

Évolution moléculaire dirigée d'anticorps

par Olivier Dubreuil, Bruno Muller, Marc Bossus, Alexandra Savatier & Frédéric Ducancel¹

UMR CEA/bioMérieux, CEA, DSV, DIEP, Gif Sur Yvette, F-91191 France.

¹Auteur à qui la correspondance doit être adressée. E-mail : frederic.ducancel@cea.fr

Reçu le 26 novembre 2006

RÉSUMÉ

Les anticorps, protéines centrales du système immunitaire, sont caractérisés par une organisation structurale homogène et par leur capacité à reconnaître un nombre quasiment illimité de molécules. Codés par un nombre fini de gènes, ils acquièrent leur spécificité et leur affinité de reconnaissance *via* une succession de processus de recombinaisons génétiques et de mutations moléculaires. Depuis les travaux de Kohler et Milstein en 1975, et la possibilité de générer à façon des anticorps monoclonaux de spécificité déterminée, l'utilisation des anticorps dans les domaines de la recherche, du diagnostic et de la thérapie n'a cessé de croître. Ainsi, on dénombre à ce jour une vingtaine d'anticorps monoclonaux ayant reçu l'autorisation

d'être utilisés en immunothérapie chez l'homme. Toutefois, il faut noter qu'une très grande majorité de ces molécules a été modifiée afin de les rendre compatible avec leur usage clinique : chimérisation, humanisation, production recombinante sous la forme de fragments seuls ou fusionnés à une molécule effectrice. Qui plus est, le développement récent des approches d'évolution moléculaire *in vitro*, rend maintenant possible la modulation à façon de l'affinité, de la spécificité ou encore de la stabilité des anticorps monoclonaux. Le potentiel de l'évolution moléculaire *in vitro* des anticorps sera illustré à travers l'exemple de l'amélioration de la spécificité de reconnaissance d'un anticorps murin anti-progestérone.

SUMMARY Directed molecular evolution of antibodies

Antibodies play a key role in the immune system, are characterized by a homogeneous overall structure and by their ability to interact with an almost unlimited number of compounds. Encoded by a fixed number of genes, they acquire their specificity and affinity of recognition after a succession of genetic recombination and molecular mutation processes. Since the pioneer works of Kohler and Milstein in 1975 describing the possibility of producing monoclonal antibodies with pre-determined specificity, the use of antibodies in the fields of research, diagnosis and therapy has never stopped increasing. Thus, about twenty monoclonal antibodies have yet been

authorized to be used in human immunotherapy. However, a majority of these molecules have been engineered to bring them into line with their clinical use: chimerization, humanization, recombinant expression of single or fused fragments. Furthermore, the recent development of *in vitro* molecular evolution approaches now make it possible to engineer the affinity, the specificity as well as the stability of monoclonal antibodies. The potential of *in vitro* molecular evolution of antibodies will be illustrated through the example of the specificity improvement of an anti-progesterone antibody.

INTRODUCTION

C'est en 1975 que Georges Köhler et Cesar Milstein ont décrit la possibilité de générer à façon des hybridomes capables de sécréter des anticorps monoclonaux (AcM) de spécificité pré-déterminée. Ces travaux qui ont révolutionné l'immunologie sont à l'origine du développement des AcM en recherche et en diagnostic, deux domaines dans lesquels ils sont devenus des outils et des réactifs incontournables. En immunothérapie, leur utilisation est apparue un peu plus tardivement puisque le premier

AcM thérapeutique date de 1986. De nombreux autres anticorps thérapeutiques ont été validés au cours des dix dernières années, et plusieurs centaines d'autres sont actuellement en cours de validation. Les AcM utilisés à ce jour en thérapie concernent principalement la cancérologie, les rejets de greffes (activité immunosuppressive), le traitement des envenimations ou des intoxications, ainsi que le traitement de pathologies inflammatoires ou allergiques (Tableau I).

Nés de la découverte de la technique des hybridomes, les AcM ont véritablement pris leur essor en thérapie

avec le développement des technologies de l'ADN recombinant. En effet, ces dernières ont tout d'abord permis de diminuer le pouvoir immunogène des anticorps thérapeutiques, et ainsi de limiter le problème de la réponse HAMA (*Human Anti-Mouse Antibody*). Cette réponse immunitaire est due au fait que les anticorps d'origine murine, une fois injectés chez l'homme, sont

reconnus par l'organisme comme des molécules étrangères, ce qui empêche et limite leur administration répétée et donc leur performance *in vivo*. De manière à pallier ce problème majeur, des anticorps chimériques (Boulianne *et al.*, 1984; Owens & Young, 1994), puis humanisés (Johnson & Chiswell, 1993; Dall'Acqua *et al.*, 2005) ont été générés et produits *via* les approches

TABLEAU I. – Liste des anticorps thérapeutiques utilisés à ce jour.

