



HAL
open science

Particularités des anticorps de lama et autres camélidés et leurs intérêts thérapeutiques

Eileen Schneider

► **To cite this version:**

Eileen Schneider. Particularités des anticorps de lama et autres camélidés et leurs intérêts thérapeutiques. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03830617

HAL Id: dumas-03830617

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03830617>

Submitted on 26 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2022

**PARTICULARITÉS DES ANTICORPS DE LAMA ET AUTRES
CAMÉLIDÉS ET LEURS INTÉRÊTS THÉRAPEUTIQUES**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 17 février 2022

par

Eileen, Magdalena SCHNEIDER

sous la direction de

Delphine Le Roux

JURY

Président du jury :	M. Matthias KOHLHAUER	Maître de Conférences à l'EnvA, HDR
Directrice de thèse :	Mme Delphine LE ROUX	Maître de Conférences à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Véronica RISCO-CASTILLO	Maître de Conférences à l'EnvA

Liste des personnes intervenant dans l'enseignement



Directeur : Pr Christophe Degueurce
Directeur des formations : Pr Henry Chateau
Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Professeurs émérites : Pr Pascal Fayolle, Pr Bernard Paragon
Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Elevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - **Adjoint :** Pr Blot Stéphane

<p>Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs - Pr Verwaerde Patrick</p> <p>Discipline : cardiologie - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier contractuel</p> <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie - Dr Pignon Charly, Ingénieur de recherche - Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Discipline : dermatologie - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Discipline : ophtalmologie - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de clinique équine - Pr Audigié Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Coudry Virginie, Praticienne hospitalier contractuelle - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Mespouilhès-Rivière Céline, Ingénieure de recherche-Praticienne hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tallaj Amélie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel</p>	<p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale - Dr Benckroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Maurey-Guénéac Christelle, Maître de conférences - Dr Mortier Jérémy, Maître de conférences associé</p> <p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Fontbonne Alain - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale - Dr Decambron Adeline, Maître de conférences - Pr Manassero Mathieu - Dr Maurice Emeline, Assistante d'Enseignement et de Recherche Contractuelle - Pr Viateau-Duval Veronique*</p>
---	--

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - **Adjoint :** Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments - Dr Bolnot François, Maître de conférences* - Pr Carlier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mtimet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle</p> <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Dr Guétin Poirier Valentine, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier contractuel - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences</p>	<p>Unité pédagogique de reproduction animale - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences* - Pr Grimard-Ballif Bénédict - Pr Ponter Andrew</p> <p>Rattachée DPASP - Dr Wolgust Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle</p>
--	--

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - **Adjoint :** Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline*</p> <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences*</p> <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Jouvion Grégory, Professeur associé - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences*</p> <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Marnignac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée</p>	<p>Unité de parasitologie, mycologie - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Pr Guillot Jacques - Dr Polack Bruno, Maître de conférences* - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud</p> <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Rattachée DSBP - Mme Dalaine Stéphanie, Professeur agrégée (Sciences de la Vie et de la Terre)</p>
---	---

* responsable d'unité pédagogique

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, M Matthias Kohlhauer, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,

Mes hommages les plus respectueux.

A Mme Delphine Le Roux, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir confié cette thèse, pour vos conseils et votre bienveillance, et pour le temps consacré aux corrections de mon manuscrit,

Mes sincères remerciements.

A Mme Véronica Risco-Castillo, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse,

Mes sincères remerciements.

A ma maman, merci pour ton amour et ton soutien indéfectible. Tu es une maman extraordinaire. Je t'aime.

A mon papa, merci d'avoir été à l'origine de cette passion.

A papi et mamie, merci pour tout votre amour et surtout d'avoir toujours été présents, vous êtes le socle de cette famille et ma force.

A mes frère et sœur, Nils et Heidi, sans oublier Anthony et Adeline, merci d'avoir toujours été là pour moi, la vie est bien plus belle lorsqu'elle est partagée.

A Ryan, Lexie et Raphaël, merci d'illuminer ma vie à chaque instant.

A Toto, Lili, Mirò, et Penny, Popo et tous les autres que je n'oublierai jamais, pour avoir contribué à ce rêve.

A Patrice, merci d'être l'homme que tu es et d'être toujours à mes côtés. Je t'aime.

Table des matières

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	11
Introduction	17
Première partie : Spécificités des anticorps, dont les anticorps de lamas et autres camélidés	21
1. L'anticorps : de sa découverte à la connaissance actuelle de sa conformation	21
A. <i>L'essor de l'immunologie</i>	21
a. Les anticorps décrits à travers l'Histoire.....	21
b. L'étude des anticorps : avancée des techniques de laboratoire au service de l'immunologie	23
• L'électrophorèse	24
• La cristallographie aux rayons-X	25
• La chromatographie d'affinité	25
• La précipitation au sulfate d'ammonium	26
• La technique de phage-display.....	26
c. De l'anticorps au nanocorps	27
• L'émergence des anticorps à domaine unique.....	27
• La découverte des anticorps à domaine unique.....	28
• Le rôle des anticorps à domaine unique.....	29
B. <i>La structure des anticorps : entre conservation et variation</i>	30
a. Les anticorps conventionnels	30
• L'anticorps à différentes échelles : de sa séquence d'acides aminés à sa structure tridimensionnelle	30
• Le site de fixation à l'antigène : la région variable	32
• La région constante	36
• La région charnière, source de flexibilité des anticorps.....	36
b. Acquisition de la variabilité des anticorps.....	36
• La génération d'isotypes.....	37
• Le contrôle de l'information génétique.....	38
2. Les anticorps à domaine unique, à l'origine des nanocorps.....	46
A. <i>La structure particulière des anticorps à domaine unique</i>	47
B. <i>L'existence d'isotypes</i>	50
C. <i>Le génome des camélidés</i>	51
a. Les gènes de la région constante.....	53
b. Les segments V.....	54
c. Les réarrangements de VDJ.....	55
d. Les mécanismes de diversification des anticorps à domaine unique	55
• Les particularités de séquence	55
• L'hypermutation somatique	56
• Les phénomènes d'insertion/délétion	56
• La conversion de gènes	56
e. Les clés de la convergence évolutive	56
D. <i>Les propriétés des nanocorps</i>	57
a. La solubilité.....	57
b. La stabilité thermodynamique.....	58
• La stabilité thermique	58
• La stabilité chimique	59
c. La demi-vie	59
d. L'affinité	60
e. La spécificité	60

<i>E. La réponse de l'hôte : une faible immunogénicité</i>	61
<i>F. Génie biologique : la production de nanocorps</i>	61
a. L'immunisation de camélidés	61
b. Les bibliothèques synthétiques	63
c. « Humanisation » de nanocorps.....	65
<i>G. Synthèse des avantages des nanocorps comparés aux anticorps conventionnels</i>	66
<i>H. Discussion des limites d'utilisation des nanocorps</i>	67
a. « L'humanisation » de camélidés	67
b. La question de la gestion des déchets biologiques	67
c. Conformation et limites d'utilisation des nanocorps	67
d. Efficacité observée en conditions physiologiques	68
e. Développement de molécules concurrentes	68
Deuxième partie : Utilisations des anticorps de lama et autres camélidés dans les domaines de la recherche, de la médecine et de l'industrie	71
1. Utilisation dans le domaine de la recherche	73
A. <i>Biotechnologies</i>	73
a. Couplage avec des fluorochromes	73
b. Spectrométrie de masse (SM).....	75
c. Ciblage de protéines.....	78
• Protéines de surfaces cellulaires.....	78
• Cytokines et autres protéines solubles.....	78
• Protéines intracellulaires	79
B. <i>Cristallisation, agrégation, régulation des protéines</i>	79
a. Étude de la conformation par cristallisation.....	79
b. Agrégation des protéines.....	80
c. Régulation des protéines.....	82
C. <i>Identification et neutralisation d'agents pathogènes : une ouverture sur les indications diagnostiques et thérapeutiques des nanocorps</i>	82
a. Bactéries et phages	82
• Prophylaxie dans le développement de caries dentaires	83
• Traitement des entérites chez le porcelet.....	83
• Modulation d'antibiothérapie.....	83
b. Virus.....	84
c. Parasites.....	84
d. Champignons et protozoaires.....	85
e. Toxines	86
f. Haptènes	86
2. Utilisation diagnostique	87
A. <i>Techniques de diagnostic des infections</i>	87
B. <i>Diagnostic précoce d'Alzheimer</i>	87
a. Les lésions d'intérêt.....	87
b. Un défi diagnostique	88
c. Développement et applications diagnostiques	89
C. <i>Diagnostic de cancers</i>	90
a. Utilisation de nanocorps couplés pour l'imagerie	91
• La tomographie par émission de positons ou monophotonique (TEP).....	91
• La fluorescence proche infrarouge (NIR)	93
• L'imagerie cellulaire	93
b. Exemple de diagnostic : les glioblastomes.....	94
3. Utilisation thérapeutique	95
A. <i>Les nanocorps : variable sources de traitements de cancers</i>	96
a. Les antigènes tumoraux : cibles de thérapies	97
b. Étude de stratégies thérapeutiques dépendantes des nanocorps à l'aide de divers modèles de cancers .	97
• Induction de cytotoxicité : les carcinomes	97
• Induire la lyse cellulaire : les cancers épidermoïdes	99

• Cibler les intermédiaires tumoraux : les mélanomes	99
• Limiter le développement et le processus métastatique : l'adénocarcinome mammaire	100
• Induire l'apoptose : le cancer du côlon	102
c. Les anticorps multivalents	103
d. Nouvelles perspectives de traitement.....	104
• Modulation de la vascularisation tumorale	104
• Les nanocorps : outils d'immunothérapie	105
• Une immunotoxine contre le myélome multiple	106
• L'utilisation « d'Affibodies »	107
B. Applications aux maladies inflammatoires	108
a. Les maladies auto-immunes.....	108
• Cibler les récepteurs de molécules pro-inflammatoires.....	109
• Les récepteurs au TNF	111
• Les récepteurs des chimiokines	112
b. Le syndrome à réponse inflammatoire systémique	112
C. Développement de vaccins	112
a. VHH et vaccins	112
b. Vaccins à assemblage moléculaire	113
c. De nouveaux protocoles vaccinaux.....	114
D. Application aux infections : les nanocorps, une solution aux problèmes de santé publique ?.....	114
a. Des nanocorps neutralisants dirigés contre des virus	115
b. Étude de nanocorps multivalents contre des infections virales	116
c. Cas d'épizootie	116
d. Espoirs pour la pandémie de COVID-19	116
e. Protéines oncogènes.....	121
E. Applications industrielles.....	121
F. Développement de médicaments et réactifs	122
a. Virus syncytial respiratoire du nourrisson	123
b. Contrôle de l'agrégation plaquettaire.....	123
• Rappels de la physiologie de l'hémostase	124
• Maladie de Willebrand	125
c. Traitements anti-venins ou « plantivenins »	125
d. Perspectives de traitement des troubles neurodégénératifs	126
e. Une perspective de traitements antipelluculaires	131
G. Molécules anti-virales pour les plantes ou « plantibodies »	132
Conclusion : Nanocorps, de petits anticorps avec de grandes indications	135
Liste des références bibliographiques	139
Annexe 1 : Les antigènes tumoraux, variables cibles thérapeutiques des nanocorps	155
Annexe 2 : Rôles de TNFR1 et TNFR2 évalués indépendamment dans divers modèles de souris et données disponibles chez l'homme.....	158

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur les génomes mitochondriaux complets des camélidés de l’Ancien et du Nouveau Monde (Burger, 2016).	19
Figure 2 : Modèle d’anticorps établi par Porter, d’après (Porter, 1973).	22
Figure 3 : Double diffusion entre chaînes légères (L) et chaînes lourdes (H), obtenues à partir d’IgG de lapin et antisérum Fc et Fab de chèvre. Expérience menée par Porter (Porter, 1973).....	23
Figure 4 : Paul Ehrlich (14 Mars 1854 – 20 Août 1915) et ses dessins de la théorie des chaînes latérales, d’après (Kaufmann, 2008).	24
Figure 5 : Structure cristallographique aux rayons C d’un anticorps IgG, illustrée par un diagramme en ruban des squelettes des chaînes polypeptidiques, d’après (Kenneth et Weaver, 2017).	25
Figure 6 : Principe de la technique « phage display » avec le bactériophage M13, d’après (Leow <i>et al.</i> , 2017).	27
Figure 7 : Représentation du squelette d’une IgG1 humaine, obtenue à partir de son alpha-carbon trace, d’après (Davies <i>et al.</i> , 1990).	31
Figure 8 :Schéma de la structure en Y d’une immunoglobuline G, d’après (Crowe <i>et al.</i> , 2015). ..	32
Figure 9 : Structure de l’anticorps, d’après (Punt <i>et al.</i> , 2019).	33
Figure 10 : Organisation des segments de gènes de la lignée germinale des Ig de souris, d’après (Punt <i>et al.</i> , 2019).	34
Figure 11 : La diversité combinatoire du site de fixation à l’antigène est le produit d’un gradient imbriqué de diversité, d’après (Schroeder et Cavacini, 2010).	35
Figure 12 : Flexibilité de mouvement des bras de l’anticorps permise par les régions charnières, d’après (Kenneth et Weaver, 2017).	36
Figure 13 : Isotypes humaines : IgM, IgA, IgD, IgG, IgE, d’après (Schroeder et Cavacini, 2010). ..	38
Figure 14 : Organisation germinales des chaînes lourdes et légères dans le génome humain, d’après (Kenneth et Weaver, 2017).	39
Figure 15 : Représentation en deux dimensions d’une molécule d’IgG, d’après (Schroeder et Cavacini, 2010).	40
Figure 16 : Construction des Ig à partir de gènes, , d’après (Kenneth et Weaver, 2017).	41
Figure 17 : Organisation germinale des segments VH, d’après (Conrath <i>et al.</i> , 2003).	42
Figure 18 : Séquences RSS adjacentes aux segments de gènes (Kenneth et Weaver, 2017).	43
Figure 19 : Régions CDR de la chaîne légère formant le site de fixation à l’antigène et sa combinaison avec une chaîne lourde, d’après (Kenneth et Weaver, 2017).	44

Figure 20 : Mécanisme d'action de l'AID qui participe à la fois à la SHM et la CSR, d'après (Kenneth et Weaver, 2017).....	45
Figure 21 : Émergence des anticorps à domaine unique chez les camélidés, d'après (Conrath <i>et al.</i> , 2003).	47
Figure 22 : Photos de camélidés, d'après (Wheeler, 2012 ; Nagy <i>et al.</i> , 2021).	48
Figure 23 : Structure cristalline d'un nanocorps, d'après (Beghein et Gettemans, 2017).	49
Figure 24 : Représentation de la structure des isotypes des Ig G, d'après (Conrath <i>et al.</i> , 2003).	50
Figure 25 : Comparaison des séquences nucléotidiques de VH et VHH, d'après (Nguyen <i>et al.</i> , 2000).	52
Figure 26 : Représentation schématique du domaine VHH d'un anticorps à domaine unique de camélidés, d'après (Wesolowski <i>et al.</i> , 2009).	58
Figure 27 : Obtention d'un répertoire d'Ac de camélidés, d'après (Sun <i>et al.</i> , 2021).	63
Figure 28 : Exemple d'anticorps « humanisés », d'après (Kenneth et Weaver, 2017).	65
Figure 29 : Domaines d'application des affibodies : thérapie, imagerie, biotechnologies, d'après (Löfblom <i>et al.</i> , 2010).	69
Figure 30 : Logo de la société Ablynx.	71
Figure 31 : Chronologie des principales avancées scientifiques dans le domaine de l'ingénierie des anticorps monoclonaux en orange et nanocorps en vert, jusqu'en 2018, d'après (Arbabi-Ghahroudi, 2017).	72
Figure 32 : Structures des anticorps conventionnels, des anticorps à chaîne lourde des camélidés et des requins, d'après (Wesolowski <i>et al.</i> , 2009).	73
Figure 33 : Coloration immunocytochimique de V γ 9V δ 2-TCR à l'aide de VHH ;, d'après (de Bruin <i>et al.</i> , 2016).	74
Figure 34 : Marquage à l'ester de N-hydroxysuccinimide pour la microscopie à super-résolution, d'après (Beghein et Gettemans, 2017).	75
Figure 35 : Microscopie super-résolution de cellules vivantes, d'après (Ries <i>et al.</i> , 2012).	75
Figure 36 : « Nanobody footprinting », d'après (Audenhove <i>et al.</i> , 2013).	76
Figure 37 : Étude du transport peroxysomal, d'après (Beghein <i>et al.</i> , 2016).	77
Figure 38 : Représentation schématique de la méthode F3H, d'après (Herce <i>et al.</i> , 2013).	81
Figure 39 : Les cellules de la barrière hémato-encéphalique, d'après (Abbott <i>et al.</i> , 2010).	88
Figure 40 : Modes de transport via la barrière hémato-encéphalique, d'après (Abbott <i>et al.</i> , 2010).	89

Figure 41 : Processus de développement de VHH sondes spécifiques de lésions cérébrales intra et extracellulaires utiles pour l'imagerie diagnostique <i>in vivo</i> (Tengfei Li <i>et al.</i> , 2016).....	90
Figure 42 : Étapes de l'imagerie TEP, d'après (Vodovar <i>et al.</i> , 2019).....	92
Figure 43 : Schéma d'une IgG conventionnelle comparée à un nanocorps et un chromobody générique : GPF-chromobody (VHH associé à mRFP), d'après (Rothbauer <i>et al.</i> , 2006).....	93
Figure 44 : Traçage d'une protéine de la chromatine tout au long de la mitose, d'après (Rothbauer <i>et al.</i> , 2006).....	94
Figure 45 : Les nanocorps formidables outils thérapeutiques contre les tumeurs, d'après (Sun <i>et al.</i> , 2021).....	97
Figure 46 : Biodistribution de l'anticorps cAb-CEA5::βL, d'après (Cortez-Retamozo <i>et al.</i> , 2002).	98
Figure 47 : Genèse d'une cellule cancéreuse d'après le Collège Français des Pathologistes (CoPath).....	100
Figure 48 : Résumé des effets de Nb8 sur la signalisation AKT2 dans le modèle des cellules MDA-MB-231, d'après (Merckaert <i>et al.</i> , 2021).....	101
Figure 49 : Représentation schématique de VHH multimères : bivalent et pentavalent (Harmsen <i>et al.</i> , 2009).....	103
Figure 50 : Apports de la normalisation de la vascularisation au sein des tumeurs solides. (Fukumura <i>et al.</i> , 2018).....	104
Figure 51 : Utilisation d'un nanocorps d'activation de l'ADCC, d'après (Gray <i>et al.</i> , 2016).....	105
Figure 52 : Démonstration de l'ADCC induite chez les cellules HER2+, d'après (Gray <i>et al.</i> , 2016).....	106
Figure 53 : Structure de l'immunotoxine 1053-PE38, d'après (Ting Li <i>et al.</i> , 2016, p. 38).....	107
Figure 54 : Mécanisme d'action du MaAbNA, d'après (Ding <i>et al.</i> , 2015).....	108
Figure 55 : Schéma de la structure du SARS-CoV-2, d'après (Mishra <i>et al.</i> , 2020).....	117
Figure 56 : Mécanisme potentiel de neutralisation du SRAS-CoV-2 par les nanocorps, d'après (Bessalah <i>et al.</i> , 2021).....	118
Figure 57 : Cartographie de plasmides de Lactobacilles permettant l'expression de VHH5 et VHH2, d'après (Hultberg <i>et al.</i> , 2007).....	122
Figure 58 : Hémostase primaire, d'après (Bazin, 2016).....	124
Figure 59 : Hémostase secondaire, la coagulation plasmatique, d'après (Bazin, 2016).....	125
Figure 60 : Photomicrographie de plaques amyloïdes Aβ et d'inclusions intra-cytoplasmiques neurofibrillaires chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer, d'après (Zigmond <i>et al.</i> , 2015).....	127

Figure 61 : Neurones dopaminergiques et leurs principales projections, d'après (Crossman <i>et al.</i> , 2015).....	128
Figure 62 : Prévalence mondiale de la maladie de Huntington en 2011, d'après (Zigmond <i>et al.</i> , 2015).....	128
Figure 63 : Neurones sérotoninergiques et leurs principales projections, d'après (Crossman <i>et al.</i> , 2015).....	129
Figure 64 : Fibres élastiques dans l'HGA, d'après (Kiuru-Enari et Haltia, 2013).	130
Figure 65 : Un groupe de lamas placés au Grand Refuge de la Société Protectrice des Animaux (SPA), France, par la société Sanofi.....	137

Liste des tableaux

Tableau 1 : Présentation clinique et biologique des patients atteints de MCL γ , d'après (Talbot <i>et al.</i> , 2020).....	29
Tableau 2 : Diversité combinatoire des anticorps chez l'homme, d'après (Punt <i>et al.</i> , 2019).....	35
Tableau 3 : Répertoire germinale isotypique du dromadaire, d'après (De Genst <i>et al.</i> , 2006).....	53
Tableau 4 : Différenciation des sept sous-familles en fonction de la localisation d'une cystéine supplémentaire et de la longueur du fragment CDR2, d'après (Nguyen <i>et al.</i> , 2000).	54
Tableau 5 : Avantages des anticorps à domaine unique de camélidés, d'après (Harmsen et De Haard, 2007).	66
Tableau 6 : Tableau simplifié des gliomes selon la classification de l'OMS (WHO 2000), d'après (Roodink <i>et al.</i> , 2010).....	94
Tableau 7 : Applications variées des nanocorps, d'après (Wesolowski <i>et al.</i> , 2009).....	96
Tableau 8 : Applications des nanocorps en immunologie, d'après (Aggarwal, 2014).....	110
Tableau 9 : Application des nanocorps aux infections, d'après (Wesolowski <i>et al.</i> , 2009).	115
Tableau 10 : Études publiées portant sur les nanocorps dirigés contre certains épitopes du coronavirus.....	119
Tableau 11 : Études publiées portant sur les nanocorps permettant de moduler l'inflammation..	120

Liste des abréviations

Aa : Acides aminés

Ac : Anticorps

ACE : Enzyme de conversion à l'angiotensine

AcM : Anticorps monoclonaux

ADDC : Antibody-dependent cellular cytotoxicity - Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADM : Adriamycine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Ag : Antigène

AID : Activation-induced cytidine deaminase – Cytidine désaminase induite par l'activation

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde

AP-SM : Spectrométrie de masse classique par purification d'affinité

ARD : Antibody recruiting domain – Domaine de recrutement d'anticorps

Arg : Arginine

ARN : Acide ribonucléique

ARNi : Acide ribonucléique interférent

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ART : ecto-ADP-ribosyltransférase

A β : Peptide de l'amyloïde- β

BBMV : Broad Bean Mottle Virus – Virus du flétrissement de la fève

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BLS : lumazine synthase de *Brucella abortus*

BoNT : Neurotoxines de *Clostridium botulinum*

bsAbs : Anticorps bi-spécifiques

CBD : Cell-binding domain – Domaine de liaison cellulaire

CEA : Antigène carcinoembryonnaire

CDR : Complementary-determining regions – Régions déterminant la complémentarité

CH : Heavy chain – Chaîne lourde

CL : Light chain – Chaîne légère

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigène
COVID-19 : Coronavirus disease 2019
CSR : Class switch recombination – Commutation isotypique
Cys : Cystéine
DAS : Disease Activity Score – Score de la maladie
DMOP : Dystrophie musculaire oculopharyngée
DNP : Dinitrophenyl
Domaine C : Domaine constant
Domaine V : Domaine variable
DR : Death receptor – Récepteur de mort cellulaire
DRX : Diffractométrie aux rayons X ou cristallographie aux rayons X
EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EGFR : Epidermal growth factor receptor – Récepteur du facteur de croissance épidermique
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay – Technique d'immunoabsorption par enzyme liée
EPEC : Escherichia coli entéropathogènes
ESB : Encéphalopathie spongiforme bovine
EULAR : European League Against Rheumatism
Fab : Antigen binding fragment – Fragment de liaison à l'antigène
Fc : Critallizable fragment – Fragment cristallisable
Ff : Phage filamenteux
FMD : Foot-and-mouth disease – Fièvre aphteuse / FMDV : Virus de la fièvre aphteuse
FR : Framework region – Region cadre
F3H : Fluorescence-trois-hybrides
GdnHCl : Dénaturation à l'équilibre au chlorure de guanidinium
GFP : Green fluorescent protein – Protéine fluorescent verte
Glu : Acide glutamique
Gly : Glycine
GMB : Glioblastome multiforme
GOx : Glucose oxydase
HA : hémagglutinine
hCAb : Heavy chain antibody - Anticorps à chaînes lourdes
HER : Human epidermal growth factor receptor – Récepteur de croissance épidermique humain

HPLC : Chromatographie en phase liquide haute performance

H5N1 : Virus de la grippe aviaire (Hémagglutinine 5)

IAP : Protéine inhibitrice de l'apoptose

IFF : Insomnie fatale familiale

Ig : Immunoglobuline

IgNAR : Immunoglobuline new antigen receptor – Ac à chaîne lourde des poissons cartilagineux

IgSF : Superfamille des immunoglobulines

IPV : Vaccin anti-polio inactivé

IRM : Imagerie par résonance magnétique

KD : Constante de dissociation

kDa : KiloDalton

K : Kelvin

LB : Lymphocyte B

Leu : Leucine

LT : Lymphocyte T

LTh : Lymphocytes T helper

MA : Maladie d'Alzheimer

MCL : Maladie des chaînes lourdes

MDAb : Multidomain antibody – Anticorps à multidomaines

MERS-CoV : Middle East respiratory syndrome-related coronavirus – coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient

MH : Maladie de Huntington

mHTT : protéine mutante la protéine Huntingtin

MICI : Maladies inflammatoires de l'intestin

MM : Myélome multiple

MP : Maladie de Parkinson

MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

Nb : Nanobody – Nanocorps ou VHH

NHS : N-hydroxysuccinimide

NIR : Near infrared fluorescence – Fluorescence proche infrarouge

NK : Cellules Natural Killer

Nt : Nucléotides

NTR : Nitroreductase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé / WHO : World Health Organization

PA : Polyarthrite

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells – Cellules mononuclées du sang périphérique

pH : Potentiel hydrogène

Phe : Phénylalanine

pI : Potentiel isoélectrique

PIF : Péritonite infectieuse féline

PTT : Purpura thrombotique-thrombocytopénique

RAG : Recombination-activating gene – Gène d'activation de recombinaison

RBD : Receptor binding-domain – Domaine de liaison au récepteur

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RIP : Protéine d'inactivation du ribosome

RSS : Recombination signal sequence – Séquence de signaux de recombinaison

RTA : Sous-unité A de la ricine

SARS-CoV-2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 – Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

scFv : Single-chain variable fragment – Fragment variable à chaîne unique

sdAb : Single domain antibody – Anticorps à domaine unique

SEP : Sclérose en plaques

Ser : Sérine

SGSS : Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker

SHM : Somatic Hypermutation Mechanism – hypermutation somatique

SIRS : Syndrome à réponse inflammatoire systémique

SM : Spectrométrie de masse

SNC : Système nerveux central

SPECT : imagerie

SrtA : Transpeptidase sortase A

SVV : Survivine

TA : Trypanosomiase africaine

TEMP : Tomographie par émission monophotonique / SPECT : Single photon emission computed tomography

TEP : Tomographie par émission de positons / PET : Positron emission tomography

TCR : T cell receptor – Récepteur des lymphocytes T

Td : Domaines de translocation

TME : Microenvironnement tumoral

TNF α : Facteur de nécrose tumorale

Trp : Tryptophane

TRAIL : TNF-related apoptosis ligand – Ligand de l'apoptose

Tyr : Tyrosine

T3SS : Système de sécrétion de protéine de type III

Val : Valine

V(D)J : Variable, Diversity, Joining gene segments – Segments de gène VDJ

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VGS : Glycoprotéine variante de surface

VH : Variable heavy domain – Domaine variable de la chaîne lourde

VHB et C : Virus de l'hépatite B et C

VHH : Domaine variable des nanocorps

VL : Variable light domain – Domaine variable de la chaîne légère

VLP : Protéines de type viral

VRS : Virus Syncytial Respiratoire

vWF : Facteur de von Willebrand

β 2m : β 2-microglobuline

Introduction

Le système immunitaire, entité essentielle au développement des êtres-vivants, évolue depuis 600 millions d'années pour offrir des mécanismes toujours plus performants pour la garantie de notre homéostasie. Il apparaît comme un véritable allié dans la reconnaissance du monde extérieur – peuplé d'organismes pathogènes, de substances toxiques ou d'allergènes – il veille et garantit au quotidien notre sauvegarde, il en est même l'acteur essentiel, puisqu'il se retrouve d'ailleurs, chez tous les métazoaires qui composent le règne animal, sous différentes formes certes, mais toujours dans le but de les protéger. Ainsi, il a réussi à développer au cours du temps des mécanismes complexes et variés pour la défense des organismes face aux agressions extérieures.

Le système immunitaire des vertébrés a été très étudié au cours de ces dernières décennies, tant il est fascinant et primordial pour la compréhension des maladies, et donc, dans l'application de la médecine moderne. Il se compose de deux mécanismes complémentaires : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Ainsi, à la faveur d'une agression, rompant les barrières physico-chimiques de l'organisme, un agent pathogène porteur d'antigènes (Ag) est capable d'entrer dans ce dernier. L'entrée de cet agent pathogène déclenche la succession de réactions décrites ci-dessous.

D'abord, l'immunité innée, ou immunité non spécifique, représente la première ligne de défense de l'organisme et s'initie dans les douze premières heures. Ses principaux acteurs, les molécules de reconnaissance, sont présents sur un grand nombre de cellules, permettant la mise en place de cette réponse précoce. Le terme d'immunité innée fait d'abord référence aux barrières physiques, chimiques et microbiologiques, puis concerne les cellules effectrices du système immunitaire en tant que tel, à l'instar des neutrophiles, des monocytes, des macrophages, les cellules Natural Killer (NK), le complément, les cytokines ou encore les protéines de la phase aiguë.

Cette étape est caractérisée par l'inflammation visible macroscopiquement, se traduisant par une rougeur, chaleur, œdème et douleur de la zone en question. Microscopiquement, cette inflammation correspond donc au recrutement de ces nombreuses cellules immunitaires citées plus haut. Ces cellules vont notamment permettre la mise en place de mécanismes d'élimination de l'agent, tels que la phagocytose ou la cytotoxicité.

Puis, viennent ensuite les défenses spécifiques de l'hôte, dans les jours suivants, si la réaction primaire n'a pas permis d'éliminer l'agent pathogène : l'immunité adaptative. Cette réaction n'est donc pas immédiate et requiert 5 jours avant d'être effective et jusqu'à 2 semaines pour fournir une réponse optimale.

L'immunité adaptative permet une réponse spécifique face à l'agent pathogène rencontré, basée sur la reconnaissance de l'antigène par un répertoire varié de lymphocytes T et B – via des récepteurs capables de reconnaître n'importe quel antigène – générés aléatoirement par un mécanisme de sélection bien orchestré.

Ces deux catégories de lymphocytes se distinguent par leurs rôles : les lymphocytes B – après maturation en plasmocytes – seront à l'origine de la production d'anticorps (Ac), tandis que les lymphocytes T vont produire des lymphocytes T effecteurs et des lymphocytes mémoires. Après

l'immunisation, les lymphocytes B – qui expriment un anticorps approprié – se multiplient par prolifération clonale dans les organes lymphatiques. Des mécanismes de mutation et de sélection finement régulés, garantissent l'expansion préférentielle des variants qui expriment des anticorps ayant une plus grande affinité avec l'immunogène. L'immunisation répétée produit donc généralement des anticorps spécifiques en plus grande quantité et de plus grande affinité. Les anticorps (Ac), ou immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines capables donc de se fixer spécifiquement à un antigène, et qui permettent ainsi son élimination. Ces molécules présentent des particularités intéressantes pour les domaines de la recherche et de la médecine.

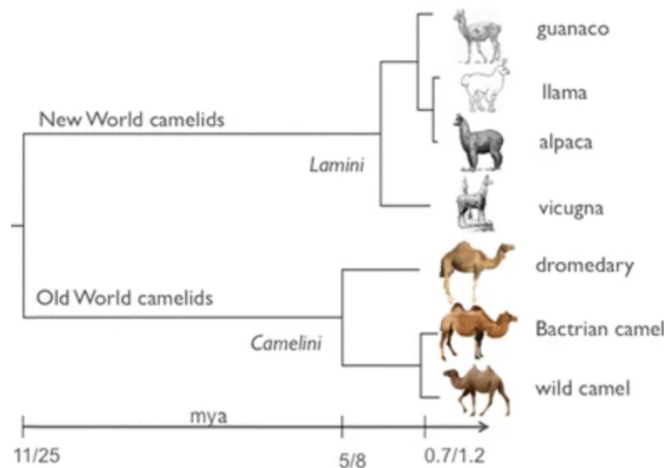
Le système immunitaire des vertébrés génère ainsi des milliards de molécules d'anticorps différentes. Ce répertoire considérable contient des partenaires de liaison hautement spécifiques pour pratiquement tous les composés biologiques et chimiques existants, malgré une structure très conservée au fil des siècles et au sein du règne animal. Il existe différents type (ou isotypes) d'anticorps, mais toujours dotés de la même structure, à savoir : une réunion de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Ils représentent donc la principale base d'intervention moderne contre les maladies infectieuses, comme en témoignent les travaux de Emil Adolf von Behring, prix Nobel de physiologie ou de médecine en 1901, pour ses travaux « sur la thérapie sérique, en particulier son application contre la diphtérie, par lequel il a ouvert une nouvelle voie dans le domaine de la science médicale et a ainsi mis entre les mains du médecin une arme victorieuse contre la maladie et la mort » (The Nobel Foundation, 1901).

Les anticorps sont au cœur de la compréhension des mécanismes de l'immunité contre la plupart des maladies infectieuses, et jouent un rôle central dans l'immunothérapie ou la vaccination, mais pas seulement ; avec les progrès récents réalisés en biologie moléculaire, ils deviennent des instruments de diagnostic et de lutte contre des maladies infectieuses et inflammatoires, le cancer ou encore les maladies neurodégénératives.

Ils représentent ainsi un atout majeur dans le domaine de la médecine, sur lequel se sont penchés chercheurs et médecins pour développer de nouvelles thérapies plus innovantes. Cependant, ces outils modernes présentent aussi certaines limites d'utilisation, du fait, entre autres, de leurs caractéristiques intrinsèques.

L'étude du système immunitaire chez divers animaux a permis d'entrevoir de nouvelles perspectives dans ces domaines, avec la découverte notamment, par sérendipité, chez les camélidés (*Camelus dromedarius* et *Camelus bactrianus*), les lamas (*Lama glama* et *Lama guanicoe*) et autres vigognes (*Vicugna vicugna* and *Vicugna pacos*) de nouveaux anticorps, dotés de caractéristiques pour le moins intéressantes (*Figure 1*). En effet, dépourvus de chaînes légères, ces anticorps possèdent une plus petite taille (~ 80 kDa) que les anticorps traditionnels (~ 150-175 kDa) rencontrés partout dans le règne animal, ce qui leur confère par ailleurs des propriétés uniques. Leur étude a permis de découvrir de formidables possibilités d'utilisation et laisse encore un bel avenir dans le domaine de la médecine.

Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur les génomes mitochondriaux complets des camélidés de l’Ancien et du Nouveau Monde (Burger, 2016).



Très étudiés au cours de ces dernières années, les anticorps à domaine unique sont retrouvés sous différents termes dans la littérature, comme les anticorps à chaîne lourde (hcAb), ou nanocorps, terme proposé par la société belge Ablynx – dérivé de nanobodies (Nb) en anglais. Du fait de l’absence de chaînes légères, ils possèdent un fragment de liaison à l’antigène (Fab) réduit à un seul domaine variable (VHH), appelé pour sa part anticorps à domaine unique (sdAb) et de taille encore plus réduite (~ 15 kDa). Ainsi, les termes VHH ou nanocorps correspondent au fragment de liaison à l’antigène dérivé de l’anticorps à domaine unique de camélidés *sensu stricto*, cependant ces termes peuvent être employés sans distinction dans les articles scientifiques et de revue.

On peut alors s’interroger sur leur présence uniquement chez les camélidés et leur rôle chez ces derniers. Sinon, comment sont-ils apparus – en plus des anticorps traditionnels, acteurs déjà efficaces du système immunitaire depuis des millions d’années ? Enfin, quelles caractéristiques avantageuses possèdent-ils les rendant aussi présents dans les travaux menés ces dernières années ? Enfin, quelles possibilités offrent-ils aujourd’hui ? Pourront-ils jouer un rôle clé dans la lutte contre le cancer ou encore dans la pandémie actuelle ?

Aussi, le travail de cette thèse bibliographique est de rappeler les bases de l’étude des anticorps, depuis la découverte des anticorps traditionnels jusqu’aux anticorps à domaine unique ; de répertorier les spécificités de ces derniers, si particuliers. Puis, dans un second temps, de s’intéresser à leur développement dans le domaine de la recherche, et enfin, de faire un état des lieux des débouchés diagnostiques et thérapeutiques qu’ils offrent. Tout au long de cette thèse les termes de nanocorps, Nb, VHH et anticorps à domaine unique pourront être employés comme synonymes.

Première partie : Spécificités des anticorps, dont les anticorps de lamas et autres camélidés

Support de l'immunité adaptative, l'anticorps ne cesse de faire couler de l'encre, tant il est sujet de nombreux articles scientifiques à travers le globe. Pressentis depuis longtemps comme outils thérapeutiques, il aura pourtant fallu attendre ces dernières décennies pour en apprécier leur développement. Ainsi, les anticorps continuent de passionner et se révèlent même encore capables de nous surprendre grâce à leurs formidables aptitudes.

1. L'anticorps : de sa découverte à la connaissance actuelle de sa conformation

L'anticorps, molécule de l'ordre du nanomètre, possède néanmoins une grande histoire, depuis les débuts de son étude à nos connaissances actuelles, une histoire qui s'est construite au gré de savantes découvertes, comme d'avancées biotechnologiques.

A. L'essor de l'immunologie

L'immunologie est un concept relativement récent à l'échelle de l'humanité, bien que l'existence d'une réponse immunitaire ait été pressentie depuis longtemps déjà. Nos connaissances concernant le système immunitaire et ses acteurs ont largement évolué au cours de ces dernières décennies et nous ont permis d'entrevoir l'immunologie sous un jour nouveau.

a. Les anticorps décrits à travers l'Histoire

L'immunité naquit avec l'arrivée des premiers être-vivants, il y a 800 millions d'années. Pourtant, il faudra attendre l'Antiquité, pour que l'on s'y intéresse. Le concept d'immunité est né de l'intuition d'un homme, Thucydide, politicien, stratège et historien de son époque, à l'Antiquité, au Vème avant JC. En effet, il remarqua, lors de l'épidémie de Peste sévissant à cette époque à Athènes, que les personnes ayant déjà contracté cette maladie étaient dès lors « immunisés » ou « exemptés » (Punt *et al.*, 2019).

C'est plus tard, au Xème siècle en Chine que ce principe fut utilisé pour la première fois, en inoculant à des patients, par inhalation, du matériel contaminé par le virus de la variole pour immuniser ces derniers. Ce principe, appelé la variolisation, fut utilisé dans l'Empire Ottoman au XVIIème, puis s'est démocratisé en Angleterre dès le XVIIIème. C'est Edward Jenner qui améliora ce procédé pour créer le vaccin de variole à partir d'une souche atténuée de variole, grâce aux femmes en contact avec des vaches infectées par cette forme atténuée (Punt *et al.*, 2019).

Par ailleurs, les travaux de Koch et Pasteur respectivement sur le bacille du charbon et la tuberculose, avec leurs découvertes sur les agents pathogènes ont permis une avancée

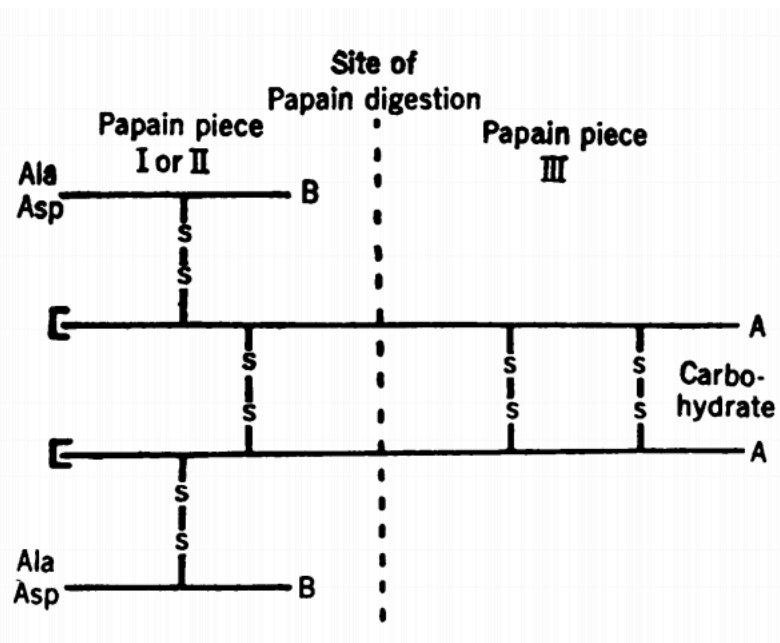
exceptionnelle à la médecine avec le développement de vaccins contre la maladie du charbon et la rage dès 1885 (Punt *et al.*, 2019).

Au XXème siècle, plus précisément en 1890, von Behring et Kitasato avaient remarqué qu'un agent présent dans le sérum était capable d'inhiber la toxine diphtérique. Fort de cette découverte, Paul Ehrlich prédit l'existence des anticorps qui pourraient interagir avec les antigènes, un an plus tard. C'est d'ailleurs à Ehrlich que l'on doit le terme d'anticorps, « Antikörper », utilisé la première fois dans la conclusion de son article « Experimental Studies on Immunity » publié en Octobre 1891. Emil Von Behring et Elie Metchnikoff, s'intéressent au fonctionnement des vaccins avec l'utilisation de sérum d'animaux immunisés, notamment à partir de leurs travaux sur la diphtérie, ce qui leur vaudra de recevoir le prix Nobel de médecine en 1908 (Kenneth et Weaver, 2017).

Bien que ces techniques soient révolutionnaires pour l'époque, elles n'étaient pas encore totalement maîtrisées et engendraient un certain nombre d'effets secondaires chez la moitié des patients. Ces effets décrits comprenaient alors des éruptions cutanées, des démangeaisons, des douleurs articulaires, de la fièvre, de l'hypotension allant même jusqu'au choc et la mort (Punt *et al.*, 2019).

C'est en 1959, que Rodney Porter, à la suite des travaux de Gerald Edelman, établit le modèle d'anticorps tel qu'on le connaît aujourd'hui.

Figure 2 : Modèle d'anticorps établi par Porter, d'après (Porter, 1973).

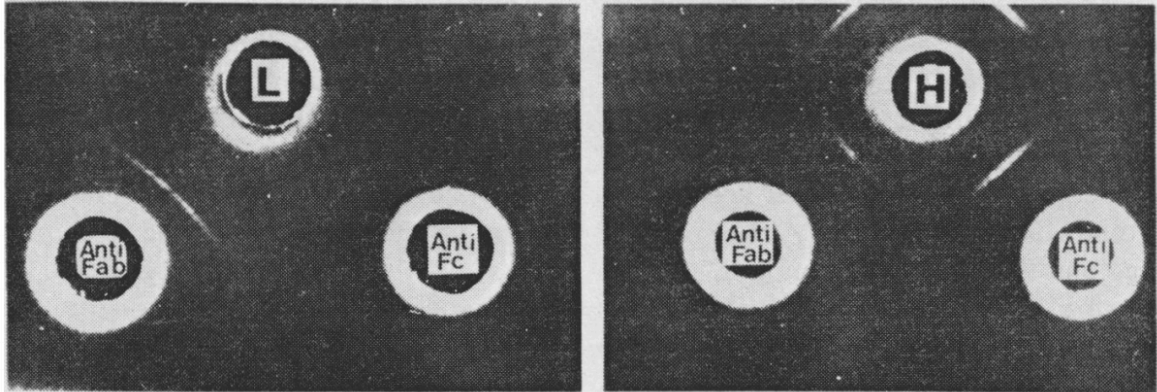


En effet, Edelman prouve que les anticorps sont composés de quatre chaînes : deux chaînes légères et deux chaînes lourdes ; après réduction des anticorps et migration des fragments obtenus (Figure 2) (Porter, 1973).

