Immunology, 2007, 44, 16, 3946.

## Brevet

**European Patent N° 05292486.7-**, on 13 of January 2006. Protein constructs designed for targeting and lysis of cells. Université de Reims Champagne Ardenne.

Inventors : Cohen JHM, **Mahmoud W**, Tonye Libyh M, Godin N, Gimenez A, Tabary T, Donvito B.

### **TARGETING AND LYSIS OF CELLS BY THE MEAN OF COMPLEMENT OR ADCC USING HETEROMULTIMERIC RECOMBINANT PROTEINS VECTORING AN ANTI TETANOS TOXOID VACCINATION ANTIBODY RESPONSE TOWARDS A SPECIFIC TARGET**

#### **ABSTRACT**

The cell lysis mediated by the immune response deviation approach is based on the use of cells targeting ligands or antibodies that are linked to a vaccine or natural antigen. Cells lysis efficacy depends on the formation of complexes with target cells and subsequent activation of downstream biologic effector mechanisms such as complement or Antibody Dependant Cell Cytotoxicity (ADCC) that result in elimination of the target. Here, we describe two models of heterofunctional molecules that bind to cells and induce in vitro the complement-dependant cells lysis. For that purpose, a multimerizing system based on the properties of the C-terminal part of the C4 Binding Protein (C4BP) was used. The Tetanus Toxin Fragment C (TTFgC) is the C-terminal portion of the heavy chain of Tetanus Toxin (TT). TTFgC is a known immunogen protective against tetanus, which was used for cell-lysis. The first model was an erythrocytes (E) targeting and lysis. Glycophorin A (GPA) is an abundant glycoprotein on the human E membrane surface. An anti-GPA Single-Chain Fv (scFv) which derived from a high affinity anti-GPA monoclonal antibody was produced. A TTFgC-C4BP $\alpha$  / Anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  heteromultimeric molecule was produced in eukaryotic and insect expression systems. In vitro this heteromultimeric protein was able to induce a E complement-dependant lysis. A TTFgC-C4BP $\alpha$  / Anti-GPA scFv-C4BP $\beta$  heteromultimeric molecule was also produced. In vitro this heteromultimeric protein was able to bind at the E surface. The second model was a human colon carcinoma cells targeting and lysis. These cells expressed the Carcino-Embryonic Antigen (CEA) at their surface. An Anti-Variable Heavy single chain of llama-C4BP $\alpha$  (anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$ ) was associated with the TTFgC-C4BP $\alpha$  molecule. This heteromultimeric molecule allowed the redirection of existing TT vaccine induced immuno-response towards human colon carcinoma cells tumor cells by targeting and destruction of them.

These data open the way for future use of heteromultimeric forms of soluble recombinant TTFgC as an effective targeting cell factor for cancer therapy, Rhesus iso immunization prevention, immuno modulation, or endocrine disturbance therapy.

## INTRODUCTION

The cell lysis mediated by the immune response deviation approach is based on the use of a molecule which combined cells targeting ligands or antibodies with a vaccine or natural antigen. Cells lysis efficacy depends on the formation of complexes with target cells and subsequent activation of downstream biologic effector mechanisms such as complement or Antibody Dependant Cell Cytotoxicity (ADCC) that result in the elimination of the target. The activation of effector mechanisms depends upon the structure the molecule used. Here, we describe two models of heterofunctional molecules that bind to cells and induce *in vitro* the complement-dependant cells lysis. Tetanus Toxin (TT) is a potent neurotoxin of molecular weight 150 KDa produced by the anaerobic bacterium *Clostridium tetani*. It consists of two polypeptide chains connected through an interchain disulfide bound. The larger fragment or heavy chain (100 KDa) contains the toxin's binding and translocation domain. The smaller polypeptide or light chain (50 KDa) is a zinc-dependant protease which cleaves synaptobrevin 2, blocking exocytosis of inhibitory transmitters. The Tetanus Toxin Fragment C (TTFgC) which is the 50 KDa C-terminal portion of the heavy chain, retains the neuronal and protein-binding activity and the uptake properties of the holotoxin without the toxic activity. TTFgC has the advantage of being non-toxic and virtually devoid of any action on the nerve processes in which they are transported. TTFgC is a known immunogen protective against tetanus, which was used for cell-lysis.

Glycophorin A (GPA) is an abundant glycoprotein on the human E membrane surface ( $0,3 \cdot 10^6$  to  $1,2 \cdot 10^6$  site / E). A recombinant anti-GPA scFv (30 kDa) was derived from a monoclonal IgG2b antibody (R18) which has a high affinity for the glycophorin A.

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a tumor marker which can be present on the membrane cells surface of various cancer such as pancreatic, gastric, colonic, ovarian and breast carcinoma. A recombinant Variable Heavy single chain of llama anti-CEA (anti-CEA VHH, 13 kDa) was obtained from D. Baty.

Multimerizations of TTFgC with anti-GPA scFv or anti-CEA VHH were provided by the multimerizing potential of the complement binding protein (C4BP). The C4BP molecule is found in normal human plasma. It has a spider-like structure made of seven  $\alpha$ -chains and one  $\beta$ -chain but minor forms made from only seven  $\alpha$ -chains or

five  $\alpha/1$   $\beta$ -chain molecules have also been described. The basic repetitive structure of both chains is termed short consensus repeat (SCR). Each SCR of about 60 amino acids includes two intrachain disulfide bridges. The C-terminal part of the C4BP lacks biological function and is responsible for the polymerization of the molecule in the cytoplasm of C4BP producing cells. The C-terminal part of the  $\alpha$ -chain of C4BP was chosen to set up homo and hetero multimers, due to these properties as well as to the probable nonimmunogenicity of a normal human plasma protein.

cDNA containing the C-terminal part of the C4BP $\alpha$  coding sequence was fused with the sequence coding for the protein of interest (TTFgC, anti-GPA scFv or anti-CEA) and C4BP $\beta$  coding sequence was fused with the anti-GPA scFv sequence coding and then transfected in eukaryotic or insect cells as a single-phase construct for *in vitro* protein expression. The chimera proteins spontaneously multimerize in the cytoplasm of transfected cells that secrete covalently linked multimeres. Cotransfection of cells by two different vectors containing sequences coding for two distinct multimeric molecules lead to the production of a heteromultimeric protein with valences from both molecules covalently linked together by disulfide bridges.

In a first model, a TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  heteromultimeric molecule was produced. In vitro this heteromultimeric protein was able to bind to the E surface and to induce a E complement-dependant lysis. A TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\beta$  heteromultimeric molecule was also produced. In vitro this heteromultimeric protein was able to bind to the E surface. In a second model TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA-C4BP $\alpha$  molecule was also produced. This heteromultimeric molecule allowed the redirection of existing TT vaccine induced immuno-response towards human colon carcinoma cells tumor cells by targeting and destruction of them.

## MATERIALS AND METHODS

### ***A. Cloning of anti-GPA heavy and light chain variable region coding sequences and assembly into an scFv***

The Single-chain Fv (scFv) was constructed according to the method described by Marks et al. Briefly, RNA was extracted from mouse hybridoma secreting the monoclonal anti-glycophorin antibody R18 (kindly provided by J.P CARTRON, Institut National de Transfusion Sanguine, Paris, France). cDNA was generated using the Mouse scFv Module kit (Amersham Pharmacia, Orsay, France), the  $V_H$  and  $V_L$  genes were amplified by PCR using primers specific for the variable region of each chain and, finally, assembled into a single gene using a linker DNA fragment which maintains the correct reading frame. The assembly reaction ultimately produced the scFv gene where the  $V_H$  region was linked to the  $V_L$  region through a sequence encoding a (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> peptide.

### ***B. DNA constructions and 293T cell transfections***

#### ***Cloning of the TTFgC-C4BP $\alpha$ construct***

DNA encoding TTFgC was kindly provided by Dr. MUNRO (Unité INSERM U 452, Faculté de Médecine de Nice, France).

PCR amplification of TTFgC DNA was achieved by forward primer: 5'-CGCGAGAGATCTCTGGATTGTTGGGTTGATAAT-3' and reverse primer: 5'-CGCGAGTCCGGAATCATTGTCCATCCTTCATC-3'. Restriction sites *Bgl*III and *Bsp*EI (underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate TTFgC subcloning. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing 500 ng of DNA, 500 ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Roissy, France), then subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 30 s at 42 °C, 2 min at 72°C] using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer). PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

PCR amplification of C4BP $\alpha$  was fulfilled by forward primer:

5'-CGCGAGTCCGGAGGCGGGTGGCTCGACCGGA-3' and reverse primer:  
5'-CGCGAGTTCTAGATCATCAGTGATGGTGATGGTGATGGTGGATTAGTTCT  
TTATC-3' (Eurogentec, Angers, France). Restriction sites *Bsp*EI and *Xba*I  
(underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively  
to facilitate C4BP $\alpha$  subcloning. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing  
500 ng of DNA, 500 ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3),  
50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer,  
Roissy, France), then subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 30 s at  
60°C, 30 s at 72°C] using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer).

The amplified products of 1371 bp for TTFgC and 225 bp for C4BP were purified by  
QIAquick PCR Purification Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany) and ligated in  
pEFIRES-P vector (kindly provided by Dr. X. DERVILLEZ, Institute for Biomedical  
Research Frankfurt, Germany) by T4 DNA ligase (Stratagene, Hwy, USA). The  
recombinant clones were screened on Luria-Bertani agar containing ampicillin 100  
 $\mu$ g/ml. The clones were selected after *Bgl*II and *Xba*I digestion of each plasmid DNA  
obtained by mini-lysate preparation. One clone was sequenced (Genomexpress,  
Meylan, France) to confirm the presence of the TTFgC-C4BP $\alpha$  insert and whether it  
was cloned in frame and was chosen for expression studies.

### ***Cloning of the anti-GPA scFv – C4BP $\alpha$ construct***

The assembled anti-GPA scFv DNA fragment was amplified using forward primer 5'-  
CGCGAGAGATCTCAGGTGAAACTGCAGCAG-3' (Eurogentec, Angers, France) and  
reverse primer 5'-CGCGAGTCCGGACCGTTTTATTTCCAGCTT-3' (Eurogentec,  
Angers, France). The restriction sites *Bgl*II and *Bsp*EI (underlined sequences) were  
inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate anti-GPA scFv  
subcloning. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing 500 ng of DNA, 500  
ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl 1,5 mM  
MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Roissy, France), then  
subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 45 s at 64°C, 1 min at 72°C]  
using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer). PCR products were analyzed by  
electrophoresis on a 2% agarose gel. PCR amplification of C4BP $\alpha$  was done as  
previously described.

The amplified products of 770 bp for anti-GPA scFv and 225 bp for C4BP $\alpha$  were  
purified by QIAquick PCR Purification Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany) and

ligated in pEFIRES-P vector. The ligation product was introduced into *Escherichia coli* and one positive clone was sequenced (Genomexpress, Meylan, France).

### ***Cloning of the Anti-GPA scFv – C4BP $\beta$ construct***

The assembled anti-GPA scFv DNA fragment was amplified using forward primer 5'-CGCGAGAGATCTCAGGTGAAACTGCAGCAG-3' (Eurogentec, Angers, France) and reverse primer 5'-CGCGAGGCGGCCCGCCCGTTTTATTTCCAGCTTG-3' (Eurogentec, Angers, France). The restriction sites *Bgl*II and *Not*I (underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate Anti-GPA scFv subcloning. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing 500 ng of DNA, 500 ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Roissy, France), then subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 45 s at 58°C, 1 min at 72°C] using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer).

PCR amplification of C4BP $\beta$  was fulfilled by forward primer:

5'-CGCGAGTCCGGAGGCGGTGGCTCGACCGGA-3' and reverse primer:

5'-CGCGAGTCTAGATCATCAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATTAGTTCTTTATC-3' (Eurogentec, Angers, France). Restriction sites *Not*I and *Xba*I (underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate the C4bp $\beta$  subcloning. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing 500 ng of DNA, 500 ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Roissy, France), then subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 30 s at 61°C, 30 s at 72°C] using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer).

PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

The amplified products of 770 bp for Anti-GPA scFv and 340 bp for C4BP $\beta$  were purified by QIAquick PCR Purification Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany) and ligated in pEFIRES-P vector. The ligation product was introduced into *Escherichia coli* and one positive clone was sequenced (Genomexpress, Meylan, France).

### ***C. Cloning of anti-Rh(D) heavy and light chain variable region coding sequences and assembly into an scFv***

A lymphoblastoid cell line, H2D5D2F5, derived from the peripheral blood lymphocytes of a hyperimmunized donor and producing a human monoclonal IgG1 $\lambda$ ,

specific for erythrocyte Rh(D) Ag, was used as source of monoclonal cells to rescue V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> regions via PCR amplification.

The single-chain Fv (scFv) was constructed according to the method described by Marks et al. Briefly, total RNA was extracted from the lymphoblastoid cell, cDNA was obtained using the first-strand cDNA synthesis Kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and pd(N)6 random primers. Amplification of V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> coding fragments was effected with the specific V gene family primers described by Marks et al.: GTG CAG HuVH1aBACK (5'-CAG GTG CAG CTG TCT GG- 3') and HuJH4-5FOR (5'-ACC TAA AAC GGT GAG CTG GGT CCC- 3') for the heavy chain and HuVL1BACK (5'-CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC- 3') and HuJL2-3FOR (5'-ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC- 3') for the light chain.

The assembly reaction ultimately produced the scFv gene where the V<sub>H</sub> region was linked to the V<sub>L</sub> region through a sequence encoding a (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> peptide.

### ***Cloning of the anti-Rh(D) – C4BP $\alpha$ construct***

The assembled anti-Rh(D) scFv DNA fragment was amplified using forward primer 5'-CGCGAGGCGGCCCAGCCGCGCCAGG-3' (Eurogentec, Angers, France) and reverse primer 5'-CGCGAGTCCGGAACCTAGGACGGTCAGCTT-3' (Eurogentec, Angers, France). The restriction sites *Sfi*I and *Bsp*EI (underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate anti-Rh(D) scFv subcloning. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing 500 ng of DNA, 500 ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Roissy, France), then subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C] using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin -Elmer). PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel. PCR amplification of C4BP $\alpha$  was done as previously described.

The amplified products of 780 bp for anti-Rh(D) scFv and 225 bp for C4BP $\alpha$  were purified by QIAquick PCR Purification Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany) and ligated in pEFIRES-P vector. The ligation product was introduced into *Escherichia coli* and one positive clone was sequenced (Genomexpress, Meylan, France).

### ***Cloning of the Anti-Rh(D) scFv – C4BP $\beta$ construct***

The assembled anti-Rh(D) scFv DNA fragment was amplified as previously described.

PCR amplification of C4BP $\beta$  was fulfilled by forward primer:

5'- CGCGAGGCGGCCGCATCCGGAGACTGTGACCCTCCT-3' and reverse primer:

5'- CGCGAGTCTAGATCATCAGTGATGGTGGTGGATGGATCAACAATTTTGCC

TTCAA -3' (Eurogentec, Angers, France). Restriction sites *NotI* and *XbaI* (underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate the C4bp $\beta$  subcloning. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing 500 ng of DNA, 500 ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Roissy, France), then subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C] using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer).

PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

The amplified products of 780 bp for Anti-Rh(D) scFv and 225 bp for C4BP $\beta$  were purified by QIAquick PCR Purification Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany) and ligated in pEFIRES-P vector. The ligation product was introduced into *Escherichia coli* and one positive clone was sequenced (Genomexpress, Meylan, France).

### ***Cloning of the anti-CEA VHH – C4BP $\alpha$ construct***

DNA of anti-CEA VHH was kindly provided by Pr. D. Baty (CNRS, UPR9027, Laboratoire des Systèmes Macromoléculaires, Marseille, France).

The VHH DNA fragment was amplified using forward primer 5'- CGCGAGAGATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG-3' (Eurogentec, Angers, France) and reverse primer 5'-CGCGAGTCCGGATGGAGGAGACAGTGACCTG-3' (Eurogentec, Angers, France). DNA of anti-CEA VHH was used for PCR amplification. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing 500 ng of DNA, 500 ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Roissy, France), then subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 45 s at 64°C, 1 min at 72°C] using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer). PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

The restriction sites *BglII* and *BspEI* (underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate anti-CEA VHH insert in

pEFIRES-P vector. Conditions for PCR amplification of C4BP $\alpha$  were previously described. The amplified products of 360 bp for anti-CEA VHH and 225 bp for C4BP $\alpha$  were by QIAquick PCR Purification Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany) and ligated in pEFIRES-P vector. The ligation product was introduced into *Escherichia coli* and one positive clone was sequenced (Genomexpress, Meylan, France).