Nom du produit	Compagnie	Origine et format	Isotype	Cible	Indication	Date de validation
<i>AcM non conjugués</i>						
Orthoclone OKT3 (muromab)	J & J	Murine	IgG2a	CD3	Rejet de greffe	1986
Reopro (abciximab)	Centocor	Chimérique	Fab	GpIIb/gpIIia	Ischémie	1994
Rituxan (rituximab)	Genentech	Chimérique	IgG1 humaine	CD20	Lymphome	1997
Zenapax (daclizumab)	Hoffmann-Laroche	Humanisé	IgG1 humaine	CD25 (récepteur Il-2)	Greffe de rein	1997
Remicade (infliximab)	Centocor	Chimérique	IgG1 humaine	TNF- α	Maladie de Crohn arthrite	1998
Simulect (basiximimab)	Novartis	Chimérique	IgG1 humaine	CD25 (récepteur Il-2)	Greffe de rein	1998
Synagis (palivizumab)	MedImmune	Humanisé	IgG1 humaine	RSV	Virus respiratoire syncytial	1998
Herceptin (trastuzumab)	Genentech	Humanisé	IgG1 humaine	Her-2 (récepteur)	Cancer du sein Autres cancers ?	1998
CroFab	Protherics	Ovine	Fab	Venin de serpent	Envenimations Crotales	2000
DigiFab	Protherics	Ovine	Fab	Digoxine	Overdoses à la Digoxine	2001
Campath-1H (alemtuzumab)	Genzyme	Humanisé	IgG1 humaine	CD52	Leucémie lymphocytaire chronique	2001
Humira (adalimumab)	Abbott	Humaine	IgG1 humaine	TNF	Arthrite rhumatoïde psoriasis	2002
Xolair (omalizumab)	Genentech	Humanisé	IgG1 humaine	IgE	Asthme	2003
Raptiva (efalizumab)	Genentech	Humanisé	IgG1 humaine	CD11a (LFA-1)	Psoriasis	2003
Erbix (cetuximab)	ImClone	Chimérique	IgG1 humaine	EGFR	Cancer colorectal avancé	2004
Avastin (bevacizumab)	Genentech	Humanisé	IgG1 humaine	VEGF	Cancer colorectal métastatique	2004
<i>Immuno-conjugués</i>						
Mylotarg (gemtuzumab)	Wyeth	Humanisé	IgG4 humaine conjuguée à la calicheamicine (streptomycète)	CD33	Leucémie myéloïde aiguë	2000
Zevalin (Ibritumomab tiuxetan)	Biogen-Idec	Murine	^{90}Y -IgG1	CD20	Lymphome non-Hodgkinien	2002
Bexxar (tositumomab)	Corixa	Murine	^{131}I -IgG2a	CD20	Lymphome	2003

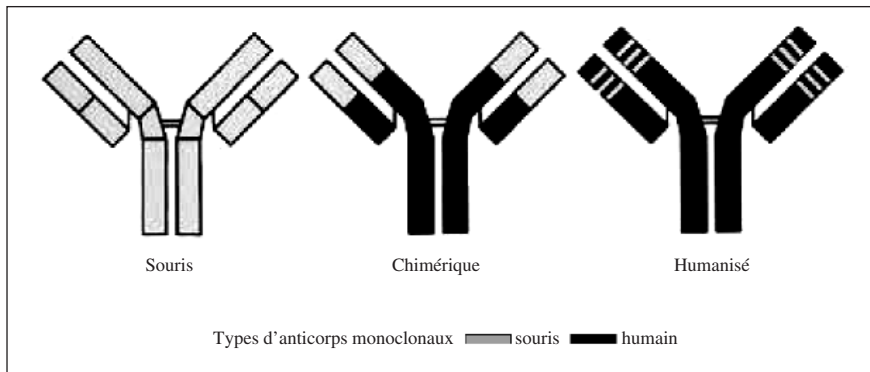


FIG. 1. – Représentations schématiques et comparatives d'anticorps. Anticorps murin en gris. Anticorps chimérique, qui associe des domaines variables d'anticorps de souris (en gris) à des régions constantes d'IgG1 humaines (en noir). Anticorps humanisé, dans lequel seules les boucles hypervariables (CDRs) issues d'un anticorps de souris (en gris) ont été greffées sur une charpente d'IgG1 humaine (en noir).

de l'ADN recombinant (Fig. 1). Un anticorps chimérique contient 60 % de séquences d'origine humaine, et résulte de la fusion des parties constantes des chaînes lourdes (C_{H1} , C_{H2} et C_{H3}) et légères (C_L) d'immunoglobulines humaines de type IgG1 aux parties variables murines (V_H et V_L) de l'anticorps d'intérêt. Un anticorps humanisé (90 % de séquences d'origine humaine) est lui obtenu par greffage des séquences hypervariables (ou CDR : *Complementarity Determining Regions*) de l'anticorps monoclonal murin d'intérêt au sein des parties variables d'un anticorps humain accepteur. Ces séquences portent les principaux éléments moléculaires et structuraux responsables des propriétés de liaison (affinité et spécificité) des anticorps. Ces anticorps qui présentent une moindre fraction de l'AcM de souris sont mieux tolérés par l'organisme humain et ont donc une demi-vie plus longue lors du traitement *in vivo* (Ying Khee Hwang & Foote, 2005).

Toutefois, l'immunogénicité des anticorps n'est pas la seule propriété qu'il est possible et parfois nécessaire de moduler par ingénierie moléculaire pour permettre leur utilisation chez l'homme. Ainsi, l'ingénierie des anticorps par évolution moléculaire dirigée permet d'adapter l'affinité, la spécificité, la stabilité, ou le format des anticorps afin de les rendre plus performants et/ou mieux adaptés aux besoins (Dall'acqua & Carter, 1998; Weiner & Carter, 2005). La principale difficulté liée à la réalisation de tels projets d'ingénierie des anticorps est due au fait que les approches moléculaires et structurales à mettre en œuvre sont à définir au cas par cas. Les caractéristiques structurales et de liaison de l'anticorps concerné, la nature biochimique et structurale de la molécule qu'il reconnaît, ainsi que la nature de la propriété que l'on souhaite modifier, sont les principaux éléments à prendre en compte. Les stratégies d'ingénierie moléculaire mises en œuvre visent à mimer et reproduire *in vitro* les processus naturels de maturation des anticorps qui reposent sur le triptyque mutations, recombinaisons et sélection (Chowdhury & Pastan, 1999). Il est souvent déterminant de disposer d'informations structurales décrivant le complexe formé entre l'anticorps d'intérêt et sa cible moléculaire, afin de cibler les positions ou la zone de l'anticorps les plus pertinents à modifier. La modification de manière aléatoire des domaines variables est également fréquemment réalisée afin d'identifier des positions au sein de l'anticorps suscep-

tibles de moduler indirectement certaines de ses propriétés. Enfin, la recombinaison (*DNA-shuffling*) des solutions issues de ces différentes approches permet de rechercher de possibles effets synergiques positifs (Brannigan & Wilkinson, 2002). Il n'existe donc pas une, mais plusieurs voies possibles d'ingénierie des anticorps, ce qui apparaît également vrai pour toutes les protéines d'une manière générale. Les différentes bibliothèques de variants ainsi générées sont le plus souvent produites par voie recombinante *in vivo* à la surface de bactériophages (Hinflay, 1998) ou de levures (Boder *et al.*, 2000), ou *in vitro* par *ribosome-display* (He & Taussig, 1997). La mise au point d'une stratégie de criblage appropriée (Hoogenboom, 2005) permet d'identifier les variants les plus pertinents par rapport aux objectifs recherchés.