Porter poursuit ces travaux, et obtient après digestion d'anticorps à la papaine - protéase à cystéine qui catalyse le clivage de liaisons peptidiques (Amri et Mamboya, 2012) - trois fragments d'anticorps, dont deux identiques (I et II) capables de fixer un antigène, fragment Fab et le troisième (III) fragment Fc (Reid et Sim, 2008).

Enfin, un processus de double diffusion permet de démontrer que le fragment Fab possède des chaînes lourdes et légères, tandis que le fragment Fc ne possède que des chaînes lourdes (Figure 3). Le modèle d'anticorps en Y est né.

Figure 3 : Double diffusion entre chaînes légères (L) et chaînes lourdes (H), obtenues à partir d'IgG de lapin et antisérum Fc et Fab de chèvre. Expérience menée par Porter (Porter, 1973).



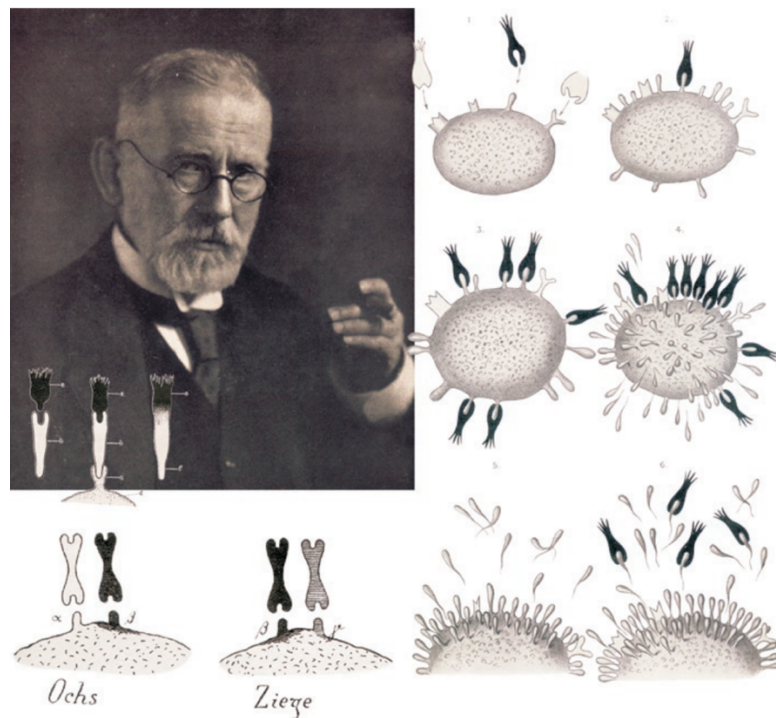
Dès lors, de nombreux chercheurs s'intéressent aux processus de production et de sélection d'immunoglobulines capables de répondre à l'attaque de la multitude d'antigènes.

En 1978, Susumu Tonegawa découvre qu'il existe des réarrangements somatiques des gènes codant pour les immunoglobulines, leur permettant ainsi d'acquérir une plus grande variabilité (Kenneth et Weaver, 2017).

b. L'étude des anticorps : avancée des techniques de laboratoire au service de l'immunologie

Paul Ehrlich proposa d'abord un modèle d'immunité, qu'il dénomma immunité en chaîne latérale ; il imaginait que chaque cellule produisait des chaînes latérales ou « nutricepteurs » pour absorber les nutriments essentiels et que les toxines microbiennes se fixaient à ces récepteurs. Lors d'infection, les récepteurs seraient alors rejetés par les cellules qui devraient donc produire plus de récepteurs pour compenser la perte de ces derniers. Cette intuition s'est avérée inexacte à la lumière des découvertes réalisées plus tard dans le domaine de l'immunologie (Bordon, 2016).

Figure 4 : Paul Ehrlich (14 Mars 1854 – 20 Août 1915) et ses dessins de la théorie des chaînes latérales, d'après (Kaufmann, 2008).



Aussi, il est désormais possible d'isoler et d'étudier les anticorps directement issus du sérum – fraction liquide du sang obtenue après coagulation et centrifugation et donc contenant les protéines et molécules circulantes non coagulées. Il existe de nombreuses méthodes de purification basées sur les propriétés physico-chimiques des anticorps, comme par exemple selon leur taille, leur charge, leur solubilité, leur hydrophobie ou leur affinité de liaison. Ces méthodes développées à l'origine pour leur étude et leur compréhension, sont maintenant utilisées à des fins de purification pour une utilisation ultérieure, et sont décrites ci-après.

- **L'électrophorèse**

L'électrophorèse est une technique de séparation de macromolécules, employée dès la fin des années 20. Elle repose sur la migration des constituants d'un mélange en fonction de leur poids moléculaire, grâce à leur charge, à travers une gélose sous l'effet d'un champ électrique. En effet, les protéines, comprenant les immunoglobulines ne sont pas électriquement neutres. Elles possèdent différents groupes ionisables (Dunn, 1986).

En 1939, à la lumière des découvertes de l'époque, Tiselius et Kabat ont entrepris de réaliser une électrophorèse sur sérum immun. Ils ont ainsi obtenu différentes fractions : l'albumine, l' α -globuline, la β -globuline et enfin la γ -globuline.

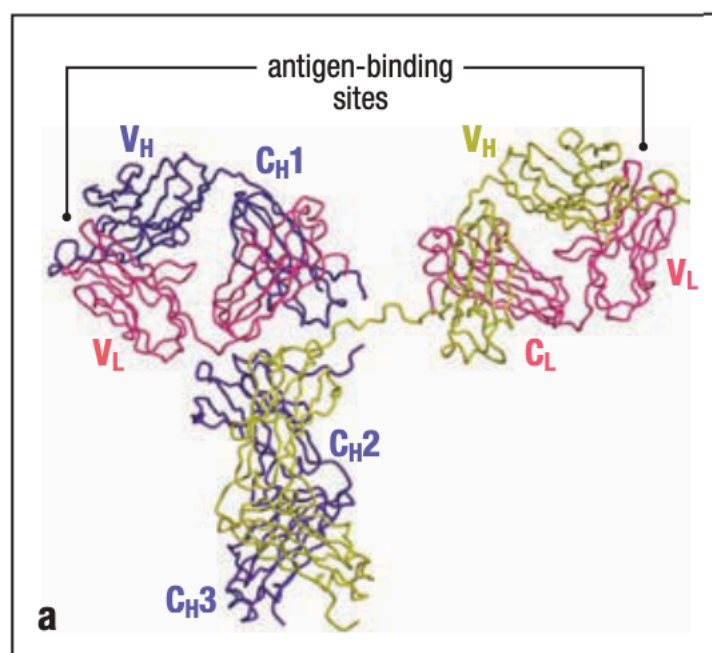
Une technique d'absorption a ensuite été réalisée avec un antigène pour mettre en évidence la fraction impliquée dans sa reconnaissance. C'est la fraction des γ -globulines qui s'est retrouvée épuisée et a reçu le nom d'immunoglobuline. Puis une séparation sur colonne a été réalisée et a permis de mettre en évidence la présence de différents types d'immunoglobulines. Ainsi, cinq classes ont été mises en évidence : les IgM, IgA, IgE, IgD et IgG (Schroeder et Cavacini, 2010).

- **La cristallographie aux rayons-X**

La cristallographie aux rayons X ou diffractométrie aux rayons X (DRX) est une technique d'analyse non destructive permettant de retrouver la structure tridimensionnelle d'une protéine. Elle a été utilisée dès le début des années 70 pour déterminer la structure du fragment Fab (Crowe *et al.*, 2015).

Les amplitudes diffractées des rayons X, par la molécule étudiée, sont caractéristiques de la nature et position des atomes de cette dernière. Il est ainsi possible d'accéder à une carte de densité électronique à une résolution atomique (0,1-0,3 nm) et donc à la structure tridimensionnelle de la molécule (Perkins *et al.*, 2008).

Figure 5 : Structure cristallographique aux rayons X d'un anticorps IgG, illustrée par un diagramme en ruban des squelettes des chaînes polypeptidiques, d'après (Kenneth et Weaver, 2017).



- **La chromatographie d'affinité**

La chromatographie d'affinité est, à l'instar des autres techniques de chromatographie, une technique de séparation de constituants biologiques. Cette technique, qualifiée de chromatographie en phase liquide, nécessite l'utilisation d'une matrice insoluble et d'une solution tampon (Hage, 1999). Elle est basée sur la liaison de la molécule d'intérêt à un ligand préalablement fixé à la matrice dans une colonne ; puis à l'élimination par élution des autres molécules par le solvant.

Les protéines A et G sont des ligands de haute affinité pour les fragments des régions Fc des immunoglobulines de mammifères. Elles sont donc particulièrement utiles en immunologie pour isoler des anticorps dans un sérum, par chromatographie d'affinité. Ce sont des protéines de parois bactériennes produites respectivement par *Staphylococcus aureus* et des streptocoques du groupe G.

Pour une fixation optimale de la molécule au ligand, la réaction se fait généralement dans les conditions les plus proches possibles de celles de l'environnement de l'analyte, c'est-à-dire à pH et d'activité électrolytique déterminée (Hage, 1999).

Cette technique principalement utilisée pour la purification d'anticorps monoclonaux, permet ainsi d'obtenir un ou des anticorps à partir d'un mélange, tel que le sérum. Une fois l'anticorps fixé au ligand, il pourra être isolé, quantifié et analysé via différentes techniques utilisées en biotechnologie (Hage, 1999).

- **La précipitation au sulfate d'ammonium**

La technique de précipitation au sulfate d'ammonium ou « salting out » est largement utilisée aujourd'hui, comme première étape pour purifier ou encore déterminer la ou les concentrations des anticorps sériques en grande quantité et à moindre coût.

Pour se faire, il suffit d'utiliser une solution – sérum ou ascite chargés en anticorps et préalablement purifiés des lipides et lipoprotéines par centrifugation à froid – dans laquelle du sulfate d'ammonium est incorporé. En effet, les protéines sont des molécules polaires, elles se retrouvent donc naturellement en solution dans l'eau avec laquelle elles forment des liaisons hydrogène. L'ajout de sulfate d'ammonium permet d'amener des ions qui vont entrer en compétition avec les immunoglobulines pour interagir avec le solvant.

Ainsi, une moindre quantité de solvant sera disponible et les molécules d'anticorps vont finir par interagir entre-elles via leurs groupes hydrophobes, entraînant la formation de précipités. Des étapes de purification supplémentaires s'avèrent souvent nécessaires afin d'éliminer des impuretés. Des techniques de filtration sur gel ou chromatographie d'exclusion permettent de séparer les différents composants selon leurs poids moléculaires. En outre, la spectrophotométrie donne accès à leur concentration en fonction de leur absorbance. Enfin, d'autres sels et solvants miscibles à l'eau peuvent également être utilisés dans ce procédé de purification (Grodzki et Berenstein, 2010).

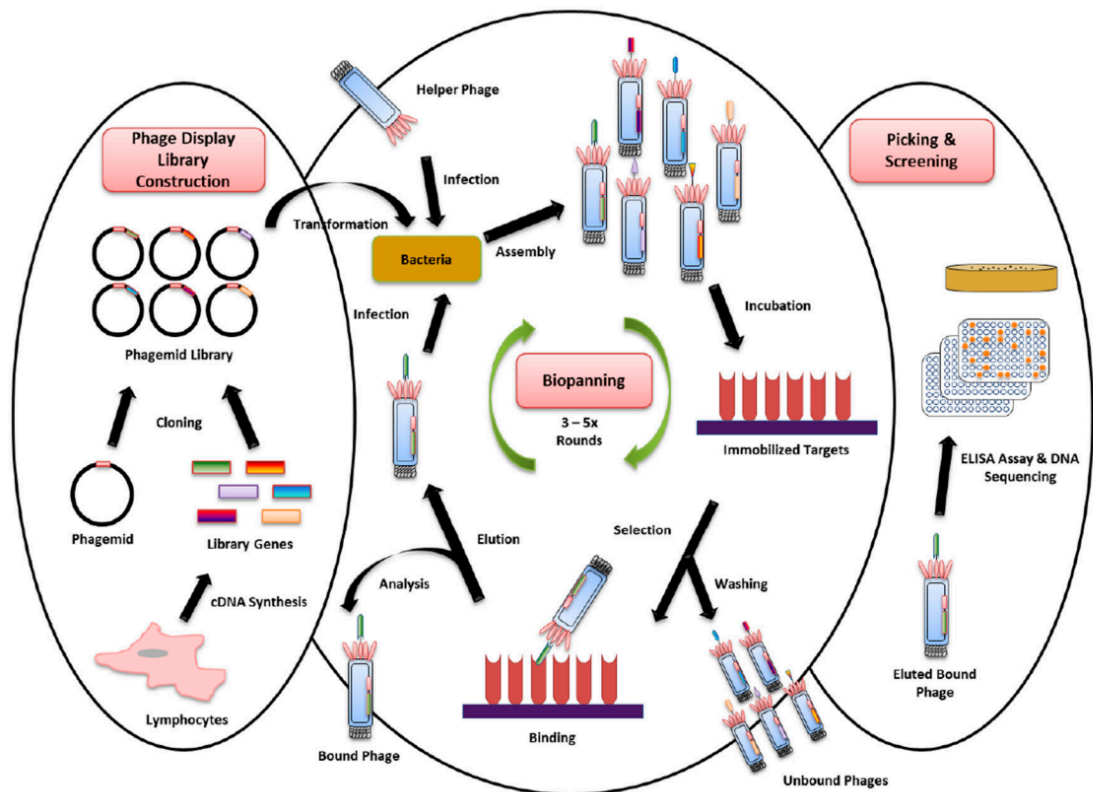
- **La technique de phage-display**

La technique d'exposition sur phage ou « phage display », décrite dès 1985, par George P. Smith, n'a cessé d'être au cœur des techniques d'immunologie depuis. Cette technique permet de sélectionner des anticorps en utilisant des bactériophages. Le bactériophage M13 – phage filamenteux (Ff) infectant uniquement les souches d'*Escherichia coli* exprimant le pilus F – est particulièrement utilisé pour cette technique d'affichage phagique.

En effet, en incorporant l'ADN codant de la molécule d'intérêt directement dans le génome du phage, avec une liaison au gène pIII (protéine de fusion) ou préférentiellement pVIII (principale protéine de d'enveloppe) pour les anticorps, il est possible de transfecter ce gène à une bactérie. La bactérie transfectée synthétisera alors la molécule grâce à sa propre machinerie enzymatique et le peptide se retrouvera à la surface des particules de phages produites (*Figure 6*). Ce phage filamenteux non lytique présente l'avantage d'établir une infection chronique de la bactérie cible, où il libère de nouveaux phages (Kügler *et al.*, 2013).

Cette technique permet donc de synthétiser à grande échelle et à faible coût des anticorps spécifiques d'antigènes d'intérêt parmi une bibliothèque combinatoire contenant des milliards de fragments d'anticorps (Ledsgaard *et al.*, 2018).

Figure 6 : Principe de la technique « phage display » avec le bactériophage M13, d'après (Leow *et al.*, 2017).



c. De l'anticorps au nanocorps

Le système immunitaire adaptatif repose donc sur l'élaboration de molécules capables de fixer n'importe quel épitope susceptible d'être rencontré par son hôte ; de sélectionner celle qui présente la meilleure affinité pour ce dernier afin de l'éliminer au décours du processus bien orchestré qu'est la réaction immunitaire. Forts de cette adaptation, les vertébrés présentent néanmoins quelques divergences, ou plutôt convergences, au sein de cette évolution (de los Rios *et al.*, 2015).

- **L'émergence des anticorps à domaine unique**

Les vertébrés à mâchoires possèdent des anticorps composés de chaînes lourdes et de chaînes légères. Parmi ces anticorps, les IgG – immunoglobulines circulantes les plus abondantes chez les mammifères – possèdent une structure très conservée, et donc très stable au cours l'évolution.

Néanmoins, une modification isolée de structure des anticorps est apparue dans la branche des Tylopodes, sous embranchement des Artiodactyles, qui n'est pas retrouvée chez les être-vivants apparentés du groupe des Artiodactyles, tels que les moutons ou encore les vaches.

En outre, cette modification a été découverte chez d'autres espèces de poissons cartilagineux (Chondrichthyens). En effet, une sous-classe d'IgM dépourvues de chaînes légères est présente chez le requin nourrice (*Ginglymostoma cirratum*), le requin-tapis (*Orectobulus maculates*), ou encore une autre sous-classe d'IgM chez le poisson-rat (*Hydrolagus colliei*) (Conrath *et al.*, 2003).

La phylogénétique permet de conclure que l'émergence de ces anticorps particuliers et fonctionnels est apparue de façon indépendante chez ces différentes espèces, et donc reflète une convergence évolutive entre ces trois taxons non apparentés.

Il est possible de dater leur apparition à l'aide de fossiles, en distinguant les divergences entre les espèces concernées au sein des Tylopodes. On estime ainsi, que ces anticorps seraient apparus entre 11 et 83 millions d'années (de los Rios *et al.*, 2015).

S'impose alors la question de l'émergence de nouveaux anticorps, tandis que les molécules conventionnelles présentent l'avantage d'une structure stable et l'élaboration d'un répertoire, en apparence, infini. En effet, la capacité de génération d'un répertoire immunologique composé de milliards de paratopes différents est finalement limitée par la composition génétique germinale des gènes codants ces derniers. C'est pourquoi, on comprend aisément que de nouvelles stratégies dans l'élaboration d'anticorps se mettent en place chez certaines espèces, jusqu'à la formation de nouvelles structures, tels que les nanocorps (de los Rios *et al.*, 2015).

- **La découverte des anticorps à domaine unique**

L'essor de ces techniques d'études a permis d'innombrables découvertes dans le domaine de l'immunologie. De nombreux chercheurs ont tenté de purifier des anticorps, pour en dissocier les chaînes légères des chaînes lourdes afin d'étudier les spécificités propres à chacune.

Utsumi *et al.* ont d'ailleurs réussi à dissocier des Ig de lapin en deux composants antigéniques distincts par une succession de deux procédés : une réduction, puis une alkylation. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que l'activité immunologique de l'anticorps est principalement associée à la chaîne lourde, bien qu'elle soit renforcée par la présence de la chaîne légère. En effet, leur spécificité de liaison à l'antigène, leur affinité et leur solubilité sont souvent réduites (Utsumi et Karush, 1964). Ces données sont corrélées avec les résultats de Yoo *et al.* qui ont pu démontrer que les chaînes légères possédaient aussi un site de fixation à l'antigène (Yoo *et al.*, 1967).

Des chercheurs vont révolutionner le monde de l'immunologie, lors d'une découverte fortuite d'anticorps avec une conformation différente de celle connue jusqu'alors. En effet, c'est en réalisant des travaux de recherche dans le cadre d'un projet étudiant visant à développer un test de sérodiagnostic pour l'infection par le trypanosome chez les chameaux et les buffles d'eau, que Raymond Hamers et son équipe de la Vrije Universiteit Brussel, découvrent des anticorps dépourvus de chaînes légères chez les camélidés, dont le *Camelus dromedarius*. Cette découverte d'anticorps à domaine unique lui valut de publier dans la revue Nature en 1993. Son équipe s'est ensuite lancée dans l'étude des anticorps circulants chez le dromadaire (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Après prélèvement de sérum, les chercheurs ont pu isoler différentes fractions d'immunoglobulines de poids moléculaires différents via des techniques de chromatographies sur les protéines A et G. Ils ont alors identifié 3 fractions, soit 3 isotypes d'IgG. Après réduction des IgG par des SDS-PAGE ou électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium, ils ont obtenu leur composition. Il apparaît alors que les IgG1 de 170 KDa sont composées de chaînes lourdes (50KDa) et de chaînes légères (30KDa) ; tandis que les autres classes d'IgG ne possèdent pas de chaînes légères et sont distinguées en deux groupes en IgG2 (46KDa) liées uniquement à la protéine A et en IgG3 (43KDa) se liant à la fois à la protéine A et à la G (Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

Ces anticorps ont été identifiés et quantifiés dans le sérum des camélidés, où ils coexistent avec des anticorps conventionnels, i.e. composés de chaînes lourdes et légères. Ils sont retrouvés en proportions variables chez les lamas et les dromadaires, à savoir qu'ils représentent respectivement de 25 à 45% chez le lama et plus de 50% des anticorps circulants chez le dromadaire. Ils ont aussi été retrouvés, mais sous forme non fonctionnelle dans des sérums humains, chez des individus atteints de la maladie des chaînes lourdes gamma (MCL γ) (Allegra et al., 2018). La MCL γ est une maladie sanguine rare, généralement une affection plasmocytaire maligne et fait donc partie des syndromes lymphoprolifératifs B matures. D'autres chaînes lourdes peuvent être sécrétées et à l'origine de diverses MCL qui sont décrites par l'ordre de fréquence suivant : la MCL α , la MCL γ , la MCL μ , la MCL δ . Des immunoglobulines monoclonales dépourvues de chaînes légères sont sécrétées par un clone plasmocytaire anormal. Ces chaînes lourdes d'Ig sont plus ou moins tronquées, au niveau de CH1, ce qui empêche la fixation d'une chaîne légère. La MCL γ a été la première décrite chez l'homme en 1964 par Franklin, affecte une sous classe d'IgG (l'IgG1 dans 65% des cas, 27% pour l'IgG3, 5% pour l'IgG4, 3% pour l'IgG2) et offre un tableau clinique très varié, parfois associée à un lymphome (Talbot *et al.*, 2020).

Tableau 1 : Présentation clinique et biologique des patients atteints de MCL γ , d'après (Talbot *et al.*, 2020).

Pic monoclonal à l'électrophorèse	83 %
Adénopathies	35 %
Anémie < 10 g/dL	35 %
Infiltration médullaire	32 %
Splénomégalie	30 %
Atteinte cutanée	30 %
Thrombopénie < 100 000	17 %
Hépatomégalie	4 %

Enfin, la fondation de la société belge Ablynx, dérivée du Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie, marque l'essor de leur développement, et renomme ces outils immunologiques « nanobodies ». Force est de constater qu'ils en limitent cependant l'usage, jusqu'en 2014, du fait de leur brevet déposé (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

- **Le rôle des anticorps à domaine unique**

Les chameaux de l'Ancien Monde sont des espèces d'élevage durables et uniques, tant par leurs caractéristiques morphologiques que physiologiques. Ils assuraient la survie de l'homme dans des zones agro-écologiques marginales, et leur exploitation comme bêtes de somme, sources de laine, de lait ou de viande, s'est maintenue au fil des siècles, et explique leur importance économique et culturelle (Burger, 2016).

Bien que les camélidés soient économiquement importants dans les pays d'Amérique du Sud, d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient, leur système immunitaire n'a guère été étudié jusqu'au

milieu des années 1990. Outre leurs avantages physiques, les camélidés sont aussi capables de produire différents types d'anticorps fonctionnels, puisqu'ils contribuent manifestement à leur réponse immunitaire et dont l'analyse structurale révélera probablement comment cette réponse humorale génère une architecture différentielle de paratope pour sonder des épitopes plats, convexes et concaves sur un antigène choisi (De Genst *et al.*, 2006 ; Griffin *et al.*, 2014).

En effet, une pression de sélection suffisante a pu être à l'origine de l'adaptation de la structure des paratopes pour améliorer leur fixation aux épitopes concaves jusqu'alors difficiles d'accès pour des anticorps conventionnels (de los Rios *et al.*, 2015).

B. La structure des anticorps : entre conservation et variation

La structure des anticorps soulève un certain nombre de questions, comme par exemple, comment une molécule avec une structure si conservée à travers le temps peut-elle proposer une variabilité génétique si grande ? D'autant plus que cette molécule apporte une réponse adaptative dans un environnement avec des conditions changeantes. Ce paradoxe a été étudié durant de nombreuses années.

a. Les anticorps conventionnels

Nous devons la découverte de la structure des anticorps conventionnels aux grands noms de l'immunologie du XX^{ème} siècle, de Ehrlich à Porter, mais depuis, la connaissance de leur structure ne cesse de s'affiner.

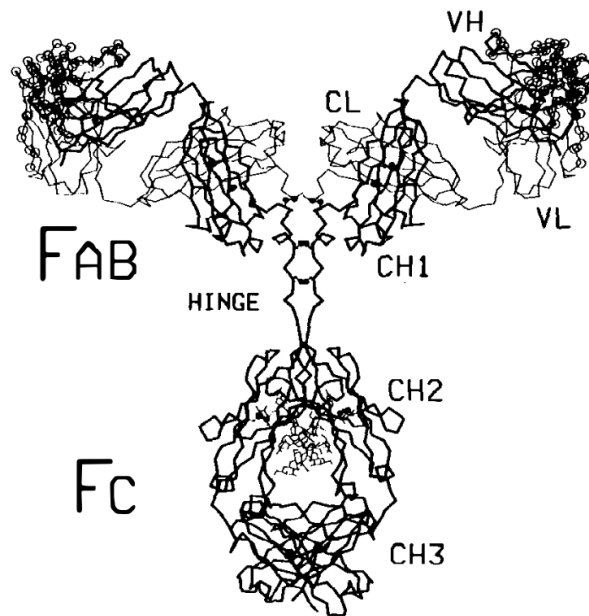
- ***L'anticorps à différentes échelles : de sa séquence d'acides aminés à sa structure tridimensionnelle***

Les anticorps ou immunoglobulines sont des protéines hétérodimériques composées de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques, assemblées entre-elles pour former un Y (*Figure 7*). Les immunoglobulines, comme leur nom le laisse présager, appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (IgSF) (Schroeder et Cavacini, 2010).

- La séquence d'acides aminés

Les immunoglobulines (Ig) sont ainsi des protéines, définies par une séquence d'acide aminés. Les Ig sont composées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes qualifiées de lourdes et deux autres de légères. Les chaînes légères sont approximativement composées de 220 acides aminés, tandis que les chaînes lourdes en possèdent de 450 à 575 (Davies *et al.*, 1990). Chaque chaîne est formée d'une partie terminale NH₂ (fonction amine) variable (V) et d'une ou plusieurs parties terminales COOH (fonction carboxyle) constantes (C). Ces chaînes forment des feuillets β liés par des ponts disulfures entre deux résidus de cystéine conservés. Chacun de ces domaines C ou V contient environ 110 à 130 acides aminés. Les chaînes légères contiennent uniquement un domaine C, tandis que les chaînes lourdes en contiennent 3 ou 4 (Schroeder et Cavacini, 2010).

Figure 7 : Représentation du squelette d'une IgG1 humaine, obtenue à partir de son alpha-carbon trace, d'après (Davies *et al.*, 1990).



Certains acides aminés sont plus fréquents selon les régions, comme l'asparagine, l'histidine et la tyrosine dans les régions CDR, tandis que la cystéine est plus souvent observée dans les régions FR.

De même, certains composés sont parfois plus présents que d'autres dans diverses régions, comme les résidus aromatiques (phénylalanine, tyrosine, thréonine) dans les régions CDR en solution. Dans les régions FR, des résidus apolaires aliphatiques (alanine, valine, isoleucine, leucine) sont fréquemment présents eux aussi. Comme ils le sont moins dans les régions CDR, ils ne sont donc pas impliqués dans des interactions ioniques. Ainsi, ils favorisent les liaisons antigène en limitant les forces de Van der Waals et les réactions hydrophobes.

Les résidus aromatiques sont impliqués en grande partie dans la fixation des antigènes et permettent de réduire les modifications de conformation lors de cette fixation. En effet, ces résidus sont responsables de 155 à 302 interactions atomiques – forces de Van der Waals principalement, mais aussi liaisons hydrogènes impliquées dans la fixation antigène/anticorps (Ag/Ac) (Padlan, 1990).

De plus, leur rôle peut être déduit après évaluation de leur degré d'exposition selon les régions. En effet, les asparagines des régions CDR se retrouvent le plus souvent enfouies et auraient donc un rôle dans les liaisons hydrogènes de la molécule. Ces liaisons hydrogènes entre deux chaînes voisines permettent de stabiliser la molécule. Les histidines, elles, peu fréquentes dans les régions variables des immunoglobulines – environ 1% - apparaissent pourtant jusqu'à 8 fois plus dans les régions CDR que dans les régions FR. Elles semblent donc avoir plutôt un rôle dans l'affinité et la fixation Ag/Ac (Kendrew, 1963).

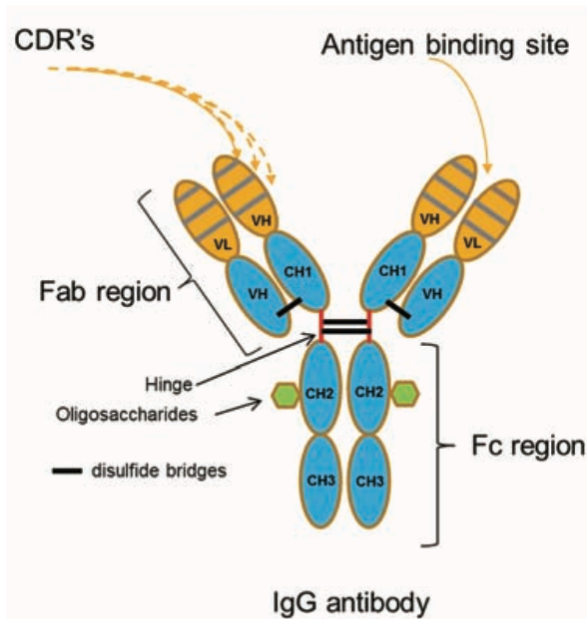
- L'assemblage des quatre chaînes

Les chaînes lourdes et chaînes légères ont des poids moléculaires respectivement d'environ 55 kDa et de 24 kDa. Elles sont assemblées par paires, créant virtuellement deux régions distinctes : un

fragment cristallisable (Fc, cristallizable fragment) et un fragment de fixation à l'antigène (Fab, antigen-binding fragment) (Schroeder et Cavacini, 2010).

Le fragment Fc est un dimère de chaînes lourdes (H) composé de 2 domaines distincts : CH2 et CH3. Le fragment Fab est un dimère de chaînes lourde (H) et légère (L) composé de domaines variable léger (VL) et constant léger (CL) associés à des domaines variable lourd (VH) et constant lourd (CH1). Les fragments Fab sont au nombre de deux au sein de l'anticorps et sont identiques. L'association de ces 4 chaînes forme l'immunoglobuline avec une structure en Y (*Figure 8*).

Figure 8 : Schéma de la structure en Y d'une immunoglobuline G, d'après (Crowe *et al.*, 2015).



- La conformation tridimensionnelle

Les domaines variables VH et VL ont une structure tertiaire similaire : ils sont composés de deux feuillets β plissés au sein desquels quatre régions FR et trois régions CDR s'alternent. Les CDR forment des boucles et se retrouvent ainsi particulièrement exposées, facilitant ainsi la fixation des antigènes (Dougall *et al.*, 1994). Les feuillets β sont assemblés ensemble par des ponts disulfures entre deux résidus de cystéine conservés et forment un sandwich (Schroeder et Cavacini, 2010).

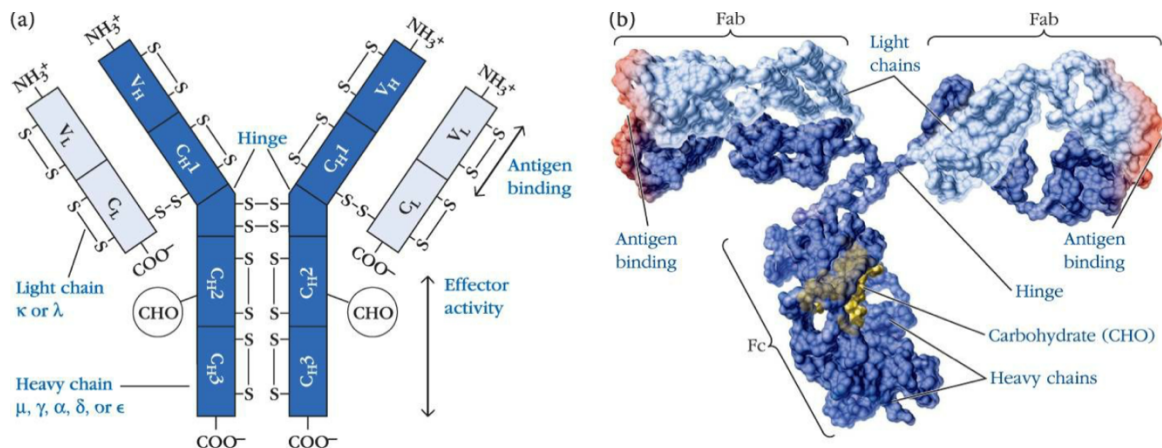
- **Le site de fixation à l'antigène : la région variable**

Le site de fixation à l'antigène ou paratope, se situe dans la région variable de l'anticorps, la région Fab. L'épitope est sa région complémentaire présente sur l'antigène.

- Composition de la région variable

La région variable (V) est composée d'une alternance de segments modérément conservés – les régions cadres (FR pour framework region) : FR1, FR2, FR3 et FR4 et de résidus très variables – les régions déterminant la complémentarité (CDR pour complementarity determining regions) : CDR1, CDR2 et CDR3. Des régions d'hypervariabilité sont retrouvées sur les chaînes lourdes et légères en divers endroits d'après l'analyse des séquences d'acides aminés. Ces régions d'hypervariabilité, qui sont de hauts lieux de mutations, correspondent aux boucles polypeptidiques faiblement repliées à l'extrémité des domaines de la région variable (*Figure 9*).

Figure 9 : Structure de l'anticorps, d'après (Punt *et al.*, 2019).



Légende : Ig composée des régions variable (V) en partie amino-terminale et la région constante, avec les chaînes lourdes représentées en bleu foncé et les chaînes légères en bleu clair.

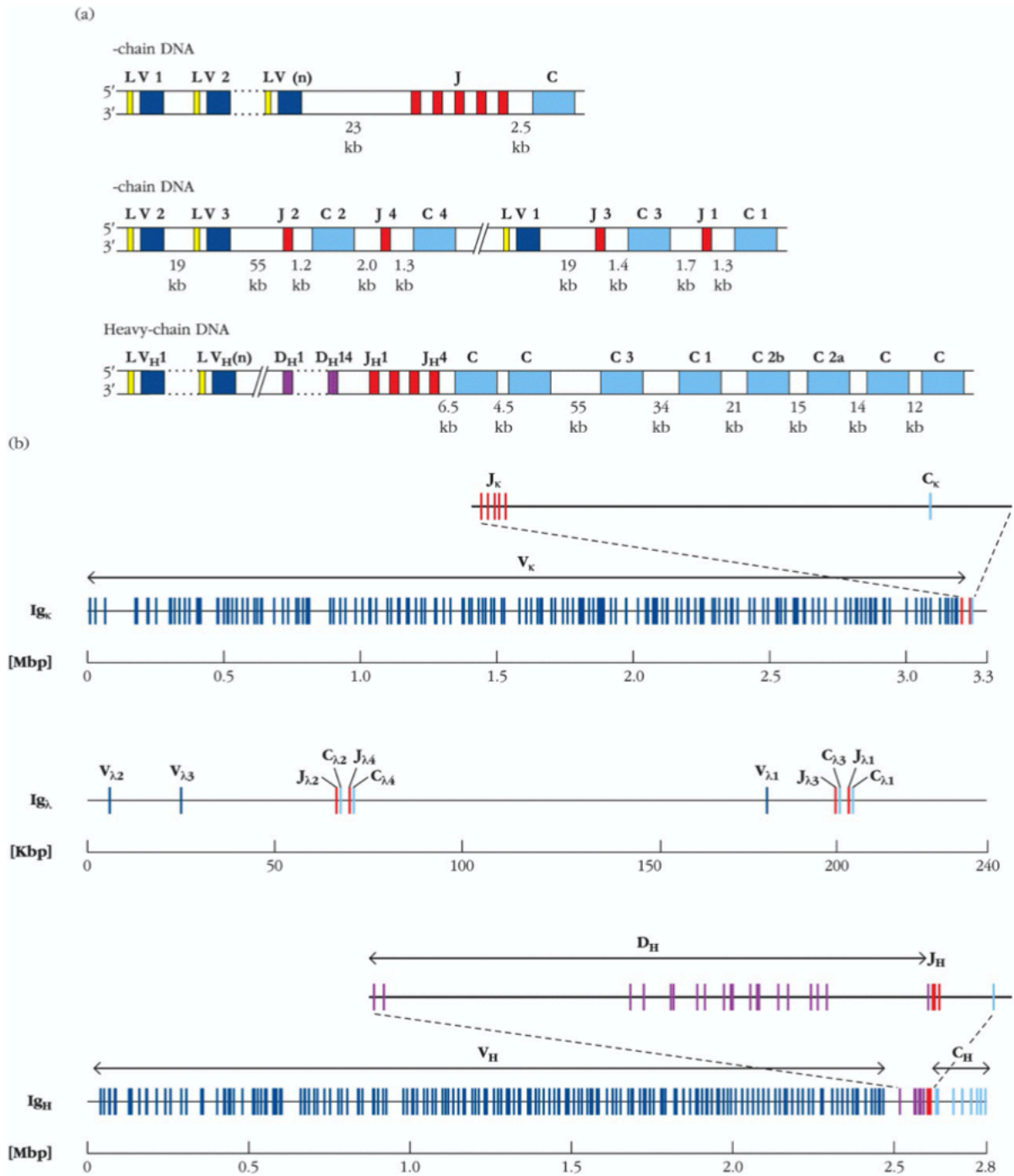
Les régions CDR fournissent des déterminants nécessaires à la fixation des antigènes, tandis que les régions FR fournissent des contraintes structurales pour l'ensemble de la région variable (Dougall *et al.*, 1994). Les deux chaînes participent donc au site de fixation à l'antigène, qui est généralement plat ou concave (Wesolowski *et al.*, 2009).

- Reconnaissance de l'antigène par l'anticorps

La fixation d'un antigène se réalise donc dans la région variable, puisque c'est cette variabilité qui permet à l'anticorps de reconnaître une infinité d'antigènes. Elle est notamment permise par les CDR, qui sont au nombre de trois sur chaque chaîne du Fab. Ainsi, les 6 CDR sont L1, L2, L3 sur la chaîne légère et H1, H2 et H3 sur la chaîne lourde.

CDR H3 admet la plus grande variabilité de séquence, de longueur et de structure (*Figure 11*). La séquence de CDR H3 peut être composée de 1 à 35 acides aminés chez l'homme, soit 15 en moyenne, contre 1 à 21 chez la souris, soit 11-12 en moyenne (Zemlin *et al.*, 2003). Cette dernière est codée par la jonction V-D-J, c'est pourquoi lors d'une insertion ou délétion de nucléotide entre V-D ou D-J on obtient une variabilité de très haut niveau. On dénombre d'ailleurs entre 3 et 9 millions de séquences uniques de CDR H3 chez l'homme (*Tableau 2*) (Arnaout *et al.*, 2011).

Figure 10 : Organisation des segments de gènes de la lignée germinale des Ig de souris, d'après (Punt *et al.*, 2019).

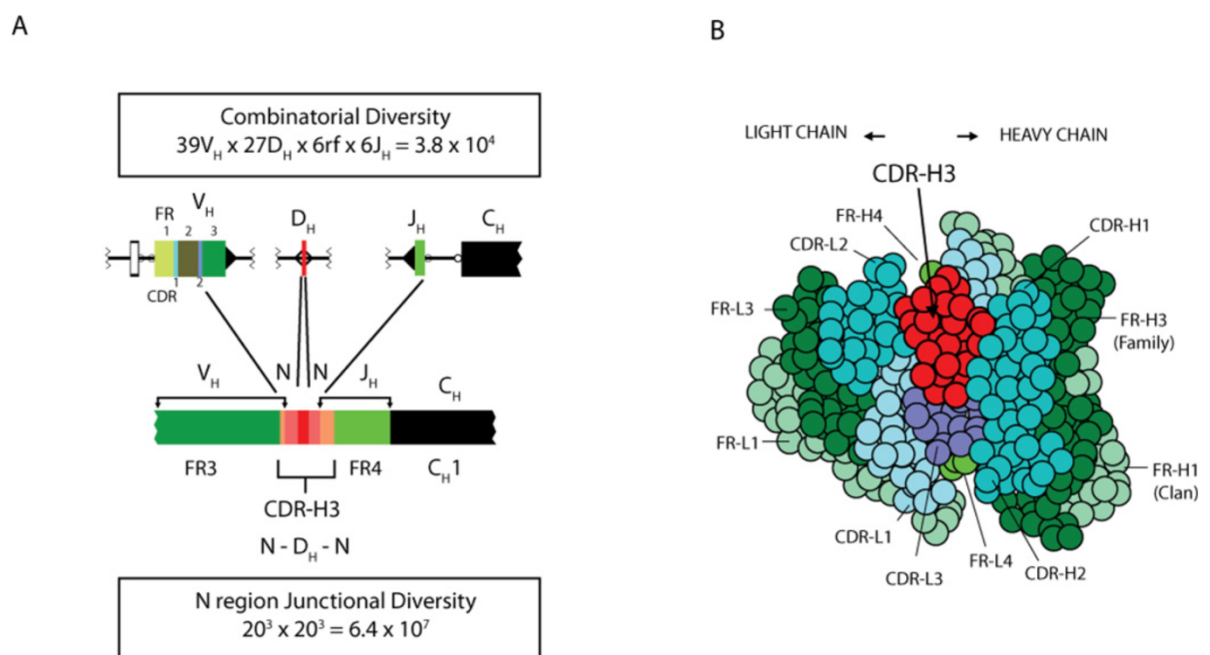


Légende : (a) Les chaînes légères κ et λ sont codées par les segments de gènes V, J, et C. La chaîne lourde est codée par les segments de gènes V, D, J et C. (b) Les segments de gènes des chaînes κ , λ et H dans le génome de la souris sont illustrés de manière à indiquer à la fois le grand nombre de segments de gènes V et la taille globale de chacun des loci de gènes V.

Tableau 2 : Diversité combinatoire des anticorps chez l'homme, d'après (Punt *et al.*, 2019).

Nature of segment	Number of heavy-chain segments (estimated)	Number of κ -chain segments (estimated)	Number of λ -chain segments (estimated)
V	45	41	33
D	23		
J	6	5	5
Possible number of combinations	$45 \times 23 \times 6 = 6210$	$41 \times 5 = 205$	$33 \times 5 = 165$
Possible number of heavy- and light-chain combinations in the human = $6210 \times (205 + 165) = 2.3 \times 10^6$			

Figure 11 : La diversité combinatoire du site de fixation à l'antigène est le produit d'un gradient imbriqué de diversité, d'après (Schroeder et Cavacini, 2010).



Légende : (A) Le réarrangement de la chaîne H peut donner jusqu'à 38 000 combinaisons VDJ différentes. L'ajout de neuf nucléotides N de part et d'autre du segment du gène D peut donner jusqu'à 64 000 000 de séquences de jonction CDR-H3 différentes. (B) Le site de liaison de l'antigène est créé par la juxtaposition des trois CDR de la chaîne lourde et des trois CDR de la chaîne légère.

Les analyses anticorps-antigènes permettent de mettre en évidence que certains antigènes utilisent les 6 boucles CDR pour leur fixation, tandis que d'autres ne se fixent que sur certains CDR. H3 joue un rôle prépondérant dans la fixation des antigènes, tandis que L2 n'intervient que peut dans la fixation de petits antigènes notamment. En effet, Wilson et Stanfield ont établi un classement par importance des interactions antigènes – CDR, comme suit (Wilson et Stanfield, 1994) :

- Interactions avec les régions hypervariables : 29% pour H3, 23% pour H2 et 21% pour L3 ;
- Autres interactions : 10% pour H1, 9% pour L1, 4% pour L2 et 4% pour le cadre.