### ***293T cell culture and transfection***

Human embryonic kidney cells, 293T (ATCC CRL-11268) were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle Medium with glucose 4500 mg/l, L-glutamine 580 mg/l and sodium pyruvate 110 mg/l (Gibco, Grand Island, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and penicillin/streptomycin/fungizone (1000 U/ml; 1000  $\mu$ g/ml; 2.5  $\mu$ g/ml). Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

Three million and half cells were transfected in a 25 cm<sup>2</sup> flask with 10  $\mu$ g of DNA by 20  $\mu$ l of lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA). Transfected cells were plated in the same medium supplemented with 20  $\mu$ g/ml puromycin (Sigma, St Louis, USA) to select resistant clones.

Homomultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$ , anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  or anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  and Heteromultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  or TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  secreting clones were screened after limiting dilution by western blotting under reducing conditions.

## ***D. DNA constructions for SF9 cell transfections and infections***

### ***Cloning of the anti-GPA scFv – C4BP $\alpha$ and TTFgC-C4BP $\alpha$ constructs***

cDNA of anti-GPA-scFv was amplified by PCR using forward primer 5'-CGCGAGCCCGGGGCAGGTGAACTGCAGCAGTCT-3' (Eurogentec, Angers, France) and reverse primer 5'-CGCGAGGCGGCCGCCCGTTTTATTTCAGCTTGG T-3' (Eurogentec, Angers, France). The restriction sites *Xma*I and *Not*I (underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate anti-GPA scFv subcloning.

PCR amplification of C4BP was fulfilled by forward primer: 5'-CGCGAGGCGGCCGCATCCGGAGGCGGTGGCTCG-3' (Eurogentec, Angers, France) and reverse primer: 5'-CGCGAGAGATCTTATTACAACAATTTTGCCTTC-3' (Eurogentec, Angers, France). Restriction sites *NotI* and *BglII* (underlined sequences) were inserted into forward and reverse primers respectively to facilitate C4BP $\alpha$  subcloning. A 100  $\mu$ l reaction mixture was prepared, containing 500 ng of DNA, 500 ng of 3' and 5' primers, 16 nM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Roissy, France), then subjected to 30 cycles of amplification [30 s at 94°C, 30 s at °C, 30 s at 72°C] using a GenAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer).

The amplified cDNA of C4BP $\alpha$  product was purified and ligated in pAcGP67C baculovirus transfer vector (PharMingen, San Diego, USA).

The TTFgC-C4BP $\alpha$  DNA was amplified using forward primer 5'-CGCGAGCCCCGGGGCTGGATTGTTGGGTTGATAATG-3' (Eurogentec, Angers, France) with restriction site (underlined sequence) of *XmaI*, and the same reverse primer as anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$ . The amplified product was ligated in pAcGP67C baculovirus transfer vector. The ligation product was introduced into *Escherichia coli* and one clone was sequenced (Genomexpress, Meylan, France) .

### ***SF9 cell culture and infection***

Sf9 cells were cotransfected with viral DNA BaculoGold linearized Baculovirus DNA (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) and *anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$*  or *TTFgC-C4BP $\alpha$*  constructs. All recombinant viruses were isolated from the transfection supernatant through plaque purification and virus stocks were generated by propagating viruses in Sf9 cells and titrated using end-point dilution assays according to the Baculovirus Expression Vector Systems and Insect Cell Culture Techniques Guide (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The presence of the different inserts was verified by PCR.

### ***E. Detection of the homo and heteromultimeric produced molecules***

### ***Western blotting detection***

TTFgC-C4BP $\alpha$ , anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  or anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatants were concentrated 5 fold by using centricon 100 (Millipore, Bedford, USA). Proteins were separated in sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel under reducing conditions and transferred into nitro-cellulose membrane. The presence of the TTFgC -C4BP $\alpha$  (His<sub>6</sub>) monomers and anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  (His<sub>6</sub>) were visualised by using a mouse anti-His<sub>6</sub> peroxydase antibody (Roche, Indianapolis, USA) used at one unit in PBS (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France). Anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  was detected by using a rabbit anti scFv antibody (kindly provided by Dr J.L Teillaud, Unité INSERM U 255, Paris) at 10  $\mu$ g in 0,1% Tween 20 and 1% milk, PBS.

Heteromultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  under reducing conditions as previously described.

### ***Biosynthetic cell labelling and immunoprecipitation***

Cells were cultured for 1 night, in RPMI 1640 without cysteine and methionine (Sigma, St Louis, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, glutamine (2 mM), penicillin/streptomycin/fungizone (1000 U/ml; 1000  $\mu$ g/ml; 2.5  $\mu$ g/ml), and 50  $\mu$ Ci of [<sup>35</sup>S]methionine cysteine (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Twenty five microliters of goat anti-mouse IgG-coated magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway) were washed three times with 0.1% BSA PBS (Sigma, St Louis, USA) then incubated with 1  $\mu$ g of anti-tetanus toxin fragment C (Roche, Indianapolis, USA) for 1 night at 4°C. Beads were washed three times with 0.1% BSA PBS. Transfected cell culture supernatants were incubated with beads for 1 night at 4°C. Washed beads were then resuspended in SDS-PAGE sample buffer for electrophoresis. Reduced and unreduced immunoprecipitates were subjected to electrophoresis in a 5% SDS acrylamide gel.

## ***F. Analysis of the heteromultimeric molecule activity***

### ***Assessment of the fixation of Heteromultimeric proteins***

#### **Fixation of TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$ on E**

##### ***a. Direct hemagglutination***

Sepharose columns were purchased from DiaMed (Paris, France). Twenty microliters of a 2.5% suspension of E were incubated for 45 minutes at 37°C with 50  $\mu$ l of

supernatant of transfected cells. Agglutination was then assessed in columns after a 1,000g centrifugation for 10 minutes at room temperature.

***b. Flow cytometry assay***

TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  binding on E was analysed by flow cytometry. Washed E were incubated for 1 hour at room temperature with transfected cells supernatant then washed three times with 1% BSA PBS. Human serum or 1  $\mu$ g of anti-tetanus toxin fragment C (Roche, Indianapolis, USA) were added for 45 minutes at room temperature. E were washed twice, and then 1 $\mu$ g of goat anti-Human Ig (H+L) biotinylated antibody (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA) or anti-mouse Ig biotinylated antibody (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) were added before 1,5  $\mu$ g of Streptavidin R-Phycoerythrin conjugated antibody (tebu-bio, Burlingame, USA) conjugated detection system.

Flow cytometry of stained cells was performed on a FACStar<sup>Plus</sup> apparatus (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). At least 10,000 events for each sample were collected. Mean fluorescence channel was used to quantify the staining of each sample.

TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  distribution pattern was analyzed using fluorescence microscopy.

Fixation of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  on LS174T cells assessed by flow cytometry.

TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  binding to LS174T cells (ATCC CCL 188) was analysed by flow cytometry. Washed LS174T cells were incubated with transfected cell supernatant for 90 minutes at 4°C then washed three times with 0,5% BSA PBS. 1  $\mu$ g of anti-tetanus toxin fragment C or 3,3  $\mu$ g monoclonal anti-c-myc (mouse IgG1 isotype) (Sigma, Saint Louis, USA) for monomeric c-myc tagged anti-CEA VHH provided by Pr. D. Baty, were added for 45 minutes at room temperature as positive control.

LS174T cells were washed twice, and then anti-mouse Ig biotinylated antibody (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) was added before R-Phycoerythrin conjugated Streptavidin detection system.

## ***G. Analysis of the heteromultimeric molecule activity***

### ***Assessment of the fixation of Heteromultimeric proteins***

#### **Fixation of TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-Rh(D) scFv -C4BP $\alpha$ and TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-Rh(D) scFv -C4BP $\beta$ on E Rh(D)**

##### ***a. Direct hemagglutination***

Sepharose columns were purchased from DiaMed (Paris, France). Twenty microliters of a 2.5% suspension of E Rh(D) were incubated for 1 hour at 37°C with 50  $\mu$ l of 5 fold concentrated supernatant of transfected cells. Agglutination was then assessed in columns after a 1,000g centrifugation for 10 minutes at room temperature.

##### ***b. Flow cytometry assay***

TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv -C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv -C4BP $\beta$  binding on E Rh(D) was analysed by flow cytometry. Washed E Rh(D) were incubated for 1 hour at room temperature with transfected cells supernatant then washed three times with 1% BSA PBS. One  $\mu$ g of anti-tetanus toxin fragment C (Roche, Indianapolis, USA) was added for 45 minutes at 4°C. E Rh(D) were washed twice, and then anti-mouse Ig biotinylated antibody (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) was added before 1,5  $\mu$ g of Streptavidin R-Phycoerythrin conjugated antibody (tebu-bio, Burlingame, USA), then anti-streptavidin biotinylated antibody (Vector Laboratories, USA), and finally 1,5  $\mu$ g of Streptavidin R-Phycoerythrin conjugated antibody.

For anti-Rh(D) scFv -C4BP $\alpha$  and anti-Rh(D) scFv -C4BP $\beta$  binding on E Rh(D), incubation step with transfected cells supernatant was followed by the addition of 5  $\mu$ g of anti-human C4BP biotinylated antibody (Binding Site, Birmingham, UK), then 1,5  $\mu$ g of Streptavidin R-Phycoerythrin conjugated antibody, anti-streptavidin biotinylated antibody, and finally 1,5  $\mu$ g of Streptavidin R-Phycoerythrin conjugated antibody.

Flow cytometry of stained cells was performed on a FACStar<sup>Plus</sup> apparatus (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). At least 10,000 events for each sample were collected. Mean fluorescence channel was used to quantify the staining of each sample.

TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv -C4BP $\alpha$ , TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv -C4BP $\beta$ , anti-Rh(D) scFv -C4BP $\alpha$  and anti-Rh(D) scFv -C4BP $\beta$  distribution pattern was analyzed using fluorescence microscopy

## *Complement (C) fixation tests*

### **Assessment of C activation by TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$ using hemolytic assay**

Fifteen microliters of 2.5% suspension of E were incubated with 200  $\mu$ l of 5 fold concentrated transfected cell supernatant at room temperature for 1 hour in 0.24 M glycine, 3 mM sodium phosphate (pH 6.8), 31 mM NaCl, low ionic strength saline buffer including 0.15 mM Ca<sup>2+</sup>, and 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>.

After 5 minutes of 160g centrifugation at room temperature, supernatant was removed and 100  $\mu$ l of serum of a healthy individual who gave an informed consent for research used, recently vaccinated against tetanus were then added (E were also from the same person). Monoclonal antibody (MoAb) against glycoprotein A (R18) was used as positive control. After 1 hour incubation at 37°C and a quick cooling in an ice-water bath, tubes were centrifuged for 10 minutes at 160g, then the 630-405nm optical density of the supernatants was determined using a microplate reader (SLT, Labinstruments, Vietech, St Bonnet De Mure, France).

### **Assessment of C activation by TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$ using flow cytometry analysis**

Fifteen microliters of 2.5% suspension E (O Rh(D)-negative) was added to 100  $\mu$ l of transfected cell supernatant for 1 hour at room temperature. After centrifugation as previously described, supernatant is removed and 100  $\mu$ l of heat inactivated serum of recently vaccinated person against tetanus were added. Incubation at room temperature for 1 hour was followed by 2 times washing with 1% BSA PBS. Fifty microliters of Human C5-deficient serum, two fold diluted in low ionic strength saline buffer including 0.15 mM Ca<sup>2+</sup> and 0.5 mM Mg<sup>2+</sup> was added, and the mixture was incubated for 1 hour at 37°C. Human C3b deposits were revealed by fluorescein-labeled goat antiserum against human C3b (Immunotech, Marseille, France) and C4d by a biotinylated monoclonal anti-Human C4d (Quidel, San Diego, USA) followed by Streptavidin R-Phycoerythrin conjugated detection system. E were washed twice, stabilized in 0.37% formaldehyde PBS buffer, and then analyzed on a FACStar Plus (Becton Dickinson).

C4d and C3b distribution pattern were analyzed using fluorescence microscopy.

## RESULTS

The results obtained with the Baculovirus expression system were similar to those of the 293T expression system.

### *H. Detection of homo and heteromultimeric recombinant proteins secreted*

The production of homomultimeric and heteromultimeric recombinant proteins was characterized by Western blotting and radioactive labeling.

#### *Homomultimeric molecules*

##### TTFgC-C4BP $\alpha$ protein

TTFgC-C4BP $\alpha$  monomers were identified by using an anti-His immunoblotting detection. GFP-(His)<sub>6</sub> was used as positive control; Its molecular weight was 32 KDa (Fig 1 : lane 3). The apparent molecular weight of TTFgC-C4BP $\alpha$  monomers was assessed from SDS-PAGE under reducing conditions and was found to be 75 KDa (Fig 1 : lane 1).

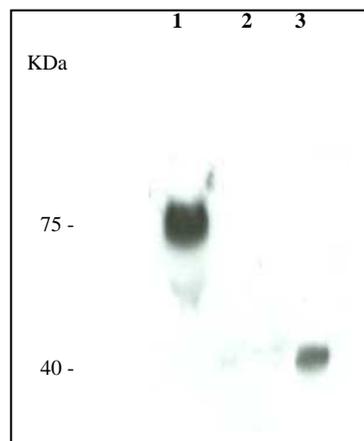


Fig 1. Western blot using anti-(his)<sub>6</sub> peroxydase after a 10% polyacrylamide gel separation under reducing conditions.

Lane 1: TTFgC-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant

Lane 2: Untransfected 293T cell supernatant as negative control

Lane 3: GFP-(His) as Positive control

Multivalent TTFgC recombinant proteins were obtained using C4BP $\alpha$  multimerizing fragments fused at the C-terminal end of the molecule. They were soluble and stable in culture supernatant of the selected clones.

$^{35}\text{S}$  amino-acid labeling experiments showed that two molecular species of more than 500 KDa apparent molecular weight on SDS-PAGE analysis were secreted (Fig 2). This pattern is compatible with a 6 and 7 valence multimers.

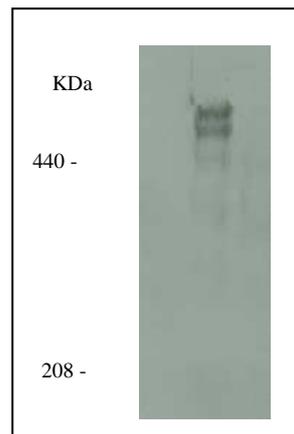


Fig 2. SDS-PAGE analysis of  $^{35}\text{S}$ -labeled TTFgC-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant immunoprecipitated by using an anti-TTFgC antibody, in a 5% polyacrylamide gel under nonreducing conditions.

### Anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$ protein

A single molecular species of anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  protein with an apparent molecular weight more than 210 KDa was detected by SDS-PAGE analysis in native conditions. This multimer was an heptamer (280 KDa) (Fig 3 : lane 3). In reducing conditions, the apparent molecular weight of the monomer was 40 KDa (Fig 3 : lane 2).

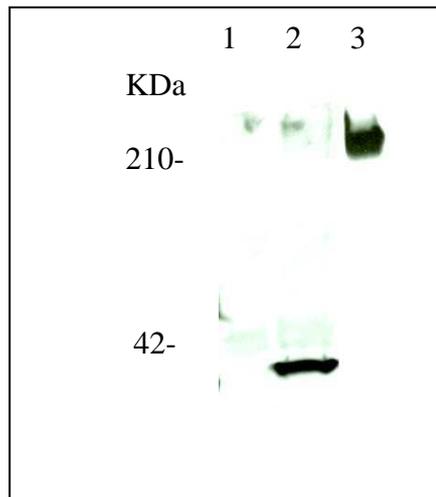


Fig 3. Western blot on 4-15% SDS gel gradient using an anti-scFv for immunodetection.

Lane 1: Untransfected 293T cell supernatant as Negative control

Lane 2: anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant analysed under reducing conditions.