Le potentiel de l'évolution moléculaire *in vitro* des anticorps sera illustré par la description des approches méthodologiques, de la démarche expérimentale, et des résultats obtenus lors du travail d'ingénierie moléculaire de la spécificité de reconnaissance d'un anticorps murin anti-progestérone humaine (Dubreuil, 2004; Dubreuil *et al.*, 2005).

LE C12G11, UN ANTICORPS AFFIN ET PEU SPÉCIFIQUE !

L'hybridome 15G12C12G11 qui sécrète l'anticorps murin monoclonal, nommé C12G11 par la suite, a été obtenu par la société de diagnostic bioMérieux après immunisation avec de la progestérone couplée à l'albumine bovine sérique. Il s'agit d'une immunoglobuline de type IgG1/k qui présente à la fois une affinité sub-nanomolaire ($K_D = 19 \cdot 10^{-12}$ M) pour la progestérone (Fig. 2A), et des pourcentages de réactions croisées élevés vis-à-vis des stéroïdes 5α -dihydroprogestérone (5α -DHP) et 5β -dihydroprogestérone (5β -DHP) de l'ordre de 20 à 30 %. Ce manque de spécificité est à l'origine de résultats surestimés lors des dosages. Afin d'améliorer les propriétés de reconnaissances de l'anticorps C12G11 nécessaires au développement d'un dosage sensible et spécifique de la progestérone, nous avons entrepris un projet d'ingénierie visant à la fois au maintien de son affinité sub-nanomolaire pour la progestérone et à la réduction de ses réactions croisées.

Afin de comprendre comment le C12G11 est capable de reconnaître avec des affinités sub-nanomolaires ces