- **La région constante**

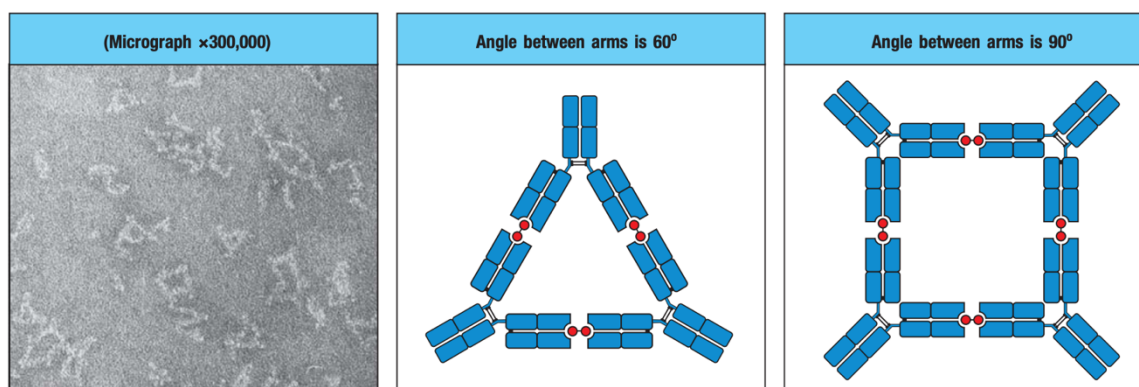
La région constante (C) permet l'exécution de nombreuses fonctions effectrices de l'anticorps, telles que l'activation du complément ou la liaison aux récepteurs Fc. Il est possible de distinguer les régions constantes présentes sur la chaîne lourde (CH) – généralement au nombre de trois CH1, CH2 et CH3 pour les IgG, IgA, IgD ou avec un domaine supplémentaire CH4 pour les IgM et les IgE – tandis que la région constante de la chaîne légère (CL) est unique (Tonegawa, 1983).

La région constante permet donc la réalisation de diverses fonctions effectrices comme l'activation d'autres médiateurs de l'immunité et sa modification peut altérer l'interaction antigène-anticorps, en modifiant son affinité ou sa cinétique de liaison par exemple (Schroeder et Cavacini, 2010).

- **La région charnière, source de flexibilité des anticorps**

L'observation d'anticorps en solution grâce à la microscopie électronique et la dépolariation par fluorescence a permis de mettre en évidence la flexibilité rotationnelle de la molécule. C'est la région charnière ou « hinge region » qui apporte de la flexibilité aux différentes parties de l'anticorps facilitant sa fixation à l'antigène ou à la cellule effectrice. En effet, cette région offre la possibilité de mouvements indépendants des deux bras de la molécule et l'obtention d'angles variés entre ces derniers (*Figure 12*) (Crowe *et al.*, 2015).

Figure 12 : Flexibilité de mouvement des bras de l'anticorps permise par les régions charnières, d'après (Kenneth et Weaver, 2017).



Légende : Mise en évidence de cette flexibilité à l'aide d'haptène (boules rouges) pour former des complexes Ag-Ac formant différents angles entre leurs bras de 60 à 90°, observés par micrographie électronique et en version schématisés.

La région CH1, à l'instar de la région charnière joue un rôle dans la flexibilité et la mobilité de la molécule. Ce qui permet la flexion et la rotation du domaine V par rapport au domaine C. Ces diverses flexibilités permettent à l'anticorps de fixer des sites éloignés l'un de l'autre, comme les sites de répétitions des polysaccharides des parois bactériennes ou encore permettent diverses interactions avec des médiateurs de l'immunité (Kenneth et Weaver, 2017).

b. Acquisition de la variabilité des anticorps

Ce ne sont pas moins de 100 ans de recherches sur la structure et la fonction des immunoglobulines qui ont permis de comprendre comment ces protéines sont capables de se lier à un nombre illimité

d'antigènes, bien qu'individuellement elles ne puissent se lier qu'à un seul ligand. L'élaboration de ces molécules démarre au sein des lymphocytes B durant leur maturation dans la moelle osseuse, à partir de petits segments d'ADN.

Les domaines variables sont conçus à partir d'abord d'une série complexe de réarrangements génétiques puis ils peuvent être soumis à une hypermutation somatique après exposition à un antigène pour permettre la maturation de son affinité avec ce dernier (Schroeder et Cavacini, 2010).

- **La génération d'isotypes**

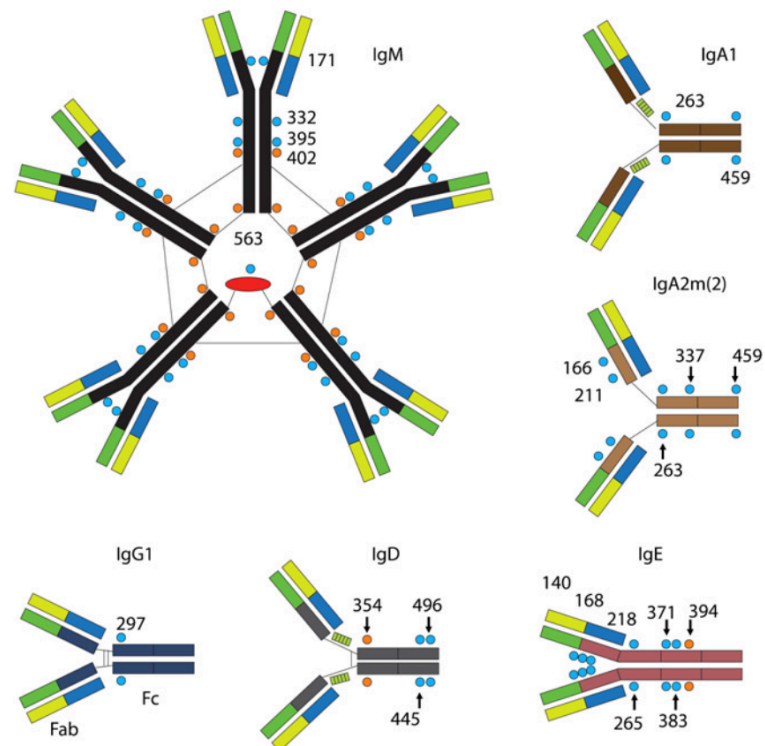
Les trois régions déterminant la complémentarité (CDR) de la chaîne lourde sont appariées avec celles de la chaîne légère pour former le site de liaison à l'antigène. Ainsi, les régions constantes, elles, peuvent être permuées pour permettre une modification de la fonction effectrice tout en maintenant la spécificité antigénique.

En effet, la diversification de la région constante de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IgH) permet une plasticité remarquable de la réponse immunitaire, notamment une distribution tissulaire polyvalente, la liaison aux récepteurs Fc et la fixation du complément. C'est donc le fragment Fc qui définit l'isotype ou la sous-classe de l'immunoglobuline (Senger et al., 2015).

Ce sont les lymphocytes B, qui par commutation isotypique (class switch recombination, CSR), lors de leur maturation en fonction de leur localisation et aidé par des cellules effectrices les lymphocytes T helper (LTh), peuvent changer la classe d'immunoglobulines qu'ils expriment. Ainsi, il existe cinq classes principales d'immunoglobulines, qu'elles soient circulantes ou de surfaces, chez les mammifères : les IgG, IgM, IgA, IgD, IgE (Senger *et al.*, 2015).

Les IgG sont les immunoglobulines présentent en plus grande proportion dans le sérum humain et possèdent aussi la plus longue demi-vie, environ 3 semaines, c'est certainement pourquoi elle est la classe d'immunoglobulines la plus étudiée. Par ailleurs, il existe quatre sous-isotypes d'IgG, déterminées sur leurs différences au sein des chaînes lourdes est notamment sur les régions CH1 et CH3. Ces quatre sous-isotypes de IgG1 à IgG4 sont numérotées en fonction de leur abondance dans le sérum humain, étudié chez un individu occidental en bonne santé (IgG1> IgG2> IgG3>IgG4). De même, les IgA sont divisées en IgA1 et IgA2 (Schroeder et Cavacini, 2010).

Figure 13 : Isotypes humaines : IgM, IgA, IgD, IgG, IgE, d'après (Schroeder et Cavacini, 2010).



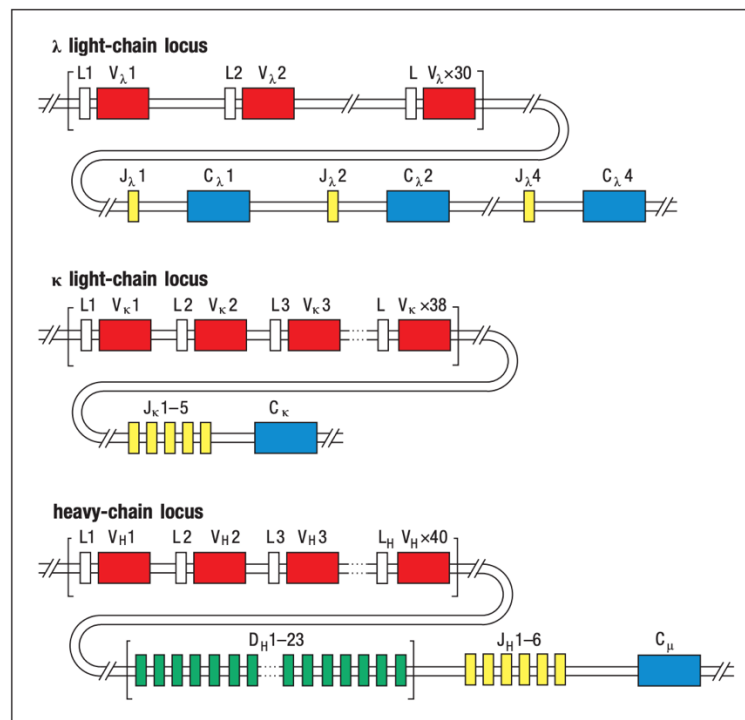
- **Le contrôle de l'information génétique**

Les chaînes légères et les chaînes lourdes sont codées par des familles multigéniques distinctes. Leur variabilité de séquence presque infinie est nourrie par diverses sources à différents points clés de leur élaboration (Schroeder et Cavacini, 2010).

Le domaine variable (VH), capable de reconnaître un nombre infini d'antigène, est obtenu par assemblage de multiples segments de gènes variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) (Tonegawa, 1983). La région constante quant à elle est codée par des exons distincts présents en aval des segments de la région variable (Schatz *et al.*, 1992).

Les immunoglobulines sont ainsi codées par trois familles de gènes : les gènes des chaînes légères (λ et κ), et les gènes des chaînes lourdes présents respectivement sur les chromosomes 16, 6 et 12 chez la souris, et les chromosomes 22, 2 et 14 chez l'homme par exemple. Par ailleurs, les chaînes CH sont aussi codées par 8 régions différentes (μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 2a$, $\gamma 1$, $\gamma 2b$, ϵ , α) définissant les différentes classes d'immunoglobulines (Tonegawa, 1983).

Figure 14 : Organisation germinales des chaînes lourdes et légères dans le génome humain, d'après (Kenneth et Weaver, 2017).

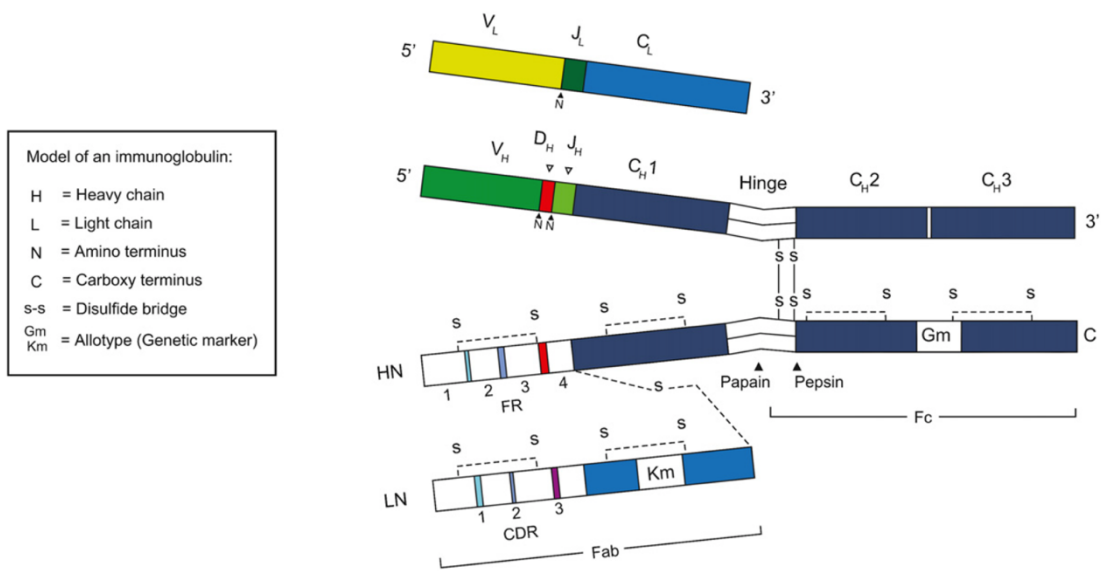


- La diversité de séquences : l'ADN et ses mutations

La variabilité des régions est permise grâce à un certain nombre de recombinaisons génétiques, puisque les régions variables VL et VH sont codées respectivement par deux et trois segments de gènes appelés V(D)J pour les chaînes lourdes ou VJ pour les chaînes légères. Les segments V codent pour le CDR1 et CDR2, tandis que la CDR3 est générée par la jonction V-D-J (Tonegawa, 1983 ; Nguyen *et al.*, 2000).

Les recombinaisons garanties par la présence de ces trois segments de gènes V (variable), D (diversité) et J (jonction), permettent d'obtenir théoriquement un million de combinaisons différentes de séquences d'anticorps (Jung *et al.*, 2006). C'est donc le choix de ces segments pendant la recombinaison somatique qui est la clé de voute de cette diversité, bien que certaines combinaisons ne se produisent jamais en réalité (Tonegawa, 1983).

Figure 15 : Représentation en deux dimensions d'une molécule d'IgG, d'après (Schroeder et Cavacini, 2010).

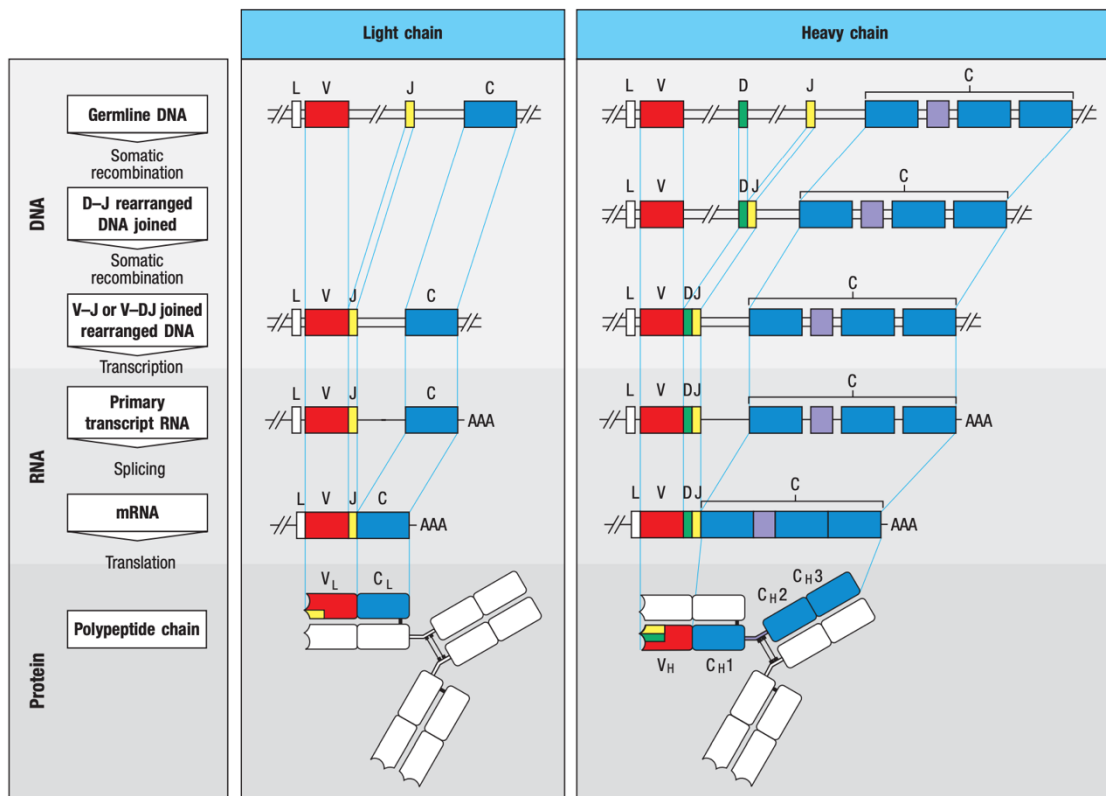


Légende : La partie supérieure est représentée selon sa séquence nucléotidique et la partie inférieure selon sa séquence protéique.

Il existe de nombreux segments dans le génome humain : 56 V, 23 D et 6 J. Ces segments de gènes existent donc dans de nombreuses copies et peuvent ainsi être assemblés de façon aléatoire sous contrôle génétique. Cependant un biais d'appariement existe, puisqu'il se fait préférentiellement entre certains D et J (Arnaout *et al.*, 2011). Ces contrôles dans la recombinaison ont notamment lieu grâce aux séquences de signaux de recombinaison (RSS) associées à chaque segment et présentes de part et d'autre (Figure 16).

Ces séquences RSS sont composées d'heptamères symétriques séparé d'un nonamère riche en A/T par quelques nucléotides (12 ou 23 paires de bases) (Jung *et al.*, 2006). Ces séquences sont directement adjacentes aux séquences codantes et se trouvent d'un ou des deux côtés. Elles sont à la fois nécessaires et suffisantes pour diriger la recombinaison V(D)J (Schatz *et al.*, 1992).

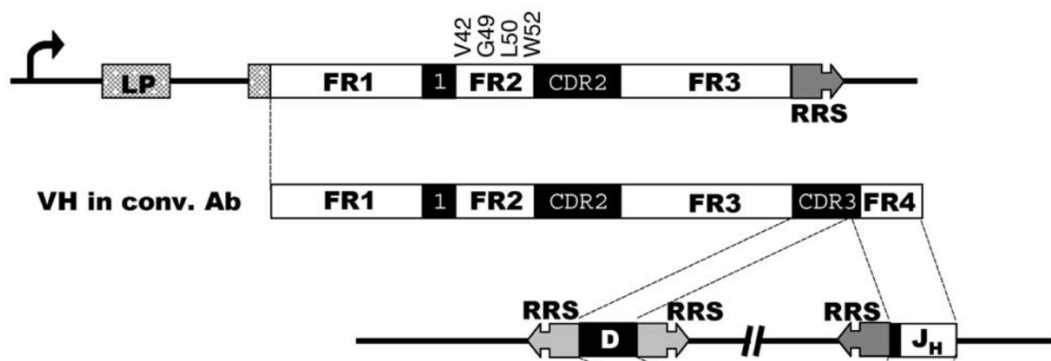
Figure 16 : Construction des Ig à partir de l'ADN germinatif, d'après (Kenneth et Weaver, 2017).



Légende : L'ADN germinatif des chaînes lourdes et légères comporte divers segments de gènes qui seront réarrangés et transcrits en ARN, lui-même converti en ARN messager grâce à un phénomène d'épissage ou « splicing » des séquences codantes (exons) avant d'être traduit en chaîne polypeptidique pour former l'Ig.

Les protéines RAG1 et RAG 2 ou V(D)J Recombination-Activating Protein 1 et 2 ont été identifiées, dans les cellules lymphoïdes immatures, comme activatrices de la recombinaison V(D)J – enzyme spécifique de ce processus de recombinaison. RAG 1 et RAG 2 forment un complexe enzymatique, l'endonucléase RAG, capable de reconnaître spécifiquement les séquences RSS (Figure 17 et 18) (Schatz *et al.*, 1992 ; Jung *et al.*, 2006). Enfin, ces gènes peuvent à tout moment subir des mutations somatiques, altérant parfois la séquence codant la région variable et source de nouvelle diversité (Nguyen *et al.*, 2000).

Figure 17 : Organisation germinale des segments VH, d'après (Conrath *et al.*, 2003).



Légende : La flèche correspond au promoteur, LP la séquence de l'exon peptide leader est séparée de l'exon V, le RSS est monté après les codons pour FR3, les acides aminés caractéristiques de FR2 sont indiqués. Après réarrangement de l'ADN du segment germinale VH avec l'un des segments communs D et l'un des six segments communs JH, après épissage, traduction et clivage du peptide leader, un domaine mature VH peut être formé et faire partie de la chaîne lourde.

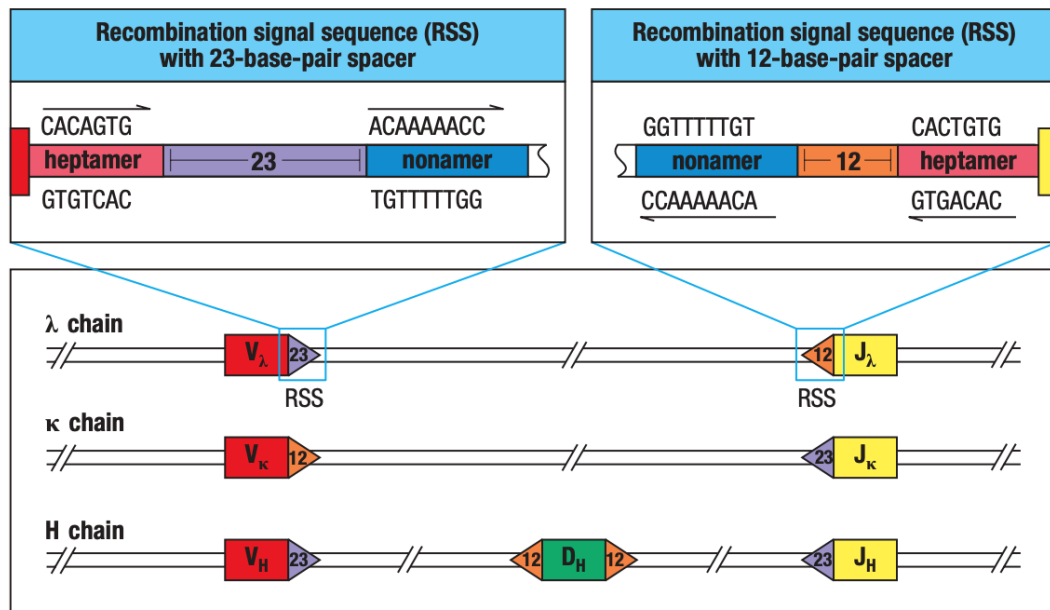
Le gène V est composé :

- D'un promoteur, l'exon leader
- D'un intron intermédiaire
- D'exons codant les FR1, 2, 3 et les CDR1, 2 et la portion amino-terminale de CDR3
- D'une séquence de signaux de recombinaisons (RSS)

Le gène J est lui composé :

- D'une séquence de signaux de recombinaisons (RSS)
- D'une séquence codant le FR4 et la partie carboxy-terminale de CDR3 et

Figure 18 : Séquences RSS adjacentes aux segments de gènes (Kenneth et Weaver, 2017).



En aval des loci VDJ se trouvent aussi 9 gènes CH fonctionnels composés d'une série d'exons codant pour divers domaines, la région charnière ou la région terminale. Ces gènes peuvent subir un épissage alternatif pouvant générer deux types de fonctions carboxy-terminales, déterminant si l'immunoglobuline sera soluble ou ancrée dans la membrane du lymphocyte B (Schroeder et Cavacini, 2010).

- La diversité jonctionnelle

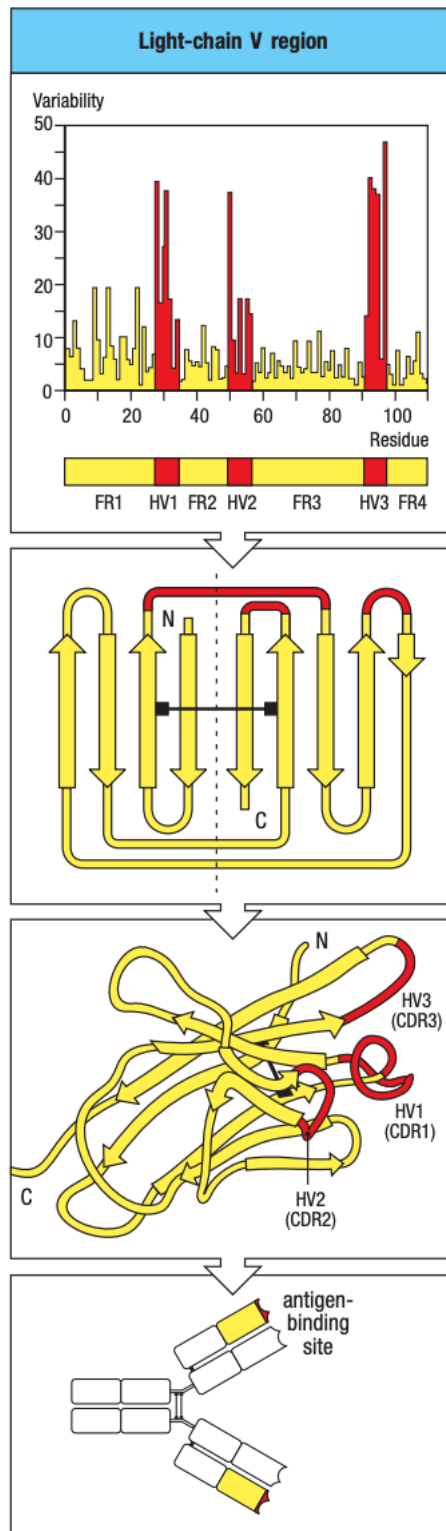
En pratique, l'obtention de séquences différentes est encore plus grande puisque des additions et délétions de nucléotides aux jonctions de ces segments de gènes peuvent survenir. Elles entraînent l'apparition de mutations somatiques qui peuvent modifier encore les séquences d'anticorps. Ces mutations sont permises aux jonctions VL-JL, VH-D et D-JH car ces extrémités sont imprécises. Et les jonctions entre les segments sont réalisées de façon aléatoires (Tonegawa, 1983).

En effet, il peut y avoir des additions ou des délétions de bases de 1 à 10 nucléotides dans ces extrémités codantes. Cependant, il est aisé de comprendre, qu'elles peuvent parfois aussi être à l'origine de la production de gènes non fonctionnels, avec la création de codons stop notamment (Schatz *et al.*, 1992).

- La diversité combinatoire

L'appariement des chaînes légères et des chaînes lourdes produites aléatoirement et indépendamment assure une nouvelle source de diversité dans le processus d'élaboration d'une immunoglobuline (Nguyen *et al.*, 2000). Lorsque les domaines VH et VL sont appariés, les trois boucles hypervariables de chaque domaine sont réunies pour ne former qu'un seul site de fixation à l'antigène à l'extrémité de chaque bras de la molécule (Figure 19). C'est ainsi, que cette combinaison détermine la spécificité de l'anticorps. Une autre source de diversité dans le répertoire permettra encore d'accroître la spécificité de l'anticorps pour son antigène, mais elle interviendra uniquement après le déclenchement de la réponse immunitaire : l'hypermutation somatique (Kenneth et Weaver, 2017).

Figure 19 : Régions CDR de la chaîne légère formant le site de fixation à l'antigène et sa combinaison avec une chaîne lourde, d'après (Kenneth et Weaver, 2017).

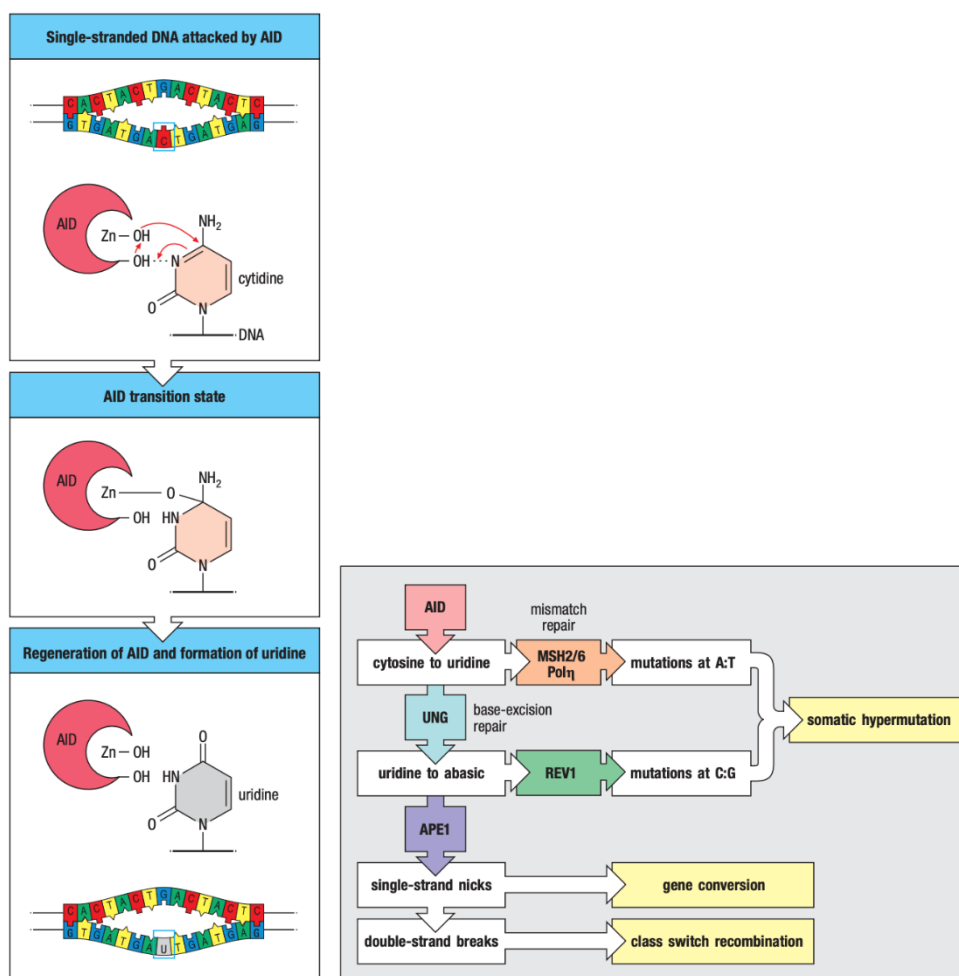


- L'hypermutation somatique

Le mécanisme d'hypermutation somatique, ou Somatic Hypermutation Mechanism (SHM) en anglais, intervient après la présentation à l'antigène, et donc l'activation des lymphocytes B. Les gènes du domaine variable des lymphocytes du centre germinal – au niveau des organes lymphoïdes secondaires – subissent une hypermutation somatique. En effet, à l'aide des lymphocytes T, une maturation d'affinité se produit en réponse à l'exposition à l'antigène, par des mutations – jusqu'à 1023 changements de paires de bases – lors de la réplication (Schroeder et Cavacini, 2010).

Une enzyme, la cytidine désaminase induite par l'activation (Activation-induced cytidine deaminase, AID), participe à la fois à l'hypermutation somatique (SHM) et à la commutation de classe (CSR) des immunoglobulines. L'AID remplit son rôle dans la diversification du gène de l'anticorps en désaminant le résidu cytidine dans les régions V d'immunoglobuline et engendre la diversification du gène. Elle intervient en permettant l'ouverture de la double hélice de l'ADN pour y incorporer des paires de bases U/G mal appariées qui seront ensuite excisées par une enzyme réparatrice de l'ADN, l'uracyle ADN glycosylase, laissant un site abasique et conduisant à terme la génération de diversité par SHM ou CSR (Figure 20) (Schroeder et Cavacini, 2010 ; Senger *et al.*, 2015).

Figure 20 : Mécanisme d'action de l'AID qui participe à la fois à la SHM et la CSR, d'après (Kenneth et Weaver, 2017).



- Les mutations post-traductionnelles

Enfin les mutations post-traductionnelles, telles que la glycosylation et la sulfatation de tyrosine, permettent l'acquisition d'une diversité de séquence supplémentaire. Puisque les immunoglobulines sont des glycoprotéines, elles possèdent des sites de glycosylation liés à l'azote, c'est-à-dire un site de fixation d'un glycanes, notamment au niveau des trois domaines CH2. La présence de ces glycanes influence la fixation des immunoglobulines aux récepteurs Fc des cellules effectrices et médiateurs immunitaires (Crowe *et al.*, 2015).

- La conversion de gènes

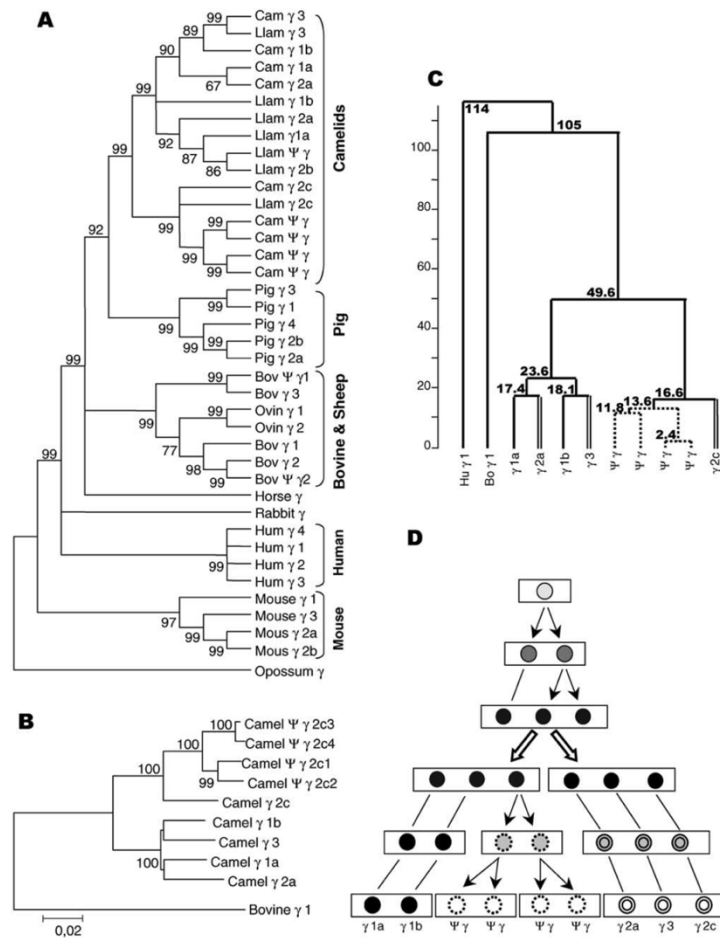
La conversion génique intervient chez de nombreuses espèces de vertébrés, en faisant varier la structure de gènes VH. Elles sont accompagnées par des mutations somatiques indépendantes – délétions et insertions de codon *de novo* – principalement en région CDR3. En effet, ces insertions et délétions de nucléotides se trouvent en général peu associées à des séquences palindromiques ou des signaux de recombinaison d'immunoglobulines, et donc seraient générées à la faveur d'un mauvais alignement de séquence ou « glissement » (Conrath *et al.*, 2003).

2. Les anticorps à domaine unique, à l'origine des nanocorps

Dès 1964, les premiers anticorps dépourvus de chaînes légères ont été identifiés chez certains individus, apparus par voie somatique, et provoquant la maladie des chaînes lourdes. Dans la plupart des cas, ces anticorps étaient dépourvus d'une grande partie de leur région V, impliquées dans la liaison à l'antigène, aussi, ces anticorps ne pouvaient plus remplir leurs fonctions (Muyldermans, 2013).

En 1993, comme indiqué plus haut, des anticorps fonctionnels dépourvus de chaînes légères ont été identifiés chez les camélidés. Divers gènes ont été identifiés chez ces espèces et leur étude permet de retracer l'apparition et l'évolution de ces immunoglobulines (*Figure 21*). Plus tard, ils ont été découverts chez le requin et le poisson rat. Aussi, il est intéressant de se demander pourquoi et comment sont apparues ces évolutions convergentes (Conrath *et al.*, 2003 ; Wesolowski *et al.*, 2009).

Figure 21 : Émergence des anticorps à domaine unique chez les camélidés, d'après (Conrath *et al.*, 2003).



Légende : (A) Arbre phylogénétique de 39 gènes d'IgG d'espèces de mammifères ; (B) Arbre phylogénétique des 9 gènes d'IgG du dromadaire ; (C) Arbre linéarisé des taxons de (B) ; (D) Duplications hypothétiques de gènes d'IgG chez le dromadaire, déduites de (C).

A. La structure particulière des anticorps à domaine unique

Il est maintenant bien établi qu'il existe à la fois des anticorps conventionnels, dit hétérotétramériques – composés de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères comme décrit précédemment – et des anticorps dépourvus de chaînes légères ou anticorps homodimériques dans le sérum des camélidés. Les anticorps hétérodimériques classiques représentent 25% des anticorps circulants chez *Camelus dromedarius* (Griffin *et al.*, 2014).

En effet, des anticorps composés uniquement de chaînes lourdes – (H)-chain antibodies (HCAbs) – ont été identifiés, circulants chez certaines espèces de Tylopodes, sous embranchement des Artiodactyles ; telles que de camélidés (*Camelus dromedarius* et *Camelus bactrianus*), des lamas et alpagas (*Lama glama*, *Lama pacos* et *Lama guanicoe*) et des vigognes (*Vicugna vicugna* et *Vicugna pacos*) (Figure 23). Ces anticorps pourtant dépourvus de chaînes légères ont la particularité d'être fonctionnels chez ces espèces, contrairement aux chaînes simples qui avaient pu être isolées jusque-là à partir d'anticorps conventionnels. En effet, ces chaînes isolées, malgré une spécificité de liaison conservée, possédaient généralement une affinité et une solubilité réduites (Ward *et al.*, 1989).

Figure 22 : Photos de camélidés, d'après (Wheeler, 2012 ; Nagy *et al.*, 2021).



Légende : A) *Camelus dromedarius* et *Camelus bactrianus* ; B) *Vicugna pacos* ; C) *Lama glama* ; D) *Lama guanicoe*.

Diverses études ont permis d'obtenir la séquence et la structure cristalline des anticorps à domaine unique, elle est similaire à un ballon de rugby d'un diamètre d'environ 2,5 nm et d'une longueur d'environ 4,2 nm (Figure 23). Son domaine Fab – plus petite entité fonctionnelle de l'anticorps – possède une masse moléculaire d'environ 15 kDa, ce qui représente environ un dixième de celle d'un anticorps traditionnel, et lui vaudra ainsi son appellation de « nanocorps » (Yu *et al.*, 2021).

Figure 23 : Structure cristalline d'un nanocorps, d'après (Beghein et Gettemans, 2017).



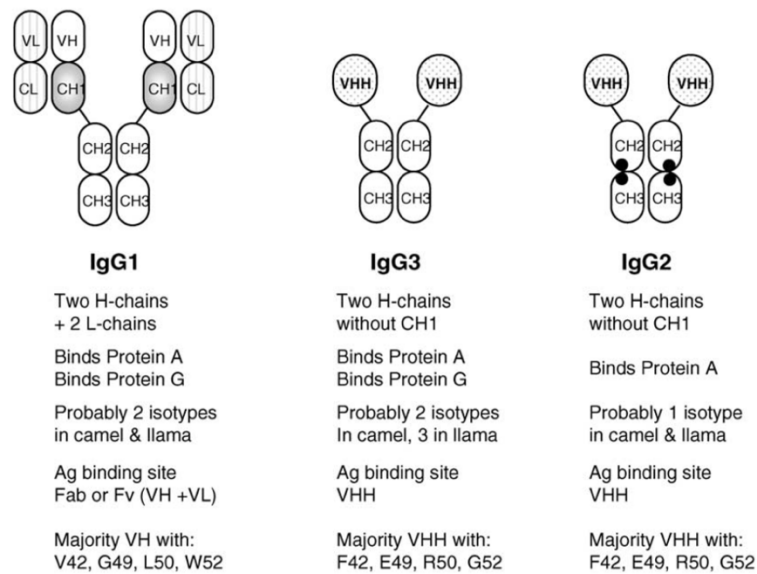
Légende : La CDR1 est représentée en jaune, la CDR2 en magenta, la CDR3 en rouge, et les FRs sont représentées en vert.

Les anticorps à domaine unique, possèdent une organisation typique d'IgG de mammifères, ils sont ainsi composés de quatre régions FR formant le cœur de la molécule puis des régions déterminant la complémentarité CDR (Figure 24). Les anticorps de requin possèdent quant à eux une région CDR2 vestigiale, qui ne participe pas à la liaison à l'antigène (Conrath *et al.*, 2003).

Par ailleurs, quatre substitutions d'acides aminés sont généralement retrouvées au sein des VHH dans la région FR2 (acides aminés 37, 44, 45 et 47 ; numérotation de Kabat). Elles sont normalement conservées dans les domaines VH des anticorps conventionnels et participent à la formation d'une interface hydrophobe avec les domaines VL. Ces substitutions hydrophiles leur confèrent ainsi leur caractéristique homodimérique, au sens où ces résidus hydrophobes sont habituellement en contact avec les VL (Harmsen et De Haard, 2007).

Le site de liaison à l'antigène de ces anticorps est composé d'un seul domaine variable (VHH), dont la structure ressemble à celui des anticorps conventionnels humains (VH). En effet, la séquence d'acides aminés du VHH possède de nombreuses similarités avec celles de VH humaine de la famille III en dehors de certaines substitutions, qui ne sont d'ailleurs pas responsables de réarrangements conformationnels du squelette (Figure 24) (De Genst *et al.*, 2006).

Figure 24 : Représentation de la structure des isotypes des IgG, d'après (Conrath *et al.*, 2003).



Légende : Structures obtenues par chromatographie à partir de protéines A et G, sur sérum de camélidés. Les VHH ont évolué au sein du sous-groupe des IgG3, d'après leurs conformations similaires.

B. L'existence d'isotypes

Chez le dromadaire, il existe deux isotypes d'IgG conventionnelles (IgG 1a et 1b) et trois types d'IgG à domaine unique (IgG 2a, 2c et 3) codées par les cinq gènes susnommés. Tandis que chez le lama un isotype supplémentaire a été identifié l'IgG2b, dont le gène n'a pas été identifié chez le dromadaire (Conrath *et al.*, 2003). Les autres types d'immunoglobulines ne sont pas très bien connus et il est difficile de conclure quant au fait qu'il existe des anticorps dépourvus de chaînes légères au sein des isotypes IgM, IgA, IgE et IgD (De Genst *et al.*, 2006).

Pour aller plus loin dans la dichotomie, sept sous-familles ont été identifiées dont cinq sont reconnues comme exprimées *in vivo*. A titre indicatif, VHH-2 est la principale sous-famille de nanocorps de dromadaire, qui comprend les nanocorps NbHuL6 et NbBcll10, elle en englobe les 75%, tandis que VHH-5, qui comprend le NbAn33, est plutôt rare (Vincke *et al.*, 2012).

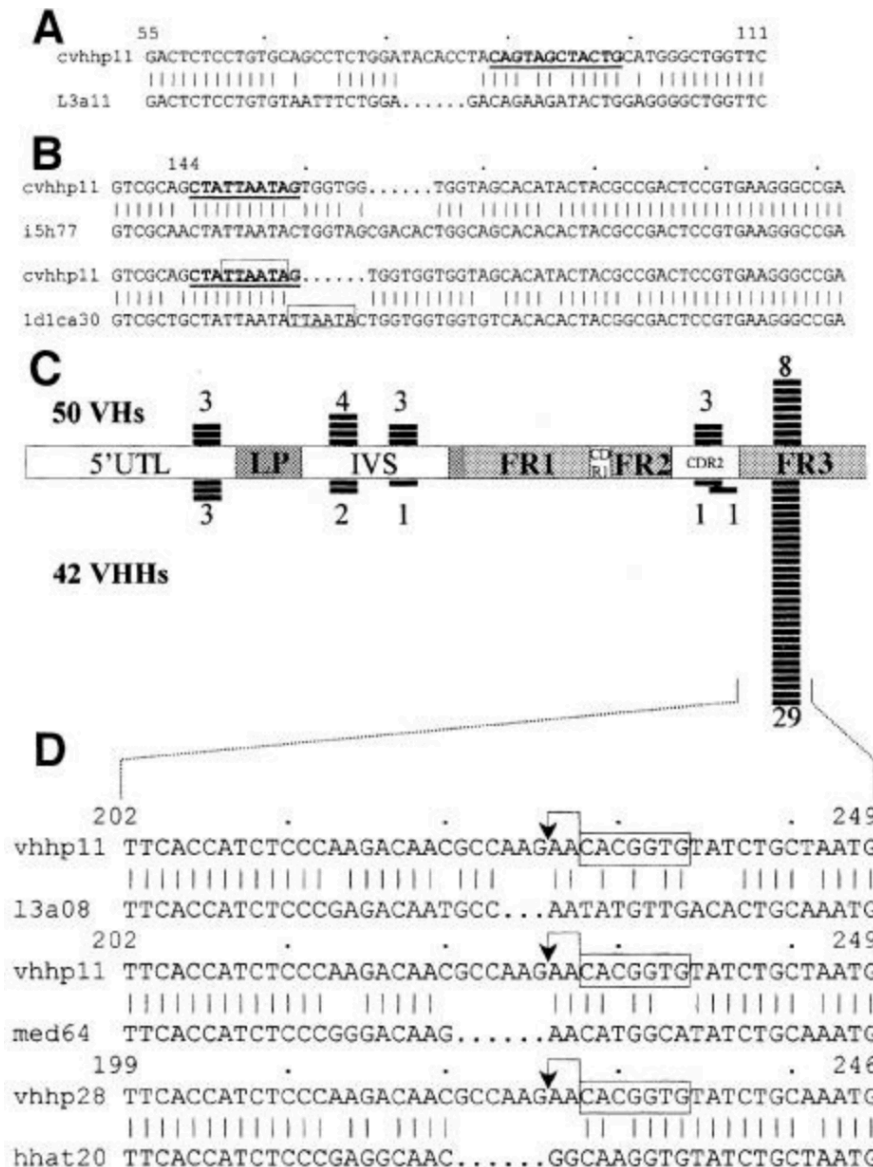
Enfin, il faut mentionner certains anticorps à domaine unique, retrouvés occasionnellement, dérivés de la recombinaison de segments de gènes VH conventionnels, au cours de la maturation des lymphocytes B. Qualifiés de VHH conventionnels de type VHH, ils ne présentent pas les substitutions caractéristiques en région FR2 des autres VHH. Ces anticorps contiennent, comme les autres VHH un résidu hydrophile – principalement arginine – situé en position 103. Cette position est normalement hydrophobe pour les VH conventionnels, car classiquement composée d'un tryptophane (Harmsen et De Haard, 2007).