Lane 3: anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant analysed under non reducing conditions

### Anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$ protein

Anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  monomers were identified by using an anti-His immunoblotting detection. The apparent molecular weight was assessed from SDS-PAGE under reducing conditions and was found to be 30 KDa (Fig 4, lane 1).

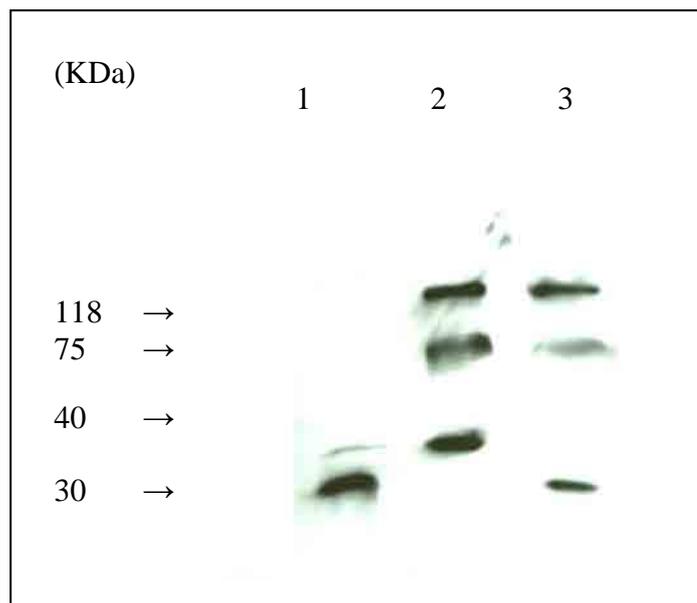


Fig 4. Western blot using anti-(his)<sub>6</sub> peroxydase in a 10% polyacrylamide gel under reducing conditions.

Lane 1: anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant

Lane 2: anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant

Lane 3: anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant

## *Heteromultimeric molecules*

### **TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$ recombinant proteins**

Under reducing conditions, TTFgC-C4BP $\alpha$  and anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  monomers were identified using anti-His immunoblotting detection. Their molecular weights were found to be 75 KDa and 40 KDa respectively (Fig 5).

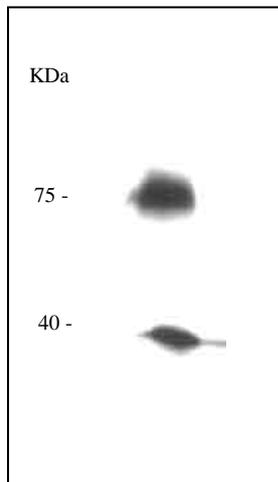


Fig 5. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  recombinant molecules revealed by western blot using anti-(his)<sub>6</sub> peroxydase antibody in a 10% polyacrylamide gel under reducing conditions.

Heteromultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  recombinant protein were detected by radioactive labeling in nonreducing conditions. After five days of exposure several valences of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  with an apparent molecular weight of more than 280 KDa can be visualized (Fig 6, Lane 3a). Two main valences were detected with 2 hours of exposure (Fig 6, Lane 3b). Multivalent TTFgC recombinant proteins were used as positive control (Fig 2 and Fig 6, Lane 1)

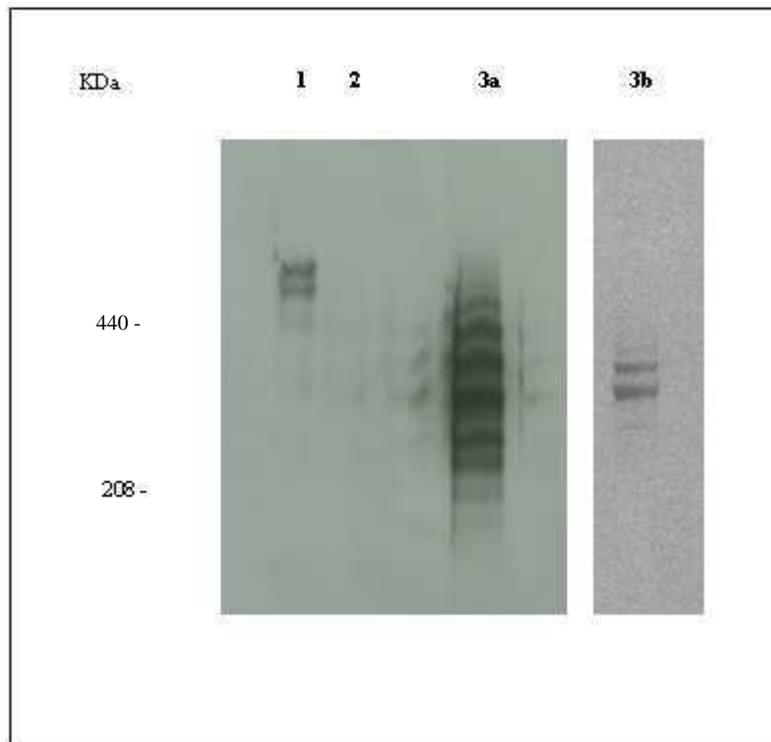


Fig 6. Analysis of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  recombinant molecules. In SDS-PAGE analysis of  $^{35}$ S-labeled supernatant immunoprecipitated using anti-TTFgC, on 5% polyacrylamide gel under nonreducing conditions:

Lane 1: TTFgC-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant multimeric TTFgC.

Lane 2: untransfected 293T cell supernatant.

Lane 3a: anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant (5 days exposure)

Lane 3b: anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant (2 hours exposure)

### **TTFgC -C4BP $\alpha$ / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$ recombinant proteins**

TTFgC-C4BP $\alpha$  and anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  monomers were identified using anti-His immunoblotting detection under reducing conditions; their molecular weights were found to be 75 KDa (Fig 4 lane 2 and 3) and 30 KDa (Fig 4 lane 1) respectively.

Heteromultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  molecules were detected by radioactive labeling in nonreducing conditions and showed three main valences with apparent molecular weight of more than 400 KDa (Fig 7, Lane 3). Multivalent TTFgC recombinant proteins (Fig 7, Lane 1) and heteromultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  recombinant molecules (Fig7, Lane 4) were used as positive control.

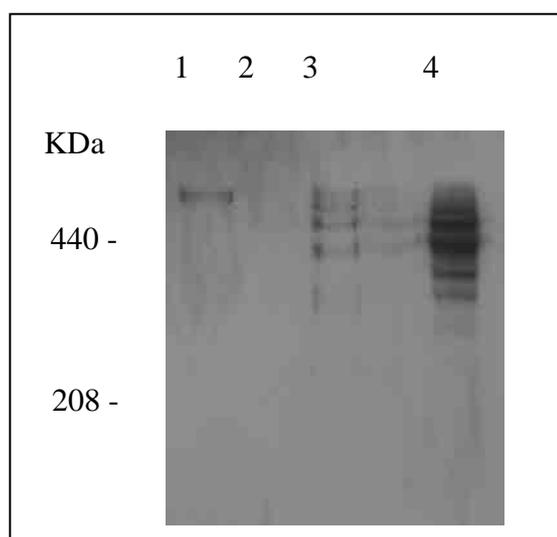


Fig 7. Analysis of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  recombinant molecules. In SDS-PAGE analysis of  $^{35}\text{S}$ -labeled supernatant immunoprecipitated using anti-TTFgC, in a 5% polyacrylamide gel under nonreducing conditions:

Lane 1: TTFgC-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant

Lane 2: Untransfected 293T cell supernatant.

Lane 3: anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant

Lane 4: anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant

## *I. Analysis of heteromultimeric molecule activity*

### *Analysis of the fixation of heteromultimeric molecules to the cell membrane surface*

#### Analysis of the fixation of TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-GPA scFv -C4BP $\alpha$ and TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-GPA scFv -C4BP $\beta$ molecule at the E membrane surface

##### *a. Direct hemagglutination*

anti-GPA ScFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA ScFv-C4BP $\alpha$  directly agglutinated E as R18 natif antibody (Fig 8).

Supernatants are still functional by direct hemagglutination after 6 months at 4°C, this proved stability of these recombinant heteromultimers.

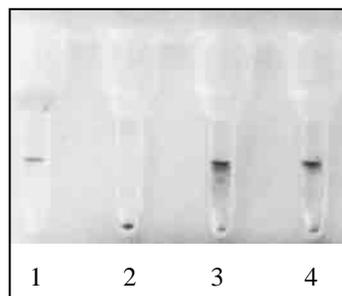


Fig 8. Direct hemagglutination of E. Incubation of E with:

1. R18 antibody (positive control).
2. TTFgC-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant
3. anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant
4. TTFgC-C4BP $\alpha$  and anti-GPA ScFv-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant

anti-Rh(D) ScFv-C4BP $\alpha$ , anti-Rh(D) ScFv-C4BP $\beta$ , TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) ScFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) ScFv-C4BP $\beta$  directly agglutinated erythrocyte Rh(D) (Fig. 9).

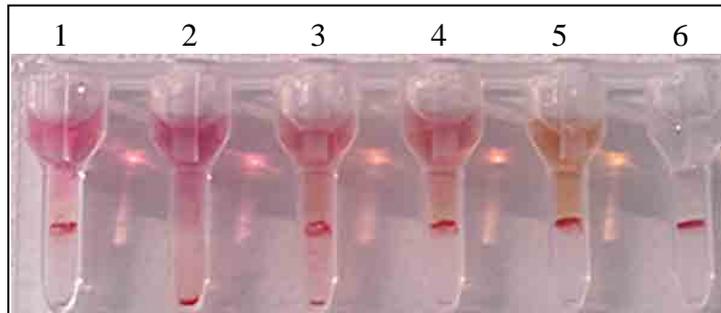


Fig 9. Direct hemagglutination of E Rh(D). Incubation of E Rh(D) with:

1. Anti-Rh(D) ScFv-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant.
2. TTFgC-C4BP $\alpha$  construct transfected 293T cell supernatant.
3. Anti-Rh(D) scFv-C4BP $\beta$  construct transfected 293T cell supernatant.
4. TTFgC-C4BP $\alpha$  and anti-Rh(D) ScFv-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant.
5. TTFgC-C4BP $\alpha$  and anti-Rh(D) ScFv-C4BP $\beta$  constructs transfected 293T cell supernatant.
6. Multimeric anti-Rh(D) ScFv -C4BP $\alpha$  / CR1-C4BP $\alpha$  as a positive control.

## ***b Flow cytometry***

To demonstrate the TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\beta$  specific binding at the E membrane surface quantitative flow cytometry analysis with supernatants of transfected 293T cells were performed.

Multimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  (Fig 10, 6) as well as TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\beta$  molecule (Fig 10, 4 ; Fig 10, 5) were able to bind at the E membrane surface.

Homomultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  and homomultimeric anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  were used as negative controls:

- homomultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  was not able to bind at the E (Fig 10, 1).
- homomultimeric anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  was attached to E but not detected by flow cytometry as not revealed by anti-TTFgC (Fig 10, 2).

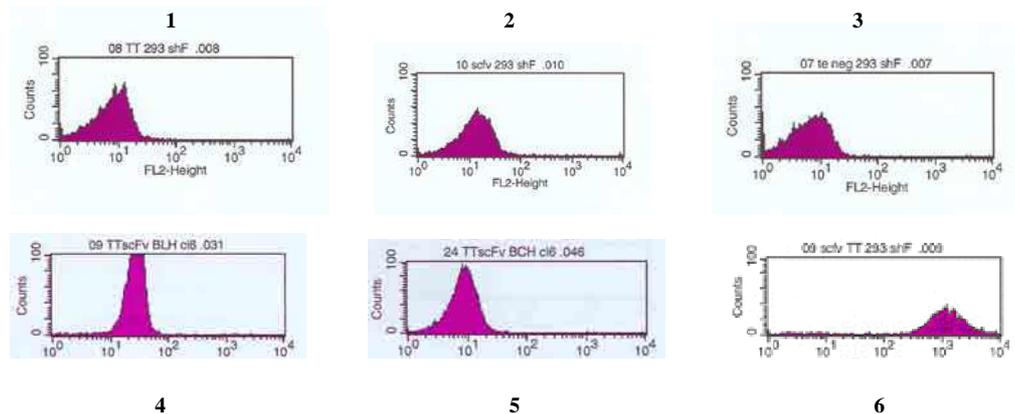


Fig 10. Analysis of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\beta$  binding on E by flow cytometry. E were incubated with :

1. TTFgC-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant.
2. anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant.
3. Non-transfected cell supernatant.
4. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\beta$ L transfected cell supernatant.
5. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\beta$ C transfected cell supernatant.
6. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant.

To demonstrate the TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\beta$  specific binding at the E Rh(D) membrane surface, quantitative flow cytometry analysis with supernatants of transfected 293T cells were performed.

Multimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\alpha$  (Fig 11, 4) and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\beta$  molecule (Fig 11, 5) were able to bind at the E Rh(D) membrane surface.

Homomultimeric anti-Rh(D) scFv-C4BP $\alpha$  (Fig 11, 1) and homomultimeric anti-Rh(D) scFv-C4BP $\beta$  (Fig 11, 2) were used as positive controls.

Homomultimeric anti-GPA scFv-C4BP $\beta$  was used as negative control because not revealed by anti-TTFgC (Fig 11, 3).

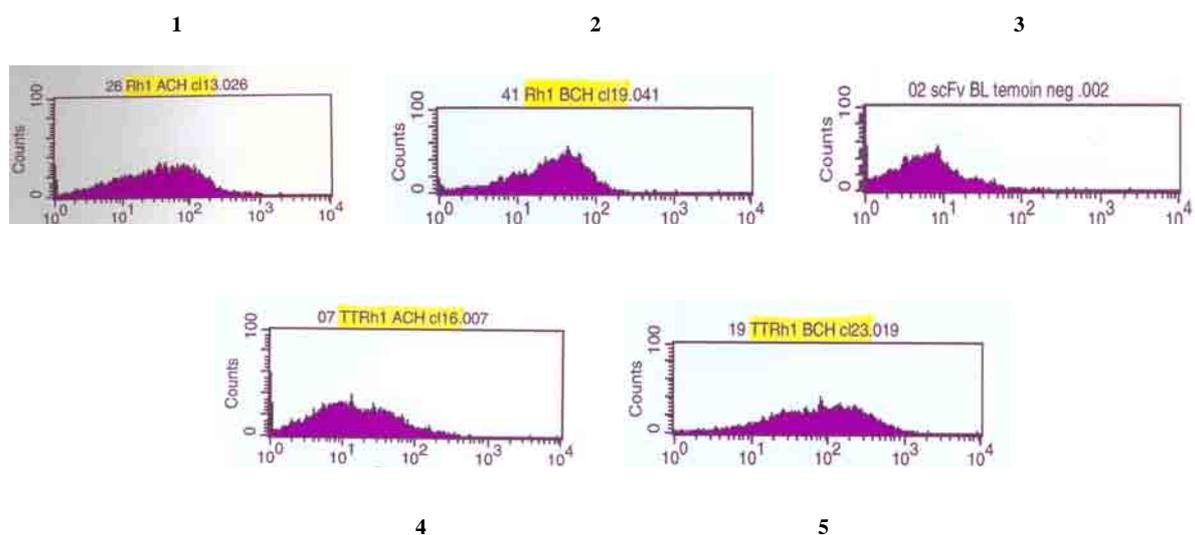


Fig 11. Analysis of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\alpha$  and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\beta$  binding on E Rh(D) by flow cytometry. E Rh(D) were incubated with :

1. Anti-Rh(D) scFv-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant.
2. Anti-Rh(D) scFv-C4BP $\beta$  transfected cell supernatant.
3. Anti-GPA scFv-C4BP $\beta$  transfected cell supernatant.
4. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant.
5. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\beta$  transfected cell supernatant.

*c fluorescence microscopy*

The distribution of heteromultimers to the E membrane surface was analyzed by using fluorescence microscopy and was homogeneous (Fig 12).