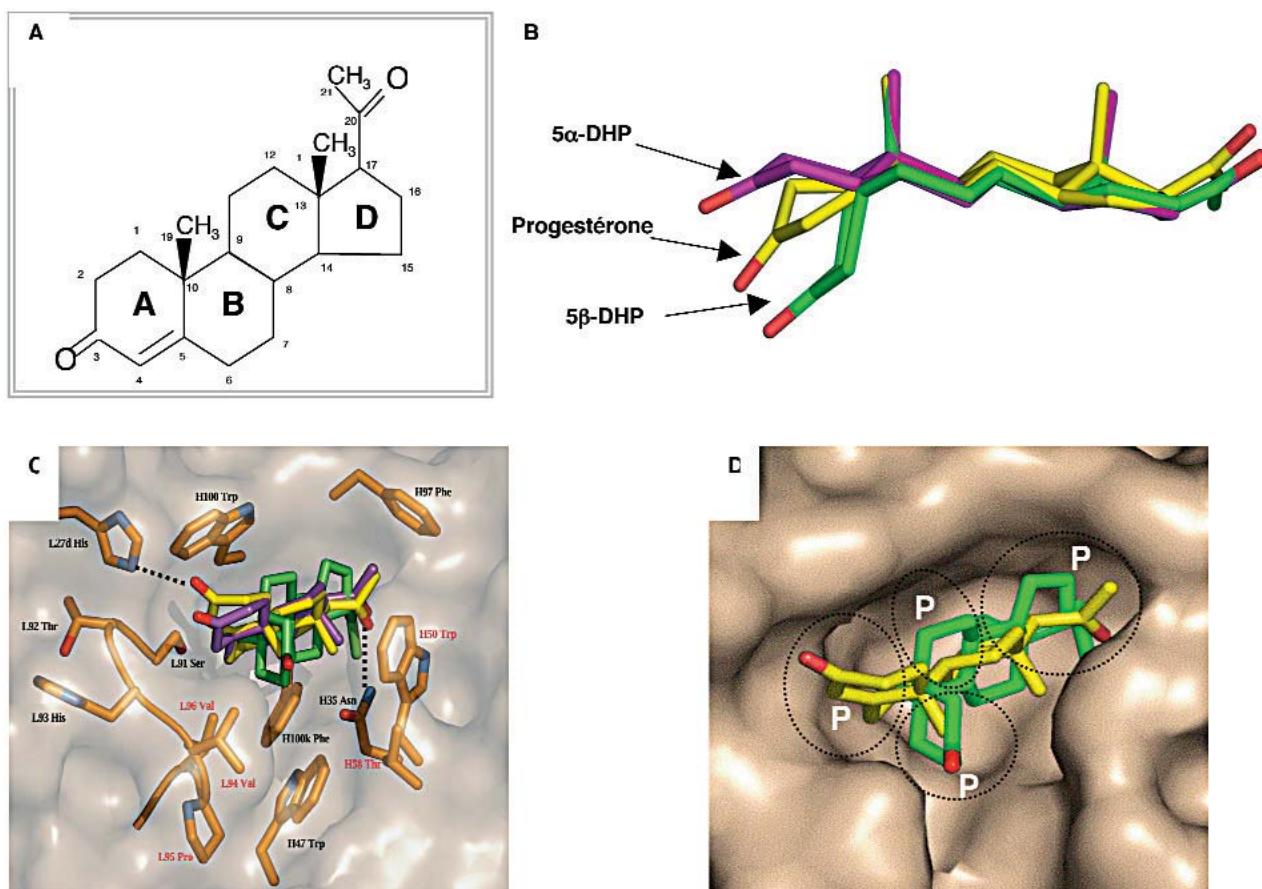


FIG. 2. – Modèles moléculaires. A) Représentation plane de la progestérone. B) Superposition de la progestérone (jaune), et de la 5 α -DHP (rose), et de la 5 β -DHP (vert). Les différences structurales sont localisées au niveau du cycle A des trois stéroïdes. C) Représentation du site de liaison du C12G11 modélisé avec ses trois ligands possibles. Les principaux acides aminés impliqués dans la liaison à la progestérone au niveau du domaine VL sont indiqués en rouge, ceux du domaine VH en noir. Le code couleur utilisé pour les stéroïdes est le même que précédemment. Les trois stéroïdes sont orientés dans le site de liaison par deux liaisons hydrogène diamétralement opposées impliquant les deux fonction cétone des cycles A et D. D) Modélisation de la cavité de liaison du C12G11, qui peut être divisée en quatre poches distinctes : P1, P2, P3 et P3' ; la progestérone (en jaune) utilise les poches P1, P2 et P3, alors que le cycle A de la 5 β -DHP (en vert) se place dans la poche P3'.

trois stéroïdes très proches chimiquement mais différents d'un point structural (Fig. 2B), nous avons modélisé (Fig. 2C) son site de liaison à partir de la structure obtenue par diffraction des rayons X d'un autre anticorps anti-progestérone (Arevalo *et al.*, 1993). On observe que le manque de spécificité est dû à l'existence d'une poche alternative de liaison notée P3' dans laquelle les cycles A des deux analogues se placent lors de l'interaction (Fig. 2D). Les acides aminés qui constituent cette poche P3' sont : une valine, une proline et une valine aux positions 94, 95 et 96 du CDR3 de la chaîne légère, un tryptophane et une thréonine aux positions 50 et 58 du domaine variable de la chaîne lourde (Fig. 2C).

ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE DU PARATOPE DU C12G11

De manière à réduire le volume de la poche P3', et donc à limiter l'interaction du C12G11 avec la 5 α -DHP

et la 5 β -DHP, nous avons tout d'abord muté individuellement les cinq acides aminés cités précédemment, et ce afin d'augmenter la taille et de réduire l'hydrophobicité de leurs chaînes latérales. Si la spécificité de reconnaissance de certains de ces mutants était bien améliorée, ces améliorations étaient systématiquement associées à des pertes d'affinité importantes pour la progestérone (Dubreuil, 2004 ; Dubreuil *et al.*, 2005). Ces premières expériences indiquent donc que la modification individuelle des acides aminés qui forment la poche P3' est possible, mais insuffisante pour atteindre les objectifs fixés initialement.

Deux nouvelles stratégies d'ingénierie du C12G11 ont donc été développées en parallèle, pour tenter d'augmenter sa spécificité de liaison. La première a consisté à muter simultanément les cinq acides aminés qui forment la poche P3', alors que la seconde concernait la modification par mutagenèse aléatoire de l'ensemble du domaine variable de la chaîne lourde (V_H). Les solutions issues de ces deux stratégies d'ingénierie ont finalement été combinées entre

elles afin de rechercher de possibles effets additifs. Dans le premier cas, les 20 acides aminés naturels ont été testés de manière combinatoire et systématique aux cinq positions préalablement identifiées, ce qui représente une diversité théorique de 20^5 combinaisons, soit $3,2 \cdot 10^6$ variants au total. Cette première bibliothèque (notée L3/H2) de variants a été générée par PCR par recouvrement (Horton *et al.*, 1989) en utilisant des oligonucléotides dégénérés et chevauchants (Fig. 3). La seconde bibliothèque a été obtenue par PCR inductrice d'erreurs (*error-prone PCR*) (Cadwell & Joyce, 1992). $5 \cdot 10^6$ mutants ont été obtenus, chacun contenant en moyenne 2 à 3 substitutions en acides aminés par molécule de V_H .

Criblages des deux bibliothèques de variants du C12G11

Les deux bibliothèques de variants ont été produites sous la forme de fragments de type scFv (*single chain*

Fragment variable) afin de simplifier leur expression en surface de bactériophages filamentueux. Un « scFv » est un fragment d'anticorps artificiel constitué dans notre cas du domaine variable de la chaîne légère (V_L) relié au domaine variable de la chaîne lourde (V_H) via un lien peptidique de 18 acides aminés. On obtient ainsi un polypeptide monocaténaire ayant les caractéristiques de liaison de l'anticorps entier, tout en étant plus simple à produire (Holliger & Hudson, 2005).

De manière à isoler les variants les plus spécifiques ayant conservé une haute affinité pour la progestérone, nous avons criblé les deux bibliothèques selon un schéma de criblage compétitif en solution. Les deux ensembles de phages exprimant à leur surface les variants ont été mis en présence d'un mélange contenant de la progestérone biotinyllée à une concentration proche de la constante de dissociation de l'anticorps sauvage, et d'un excès de mille fois de 5α - ou de 5β -DHP non biotinyllé. Ainsi, tous les variants qui ont conservé une haute affi-