C. Le génome des camélidés

La diversité combinatoire des anticorps conventionnels est d'ordinaire générée par l'association aléatoire entre les chaînes lourdes et légères. Chez les camélidés, ce manque de diversité est compensé par l'existence de séquences VHH plus variées. D'autres mécanismes de diversité jonctionnelle et d'hypermutation somatique sont aussi présents. En effet, la variation de séquences se concentre plus particulièrement au niveau des régions CDR, pour augmenter le type de boucles possibles, soit 10 boucles pour le VHH contre 6, 5 et 3 chez les VH conventionnels de dromadaires, hommes et souris (Conrath *et al.*, 2003).

Il existe 33 séquences uniques de VHH contre 39 de VH, codées respectivement par 42 et 50 gènes différents. Parmi les 42 gènes germinaux VHH, les plus rencontrés sont ceux de la sous-famille VH 2a ; ils représentent 66% des pools réarrangés (*Figure 25*) (Nguyen *et al.*, 2000).

Figure 25 : Comparaison des séquences nucléotidiques de VH et VHH, d'après (Nguyen et al., 2000).



Légende : (A) Alignement nucléotidique du clone d'ADNc l3a11 (ligne inférieure) et de son gène germinale putatif (cvhhp11, ligne supérieure), révélant une délétion de 6 nucléotides (nt) (en pointillés). La séquence palindromique est en gras et soulignée. Les chiffres indiquent les positions nucléotidiques de l'élément VHH germinale. (B) L'alignement de l'ADNc (lignes inférieures) et des séquences germinales les plus proches (lignes supérieures) indique les insertions, qui ne sont pas tempérées (paire 1) ou sont dupliquées (encadré dans la paire 2). (C) Fréquence et distribution des éléments de type RSS dans les VHs et VHHs germinaux du chameau. Les nombres indiquent la fréquence des éléments RSS trouvés dans 50 VHs (en haut) et 42 VHHs (en bas). (D) Jonction incorrecte adjacente au signal RSS résultant en des clones avec une délétion : les séquences heptamériques sont encadrées et le site de clivage attendu est indiqué par une flèche. Les trois séquences d'ADNc de VHH de chameau (l3a08, med64 et hhat20) présentent une délétion de codon lorsqu'elles sont alignées avec leurs gènes correspondants putatifs (cvhhp28 et cvhhp11).

Il est intéressant de remarquer que les séquences de signaux de recombinaison sont directement intégrées dans le génome germinale du dromadaire, elles ne sont donc pas introduites par un mécanisme d'hypermutation somatique a posteriori (Schroeder et Cavacini, 2010).

Particularités de la séquence de VHH :

- La présence d'une région codant pour la cystéine, en région 45, responsable de l'établissement des ponts disulfures entre la région CDR1 et la CDR3 ;
- La séquence CDR3 formée de la réunion de deux segments D ou alors par une activité accrue de la désoxynucléotidyl-transferase terminale pendant la recombinaison des séquences J et D.

a. Les gènes de la région constante

Dans le répertoire génétique des dromadaires neuf gènes γ ont été identifiés dans l'élaboration d'isotypes (Tableau 3), cinq ont été identifiés comme codant des immunoglobulines, dont deux conventionnelles et trois dépourvues de chaînes légères (De Genst *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Répertoire germinal isotypique du dromadaire, d'après (De Genst *et al.*, 2006).

Gene	Isotype	GenBank	Major features and other information
IGHG1A	IgG1a		H2–L2 composition, binds protein A and protein G, sequence only obtained as cDNA. Hinge sequence: ELKTPQPQSQPECRCPKCP
IGHG1B	IgG1b		H2–L2 composition, binds protein A and protein G, sequence only obtained as cDNA Hinge sequence: EPHGGCTCPQCP
IGHG2A	IgG2a	AJ131945	Heavy-chain antibody devoid of L chains, binds protein A, not protein G. Sequence obtained as cDNA and from cloned genomic DNA. Hinge sequence: EPKIPQPQPKPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP
IGHG2C	IgG2c		Heavy-chain antibody devoid of L chains, binds protein A, not protein G. Sequence only obtained as cDNA Hinge sequence: AHHSDDPSSKCPKCP
IGHG3	IgG3		Heavy-chain antibody devoid of L chains, binds protein A and protein G. Sequence only obtained as cDNA. Hinge sequence: GTNEVCKCPKCP
IGHGP1	IgGP1		Pseudogene, sequence found in clones of genomic DNA, never as cDNA. Largest homology with IGHG2C
IGHGP2	IgGP2		Pseudogene, sequence found in clones of genomic DNA, never as cDNA. Largest homology with IGHG2C
IGHGP3	IgGP3		Pseudogene, sequence found in clones of genomic DNA, never as cDNA. Largest homology with IGHG2C
IGHGP4	IgGP4		Pseudogene, sequence found in clones of genomic DNA, never as cDNA. Largest homology with IGHG2C
IGHM	IgM		Sequence obtained as cDNA, and 3' end of gene as cloned genomic DNA
IGHA	IgA		Antibody only detected by cross-reactivity with anti-IgA serum, no DNA sequence available
IGHD	IgD		Presence remains questionable
IGHE	IgE		Presence remains questionable
IGKC			Constant κ L-chain gene (only cDNA available)
IGLC1			Constant λ L-chain gene (only cDNA available)
IGLC2			Constant λ L-chain gene (only cDNA available). Contains a glycosylation site

Les gènes codant la région constante des anticorps à domaine unique conservent une organisation typique des IgG d'autres mammifères, notamment la longueur des domaines codants conservés après épissage – les exons – et des domaines éliminés après épissage – les introns. En effet, chaque gène contient quatre exons des domaines constants – CH1, la région charnière, CH2, CH3 – et deux exons transmembranaires.

Ils possèdent tous la même séquence nucléotidique CH1, à l'exception d'une mutation au niveau du site d'épissage canonique à la fin de la séquence CH1, cette mutation est ainsi responsable de la perte du signal consensus d'épissage et est responsable de l'élimination de l'ensemble du domaine CH1 dans les immunoglobulines IgG2a à domaine unique de chameau.

Bien qu'ils soient dépourvus de leur domaine CH1, les anticorps à domaine unique conservent leurs fonctions effectrices, telle que la liaison au complément, permettant la lyse du complément (Conrath *et al.*, 2003).

b. Les segments V

Les gènes V constituent un ensemble de segments germinaux VH et VHH codant donc les domaines variables des anticorps conventionnels et anticorps à domaine unique des dromadaires. Or, en l'absence de diversité générée par l'association aléatoire de chaînes lourdes et de chaînes légères notamment, la diversité des VHH repose sur la diversité de séquences de segments germinaux VHH et la diversité jonctionnelle (Nguyen *et al.*, 2000).

Chez le dromadaire, 92 séquences nucléotidiques de la région V ont été identifiées. Ces séquences sont réparties en 50 gènes codant des VH3 et 42 gènes pour les VHH3, qui donneront respectivement 39 et 33 séquences uniques d'acides aminés. Parmi ces dernières, des modifications, telles que la présence d'un résidu cystéine en position 30, 32, 33 et 45 ou encore une longueur de CDR2 variant de 16 à 17 acides aminés, ont permis d'établir une répartition en sous-familles. Aussi, sept sous-familles (1a, 2a, 2b, 3b, 4b, 5a et 5b) sont décrites (*Tableau 4*) (Nguyen *et al.*, 2000).

Tableau 4 : Différenciation des sept sous-familles en fonction de la localisation d'une cystéine supplémentaire et de la longueur du fragment CDR2, d'après (Nguyen *et al.*, 2000).

Subfamily	Cys/CDR2 ^a	Members	Total cDNA found	Binder found	Ags ^b
V _H 3H-1a	Cys ⁻ /17	1	0	0	
V _H 3H-2a	Cys33/17	5	54	18	lysozyme, carbonic anhydrase, cutinase, tetanus toxoid, RNase phenyl oxazolone
V _H 3H-2b	Cys33/16	1	2	2	lysozyme, carbonic anhydrase
V _H 3H-3b	Cys30/16	2	5	2	amylase
V _H 3H-4b	Cys45/16	5	8	3	amylase, tetanus toxoid
V _H 3H-5a	Cys32/17	2	0	0	
V _H 3H-5b	Cys32/16	26	3	1	amylase
Total		42	72	26	

Les séquences d'ARNm matures des anticorps à chaînes lourdes semblent différer de celles des anticorps conventionnels uniquement au niveau de codons investis dans l'interaction des chaînes lourdes et légères – au niveau des codons 42, 49, 50 et 52 (Conrath *et al.*, 2003). Par ailleurs, ces segments V des anticorps à chaînes lourdes héritent des promoteurs et les séquences signal de recombinaison conservées (RSS).

Quant au lama, six segments de gènes V germinaux ont été identifiés. L'un d'eux possède des résidus d'acides aminés conservés des chaînes lourdes conventionnelles – Val42, Gly49, Leu50 et Trp52 – tandis que les cinq autres possèdent des résidus de chaînes similaires à ceux des dromadaires (Conrath *et al.*, 2003).

c. Les réarrangements de VDJ

L'assemblage aléatoire de segments germinaux permet d'acquérir une diversité supplémentaire. Des segments de mini-gènes DH et JH sont aussi utilisés dans l'élaboration des séquences. Cependant, des segments, le JH3 et le JH5, sont les plus fréquemment utilisés dans ces réarrangements, cette source de variabilité nécessaire n'est donc pas suffisante (Conrath *et al.*, 2003).

d. Les mécanismes de diversification des anticorps à domaine unique

Divers mécanismes de diversification entrent en jeu dans l'élaboration d'un vaste répertoire de séquences VHH chez le dromadaire. En effet, des hypermutations somatiques, des variations de séquence, encore des insertions/délétions d'oligonucléotides et enfin des remplacements de gènes (Conrath *et al.*, 2003).

• Les particularités de séquence

A l'instar des anticorps traditionnels, la variation de la séquence des gènes réarrangés par rapport aux gènes de la lignée germinale témoigne d'une diversification à plusieurs niveaux des nanocorps (Nguyen *et al.*, 2000).

○ La longueur du CDR3

La longueur moyenne des CDR3 peut être discutée comme source de diversification. En effet, une région CDR3 de VH de dromadaire comprend environ 11 acides aminés, contre 17 pour le VHH et 15 chez le lama. Une séquence CDR3 plus longue peut représenter un avantage pour la liaison de ces anticorps. Cependant, cette observation n'est pas obligatoirement retrouvée chez tous les anticorps (De Genst *et al.*, 2006).

○ Les cystéines non canoniques

Les ponts disulfures supplémentaires dans les régions variables semblent apporter une diversification de présentation géométrique du paratope, permettant d'augmenter le répertoire de liaison à l'antigène. Ces ponts s'établissent entre les résidus cystéines à différentes localisations possibles, notamment aux positions 31, 33, 34 et 50 du VHH germinale de dromadaire ou à d'autres positions après une nouvelle insertion somatique (De Genst *et al.*, 2006).

En effet, les boucles canoniques des VHH changent de façon dynamique au cours du processus de diversification somatique. Les variations de séquence dans la région CDR1a et la formation de ponts disulfure inter-boucles pourraient conduire à des architectures de boucles alternatives, augmentant ainsi la diversité structurelle du paratope, et pourraient également améliorer le contact direct avec l'antigène. Si ce processus d'adaptation se produit avant que la cellule ne rencontre un antigène, ceci peut augmenter le répertoire de liaison à l'antigène. Ainsi, les mutations somatiques peuvent contribuer à l'expansion continue du répertoire primaire à tous les stades de la génération d'anticorps à domaine unique (Conrath *et al.*, 2003).

Par ailleurs, le site de liaison à l'antigène des anticorps à domaine unique possède seulement trois boucles contre six pour des anticorps classiques. Ce site de liaison simplifié bénéficie donc d'une boucle CDR3 plus longue contrainte par des liaisons disulfure, qui augmente la diversité du paratope, encore modifiée par l'ajout d'une cystéine en partie N-terminale du CDR1 (ou FR2) ou en partie C-terminale du CDR3 (De Genst *et al.*, 2006).

- **L'hypermutation somatique**

Le phénomène de maturation des affinités est une étape cruciale du développement de la réponse humorale, qu'elle soit pour les anticorps conventionnels ou pour les nanocorps, où elle y est plus marquée. Dans les deux semaines suivant l'immunisation, les lymphocytes B spécifiques de l'antigène sécrètent des anticorps de faible affinité, codés par la lignée germinale à des molécules d'anticorps de haute affinité, diversifiées sur le plan somatique. La prolifération des lymphocytes B induite par l'antigène active un mécanisme d'hypermutation – ou mutation à haute fréquence, comme expliqué au chapitre 1.B – par lequel des mutations ponctuelles sont introduites dans les régions variables réarrangées et les séquences flanquantes adjacentes. La sélection des antigènes peut faire en sorte que les cellules exprimant des récepteurs à haute affinité, soient préférentiellement produites. Le résultat de ces processus est une augmentation de l'affinité des molécules d'anticorps spécifiques de l'antigène (Berek *et al.*, 1991).

Certains triplets de nucléotides ont été identifiés comme points chauds de l'hypermutation somatique, chez les camélidés. Ces codons ont ainsi été sélectionnés dans la FR et la CDR des gènes V en fonction de leur propriété de mutabilité, comme le codon 'AGY' pour la sérine (Ser) des CDR et 'TCN' pour celle des FR. Et même, certaines substitutions uniques de Phe28 et Phe30 (codon 'TTY') en Tyr28 et Tyr30 (codon 'TAY') introduisent de nouveaux points chauds lors de l'évolution des VH en VHH (Conrath *et al.*, 2003).

D'autres mutations conduiront à de nouvelles conformations complètes de la boucle et élargiront ainsi le répertoire structural des VHH, tandis que certaines pourraient conduire à des substitutions d'acides aminés provoquant des modifications subtiles de la surface qui pourraient améliorer l'affinité de liaison à l'antigène (Nguyen *et al.*, 2000).

- **Les phénomènes d'insertion/délétion**

Les insertions et délétions de nucléotides se situent principalement dans quatre régions dans les gènes germinaux de VHH. La moitié des insertions sont en réalité des duplications de nucléotides et donc des sous-produits de l'hypermutation somatique ou de conversion de gènes, dans lequel une jonction incorrecte pourrait conduire à de multiples insertions ou délétions de trinuécléotides. Il est intéressant de noter que ces insertions/délétions ne sont pas réparties au hasard, mais interviennent à proximité dans la région du paratope, induisant ainsi un remodelage des boucles VHH (Nguyen *et al.*, 2000).

- **La conversion de gènes**

A l'instar des autres phénomènes de réarrangement sus-cités, les conversions géniques interviennent dans l'élaboration des anticorps. Ainsi, une conversion de gènes peut conduire au remplacement d'un segment d'ADN réarrangé par un autre issu du réservoir génomique ou d'un pseudo-gène situé en amont (Roman *et al.*, 2001).

e. Les clés de la convergence évolutive

Le paradigme des anticorps uniquement composés de chaînes lourdes doit certainement représenter un avantage évolutif, puisqu'il est apparu il y a de cela des millions d'années et ce, chez diverses espèces sans lien de parenté. Ce mystère évolutif n'est cependant pas encore complètement résolu (de los Rios *et al.*, 2015).

L'acquisition de nouveaux caractères, par conservation de mutations génomiques, se réalise sous le joug d'une pression sélective, en l'occurrence par des structures antigéniques différentes. Or, une piste intéressante peut être évoquée, au sens où les camélidés comme les bovins, sont des ruminants possédant une flore commensale substantielle dans leur rumen. D'autant plus que ces microorganismes sont déjà connus et ce depuis longtemps pour être source importante de stimulation antigénique (Sharpe *et al.*, 1969 ; Sutherland *et al.*, 2016). Il est alors aisé d'imaginer que cette flore est possiblement à l'origine d'une pression de sélection de nouveaux anticorps capables de fixer de paratopes complexes et variés, d'organismes procaryotes et eucaryotes (de los Rios *et al.*, 2015).

Compte tenu des avantages uniques de ces anticorps, les efforts futurs dans la découverte d'anticorps et l'étude des systèmes immunitaires d'espèces alternatives permettront certainement de découvrir de nouveaux mécanismes pour la génération de la diversité des anticorps ainsi que d'autres variations structurelles au sein de répertoires immunologiques ; d'autant plus que les progrès récents du séquençage génomique pourrait faire progresser rapidement nos connaissances à ce sujet dans un avenir proche (de los Rios *et al.*, 2015).

D. Les propriétés des nanocorps

Les nanocorps offrent une biodisponibilité intéressante *in vivo*, grâce à une bonne pénétration dans les tissus denses et une clairance rénale rapide (Wesolowski *et al.*, 2009). Par ailleurs, ils ne subissent pas de modification post-traductionnelle et permettent ainsi une expression, une sélection et une production à grande échelle en biologie moléculaire. En effet, la production d'une bibliothèque d'anticorps conventionnels (scFv) ou des fragments de liaison à l'antigène (Fab) nécessite la jonction artificielle des domaines VH et VL par un ligand synthétique et les paires VH-VL naturelles sont généralement perdues. Tandis que la production d'anticorps à domaine unique, elle, ne nécessite qu'une immunisation de camélidé avec un antigène d'intérêt, pour obtenir des anticorps stables, facilement isolés et clonés (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

a. La solubilité

Comme nous l'avons vu précédemment certaines substitutions d'acides aminés au sein du FR2 des VHH de camélidés par rapport aux VH d'anticorps traditionnels – Aa 42, 49, 50, 52 pour rappel – permet d'apporter un caractère plus hydrophile à la chaîne. En effet, les Aa substitués comme la phénylananine ou la tyrosine (Phe ou Tyr), l'acide glutamique (Glu), l'arginine ou la cystéine (Arg ou Cys) et la glycine (Gly) sont plutôt hydrophiles et donc augmentent la solubilité du nanocorps dans l'eau. A l'inverse, les VH traditionnelles elles, s'agrègent lorsque leurs parties hydrophobes sont exposées, ce qui les rend beaucoup moins hydrophiles (Yu *et al.*, 2021).

Ces observations ont d'ailleurs permis d'améliorer expérimentalement la solubilité de séquences VH humaines en substituant certaines fractions hydrophobes par des séquences de camélidés et ainsi éviter leur agrégation (Muyldermans, 2001).

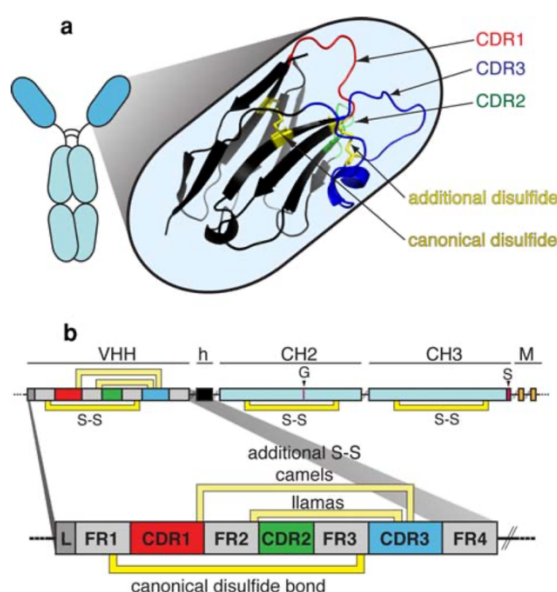
Enfin, ces caractéristiques de petite taille et de grande solubilité permettent aux nanocorps d'avoir une capacité de pénétration dans les tissus améliorée, comme par exemple dans des tumeurs solides ou passer à travers la barrière hémato-encéphalique (Yu *et al.*, 2021).

b. La stabilité thermodynamique

Les anticorps à domaine unique sont donc plus petits que les anticorps traditionnels et ils possèdent un pont disulfure – liaison covalente entre deux atomes de soufre, présents au sein des cystéines – conférant une plus grande stabilité à la molécule, notamment dans des conditions environnementales extrêmes à température élevée ou à pH limites (Yu *et al.*, 2021).

Ces liaisons covalentes supplémentaires sont présentes de CDR3 à l'extrémité distale de CDR1 chez les dromadaires et de CDR3 à l'extrémité proximale de CDR1 chez les lamas. Elles sont permises notamment grâce à la forme convexe adoptée par ces anticorps en l'absence de chaînes légères, lorsqu'il est soumis à des conditions défavorables (Allegra *et al.*, 2018).

Figure 26 : Représentation schématique du domaine VHH d'un anticorps à domaine unique de camélidés, d'après (Wesolowski *et al.*, 2009).



Légende : Le domaine VHH possède un pont disulfure supplémentaire (entre CDR1 et CDR3 chez les dromadaires ou CDR2/FR2 et CDR3 chez les lamas).

Les nanocorps ont en outre un comportement strictement monomérique, i.e. aucun signe de dimérisation spontanée n'est rapporté, ce qui confère aux échantillons d'anticorps une meilleure homogénéité (De Genst *et al.*, 2006).

• La stabilité thermique

Contrairement aux anticorps conventionnels, les nanocorps exposés à des conditions environnementales extrêmes ne se replient pas en exposant leurs parties hydrophobes, entraînant leur précipitation, mais ils adoptent des modèles de conformation différents afin d'assurer une stabilité améliorée (Yu *et al.*, 2021).

Cette thermostabilité des fragments VHH augmentée pourrait être due à des substitutions particulières au niveau des zones de liaisons VH-VL normalement hydrophobes, qui apparaît alors plus hydrophile (Muyldermans *et al.*, 2001).

Ainsi, les nanocorps adoptent des dépliages locaux pour des températures moyennes (< 313 Kelvin (K), ~ 40°C) et un dépliage total pour de très hautes températures (> 333 K, ~ 60°C). La température de transition, ou température de fusion, entre les deux états a donc été évaluée à 333 K (Pérez *et al.*, 2001).

Par ailleurs, ce mécanisme de dépliage est réversible et leur permet de garder toutes leurs fonctionnalités, tandis que la dénaturation thermique induite chez les anticorps conventionnels est irréversible. En effet, après avoir atteint la température de fusion, les anticorps de lamas sont capables de se déplier lors du refroidissement (> 90%). Cette capacité à fondre de manière réversible et sans s'agréger a été mise en évidence lors d'observations de déploiement thermique surveillé par spectroscopie, jusqu'à des températures telles que 363 K, soit ~ 90°C. De plus, ces expérimentations ont permis de mettre en évidence que les anticorps de lama ont une importante flexibilité à des températures élevées (Pérez *et al.*, 2001).

D'autres auteurs ont permis de conforter ces résultats et estiment que la température de fusion se situe plus précisément entre 60,1° et 66,7°C, soit la même température de fusion que les fragments des domaines V(H)3 humains, qui eux se sont agrégés. Ils présentent donc des propriétés de stabilité favorables, d'autant plus que leur fusion est réversible (Ewert *et al.*, 2002).

Enfin, une étude permet encore de nuancer ces observations et confirme les observations de Pérez *et al.*, en démontrant que la dénaturation thermique n'est pas toujours complètement réversible ($\leq 60\%$ de l'activité récupérée), puisqu'un repliement incorrect des longues boucles CDR pourrait être à l'origine d'une perte partielle d'affinité (Dumoulin *et al.*, 2002).

- **La stabilité chimique**

La stabilité thermodynamique des anticorps de lama a aussi été explorée par des expériences de dénaturation à l'équilibre au chlorure de guanidinium (GdnHCl) - agent chaotropique qui détruit la structure tridimensionnelle des protéines.

Les fragments VHH de camélidés possèdent des énergies libres de dépliage (ΔG_{N-U}) situées entre 20,7 et 35,0 kJ/mol, tandis que les fragments V(H)3 humains eux possèdent une énergie de dépliage plus élevée, comprise entre 39,7 kJ/mol et 52,7 kJ/mol (Ewert *et al.*, 2002). La dénaturation dans d'autres conditions extrêmes a aussi été étudiée, comme avec des pH extrêmes, des concentrations importantes d'urée ou de surpression (Dumoulin *et al.*, 2002).

Ces propriétés font des anticorps à domaine unique des candidats pour leur utilisation dans des conditions défavorables, comme un environnement gastrique, pour une administration d'un traitement par voie orale par exemple (Harmsen *et al.*, 2005).

c. La demi-vie

Les nanocorps sont aussi facilement filtrés du sang par les glomérules rénaux – unité proximale du néphron au sein du rein, investie dans la filtration de l'urine primitive grâce à un équilibre de pressions – du fait de leur petite taille. Ainsi, leur taux d'élimination sanguine est assez rapide et permet d'éviter une accumulation, à terme possiblement préjudiciable pour l'organisme (Yu *et al.*, 2021).

En effet, la clairance rénale dépend de la taille des molécules, mais aussi de leur charge, qui est principalement déterminée par la composition en acides aminés des régions CDR. Par

conséquent, certains nanocorps avec des points isoélectriques trop extrêmes pourraient se retrouver inadaptés pour une utilisation *in vivo* (Kijanka *et al.*, 2015).

Mais en général, cette courte demi-vie sanguine permet aux nanocorps d'être particulièrement appropriés à des fins diagnostiques, notamment en imagerie, ou encore comme outil thérapeutique afin de délivrer certaines substances, toxiques ou radio-isotopes, au sein de tissus cibles (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Enfin, cette courte demi-vie peut être modulée afin d'être rallongée par différentes options de formatage, comme la PEGylation – réaction d'éthoxylation des protéines pour les protéger des enzymes protéolytiques et augmenter leur demi-vie – ou la fusion à l'albumine sérique (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

d. L'affinité

Les nanocorps comprennent 4 régions FR et 3 CDR, dont les CDR sont plus longues que celles des anticorps traditionnels, notamment CDR3 qui leur permettent de se lier à des épitopes non conventionnels. Ces séquences accrues élargissent la zone de liaison à l'antigène et leur diversité (Yu *et al.*, 2021).

Les nanocorps sont maintenant reconnus pour se lier spécifiquement et avec une grande affinité à leurs antigènes, avec notamment des constantes de dissociation (KD) de l'ordre du nanomolaire, affinité comparable à celle de la plupart des anticorps conventionnels (Dumoulin *et al.*, 2002 ; Arezumand *et al.*, 2017).

Une des caractéristiques particulièrement intéressantes des nanocorps est leur capacité à cibler des épitopes à des endroits difficilement accessibles pour des anticorps conventionnels, comme des cibles intracellulaires, des épitopes dissimulés ou des récepteurs couplés aux protéines G ou canaux ioniques (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Par ailleurs, certains de ces anticorps sont capables de reconnaître et réagir avec des enzymes, ils interagissent directement avec le site actif de l'enzyme, qui n'est classiquement pas accessible aux anticorps conventionnels en raison de la taille du site de liaison des chaînes lourdes avec les chaînes légères (VH-VL). Cette inhibition enzymatique permet d'entrevoir de nouvelles perspectives dans leurs applications (Dumoulin *et al.*, 2002).

Enfin, pour augmenter d'autant plus cette affinité ou avidité, il est possible de les modifier assez aisément pour les rendre multivalents (Harmsen et De Haard, 2007).

e. La spécificité

Les nanocorps ne possèdent pas de segment Fc, ce qui permet d'éviter des réactions du complément. En effet, ces segments peuvent être responsables du déclenchement de réponses immunogènes, comme une cytotoxicité à médiation par le complément ou cellulaire, pouvant conduire à l'apoptose avec les anticorps entiers (Sapra et Allen, 2003).

Les nanocorps possèdent donc une haute affinité et spécificité, au moins équivalente aux anticorps conventionnels, mais une thermostabilité et une solubilité plus élevée, ainsi qu'une courte demi-vie, permettant d'imaginer de nouvelles applications pour ces nouveaux outils biologiques (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

E. La réponse de l'hôte : une faible immunogénicité

Il a été démontré que les nanocorps possèdent des régions avec plus de 80% d'homologie de séquence avec les régions VH humaines et des structures tridimensionnelles qui peuvent se chevaucher. Ces constats permettent d'assurer qu'il existe à la fois une faible immunogénicité et une bonne biocompatibilité (Yu *et al.*, 2021).

Cette faible immunogénicité, par rapport à des anticorps conventionnels, a notamment été mise en évidence par Cortez-Retamozo *et al.* En effet, des perfusions de 10 µg d'un anticorps à domaine unique de camélidé, le cAb-Lys3, chez des souris, n'ont pas induit la production d'anticorps anti-cAb-Lys3 chez ces dernières. Afin de démontrer l'absence de réaction immunitaire à médiation cellulaire, des cellules de rate de ces souris ont été restimulées avec l'antigène et aucune prolifération lymphocytaire n'a été observée (Cortez-Retamozo *et al.*, 2002). De plus, leur « humanisation » est relativement simple à réaliser, pour limiter d'autant plus le risque d'immunogénicité de ces anticorps étrangers chez l'homme. Pour cela, il suffit de réaliser quelques substitutions d'acides aminés dans la région Fab (Steeland *et al.*, 2015).

Afin d'être utilisés comme traitement contre le cancer en médecine humaine, les nanocorps devront néanmoins être humanisés au maximum, mais sans affecter leur fonctionnalité. Vincke *et al.* ont d'ailleurs mis en évidence les principales variations entre les nanocorps et les domaines variables humains. Il existe en tout une dizaine d'acides aminés à l'origine de ces variations : les acides aminés en position 42, 49, 50 et 52 de la région CDR2 et une troisième boucle de liaison à l'antigène (H3). L'humanisation de l'anticorps consiste donc à réaliser la mutation de ces acides aminés en leur équivalent présents sur les chaînes humaines. Ainsi, ils ont pu démontrer que les modifications des acides aminés 49 (Glu-49 → Gly) et 50 (Arg-50 → Leu) génèrent un domaine unique plus stable, mais probablement moins soluble. Tandis que les autres substitutions en positions 42 (Phe-42 → Val) et 52 (Gly/Ala-52 → Trp) diminuent l'affinité antigénique puisqu'elles sont présentes sur une zone de repliement de la boucle H3. Ces substitutions d'acides aminés ont donc permis d'explorer d'avantage les propriétés de solubilité, de stabilité ou d'affinité des nanocorps (Vincke *et al.*, 2012).

F. Génie biologique : la production de nanocorps

La découverte de ces anticorps simplifiés et fonctionnels permet d'entrevoir diverses applications biotechnologiques. Bien que de tels anticorps aient été identifiés chez certains poissons cartilagineux, la plupart des travaux ont été réalisés sur ceux des camélidés en raison de leur facilité de manipulation, ou immunisation entre autres (Harmsen *et De Haard*, 2007).

a. L'immunisation de camélidés

Produits naturellement chez les camélidés, les nanocorps coexistent dans leur sérum avec des anticorps conventionnels. Leur génome leur permet donc de produire deux types d'anticorps parfaitement fonctionnels.

La production d'anticorps conventionnels auxquels on enlèverait une partie de la structure, diminue en général leur capacité de liaison à l'antigène. C'est pourquoi l'immunisation de camélidés représente un moyen simple et économique de produire une banque de nanocorps fonctionnels, après en avoir isolés les molécules d'intérêts (De Genst *et al.*, 2006).

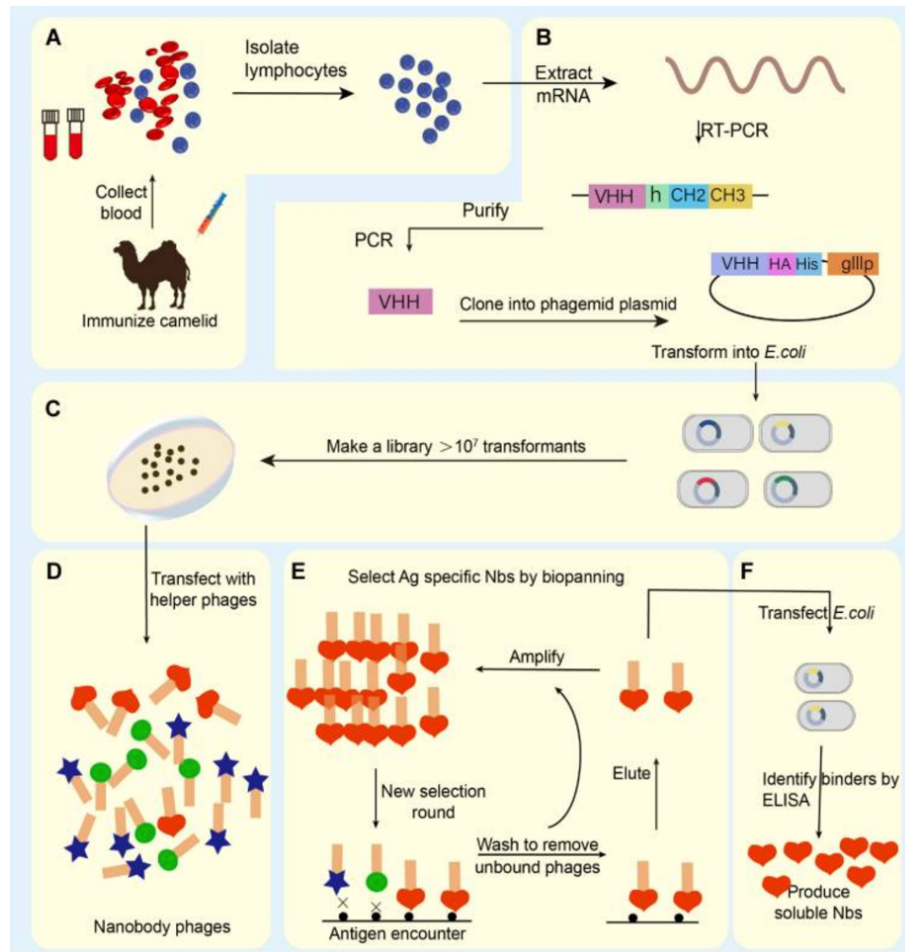
Afin de produire des anticorps à domaine unique fonctionnels et spécifiques d'un antigène donné, il suffit de sélectionner un camélidé – dromadaire ou lama – puis de l'immuniser, c'est-à-dire de lui inoculer l'antigène d'intérêt, contre lequel il va naturellement produire des anticorps en 5 à 10 semaines (Sun *et al.*, 2021).

En effet, par des protocoles classiques d'immunisation avec l'injection de doses de 50 µg d'immunogènes ou de mélanges d'immunogènes, dans un adjuvant de Freund – mélange lipidique utilisé pour augmenter la réponse immunitaire chez les animaux – après 5 ou 6 rappels hebdomadaires. Le camélidé produira ainsi des anticorps à chaîne lourde de haute affinité pour chacun des immunogènes (Muyldermans, 2001).

Par la suite, ce seront les lymphocytes B effecteurs qui seront isolés à partir du plasma sanguin prélevé chez le camélidé en question. L'ARN total des lymphocytes est extrait afin de le transcrire en ADN complémentaire (ADNc) et de l'incorporer dans un plasmide phagique, puis de réaliser les techniques de sélection et d'amplification décrites précédemment au paragraphe 1.1.2.5 (*Figure 27*) (Sun *et al.*, 2021).

Ainsi, la construction de bibliothèques de phages réalisée par clonage des répertoires de nanocorps amplifiés permet d'obtenir une image représentative du répertoire mûré *in vivo*. De plus, ces bibliothèques présentent divers avantages par rapport à celles d'anticorps conventionnels, comme une taille réduite nécessaire pour capturer le répertoire immunitaire des VHH, une plus grande stabilité, une possibilité de réaliser un clonage direct des répertoires de VHH de camélidés immunisés, l'affichage sur phage ou autres formats alternatifs, la facilité de sous clonage et d'expression de VHH spécifique de l'antigène (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Figure 27 : Obtention d'un répertoire d'Ac de camélidés, d'après (Sun *et al.*, 2021).



Les nanocorps sont donc issus du génie génétique, obtenus à partir de gènes VHH de camélidés, et sont facilement modifiables. Le terme de VHH, dans la littérature, correspond aussi bien au fragment d'anticorps, au nanocorps ou au gène dont il est issu (Yu *et al.*, 2021).

Leur petite taille et leur composition chimique permet aussi de les cloner facilement. Ils sont généralement fortement exprimés dans les souches d'*E. coli*, soit environ 10 à 200 mg/L (Yu *et al.*, 2021). Par ailleurs la société Ablynx, a réussi à produire une quantité encore plus importante de nanocorps, environ 7,5 g/L, grâce au développement d'une souche de levure de *Pichia pastoris* (Detalle *et al.*, 2015).

Enfin, toutes ces caractéristiques de production facilitée sont accompagnées d'un faible coût de production au sein de microorganismes, ce qui propulsent les nanocorps au rang d'outils de biotechnologie de choix pour l'avenir (Fernandes *et al.*, 2017).

b. Les bibliothèques synthétiques

Actuellement, les VHH ne peuvent être produits qu'après immunisation de camélidés, bien que des bibliothèques d'anticorps à domaine unique aient été construites, soit en ajoutant une région CDR3 synthétique à des anticorps monoclonaux humains, possédant une interface VH/VL unique, soit en modifiant cette dernière (Reiter *et al.*, 1999).

En effet, d'une part, une interface VH/VL humaine de la chaîne lourde d'immunoglobuline de camélidé a été imitée pour empêcher la liaison non spécifique du VH par son interface avec le domaine variable de la chaîne légère, grâce à trois mutations dans l'interface VH/VL qui copient les chaînes lourdes de camélidés naturellement dépourvues de partenaires de chaîne légère.

D'autre part, le CDR3 de la chaîne lourde, élément qui contribue généralement le plus à la liaison de l'antigène, a été randomisé, puisque les résidus CDR3 sont responsables de la plupart des surfaces de contact et de l'interaction moléculaire avec l'antigène. C'est pourquoi ces résidus CDR3 aléatoires permettent de générer le répertoire de VH à domaine unique qui ont acquis une affinité d'environ 20 nM pour leur ligand.

Ces molécules de liaison ou peptidomimétiques, diffèrent ainsi des nanocorps, puisqu'ils possèdent des boucles CDR1 et CDR2 identiques entre les différents clones. Seule la boucle CDR3 varie dans cet échafaudage de molécules. Néanmoins, si des bibliothèques de VHH étaient développées, elles pourraient représenter un atout pour récupérer des ligands ou des inhibiteurs d'intérêts (Reiter *et al.*, 1999 ; Nguyen *et al.*, 2000).

La création de bibliothèques synthétiques peut s'avérer utile dans certains cas où l'immunisation d'un individu n'est pas possible – absence d'antigène, antigène toxique ou non immunogène. Cependant, l'affinité des molécules obtenues risque d'être moindre par rapport à des anticorps maturés contre un antigène et leur rendement doit être étudié (Muyldermans, 2021).

La production d'anticorps fonctionnels au sein de microorganismes est maintenant possible et a été notamment réalisée avec une IgG non glycosylée active synthétisée en grande quantité dans une souche d'*Escherichia coli*. En général, leur production n'était possible qu'avec des cellules de mammifères, afin de permettre leur glycosylation, dans le cadre d'une utilisation à visée thérapeutique. Néanmoins, les fragments d'anticorps dépourvus de fragment Fc associé à un oligosaccharide, sont préférentiellement produits à l'aide de microorganismes, tels que *E. coli*, des levures ou des champignons filamenteux. Ceci est permis par un temps de développement plus court du gène produit, des conditions de fermentations plus simples, facilement applicable à grande échelle et ce à faible coût – environ 1 \$ par gramme de protéine hétérologue (Estell, 2006).

Aussi, les VHH ont souvent été produits par des microorganismes, dont principalement *E. coli*. La production via des champignons filamenteux ou levures peut être limitée ou encore altérer la liaison à l'antigène avec l'ajout d'oligosaccharides en trop grande quantité.

Plusieurs observations permettent de déduire que leur niveau de production dépend de la nature de l'hôte et de son environnement, mais aussi de la composition des séquences produites, et notamment, avec :

- Présence de N-glycosylation, qui peut augmenter leur niveau de production dans les levures ;
- VHH conventionnels, qui sont produits en moindre quantité dans les levures et en grande quantité dans *E. coli*, notamment grâce à leur faculté de repliement ;
- Présence de cystéines C-terminales non appariées, qui réduit leur niveau d'expression ;
- Mutations hydrophiles naturellement présentes dans les VHH, qui permettent d'augmenter leur niveau d'expression.

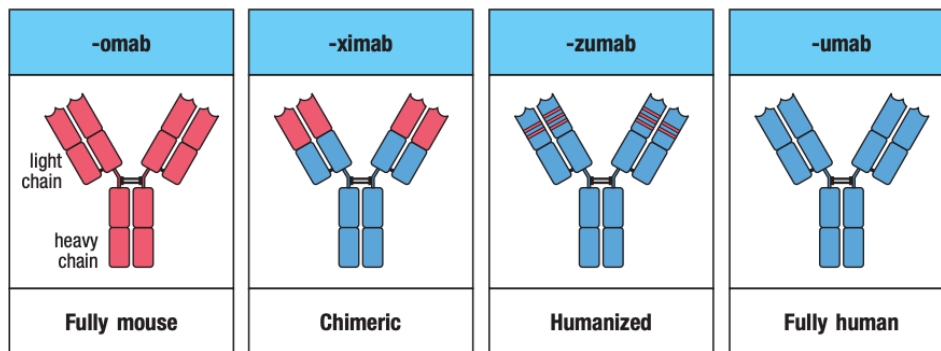
Cependant, des variations d'acides aminés peuvent encore altérer leur niveau de production de façon imprévisible.

Enfin, la glycosylation du domaine CH2, nécessaire pour produire un anticorps fonctionnel et non réalisée avec la production d'anticorps par des microorganismes, pourrait finalement être réalisée par des souches d'une levure *P. pastoris*, capable de produire des protéines avec une glycoforme humaine spécifique (Harmsen et De Haard, 2007).

c. « Humanisation » de nanocorps

Une étude permet de souligner qu'il est possible de produire des anticorps à chaîne lourde (HCAb) chez des modèles murins. La production de tels anticorps peut s'avérer intéressante d'autant plus qu'ils peuvent être « humanisés », à l'instar des anticorps conventionnels (*Figure 28*), en générant des souris transgéniques possédant les loci d'anticorps hybrides lama/humain. En effet, ces loci contiennent deux régions variables de lama et des régions constantes D, J et C μ et/ou C γ humaines. Aussi, tout le répertoire immunologique peut être produit, soit des anticorps de n'importe quelle classe, et ce en grande quantité. De tels anticorps peuvent donc être utilisés pour la production d'éléments thérapeutiques chez l'homme, mais aussi chez n'importe quel animal, en élargissant cette technique à d'autres espèces de vertébrés (Janssens *et al.*, 2006).

Figure 28 : Exemple d'anticorps « humanisés », d'après (Kenneth et Weaver, 2017).



Légende : « L'humanisation » est le processus d'épissage des seules régions déterminant la complémentarité de l'anticorps de souris, ce qui réduit son immunogénicité, ils diffèrent des anticorps chimériques dans lesquels les régions V de la souris sont épissées sur les régions constantes de l'anticorps humain.

G. Synthèse des avantages des nanocorps comparés aux anticorps conventionnels

De nombreuses études ont permis d'établir les caractéristiques des nanocorps au cours de ces dernières décennies, elles ont permis de définir leurs avantages notamment en vue de leur applications biotechnologiques (*Tableau 5*) (Harmsen et De Haard, 2007).