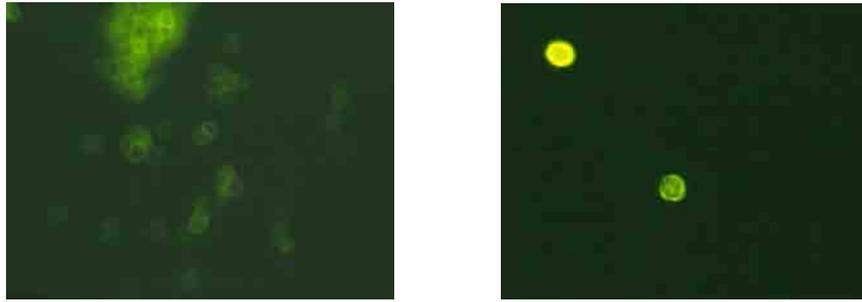


Fig 12. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  distribution pattern was analyzed using fluorescence microscopy.

The distribution of heteromultimers to the E Rh(D) membrane surface was analyzed by using fluorescence microscopy and was homogeneous (Fig 13).

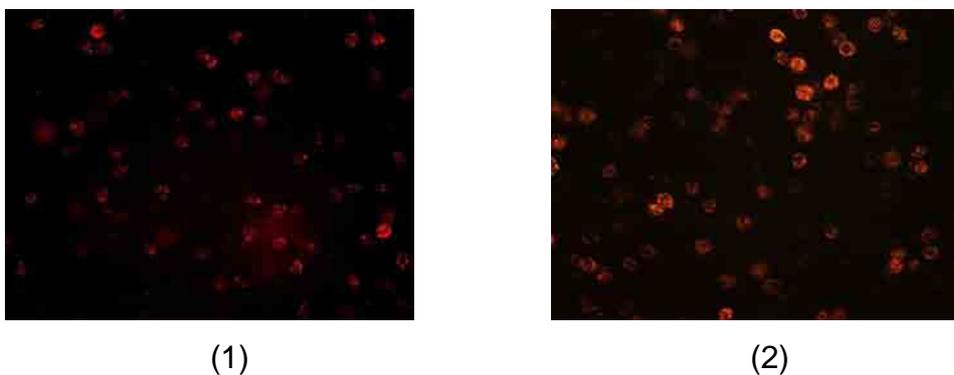


Fig 13. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\alpha$  (13, 1) and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-Rh(D) scFv-C4BP $\beta$  (13, 2) distribution pattern was analyzed using fluorescence microscopy.

## Analysis of TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$ molecule binding at the LS174T cell membrane surface

### *a Flow cytometry*

To demonstrate the TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  specific binding at the LS174T membrane surface; quantitative flow cytometry analysis with supernatants of transfected 293T cells were performed.

Monomeric anti-CEA VHH-c-myc and TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH -C4BP $\alpha$  heteromultimeric molecules were detected at the LS174T membrane surface (Fig 14, 4 and 3). Homomultimeric VHH-C4BP $\alpha$  molecules were attached to the LS174T cells surface but not detected by flow cytometry because not revealed by anti-TTFgC (Fig 14, 2).

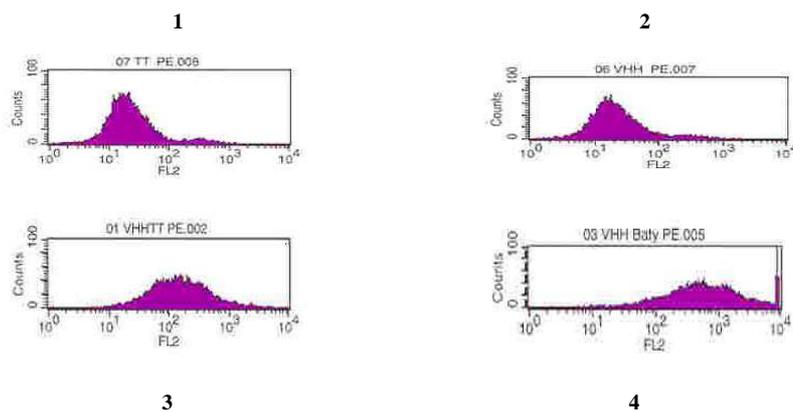


Fig 14. Analysis of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  binding by flow cytometry. LS174T cell were incubated with :

1. TTFgC-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant.
2. Multimeric anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant.
3. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant.
4. Monomeric anti-CEA VHH-c-myc transfected cell supernatant as positive control

*b fluorescence microscopy*

The distribution of heteromultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  to the LS174T membrane surface was analyzed using fluorescence microscopy and was heterogeneous (Fig 15).

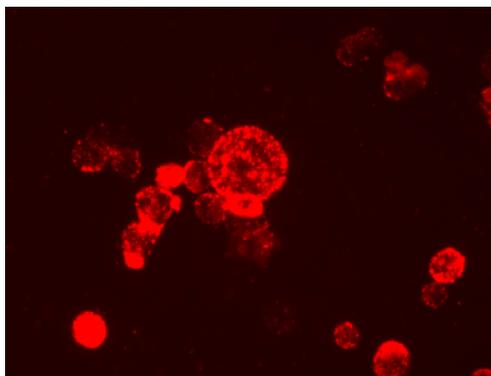


Fig 15. Analysis of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-CEA VHH-C4BP $\alpha$  distribution pattern using fluorescence microscopy.

### ***Analysis of complement activation by TTFgC-C4BP $\alpha$ / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$ molecules***

The ability of heteromultimeric TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  molecules to activate the complement was tested.

E were incubated with a C5-deficient serum in presence of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  constructs transfected 293T cell supernatant. The C5-deficiency of this serum stops the complement cascade and E are not lysed. C4d binding was detected at the E membrane surface by flow cytometry (Fig 16) and fluorescence microscopy as well as C3b (Data not shown)

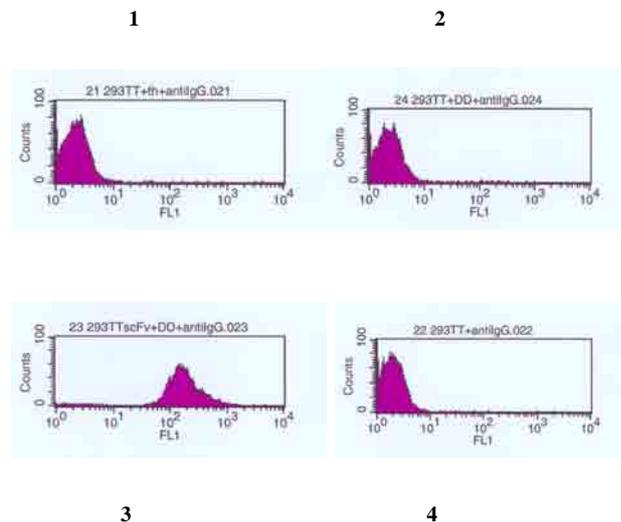


Fig 16. Analysis of cascade complement activation by TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  molecules, revealed by a biotinylated monoclonal anti-human C4d antibody.

E were incubated with :

1. TTFgC-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant and heat inactivated serum containing high level of anti-TTFgC.
2. TTFgC-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant and C5-deficient serum.
3. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  cell supernatant and C5-deficient serum.
4. TTFgC-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant

In a separated experiment; E from an healthy individual, recently vaccinated against tetanus were incubated with his serum, in presence of TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  transfected cell supernatant. Anti-tetanus toxin antibodies present in the serum are able to link to the TTFgC potion of the TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  heteromultimeric molecules attached at the E surface. E has been opsonized and complement activation cascade started. Under these conditions the final membrane attack pathway of complement could be activated and lysed the E. Fig 17 showed that heteromultimeric molecules induce the E lysis at 87% whereas homomultimeric molecules are not able to induce E lysis at all.

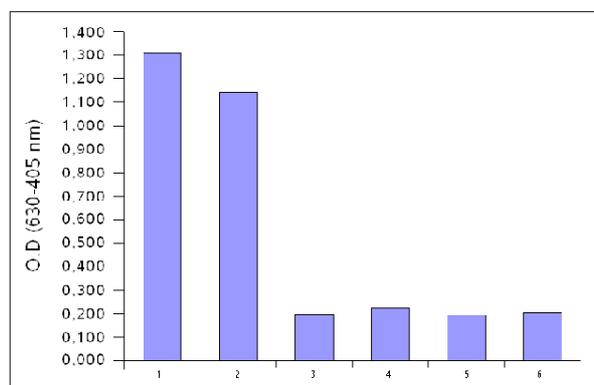


Fig 17. O.D (630-405 nm) corresponds to the absorbance of haemoglobin; which indicates the degree of E lysis.

1. E lysed with repetitive cycles of freezing / defreezing (100% of E lysis).
2. E with TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  supernatant.
3. E with TTFgC-C4BP $\alpha$  supernatant.
4. E with anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  supernatant.
5. E with non-transfected cell supernatant.
6. TTFgC-C4BP $\alpha$  / anti-GPA scFv-C4BP $\alpha$  supernatant, without E.

The minimal value of O.D (~ 0.200) corresponded to the absorbance of the serum.

## **PUBLICATIONS**

**Deux articles sont actuellement en cours de rédaction et seront soumis dans quelques jours :**

### **1- Redirecting Vaccine Immune Response by Using an Heteromultimeric Recombinant Tetanus Toxin Fragment C / Anti-Glycophorin A scFv molecule**

**Wael Mahmoud**, Annelise Gimenez, Nathalie Godin, Aymric Kisserli, Béatrice Donvito, Marcelle Tonye Libyh, Thierry Tabary, Xavier Dervillez, Kamel Ghedira and Jacques Cohen

### **2- Inhibition of the development of tumour cells by deviation of the immune response using anti-CEA / Tetanus toxin C fragment recombinant molecule.**

**Wael Mahmoud**, Nathalie Godin, Annelise Gimenez, , Aymric Kisserli, Béatrice Donvito, Marcelle Tonye Libyh, Thierry Tabary, Xavier Dervillez, Daniel Baty and Jacques Cohen

# **A soluble recombinant multimeric Tetanus Toxin Fragment C / anti-Glycophorin A single-chain Fv molecule for re-directing a pre-existing antibody immune response towards target red blood cell lysis, through Complement activation.**

Dr. Wael Mahmoud<sup>[a]</sup>, Dr. Annelise Gimenez-Maitre<sup>[a]</sup>, Dr. Nathalie Godin<sup>[a]</sup>, Dr. Marcelle Tonye Libyh<sup>[a]</sup>, Dr. Aymric Kisserli<sup>[a]</sup>, Dr. Béatrice Donvito<sup>[a]</sup>, Dr. Valerie Duret<sup>[a]</sup>, Brigitte Réveil<sup>[a]</sup>, Frédérique Philbert<sup>[a]</sup>, Dr. Thierry Tabary<sup>[a]</sup>, Prof. Dr. Kamel Ghedira<sup>[b]</sup>, Dr. Xavier Dervillez<sup>[c]</sup> & Prof. Dr. MD Jacques H.M. Cohen<sup>\*[a]</sup>

[a] Laboratoire d'Immunologie EA3798 - Institut Fédératif de Recherche 53 - Université de Reims Champagne Ardenne - 51100 Reims - France - correspondance author : \* jacques.cohen@univ-reims.fr

[b] Unité de Pharmacognosie / Biologie Moléculaire 99/UR/07-03, Faculté de Pharmacie, Monastir, Tunisie.

[c] Unité Mixte de Recherche 7087 - Biologie et Thérapeutique des Pathologies Immunitaires - Université Pierre et Marie Curie, Paris 06 - 83, Boulevard de l'Hôpital - 75651 Paris cedex 13 - France - Xavier\_dervillez@hotmail.com

The first 3 authors are equal contributors to this work.

## **Abstract**

Immunotherapy against tumor cells often faces the problem of lack of immunogenicity of these undesired cells, escaping thus the recognition by the immune system because of either (i) their lack of specific markers or (ii) a down regulation of the MHC surface proteins. To overcome this lack of recognition by the immune system, we have established a multimeric recombinant bi-specific molecule, susceptible of taking benefit of the pre-existing immune response against tetanus and of redirecting it towards specific target cells. This molecule contains an effector function represented by the Tetanus toxin Fragment C, a non toxic and highly immunogenic fragment from the Tetanus toxin and a target or anchoring function, which is a scFv anti-Glycophorin A (multi-TTFC-scFv anti-GPA). As a preliminary *in vitro* model, we established the proof-of-concept that the multimeric TTFC-scFv anti-GPA recombinant molecule is capable of binding specifically onto erythrocytes, establishing then at their surfaces a platform for binding of anti-tetanus antibody triggering the activation of the Complement system leading not only to opsonizing C3 binding, but also to the end product of Complement activation, the membrane-disrupting pore formation, so-called the membrane attack complex, that leads to erythrocyte lysis. This data provide important outcomes of a new innovative therapeutic tool for immuno-interventions, where one could dramatically enhance the weak immunogenicity of undesired cells by taking advantage of a broadly pre-existing immune-response.

**Keywords :** C4bp, Immunotherapy, Glycoprotein, Protein engineering, Tetanus toxin

## Introduction

Natural immune response is most of the time inefficient to destroy some undesired cells such as tumor cells. Although tumor cells are poorly immunogenic, thus generally escaping the immune surveillance, specific tumor-marker antigens (TMA) such as carcinoembryonic antigens (CEA) can be present at the membrane tumor-cell surface in various cancers such as pancreatic, gastric, colonic, ovarian and breast cancers. These TMA are potential targets for development of new anti-tumor strategies.

Active specific immunotherapy or vaccine therapy against tumor cells aim to increase the antigen-receptor-mediated interactions of the TMA to the antigen-presenting cells (APCs) to enhance the specific adapted immune response to the TMA. This can be achieved by delivering the target TMA expressed under recombinant form to the APC, in particular to the dendritic cells (DC), by targeting certain DC receptors, such as receptors of innate immunity TLR2 or CD14<sup>[1]</sup>. The TMA can be thus captured and routed inside the DC, then digested and exposed onto the DC-surface in the context of MHC class I and II to activate the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector cell clones specific for the tumor.

An alternative innovative strategy consists in taking advantage of pre-existing vaccine-induced or natural immune response by redirecting it towards specific TMA targets, in order to artificially reinforce their immunogenicity. For this purpose, the design of a bi-functional soluble recombinant therapeutic polypeptide, presenting (i) an effector immunogenic moiety and (ii) a targeting moiety that targets tumor cells, can lead to their destruction by creating at their surface a platform of activation for the autologous innate and adaptive immune system. This activation takes place by recruiting natural host antibodies against the effector immunogenic moiety, followed by activation of the complement classical pathway (CP). Then, the formation of the Membrane Attack Complex (MAC) settles and/or by activating the antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC).

The multivalent expression of the effector immunogenic moiety, comprising a scaffold multimerising domain, may dramatically improve its immunogenicity by increasing its local density, making it a “hyperantigen”.

We had previously developed a general purpose biotechnological tool based on the use of the C-terminal ends of the human C4b Binding Protein (C4bp)  $\alpha$ - and/or  $\beta$ -chains (C4bp $\alpha$  or C4bp $\beta$ , respectively), used as scaffold domains allowing the spontaneous expression and association - in eukaryotic system - of soluble recombinant therapeutic proteins under heteromultimeric bi-functional form<sup>[2]</sup>. The C4bp $\alpha$  fragment associated in 3' of a gene allows its spontaneous multimeric expression in eukaryotic cells. In contrast, the C4bp $\beta$  associated to a gene of interest leads to the formation of monomers or dimers.

In the present work, we established an *in vitro* model of re-direction of a pre-existing immune response towards red blood cells (RBCs). We have previously used the C4bp $\alpha$  and/or C4bp $\beta$  domains<sup>[3]</sup> respectively in 2 distinct expression vectors, which are co-transfected, to produce soluble recombinant heteromultimeric bi-functional glycoproteins, bearing (i) an effector moiety and (ii) a target moiety.

As a model antigen for the effector moiety, preferentially a toxin fragment that is immunogenic but non toxic, we have used the recombinant tetanus toxin fragment C (TTFC). The TTFC is the 47 kDa C-terminal portion of the Tetanus toxin-heavy chain, which retains the neuronal protein-binding activity carrying the ganglioside binding domain of the holotoxin, lacks toxic activity and devoid of any action on the nerve processes. TTFC has been shown to be immunogenic in mice and guinea pigs <sup>[4]</sup>. Previous studies demonstrated that intragastric or intranasal administration of TTFC-expressing recombinant (i) *Streptococcus gordonii* <sup>[5]</sup> or (ii) *Lactococcus lactis* <sup>[6]</sup> to mice induced systemic antibody response at levels sufficient to be protective against a lethal challenge with tetanus toxin. Mice immunised with *Bacillus subtilis* spores displaying the TTFC on their surface administered through oral or nasal routes have been shown to induce the production of specific IgG and secretory IgA <sup>[7, 8]</sup>, as well as a cellular immune response <sup>[9, 10]</sup>.