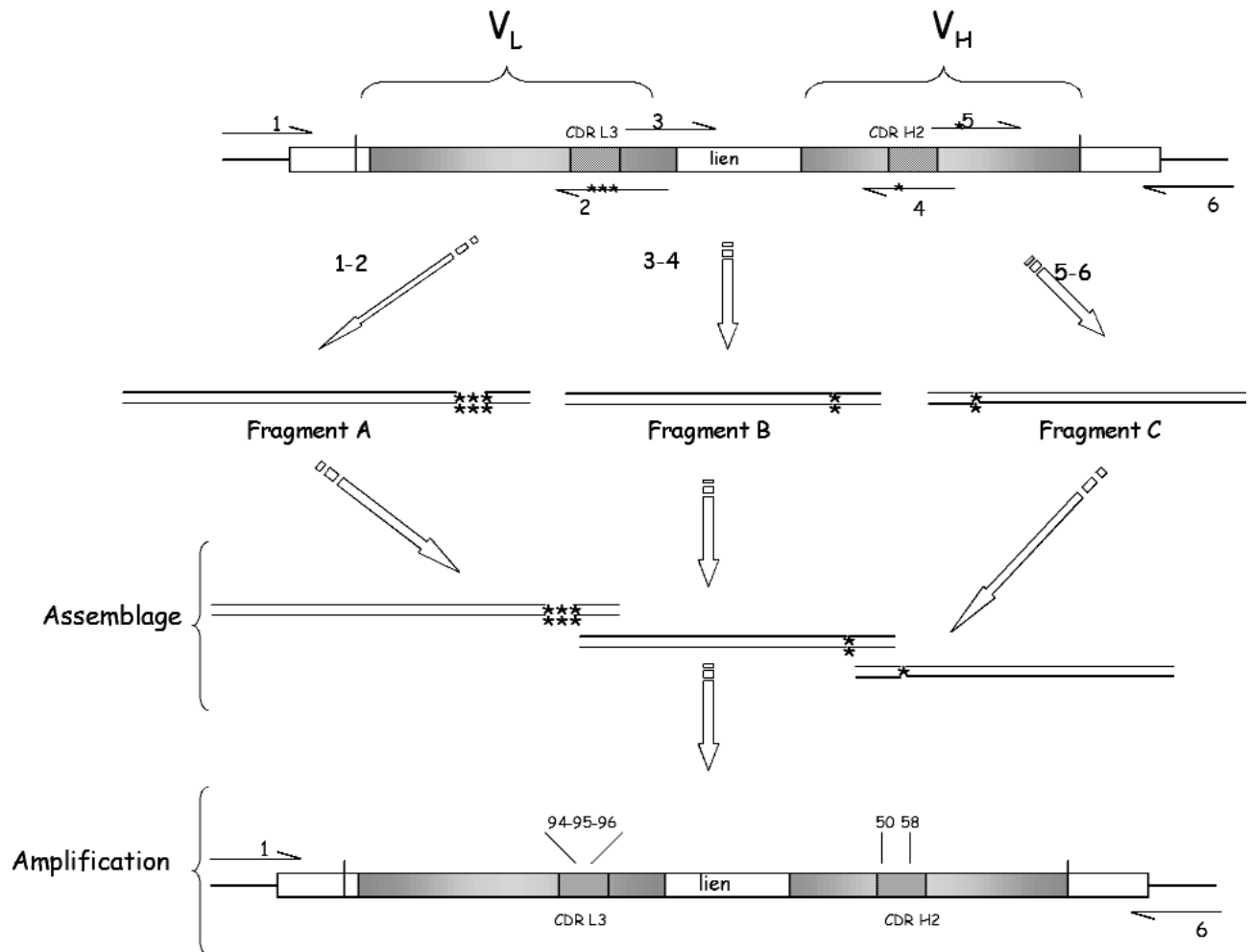


FIG. 3. – Schéma de construction de la banque L3/H2. Trois couples d'amorces chevauchantes sont nécessaires pour créer la diversité souhaitée aux positions L_{94} , L_{95} , L_{96} , H_{50} , et H_{58} du C12G11. Chacun des fragments d'ADN amplifiés et mutés par PCR, présente une séquence d'ADN complémentaire de recouvrement qui va permettre de reconstituer l'ADN codant les variants complets de scFv. Le symbole (*) indique la position des codons dégénérés. L'assemblage est réalisé en absence d'amorce nucléotidique, alors que l'amplification finale est réalisée à l'aide des amorces distales (notées 1 et 6).

nité pour la progestérone et perdu en capacité de reconnaissance de la 5 α - ou 5 β -DHP seront isolés à l'aide de billes magnétiques recouvertes de streptavidine, alors que les scFv caractérisés par une forte affinité pour l'un ou l'autre des deux stéroïdes analogues ne seront pas retenus. Cinq tours successifs de criblage ont été réalisés.

L'analyse des séquences des scFv ainsi sélectionnés a révélé que les variants retenus ont une structure primaire convergente. Ainsi aux positions 96 du domaine V_L et 50 du domaine V_H on retrouve systématiquement les deux acides aminés présents dans l'anticorps sauvage : respectivement une valine et un tryptophane. Cette observation indique que la présence des deux acides aminés sauvages à ces deux positions du site de liaison du

C12G11 est indispensable à la reconnaissance de la progestérone. Par contre aux trois autres positions mutées on observe des substitutions par rapport à la séquence sauvage. En lieu et place de la valine 94, on retrouve de manière majoritaire une proline, et à des niveaux moindres une arginine ou une lysine. La position 95, initialement occupée par une proline, présente maintenant majoritairement un acide aminé basique de type histidine ou arginine. Enfin, la thréonine initialement présente en position 58 du CDR2 du domaine V_H est remplacée par une arginine ou une histidine.

Le criblage de la bibliothèque des variants aléatoires du domaine V_H générés par *error-prone PCR* puis fusionnés au domaine V_L sauvage, a été effectué de manière similaire à celui de la bibliothèque L3/H2. L'analyse par