Tableau 5 : Avantages des anticorps à domaine unique de camélidés, d'après (Harmsen et De Haard, 2007).

AVANTAGES	BASES MOLECULAIRES
MANIPULATION GENETIQUE SIMPLE	Anticorps à domaine unique
AUGMENTATION DE LA TAILLE FONCTIONNELLE DES BIBLIOTHEQUES IMMUNITAIRES	Pas de diminution de la taille de la bibliothèque en raison du remaniement des domaines VL et VH
PRODUCTION AISEE DE FORMATS MULTIVALENTS	Conception plus souple du linker et pas de mauvais appariement des domaines VL et VH
PRODUCTION AISEE DE PREPARATIONS OLIGOCLONALES A PARTIR DE CELLULES UNIQUES	
STABILITE PHYSICO-CHIMIQUE ELEVEE	Repliage efficace : hydrophilie accrue et de domaine unique
HAUTE SOLUBILITE	Hydrophilie accrue
RECONNAISSANCE DE SITES ANTIGENIQUES CACHES	Petite taille et CDR3 flexible étendu
PENETRATION TISSULAIRE ET CLAIRANCE RAPIDES	Petite taille
BONNE EXPRESSION	Repliage efficace grâce à une hydrophilie accrue et à la nature du domaine unique

H. Discussion des limites d'utilisation des nanocorps

Malgré les nombreux avantages des nanocorps déjà évoqués, il est néanmoins nécessaire de discuter des limites qu'ils peuvent présenter, de leur fabrication à leur recyclage après utilisation (Steeland *et al.*, 2016).

a. « L'humanisation » de camélidés

D'une part, le fait que le paratope des anticorps à domaine unique soit réduit à un seul domaine de 110 Aa sous-tend la complexité de cette séquence. Aussi, chacun des Aa peut avoir des effets sur la stabilité et l'intégrité structurale et fonctionnelle de la molécule. En effet, divers mécanismes évolutifs précédemment évoqués – les CDR1 et CDR3 étendus, l'implication du FR2, la boucle du CDR3 et l'hypermutation somatique – ont permis de contrer l'absence de diversité apportée par le domaine VL. Ceci limite, par conséquent, les possibilités de manipulations des VHH. Ainsi, l'humanisation complète des VHH, en dehors des boucles de fixation à l'antigène, compromet leur stabilité et leur rendement d'expression. L'immunisation directe de camélidés ou le recours à de grandes bibliothèques de camélidés naïfs représentent ainsi la majorité des processus de sélection de nanocorps (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

D'autre part, la création d'immunothèques de mutants nécessite du temps et de l'argent. En effet, même si l'expression et la production de nanocorps sont peu coûteuses dans des microorganismes, l'immunisation de camélidés ne l'est pas, particulièrement lorsqu'elle est comparée à celle de petits mammifères pour la production d'anticorps conventionnels (Steeland *et al.*, 2016).

b. La question de la gestion des déchets biologiques

L'impact environnemental est aussi un élément à prendre en compte lors du développement de nouveaux composés. Certains nanocorps sélectionnés pour être stables dans des conditions extrêmes, ne seront donc pas biodégradables lorsqu'ils seront libérés dans l'environnement. Ceci peut représenter un frein dans l'élaboration de traitements et autres produits du quotidien, tels que des shampoings antipelliculaires à base de nanocorps. Pire encore, ils pourraient avoir des effets néfastes sur les populations de bactéries dans l'environnement, à l'instar des antibiotiques utilisés trop fréquemment de nos jours, posant des problèmes d'antibiorésistance (Steeland *et al.*, 2016).

c. Conformation et limites d'utilisation des nanocorps

La topologie de surface convexe dominante des nanocorps peut finalement aussi être un frein pour lier de petites molécules, à l'inverse des fragments d'anticorps conventionnels (scFv, Fab) qui possèdent des topologies plates ou concaves. En effet, lors d'essais d'immunisation de lamas, certaines réponses d'anticorps à domaines uniques était plutôt faibles par rapport à la réponse des anticorps conventionnels. Bien qu'une immunisation répétée avec de petites molécules, telles que la caféine, un colorant azoïque rouge (Reactive Red ou RR6) ou des peptides linéaires ait cependant permis d'obtenir une réponse des VHH satisfaisante (Spinelli *et al.*, 1996 ; Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Par ailleurs, leur petite taille, qui représente en majorité un avantage, pose quelques limites, notamment pour la neutralisation de toxines ou de virus. Il semblerait même parfois nécessaire d'utiliser des procédés de modification, telle que la N-glycosylation, afin d'améliorer leur fonction – la N-glycosylation du nanocorps LT109 a permis d'augmenter de 3 à 5 fois sa capacité neutralisante vis-à-vis de la toxine thermolabile de *E. coli*, en augmentant sa masse moléculaire. Des résultats

comparables ont été obtenus en étudiant les effets de la N-glycosylation sur des VHH neutralisants du virus de la fièvre aphteuse (Harmsen *et al.*, 2009).

d. Efficacité observée en conditions physiologiques

Les nanocorps non modifiés ne sont pas capables de traverser la membrane cellulaire. Il est indispensable de réaliser une transfection ou une transduction dans les cellules, ou encore d'utiliser des bactéries – certaines souches d'*E. coli* entéropathogènes (EPEC) utilisent un système de sécrétion de protéines de type III (T3SS) ou « aiguille moléculaire » pour injecter des effecteurs dans les cellules hôtes. Il est aussi possible de coupler les nanocorps à des peptides capables de pénétrer dans les cellules, comme la penetratin (Thueng-in *et al.*, 2012).

De plus, le passage de la barrière hématoencéphalique (BHE) peut aussi être remise en question pour les nanocorps, puisqu'ils ne permettent généralement pas d'atteindre des concentrations suffisantes dans le cerveau pour avoir une action efficace (Steelnd *et al.*, 2016).

Les nanocorps pourront être développés en tant qu'agents antagonistes, mais en raison de l'absence d'un domaine Fc-effecteur, leur efficacité en tant qu'agent effecteur est limitée. Leur utilisation en tant qu'immunothérapeutiques purs sera certainement limitée puisque leur efficacité est moindre que celle des anticorps monoclonaux (AcM). L'absence de ce domaine Fc-effecteur présente cependant l'avantage de diminuer l'occurrence d'effets indésirables et leur fusion avec d'autres molécules effectrices pourra résoudre leur problème d'efficacité (Steelnd *et al.*, 2016).

Enfin, certaines études rapportent que les nanocorps peuvent perdre leur fonctionnalité une fois exprimés en intracellulaire, sous forme « d'intrabodies ». Ce qui est tout à fait exceptionnel, mais il semblerait que certains nanocorps souffrent de l'environnement intracellulaire réducteur, probablement à l'origine d'une réduction des ponts disulfures, au dépliage partiel et donc à la perte de fonction. D'autres études rapportent justement que les nanocorps conservent leur stabilité malgré l'absence de pont disulfures, à l'inverse des fragments conventionnels (Tanaka *et al.*, 2003 ; Beghein *et al.*, 2016).

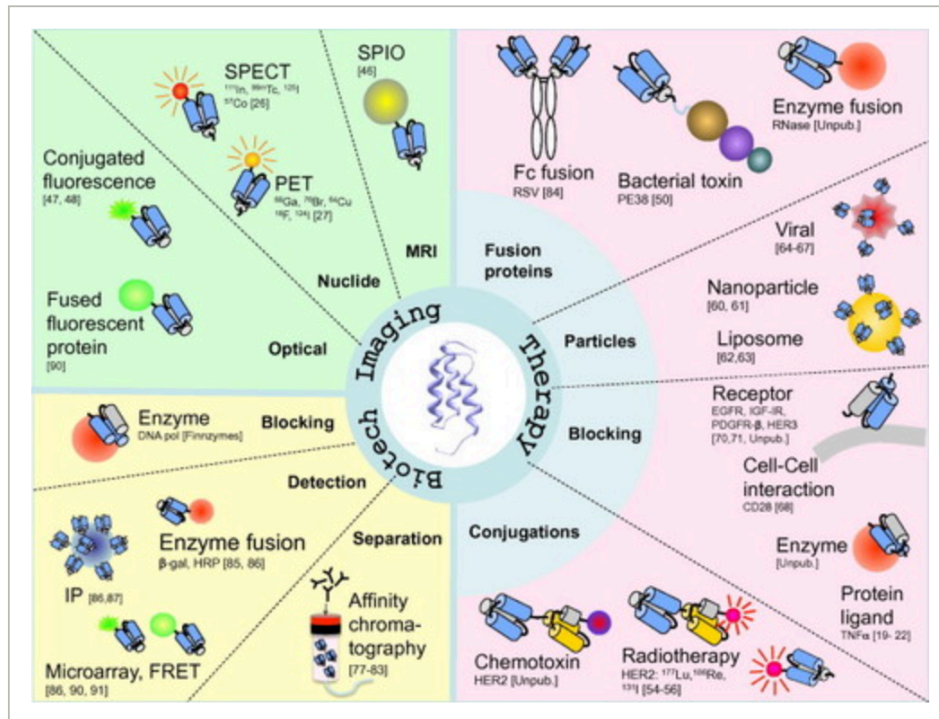
e. Développement de molécules concurrentes

Enfin, les recherches en biotechnologies se développent pour d'autres molécules, dont certaines sont actuellement à l'étude. Celles-ci sont issues de diverses classes de molécules ou d'échafaudages :

- Des échafaudages protéiques mimétiques d'anticorps de petite taille, tels que les DARpins,
- Des dérivés des protéines ankyrines, protéines se fixant sur la spectrine et sur les protéines membranaires,
- Des anticalines, protéines artificielles capables de se lier aux antigènes,
- D'échafaudages de lipocalines, protéines de transports de molécules hydrophobes,
- Des affibodies, petites protéines à domaine unique (6,5 kDa)
- Autres molécules non immunologiques.

Ces petites molécules, qui peuvent être exprimées dans des systèmes d'expression microbiens, présentent, elles aussi, une affinité élevée, des propriétés biophysiques robustes et une faible immunogénicité. Certaines de ces protéines, comme les affibodies, font d'ailleurs déjà l'objet d'essais cliniques (*Figure 29*) (Steelnd *et al.*, 2016).

Figure 29 : Domaines d'application des affibodies : thérapie, imagerie, biotechnologies, d'après (Löfblom *et al.*, 2010).



Deuxième partie : Utilisations des anticorps de lama et autres camélidés dans les domaines de la recherche, de la médecine et de l'industrie

Historiquement, les anticorps ont trouvé de nombreuses applications dans le domaine de la recherche, dans l'utilisation diagnostique ou thérapeutique, puisqu'ils constituent à ce jour une classe importante de médicaments pour l'industrie pharmaceutique ou servent de réactifs dans de nombreux tests – ELISA, Western Blot, cytométrie de flux, immunoprécipitation, etc. (de los Rios *et al.*, 2015).

Les anticorps conventionnels restent des outils indispensables dans le domaine de la recherche fondamentale et le diagnostic, mais ils revêtent certaines limites. En effet, les anticorps polyclonaux, utilisés au préalable, présentaient une trop grande variabilité dans les lots obtenus, c'est pourquoi les anticorps monoclonaux se sont ensuite imposés sur le marché, mais ils requièrent d'importants délais et coûts de production (de Marco, 2011).

Arrivent ensuite les anticorps de camélidés, comme outils de biotechnologies, offrant certains avantages non négligeables. Le développement de ces nanocorps en outils thérapeutiques est passé par trois phases depuis leur découverte à nos jours. D'abord, une phase exploratoire durant les dix premières années, de 1993 à 2003, a été marquée par la fondation de la société Ablynx – société de biopharmaceutique belge fondée par des professeurs émérites de l'Université de Bruxelles, comme Cécile Casterman (*Figure 30*).

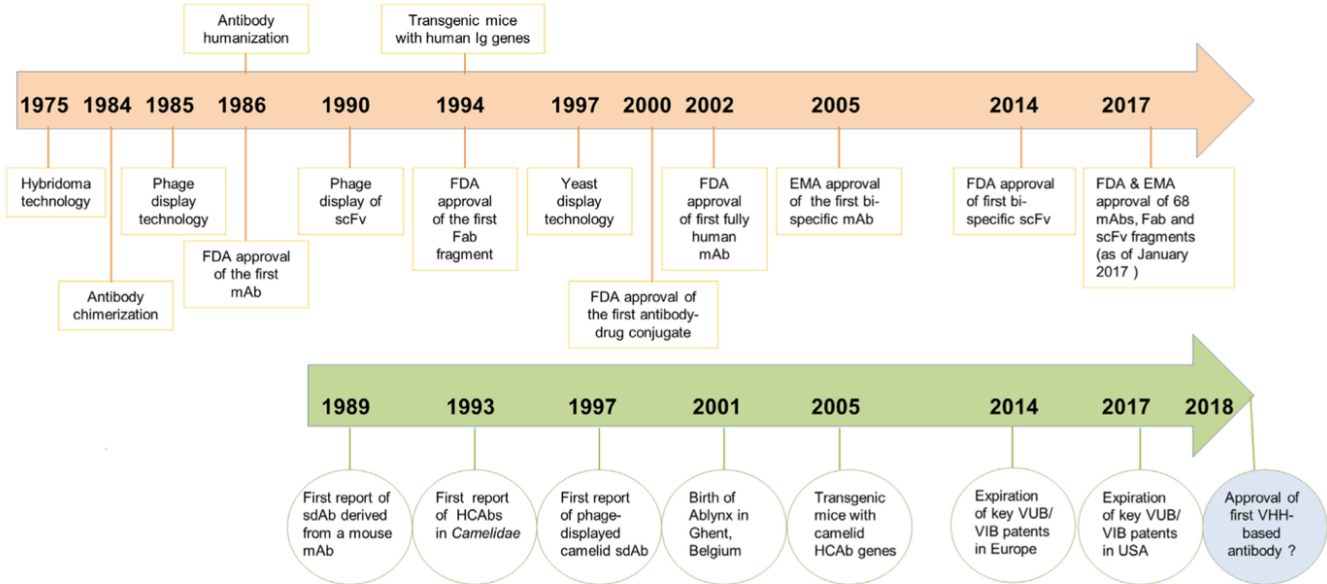
Figure 30 : Logo de la société Ablynx.



Puis, une phase de développement de 2003 à 2013, où les nanocorps se sont retrouvés au cœur de plus de 1 000 publications partout dans le monde. Au même moment, des essais précliniques et cliniques ont été menés par Ablynx afin d'utiliser ces molécules comme outils thérapeutiques et réactifs d'imagerie.

Enfin, une phase de lancement depuis 2014, avec l'arrivée à son terme des différents brevets européen déposés par Ablynx (2014) et américains (2017). Avec l'avènement de ces outils, de nouvelles collaborations avec de grands groupes biopharmaceutiques (Merk, Boehringer Ingelheim, Sanofi) se sont d'ailleurs développées (Figure 31). Plus tard, une première autorisation de mise sur le marché est accordée à Sanofi/Ablynx en 2018 pour le traitement contre une maladie rare de la coagulation sanguine, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) acquis et qui prendra le nom commercial de Cablivi® (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

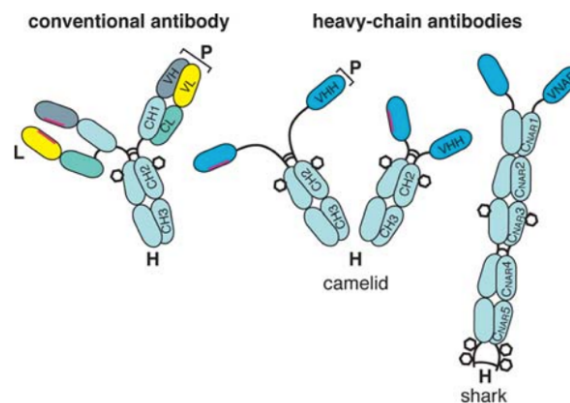
Figure 31 : Chronologie des principales avancées scientifiques dans le domaine de l'ingénierie des anticorps monoclonaux en orange et nanocorps en vert, jusqu'en 2018, d'après (Arbabi-Ghahroudi, 2017).



1. Utilisation dans le domaine de la recherche

Les nanocorps, ainsi que plusieurs structures recombinantes, ont été développés – scFv simple chaîne, VHH, VH et NAR V domaines uniques – pour se retrouver actuellement au service de la recherche fondamentale, et ce dans plusieurs domaines, tels que la microscopie, les interactions entre protéines et les fonctions des protéines (Figure 32). L'ingénierie a permis d'accroître considérablement leur polyvalence et promet sans cesse de nouvelles applications (de Marco, 2011).

Figure 32 : Structures des anticorps conventionnels, des anticorps à chaîne lourde des camélidés et des requins, d'après (Wesolowski *et al.*, 2009).



A. Biotechnologies

Du perfectionnement au développement de nouveaux outils, l'utilisation de nanocorps révolutionne notre compréhension des cellules, de la structure et la fonction des protéines ou encore des mécanismes cellulaires (Audenhove *et al.*, 2013).

a. Couplage avec des fluorochromes

De nombreuses applications existent déjà avec les anticorps conventionnels. La petite taille des nanocorps permet de nouvelles applications. En effet, grâce à une fusion génétique d'un nanocorps et d'une protéine intracellulaire permet la génération de « chromobodies » ou « fluobodies » capables de tracer divers antigènes dans différents compartiments cellulaires. Ces applications dans les cellules vivantes, à savoir localiser les protéines au sein des compartiments cellulaires et connaître leur dynamique, n'étaient pas permises avec des anticorps conventionnels du fait de leur encombrement avec des chaînes lourdes et des chaînes légères (Rothbauer *et al.*, 2006).

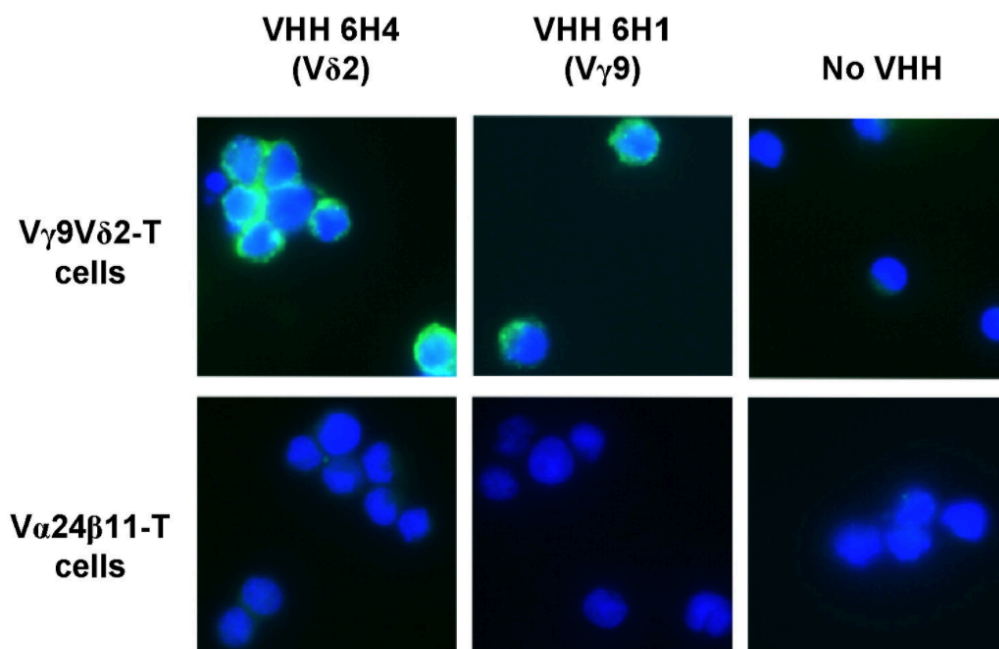
En outre, ils peuvent être utilisés comme traceurs microscopiques, avec visualisation de la cible qui peut être obtenue par l'expression intracellulaire de nanocorps marqués par la fluorescence. Alors qualifiés « d'intrabodies », ils n'interfèrent généralement pas avec la fonction des protéines et donc il n'est plus nécessaire de surexprimer une protéine de fusion fluorescente qui modifie le comportement cellulaire ou qui aboutit à une fausse représentation dynamique des protéines. Par exemple, Baghein *et al.* ont développé un nanocorps dirigé contre la survivine – protéine exerçant des rôles clés durant la mitose – équipé d'une étiquette épitope V5, peptide

généralement utilisé pour la détection immunohistochimique de protéines à l'aide d'anticorps anti-V5 (Beghein et Gettemans, 2017).

Il est aussi possible de produire directement des fluobodies dans des bactéries *E.coli* à partir de VHH de lama sélectionnés et dirigés contre les microtubules, protéines cytosoliques, faisant partie du cytosquelette de la cellule et impliqués notamment dans le phénomène de division cellulaire ou mitose (Olichon et Surrey, 2007).

Ces avancées technologiques, permettent aux nanocorps d'être utilisés comme outils de recherche en microscopie de fluorescence. A titre d'exemple, De Bruin et al. ont généré des nanocorps dirigés contre les récepteurs cellulaires anti-V γ 9 et anti-V δ 2-T pour servir de réactifs de détection primaire de cellules qui en sont pourvues, en immunocytochimie. Le nanocorps lié est détecté à l'aide d'un anticorps anti-nanocorps, lui-même révélé par un anticorps tertiaire conjugué à un fluochrome, l'Alexa Fluor 488 (Figure 33) (de Bruin et al., 2016).

Figure 33 : Coloration immunocytochimique de V γ 9V δ 2-TCR à l'aide de VHH, d'après (de Bruin et al., 2016).



Légende : Des cellules V γ 9V δ 2-T et V α 24V β 11-T dérivées de donneurs sains ont été incubées avec des VHH dont 6H4 spécifique de V δ 2, 6H1 spécifique de V γ 9 ou aucune VHH. Le VHH lié a été détecté avec un anticorps de lapin anti-VHH et un anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à Alexa488 et imagé par microscopie fluorescente à grand champ.

Pour simplifier encore la manipulation, il est possible de doter directement le nanocorps d'un colorant fluorescent organique, pour éviter l'utilisation d'un anticorps secondaire marqué par fluorescence. Braun et al. ont élaboré un nanocorps anti- β -caténine (BC2-VHH) – protéine de transcription de gènes, d'adhésion et de signalisation cellulaire – couplé aux colorants organiques Alexa Fluor 488 ou ATTO 647 par un marquage par ester de N-hydroxysuccinimide (NHS). En effet, tout nanocorps compatible avec l'immunomarquage peut être utilisé en microscopie à super-résolution. Il existe différentes techniques de marquage, l'utilisation de dérivés esters NHS de diverses sondes fluorescentes est la plus répandue. La fonction carbonyle de l'ester NHS réagit

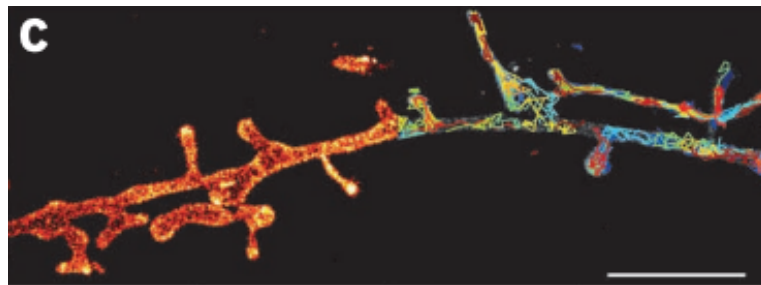
avec les amines primaires dans le nanocorps, libérant ainsi le NHS et réticulant le nanocorps avec le colorant organique ou « label » (Figure 34) (Beghein et Gettemans, 2017).

Figure 34 : Marquage à l'ester de N-hydroxysuccinimide pour la microscopie à super-résolution, d'après (Beghein et Gettemans, 2017).



Par ailleurs, ces progrès en microscopie à super-résolution permettent des mesures plus précises puisque l'utilisation d'anticorps secondaire augmentait la taille apparente de la structure d'intérêt et entraînait un biais de localisation estimé de 10 à 20 nm. C'est ainsi que les nanocorps anti-GFP et anti-RFP, dotés d'un colorant organique puissant, sont utilisés pour cibler des protéines de fusion fluorescentes génétiquement codées. Ries et al. ont d'ailleurs développé une méthode polyvalente de détection de n'importe quelle protéine, d'une résolution spatiale nanométrique, notamment de microtubules, de neurones vivants ou encore de cellules de levure à l'aide de nanocorps de camélidés marqués GFP (Green Fluorescent Protein) (Figure 35). Ainsi, il est possible d'obtenir des résultats probants, notamment pour la visualisation de microtubules très compacts, avec un pouvoir de résolution 2,5 et 10 fois plus élevé qu'avec les marquages d'anticorps primaires et primaires-secondaires respectivement. Outre une meilleure approximation des dimensions réelles de structures, ces outils présentent l'avantage d'être disponibles dans le commerce et permettent un marquage quantitatif des protéines (Beghein et Gettemans, 2017 ; Ries *et al.*, 2012).

Figure 35 : Microscopie super-résolution de cellules vivantes, d'après (Ries *et al.*, 2012).



Légende : Visualisation de neurones d'hippocampe en culture exprimant la GPI-GFP, marqués avec des nanocorps anti-GFP-AF647, échelle 2 mm.

Enfin, de nouvelles techniques de dérivations, telles que la réticulation du furane ou encore le marquage à la transpeptidase sortase A (SrtA), se développent pour le marquage de nanocorps avec des colorants organiques et s'avèrent toujours plus performantes (Beghein et Gettemans, 2017).

b. Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une méthode analytique reposant sur la détermination des masses moléculaires des composés analysés, avant leur identification et quantification à partir d'un

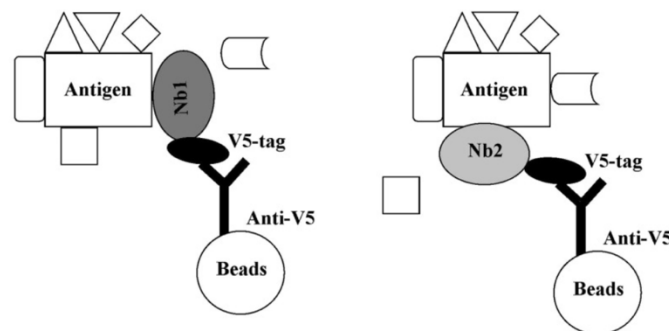
échantillon. Son principe repose sur la séparation et la détection d'ions formés dans une chambre de collision (Masson, 2011).

Les nanocorps peuvent également servir d'alternative aux anticorps dans les applications de spectrométrie de masse classique par purification d'affinité (AP-SM) afin d'étudier les complexes protéiques. Leur petite taille permet de limiter la liaison de fond et réduit la quantité de peptides tryptiques libérés de la résine d'affinité pendant la digestion sur billes (Beghein et Gettemans, 2017).

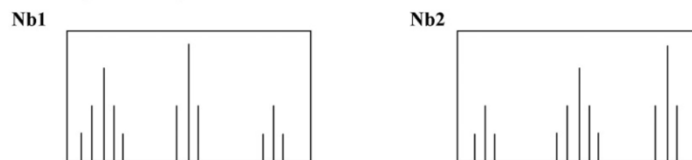
En effet, l'utilisation de nanocorps, suite à l'immunisation et à l'exposition sur phages, permettrait une identification des protéines avec une sensibilité supérieure, puisque certains reconnaissent différents épitopes sur le même antigène. Cette stratégie appelée « nanobody footprinting » ou « empreinte des nanocorps » consiste à isoler l'antigène et les protéines associées à partir de lysats cellulaires. Il suffit de rechercher les protéines qui manquent dans l'une ou l'autre des conditions (Figure 36) – lors de la fixation du nanocorps 1 ou 2 – et de les identifier par spectrométrie de masse (Audenhove *et al.*, 2013).

Figure 36 : « Nanobody footprinting », d'après (Audenhove *et al.*, 2013).

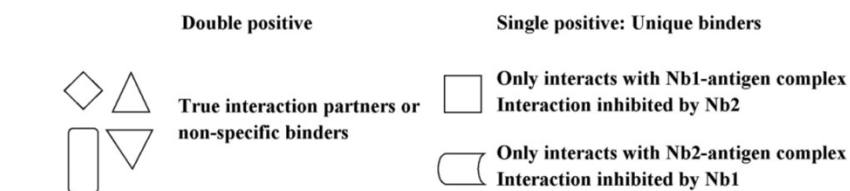
A Pull-down on cell lysates with different nanobodies



B Mass spectrometry



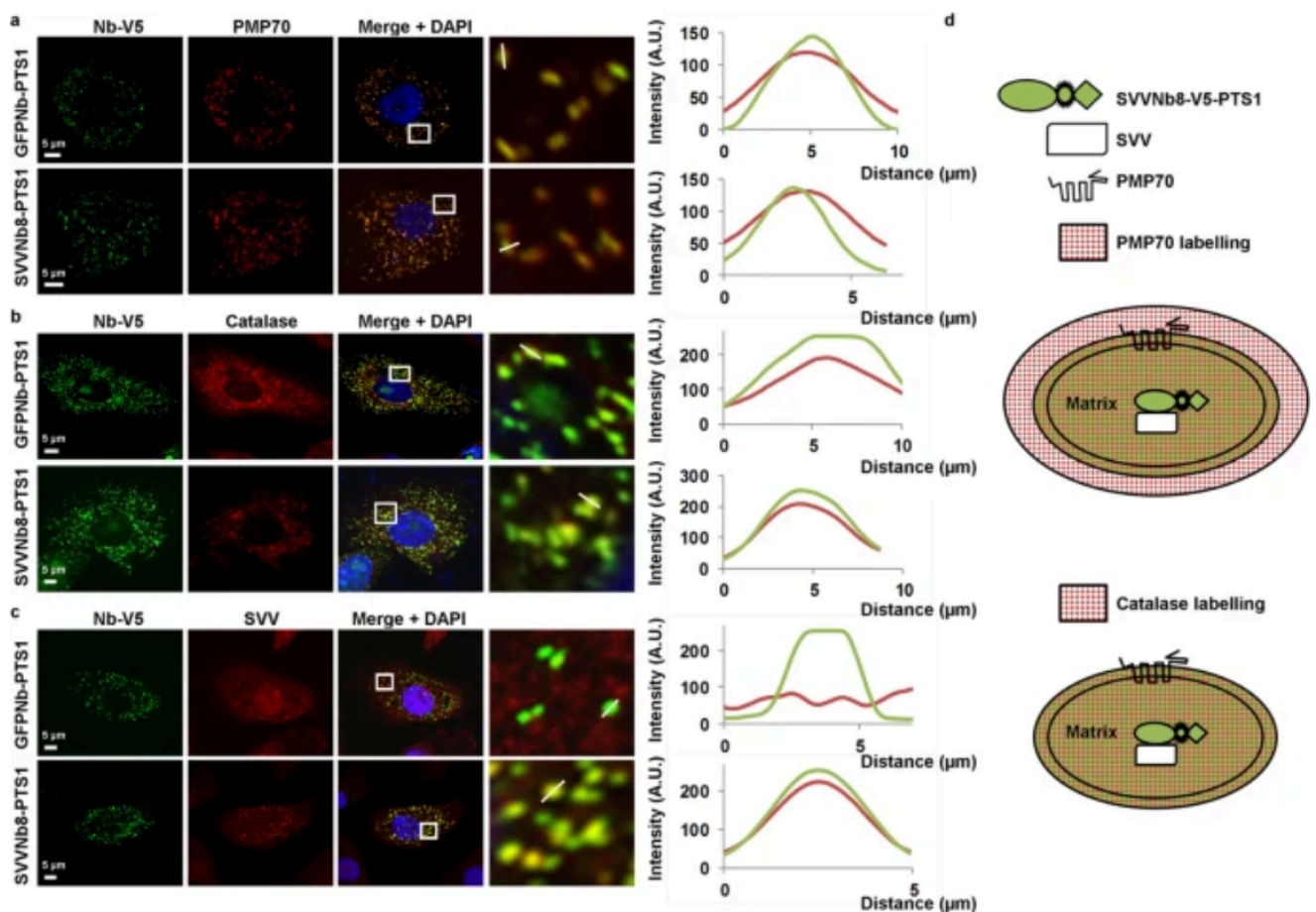
C Analysis



Cette technique peut être couplée avec Virotrap – méthode d'analyse des interactions des protéines sans lyse – afin d'améliorer l'étude des complexes protéiques. En effet, Virotrap permet de piéger une protéine cible avec ses partenaires d'interaction à l'intérieur de particules de type viral (VLP) protectrices (Eyckerman *et al.*, 2016).

D'autres techniques permettent encore d'identifier et d'étudier les partenaires d'interaction de protéines cibles, comme la personnalisation des nanocorps avec une étiquette de relocalisation. Les peroxysomes peuvent être des éléments intéressants, puisque contrairement aux mitochondries et au réticulum endoplasmique, ils sont dotés de la capacité d'importer des complexes protéiques oligomériques. Le nanocorps équipé d'une séquence de ciblage peroxysomale SKL permettra le transport de la protéine cible et ses partenaires vers la matrice peroxysomale. Cette technique permet de limiter la contamination des échantillons d'étude avec des protéines cytoplasmiques et d'isoler les protéines cibles des protéines peroxysomales intrinsèques déjà connues, afin d'identifier plus aisément la protéine à l'aide de la SM (Figure 37) (Beghein *et al.*, 2016 ; Beghein et Gettemans, 2017).

Figure 37 : Étude du transport peroxysomal, d'après (Beghein *et al.*, 2016).



Légende : *SVVNB8 se localise au niveau de la matrice peroxysomale et redistribue la survivine (SVV) en conséquence. Microscopie confocale et profils d'intensité le long des peroxysomes : (a) les nanocorps marqué PTS1 (contrôle) ou SVVNB8 sont tous deux co-localisés avec le marqueur peroxysomal PMP70, une protéine transmembranaire. (b) Les études de co-localisation avec la catalase, véritable enzyme de la matrice, permettent de mettre en évidence un chevauchement d'activité et donc d'affirmer que le nanocorps se trouve dans la matrice ou à proximité immédiate. (c) La co-localisation du SVV est complète avec le SVVNB8. (d) Représentation schématique des différents composants au niveau des peroxysomes. Le couplage de SVVNB8 à la séquence de ciblage de la matrice peroxysomale PTS1 était suffisant pour délocaliser avec succès le nanocorps et le SVV vers les peroxysomes.*

c. Ciblage de protéines

Les protéines sont des macromolécules présentes dans toutes les cellules du vivant et permettent la réalisation d'une multitude de fonctions. Leur connaissance est donc fondamentale dans les domaines de la biologie et de la médecine moderne.

- **Protéines de surfaces cellulaires**

Les leucocytes expriment de nombreuses ecto-enzymes, situées à l'extérieur de la membrane plasmique, impliquées dans de nombreux processus cellulaires, tels que le déplacement cellulaire, l'inflammation et sa régulation, ou encore l'apoptose. A cet égard, des inhibiteurs spécifiques de ces molécules pourraient moduler les fonctions immunitaires (Salmi et Jalkanen, 2005).

Des inhibiteurs spécifiques de ces acteurs de l'immunité existent déjà sous forme de petits antagonistes chimiques, mais manquent souvent de spécificité. De plus, la structure cristalline de ces enzymes ayant déjà été élucidée – elle possède généralement une crevasse au niveau du site actif – les nanocorps peuvent jouer le rôle d'inhibiteurs spécifiques. C'est le cas pour un VHH, préalablement sélectionné et injecté par voie intraveineuse. Il a été capable de bloquer l'activité enzymatique de l'ecto-enzyme ADP- ribosyltransférase ART2.2 – qui détecte la Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) – sécrétée par les lymphocytes T endommagés afin de déclencher la cytotoxicité dans le contexte inflammatoire. La NAD est une coenzyme essentielle dans le métabolisme cellulaire, en tant que transporteur d'électrons dans les mécanismes d'oxydo-réduction (Wesolowski *et al.*, 2009).

De nombreuses cellules possèdent des protéines membranaires, qui ne sont pas forcément des enzymes, mais par exemple des récepteurs, des canaux ioniques et des transporteurs. Ces éléments pourraient servir de cibles et permettre le recrutement de leur cellule hôte. Des VHH dirigés contre le récepteur Fc CD16 des cellules Natural Killer (NK) ont été développés, afin de recruter et activer ces cellules alors dirigées contre des cellules d'intérêts, comme des cellules cancéreuses (Behar *et al.*, 2008).

- **Cytokines et autres protéines solubles**

Les cytokines sont des protéines variées solubles qui assurent la communication entre les différents effecteurs du système immunitaire. Les nouvelles perspectives de traitement de la polyarthrite rhumatoïde, du psoriasis et autres maladies inflammatoires basées sur la neutralisation de ces cytokines à l'aide d'anticorps conventionnels, ont incité de nouvelles recherches dans le domaine des nanocorps, afin de développer des molécules toujours plus performantes. Dans des modèles murins d'arthrite induite par le collagène, le traitement quotidien par des nanocorps neutralisants le TNF α a permis de diminuer significativement la sévérité des signes cliniques. Leur développement pour des essais cliniques est actuellement à l'étude (Wesolowski *et al.*, 2009).

D'autres protéines solubles peuvent avoir une importance capitale dans le développement de certaines maladies ; c'est le cas notamment de protéines impliquées dans la cascade de la coagulation sanguine. En effet, une protéine en particulier, le facteur de von Willebrand (vWF), qui assure normalement la fixation des plaquettes à la paroi endothéliale vasculaire, est à l'origine de maladies amyloïdes. Des nanocorps spécifiques, inhibant la formation de ce facteur, représentent donc une stratégie thérapeutique intéressante (Wesolowski *et al.*, 2009).

- **Protéines intracellulaires**

Puisque la membrane cellulaire est normalement imperméable aux protéines, les anticorps ne peuvent en théorie pas cibler d'antigènes intracellulaires. Aussi, c'est pourquoi des stratégies ont été développées pour permettre leur accès aux cibles intracellulaires. Deux approches sont utilisées. La première repose sur l'utilisation des mécanismes de translocation de la membrane cellulaire, à l'aide d'une fusion avec des peptides impliqués dans ce processus. En effet, des peptides dotés de domaines de translocation (td) peuvent vraisemblablement conférer cette aptitude, de manière aléatoire cependant, à des composés issus de leur fusion avec une autre protéine. La seconde repose sur une modification du génome cellulaire, reposant sur la transfection des cellules avec des ADNc codant directement pour des anticorps intracellulaires. Les nanocorps semblent particulièrement adaptés à ces stratégies. La transfection directe *in vivo* a déjà été testée dans des cellules de peau ou de foie, mais l'efficacité observée était pour le moment limitée (Wesolowski *et al.*, 2009).

B. Cristallisation, agrégation, régulation des protéines

Depuis quelques décennies la physiologie cellulaire a été particulièrement étudiée pour en comprendre son fonctionnement. De nombreuses techniques ont été développées, notamment en perturbant l'expression de gènes, la traduction de l'ARNm ou la fonction des protéines. De nombreuses enzymes peuvent être bloquées par de petits composés pharmacologiques en inactivant quelques acides aminés, mais le ciblage de protéines structurelles est quant à lui plus complexe. En effet, les interactions protéine-protéine, notamment celles du cytosquelette, sont permises grâce à des zones de contact larges et stabilisées par de nombreuses interactions faibles et l'utilisation de petits composés n'est pas suffisante pour rompre ces liens. La compréhension de ces interactions permet de mieux comprendre les données génétiques, notamment dans le domaine de la recherche sur le cancer et d'imaginer de nouvelles sources de traitement. En effet, les interactions au niveau du cytosquelette des cellules jouent souvent un rôle clé dans la pathogenèse des cancers – des dérégulation des protéines de liaison à l'actine sont à l'origine de modifications de la croissance cellulaire, de la migration ou de l'invasion des métastases des cellules tumorales notamment (Audenhove *et al.*, 2013).

Les anticorps à domaine unique s'avèrent être d'excellents outils d'études des protéines, du fait de leur forte capacité de liaison et leur faible masse, ils offrent une capacité « d'adaptation induite » au complexe Ag-Ac et permettent d'améliorer en outre l'emballage des cristaux et la phase des rayons X (de Marco, 2011).

a. Étude de la conformation par cristallisation

Pour acquérir sa structure tridimensionnelle une protéine se replie dans l'espace qualifié de « protein folding ». Le nombre de configurations possibles dans chaque état, basés sur la thermodynamique, est appelée entropie conformationnelle. Cette dynamique régule l'activité des protéines et notamment a un impact sur ses liaisons aux ligands intracellulaires, bien que les sites de fixation soient toujours présents (Tzeng et Kalodimos, 2012).

Ces modifications compliquent grandement l'étude de la conformation des protéines. Certains travaux ont conduit à l'utilisation de molécules chaperons – comme des ions, de petites molécules ou de petits peptides – pour les stabiliser et obtenir leur conformation par cristallographie. Seulement, il est difficile de trouver des molécules chaperons pour chaque protéine et ces molécules ne sont parfois pas compatibles avec les techniques utilisées par la suite, notamment leur solubilité,

affinité et stabilité chimique lors des essais. Ces travaux s'avèrent donc être partiellement insatisfaisants et conduit à de nouvelles recherches sur ce sujet. Des anticorps monoclonaux seront utilisés à ces fins, mais leur production s'avère assez coûteuse et difficile ; c'est pourquoi on leur préfère les anticorps à chaînes lourdes des camélidés (de Marco, 2011).

L'utilisation de nanocorps spécifiques capables de se fixer sur des protéines très dynamiques s'avère nécessaire pour les inhiber. En effet, ils permettent de stabiliser les régions flexibles pour protéger les régions hydrophobes du contact avec les solvants, et plus particulièrement avec les petites protéines membranaires avec des domaines hydrophobes ou flexibles (Hunte et Michel, 2002).

Ces nanocorps servent donc de chaperons pour les protéines dont on veut étudier la conformation par cristallographie aux rayons-X en réduisant leur hétérogénéité et la formation de cristaux au contact de surfaces réactives. Les nanocorps possèdent là encore les qualités nécessaires pour cette utilisation : ils sont résistants, de petite taille et faciles à produire. Il suffit de sélectionner les VHH d'intérêts dans une banque d'ADNc de phages obtenu à partir d'un animal immunisé (Koide, 2009).

Certaines protéines sont parfois même réfractaires à la cristallisation et l'utilisation de nanocorps est indispensable pour accéder à leur structure. Ceci est illustré par les récepteurs transmembranaires, notamment couplés à la protéine G (GPCR). Le nanocorps s'applique à l'interface des sous unités G β et G α du récepteur et permet d'accéder à haute résolution de sa structure cristalline et a fortiori de la signalisation transmembranaire (Rasmussen *et al.*, 2011).

De nombreux exemples d'utilisation de VHH pour la cristallographie existent, à titre d'illustration, nous pouvons citer la détermination de la conformation du peptide MazE, connu pour être l'antidote de MazF, protéine toxique produite lors de stress et induisant la mort cellulaire. L'opéron MazEF code les protéines impliquées dans la mort cellulaire programmée d'*E. coli*. La mort cellulaire est donc gérée par la co-expression d'une molécule toxique stable, de longue durée de vie et de son antidote labile. Grâce à une liaison avec un nanocorps, sa structure a pu être cristallisée. Cependant, il faut noter que seulement la moitié de sa structure est cristallisée de manière ordonnée, cela prouve qu'il serait impossible d'accéder à la structure de cette protéine bactérienne sans liaison au VHH (Lah *et al.*, 2003).

Leur efficacité a aussi été démontrée avec la cristallisation d'un complexe VHH-EpsI:EpsJ pseudopiline hétérodimère, qui forme le pseudopilus central. Ce pseudopilus est un composant des systèmes de sécrétion bactériens de type II (SST2), outil impliqué dans le processus d'infection, de colonisation et de communication microbienne. Sa structure a été cristallisée en 15 jours, contre 11 mois et 17 variantes nécessaires pour une cristallisation sans VHH (Koide, 2009 ; Lam *et al.*, 2009).

b. Agrégation des protéines

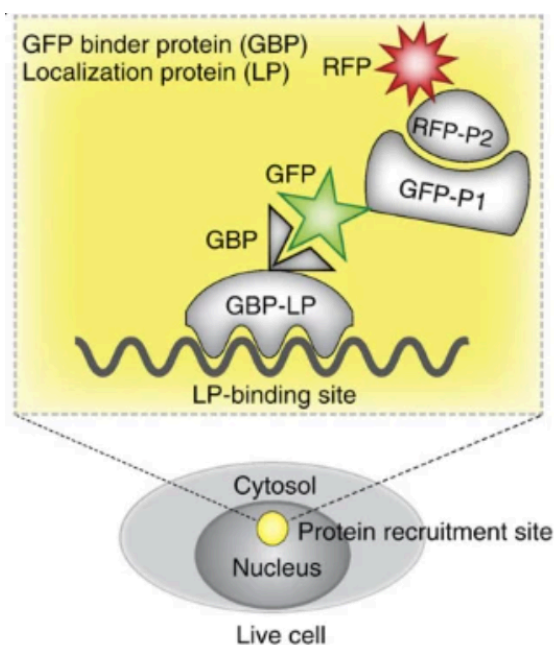
Les nanocorps sont aussi utiles comme chaperons pour étudier les réactions d'agrégations polypeptidiques, notamment dans le cas de la protéine prion ou encore des fragments amyloïdogènes. L'utilisation de VHH permet de réaliser une co-cristallisation pour améliorer l'acquisition des données et permet le remplacement moléculaire afin d'accéder à la structure (de Marco, 2011).