As target moiety, we developed an anti-Glycophorin A (GPA) single chain Fv (scFv), derived from the R18 high affinity anti-GPA monoclonal antibody <sup>[11]</sup>. Glycophorin A is an abundant glycoprotein present at the human RBC-membrane surfaces with a density ranged from  $0,3 \cdot 10^6$  to  $1,2 \cdot 10^6$  GPA / erythrocyte <sup>[12, 13]</sup>.

On the one hand, the gene encoding the TTFC effector moiety was fused in 3' to the cDNA encoding the C4bp C-terminal  $\alpha$ -chain (C4bp $\alpha$ ), and on the other hand, the gene encoding the anti-GPA scFv targeting moiety was fused in 3' to the cDNA encoding (i) the C4bp C-terminal  $\alpha$ -chain (C4bp $\alpha$ ) or (ii) the C4bp C-terminal  $\beta$ -chain (C4bp $\beta$ ). The two constructs were co-transfected into the 293T cells. The soluble recombinant multimeric heteromultimeric bi-functional (i) multi-TTFC-C4bp $\alpha$ /multi-scFv-anti-GPA-C4bp $\alpha$  (TTFC $\alpha$ /scFv-GPA $\alpha$ ) and (ii) multi-TTFC-C4bp $\alpha$ /scFv-anti-GPA-C4bp $\beta$  (TTFC $\alpha$ /scFv-GPA $\beta$ ) molecules were spontaneously multimerised in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi of the transfected cells, then secreted into the supernatants. Both TTFC $\alpha$ /scFv-GPA $\alpha$  and TTFC $\alpha$ /scFv-GPA $\beta$  heteromultimers were shown to specifically bind to the RBC surfaces and to induce the RBC complement-dependent lysis.

These constructs provide the proof of concept and show that it is possible to re-direct pre-existing immune-responses in patients towards undesired target cells, thus providing new biotechnological tools that could be applied to a broad variety of pathologies such as cancers, infectious or autoimmune diseases.

## Experimental section

**The pEF-IRESp-derived plasmid previously established was used as protein-expression vector** : We had previously used the pEF-IRESpac bicistronic vector <sup>[14]</sup> and established, downstream from the human polypeptide chain elongation factor 1 $\alpha$  strong promoter, in the multiple cloning site in-between the ECoRI & XbaI restriction sites, a cassette sequence containing (i) the signal peptide for the low-affinity nervous growth factor receptor (LNGFR) <sup>[15]</sup> between the ECoR1 and Bgl2 restriction sites; and (ii) the HIV-1 gp41-derived C46 peptide between the Bgl2 and BspE1 restriction sites, and between the BspE1 and Xba1 restriction sites; (iii) a linker GSSSSG, followed by the C-terminal  $\alpha$ -chain C4bp

multimerising domain (C4bp $\alpha$ ) and a 8 Histidin-tag epitope immediately followed by a stop codon. This cassette corresponds to the construct 364H-1L (X=1) containing a single SGGGS linker between C46 and the C4bp $\alpha$ -multimerising domain published in the paper Dervillez et al <sup>[2]</sup>. The gene of interest is then inserted according to the reading frame between the signal peptide and the C4bp $\alpha$ -multimerising domain and between the Bgl2 & BspE1 restriction sites instead of C46. Further modifications described below will be done to replace the C4bp $\alpha$  by the C4bp $\beta$ .

### **Cloning of anti-glycophorin A heavy (VH) and light chain-variable (VL) region coding sequences and assembly into single chain Fv :**

Total RNA from the mouse R18 IgG2b anti-GPA monoclonal antibody-secreting hybridoma cells <sup>[16]</sup> was isolated by using the QIAamp RNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription of the extracted RNA was then performed using the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Gibco BRL).

The cDNA encoding the variable region of the R18 IgG2 anti-glycophorin A monoclonal antibody heavy chain (VH) was amplified by PCR using the Mouse scFv Module kit (GE Healthcare). The comparison of the VH DNA sequence to the IMGT database sequences (<http://imgt.cines.fr>) showed a strong similarity (97.8%) of amino acids with the IGHV5 family of mouse immunoglobulin heavy chain (Gene Bank U04230).

The cDNA encoding the variable region of the R18 IgG2 anti-glycophorin A monoclonal antibody light chain (VL) was amplified by PCR using eleven degenerated forward (fwd) primers containing the restriction site *Sal* I and the *Not*I reverse primer (CGCGAGGCGGCCGCTCGACACGACTGAGGCACCTCCAG)<sup>[17]</sup>.

The DNA sequence analysis by the IMGT database showed 100% of identity with Gene Bank (AJ235946) IGKV 8-27 gene of mouse immunoglobulin Light Kappa chain.

Paired VH and VL were then assembled by PCR with a (Gly4-Ser)3 linker by using the Mouse scFv Module kit to design the final anti-GPA single-chain Fv.

### **Cloning of the anti-glycophorin A single chain Fv with the C-terminal C4bp alpha-chain**

: The DNA encoding the scFv anti-GPA was amplified by PCR with the *Pwo* Taq polymerase (Roche) using the *Bgl*II forward primer (CGCGAGAGATCTCAGGTGAAACTGCAGCAG) and the *Bsp*E1 reverse primer (CGCGAGTCCGGACCGTTTTATTTCCAGCTT). The restriction sites in the depicted primer sequences are underlined. The PCR product was ligated and then amplified in the PCR2.1 TOPO vector (Invitrogen). The anti-glycophorin A scFv DNA fragment was collected by digestion of the PCR2.1 TOPO with Bgl2 & BspE1 and then ligated with the T4-ligase (New England Biolabs) into the 364H-1L construct, instead of the C46 fragment previously removed by digestion with Bgl2 & BspE1. The established cassette in pEF-IRESpac is SP(LNGFR).scFv anti-GPA.(SGGGS).C4bp $\alpha$ .His 8x.

### **Cloning of the anti-glycophorin A single chain Fv and the C-terminal C4bp beta-chain :**

The DNA encoding the scFv anti-GPA was amplified by PCR using *Bgl*II forward primer used above, and the *Not*I reverse primer (CGCGAGGCGGCCGCCCGCGTTTTATTTCCAGCTTG). The PCR product was ligated

and then amplified in the PCR2.1 TOPO vector. The scFv anti-glycophorin A DNA fragment was collected by digestion of PCR2.1 TOPO with Bgl2 & Not1.

The cDNA encoding the C4bp third Short Consensus Repeat (SCR3) followed by the C-terminal C4bp beta-chain was amplified by PCR using the *NotI* forward primer (CGCGAGGCGGCCGCATCCGGAGGCGGTGGCTCG) and the Xba1 6-His reverse primer (CGAGTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGGATCAACAATTTTGCCTTCAA).

As template, we had used a previously established construct in the pKC3 expression vector produced in our laboratory containing the cDNA encoding the third SCR followed by the C-terminal domain of the C4bp $\beta$ -chain. The PCR product was ligated, then amplified in the PCR2.1 TOPO vector. The SCR3.C4bp $\beta$ .His6x DNA fragment was collected by digestion of the PCR2.1 TOPO with Not1 & Xba1.

Several scFv anti-GPA DNA fragment- as well as SCR3.C4bp $\beta$ .His6x DNA fragment-containing TOPO clones were sequenced to ensure the correct sequences of the DNA fragments used hereafter.

The 364H-1L construct produced in dam<sup>-</sup> Top Ten bacteria (Invitrogen) was digested by Bgl2 and Xba1 to remove the cassette C46.1L.C4bp $\alpha$ .His8x, leaving upstream the signal peptide between the ECoRI and Bgl2 restriction sites, and then dephosphorylated using the CIP T4 alkaline phosphatase (New England Biolabs). The remaining plasmid, previously separated from its C46.1L.C4bp $\alpha$ .His8x DNA fragment and then column-purified (Macherey-Nagel), was ligated together with (i) the scFv anti-GPA (Bgl2-NotI) and (ii) the SCR3.C4bp $\beta$ .His6x (NotI-Xba1) DNA inserts. The established cassette in pEF-IRESpac is SP(LNGFR).scFv anti-GPA.(SGGGGS).SCR3.C4bp $\beta$ .His 6x.

**Cloning of the tetanus toxin Fragment C (TTFC) linked to the C-terminal C4bp alpha-chain :** The cDNA encoding the tetanus toxin Fragment C, kindly provided by P. MUNRO (INSERM U 452, Nice, France), was amplified by PCR using the *BglII* forward primer (CGCGAGAGATCTCTGGATTGTTGGGTTGATAAT) and the BspE1 reverse primer (CGCGAGTCCGGAATCATTTGTCCATCCTTCATC). The PCR product was ligated, then amplified in the PCR2.1 TOPO vector. The TTFC DNA fragment was collected by digestion of the PCR2.1 TOPO with Bgl2 & BspE1, then ligated into the 364H-1L construct instead of the C46 fragment previously removed by digestion with Bgl2 & BspE1. The established cassette in pEF-IRESpac is SP(LNGFR).TTFC.(SGGGGS).C4bp $\alpha$ .His 8x.

scFv anti-GPA VL	P1	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
	P2	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGT
	P3	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG
	P4	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGAGGRCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
	P5	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGGATTTWCAGGTGCAGATTTWCAGCTTC
	P6	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGAGGTKCYTYGYTSAGYTYCTGRGG
	P7	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGGGCWTCAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
	P8	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGTGGGGAYCTKTTTTYCMTTTTTCAATTG
	P9	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGGTBTCCWCASCTCAGTTCCTTG
	P10	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
	P11	fwd	Sal1	CGCGAGGTCGACATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
	P12	rev	Not1	CGCGAGGCGGCCGCTCGACACGACTGAGGCACCTCCAG
scFv anti-GPA for C4bp $\alpha$	P13	fwd	Bgl2	CGCGAGAGATCTCAGGTGAAACTGCAGCAG
	P14	rev	BspE1	CGCGAGTCCGGACCCTTTTATTTCCAGCTT
scFv anti-GPA for C4bp $\beta$	P13	fwd	Bgl2	CGCGAGAGATCTCAGGTGAAACTGCAGCAG
	P15	rev	Not1	CGCGAGGCGGCCGCCGCCGCTTTTATTTCCAGCTTG
1L.SCR3.C4bp $\beta$ .his6x	P16	fwd	Not1	CGCGAGGCGGCCCGCATCCGGAGGCGGTGGCTCG
	P17	rev	Xba1	CGAGTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGATCAACAATTTTGCCTTCAA
TTFC for C4bp $\alpha$	P18	fwd	Bgl2	CGCGAGAGATCTCTGGATTGTTGGTTGATAAT
	P19	rev	BspE1	CGCGAGTCCGGAATCATTTGTCCATCCTTCATC

**Table 1.** Summary of the primers used for cloning the constructs

**Stable expression in 293T of the multi-TTFC-C4bp $\alpha$ , multi-anti-GPA-scFv-C4bp $\alpha$  and mono-anti-GPA-scFv-C4bp $\beta$  molecules :** 293T human embryonic kidney cells (ATCC, CRL-11268) were cultured in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 1% penicillin/streptomycin/fungizone antibiotics (1000 U/ml; 1000  $\mu$ g/ml; 2.5  $\mu$ g/ml) (Cambrex Biosciences, Verviers, Belgium), 10% heat-inactivated Foetal Calf Serum (FCS) (Biowest, Paris, France) and 2% glutamine (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The day preceding the transfection (D-1), cells were plated onto 25 cm<sup>2</sup> flasks (3,5 million cells per flask). At D0, cells were co-transfected with 10  $\mu$ g total DNA with 20  $\mu$ l lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA).

The single transfections are :

- 1) TTFC.(SGGGS).C4bp $\alpha$ .His8x (homomultimers TTFC.C4bp $\alpha$ ),
- 2) scFv anti-GPA.(SGGGS).C4bp $\alpha$ .His8x (homomultimers scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ ),
- 3) scFv anti-GPA.(SGGGGS).SCR3.C4bp $\beta$ .His6x (monomers/dimers scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$ ).

The double transfections are :

- 1) multimeric TTFC.(SGGGS).C4bp $\alpha$ .His8x / multimeric scFv anti-GPA.(SGGGS).C4bp $\alpha$ .His8x (heteromultimers TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ ),

- 2) multimeric TTFC.(SGGGS).C4bp $\alpha$ .His8x / monomeric scFv anti-GPA.(SGGGGS).SCR3.C4bp $\beta$ .His6x (heteromultimers TTFC.C4bp $\alpha$ / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$ ).

Stable transfections were established by culturing the cells in presence of 20  $\mu$ g/ml Puromycin (Sigma, St Quentin Fallavier, USA). The medium was replaced daily for 5 days after transfection to achieve full selection pressure. After 2 weeks, for each transfection, bulks from surviving cells were sub-cloned in 96 well-plates by limiting dilutions; single cell colonies were then expanded separately in 24-well cell culture plates (Costar, San Diego, CA) in presence of 20  $\mu$ g/ml Puromycin. The supernatants of each single clone were analysed by western blot and quantify by ELISA. For each transfection, the clones expressing the highest amounts of proteins were kept and expanded for further analyses.

#### **Biochemical analysis of the different recombinant molecules generated by Western blotting**

: Crude supernatants from the 293T cells expressing (i) the TTFC.C4bp $\alpha$ , (ii) the scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ , (iii) the scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$ , (iv) the TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ , and (v) the TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  molecules were analysed under reducing conditions (500 mM  $\beta$ 2-mercaptoethanol) using a 10% SDS-PAGE followed by Western blotting using 0.2  $\mu$ m polyvinylidene difluoride (PVDF) blotting membranes (Millipore). After blocking with PBS-5% milk powder/0.1 % Tween 20, the membrane was incubated using a peroxidase-conjugated monoclonal mouse anti-His6x antibody (Roche), and revealed using a chemoluminescent detection ECL kit (Amersham).

#### **Biochemical analysis of the different recombinant molecules generated using biosynthetic radiolabeling, followed by immunoprecipitation and SDS-PAGE**

: Alternatively, 293T cells producing the different recombinant molecules were cultured overnight in RPMI 1640 cysteine and methionine free medium, supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin/fungizone (1000 U/ml; 1000  $\mu$ g/ml; 2.5  $\mu$ g/ml, respectively), and 50  $\mu$ Ci  $^{35}$ S-Methionine /  $^{35}$ S-Cysteine (Amersham Biosciences, Orsay, France) radioactive amino acids.

Supernatants were then collected and cleaned by centrifugation at 3000 rpm for 5 min at 4 $^{\circ}$ C. TTFC moiety-containing supernatants were immunoprecipitated overnight at 4 $^{\circ}$ C with anti-mouse IgG coated-magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway) bearing a mouse anti-tetanus toxin fragment C monoclonal antibody (Roche). The scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ -containing supernatant was immunoprecipitated with anti-rabbit IgG coated-magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway) bearing a rabbit IgG anti-His6x (Roche) polyclonal antibody.

Beads were collected by centrifugation at 4000 rpm for 5 min at 4 $^{\circ}$ C, then they were washed with PBS-0,1 % BSA and resuspended in the protein loading buffer, with or without  $\beta$ 2-mercaptoethanol, and analyzed by SDS-PAGE on a 5% acrylamide gel for the non-reduced samples, or a 10% acrylamide gel for the reduced samples. The gels were then dried and exposed to Kodak X-Omat Films (Kodak, Paris, France) at -80 $^{\circ}$ C.