Clone	Séquences des clones analysés										Variations d'IC ₅₀			Réactions croisées (%)	
	Domaine VL			Domaine VH							Progéstérone	5 β -DHP	5 α -DHP	5 β -DHP	5 α -DHP
	1.94	1.95	1.96	H.31	H.32	H.50	H.52	H.56	H.58						
	V	P	V	N	Y	W	N	E	T						
Sauvage										1	1	1	26,0 \pm 5,4	19,0 \pm 1,0	
K56	-	-	-	-	-	-	-	K	-	3,6	2,4	1,3	45,3 \pm 1,4	32,2 \pm 10,5	
K52	-	-	-	-	-	-	K	-	-	2,4	3,3	3,5	22,4 \pm 3,5	21,5 \pm 3,5	
K31H32	-	-	-	K	II	-	-	-	-	1,3	1,5	1,2	26,7 \pm 5,4	18,0 \pm 2,1	
P-L-V-W-A + K56	P	L	-	-	-	-	-	K	A	1,6	3,2	16	14,5 \pm 0,6	4,9 \pm 0,5	
P-L-V-W-A + K52	P	L	-	-	-	-	K	-	A	6,6	12,8	34,9	13,1 \pm 1,2	4,7 \pm 1,0	
P-L-V-W-A + K31H32	P	L	-	K	II	-	-	-	A	2	10	27	7,6 \pm 2,0	1,9 \pm 0,5	
P-L-V-W-A	P	L	-	-	-	-	-	-	A	1,4	4,3	8,4	11,4 \pm 3,2	3,3 \pm 0,15	
P-R-V-W-R + K56	P	R	-	-	-	-	-	K	R	2,5	15,4	16,9	5,7 \pm 0,6	3,9 \pm 1,3	
P-R-V-W-R + K52	P	R	-	-	-	-	K	-	R	16,8	60	107	10,4 \pm 1,2	5,0 \pm 0,6	
P-R-V-W-R + K31H32	P	R	-	K	II	-	-	-	R	0,7	3,9	9,7	4,7 \pm 0,6	1,9 \pm 0,2	
P-R-V-W-R	P	R	-	-	-	-	-	-	R	2	9,1	12,7	7,0 \pm 1,1	2,8 \pm 0,4	
P-H-V-W-R + K56	P	II	-	-	-	-	-	K	R	5	26,3	32,9	6,9 \pm 2,9	2,8 \pm 0,4	
P-H-V-W-R + K52	P	II	-	-	-	-	K	-	R	13,5	43,6	87	7,3 \pm 0,3	2,8 \pm 0,3	
P-H-V-W-R + K31H32	P	II	-	K	II	-	-	-	R	1	10,1	8,8	3,4 \pm 0,4	1,6 \pm 0,4	
P-H-V-W-R	P	H	-	-	-	-	-	-	R	2,8	13,5	20,8	5,8 \pm 1,9	2,2 \pm 0,2	
P-H-V-W-D + K56	P	II	-	-	-	-	-	K	D	1,7	7,3	17,8	11,8 \pm 1,7	3,6 \pm 0,8	
P-H-V-W-D + K52	P	II	-	-	-	-	K	-	D	5,7	24,9	42,6	7,1 \pm 0,5	3,3 \pm 1,1	
P-H-V-W-D + K31H32	P	II	-	K	II	-	-	-	D	2,2	13,3	21,2	5,1 \pm 1,4	1,9 \pm 0,5	
P-H-V-W-D	P	II	-	-	-	-	-	-	D	1,3	4,8	8,3	7,0 \pm 1,8	2,9 \pm 0,1	

FIG. 4. – Caractérisation ELISA compétitifs (format scFv-phage) des variants du C12G11. Les résultats obtenus pour ces variants sont comparés au fragment sauvage et aux variants issus de la banque L3/H2 ou de la banque aléatoire. Les caractères gras identifient des variants combinés dont les propriétés de liaison sont améliorées par rapport aux mutants non combinés de référence. Les différents variants construits et sélectionnés ont été produits individuellement sous la forme de phage-scFv selon un schéma d'ELISA en compétition dans lequel de la progestérone immobilisée est mise en présence d'une concentration fixe de phage-scFv et de concentrations croissantes de progestérone, de 5 α - ou de 5 β -DHP soluble. La séquence en acides aminés de l'anticorps C12G11 de départ est indiquée, ainsi que celles de l'ensemble des variants analysés. Un (-) indique que l'acide aminé trouvé à une position donnée est identique à celui du C12G11 sauvage. L'affinité relative de ces différents variants est évaluée par détermination de l'IC₅₀ (concentrations de progestérone, de 5 α -DHP ou de 5 β -DHP, qui diminuent de moitié le signal ELISA de départ mesuré en absence de compétiteur soluble).

séquençage de plusieurs clones issus de ce criblage a permis d'identifier quatre mutations redondantes. Les positions 52 et 56 du domaine VH initialement et respectivement occupées par une asparagine et un acide glutamique présentent maintenant toutes les deux un résidu de type lysine (mutations notées K_{H52} ou K_{H56}). Par ailleurs, on peut noter la présence d'une double mutation aux positions 31 et 32, où l'asparagine et la tyrosine initiales sont respectivement remplacées par une lysine et une histidine (double-mutant noté $K_{H31}H_{H32}$).

Caractérisation des variants générés

De manière à établir expérimentalement et de manière comparative les propriétés de liaison des différents variants isolés à partir du criblage des deux bibliothèques, ainsi que des combinaisons réalisées entre elles, nous les avons tout d'abord testés individuellement en ELISA (Fig. 4). De ces expériences, il ressort tout d'abord que l'ensemble des variants issus de la bibliothèque L3/H2 sont tous plus spécifiques que l'anticorps sauvage, le meilleur d'entre eux étant le trimutant $P_{L94}H_{L95}R_{H58}$ noté « $P_{L94}H_{L95}V_{L96}W_{H50}R_{H58}$ » dans la figure 4. Par contre, on note que les trois types de mutations redondantes issues de la stratégie aléatoire sont, après transfert dans l'anticorps sauvage, soit neutres (cas des mutants K_{H52} et $K_{H31}H_{H32}$) ou défavorables (mutant K_{H56}). Toutefois, une fois combiné avec les différents variants issus de la bibliothèque L3/H2, on observe un effet synergique positif du double-mutant $K_{H31}H_{H32}$, et ce quel que soit le variant L3/H2 auquel il est combiné (Fig. 4). Le meilleur des variants obtenu étant finalement le pentamutant « $P_{L94}H_{L95}R_{H58} + K_{H31}H_{H32}$ ».