En effet, les nanocorps permettent l'étude d'intermédiaires sujets à l'agrégation du peptide de l'amyloïde- β (A β) dans le cerveau, à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Jusqu'alors les

informations relatives à l'amyloïde- β ont été limitées en raison de sa nature non cristalline et instable. Or l'utilisation de nanocorps a permis de piéger et de caractériser les intermédiaires à l'amyloïdogénèse de la β 2-microglobuline (β 2m) par cristallographie à rayons X. Ainsi, le mécanisme d'élongation par lequel les grands feuillets β intermoléculaires sont construits, a été élucidé. Ce phénomène d'auto-association repose sur un échange de domaines de dimères de protéines démasquant les séquences amyloïdogènes qui se replient en un feuillet β antiparallèle à deux brins (Domanska *et al.*, 2011 ; Streltsov *et al.*, 2011).

D'autre part, l'utilisation de nanocorps ciblant la GFP pour étudier les interactions protéines-protéines a déjà été décrite plusieurs fois et parfois en couplant cette nanoparticule à une étiquette de délocalisation, pour visualiser les cibles à l'aide d'une technique de fluorescence-trois-hybrides (F3H) dans un emplacement subcellulaire défini. Cette technique basée sur une lecture optique simple permet donc de visualiser les interactions protéines-protéines ou leur inhibition dans tous types de cellules et d'espèces *in vivo* (Figure 38). Cependant cette approche ne s'intéresse pas à la cinétique d'interaction ou de perturbation (Herce *et al.*, 2013).

Figure 38 : Représentation schématique de la méthode F3H, d'après (Herce *et al.*, 2013).



Légende : La méthode F3H permet l'étude des interactions protéine-protéine. Une protéine liante GFP (GBP) est attachée à une protéine (LP) qui s'accumule à un endroit bien défini de la cellule. Ce complexe recrute à cet endroit particulier des protéines marquées GFP (GFP-P1). Si la protéine P1 interagit avec une seconde protéine P2, marquée par un marqueur fluorescent différent, l'interaction peut être immédiatement visualisée par microscopie à fluorescence.

c. Régulation des protéines

La compréhension de la fonction des protéines ne cesse de progresser, mais repose essentiellement sur des technologies qui ciblent la fonction des protéines en amont, comme avec les ARN interférents (ARNi) ou les oligonucléotides antisens Morpholino. En effet, les ARNi peuvent être utilisés pour étudier la fonction des gènes en bloquant leurs effets, donc en inhibant la production de protéines. Les phénotypes obtenus permettent d'élucider la fonction du gène, cependant cette technique manque de spécificité avec une activité hors cible possible et présente aussi des risques de toxicité. Afin de pallier ces problèmes l'utilisation de nanocorps ciblant directement les protéines s'avère utile. En effet, les nanocorps, ciblant des protéines, peuvent être considérés comme des inhibiteurs de haute affinité, et pourraient être directement exprimés dans les cellules afin de neutraliser une ou plusieurs de leurs fonctions en provoquant des effets quantifiables. Ils peuvent ainsi servir d'outils d'études de la fonction des protéines ou des voies de signalisation encore mal connues, laissant ainsi entrevoir de nouvelles possibilités de développement de médicaments (Beghein et Gettemans, 2017).

A titre d'exemple, le botulisme est causé par les neurotoxines de *Clostridium botulinum* (BoNT) de sérotypes A, B, E et F chez l'homme. Il se caractérise par une paralysie musculaire flasque, le plus souvent rapidement mortelle. A l'heure actuelle, les traitements du botulisme reposent sur l'utilisation d'antitoxines équine ou humaine, qui sont toutes deux des immunoglobulines. Cependant ces thérapies ne sont efficaces qu'avant la pénétration de la toxine dans les neurones et donc en prévention de la paralysie. L'utilisation de VHH de lamas non immunisés affichés à la surface d'une levure, *Saccharomyces cerevisiae*, peuvent représenter des inhibiteurs intéressants de la translocation et des domaines catalytiques de la neurotoxine. En effet, à l'instar de l'affichage sur phage ou phage display, décrit au chapitre 1.A.b, des levures peuvent être utilisées pour produire et sécréter à leur surface des VHH à partir d'un gène et à l'aide de leur machinerie enzymatique (Dong *et al.*, 2010).

Enfin, les études conventionnelles de cartographie des épitopes, combinées à des expériences fonctionnelles *in vitro* ou *in vivo*, permettent de relier la fonction d'une protéine à un domaine protéique spécifique. L'étude de la structure cristalline du complexe Ag-Ac permettent de déterminer les interactions faibles dans les liaisons protéiques qui ont lieu au niveau atomique (Audenhove *et al.*, 2013).

C. Identification et neutralisation d'agents pathogènes : une ouverture sur les indications diagnostiques et thérapeutiques des nanocorps

L'identification et la neutralisation d'agents pathogènes à l'aide de nanocorps s'avère prometteuse, cependant l'absence de fonctions effectrices nécessite souvent un couplage avec des enzymes toxiques, ou permet au moins de bloquer une interaction moléculaire spécifique (Harmsen et De Haard, 2007).

a. Bactéries et phages

Les anticorps sont capables de reconnaître et de se fixer aux bactéries grâce à la présence d'antigènes de surface spécifiques. Les nanocorps, dépourvus de fragment Fc, sont capables de reconnaître des antigènes apparentés chez des bactéries d'espèces différentes. Cette capacité leur permet d'identifier des bactéries d'une même sous-population (de Marco, 2011).

On peut citer divers exemples d'anticorps permettant la fixation et la neutralisation de bactéries impliquées dans des infections chez l'homme ou l'animal. Ces anticorps sont produits à partir d'immunisation de lamas ou de dromadaires après inoculation de protéines cibles. L'utilisation de ces nanocorps pourrait permettre d'empêcher la fixation des bactéries pathogènes aux cellules hôtes *in vivo* (de Marco, 2011).

- **Prophylaxie dans le développement de caries dentaires**

L'apparition de caries est notamment corrélée à la présence de *Streptococcus mutans* buccaux. Une sélection d'anticorps à domaine unique (S36-VHH) a été réalisée à partir de l'immunisation de lamas, pour la fixation à un antigène de ce streptocoque, l'adhésine I/II. L'administration quotidienne de ces anticorps à des rats sélectionnés a permis de mettre en évidence la réduction d'apparition de nouvelles caries, cependant aucun effet thérapeutique supplémentaire n'a été observé et une production à l'échelle industrielle n'est pas encore envisageable en raison des faibles rendements obtenus. Mais ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans le traitement d'affections bucco-dentaires (Krüger *et al.*, 2006).

La modification aisée des nanocorps permet de développer d'autres approches, dans un souci de perfectionnement constants des procédés développés. En effet, dans la gestion des caries, l'utilisation d'enzymes, telles que la lactoperoxydase ou encore la glucose oxydase (GOx), déjà utilisées comme agents anti-microbiens dans les produits d'hygiène buccale, mais leur modification pourrait permettre d'augmenter leur spécificité et donc leur efficacité. Ainsi, une protéine de fusion à partir de la GOx a été développée et couplée à un anticorps de lama, préalablement immunisé avec une souche HG982 de *Streptococcus mutans*. Les bactéries ont été spécifiquement ciblées et détruites par la protéine de fusion obtenue. Cette synergie démontrée doit cependant encore faire ses preuves *in vivo* (Szynol *et al.*, 2004).

- **Traitement des entérites chez le porcelet**

Les porcelets sont sensibles à diverses diarrhées néonatales d'étiologie variable, les principaux agents pathogènes retrouvés sont des bactéries *E. coli* à tropisme intestinal et des rotavirus. L'anticorps à domaine unique (K609) reconnaît spécifiquement *E. coli* F4 fimbriae impliquée dans les entérites du porcelet. Pour cet anticorps, utilisé par voie orale chez les porcelets, une recombinaison avec deux autres VHH a été nécessaire pour éviter sa dégradation par les enzymes digestives protéolytiques, telles que la trypsine et la chemo-trypsine, respectivement présentes dans l'estomac et dans le duodénum. En effet, un VHH dirigé contre un rotavirus a été sélectionné dans un modèle murin pour sa capacité de résistance à l'environnement acide de l'estomac. Par ailleurs, la protéolyse des VHH pourrait aussi être évitée directement grâce à leur production locale par des bactéries commensales de l'intestin, des lactobacilles transformés. Des VHH – sous forme sécrétée et ancrée à la surface cellulaire – ont été exprimés dans *Lactobacillus paracasei*, directement administré sous forme fraîche ou lyophilisée dans un modèle murin. Un nouvel espoir de gestion des diarrhées néonatales est donc en cours d'étude, applicable au modèle porcin, comme à l'humain (Harmsen *et al.*, 2005 ; Pant *et al.*, 2006 ; Wesolowski *et al.*, 2009).

- **Modulation d'antibiothérapie**

La production d'enzymes, telles que des lactamases, permet à certaines bactéries d'échapper aux antibiotiques de la famille des β -lactamines, en les inactivant directement. Certaines molécules, comme l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam, sont d'ores-et-déjà utilisées afin de

limiter ce problème ; mais de nouvelles perspectives émergent avec l'utilisation d'anticorps spécifiques de ces enzymes. Obtenus après immunisation de dromadaires, certains nanocorps permettent d'éviter l'inactivation des β -lactamines afin de rendre l'antibiothérapie efficace (Conrath *et al.*, 2001).

b. Virus

La grande boucle CDR3 permet aux nanocorps d'être un outil particulièrement adapté pour la reconnaissance des épitopes viraux. En effet, les épitopes viraux responsables de la reconnaissance de l'hôte ont la particularité d'être cryptiques, chaque virion possède des dizaines de copies de ces épitopes, dont les anticorps conventionnels n'ont généralement pas accès. *A contrario*, il est intéressant de noter que ces derniers ont la capacité de neutraliser les virus grâce à leur grande taille, par encombrement stérique. Alors l'utilisation de nanocorps conjugués à d'autres molécules ou tout simplement glycosylés pour augmenter leur masse sans modifier leur affinité pour l'épitope, s'avère être une alternative prometteuse à ces contraintes. Par exemple, une N-glycosylation par mutagenèse et expression dans des cellules de levures a permis d'obtenir des nanocorps performants. Des essais sur modèles murins sont d'ailleurs en cours, et démontrent la neutralisation *in vitro* de rotavirus du groupe A – à l'aide d'un nanocorps ciblant la protéine de la capsid interne VP6 – impliqué dans les diarrhées du nourrisson. Puis *in vivo*, grâce à la technique de « phage display » sur des lactobacilles, la gravité et la durée des signes cliniques ont été significativement réduits, en même temps que la charge virale, chez les souris traitées par voies orales avec ces molécules (Garaicoechea *et al.*, 2008 ; de Marco, 2011).

En outre, malgré les progrès réalisés en matière de vaccination, certaines infections virales nécessitent le développement de nouvelles approches pour leur éradication. En effet, la poliomyélite, pourtant sujette de campagnes de vaccination à grande échelle, sévit encore aujourd'hui. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), des flambées en Afrique subsaharienne surviennent suite à la circulation de souches sauvages ou de souches dérivées de vaccins, et des recrudescences sur d'autres continents ne sont pas exclues. Il est essentiel aujourd'hui de développer de nouvelles stratégies dans la lutte contre la poliomyélite, et la piste la plus prometteuse semble être un médicament antiviral dirigé contre la capsid – enveloppe protéique icosaédrique – du virus. D'après les données collectées, les VHH présentent l'avantage de se fixer des régions normalement peu accessibles par les anticorps conventionnels *in vitro*, or ces régions sont impliquées dans la fixation aux cellules cibles et sont généralement bien conservées au sein des différentes souches virales. La sélection de VHH efficaces pourrait donc permettre d'éviter l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules hôtes, et ce pour différents types de poliovirus. Mieux encore, la fixation des VHH sur de nouveaux épitopes, jusqu'alors inaccessibles par les anticorps impliqués dans le procédé de vaccination avec le vaccin anti-polio inactivé (IPV), n'interférerait pas avec les autres techniques prophylactiques et représenterait donc une méthode complémentaire de lutte contre le virus (Thys *et al.*, 2010).

c. Parasites

Les anticorps à domaine unique peuvent aussi reconnaître les épitopes des glycoprotéines parasitaires, que ce soit dans un cadre diagnostique ou *in vivo*. La cysticercose est une parasitose à l'origine de symptômes neurologiques dans les pays émergents, qui se développe après consommation de viande porcine contaminée par des larves de *Taenia solium*. L'immunisation de dromadaire a permis d'obtenir des anticorps à domaine unique (NbSol52) capables de reconnaître et capturer une glycoprotéine Ts14, antigène de 14kD, dans le sérum de cochons infectés. Ce

diagnostic n'était jusqu'alors pas possible par technique ELISA classique puisque des réactions croisées étaient souvent observées. Cette application diagnostique permet d'ouvrir d'autres perspectives notamment en termes de thérapeutique, de nouvelles études seront certainement nécessaires afin de les développer (de Marco, 2011).

d. Champignons et protozoaires

Les applications des nanocorps aux champignons et protozoaires ont encore peu été explorées, néanmoins, quelques exemples peuvent être évoqués ici. D'abord, un nanocorps a été sélectionné pour identifier spécifiquement une protéine de paroi cellulaire (Malf1) de *Malassezia furfur* – une levure ou champignon impliquée dans l'apparition des pellicules ou de psoriasis lors de son renouvellement accru (Dolk *et al.*, 2005).

Ensuite, la trypanosomiase africaine (TA) ou maladie du sommeil est causée par des protozoaires flagellés unicellulaires extracellulaires du genre *Trypanosoma* et touche les populations et les bétails en Afrique subsaharienne. Cette maladie vectorielle est transmise à l'homme par des piqûres de la mouche tsé-tsé, du genre *Glossina*. Elle se présente sous deux formes : 95% des cas de maladie du sommeil sont causés par *Trypanosoma brucei gambiense* et sont à l'origine de signes nerveux lorsque la maladie est à un stade avancé, alors que dans 5% des cas elle est causée par *Trypanosoma brucei rhodesiense* qui entraîne une infection aiguë avec des signes nerveux en quelques semaines ou mois. En effet, lors du premier stade de la maladie, les parasites se développent dans le système sanguin et lymphatique de l'hôte, à l'origine de poussées de fièvre, de douleurs articulaires et de démangeaisons, avant de franchir la barrière hémato-encéphalique, causant des modifications du comportement, des troubles sensoriels et du sommeil, et enfin la mort. La trypanosomiase animale, ou Nagana due à l'une ou l'autre de ces deux souches, affecte les espèces sauvages ou domestiques, comme le bétail qui constituent le réservoir principal de la maladie. Ces hémoparasites sont régulièrement à l'origine d'épidémies humaines et de pertes économiques majeures et le traitement de cette maladie reste compliqué, c'est pourquoi elle reste un enjeu important pour l'OMS et fait l'objet de diverses études. Six médicaments sont actuellement recommandés et distribués gratuitement aux pays endémiques. Cependant, ces efforts restent insuffisants pour le moment, puisqu'ils sont peu développés pour l'infection par *T. b. rhodesiense*. Cette dernière est particulièrement problématique puisque la forme hémolympatique peut rapidement passer à un stade encéphalique, et que les effets indésirables des traitements peuvent être nombreux (OMS, 2021).

De plus, ces parasites ont développé des stratégies pour échapper aux anticorps conventionnels, basées sur une variation antigénique de la glycoprotéine variante de surface (VSG), induisant une résistance à la lyse médiée par le complément, l'échappement à la réponse immunitaire, la production exagérée de cytokines et la production d'auto-anticorps. Les nanocorps pourraient rapidement devenir des outils précieux dans le diagnostic et le traitement de la TA. En effet, les nanocorps, tel que le An46, ciblent les épitopes VSG des trypanosomes pour perturber la machinerie cellulaire de la poche flagellaire du parasite, tandis que le An33 est capable de passer la BHE *in vivo* dans des conditions saines et pathologiques. Bien d'autres Nb, avec diverses spécificités, sont actuellement à l'étude. Les nanocorps combinent donc des qualités essentielles dans la lutte contre cette maladie, comme leur capacité de passage de la barrière hémato-encéphalique et leur activité trypanolytique directe (Steelnd *et al.*, 2016 ; Stijlemans *et al.*, 2017).

Enfin, le paludisme causé par *Plasmodium falciparum* est liée à la protéine VAR2CSA, reconnue comme la principale adhésine exposée à la surface des érythrocytes infectés. La cyto-

adhésion de ces érythrocytes infectés au placenta peut être à l'origine de 200 000 décès de fœtus et nourrissons et de 10 000 décès maternels par an. La chondroïtine sulfate A a été identifiée comme le principal récepteur de l'hôte dans le placenta. Des nanocorps, le Nb2907 et le Nb2919, dirigés contre le domaine DBL6 ϵ de la protéine VAR2CSA de la souche FCR3 de *P. falciparum*, ont été produits afin d'établir la structure cristallographique des épitopes mis en jeu. L'acquisition de ces données permet de déchiffrer le rôle de DBL6 ϵ dans l'adhésion au placenta et l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte (Vuchelen *et al.*, 2013).

e. Toxines

Comme évoqué au chapitre précédent, les nanocorps peuvent reconnaître de petits épitopes issus de toxines bactériennes. C'est notamment le cas pour l'aflatoxine B pour la surveillance sanitaire des céréales, mais cette surveillance peut s'appliquer aussi aux sources d'air, d'autres aliments ou d'eau en vue de contaminations délibérées – puisque certaines toxines sont actuellement classées comme armes biologiques – ou non. Les nanocorps issus de camélidés, ou leur cousins issus de poissons, peuvent être particulièrement utiles dans ces dosages, en ciblant par exemple le ricin, la toxine du choléra ou encore l'entérotoxine staphylococcique B (Goldman *et al.*, 2006).

De la même manière, la possibilité d'utiliser ces anticorps sous formes « d'intrabodies » permet aux nanocorps d'être particulièrement adaptés pour la recherche de la toxine SpyB de *Salmonella*, qui est sécrétée directement dans le cytoplasme de la cellule hôte pour laquelle elle devient pathogène. Leur facilité de modification en éléments multivalents leur permet d'améliorer la neutralisation, même *in vivo*, de nombreuses autres toxines par rapport à des anticorps conventionnels, comme les toxines de scorpion (Aahl/Aahl), la vérotoxine 1 d'*E. coli*, l'alpha-cobrotoxine et la toxine A de *Clostridium difficile* (de Marco, 2011).

f. Haptènes

Un haptène est une petite molécule, partie d'un antigène et reconnue comme étrangère à l'organisme, mais de taille insuffisante pour induire une réaction immunitaire seule. En effet, l'haptène doit se lier à une protéine, en général une protéine sérique telle que l'albumine, à l'aide d'une liaison covalente, pour pouvoir être transporté dans l'organisme. Ils peuvent faire partie de diverses classes de molécules, comme les herbicides, la caféine, les mycotoxines, le trinitrotulène, les stéroïdes ou autres médicaments thérapeutiques (de Marco, 2011).

Dans le cas de la caféine, un anticorps de lama a été isolé pour analyser la caféine dans les sodas froids ou les boissons chaudes, puisque les VHH sont stables même à de hautes températures. Le nanocorps VSA2 était d'ailleurs capables de lier la caféine jusqu'à 70°C. Les valeurs obtenues avec le VSA2 grâce à une analyse immuno-enzymatique (ELISA) ont pu être comparées aux données obtenues par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) et celles publiées par les fabricants de boisson. Ces données et l'élaboration d'un test rapide, le « dip-stick », ou bandelettes réactives colorimétriques, pourraient permettre aux consommateurs d'avoir des indications fiables concernant la quantité et même à terme la qualité de la caféine présente dans les boissons commercialisées, et particulièrement pour vérifier la sureté des boissons décaféinées. Ces détecteurs n'ont cependant pas été développés depuis la publication des travaux de Ladenson (Ladenson *et al.*, 2006).

2. Utilisation diagnostique

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les nanocorps permettent la détection de divers pathogènes. Ils présentent ainsi un intérêt diagnostique, particulièrement lorsque les autres techniques diagnostiques déjà existantes ne sont pas suffisantes, comme lorsque l'épitope n'est pas accessible par des anticorps conventionnels. Plus encore, ils sont capables de reconnaître bons nombres d'épitopes complexes de molécules biologiques, qui peuvent être impliquées dans diverses affections, et même certains épitopes reconnus comme non antigéniques pour des anticorps conventionnels. Ils peuvent aussi permettre de déceler ces antigènes directement *in vivo* et à l'aide de technologies de plus en plus sophistiquées (Muyldermans, 2013).

A. Techniques de diagnostic des infections

Les nanocorps peuvent servir de réactifs dans les techniques de diagnostic par méthode immuno-enzymatiques (ELISA) ou encore des essais de résonance plasmonique de surface (SPR) utilisés pour le diagnostic précoce et précis de maladies virales, bactériennes ou fongiques. Par exemple des tests rapides de détection par ELISA sandwich des virus de la grippe H3N2 et H5N1 ont été mis au point avec des nanocorps ou encore, un test de diagnostic compétitif basé sur l'utilisation de nanocorps spécifiques d'une protéine présente dans la salive de la mouche tsé-tsé, Tsal, pour identifier l'exposition aux vecteurs de transmission des trypanosomes (Steeland *et al.*, 2016).

De même, d'autres nanocorps spécifiques des résidus oligomannoses des glycoprotéines de surface de *Trypanosoma b. rhodiense* et autres *Trypanosoma spp.*, marqués avec du Alexa Fluor 488, peuvent être utilisés pour le diagnostic par cytométrie de flux rapide pour quantifier le pathogène dans les échantillons de sang (Saerens *et al.*, 2008).

B. Diagnostic précoce d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) décrite pour la première fois en 1906 par Alois Alzheimer, est une maladie neurodégénérative entraînant un déclin cognitif et moteur, en affectant le langage, la mémoire, la capacité de résolution de problèmes, la marche ou encore la capacité à avaler. Décrite par la suite comme la première démence neurodégénérative aux États-Unis, elle a été beaucoup étudiée, ce qui a d'ailleurs permis d'établir ses différents stades. D'abord, sont présentes des difficultés pour transcrire et stocker des souvenirs, puis apparaissent des modifications de la cognition et du comportement (Soria Lopez *et al.*, 2019).

La maladie d'Alzheimer représente un défi diagnostique ; puisque d'une part les marqueurs de la maladie se situent dans l'encéphale, zone difficilement accessible par les techniques diagnostiques classiques, du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et d'autre part puisqu'il existe un véritable enjeu thérapeutique pour la détection précoce de la maladie afin d'élaborer de nouvelles perspectives de traitement, car les traitements symptomatiques utilisés aujourd'hui restent vains.

a. Les lésions d'intérêt

Deux types de lésions cérébrales sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. En effet, sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, une modification du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) a lieu. Ainsi le peptide bêta amyloïde (A β) s'accumule dans l'encéphale au cours du temps jusqu'à former des plaques amyloïdes, qui sont toxiques pour les cellules nerveuses. Ces plaques entraînent

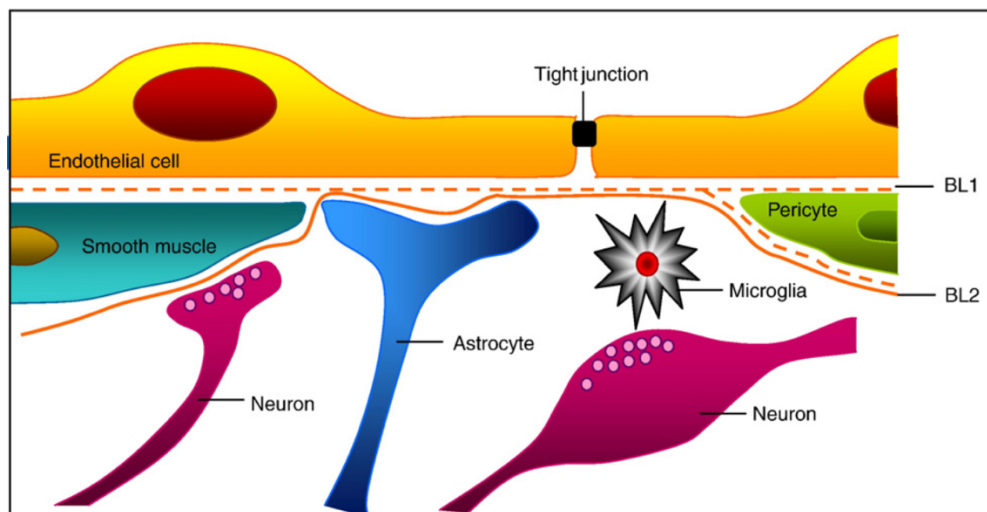
une désorganisation de la structure des neurones associée à une dégénérescence neurofibrillaire, caractérisée par des agrégats anormaux de la protéine tau hyperphosphorylée, provoquant ainsi une perte synaptique et leur mort cellulaire (Soria Lopez *et al.*, 2019).

b. Un défi diagnostic

La maladie d'Alzheimer affecte donc les cellules nerveuses situées dans l'encéphale, ou neurones, qui sont protégées par une membrane active, jouant un rôle de filtre et permettant d'isoler l'encéphale ou au contraire de distribuer des substances circulantes dans le sang : la barrière hémato-encéphalique (BHE).

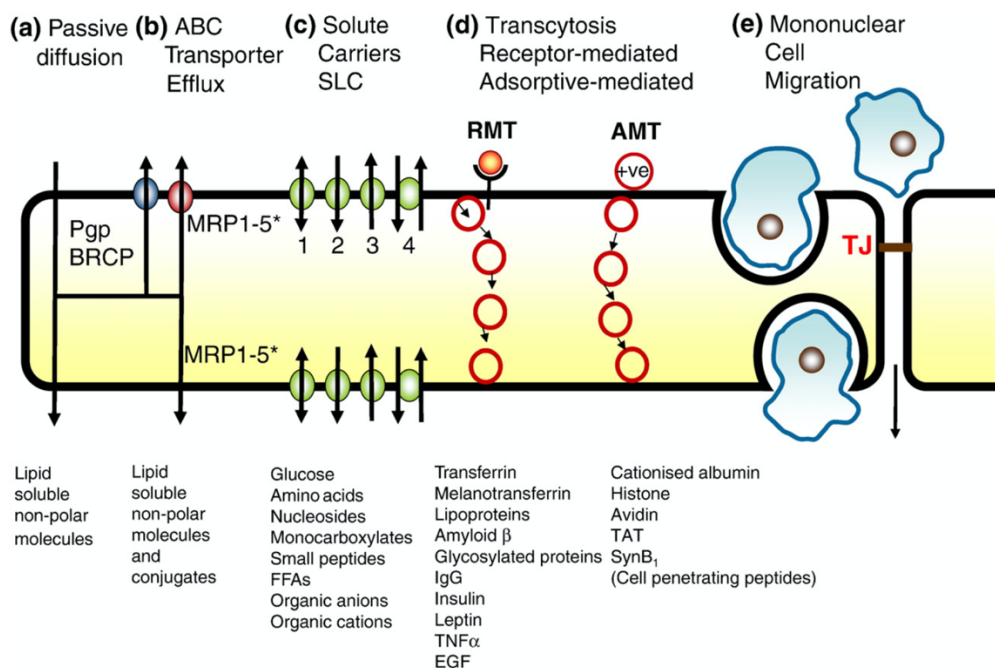
Les neurones sont des cellules sensibles chargées de stocker et de transmettre l'information au sein de l'encéphale, c'est pourquoi ils ont besoin d'un microenvironnement contrôlé. En effet, certaines molécules transportées dans le sang sont essentielles à leur fonctionnement, telles que l'oxygène, l'insuline ou le glucose. Tout ceci est régulé par les astrocytes, cellules en forme d'étoile (Figure 39) (Abbott *et al.*, 2010).

Figure 39 : Les cellules de la barrière hémato-encéphalique, d'après (Abbott *et al.*, 2010).



La BHE, responsable de cette homéostasie, est donc formée d'une barrière physique composée de jonctions serrées endothéliales et une barrière active perméable à certaines molécules qui diffuseront selon différents modes de transport. Des récepteurs sont investis dans le mécanisme de transcytose permettant un flux de molécules spécifiques, dont notamment les immunoglobulines (Figure 40).

Figure 40 : Modes de transport via la barrière hémato-encéphalique, d'après (Abbott *et al.*, 2010).



Des techniques classiques de diagnostic reposent d'ores et déjà sur l'utilisation d'anticorps, tels que les IgG, afin de cibler des cellules d'intérêts. Cependant l'existence de cette barrière est un frein à leur utilisation. En effet, il a été établi que seuls 0,02% à 0,1% des immunoglobulines circulantes seraient capables de passer à travers la BHE (Bard *et al.*, 2000 ; Tengfei Li *et al.*, 2016).

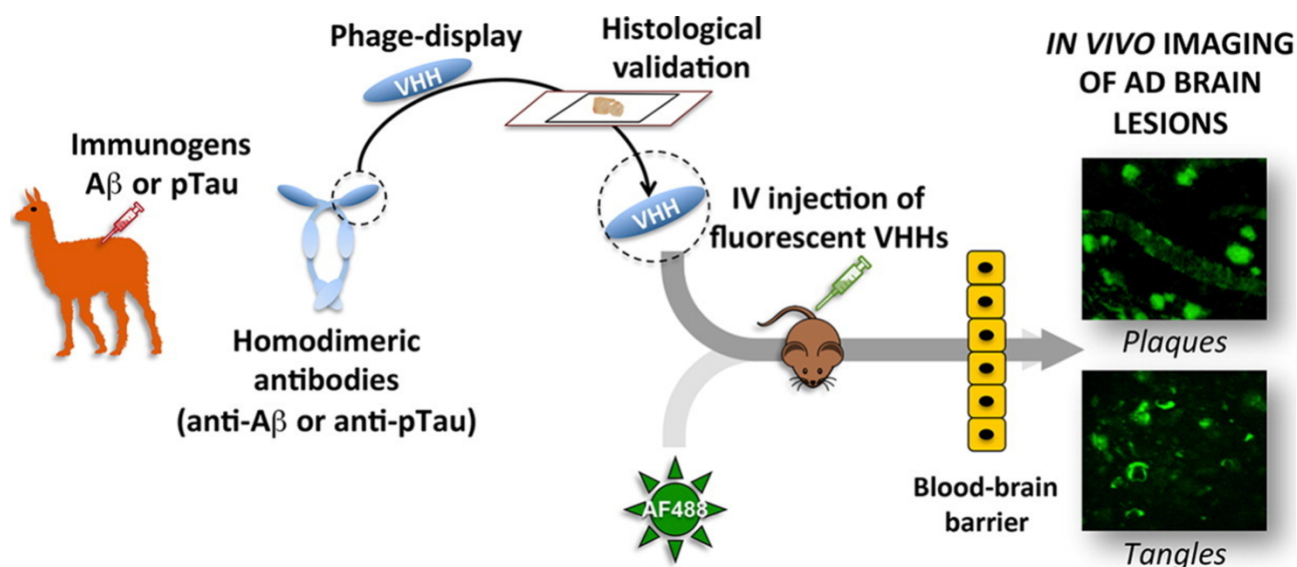
Diverses techniques ont été envisagées afin de contourner ce problème, comme un détournement des mécanismes de transcytose, i.e. des flux de molécules à travers la barrière, en ciblant certains récepteurs ou protéines de transport ou encore en modifiant sa perméabilité via l'utilisation d'ultrasons. Or, les fragments VHH pourraient, quant à eux, pénétrer plus facilement dans l'encéphale pour atteindre les lésions recherchées. Enfin, une modification de ces fragments permettrait leur utilisation comme biomarqueurs (Tengfei Li *et al.*, 2016).

c. Développement et applications diagnostiques

Forts de leur petite taille, les VHH passent plus facilement la BHE et ont de surcroit une biodistribution au sein du parenchyme de l'encéphale améliorée. En effet, les VHH sont capables de traverser la BHE *in vivo*, soit par transcytose, soit par diffusion passive dans le cas des VHH possédant un point isoélectrique (pI) basique (Tengfei Li *et al.*, 2016). Des VHH anti-A β et anti-tau ont été développés pour cibler spécifiquement les lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Pour arriver à développer de telles molécules, une immunisation d'un alpaga avec 1 mg de peptide synthétique A β 42 fibrillaire ou encore d'agrégats de protéine tau d'extraits d'encéphales, ont été réalisées. Enfin, la construction d'une bibliothèque de phages spécifiques des épitopes des protéines d'intérêt a permis d'obtenir deux types de fragments : le VHH R3VQ se lie aux dépôts A β extracellulaires tandis que le VHH A2 reconnaît les inclusions intracellulaires tau (Figure 41) (Soria Lopez *et al.*, 2019).

Figure 41 : Processus de développement de VHH sondes spécifiques de lésions cérébrales intra et extracellulaires utiles pour l'imagerie diagnostique *in vivo* (Tengfei Li *et al.*, 2016).



Légende : Immunisation d'un alpaga avec des extraits de cerveau humain de la MA enrichis en enchevêtrements et un second alpaga avec un peptide synthétique extrait de la protéine tau. Construction d'une bibliothèque par « phage display » et sélection des VHH spécifiques recherchés et marquage à l'Alexia fluor 488. Injections stéréotaxiques à un modèle de souris PS2APP abritant les lésions d'intérêts, sous sédation. Révélation par immunohistochimie et double coloration par immunofluorescence sur coupes de paraffine de l'encéphale.

Jusqu' alors, les techniques d'imagerie utilisant des marqueurs de lésions spécifiques à la maladie d'Alzheimer reposaient sur l'utilisation de ligands ou radiotraceurs absorbés et révélés via la tomographie par émission de positons (TEP) (Vodovar *et al.*, 2019). Cependant la TEP présente plusieurs limites d'utilisations telles qu'un coût élevé, l'exposition des sujets aux radiations, une faible résolution dans l'espace et une disponibilité limitée. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) serait alors plus indiquée, c'est pourquoi l'utilisation de VHH couplé à un produit de contraste, tel que le gadolinium paramagnétique, permettrait de révéler les lésions d'intérêt. En sus, de leur petite taille, leur grande stabilité et leur clairance sanguine, les VHH présenteraient certainement une faible immunogénicité à long terme en raison de leur similitude avec les VH humaines. L'absence de réaction d'immunogénicité a par ailleurs déjà été soulignée chez les souris par le passé (Cortez-Retamozo *et al.*, 2002 ; Tengfei Li *et al.*, 2016). Ainsi cette technique toujours à l'étude offre de nouvelles perspectives, puisque la détection précoce d'Alzheimer permettrait de tester de nouveaux traitements avant l'apparition des symptômes.

C. Diagnostic de cancers

Depuis des années, des études utilisant des anticorps spécifiques de cancers ont essayé de démontrer leur efficacité en termes de ciblage de tumeurs. En effet, l'utilisation d'anticorps spécifiques d'antigènes de surface des tumeurs pourraient permettre leur discrimination au sein de tissus sains, et par la suite être utiles pour leur traitement ou leur visualisation. Ces modèles utilisaient notamment des anticorps murins, avec une haute immunogénicité non souhaitée, une distribution aux organes sains et finalement une faible dissémination aux tumeurs solides. Ces observations ont poussé les chercheurs à développer des anticorps de plus petite taille pour pallier

ces problèmes. Enfin, la découverte de VHH de camélidés a permis de contrer ces difficultés rencontrées (Cortez-Retamozo *et al.*, 2002).

Les tumeurs sont le résultat d'altérations génétiques affectant l'expression ou l'intégrité des protéines, ce qui modifie par la suite les voies de transduction du signal impliquées dans la prolifération, la survie, l'angiogenèse, l'invasion et les métastases. Ce sont ces modifications moléculaires qui servent de support pour le diagnostic de cancer, pour distinguer les tumeurs des tissus sains. De plus, il est primordial de développer des techniques diagnostiques fiables et non invasives, c'est pourquoi le recours à l'imagerie est souvent nécessaire et est utilisé depuis de nombreuses années, avec la simple radiographie par rayon X jusqu'à des techniques plus performantes d'imagerie nucléaire (Huang *et al.*, 2008).

a. Utilisation de nanocorps couplés pour l'imagerie

Les nanocorps, grâce à leurs caractéristiques exceptionnelles, s'avèrent être des outils intéressants dans le domaine de l'imagerie. En effet, ils peuvent être utilisés comme réactifs de détection avec diverses techniques d'imagerie médicale. Certaines caractéristiques sont primordiales pour être un agent intéressant pour l'imagerie en oncologie :

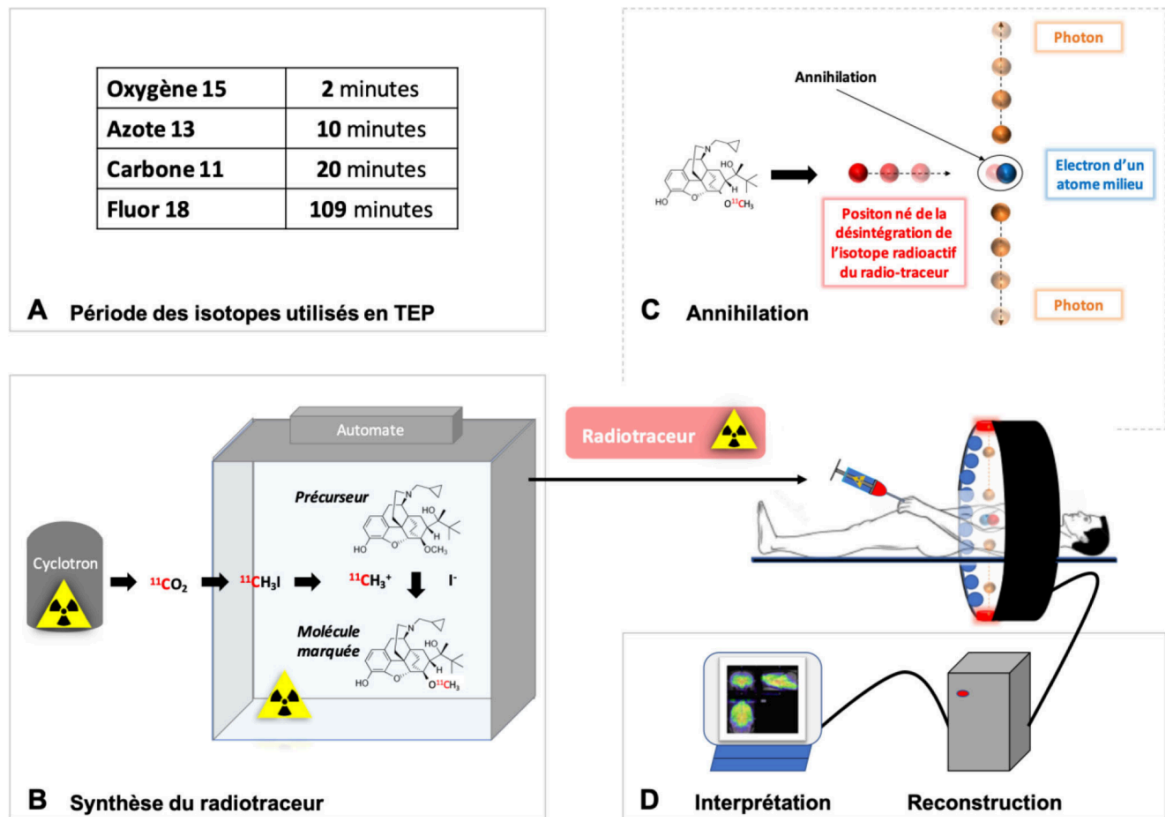
- Il doit être capable de délivrer une quantité suffisante de marqueur pour détecter les plus petites métastases,
- Il doit fixer rapidement son antigène et avec grande affinité, sans colorer les zones de nécroses, pour réaliser l'examen d'imagerie quelques heures après l'injection,
- Le conjugué non lié doit être rapidement éliminé de la circulation pour minimiser l'exposition du corps entier au rayonnement (Muyldermans, 2001).

De nos jours, les techniques d'imagerie sont bien développées avec l'échographie, la tomographie par émission de positons (TEP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'imagerie nucléaire ou l'imagerie par fluorescence, où chaque technique comporte des avantages et des inconvénients, poussant les médecins à systématiser d'une utilisation combinée de celles-ci et le perfectionnement technique de chacune (Kosaka *et al.*, 2009).

• La tomographie par émission de positons ou monophotonique (TEP)

La tomographie par émission de positons (TEP, ou PET pour positron emission tomography) est une technique d'imagerie fonctionnelle quantitative et dynamique, développée à des fins diagnostiques par la médecine nucléaire. Elle repose sur l'utilisation de traceurs radiomarqués par un isotope émetteur de positons (rayonnement β^+) et de caméras dédiées. Les images obtenues sont ainsi en trois dimensions, *in vivo* et obtenues grâce à une technique non invasive (Vodovar *et al.*, 2019).

Figure 42 : Étapes de l'imagerie TEP, d'après (Vodovar *et al.*, 2019).



La tomographie par émission monophotonique (TEMP ou SPECT pour single photon emission computed tomography) est aussi une technique d'imagerie médicale nucléaire et est quant à elle basée sur la scintigraphie après injection de marqueurs émetteur de rayonnements γ , constitués de photons, captés par l'organe cible et détectés à l'aide de gamma-caméras tournant autour du patient pour reconstruire une image tridimensionnelle à l'aide d'algorithmes de traitement d'images sophistiqués.

Le recours aux nanocorps pour améliorer cette technique se justifie facilement, comme sonde de ciblage moléculaire permettant de délivrer les éléments radioactifs aux tumeurs. Par exemple, des nanocorps radiomarqués ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -VHH) spécifiques des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) ont été développés, puisque ces derniers sont fréquemment exprimés dans les tumeurs épithéliales, les carcinomes. Ils sont notamment impliqués dans de nombreux processus cellulaires clés – la croissance, la prolifération, la motilité, la survie cellulaire et l'angiogenèse – et décrit comme un facteur pronostic fort de d'un taux de survie réduit. Les premiers résultats *in vivo* obtenus à l'aide de nanocorps sont plutôt satisfaisants et ont permis de discriminer les tumeurs exprimant modérément ou fortement l'EGFR (Huang *et al.*, 2008).

D'autre part, l'imagerie SPECT couplée à l'utilisation d'un nanocorps ciblant des cellules myéloïdes Nb-DC2.1 et d'un second nanocorps ciblant les cellules dendritiques immatures dérivées de la moelle osseuse, permettent de définir la biodistribution de ces différents types cellulaires. Ces anticorps pourraient permettre de surveiller l'état de la réponse inflammatoire *in vivo* (De Groeve *et al.*, 2010).

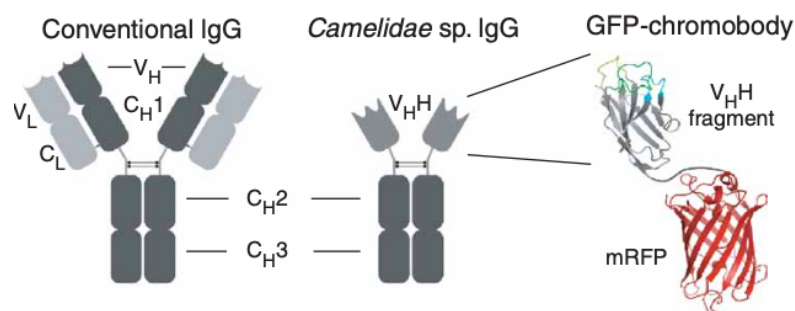
- **La fluorescence proche infrarouge (NIR)**

L'imagerie par fluorescence dans le proche infrarouge (NIR pour near infrared fluorescence) est un domaine en plein essor en oncologie, qu'elle soit utilisée en préclinique ou clinique. Elle est utile pour le dépistage du cancer, déterminer son stade, mais aussi sa caractérisation, le guidage chirurgical ou encore l'évaluation de la réponse au traitement. L'utilisation des rayons proches de l'infrarouge – d'une longueur d'onde de 650 à 900 nm – permet une pénétration plus profonde des tissus en raison d'une absorption moindre par l'hémoglobine et l'eau, par rapport à la lumière visible et un faible bruit de fond. L'imagerie NIR a été bien décrite dans la détection du cancer du sein, mais plus récemment c'est le cancer du poumon qui est au centre des recherches sur la fluorescence NIR conjuguée à l'utilisation de nanocorps pour la guider. En effet, des nanocorps ont permis de mettre en évidence la nitroreductase (NTR) enzyme présente dans le tissu tumoral, ce qui a entraîné une augmentation du signal de fluorescence et donc le diagnostic de cancer, mais a aussi catalysé l'esprit d'innovation sur son traitement (Kosaka *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2020).