**Quantification of the soluble recombinant proteins by ELISA :** A rabbit anti-His polyclonal antibody (ABR : Affinity BioReagents) was coated overnight in Dubelcco's phosphate buffer saline (DPBD, 100 ng per well per 100  $\mu$ l DPBD) at 4°C on 96-well microtiter immunoassay plates (Dynatech laboratories Inc, Chantilly, VA, USA). After being washed 5 times with DPBS-1% BSA, plates were blocked with DPBS-5% BSA for 1 h at 37°C. After 2 additional washings, dilutions of samples to quantify were prepared separately in a final volume of 100  $\mu$ l DPBS-1% BSA, transferred to the ELISA plates and incubated for 1 h at 37°C. After 4 washings, plates were incubated in 100 ng per well per 100  $\mu$ l DPBS-1% BSA mouse 2F12 anti-C4bp C-terminal  $\alpha$ -chain monoclonal antibody (kindly provided by Prof. B. Bouma, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands) for 1 h at 37 °C. After 4 further washings, the plates were incubated with an anti-mouse HRP-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) in 100  $\mu$ l PBS-1% BSA per well for 1 h at 37°C. The plates were washed 5 times and incubated in a 100 mM phosphate-citrate buffer pH 5,00 (Sigma) with the o-phenylenediamine (OPD, Sigma)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chromogenic substract combination for peroxydase for 6 min. (100  $\mu$ l per well) with shaking at room temperature. The reaction was stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 N, 100  $\mu$ l per well) and the plates were read at 492 nm using a microplate reader (SLT, Labinstruments, Vietech, St Bonnet de Mure, France). We used as standards the C46-C4bpsHis8x produced in the paper Dervillez et al. 2006<sup>[2]</sup>.

**Direct hemagglutination of human red blood cells by the different constructs :** Twenty microliters of a 2,5 % suspension of erythrocytes were incubated for 45 minutes at 37°C with 50  $\mu$ l of crude supernatant from 293T cells expressing (i) the TTFC.C4bp $\alpha$ , (ii) the scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ , (iii) the scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$ , (iv) the TTFC.C4bp $\alpha$ / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ , and (v) the TTFC.C4bp $\alpha$ / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$ , respectively. As positive control, RBCs were incubated with the mouse R18 anti-GPA IgG2b monoclonal antibody<sup>[16]</sup>. As negative control, RBCs were incubated with crude supernatant from untransfected 293T cells. Agglutination was performed using agglutination sepharose columns (DiaMed, Paris, France) by centrifugation at 1,000 g for 10 min. at room temperature.

***In vitro* analysis by flow cytometry of the ability of TTFC-bearing RBCs to bind anti-tetanus toxin antibodies :** RBCs ( $2,6 \cdot 10^6$ ) from a healthy individual recently vaccinated against tetanus were incubated with 100  $\mu$ l of crude supernatants containing respectively the different proteins as described above, alternatively with supernatant from wild type 293T cells as negative control, for 1 h at 37°C, washed 3 times with PBS-1% BSA. Pelleted RBCs were resuspended in 100  $\mu$ l **decomplemented** serum from the same individual, or alternatively with 100  $\mu$ l (1  $\mu$ g) mouse anti-tetanus toxin fragment C antibody (Roche) for 1 h at 4°C. RBCs were washed twice, then incubated with 1  $\mu$ g goat biotinylated anti-human antibody (Southern Biotechnology, Montrouge, France) or biotinylated anti-mouse antibody (Amersham), respectively. After 2 washings, RBCs were incubated with 1,5  $\mu$ g R-Phycoerythrin-conjugated streptavidin (Tebu-Bio, Le Parray-en-Yvelines, France) for 1 h at

4°C. RBCs were washed twice, then fixed with 0,4 % paraformaldehyde in PBS. Cells were analysed by flow cytometry with a FACStar<sup>Plus</sup> flow cytometer (Becton Dickinson). Ten thousands events were analyzed per tube. Mean fluorescence channel was compared for each sample.

***In vitro* analysis by flow cytometry of the ability of RBCs bearing TTFC and anti-tetanus toxin antibodies to bind Complement molecules** : Alternatively, the same RBCs successively incubated as described above with (i) the diverse recombinant molecules followed by (ii) the decomplexed serum from a healthy individual recently vaccinated with tetanus toxin were then incubated with (iii) 50 µl C5-deficient non-decomplexed human serum diluted twice in low ionic-strength saline buffer (LISS) containing 0,15 mM Ca<sup>2+</sup> & 0,5 mM Mg<sup>2+</sup> for one hour at 4°C. After 3 washings, C3b and C4b deposits were revealed with a FITC-labeled goat anti-human C3b antibody (Cappel, Cochranville, France) or a biotinylated-conjugated anti-human C4d antibody (Quidel, San Diego, USA) followed by R-phycoerythrin-conjugated streptavidin, respectively. RBCs were analysed by flow cytometry as described above.

***In vitro* hemolytic assay of RBCs bearing the complexes TTFC-scFv anti-GPA-anti-tetanus toxin antibodies-Complement** : RBCs ( $3,8 \cdot 10^6$ ) from a healthy individual recently vaccinated against tetanus were incubated with 200 µl crude supernatants from transfected cells for 1 h at 37°C. RBCs were washed twice, centrifuged at 1,800 rpm for 5 min. at 4°C, then incubated with 100 µl **non-decomplexed** serum from the same individual, or alternatively the R18 anti-GPA monoclonal antibody for 1 h at 37°C then were cooled down in ice, cells were centrifuged at 160g for 10 min. at 4°C, and supernatants were transferred onto a 96-well plate microplate. The O.D. was measured in each case at 630-405 nm using a microplate reader (SLT, Labinstruments).

## Results

**Biochemical characterization of the homo-/hetero- multimeric, dimeric, monomeric proteins** : The 3 different constructs depicted in figure 1 were stable transfected in 293T cells as 3 single transfections (i) TTFC.C4bp $\alpha$  (homomultimers), (ii) scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  (homomultimers), (iii) scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (monomers), and as 2 double transfections or co-transfections : (i) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  ( $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimers) and (ii) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  ( $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers): TTFC was the effector function, and the scFv anti-GPA was the anchoring function in the heteromultimers. Recombinant proteins secreted into the crude supernatants from transfected cells were first analysed by Western blotting under reducing conditions using  $\beta$ 2-mercaptoethanol and revealed with a HRP-conjugated anti-His antibody : the multimers were consecutively reduced to monomers through reduction of the disulfide bridges within the C-terminal end of the C4bp $\alpha$ - as well as  $\beta$ -chains. The first fragment considered as multimerising domain links covalently the different  $\alpha$ -monomers together by cross bridging;

the second eventually links a unique  $\beta$  monomer to the  $\alpha$ -homomultimer to form the  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers. Figure 2a at left presents the protein pattern under reducing conditions resulted from the 5 transfections : the TTFC.C4bp $\alpha$  (lane 1), the scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  (lane 2) and the scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (lane 4) monomers have an approximate molecular weight of 72, 38 and 50 kDa, respectively. The figure 2a at right depicts the protein patterns under non reducing conditions from the single transfections (i) scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  (lane 2) and (ii) the scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (lane 4), representing the anchoring constructs. The scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  (lane 2) is expressed under unique species that can be either hexameric (230 kDa) or heptameric (265 kDa) scFv anti-GPA proteins. The scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (lane 4) is mainly expressed under dimeric form whose MW is about 100 kDa, and a minority is monomeric (50 kDa). The dimeric form is reduced under its monomeric component with a MW of 50 kDa (Figure 2a, left, lane 4). Thus, if the C4bp c-terminal  $\alpha$ -chain is associated downstream with a protein of interest it allows the expression of the soluble multimeric form of this protein. In contrast the C4bp c-terminal  $\beta$ -chain associated to the same protein allows the expression of this protein under monomeric and dimeric soluble forms.

The Western blotting patterns from the recombinant proteins secreted into the supernatants resulting from the double transfections  $\alpha$ - $\alpha$  (lane 3) and  $\alpha$ - $\beta$  (lane 5) depict 2 bands corresponding to the 2 functions : (i) effector TTFC.C4bp $\alpha$  (72 kDa) and (ii) anchoring scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  (38 kDa) or scFv anti-GPA.C4bp $\beta$  (50 kDa) functions respectively, characterised at the same molecular weight as for the corresponding single transfections.

The supernatants containing the recombinant homomultimers TTFC.C4bp $\alpha$ , and the  $\alpha$ - $\alpha$  &  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers were immunoprecipitated with anti-tetanus toxin mouse monoclonal antibody-bearing magnetic beads, after a biosynthetic labelling with  $^{35}\text{S}$ -methionine/ $^{35}\text{S}$ -Cysteine. Alternatively, the homomultimers scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ -containing supernatant were immunoprecipitated with rabbit anti-His antibody-bearing magnetic beads. Immunoprecipitated samples were analysed by SDS-PAGE and exposed to autoradiography films. Figure 2b depicts the results either under reducing conditions (left) or under non-reducing conditions (right). Under reducing conditions, the reduced recombinant TTFC.C4bp $\alpha$  has a molecular weight of 72 kDa (lines 1, 3 & 5), like that of the Western blotting (figure 2a, lines 1, 3, 5). The reduced recombinant scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  has a molecular weight of 38 kDa like previously established in Western blotting (figure 2a line 2). The figure 2b lines 3 & 5 at left under reducing conditions depicts respectively the  $\alpha$ - $\alpha$  and  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers, whose respective patterns are the same as in Western blot (figure 2a, lines 3 & 5). Interestingly, the 38 kDa scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  (figure 2b left, line 3) and the 50 kDa scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (figure 2b left, line 5) present in the  $\alpha$ - $\alpha$  and  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers, respectively, were co-immunoprecipitated with the anti-TTFC-bearing magnetic beads together with the TTFC.C4bp $\alpha$ . This shows that the scFv anti-GPA anchoring functions are effectively associated to the TTFC effector functions in both heteromultimers. Figure 2b right depicts the TTFC.C4bp $\alpha$  homomultimers (line 1), the  $\alpha$ - $\alpha$  (line 3) and the  $\alpha$ - $\beta$  (line 5) heteromultimers respectively under **non reducing conditions**.

These conditions give information about the number of different multimeric species. The TTFC.C4bp $\alpha$  homomultimer pattern (figure 2b right, line 1) presents 2 main upper bands higher than 400 kDa and a weaker band with a size around 400 kDa corresponding to 3 different species of multimers. If one considers that one monomer TTFC.C4bp $\alpha$  has a size of about 72 kDa, hexamers, heptamers and octamers of TTFC.C4bp $\alpha$  with respective sizes of about 430, 500 and 580 may represent the 3 main multimeric species produced simultaneously in the cell culture supernatants. Minor bands are also present and may correspond to pentamers (360 kDa) and tetramers (290 kDa). The  $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimer pattern (figure 2b right, line 3) presents 6 bands, including 4 main bands, 2 higher than 400 kDa, and 2 lower. The pattern is different from that of the homomultimer (line 1). Furthermore, as the ratio TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  cannot be controlled, the results from Western blotting analysis cannot predict either the number or the ratio of each function in the heteromultimers. The  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimer pattern (line 5) presents 6 main bands, including 3 higher than 400 kDa. The advantage of using the C-terminal C4bp $\beta$ -chain is that the  $\beta$ -form, corresponding to the scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (50 kDa) in the present work, is theoretically unique within the heteromultimer, like for the main physiological form of C4bp (7 $\alpha$ 1 $\beta$ ). Thus, the 6 bands depicted here (figure 2b right, line 5) could thus correspond to 7 $\alpha$ 1 $\beta$  (554 kDa), 6 $\alpha$ 1 $\beta$  (482 kDa), 5 $\alpha$ 1 $\beta$  (410 kDa), 4 $\alpha$ 1 $\beta$  (338 kDa), 3 $\alpha$ 1 $\beta$  (266 kDa) and 2 $\alpha$ 1 $\beta$  (194 kDa) heteromultimeric species, respectively. If we compare the  $\alpha$ - $\alpha$  to the  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers, there are more molecular species with a higher degree of multimerisation for the  $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimer than for the  $\alpha$ - $\beta$ , whose sizes are approximately ranged from 350 to 450 kDa.

**Quantification by ELISA of the generated heteromultimers :** The molar concentrations of the  $\alpha$ - $\alpha$  and  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers from crude supernatants were established by ELISA using a rabbit anti-His monoclonal antibody as first coated antibody, and the 2F12 mouse monoclonal anti-C4bp c-terminal  $\alpha$ -chain (kindly provided from B. Bouma) as secondary antibody. The multimeric C46 peptide was used as standard.<sup>[2]</sup> The molar concentrations were 9,2 nM and 8,5 nM for the  $\alpha$ - $\alpha$  and for the  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers, respectively. The corresponding protein concentrations were not calculated here, because of the presence of several multimeric species in the crude supernatants, in contrast to the standard multimeric soluble C46. However, if one considers an average MW of about 380 kDa for the  $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimers, corresponding to the main molecular species, the approximate protein concentration is 3,5  $\mu$ g/ml. Depending on the respective molar concentrations of the different molecules, supernatants were diluted to get the same final molar concentration for each species used in the different experiments described below.

***In vitro* analysis of the ability of the scFv anti-GPA recombinant anchoring function in the different generated constructs to direct agglutination of human red blood cells :** In order to show the ability of the scFv anti-GPA anchoring function to effectively bind the glycoprotein A erythrocyte surface glycoprotein, leading to erythrocyte agglutination, we

incubated RBCs with the crude supernatants from 293T cells expressing either (i) TTFC.C4bp $\alpha$  homomultimers (figure 3, tube 2), (ii) scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  homomultimers (figure 3, tube 3), (iii) scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (figure 3, tube 4), (iv) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  heteromultimers (figure 3, tube 5), or (v) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  heteromultimers (figure 3, tube 6), respectively. As positive control, we used the R18 anti-GPA monoclonal antibody. As negative control, we incubated the RBCs with the crude supernatant from untransfected cells. The results depicted in the figure 3 show that RBCs agglutinated when pre-incubated either with (i) the scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  homomultimers (figure 3, tube 3), (ii) the scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (figure 3, tube 4), (iii) the TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  heteromultimers (figure 3, tube 5), or (iv) the TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  heteromultimers (figure 3, tube 6). RBCs agglutinated with all constructs containing scFv anti-GPA, whatever linked to the C4bp C-terminal end C4bp  $\alpha$ - or  $\beta$ -chain. Incubation of RBCs with R18 anti-GPA antibody led to agglutination as well. In contrast, homomultimers TTFC.C4bp $\alpha$  lacking the scFv anti-GPA anchoring function did not agglutinate RBCs. The scFv anti-GPA associated to the SCR3.C4bp $\beta$ , whatever expressed from single transfection, or under heteromultimeric form associated to TTFC.C4bp $\alpha$  as double transfection, led to RBC agglutination, as well as did scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  expressed as dimers.

***In vitro* analysis by flow cytometry of the ability of the TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  as well as TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  heteromultimers previously bound at the surface of RBCs to capture human anti-tetanus toxin antibodies :** After showing the functionality of the scFv anti-GPA anchoring function to bind specifically RBCs, we investigated the ability of the TTFC effector function, previously bound to RBCs through their scFv anti-GPA anchoring-function (heteromultimers  $\alpha$ - $\alpha$  or  $\alpha$ - $\beta$ ), to capture anti-tetanus toxin antibodies from the serum of an individual recently vaccinated against tetanus, thus redirecting specifically the tetanus toxin antibody response to the particular erythrocyte target. RBCs from an individual recently immunised against tetanus toxin were incubated with different recombinant proteins as depicted in the figure 4. RBCs were then incubated with the de complemented serum from the same individual (numbers 1 to 6), and alternatively as positive control with a mouse anti-TTFC monoclonal antibody (number 7). The capture of anti-TT antibodies at the surface of the RBCs was assessed by flow cytometry. Only the RBCs pre-incubated with the crude supernatants containing the  $\alpha$ - $\alpha$  (peak number 4) or  $\alpha$ - $\beta$  (peak number 6) heteromultimers were positively labelled, as well as the RBCs incubated with anti-TT antibodies (peak number 7). The RBCs pre-incubated with the TTFC function alone (peak number 1), or the anchoring function alone (peak 2 and 5) do not capture anti-TT antibodies at their surface. The switch of the positive populations for the RBCs pre-incubated with either the  $\alpha$ - $\alpha$  or the  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers was about 2 logs and for the RBCs pre-incubated with the mouse anti-TTFC antibody was more than 3 logs, compared to the negative controls (peaks numbers 1, 2, 3, 5), respectively.