De manière à établir les affinités en solutions de nos deux meilleurs variants pour la progestérone, la 5α -DHP et la 5β -DHP, nous les avons sous-clonés et produits sous la forme de fragments de type scFv soluble dans le périplasma bactérien. Après purification (*via* leur extrémité poly-histidines) et dosage, les scFv ont été utilisés dans des expériences de résonance plasmonique de surface en solution et en compétition (Nieba *et al.*, 1996). Ainsi, le variant le plus évolué présente une spécificité respectivement 23 et 15 fois plus grande que celle de l'anticorps de départ vis-à-vis de la 5β - et la 5α -dihydroprogestérone et ce, tout en gardant une affinité picomolaire pour la progestérone (Fig. 5).

CONCLUSIONS

Comme démontré précédemment dans le cas d'un anticorps, il est possible de faire évoluer artificiellement une protéine de manière à lui conférer de nouvelles propriétés, ici une spécificité améliorée par rapport à la molécule de départ. Ce travail permet de tirer plusieurs enseignements en matière d'ingénierie des protéines.

Le premier est qu'il n'existe pas un chemin unique pour atteindre l'objectif fixé, et que les meilleurs résultats sont souvent obtenus à l'issue de la combinaison de solutions qui ont été sélectionnées indépendamment les

unes des autres *via* des approches différentes. Chaque approche apporte son propre lot de solutions, et certaines d'entre elles sont indépendantes et additives. Cette indépendance et additivité de certaines mutations est fréquemment observée en matière d'ingénierie de l'affinité de reconnaissance des anticorps, ou encore de l'amélioration de la stabilité des protéines en général.

Il ressort également, que des solutions neutres dans un contexte particulier sont susceptibles d'être bénéfiques dans un autre environnement structural. Il est donc fondamental en matière d'évolution moléculaire des protéines d'associer mutagenèse et recombinaison moléculaire. Ceci peut être réalisé à la fin du programme d'évolution moléculaire dirigée, comme ce fut notre cas, ou par alternance de tours successifs de mutagenèse aléatoire et de recombinaison tout au long de la procédure d'ingénierie.

La taille des bibliothèques de variants générées est également un élément déterminant. IL faut en effet veiller à ne pas générer des bibliothèques de variants dont la diversité théorique est supérieure à ce que la stratégie d'expression/criblage utilisée permet d'analyser. La limite supérieure des méthodes de transformation des cellules hôtes par les banques de gènes est de 10^9 - 10^{10} variants. Les approches *in vitro* : *ribosome*- ou *mRNA-display* permettent quant à elles d'analyser jusqu'à 10^{11} - 10^{13} variants. Notons que seule la technologie du *phage-display* qui nécessite l'emploi de bactéries est à ce jour accessible à la majorité des laboratoires de recherche. Sachant que trouver les molécules d'intérêt dépend de la capacité à analyser un large espace structural, il est préférable de générer plusieurs bibliothèques de tailles raisonnables (10^5 - 10^7 membres) puis de combiner entre elles les solutions issues de leur criblage.

Un autre élément crucial en matière d'évolution moléculaire dirigée est la capacité à cribler ou à sélectionner. La sélection s'effectue après transformation de cellules (bactéries, levures etc.), l'expression d'un variant particulier d'une protéine (une enzyme le plus souvent) étant couplée à la survie de la cellule. Le criblage s'effectue lui principalement *in vitro*, et va nécessiter de tester individuellement (criblage à moyen ou haut débit) ou globalement (*phage*, *ribosome* ou *mRNA-display*) l'ensemble des variants présents dans la bibliothèque. Sachant que c'est le schéma de criblage mis en œuvre, ou la stratégie de sélection utilisée qui déterminera la nature des variants que l'on sera capable d'isoler : "You get what you screen for", il est donc fondamental de se doter d'outils de criblage ou de procédures de sélection pertinents par rapport aux protéines manipulées et aux objectifs fixés.

En conclusion, les progrès technologiques et méthodologiques de ces dernières années ont ouvert un vaste champ d'exploration en matière d'ingénierie des protéines. Cette évolution technologique trouve de nombreuses applications en offrant en particulier la possibilité aux chercheurs d'élaborer de nouvelles molécules : anticorps, enzymes, ou antigènes vaccinaux, mieux adaptés aux besoins et à la demande de la société dans