- **L'imagerie cellulaire**

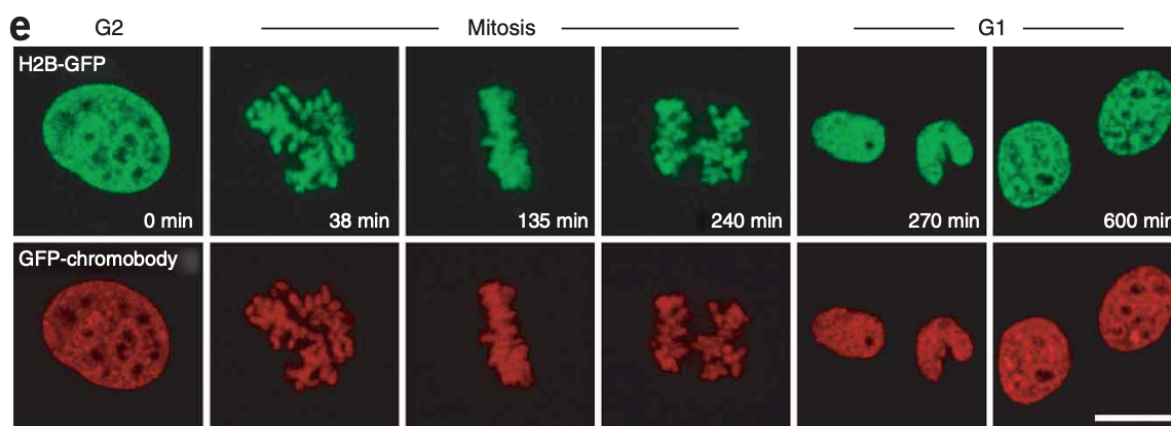
Les nanocorps peuvent aussi être utilisés comme « intrabodies », notamment dans le domaine de l'imagerie cellulaire *in vivo*, puisqu'ils sont adaptés à l'expression cytosolique grâce à leur capacité à se replier dans l'environnement intracellulaire réducteur. En effet, la présence d'un pont disulfure unique associé au domaine unique de ces anticorps permet une plus grande flexibilité par rapport aux anticorps à domaines multiples (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Figure 43 : Schéma d'une IgG conventionnelle comparée à un nanocorps et un chromobody générique : GFP-chromobody (V_HH associé à mRFP), d'après (Rothbauer *et al.*, 2006).



Aussi, la création de « chromobodies » permet de cibler et tracer des antigènes au cours des phases du cycle cellulaire et dans différents compartiments cellulaires. Il est donc possible de visualiser les composants cellulaires directement dans les cellules vivantes, ce qui n'était alors pas possible avec des anticorps conventionnels (Rothbauer *et al.*, 2006).

Figure 44 : Traçage d'une protéine de la chromatine tout au long de la mitose, d'après (Rothbauer et al., 2006).



Légende : Imagerie time-lapse d'une cellule HeLa exprimant de manière stable l'histone H2B-GFP et transfectée avec un chromobody GFP. Au moment où l'imagerie a commencé (0 h), cette cellule était en fin de phase G2. Barres d'échelle, 10 µm.

Ces anticorps couplés à des protéines fluorescentes n'interfèrent pas avec la fonction de leurs cibles endogènes et permettent même de suivre précisément leur rôle dans des mécanismes cellulaires, tels que la mitose (Beghein et Gettemans, 2017).

b. Exemple de diagnostic : les glioblastomes

Les gliomes de haut grade – astrocytome de grade IV et glioblastome multiforme notamment – sont des tumeurs cérébrales primaires agressives et sont considérées comme faisant partie des tumeurs humaines les plus mortelles.

Tableau 6 : Tableau simplifié des gliomes selon la classification de l'OMS (WHO 2000), d'après (Roodink et al., 2010).

Type de tumeur	Grade selon OMS
Gliome de bas grade	
Astrocytome pilocytique	(grade I)
Astrocytome diffus	(grade II)
Oligodendrogliome	
Gliome de haut grade	
Astrocytome anaplasique	(grade III)
Oligodendrogliome anaplasique	(grade III)
Glioblastome multiforme (GMB)	(grade IV)

Ces tumeurs possèdent généralement un noyau nécrotique, entouré d'une bordure de croissance vasculaire, ainsi elles présentent toujours de vastes zones de croissance infiltrées, dans lesquelles les cellules tumorales migrent le long des voies de la substance blanche ou des vaisseaux sanguins. Ce caractère infiltrant et diffus limite fortement l'efficacité de la chirurgie et de la radiothérapie. En outre, la barrière hémato-encéphalique dans les zones d'infiltration diffuse est généralement intacte, ce qui contribue à la faible réponse de ces tumeurs aux chimiothérapies. Ces

observations conduisent au développement de techniques moins courantes pour leur prise en charge (Roodink *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'altération du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) joue un rôle important dans l'évolution de ces cancers. Or, certains auteurs ont déjà mis en évidence qu'il est possible de visualiser les cellules tumorales exprimant l'EGFR grâce à l'imagerie SPECT basée sur un nanocorps (le 99mTc-8B6) (Huang *et al.*, 2008).

Enfin, il est possible de distinguer des vaisseaux normaux des vaisseaux tumoraux en utilisant un anticorps dérivé de lama dirigé contre la protéine de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline 7 (l'anti-IGFBP7 Nb-Cy5.5), administré par voie intraveineuse. Cet anticorps est donc capable de se lier spécifiquement aux vaisseaux des glioblastomes multiformes (GMB) humains et murins dans des coupes de tissus cérébraux et aux vaisseaux tumoraux. Ainsi, ce dernier peut être utilisé pour évaluer de manière non invasive l'angiogenèse des tumeurs cérébrales à l'aide de diverses modalités d'imagerie (Iqbal *et al.*, 2010).

Ces techniques diagnostiques laissent entrevoir de nouvelles perspectives de traitement, notamment dans la lutte contre le cancer. En effet, les anticorps à domaine unique peuvent s'avérer être de très bons alliés dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques, tant ils sont malléables et faciles à produire.

3. Utilisation thérapeutique

L'utilisation d'anticorps conventionnels tels que l'anticorps neutralisant le $TNF\alpha$, a été un réel succès dans la prise en charge thérapeutique de maladies inflammatoires ou d'arthrites rhumatoïdes. Il a donc inspiré un nouveau champ d'application dans le domaine de l'immunologie. Les applications se sont diversifiées notamment avec le traitement de maladies auto-immunes, d'allergies ou encore de cancers. Cependant, le coût de production de telles thérapies est devenu en enjeu primordial dans le domaine de la santé et peut représenter un frein à la démocratisation de ces avancées médicales, le développement de nouveaux outils mérite donc toute notre attention (*Tableau 7*) (Wesolowski *et al.*, 2009).

Trois principaux outils à base de nanocorps ont été développés dans la lutte contre le cancer : les nanocorps nus, les nanocorps de ciblage transportant des domaines effecteurs et les nanocorps de ciblage encapsulant un médicament (Kijanka *et al.*, 2015). En 2016, plus de 120 cibles thérapeutiques des nanocorps, dans les différents domaines susmentionnés, ont été identifiées (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

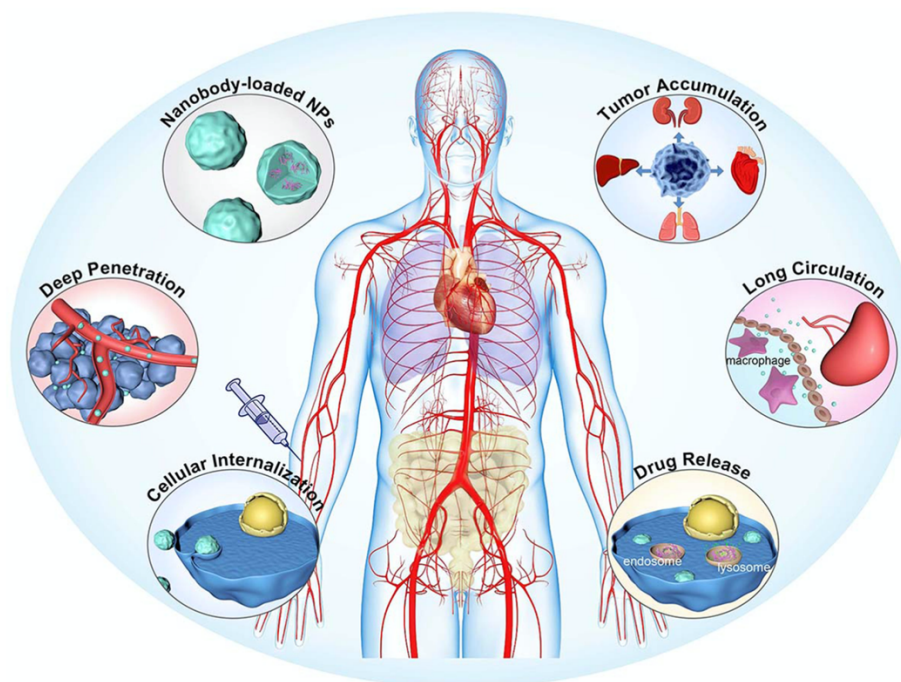
Tableau 7 : Applications variées des nanocorps, d'après (Wesolowski *et al.*, 2009).

Target	Application	Source of sdAb
<i>Membrane proteins</i>		
ART2.2	Blocking T-cell ecto-enzyme, treatment of auto-immune disease	Immune llama
CD16	Activation of NK cells	Immune llama
$\alpha 3\beta 1$ Integrin VLA-3	Block leukocyte-matrix adhesion	Immune llama
$\alpha 2,3$ Sialoglyco-protein	Crossing the blood brain barrier	Non-immune llama
EGFR	In vivo imaging, cancer immunotherapy	Immune camel, immune llama
CEA	Cancer immunotherapy	Immune llama
MUC 1	Tumor targeting	Immune camel and llama
CD105 (endoglin)	Tumor targeting	Immune camel
<i>Secretory proteins</i>		
TNF α	Cytokine neutralization	Immune llama and alpaca
PSA	Cancer diagnosis	Immune dromedary
von Willebrand factor	Blocking blood clotting	Immune llama
Amyloid A β peptide	Amyloid aggregation	Immune dromedary and alpaca
Lysozyme	Amyloidosis	Immune dromedary
IgG	Depletion of auto-Abs	Immune llama
Serum albumin	Bispecific sdAbs, increase serum half-life	Immune llama
<i>Intracellular proteins</i>		
Bax	Inhibiting apoptosis	Non-immune llama
HIF-1 α	Hypoxia response	Non-immune llama
PABPN1	Aggregation disorders	Immune and non-immune llama
<i>Vaccine enhancement</i>		
Lumazine synthase	Molecular assembly vaccines	Immune llama
<i>Molecular mimicry</i>		
Immunoglobulin idiotype	Molecular mimicry	Immune llama, non-immune shark

A. Les nanocorps : variable sources de traitements de cancers

De nos jours, les anticorps conventionnels sont devenus une classe thérapeutique à part entière dans le traitement des cancers. Ils sont encore en pleine expansion au vu des résultats prometteurs et de la diversité des cellules cancéreuses cibles et leur faibles effets secondaires (*Figure 45*) ; c'est pourquoi cinq anticorps étaient déjà présents sur le marché de 1995 à 2001, tandis qu'une dizaine en était aux phases d'essais cliniques (Carter, 2001).

Figure 45 : Les nanocorps formidables outils thérapeutiques contre les tumeurs, d'après (Sun *et al.*, 2021).



a. Les antigènes tumoraux : cibles de thérapies

Pléthore d'études ont été menées et témoignent des diverses possibilités qu'offrent ces anticorps à domaine unique dans la lutte contre le cancer. En voici quelques exemples dans un tableau non exhaustif présenté en annexe (ANNEXE 1) concernant le cancer pancréatique : (Groot *et al.*, 2009) ; (Kang *et al.*, 2021), le cancer pulmonaire : (Tian *et al.*, 2015), le cancer du sein : (Yu *et al.*, 2014), le cancer du foie : (Feng *et al.*, 2013) notamment.

Le principal avantage de ces anticorps de haute affinité et spécificité, est d'obtenir une thérapie ciblée, ce qui est primordiale dans la lutte contre le cancer pour éviter les effets secondaires délétères des traitements (Ghobrial *et al.*, 2005).

b. Étude de stratégies thérapeutiques dépendantes des nanocorps à l'aide de divers modèles de cancers

Comme évoqué précédemment, divers mécanismes entrent en jeu dans la genèse des cancers, à savoir les altérations génétiques affectant l'expression ou l'intégrité des protéines, modifiant par la suite les voies de transduction du signal impliquées dans la prolifération, la survie, l'angiogenèse, l'invasion et les métastases. Ces cibles diagnostiques représentent aussi des points clé du développement de traitements.

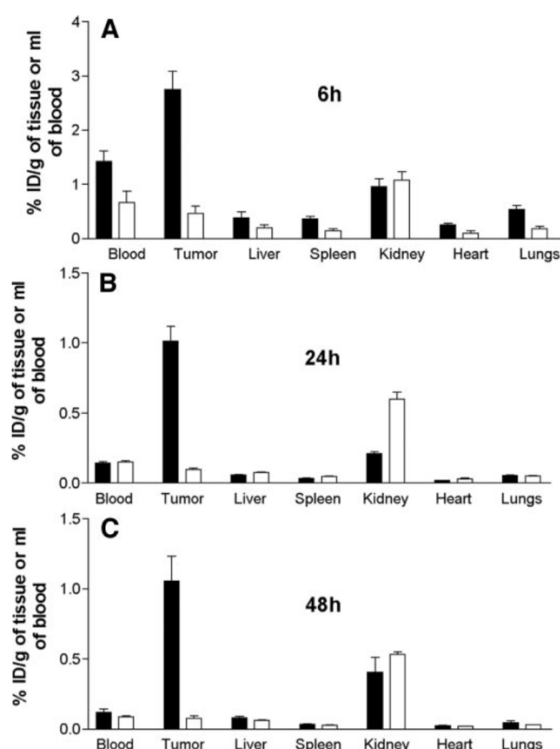
- **Induction de cytotoxicité : les carcinomes**

L'antigène carcinoembryonnaire (CEA) est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire. Cette glycoprotéine est normalement produite dans les tissus gastrointestinaux au cours du développement embryonnaire ; puis ne sont retrouvées qu'à faible dose dans ces tissus à l'âge adulte. Cependant, ces antigènes ont été décelés dans diverses cellules tumorales d'origine

épithéliale, telles que des carcinomes colorectaux, pulmonaires, mammaires et ovariens (Cortez-Retamozo *et al.*, 2002).

Cet antigène assez spécifique des processus tumoraux, peut donc devenir une cible intéressante. Par exemple, Cortez-Retamozo et ses collaborateurs ont réalisé des essais de thérapie ciblée à l'aide de nanocorps couplés à une enzyme, qui sont plutôt encourageants. En effet, après immunisation d'un dromadaire et constitution d'une bibliothèque, quatre anticorps anti-CEA ont été sélectionnés et produits par *E. coli*, les cAb-CEA. L'anticorps disposant des meilleures propriétés a été ensuite couplé à une β -lactamase de *E. cloacae* P99, pour former le cAb-CEA5:: β L. Cette dernière est une enzyme qui catalyse la réaction de conversion de prodrogues à base de céphalosporine en molécules cytotoxiques puissantes. L'étude de sa biodistribution a permis de montrer que le cAb-CEA5:: β L se localisait préférentiellement dans les tumeurs et était naturellement éliminé de la circulation sanguine par clairance rénale, comme en témoignent les diagrammes de sa biodistribution (Figure 46).

Figure 46 : Biodistribution de l'anticorps cAb-CEA5:: β L, d'après (Cortez-Retamozo *et al.*, 2002).



Légende : L'anticorps cAb-CEA5:: β L (noir) et son contrôle (blanc) à 6h, 24h et 48h post-injection chez des souris LS174T ayant subi une xenogreffe.

Enfin, des essais thérapeutiques ont été menés avec l'administration d'une prodrogue la 7-(4-carboxybutanamido) cephalosporin mustard (CCM) aux souris LS174T, qui avaient subi une greffe tumorale par injection sous-cutanée d'adénocarcinome. Ces souris avaient aussi reçu des injections intra-veineuses de cAb-CEA5:: β L à la dose de 1 mg/kg 24h avant l'injection de CCM à différentes doses. Une guérison des tumeurs – mesurant en moyenne 150 mm³ – sans effet toxique avait été observée. Ces résultats laissent entrevoir un avenir prometteur aux thérapies basées sur des nanocorps (Cortez-Retamozo *et al.*, 2004). De même, Wang *et al.* ont démontré que les

nanocorps anti-CEA étaient plus sensibles dans le diagnostic et le traitement du cancer du poumon que des anticorps traditionnels (Wang *et al.*, 2017).

- **Induire la lyse cellulaire : les cancers épidermoïdes**

Des anticorps à chaînes lourdes dirigés contre des récepteurs CD16 des cellules Natural Killer (NK) sont capables de les activer via des interactions biotine/streptavidine. Cette observation permet de produire des anticorps spécifiquement impliqués dans le ciblage et la destruction de tumeur. En effet, il est possible de produire des anticorps par immunisation d'un lama avec une lignée cellulaire spécifique d'un cancer. Un lama a été immunisé avec les cellules humaines A431 d'un cancer épidermoïde, pour en isoler un anticorps (VLA-3) dirigé contre l'intégrine $\alpha 3\beta 1$. Cet anticorps pourra par la suite inhiber la fixation des érythroblastes à la matrice extracellulaire (Wesolowski *et al.*, 2009). En effet, l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est principalement présente dans le compartiment basolatéral des cellules épithéliales et se lie à la laminine 5 qui compose la membrane basale (Groot *et al.*, 2009).

Les récepteurs d'IgG humaines ($Fc\gamma R$) présents à la surface de cellules immunitaires effectrices telles que les lymphocytes B, les cellules NK, les macrophages, les neutrophiles et autres globules blancs, sont classés en trois catégories : $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) et $Fc\gamma RIII$ (CD16). On retrouve deux isoformes de $Fc\gamma RIII$, dont $Fc\gamma RIIIA$ et $Fc\gamma RIIIB$:

- $Fc\gamma RIIIA$ est un récepteur impliqué dans la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), indépendant du système du complément donc, et permettant la lyse de cellules cibles marquées par des anticorps fixés à sa surface,
- $Fc\gamma RIIIB$ est quant à lui ancré dans le feuillet externe de la membrane plasmique de neutrophiles, grâce à un glycolipide, le glycosylphosphatidylinositol (GPI). Il permet la dégranulation et la génération de réactifs intermédiaires de l'oxygène, impliqués dans l'explosion oxydative lors de la phagocytose (Unkeless *et al.*, 1995).

Or, le $Fc\gamma RIII$ (CD16) joue un rôle primordial dans les effets anti-tumoraux des anticorps thérapeutiques. En effet, des anticorps bi-spécifiques (bsAbs) de ce récepteur permettent son recrutement efficace pour cibler et détruire des cellules tumorales, mais ils ne sont pas produits efficacement. Des nanocorps anti- $Fc\gamma RIII$ (le C21 et le C28), sont produits à partir d'un lama immunisé avec des domaines extracellulaires du $Fc\gamma RIIIB$. Ainsi, ces VHH lient des cellules NK $Fc\gamma RIIIA+$ et les polynucléaires $Fc\gamma RIIIB+$, plus précisément le C21 lie un épitope linéaire et le C28 un épitope conformationnel des récepteurs avec un K_d de l'ordre de 10 et 80 nM, respectivement. Ces nanocorps, une fois multimérisés par le biais d'interactions streptavidine/biotine, sont capables de rediriger les cellules NK vers les cellules tumorales et déclencher l'ADCC. Ils offrent une perspective future d'outils polyvalents, possiblement exprimés sous différentes formes et plus sûrs que les anticorps thérapeutiques possédant des Fc, dans la lutte contre le cancer (Behar *et al.*, 2008).

- **Cibler les intermédiaires tumoraux : les mélanomes**

Des publications ont mis en évidence une association d'un taux élevé en leptine circulante avec certains cancers, tels que le cancer de la prostate, celui du sein ou encore le mélanome. Pour rappel, le mélanome est une tumeur maligne du système pigmentaire de la peau : le mélanocyte. Cette implication de la leptine – hormone de la digestion à action anorexigène, produite principalement par les adipocytes – pourrait être expliquée par son caractère mitogène et/ou améliorant l'angiogenèse, mis en évidence *in vitro* (McMurphy *et al.*, 2014).

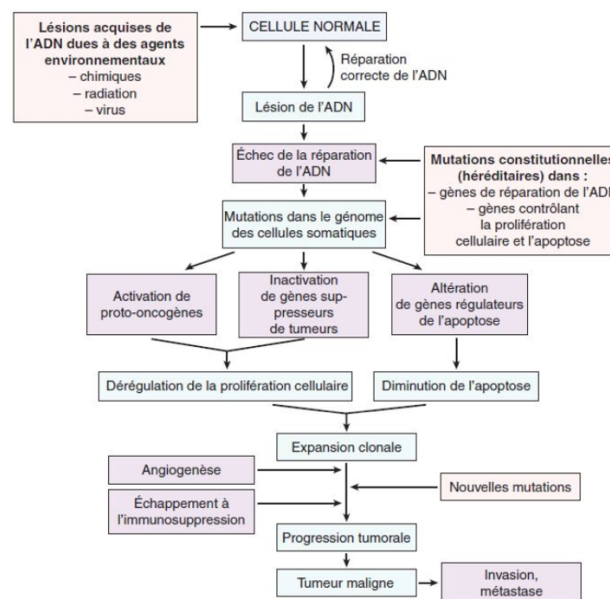
Des travaux précédents mettent en évidence que le fait de vivre dans un environnement enrichi, c'est-à-dire fournissant des stimuli physiques, sociaux et cognitifs aux souris, réduit la croissance tumorale et augmente la rémission dans des modèles murins de mélanome et de cancer du côlon. Mc Murphy *et al.* démontrent ensuite l'implication de l'activation de l'axe neuroendocrinien hypothalamique-adipocytaire (HSA) médié notamment par la leptine dans ce type d'environnement. La leptine apparaît alors comme un intermédiaire intéressant pour inhiber la croissance tumorale, jusqu'à la rémission parfois, dans ce modèle murin de mélanome (Cao *et al.*, 2010 ; McMurphy *et al.*, 2014).

Mc Murphy *et al.* poursuivent en démontrant que l'injection locale et à faible dose de nanocorps ciblant les récepteurs à la leptine (anti-LepR) a permis la réduction de la taille de la masse associée à une diminution de l'angiogenèse, tandis que son injection systémique restait sans effet sur la masse. Par ailleurs, cette administration locale ne compromet pas la régulation du métabolisme médiée par la leptine, alors que son administration systémique par voie intrapéritonéale quotidienne et à forte dose a pour effet une prise de poids, une hyperphagie, associées à une hyperinsulinémie (McMurphy *et al.*, 2014).

- **Limiter le développement et le processus métastatique : l'adénocarcinome mammaire**

La multiplication cellulaire et la formation de métastases est le point d'orgue du développement de cancer. Elle débute par l'acquisition de lésions de l'ADN, par des agents chimiques, des radiations ou encore des virus, qui ne seront pas réparées. Une dérégulation de l'expression génétique s'en suit, avec activation de proto-oncogènes, inactivation de gènes suppresseur de tumeur ou altération de gènes régulateurs de l'apoptose, conduisant à la dérégulation de la prolifération cellulaire et la diminution de l'apoptose et donc à l'expansion clonale jusqu'à l'acquisition de la malignité (Figure 47) (Zheng *et al.*, 2004).

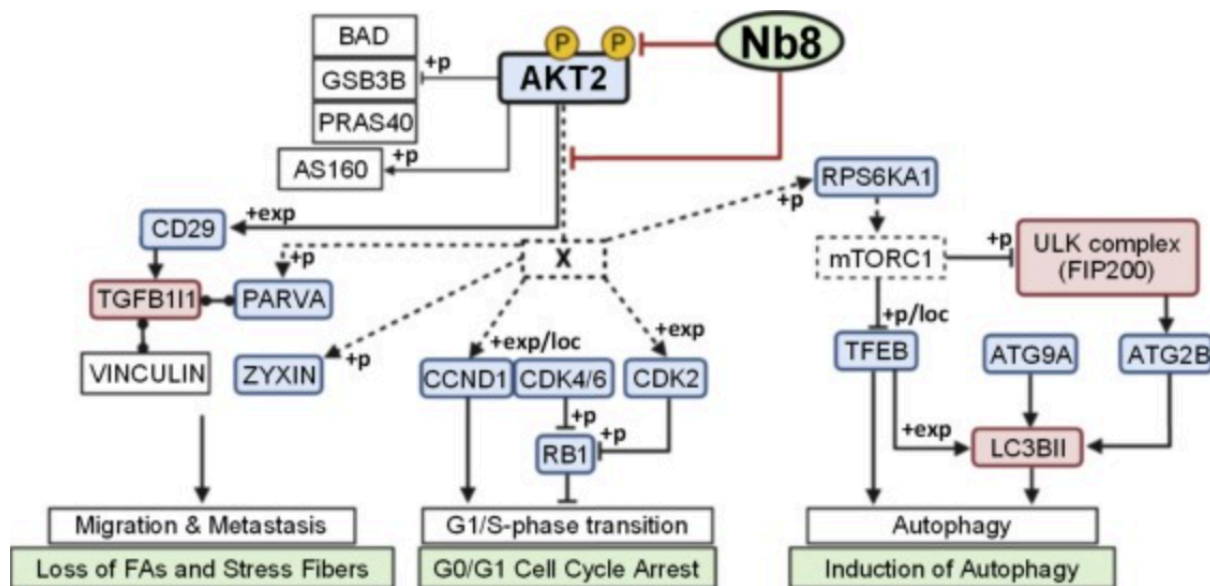
Figure 47 : Genèse d'une cellule cancéreuse d'après le Collège Français des Pathologistes (CoPath).



- Limiter le développement tumoral : bloquer le cycle cellulaire

La famille des kinases AKT représente une cible intéressante dans le traitement du cancer, en raison leur rôle dans les signaux extracellulaires de prolifération, survie, croissance, migration et métabolisme des cellules. La voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-AKT est la plus fréquemment suractivée dans le cancer humain. De multiples aberrations sont généralement retrouvées dans cette voie lors de cancer avec une incidence d'hyperactivation de l'AKT de 50%. C'est pourquoi plusieurs inhibiteurs sont étudiés, mais affectent en général toutes les isoformes d'AKT (AKT1, AKT2, AKT3) qui peuvent avoir des fonctions opposées. En utilisant des nanocorps spécifiques de l'AKT2 (Nb8 et Nb9), Merckaert *et al.* ont pu étudier sa fonction endogène dans le cancer du sein. En effet, ces nanocorps réduisent la viabilité et la prolifération des cellules MDA-MB-231, utilisées comme modèle cellulaire du cancer du sein. Plus précisément, Nb8 réduit la phosphorylation du motif hydrophobe d'AKT2 dans les cellules stimulées par l'IGF-1, il affecte la phosphorylation et les niveaux d'expression de la voie (PI3K)-AKT et induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, une autophagie et des changements dans le cytosquelette (*Figure 48*) (Merckaert *et al.*, 2021).

Figure 48 : Résumé des effets de Nb8 sur la signalisation AKT2 dans le modèle des cellules MDA-MB-231, d'après (Merckaert *et al.*, 2021).



Légende : ligne pointillée, événements qui n'ont pas été détectés dans cette étude, mais qui sont connus pour faire partie de la voie de signalisation AKT ; "X" indique le(s) lien(s) manquant(s) entre AKT et les protéines régulées de manière différentielle ; flèche et une barre en T indiquent des modifications activatrices et inhibitrices, respectivement ; lignes se terminant par des points indiquent une interaction protéine-protéine ; +p = phosphorylation, +exp = expression accrue et loc = effets sur la localisation ; cases blanches, protéines qui ont été détectées mais qui n'étaient pas régulées de manière différentielle ; cases colorées en rouge et en bleu, les protéines détectées dont les niveaux de phosphorylation/expression ont augmenté ou diminué, respectivement. L'effet de Nb8 sur les voies est indiqué dans un encadré vert au bas de la figure.

- Limiter le processus métastatique : action sur le cytosquelette

Un autre aspect dans le traitement de cancer concerne le processus métastatique, et là encore les nanocorps pourraient s'avérer utiles. De nombreuses études se sont intéressées aux protéines liées à l'actine. En effet, le caractère invasif et métastatique d'une tumeur est intimement lié au développement anormal du cytosquelette d'actine de ses cellules constitutives. Cependant, l'apparente redondance du système d'actine avec de nombreuses protéines liées (>100) a ralenti l'avancée des recherches à ce sujet. Parmi ces protéines, les protéines Cap (capping protein) se fixent sur l'extrémité du filament, et dont la CapG a été identifiée comme élément clé, puisqu'elle se lie de manière réversible aux filaments d'actine et permet la motilité ou chimiotaxie cellulaire. La surexpression de la CapG a été mise en évidence dans divers cancers et notamment le cancer du sein, et plus particulièrement dans les marges tumorales, permettant ainsi son expansion et sa dissémination.

Un nanocorps issu de lamas, dirigé contre la CapG humaine a été produit et a permis son inhibition dans les modèles murins expérimentaux. Ces résultats ont permis de démontrer formellement l'implication de la CapG dans le processus de métastases puisque son inhibition a réduit la formation de métastases pulmonaires du cancer du sein. Ce travail pourrait servir là encore de base au développement de nouvelles thérapies (Van Impe *et al.*, 2013).

- **Induire l'apoptose : le cancer du côlon**

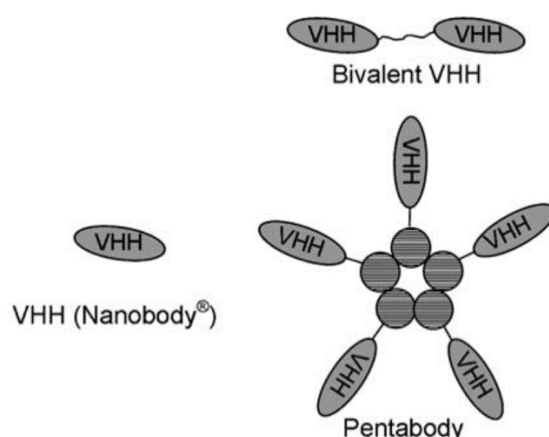
La régulation de l'apoptose dans le développement de thérapie contre le cancer peut s'avérer intéressante, en induisant directement la mort de cellules cancéreuses, ou bien en les sensibilisant aux agents cytotoxiques ou à la radiothérapie. En effet, l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est comme son nom l'indique, un processus de mort cellulaire induit par des signaux intrinsèques ou extrinsèques, afin de contrôler la prolifération cellulaire et de limiter les lésions de l'ADN, qui peuvent survenir au cours d'une division cellulaire.

Des travaux menés sur le TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) et les récepteurs de mort (Death Receptor, DR) de la famille du TNF, le DR4 et DR5, ont permis de démontrer qu'ils pouvaient induire une apoptose rapide dépendante de la caspase dans les cellules cancéreuses lors d'études précliniques. Cependant, comme ils manquent de spécificité dans le ciblage des cellules tumorales, ils étaient à l'origine de graves effets secondaires, tels que des lésions ischémiques et hémorragiques étendues dans plusieurs tissus, ayant conduit à un choc septique et à une insuffisance hépatique fulminante chez certains animaux, possiblement à cause d'une interaction perturbée du Fc avec les récepteurs Fc γ R (Ghobrial *et al.*, 2005).

De plus, des essais cliniques menés sur des patients humains avec certains agonistes de DR5 étaient décevants, car ces anticorps dimériques n'étaient pas assez puissants. S'imposent alors les nanocorps afin de pallier ces problèmes. Ces anticorps ont été générés après immunisation d'un dromadaire, contre les molécules DR5, transmembranaires, retrouvées à la surface des cellules tumorales. Des modèles multivalents ont été adoptés afin d'induire une réponse suffisamment puissante. Le Nb28 oligomérique a été sélectionné et semble induire une signalisation cytoplasmique activant la caspase 3/7, à l'origine de l'apoptose des cellules du cancer du côlon, dans le modèle COLO 205 (Allegra *et al.*, 2018 ; Sadeghnezhad *et al.*, 2019). D'autres nanocorps ont permis de déclencher l'apoptose de cellules tumorales du cancer colorectal *in vitro* (Shaker et Melake, 2012).

L'utilisation de nanocorps pentavalents suggère pour la première fois une corrélation entre la valence et la puissance *in vitro* (Figure 49). En effet, le DR5Nb1 pentavalent possède une plus grande activité que les formes tétravalentes et trivalentes en raison d'une cinétique d'activation des caspases efficace. Cependant, *in vivo*, la plus grande puissance de DR5Nb1-penta ne s'est pas traduite par une plus grande activité antitumorale, ce qui suggère que l'activation de la voie peut atteindre la saturation sans que l'efficacité en soit améliorée. Le taux de réponse totale à un agoniste de DR5 multivalent dans des xénogreffes de tumeurs primaires a été observée dans 59 % dans le cancer colorectal et 36 % dans le cancer du pancréas, et ce lorsqu'il était utilisé comme unique agent. Ces observations suggèrent donc un potentiel intérêt thérapeutique de l'approche de ciblage par nanocorps chez les patients atteints de cancer (Huet *et al.*, 2014).

Figure 49 : Représentation schématique de VHH multimères : bivalent et pentavalent (Harmsen *et al.*, 2009).



Enfin, nous pouvons évoquer la survivine (SVV ou BIRC5) – plus petit membre (16,5 kDa) de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) – qui joue un rôle important lors de la mitose et exerce une fonction cytoprotectrice. D'abord, la SVV se lie aux microtubules du fuseau mitotique pendant la métaphase, l'anaphase et la fin de la télophase, pour supprimer leur dynamique et réduire leur nucléation. Puis, la SVV mitochondriale, qui est libérée lors de l'expression des signaux apoptotiques, exerce aussi un effet cytoprotecteur en inhibant l'activité de l'initiateur caspase-9 et en retenant le facteur inducteur de l'apoptose dans l'espace mitochondrial. La SVV mitochondriale est seulement exprimée dans les cellules tumorales, tandis que la SVV cytosolique est fortement exprimée dans la plupart des types de cancer. Leur expression élevée favorise en outre la migration et l'invasion des cellules tumorales, donc stimule les métastases et implique par conséquent un mauvais pronostic. L'utilisation d'un nanocorps s'annonce là encore prometteuse, puisque le SVVNb8, issu d'alpaga, exprimé dans les cellules HeLa et couplé à diverses étiquettes de délocalisation, permet de modifier la localisation de la SVV et donc perturber sa fonction en limitant sa biodisponibilité locale (Beghein *et al.*, 2016).

c. Les anticorps multivalents

Les nanocorps sont assez facilement modulables du fait de leur plasticité, il est donc possible de créer des anticorps reconnaissant plusieurs sites antigéniques. Comme nous l'avons vu précédemment, la multivalence des nanocorps pourrait permettre d'accroître leur affinité fonctionnelle et donc leur puissance, c'est d'ailleurs dans ce but que la fusion de séquences codantes de nanocorps a été réalisée dans de nombreuses études. Néanmoins, ces fusions

permettant d'accroître l'affinité de ces anticorps, diminuent leur rendement de production (Sadeghnezhad *et al.*, 2019 ; Muyldermans, 2021).

Par ailleurs, ces anticorps polyvalents ou bispécifiques pourraient aussi être utiles pour attirer des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral (TME), classiquement immunosuppresseur. En effet, des anticorps ciblant à la fois un antigène tumoral et des cellules immunitaires pourrait permettre à ces dernières d'accéder aux cellules cancéreuses alors que ça leur est généralement difficile.

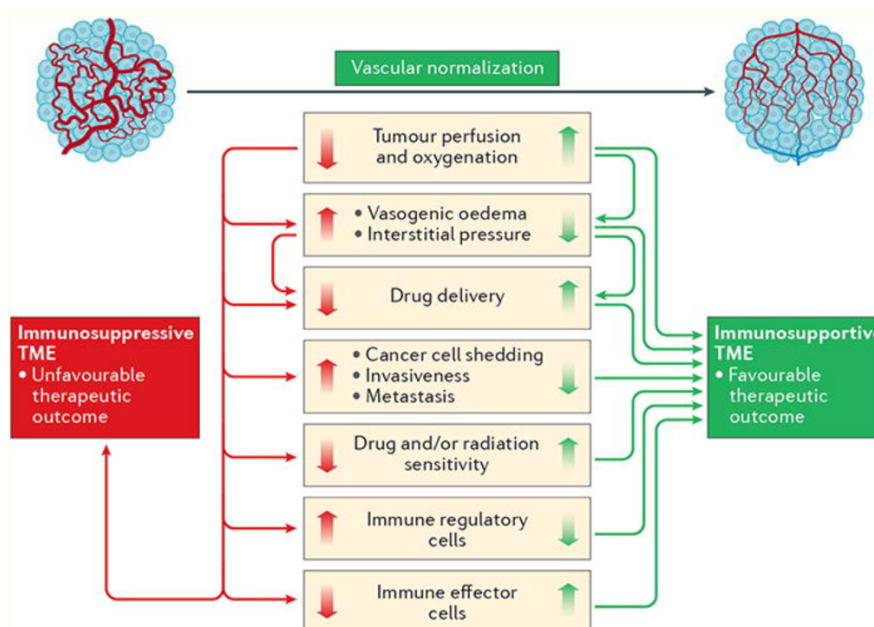
Il est également possible de fusionner l'anticorps thérapeutique avec un second anticorps se liant à l'albumine sérique ou directement en le fusionnant à cette dernière. En effet, l'albumine est une protéine plasmatique majeure avec une très longue demi-vie. Ces constructions bispécifiques présentent ainsi un temps de circulation sanguine plus long, limitant la clairance rénale et permet d'adapter ces molécules à une fonction thérapeutique (Sadeghnezhad *et al.*, 2019).

d. Nouvelles perspectives de traitement

- **Modulation de la vascularisation tumorale**

La vascularisation tumorale et le microenvironnement tumoral (TME) sont des points critiques dans la lutte contre certaines tumeurs solides. En effet, la vascularisation anormale et l'environnement immunosuppresseur autour de la tumeur peuvent être un frein au fonctionnement d'agents thérapeutiques (Fukumura *et al.*, 2018).

Figure 50 : Apports de la normalisation de la vascularisation au sein des tumeurs solides. (Fukumura *et al.*, 2018)



Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est une protéine permettant la création de nouveaux vaisseaux sanguins, vecteurs d'oxygène et de nutriments nécessaires au développement tumoral et est particulièrement impliquée dans ce processus. C'est pourquoi, une thérapie basée sur l'utilisation d'un traitement anti-VEGF permettrait théoriquement de réguler les apports sanguins, dont l'apport d'oxygène – molécule assurant la radiosensibilité et l'immunostimulation – ainsi que les agents thérapeutiques (Fukumura *et al.*, 2018).

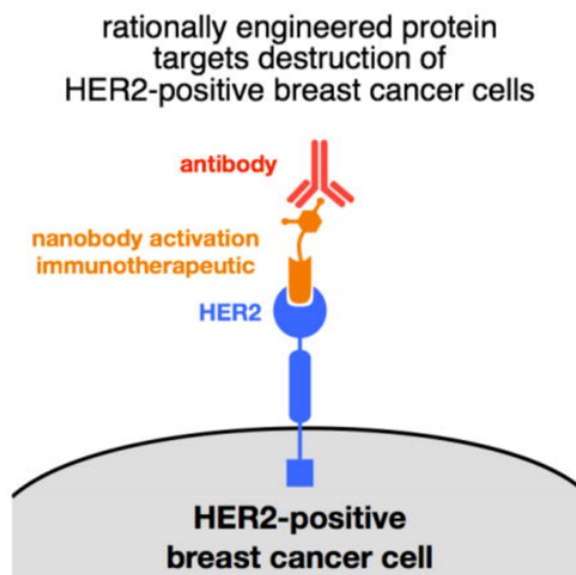
Le récepteur au facteur de croissance endothélial (VEGFR) pourrait être une cible intéressante dans le but de diminuer la néovascularisation tumorale et les processus métastatiques. L'immunisation d'un dromadaire a permis finalement d'obtenir par les méthodes classiques de phage display, un anticorps spécifique de ces VEGF : le ZFR-5 Nb, disposant ainsi de toutes les qualités spécifiques des nanocorps. Ce nouvel anticorps offre alors de nouvelles perspectives dans le développement de thérapies contre les tumeurs solides (Farajpour *et al.*, 2014).

- **Les nanocorps : outils d'immunothérapie**

Les nanocorps peuvent être utilisés afin de déclencher une réponse immunitaire directement dirigée contre la tumeur. Pour cela, ils doivent être comme nous l'avons décrit précédemment, polyvalents pour reconnaître des antigènes tumoraux, tels que le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (human epidermal growth factor receptor 2 ou HER2) – présent à la surface de 20 à 30% des cancers du sein – et posséder un site de fixation à un anticorps endogène, appelé domaine de recrutement d'anticorps (antibody recruiting domain ou ARD). Ce dernier sera ainsi recruté pour cibler spécifiquement les cellules tumorales, d'où vient le terme d'immunothérapie.

Le dinitrophenyl (DNP) est un composé toxique retrouvé dans certains colorants, conservateurs ou pesticides. On estime ainsi que des anticorps anti-DNP sont retrouvés chez les individus exposés à ces composés dans la population générale, à hauteur de 1% des IgG et 0,8% des IgM circulantes. Ces anticorps circulants pourraient être recrutés et redirigés vers des tumeurs pour induire une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps sur des cellules cancéreuses. Par exemple, les cellules HER2+, où HER2 est un récepteur transmembranaire à tyrosine kinase et dont l'augmentation est associée à un pronostic négatif dans le cancer du sein, peuvent être ciblées par l'intermédiaire d'un nanocorps anti-DNP (Figure 51).

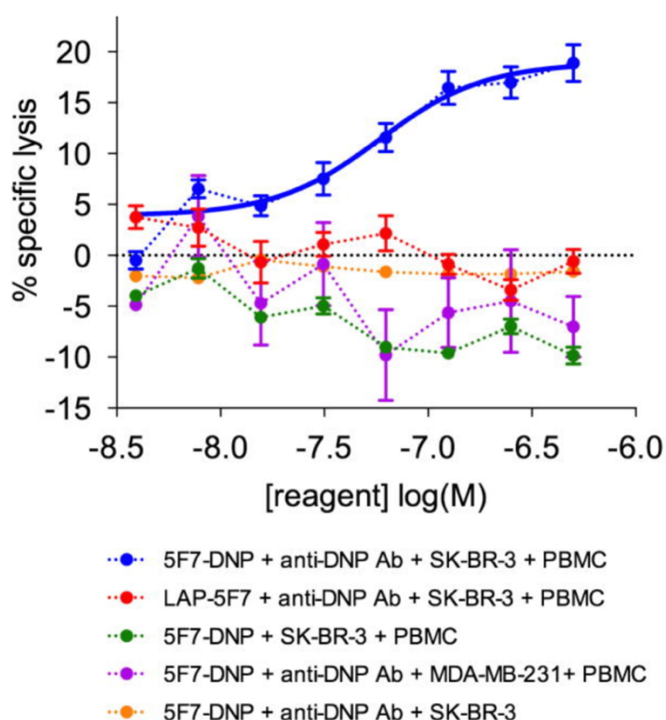
Figure 51 : Utilisation d'un nanocorps d'activation de l'ADCC, d'après (Gray *et al.*, 2016).



Légende : Cellule du cancer du sein HER2+ (récepteur en bleu) ciblée par un nanocorps anti-HER2 (5F7 en orange) qui recrute l'anticorps anti-DNP (en rouge).