***In vitro* analysis by flow cytometry of the deposition of C3b/C4d from Complement at the surface of human RBCs bearing  $\alpha$ - $\alpha$  or  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers and human anti-tetanus toxin antibodies :**

In order to investigate whether the complexes (i)  $\alpha$ - $\alpha$  (5), or the  $\alpha$ - $\beta$  (6) TTFC/scFv anti-GPA heteromultimers and (ii) anti-tetanus toxin antibodies at the surface of human erythrocytes (O<sup>+</sup> blood-group) can activate complement components at their surface, we analysed *in vitro* by flow cytometry the presence of the C3b and C4d Complement component depositions at the surface of these erythrocytes, using the anti-C3b-FITC & anti-C4d-biot/strepta-PE antibodies. In our experimental conditions, human erythrocytes were incubated (i) with the diverse recombinant proteins followed by (ii) C5-lacking non-decomplemented human serum to prevent the activation of the MAC.

Membrane-bound C3b is the pivotal component responsible for the activation of the C3 loop also named Complement alternative pathway. Furthermore, C3d deposition resulting from Complement ultimate split products that accumulate throughout the alternate pathway activation leads in physiological conditions to the activation of the C5b-C6C7C8(C9)n components of the MAC and to the assembly of the C9 subunits, followed by pore formation of the membrane-targeted.

As negative control, RBCs had previously been incubated with the TTFC.C4bp $\alpha$  homomultimers (2), scFv anti.GPA.C4bp $\alpha$  homomultimers (3), scFv anti.GPA.SCR3.C4bp $\beta$  (4), or cell culture supernatant from 293T untransfected cells (1).

Figure 5 depicts the results of detection of the C3b and C4d components at the surface of the human RBCs analysed by flow cytometry, respectively detected with FITC and Phycoerythrin (PE). C3b-FITC labelling is depicted on X-axis (FL1) and C4d-biot-strepta-PE on Y-axis (FL2). The RBCs incubated with either the  $\alpha$ - $\alpha$  (Figure 5, N<sup>5</sup>) or the  $\alpha$ - $\beta$  (Figure 5, N<sup>6</sup>) TTFC/scFv anti-GPA heteromultimers are stained for both antibodies. RBCs incubated with the  $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimers were more strongly stained for both antibodies (Figure 5, N<sup>5</sup> versus N<sup>6</sup>), with a switch of the main positive cell population of about one log along the X-axis (C3b) and about two logs along the Y-axis (C4d) (Figure 5, graph N<sup>5</sup>). This shows that the multivalence of the anti-GPA anchoring function within the  $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimers seems to allow a better binding of the  $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimers onto the erythrocyte-surfaces than its  $\alpha$ - $\beta$  counterpart, were the scFv anti-GPA is only present under mono- or dimeric form within the heteromultimers. In contrast, RBCs incubated with the TTFC.C4bp $\alpha$  effector moiety alone (Figure 5, N<sup>2</sup>), or with the anchoring moieties scFv anti.GPA.C4bp $\alpha$  (Figure 5, N<sup>3</sup>) or scFv anti.GPA.SCR3.C4bp $\beta$  alone (Figure 5, N<sup>4</sup>) were stained neither with anti-C3b, nor with the anti-C4d antibodies. This suggests that the lack of either the TTFC effector moiety or the scFv anti-GPA anchoring moiety impairs the full function of the whole  $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimer, consisting of capturing the anti-tetanus toxin antibodies at the surface of erythrocytes through the scFv anti-GPA, thus creating a de novo platform for complement activation leading to lysis of erythrocytes.

***In vitro* haemolytic assay of human RBCs previously incubated with the different recombinant soluble molecules :**

In order to investigate whether the  $\alpha$ - $\alpha$  or the  $\alpha$ - $\beta$

TTFC/scFv anti-GPA heteromultimeric complexes and anti-tetanus toxin antibodies bound specifically onto erythrocyte membrane-surfaces through their scFv anti-GPA anchoring moiety are subsequently capable of recruiting and activating the Complement at the surface of RBCs, we have investigated *in vitro* their ability to trigger the lysis of target erythrocytes. RBCs bearing TTFC/scFv anti-GPA heteromultimers were incubated with non-decomplemented serum from a healthy individual recently vaccinated against tetanus. The lysis of erythrocytes was analysed by measuring the optical density of the supernatants using a spectrophotometer at 405-630 nm. Figure 6 depicts the results of the hemolytic assays of the RBCs, previously incubated with either TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$   $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimers (bar 9), or TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$   $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers (bar 8). The following controls were used simultaneously : RBCs submitted to several cycles freezing-refreezing (bar 1), RBCs incubated with cell culture supernatant from untransfected 293Tcells (bar 3), RBCs incubated in phosphate buffered-saline (bar 4), RBCs incubated with the effector homomultimeric TTFC.C4bp $\alpha$  moiety (bar 5), RBCs incubated with either homomultimeric scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  (bar 6) or homomultimeric scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  anchoring moieties (bar 7).

Erythrocytes lysis were observed only when they had previously been incubated with the TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$   $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimers (bar 9). The lyses were then comparable to that when RBCs were submitted to several cycles of freezing-defreezing (bar 1). Surprisingly, RBCs previously incubated in presence of TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$   $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers (bar 8) were not lysed. The valence of the anchoring moiety within the heteromultimers seems to have an important role in their binding efficacy onto the erythrocytes.

## Discussion

We had previously developed by molecular engineering a multi-purpose biotechnological tool based on the use of the C-terminal end of the C4bp  $\alpha$ -chain, used as domain for multimerisation of therapeutic proteins <sup>[2, 18]</sup> as well as peptides <sup>[19]</sup>. This tool allows the expression of homomultimers, and more interestingly of bi-functional heteromultimers, which can associate (i) an effector function to (ii) a targeting or an anchoring function. We had produced the recombinant soluble heteromultimeric bi-functional complement receptor type 1 (sCR1) / scFv anti-Glycophorin A (GPA), allowing the restoration at supra-physiological densities of CR1 at the surface of CR1-deficient erythrocytes. The CR1 newly bound to erythrocytes has been shown to be functional, capable of binding C3b/C4b opsonised immune complexes <sup>[20]</sup>.

Aiming to apply this tool further in fields such as T-cell immunotherapy against tumor antigens, we designed soluble recombinant hetero-multimeric peptide-based therapeutic molecules that allow the vectorisation of immunogenic antigens towards target cells, reinforcing thus the immunogenicity of poorly immunogenic tumor rejection antigens, to enhance the cytotoxic T-cell response specifically against tumor cells.

We used in the present work the C-terminal end of the C4bp  $\alpha$ -chain as domain of multimerisation to design and produce recombinant soluble heteromultimeric molecules that associate (i) the tetanus toxin fragment C (TTFC) - a highly immunogenic - non toxic - component of the *Clostridium tetani* tetanus toxin - as effector moiety, to an anchoring moiety represented by the scFv anti-Glycophorin A (scFv anti-GPA).

The targeting moiety and the effector moiety are linked together by fusing each of them either to the C-terminal part of the  $\alpha$ - (C4bp $\alpha$ ) or to  $\beta$ -chain (C4bp $\beta$ ) of the C4b binding protein. The TTFC.C4bp $\alpha$  effector function and the scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  or the scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  anchoring functions were cloned separately into the pEF-IRESpac eukaryotic expression vector <sup>[14]</sup>, and then were co-transfected into 293T cells. Spontaneous covalent association between the effector & targeting moieties takes place thanks to the C-terminal  $\alpha$ -chains that are associated within the ER/Golgi by disulphide cross-bridging formation between interchain cysteins. The fusion with the C-terminal part of the  $\beta$ -chain of the C4b binding protein allows only monomeric or dimeric associations. We have thus designed the (i) TTFC.C4bp $\alpha$ /scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  ( $\alpha$ - $\alpha$ ) or (ii) TTFC.C4bp $\alpha$ /scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  ( $\beta$ - $\beta$ ) heteromultimers.

We have established *in vitro* that these bi-functional heteromultimers multi-TTFC / scFv anti-GPA (i) specifically bind to erythrocyte target cells through their scFv anti-GPA anchoring domain specific to erythrocytes. The cluster of TTFC is capable to (ii) capture anti-tetanus toxin antibodies and to trigger the lysis of the targeted erythrocytes cells. We have succeeded to manipulate the Complement activation as well as the pre-existing immune response against tetanus towards specific cell targets, leading to the cell lysis by mechanisms such as the activation of the (C5b-9)<sub>n</sub> membrane attack complex and/or the antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC).

This promising *in vitro* model successfully established the evidence that this concept could be applied to cancer therapy as an efficient methodology leading to the destruction of a given target. The pre-existing antibody response directed against the Tetanus toxin fragment C has been efficiently routed towards erythrocytes, leading to their lysis in a humoral model. Cellular responses initiated by vectorized antibody binding, through complement activation, Fc receptors, or inter cellular cross-linking between target and effector cells by using a multi functional heteromultimer will also be put to the draft for fighting against tumors in the future.

## Bibliography

- [1] G. Tunheim, K. M. Thompson, A. B. Fredriksen, T. Espevik, K. W. Schjetne, B. Bogen, *Vaccine* **2007**, 25, 4723 - 4734.
- [2] X. Dervillez, A. Hüther, J. Schuhmacher, C. Griesinger, J. H. Cohen, D. von Laer, U. Dietrich, *ChemMedChem*. **2006**, 1, 330 – 339
- [3] S. Oudin, M. T. Libyh, D. Goossens, X. Dervillez, F. Philbert, B. Réveil, F. Bougy, T. Tabary, P. Rouger, D. Klatzmann, J. H. Cohen, *J. Immunol.* **2000**, 164, 1505 - 1513.
- [4] N. F. Fairweather, V. A. Lyness, D. J. Maskell, *Infect. Immun.* **1987**, 55, 2541 - 2545.
- [5] D. Medaglini, A. Ciabattini, M. R. Spinosa, T. Maggi, H. Marcotte, M. R. Oggioni, G. Pozzi, *Vaccine* **2001**, 19, 1931 - 1939.
- [6] P. M. Norton, J. M. Wells, H. W. Brown, A. M. Macpherson, R. W. Le Page, *Vaccine* **1997**, 15, 616 - 619.
- [7] R. Isticato, G. Cangiano, H. T. Tran, A. Ciabattini, D. Medaglini, M. R. Oggioni, M. De Felice, G. Pozzi, E. Ricca, *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 6294 - 6301.
- [8] H. Duc Le, H. A. Hong, N. Fairweather, E. Ricca, S. M. Cutting, *Infect. Immun.* **2003**, 71, 2810 - 2818.
- [9] E. M. Mauriello, G. Cangiano, F. Maurano, V. Saggese, M. De Felice, M. Rossi, E. Ricca, *Vaccine*, **2007**, 25, 788 - 793.
- [10] K. Robinson, L. M. Chamberlain, M. C. Lopez, C. M. Rush, H. Marcotte, R. W. Le Page, J. M. Wells, *Infect. Immun.* **2004**, 72, 2753 - 2761.
- [11] J.P. Cartron, C. Rahuel, *Transfus. Med. Rev.* 1992, 2, 63-92. Review.
- [12] P. W. A. Edwards, *Biochem. Soc. Transac.* **1980**, 8, 334.
- [13] A. H. Merry, E. E. Thomson, D. J. Anstee, F. Stratton, *Immunol.* **1984**, 51, 793-800.
- [14] S. Hobbs, S. Jitrapakdee, J. C. Wallace, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 252, 368 - 372.
- [15] M. Hildinger, M. T. Dittmar, P. Schult-Dietrich, B. Fehse, B. S. Schnierle, S. Thaler, G. Stiegler, R. Welker, D. von Laer, *J. Virol.* **2001**, 75, 3038 - 3042.
- [16] B. Gardner, S. F. Parsons, A. H. Merry, D. J. Anstee, *Immunology*, **1989**, 68, 283-289.
- [17] S. T. Jones, M. M. Bendig, *Biotechnology (NY)*, **1991**, 9, 6, 88 - 89.
- [18] E. Shinya, X. Dervillez, F. Edwards-Lévy, V. Duret, E. Brisson, L. Ylisastigui, M. C. Lévy, J. H. Cohen, D. Klatzmann, *Biomed. Pharmacother.* **1999**, 53, 471-483.
- [19] M. T. Libyh, D. Goossens, S. Oudin, N. Gupta, X. Dervillez, G. Juszcak, P. Cornillet, F. Bougy, B. Reveil, F. Philbert, T. Tabary, D. Klatzmann, P. Rouger, J. H. Cohen, *Blood*. **1997**, 90, 3978-3983.
- [20] S. Oudin, M. T. Libyh, D. Goossens, X. Dervillez, F. Philbert, B. Réveil, F. Bougy, T. Tabary, P. Rouger, D. Klatzmann, J. H. Cohen, *J. Immunol.* **2000**, 164, 1505-1513.

**Figure 1.** Scheme of the different DNA constructs generated. a) Amino acid sequence of the different functional domains cloned in pEF-IRESpac backbone eukaryotic expression vector. b) Architecture of the diverse cassette vectors developed in the present study : (1) TTFC.C4bp $\alpha$ , (2) scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ , (3) scFv anti-GPA-SCR3.C4bp $\beta$ . The homomultimers were produced by single transfection. The bi-functional heteromultimers were produced by co-transfection with (1) + (2) or with (1) + (3).

**Figure 2.** Biochemical characterization of the different constructs generated. **a)** Analysis of the crude cell culture supernatants by SDS-PAGE and Western blotting under reducing or non reducing conditions : Western blottings were revealed with a HRP-conjugated anti-His antibody. **b)** Analysis of the different constructs generated by SDS-PAGE, after biosynthetic labeling with  $^{35}\text{S}$ -Met /  $^{35}\text{S}$ -Cys followed by immunoprecipitation using an anti-mouse IgG coated-magnetic beads bearing a mouse anti-tetanus toxin fragment C monoclonal antibody, except for the line (2), where the scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  was alternatively immunoprecipitated with anti-rabbit IgG coated-magnetic beads bearing a rabbit IgG anti-His6x polyclonal antibody.

(1) homomultimers TTFC.C4bp $\alpha$ , (2) homomultimers scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ , (3)  $\alpha$ - $\alpha$  heteromultimers TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ , (4) scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  and (5)  $\alpha$ - $\beta$  heteromultimers TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$ .

**Figure 3.** Direct agglutination of Red blood cells, previously incubated with cell culture supernatants from transfected cells containing :

1. The R18 anti-GPA monoclonal antibody (positive control)
2. Homomultimers TTFC.C4bp $\alpha$
3. Homomultimers scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$
4. scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$
5. Heteromultimers TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$
6. Heteromultimers TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$
7. Crude supernatants from untransfected 293T cells (negative control)

**Figure 4.** Analysis by flow cytometry of the ability of human RBCs bearing recombinant  $\alpha$ - $\alpha$  or  $\alpha$ - $\beta$  TTFC-heteromultimers to capture specifically anti-tetanus toxin antibodies from a healthy individual recently vaccinated against tetanus. After incubation with the different recombinant molecules from cell culture supernatant described below, RBCs were incubated with (i) decomplexed serum from the same individual (1 to 6) or alternatively with a mouse anti-tetanus toxin fragment C antibody (7), then with (ii) a goat biotinylated anti-human (1 to 6) or anti-mouse (7) antibodies followed by R-Phycoerythrin-conjugated streptavidin.

1. Homomultimers TTFC.C4bp $\alpha$
2. Homomultimers scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$
3. 293Tcell culture supernatant (negatif control)
4. Heteromultimers ( $\alpha$ - $\alpha$ ) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$
5. scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  cell supernatant.
6. Heteromultimers ( $\alpha$ - $\beta$ ) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$
7. Heteromultimers ( $\alpha$ - $\alpha$ ) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$

**Figure 5.** Analysis by flow cytometry of the ability of human RBCs bearing (i) recombinant  $\alpha$ - $\alpha$  or  $\alpha$ - $\beta$  TTFC-heteromultimers and (ii) anti-tetanus toxin antibodies from a healthy individual recently vaccinated against tetanus to bind specifically the C3b/C4d molecules from Complement. After incubation with the different recombinant molecules from cell culture supernatant described below, RBCs were incubated with (i) decomplemented serum from the same individual, then with (ii) non-decomplemented C5-deficient human serum. C3b/C4d deposits were revealed with (i) a FITC-labeled goat anti-human C3b antibody (X-Axis), (ii) a biotinylated-conjugated anti-human C4d antibody (Y-Axis), followed by (iii) R-phycoerythrin-conjugated streptavidin.