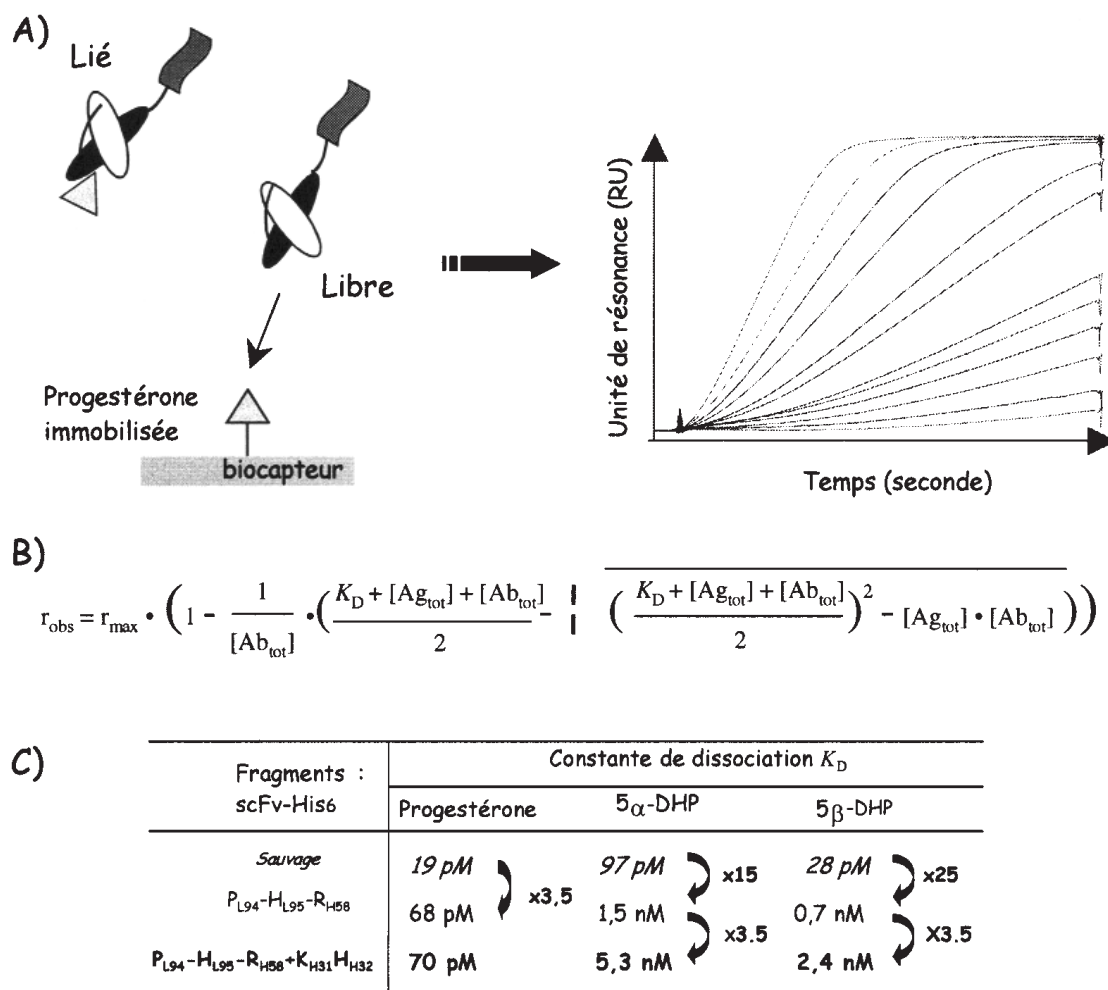


FIG. 5. – Expériences de résonance plasmonique de surface. A) Représentation schématique du dosage effectué : une concentration fixe de fragments d'anticorps recombinants est mise en présence de concentrations croissantes de progesterone, de 5 α -DHP, ou de 5 β -DHP. Les fragments non liés sont dosés par résonance plasmonique de surface grâce à une sensorchip activée avec de la progesterone. Profil des sensorgrammes obtenus pour une concentration fixe de scFv-His₆ préalablement incubés avec différentes concentrations de compétiteur. B) Forme littérale de l'équation qui permet de déterminer les K_D en solution des différents fragments d'anticorps sauvage ou mutés pour la progesterone, la 5 β -DHP et la 5 α -DHP, et ce à l'aide de la représentation des pentes en RU/seconde en fonction de la quantité de compétiteur (Nieba *et al.*, 1996). C) Tableau final des variations des valeurs de la constante de dissociation (K_D) du C12G11 sauvage du triple mutant, et du penta mutant. Note : Sensorship : support physique utilisé dans la technologie BioCore ; Sensorgramme : tracé expérimental obtenu lors d'expérience de résonance plasmonique de surface ; Résonance plasmonique de surface : principe physique mis en œuvre dans le cadre de la technologie BioCore.

les domaines du diagnostic, de la thérapie, de la vaccinothérapie, de l'imagerie médicale, des applications industrielles, de l'écologie, de la biodéfense, ou encore de la bioéthique.

BIBLIOGRAPHIE

- Arevalo J. H., Stura E. A., Taussig M. J. & Wilson I. A., Three-dimensional structure of an anti-steroid Fab' and progesterone-Fab' complex. *J. Mol. Biol.*, 1993, 231, 103-118.
- Boder E. T., Midelfort K. S. & Wittrup K. D., Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *P. N. A. S. USA*, 2000, 97, 10701-10705.
- Boulianne G. L., Hozumi N. & Shulman M. J., Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, 1984, 312, 643-646.
- Brannigan J. A. & Wilkinson A. J., Protein engineering 20 years on. *Nature Reviews*, 2002, 3, 964-970.
- Cadwell R. C. & Joyce G. F., Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Methods Appl.*, 1992, 2, 28-33.
- Chowdhury P. S. & Pastan I., Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation *in vitro*. *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 568-572.
- Dall'Acqua W. F. & Carter P., Antibody engineering. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, 8, 443-450.
- Dall'Acqua W. F., Damschroder M. M., Zhang J., Woods R. M., Widjaja L., Yu J. & Wu H., Antibody humanization by framework shuffling. *Methods*, 2005, 36, 43-60.
- Dubreuil O., Amélioration de la spécificité de reconnaissance d'un anticorps anti-progesterone par évolution moléculaire diri-

- gée. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, 19 novembre 2004.
- Dubreuil O., Bossus M., Graille M., Bilous M., Savatier A., Stura E., Jolivet M., Ménez A., & Ducancel F., Fine tuning of the specificity of an anti-progesterone antibody by first and second sphere residue engineering. *J. Biol Chem.*, 2005, 280 (26), 24880-24887.
- He M. & Taussig M. J., Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 5132-5134.
- Hinfray J., Le phage display (Technoscope). 1998, 182, 1-11.
- Holliger P. & Hudson P. J., Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 2005, 23, 1126-1136.
- Hoogenboom H. R., Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 2005, 23, 1105-1116.
- Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K. & Pease L. R., Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77, 61-68.
- Jonhson K. S. & Chiswell D. J., Human antibody engineering. *Current Biology*, 1993, 3, 564-571.
- Kholer G. & Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256, 495-497.
- Nieba L., Krebber A. & Plückthun A., Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal. Biochem.*, 1996, 234, 155-165.
- Owens R. J. & Young R. J., The genetic engineering of monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 1994, 168, 149-165.
- Weiner L. M. & Carter P., Tunable antibodies. *Nature Biotechnology*, 2005, 23, 556-557.
- Ying Khee Hwang W. & Foote J., Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, 2005, 36, 3-10.
-