1. Cell culture supernatant from untransfected 293T cells
2. Homomultimers TTFC.C4bp $\alpha$
3. Homomultimers scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$
4. scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$
5. Heteromultimers ( $\alpha$ - $\alpha$ ) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$
6. Heteromultimers ( $\alpha$ - $\beta$ ) TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$

**Figure 6.** *In vitro* hemolytic assay of human RBCs previously incubated as described below. RBCs were then incubated with non-decomplemented serum from a healthy individual recently vaccinated against tetanus. Optic density from supernatants was analyzed using a spectrophotometer at 405-630 nm of hemoglobin absorbance.

1. RBCs submitted to several cycles thawing - freezing.
2. Heteromultimers TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ -containing cell supernatants, no RBCs.
3. RBCs with cell culture supernatant from untransfected 293T cells.
4. RBCs with PBS.
- 5, 6 and 7. RBCs with homomultimers TTFC.C4bp $\alpha$ , homomultimers scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$  and scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$ -containing cell culture supernatants, respectively.
- 8 and 9. RBCs with heteromultimers TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.SCR3.C4bp $\beta$  and TTFC.C4bp $\alpha$  / scFv anti-GPA.C4bp $\alpha$ -containing cell culture supernatants, respectively.

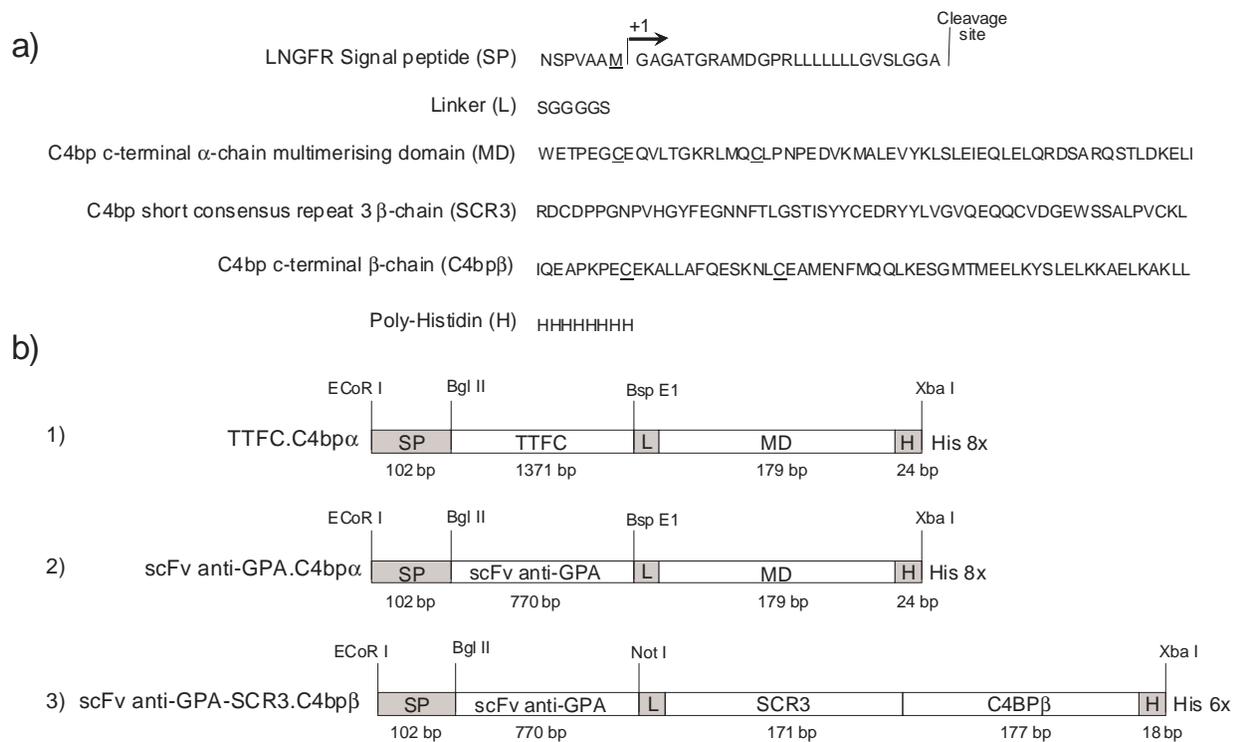
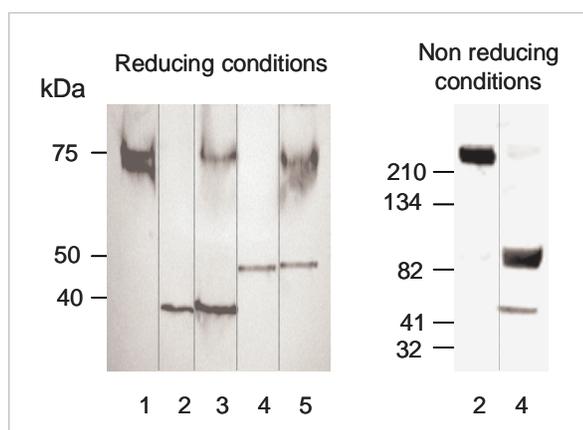


Figure 1

a)



b)

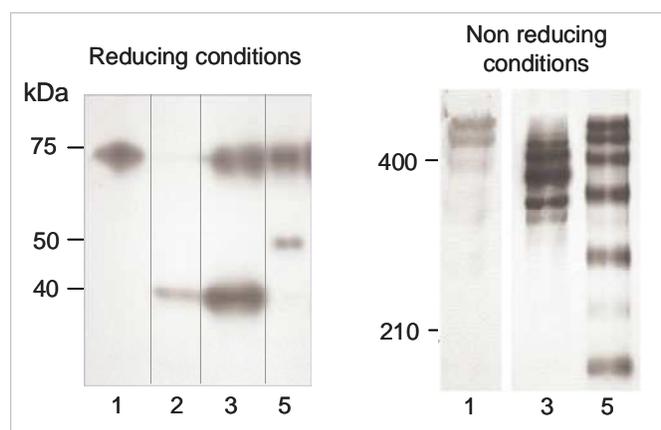
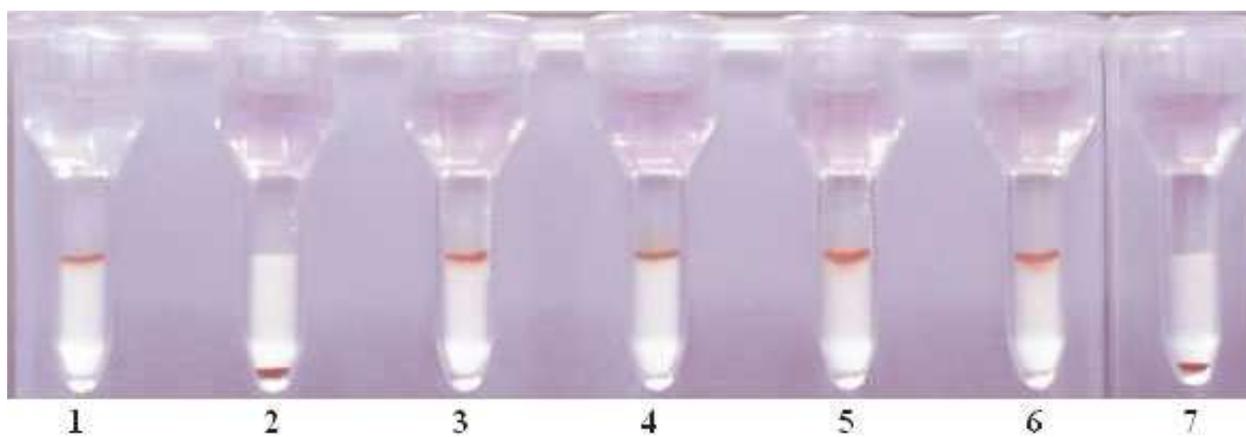


Figure 2



**Figure 3**

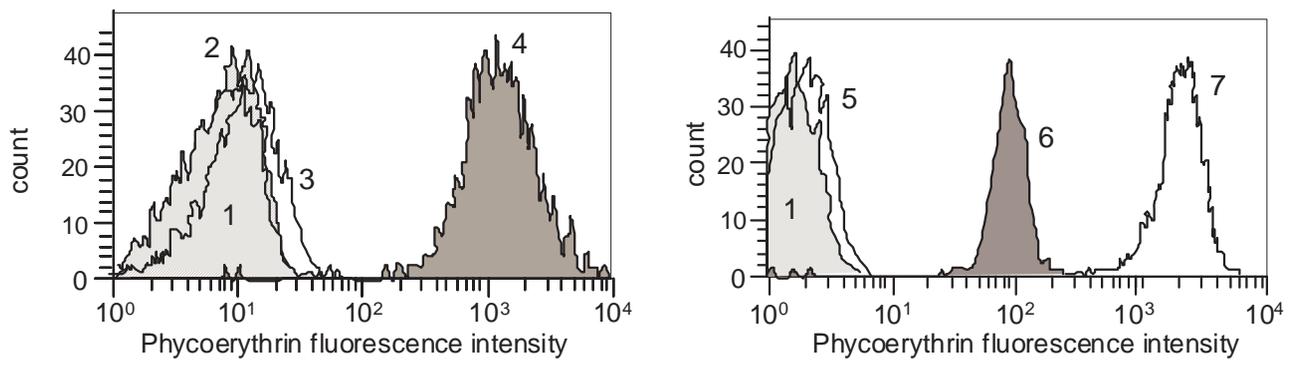


Figure 4

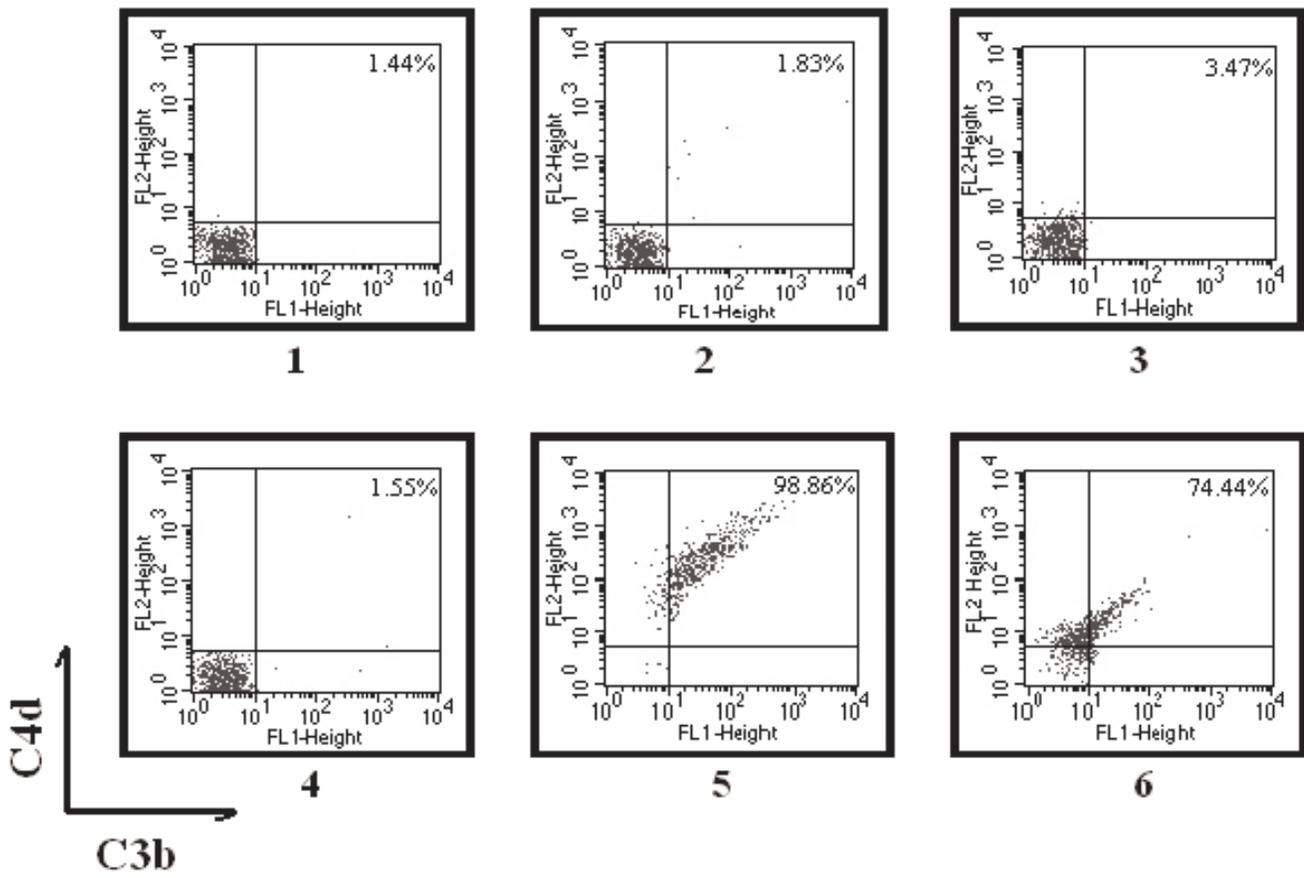
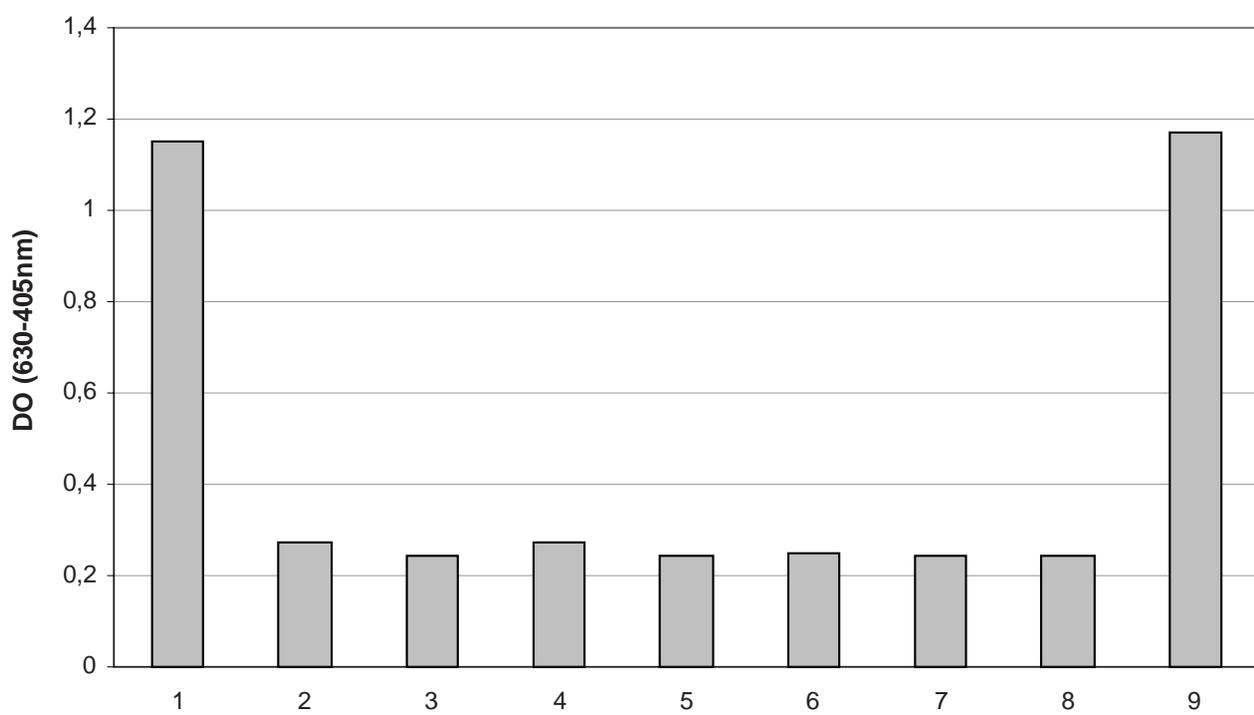


Figure 5



**Figure 6**