Gray *et al.* ont utilisé un nanocorps dérivé de camélidés, le 5F7, qui se lie spécifiquement à HER2, et qui permet de rediriger l'anticorps anti-DNP vers la surface des cellules tumorales, là il sera capable d'induire l'ADCC, grâce aux cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, les macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques). En effet, cette technique d'immunothérapie repose sur l'utilisation d'un nanocorps composé d'un domaine de liaison cellulaire (CBD) se liant sélectivement à la cellule cancéreuse et d'un domaine de recrutement d'anticorps (ARD). Le DNP, un haptène, est utilisé dans ce cas comme ARD et permet de recruter l'anticorps endogène anti-DNP à l'origine de la cytotoxicité ciblée (Figure 52) (Gray *et al.*, 2016).

Figure 52 : Démonstration de l'ADCC induite chez les cellules HER2+, d'après (Gray *et al.*, 2016).



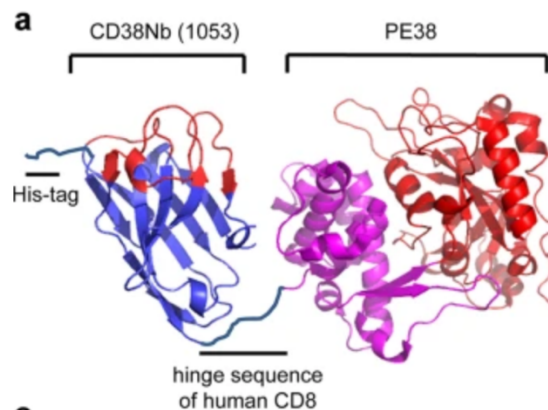
Légende : ADCC des cellules SK-BR-3 à forte expression de HER2 (bleu), mais pas des cellules MB-MDA-231 à faible expression de HER2 (violet), déclenchée par l'immunothérapie DNP-5F7. Absence de toxicité pour les cellules SK-BR-3 : si le nanocorps n'est pas conjugué, LAP-5F7 (rouge), en cas d'absence d'Ac anti-DNP (vert) ou des PBMC (orange).

- **Une immunotoxine contre le myélome multiple**

Le CD38 est une glycoprotéine présente à la surface de nombreuses cellules immunitaires, elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, dont l'adhésion cellulaire, la transduction du signal et la signalisation du calcium. C'est aussi un antigène de surface cellulaire fortement exprimé dans de nombreuses maladies hématologiques, dont le myélome multiple (MM). Cet antigène constitue donc une cible intéressante dans l'immunothérapie ciblée contre cette maladie.

Il est possible de fabriquer des molécules hybrides formées d'un nanocorps et d'une toxine, pour induire une toxicité dirigée spécifiquement contre les lignées cellulaires reconnues par l'anticorps : l'immunotoxine. Celle-ci est fabriquée fusionnant les gènes de l'anticorps souhaité (CD38Nb ou 1053) et de la toxine bactérienne (PE38) – toxine qui présente une cytotoxicité extrêmement sélective contre les cellules dérivées de myélome multiple (*Figure 53*). Après l'épissage de ces gènes, la construction d'un plasmide a été réalisée puis il a été transfecté à des *E.coli* BL21(DE3) afin de produire l'immunotoxine (Ting Li *et al.*, 2016).

Figure 53 : Structure de l'immunotoxine 1053-PE38, d'après (Ting Li *et al.*, 2016, p. 38).



Des immunotoxines de CD38 ont également été construites à partir d'anticorps monoclonaux, tels que HB740 et IB-441, qui montrent une excellente efficacité sur les cellules de myélome multiple et d'autres cellules surexprimant CD38. Or, l'immunotoxine basée sur un nanocorps présente divers avantages par rapport à celles basées sur un anticorps monoclonal, notamment leur simplicité de la production en masse et leur spécificité vis-à-vis du CD38, en témoigne l'absence de cytotoxicité de 1053-PE38 envers les cellules exprimant peu ou pas de CD38. Le 1053-PE38 tue donc sélectivement les cellules du MM et présente une efficacité comparable aux anticorps monoclonaux qui font l'objet d'études cliniques actuellement, tel que le daratumumab de GenMab/Johnson & Johnson38 et le SAR650984 de Sanofi39, en sus de ses divers avantages par rapport à ces derniers (Allegra *et al.*, 2018).

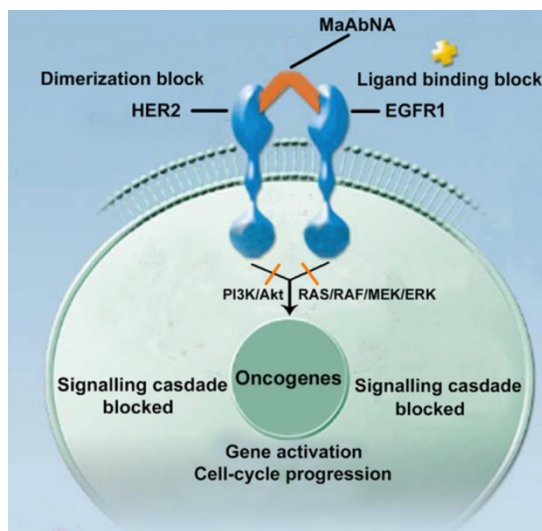
Ainsi, l'élaboration d'immunotoxines basées sur des nanocorps semble très prometteuse grâce à leur polyvalence, la simplicité de leur manipulation, notamment par dimérisation pour améliorer encore leur affinité et prolonger leur durée de vie dans le sérum et d'utilisation. Les nanocorps pourront certainement devenir des protagonistes essentiels dans la lutte contre le cancer, dans un futur proche (Tengfei Li *et al.*, 2016).

- **L'utilisation « d'Affibodies »**

Les nanocorps ne présentent donc, intrinsèquement, pas de propriétés anti-tumorales. Pour pallier cette difficulté, outre les solutions susmentionnées, il est par exemple possible de les coupler à des affibodies, de petites protéines robustes, qui se lient spécifiquement à un grand nombre de protéines. L'anticorps multivalent, composé de nanocorps et d'affibodies, MaAbNA et couplé à l'adriamycine (ADM) a donc été conçu pour répondre à ces attentes. Le MaAbNA est composé d'un nanocorps anti-EGFR1 et de deux affibodies anti-HER2, deux récepteurs du facteur de croissance épidermique (*Figure 54*). D'après les premiers résultats, cette molécule permet effectivement de cibler les cellules

EGFR1+ et/ou HER2+, avec une toxicité minimale pour les cellules EGRF1-/HER2- et les cellules non malignes, ce qui en fait un agent antitumoral potentiel. La conjugaison de nanocorps-affibodies avec l'ADM a permis d'augmenter considérablement sa létalité tumorale sélective, par rapport aux autres thérapies déjà utilisées, comme l'ADM, le Cetuximab et l'Herceptin (Ding *et al.*, 2015).

Figure 54 : Mécanisme d'action du MaAbNA, d'après (Ding *et al.*, 2015).



B. Applications aux maladies inflammatoires

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme contre les blessures ou les infections. L'inflammation aiguë tend à restaurer l'homéostasie, mais si elle persiste et devient chronique, elle est à l'origine de maladies inflammatoires et auto-immunes (Steeland *et al.*, 2016).

a. Les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont donc dues à un dysfonctionnement du système immunitaire, entraînant une réponse inflammatoire aberrante et complexe, avec entre autres des auto-anticorps dirigés contre des molécules du soi. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, l'inflammation chronique affecte les articulations, causant des lésions cartilagineuses et osseuses à l'origine de troubles musculo-squelettiques et donc d'une réduction de la mobilité (Smolen *et al.*, 2016).

Des nanocorps anti-IgG pourraient être intéressants, puisque ces derniers sont impliqués dans les affections auto-immunes. La plasmaphérèse – méthode de purification de sang – couplée à l'utilisation de ces nanocorps anti-IgG permettrait de combattre d'autres maladies, comme le lupus érythémateux systémiques, chef de file des maladies auto-immunes, ou encore la maladie de Goodpasture, où les patients sont déjà traités par hémodialyse (Aggarwal, 2014).

Des enzymes de la famille des ecto-ADP-ribosyltransférases (ART), déjà évoquées, présentes à la surface des cellules sont impliquées dans les mécanismes de l'inflammation et *a fortiori* dans l'apoptose cellulaire ; elles peuvent être ciblées pour en bloquer les mécanismes – qualité recherchée dans le traitement des maladies auto-immunes ou inflammatoires. De même, le CD19, une glycoprotéine transmembranaire de la super famille des immunoglobulines présente à la surface des lymphocytes B, s'avère être une cible intéressante à l'instar du CD20 et CD22, pour

traiter le lymphome de type B et certaines maladies auto-immunes. La production de nanocorps anti-CD19 ou anti-ART laisse donc présager de nouvelles approches thérapeutiques dans la lutte ces maladies et leur développement s'avère être très prometteur puisque certaines molécules chimiques déjà testées à ces fins ne sont pas assez spécifiques de ces enzymes (Wesolowski *et al.*, 2009 ; Banihashemi *et al.*, 2018).

- ***Cibler les récepteurs de molécules pro-inflammatoires***

D'autres acteurs participent à cette réaction immunitaire et représentent des cibles de traitement, comme le TNF α contre lequel un VHH peut être dirigé et utilisé en tant que traitement. En effet, comme décrit précédemment, ce facteur avait déjà été identifié comme cible intéressante de médicaments dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Cependant, ces molécules, souvent à base d'anticorps anti-TNF conventionnel, comme l'infliximab et l'adalimumab, restaient très onéreuses. La construction de molécule bivalente à partir de VHH de lamas permet d'obtenir des agents thérapeutiques plus puissants que les molécules préexistantes et à moindre coût. De plus, un couplage à l'albumine a permis encore d'améliorer ses caractéristiques, en augmentant sa demi-vie et en favorisant son ciblage vers les articulations affectées dans le modèle murin. Diverses applications en immunologie sont ainsi décrites dans la littérature, notamment dans le traitement des maladies auto-immunes (*Tableau 8*) (Aggarwal, 2014).

Tableau 8 : Applications des nanocorps en immunologie, d'après (Aggarwal, 2014).

Nom et composition du nanocorps	Cible et effets thérapeutiques	Essais précliniques	Essais cliniques
<p>ALX-0061</p> <p><i>nanocorps bivalent : Nb monovalent anti-IL6R lié à un Nb anti-HSA pour prolonger sa demi-vie</i></p>	<p>Interleukine (IL)-6, acteur clé des maladies inflammatoires</p> <p>Bloque le récepteur de l'IL-6 (IL6R)</p>	<p>Bons résultats précliniques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Modèle humain d'inflammation induite par IL-6 chez <i>Macaca fascicularis</i> (singes cynomolgus) - Modèle d'arthrite induite par le collagène chez le singe rhesus 	<p>Phase I/II réalisée : innocuité par injection IV</p> <p>Phase IIa sur des patients atteints de PR active : bons résultats</p> <p>Phase IIb : en cours sur la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le lupus érythémateux disséminé (LED)</p>
<p>ATN-103</p> <p><i>(ozoralizumab) : Nb humanisé, trivalent (deux Nb anti-TNF et un Nb anti-HSA) et bispécifique</i></p>	<p>TNF</p>	<p>Modèle de souris transgéniques de polyarthrite : réduit les scores cliniques et inverse la pathologie</p>	<p>Premier essai chez des volontaires japonais masculins : innocuité par injection SC ou IV</p> <p>Phase I/II réalisée sur des patients atteints de PR : rémission DAS28 chez 38% et réponse EULAR chez 97% des patients *</p>
<p>ATN-102 : forme PEGylée de l'ATN-103</p>			
<p>ALX-0761 : Nb trivalent</p>	<p>Cible les acteurs pro-inflammatoires important IL17A et IL17F et l'HSA</p>	<p>Modèle de PR chez le singe cynomolgus : amélioration de la qualité de vie</p>	<p>Phase Ia sur des volontaires sains validée</p> <p>Phase Ib sur des patients atteints de psoriasis en cours</p>
<p>ALX-0962</p> <p><i>bispécifique : Nb anti-IgE monovalent couplé à un Nb liant l'HSA</i></p>	<p>IgE principales actrices des réactions allergiques et donc dans l'asthme allergique</p> <p>Ce Nb est cinq fois plus efficace dans la neutralisation des IgE que l'Ac omalizumab</p>	<p>Etudes initiées en 2013 non poursuivies pour des raisons de concurrence</p>	

***Dans la polyarthrite rhumatoïde, l'activité inflammatoire ne peut être mesurée par une seule variable. Deux variables ont été élaborées : le Disease Activity Score (DAS) basé sur l'état des articulations sensibles, la réponse à la phase aiguë et l'état de santé général et les critères de réponse individuelle EULAR (European League Against Rheumatism). Le DAS28 est le score le plus utilisé et permet donc d'une part l'évaluation du statut du patient, et d'autre part l'analyse de la réponse EULAR. La prise en charge thérapeutique des patients PR se base actuellement sur l'obtention d'une réponse au plus tard à 3 mois et l'atteinte de l'objectif au plus tard à 6 mois (Gaujoux-Viala, 2017).**

- **Les récepteurs au TNF**

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) regroupent une famille de maladies inflammatoires à l'origine de troubles gastro-intestinaux chroniques, telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, avec une prévalence actuelle non négligeable de 2/1000 dans le monde occidental. A l'instar des autres maladies inflammatoires, le TNF α serait responsable de nombreux signes cliniques de ces affections. Le traitement systémique avec l'infliximab reste limité en raison de nombreux effets secondaires et d'un coût assez élevé. Pour limiter les effets indésirables des traitements administrés par voie systémique une des solutions serait de délivrer ces molécules localement, avec une administration par voie orale donc. Or, du fait de leur stabilité face à des conditions extrêmes, les nanocorps présentent une résistance aux pepsines gastriques et leur permet d'être administré per os, afin d'améliorer la fonction gastrique et de traiter les maladies gastro-intestinales. C'est pourquoi une souche de *Lactococcus lactis* a été génétiquement modifiée pour exprimer des nanocorps anti-TNF bivalents, afin de répondre à ces attentes (Vandenbroucke *et al.*, 2010 ; Hussack *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2021).

Néanmoins, des effets indésirables persistent avec l'utilisation d'anti-TNF, car les molécules interférant avec tous les récepteurs TNF, i.e. le TNFR1 et le TNFR2, qui sont respectivement responsables de la signalisation pro-inflammatoire et de fonctions immunomodulatrices. C'est pourquoi, diverses études tentent d'élucider précisément l'implication de chacun de ces deux récepteurs dans les voies de signalisation de divers processus pathologiques, afin de les cibler particulièrement (ANNEXE 2) (Gough et Myles, 2020). L'abolition du signal initié par les TNFR2 entraîne par exemple des effets indésirables. Le nanocorps biparatopique trivalent lié à un nanocorps de liaison à l'albumine (TROS) a été développé pour entrer en compétition avec le TNF uniquement sur le TNFR1 pour répondre à cette problématique (Coppieters *et al.*, 2006 ; Aggarwal, 2014).

Dans le modèle de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale murine (EAE), TROS a été testé chez des souris transgéniques. L'EAE permet la modélisation de la sclérose en plaque (SEP) chez l'homme. Après avoir démontré la biodistribution de TROS, notamment avec le passage de la BHE chez ces souris, l'administration prophylactique de ce nanocorps a permis de retarder considérablement l'apparition de la maladie et d'améliorer les symptômes. Son administration au début de la maladie a réduit l'inflammation de la moelle épinière et a préservé la myéline et les neurones. Ces données permettent de mettre en évidence que le TNFR1 est une cible thérapeutique intéressante dans la SEP, tandis que TNFR2 joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie immunitaire dans l'environnement du SNC. Ainsi, les nanocorps apportent une solution intéressante à développer pour cibler spécifiquement le TNFR1 et avec une demi-vie supérieure à celle obtenue avec des anticorps monoclonaux (Gough et Myles, 2020).

- **Les récepteurs des chimiokines**

Les chimiokines et leurs récepteurs sont aussi impliqués dans le développement des maladies inflammatoires. Leur blocage représente ainsi une alternative intéressante, notamment pour la lutte contre l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), la SEP, la PA et les MICI. Les chimiokines fournissent des signaux directionnels pour la migration des leucocytes et la colonisation des tissus. Le récepteur couplé à la protéine G de l'IL-8, le GPCR CXCR2, le plus répandu de tous, représente une cible de choix. L'interférence avec ses fonctions a démontré différents effets dans le poumon notamment, avec l'inhibition de lésions pulmonaires induites par les neutrophiles, de l'hyperplasie des cellules caliciformes induite par des antigènes ou substances irritante – à l'origine d'une hypersécrétion de mucus et du rétrécissement des voies aériennes – et le dépôt de collagène causé par les lésions pulmonaires (Chapman *et al.*, 2009). Un nanocorps biparatopique dirigé contre ce dernier a d'ailleurs été développé et agit comme un agoniste inverse, il produit donc l'effet inverse en se fixant sur deux épitopes distincts et normalement inaccessibles pour les molécules médicamenteuses classiques. Ce nanocorps s'avère être un outil puissant, sélectif et efficace pour l'inhibition du CXCR2 (Bradley *et al.*, 2015 ; Steeland *et al.*, 2016).

Depuis de nouveaux nanocorps ciblant les domaines extracellulaires de CXCR4, ACKR3/CXCR, US28, ChemR2 ou mGluR2 ont été identifiés et développés, et plusieurs brevets décrivant des nanocorps contre plusieurs RCPG ont également été déposés. La plupart de ces études soulignent que les nanocorps bivalents montrent des effets agonistes inverses, contrairement aux nanocorps monovalents. Outre ces nanocorps à liaison extracellulaire, il est aussi possible de développer des nanocorps à liaison intracellulaire, avec l'utilisation « d'intrabodies » déjà évoqués. Le potentiel d'utilisation des nanocorps thérapeutiques ciblant les RCPG doit cependant encore être développé (Heukers *et al.*, 2019).

b. Le syndrome à réponse inflammatoire systémique

Pour aller plus loin, les nanocorps pourraient trouver de nouvelles fonctions dans le cas de syndrome à réponse inflammatoire systémique (SIRS), qui résulte d'une réponse inflammatoire incontrôlée. Lors de cette condition, l'équilibre entre les signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est rompu et si celle-ci est accompagnée d'une infection, elle est qualifiée de septicémie. C'est alors que des agents ciblant la cascade de l'inflammation, notamment les cytokines, s'avèrent utiles, mais aussi, les GPRC, qui sont exprimés dans de nombreuses cellules et impliqués dans bon nombres de maladies inflammatoires. Leur structure, ainsi que leur rôle ont déjà été étudiés, mais le développement d'agents thérapeutiques reste limité. Aussi, la recherche sur les VHH appliquée à ces derniers laisse entrevoir de nouvelles possibilités (Steeland *et al.*, 2016).

C. Développement de vaccins

Les stratégies actuelles ne sont pas toujours pleinement satisfaisantes pour gérer des épidémies ou des risques biologiques. De nouvelles approches se développent alors. A l'instar des anticorps conventionnels, les nanocorps peuvent être utilisés pour la fabrication de nouveaux vaccins.

a. VHH et vaccins

Le premier exemple de stratégie vaccinale insuffisante et le plus pertinent est peut-être celui de la grippe. En effet, les virus de la grippe provoquent chaque année des épidémies saisonnières et des pandémies occasionnelles. Des vaccins existent pourtant, mais la grande diversité des protéines de l'enveloppe virale, comme l'hémagglutinine (HA), permet aux virus d'échapper à l'immunité de l'hôte.

Les nouvelles immunothérapies qui se développent actuellement à base de VHH devront permettre d'obtenir des anticorps neutralisants à large spectre pour contrôler les différents virus mutants. Des anticorps tétravalents ont été créés à partir de VHH (MDAb pour multidomain antibody) pour neutraliser les virus de la grippe A et B. L'anticorps multidomaine MD3606 protège effectivement d'une infection avec le virus A et B, dans un modèle murin, lorsqu'il est administré par voie intraveineuse ou à partir d'un vecteur viral adéno-associé recombinant. Ces anticorps permettent d'obtenir une réaction croisée avec les hémagglutinines des virus de la grippe A et B, en raison de la présence d'épitopes hautement conservés. Ces résultats suggèrent que des stratégies efficaces contre les agents pathogènes hautement variables utilisant les nanocorps existent et sont encore à développer pour la prévention de futures pandémies (Laursen *et al.*, 2018).

Un autre exemple de la nécessité de développer de nouvelles stratégies basées sur des nanocorps concerne la ricine. La ricine est une toxine, membre de la famille des protéines d'inactivation du ribosome (RIP) de type II végétales et bactériennes. La sous-unité A catalytique de la ricine (RTA), une N-glycosidase d'ARN, a été étudiée pour en déterminer sa structure cristalline, afin de développer un vaccin recombinant à base de sous-unité de toxine ricine. Cependant, comme il manquait toujours des données concernant les épitopes de RTA, des VHH issus d'alpagas spécifiques de la toxine et non neutralisants ont été utilisés. Dans l'étude de Rudolph *et al.*, cinq VHH, utilisés comme chaperons de cristallisation, ont permis d'obtenir la structure cristalline aux rayons X des épitopes. Ces VHH se sont fixés sur différents épitopes se chevauchant, mais aucun n'est entré en contact direct avec les résidus impliqués dans l'activité enzymatique de RTA ou n'a induit de changement allostérique dans la sous-unité de la toxine. Ces différents VHH ont eu des interactions spécifiques avec la toxine, en particulier du fait des tailles variables de leur CDR3. Ces données donnent des informations précieuses pour la conception de vaccins efficaces contre la toxine et notamment concernant les mécanismes de sa neutralisation. La ricine est considérée comme agent de menace biologique et le vaccin serait principalement à destination du personnel militaire et aux civils à risque, comme les agents de laboratoire ou les intervenants en cas d'incidents de bioterrorisme (Rudolph *et al.*, 2014).

Enfin, dans plusieurs études sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les VHH sont prometteurs comme agents de diagnostic, d'imagerie, dans la conception de vaccin ou de microbicides. Des nanocorps bivalents neutralisants spécifiques des protéines gp120 et gp41, de l'enveloppe du VIH-1 ont été développés. Ils en sont pour l'heure au stade des essais précliniques, mais ont des perspectives similaires d'application à l'immunothérapie et à la prévention (Weiss et Verrips, 2019).

b. Vaccins à assemblage moléculaire

Certains antigènes présentent une immunogénicité élevée, et ce dès la première exposition, en raison de leur caractère multimérique, c'est-à-dire un degré élevé de répétitivité. Par exemple, la lumazine synthase de *Brucella abortus* (BLS) s'assemble spontanément en pentamères et décimères. De la même manière, le principe d'assemblage moléculaire peut permettre d'accroître l'efficacité de vaccin en augmentant l'immunogénicité de l'antigène. Actuellement des nanocorps spécifiques de la lumazine synthase sont développés pour interférer avec la biosynthèse de la xavine dans les cellules de *Brucella* (Laplagne *et al.*, 2004 ; Wesolowski *et al.*, 2009).

c. De nouveaux protocoles vaccinaux

Comme la majorité des agents pathogènes pénètre dans l'organisme par le biais des muqueuses respiratoires, gastro-intestinales et urogénitales, de nouvelles approches sont actuellement à l'étude, telle que la vaccination intranasale pour des virus à tropisme respiratoire ou encore le ciblage d'une muqueuse pour les agents pathogènes entériques. Jusqu'alors l'administration de vaccins sous-unitaires par voie orale ne permet qu'une faible absorption et un transport inefficace jusqu'à l'épithélium intestinal, à l'origine d'une faible réponse immunitaire. De plus, ces derniers présentent aussi plus de risques, donc seuls quelques vaccins de ce type ont pu être homologués (Bakshi *et al.*, 2020). C'est pourquoi de nouveaux vaccins pourraient voir le jour, à base de nanocorps gastrorésistants, puisqu'ils conservent leurs propriétés neutralisantes après aérosolisation, lyophilisation et traitement thermique pour être instillés directement au site d'infection par inhalation (Bessalah *et al.*, 2021).

D. Application aux infections : les nanocorps, une solution aux problèmes de santé publique ?

Comme évoqué lors du chapitre précédent, le développement des thérapies utilisant les nanocorps semble être aujourd'hui incontournable, compte tenu des excellents résultats préliminaires obtenus (Tableau 9).

Tableau 9 : Application des nanocorps aux infections, d'après (Wesolowski *et al.*, 2009).

Target	Application	Source of sdAb
<i>Toxins</i>		
Salmonella SpvB toxin	Neutralization	Immune llama
Cholera toxin, staphylococcus enterotoxin A, ricin, botulinum neurotoxin A	Biosensor	Non-immune llama and non-immune shark
LPS	Depletion of endotoxin	Non-immune llama
Scorpion toxin	Neutralization	Immune camel and dromedary
Scorpion/conus toxins	Neutralization	Immune shark
Alpha-cobrotoxin	Antivenom development	Non-immune llama
Mycotoxin	Detecting toxin contamination	Immune llama
<i>Viruses</i>		
HIV env	Neutralization	Immune llama
Rotavirus, gp6	Absorption of virus on lactobacillus	Immune llama
FMDV	Neutralization	Immune llama
Hepatitis B	Blocking virus secretion	Immune llama
Lactococcus phage receptor binding protein	Protect milk fermentation	Immune llama
Porcine retrovirus	Neutralize endogenous retrovirus in transgenic pigs	Immune llama
Marburg virus	Biosensor/diagnosis	Non-immune llama
<i>Bacteria</i>		
Streptococcus mutans	Reduce dental caries	Immune llama
<i>E. coli</i> F4 fimbriae	Treat pig diarrhea	Immune llama
EspI:EpsJ pseudopilin	Chaperone assisted crystallography	Immune llama
GspD secretin	Chaperone assisted crystallography	Immune llama
β -lactamase	Antibiotic enhancement	Immune dromedary
<i>Parasites</i>		
Variable surface glycoprotein (oligomannose)	Trypanosome drug delivery	Immune dromedary
Trans-sialidase	Trypanosomiasis diagnosis	Immune llama
Trypanosomes	Infectome tools	Immune dromedary
AMA1	Malaria diagnosis	Immune shark
<i>Taenia solium</i>	Tapeworm diagnosis	Immune dromedary

a. Des nanocorps neutralisants dirigés contre des virus

L'immunisation passive est une technique intéressante au service de la lutte contre les maladies virales. Elle consiste en l'administration directe d'anticorps chez un sujet et permet sa protection immédiate contre l'agent en question et ce durant quelques semaines. Des nanocorps neutralisants des souches H5N1 ou H5N2 administrés par voie intranasale pourraient être utilisés pour protéger d'une infection contre ces virus de la grippe. En effet, certains nanocorps empêchent l'attachement du virus aux cellules hôtes et donc sa réplication virale dans un modèle murin. De même, pour le virus de l'hépatite C (VHC), le nanocorps D03, issu de l'immunisation d'alpaga, a prouvé son efficacité en empêchant l'entrée du virus dans les cellules hépatiques et leur réplication entre cellules (Tarr *et al.*, 2013 ; Tillib *et al.*, 2013).

b. Étude de nanocorps multivalents contre des infections virales

Pour améliorer la prévention contre des infections virales et apporter une protection croisée, le ciblage de plusieurs épitopes viraux est nécessaire. Trois virus enveloppés à ARN à l'origine d'infections humaines graves ont été étudiés : le virus respiratoire syncytial (VRS), le virus de la rage (Lyssavirus) et le virus de la grippe aviaire (H5N1). Les virus enveloppés disposent de glycoprotéines virales permettant leur fusion avec les membranes cellulaires pour faciliter leur entrée dans les cellules cibles. Des VHH ont été sélectionnés à partir de bibliothèques immunitaires dérivées de lamas par la technique de « phage display » et sont capables de reconnaître différents épitopes dans les sites de liaison des récepteurs – la protéine de fusion F du VRS, la glycoprotéine G du Lyssavirus et l'hémagglutinine 5 du virus H5N1. Grâce à la flexibilité de manipulation des VHH, il a été possible d'obtenir des molécules antivirales multivalentes offrant des résultats de neutralisation jusqu'à 4 000 fois supérieurs à ceux des VHH monovalents et des capacités de neutralisation élargies permettant probablement d'éviter que le virus n'y échappe (Hultberg *et al.*, 2011).

c. Cas d'épizootie

La foot-and-mouth disease (FMD) ou fièvre aphteuse, est une maladie virale, hautement contagieuse, affectant particulièrement les animaux aux sabots fendus – bovins, porcins et ovins – sévissant jusque dans les années 2000 en Europe. Elle est due à un aphtovirus de la famille des Picornaviridae, le FMDV. Cette maladie n'est généralement pas mortelle pour les adultes, mais l'est pour les jeunes qui développent des myocardites, elle entraîne des lésions des muqueuses, sous forme d'aphte, une hyperthermie transitoire, une perte de poids et donc entraîne d'importantes baisses de production, et des pertes économiques sans précédents. Elle représente un fléau pour l'élevage et est donc soumise à une réglementation stricte et une prise en charge par l'état. Elle n'est cependant pas directement transmissible à l'homme, mais il en est souvent vecteur lors d'infection de cheptels (Streltsov *et al.*, 2011).

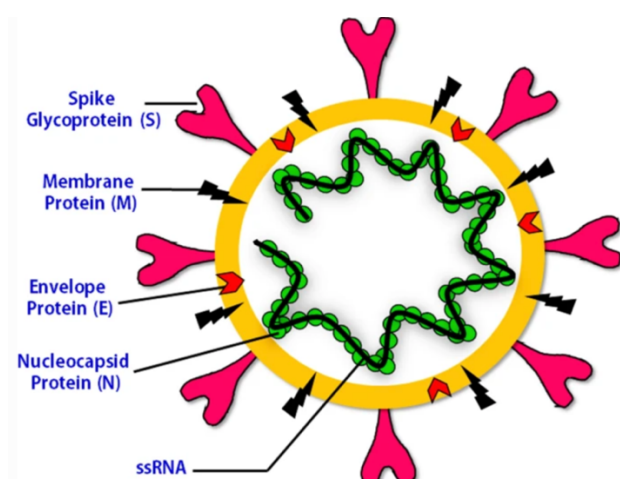
Une étude a permis de démontrer que l'utilisation de fragments d'anticorps à domaine unique issus de lamas pourrait réduire significativement la virémie chez des cochons infectés. En effet, la sélection de fragments d'anticorps de lamas spécifiques du FMDV et recombinés à une immunoglobuline porcine (pIg) aboutissent à la formation d'un anticorps (VHH2) avec une demi-vie compatible avec une immunisation. Une injection intramusculaire à des porcs a permis de vérifier leur potentiel thérapeutique *in vivo*. En effet, les cochons ont été infectés 24 heures plus tard par le FMDV et ont développé une virémie moins importante que ceux non immunisés ; bien que ces résultats soient en faveur d'une immunisation contre la FMD, elle n'a pas permis d'éviter le développement de signes cliniques, ni l'absence de transmission de la maladie. Des études complémentaires seront nécessaires pour obtenir des résultats satisfaisants pour avoir un réel intérêt dans la lutte contre la fièvre aphteuse sur le terrain (Harmsen *et al.*, 2008).

d. Espoirs pour la pandémie de COVID-19

L'infection au coronavirus 2019 (COVID-19) a été signalée dans plus de 200 pays dans le monde et se propage rapidement depuis son apparition à Wuhan, en Chine, en décembre 2019. Le virus incriminé, le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2), appartenant à la famille des Coronaviridae, du genre beta-CoV, était responsable de plus d'un million de décès dans le monde un an seulement après sa découverte, en décembre 2020 (Lu *et al.*, 2020).

Ce virus à ARN enveloppé, simple brin, possède un génome d'environ 30 kilobases codant pour quatre protéines structurales dénommées pointe (S), enveloppe (E), membrane (M) et capsid nucléaire (N) (*Figure 55*). La protéine S possède un rôle déterminant dans l'attachement, la fusion et l'entrée du virus dans les cellules cibles. Elle possède deux sous-unités, d'abord S1 qui possède un domaine de liaison de grande affinité au récepteur de sa cellule cible (receptor-binding domain, RBD) de l'enzyme de conversion à l'angiotensine 2 (ACE2), puis S2 qui assure la fusion des membranes cellulaires et virales, afin de libérer l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule cible. Ces deux sous-unités permettent donc la survie et la réplication rapide du virus, induisant ainsi une réponse inflammatoire et une accumulation de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Bessalah *et al.*, 2021).

Figure 55 : Schéma de la structure du SARS-CoV-2, d'après (Mishra *et al.*, 2020).



Les facteurs environnementaux pourraient avoir un effet sur la circulation du virus, tels qu'une température et une humidité relative plus élevées semblent diminuer la propagation du virus (Alkhowailed *et al.*, 2020). Tandis que l'immunité protectrice de la population pourraient la bloquer. En effet, Vashishtha et Kumar, estiment qu'il faudrait atteindre environ 67% d'immunité au sein de la population (Vashishtha et Kumar, 2021). Aussi, c'est pourquoi nous pouvons supposer que la pandémie de COVID-19 évoluera par vagues dans les prochaines années, jusqu'à ce que l'immunité collective se renforce (Bessalah *et al.*, 2021).

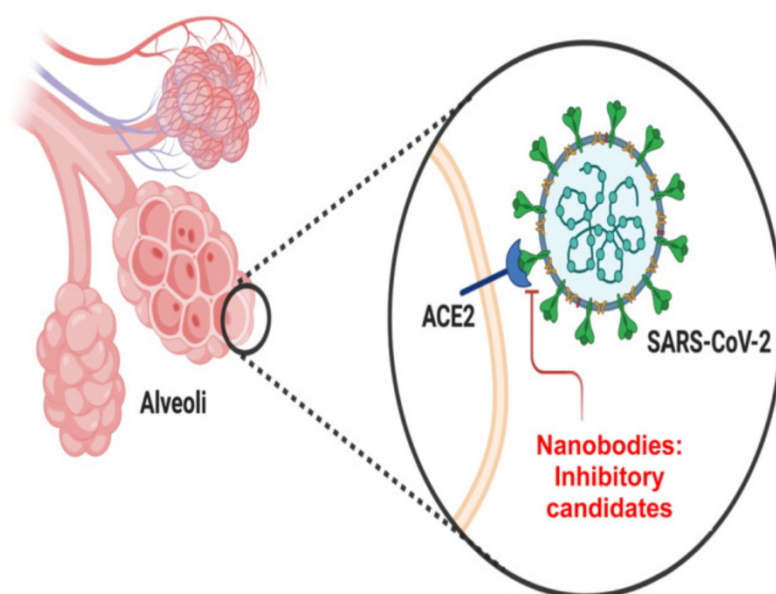
Les symptômes du SARS-CoV-2, peuvent être absents – individus asymptomatiques – ou allant de la fièvre, de la toux sèche, de la perte d'odorat ou de goût, de l'essoufflement, d'une détresse respiratoire aiguë jusqu'à parfois la mort du malade, particulièrement chez les personnes âgées, avec un système immunitaire plus faible, ou possédant des comorbidités (Mishra *et al.*, 2020).

D'un point de vue thérapeutique, bien qu'il existe plusieurs stratégies de traitement et de prévention du COVID-19, l'épidémie fait encore rage à l'heure actuelle et l'immunothérapie passive utilisant des anticorps à domaine unique pourrait s'avérer fort intéressante (Bessalah *et al.*, 2021). En effet, pour le moment, des médicaments antiviraux sont encore à l'étude. Parmi ces derniers, le Remdesivir (GS-5734) par exemple, analogue de l'adénosine pourrait bloquer la réplication de l'ARN viral – prodrogue du GS-441524 parfois utilisé dans le traitement de la Péritonite Infectieuse Féline (PIF), chez le chat, causée par un coronavirus félin – comme démontré précédemment avec le SARS (Sheahan *et al.*, 2017). Des anticorps neutralisants sont aussi à l'étude, notamment des anticorps monoclonaux humains (mAbs) ont été isolés et caractérisés (Renn *et al.*, 2020).

En effet, des anticorps monoclonaux humains avaient déjà été à l'étude lors des précédentes épidémies dues aux coronavirus. Ils représentent un secteur important et de croissance rapide au sein de l'industrie pharmaceutique. Malgré tout, leur utilisation thérapeutique s'est vue limitée dans ce contexte d'épidémie, du fait d'un processus de fabrication longs et onéreux dans des systèmes eucaryotes, puisque leur production à grande échelle prend entre 3 et 6 mois (Wu *et al.*, 2020).

Enfin, des nanocorps dirigés contre certains coronavirus, en bloquant leur interaction avec la cellule hôte, ont été isolés et se révèlent être une alternative intéressante aux mAbs (Figure 56). Nous pouvons citer l'anticorps chimérique chameau/humain ciblant le RBD du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) (Stalin Raj *et al.*, 2018). Mais aussi, les nanocorps 2F2, 3F11 et 5F8, capables d'inhiber la fusion des membranes pourraient représenter un avenir dans la prévention de l'infection (Chi *et al.*, 2020).

Figure 56 : Mécanisme potentiel de neutralisation du SRAS-CoV-2 par les nanocorps, d'après (Bessalah *et al.*, 2021).



Légende : Perturbations de l'interaction entre le domaine de liaison au récepteur du SRAS-CoV-2 (couleur verte) et le récepteur de sa cellule hôte (enzyme de conversion de l'angiotensine 2 : ACE2). Les nanocorps se sont liés directement au domaine de liaison au récepteur (RBD) et ont concurrencé le récepteur ACE2 à la surface des cellules humaines.

D'autres anticorps encore, dirigés contre les protéines spike du MERS-CoV présentent une activité de réactions croisées avec une affinité élevée pour les RBD des SARS-CoV 1 et 2 (Hanke *et al.*, 2020). De nouveaux nanocorps sont développés sur la base des précédents travaux, et notamment grâce à l'ingénierie assistée par ordinateur, Dong *et al.* ont pu développer des nanocorps multi-spécifiques fusionnés à des domaines Fc d'IgG1 humaines. Ces nanocorps tri-spécifiques admettent ainsi un site de liaison S1, un blocage S1/ACE2 et une neutralisation du pseudovirus SARS-CoV-2, et s'avèrent être plus puissants que leurs homologues bi-spécifiques, monoclonaux individuels ou en combinaison (Dong *et al.*, 2020). Les exemples, nombreux et variés peuvent être rassemblés dans le tableau ci-après (Tableau 10).

Tableau 10 : Études publiées portant sur les nanocorps dirigés contre certains épitopes du coronavirus.

<i>Nanocorps étudiés</i>	<i>Cibles</i>	<i>Réponses induites</i>	<i>Références</i>
Ty1	RBD		(Hanke <i>et al.</i> , 2020)
Nanocorps de classe I : Nb6 et Nb11	RBD	Compétition avec le récepteur ACE2 humain	(Schoof <i>et al.</i> , 2020)
Nanocorps de classe II	Protéine de pointe	Modification de la conformation structurelle du RBD, pour éviter de reconnaître le récepteur ACE2	(Schoof <i>et al.</i> , 2020)
Nanocorps H11-D4 et H11-H4 et CR3022	Différents épitopes non chevauchant du RBD	Activité neutralisante du virus	(Huo <i>et al.</i> , 2020)
Nb21, Nb20 et Nb89	Différents épitopes non chevauchant du RBD	Affinité picomolaire et inhibition de l'infection virale pour des concentrations inférieures au ng/mL	(Xiang <i>et al.</i> , 2020)
Nb213 et Nb203 : constructions homotrimériques	Idem	Activité inhibitrice multipliée par 30 avec une CI50 de 1,3 picomolaire et 4,1 picomolaires. Adaptés à l'administration par inhalation	(Xiang <i>et al.</i> , 2020)
NM1226, NM1228 et NM1230	Différents antigènes de spike : RBD, domaine S1 ou spike homotrimérique	Développement d'un test de liaison multiplex compétitif (« NeutrybodyPlex »), activité neutralisante des Nb supérieure à celle des Ac conventionnels. Détection d'Ac neutralisants dans le sérum de patients grâce à ce test.	(Wagner <i>et al.</i> , 2021)
Nb11-59	RBD	Bonne activité neutralisante et stabilité, utilisation possible en traitement inhalé.	(Gai <i>et al.</i> , 2021)
NIH-CoVnb-112	RBD	Bloque l'interaction entre ACE2 et plusieurs formes variantes de la protéine de pointe	(Esparza <i>et al.</i> , 2020)

Au-delà de leurs propriétés antivirales, les nanocorps peuvent permettre une modulation de l'inflammation. De récents rapports mettent en parallèle les réponses immunopathologiques entre le SARS-CoV-2 et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Or l'un des principaux mécanisme du SDRA est l'inflammation systémique incontrôlée – tempête de cytokines – à l'origine de la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (interférons : IFN α et IFN γ ; interleukines : IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-18 et IL-33 ; facteur de nécrose tumorale : TNF α ; facteur de croissance transformant β : TGF β ; etc.) et des chimiokines (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, etc.) par les cellules effectrices du système immunitaire lors de l'infection virale (Shi *et al.*, 2020). C'est pourquoi des inhibiteurs spécifiques de leurs activités pourraient être utilisés pour les infections au SARS-CoV-2 dans les cas les plus graves. Parmi les cibles possibles, nous pouvons établir un tableau reprenant les travaux déjà publiés (*Tableau 11*).

Tableau 11 : Études publiées portant sur les nanocorps permettant de moduler l'inflammation.

<i>Nanocorps étudiés</i>	<i>Cibles</i>	<i>Réponses induites</i>	<i>Références</i>
Nanocorps 13A7	Canal ionique P2X7 des monocytes et cellules T	Inhibition de la libération d'IL-1 β induite par l'ATP	(Danquah <i>et al.</i> , 2016)
	TNF α	Blocage du TNF α impliqué dans divers troubles inflammatoires chroniques	(Coppieters <i>et al.</i> , 2006)
	IL6R et IL23	Traitement de la polyarthrite rhumatoïde	(Desmyter <i>et al.</i> , 2017 ; Bessalah <i>et al.</i> , 2021)
	ART2.2 : ecto-enzyme des cellules T	Blocage de l'activité enzymatique de ART2.2, normalement impliqué dans les inflammations et la mort des cellules	(Koch-Nolte <i>et al.</i> , 2007)
3NB12	CXCL10	Inhibition de la migration des cellules : effets anti-inflammatoire et anti-métastatique	(Sadeghian-Rizi <i>et al.</i> , 2020)
238D2 et 238D4	CXCR4	Activité antirétrovirale contre certaines souches du VIH-1	(Jähnichen <i>et al.</i> , 2010)
	CXCR7	Réduction de la sécrétion de molécules angiogénique chez certaines cellules tumorales	(Maussang <i>et al.</i> , 2013)
CA4910 et CA5183	ChemR23	Antagonisent l'augmentation de calcium intracellulaire induite par la chémérine	(Peyrassol <i>et al.</i> , 2016)
	CCL2, CCL5, CXCL11 et CXCL12	Prévention de la migration des cellules immunitaires	(Blanchetot <i>et al.</i> , 2013)

Enfin, la réponse immunitaire adaptative au SARS-CoV a été analysée pour en comprendre précisément les mécanismes, il en résulte que les cellules T CD4+ favorisent la prolifération d'anticorps neutralisants, tandis que les T CD8+ sont responsables de la destruction des cellules infectées. Ainsi, les nanocorps ciblant des produits du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) – les intégrines (CD11b) et les récepteurs scavenger (CD36) – exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) permettent d'augmenter les réponses immunitaires, puisque ces dernières stimulent la production d'anticorps, activent les cellules T CD4+ et la réponse des T CD8+. L'utilisation de ces VHH ciblant les CPA pourraient permettre de déclencher l'immunité humorale et de suivre l'inflammation pour traiter ou prévenir l'infection par le SARS-CoV-2, à l'instar de la grippe (Duarte *et al.*, 2016 ; Rajaei et Dabbagh, 2020).

e. Protéines oncogènes

Togtema *et al.* rappellent qu'aujourd'hui environ 20% des tumeurs malignes dans le monde seraient associées à une infection virale ou bactérienne persistante. Le potentiel thérapeutique pour plusieurs virus tumoraux a déjà été étudié, comme les virus de l'hépatite B et C (VHB et VHC). D'abord, cinq VHH reconnaissant la protéine d'enveloppe (S), ont été exprimés et retenus dans le réticulum endoplasmique comme intrabodies et ont permis de réduire les taux d'antigènes s de surface (AgHBs) ; ils ainsi ont pu inhiber significativement la sécrétion de virions dans le plasma des souris étudiées. Puis, trois autres VHH ont été étudiés aussi comme « intrabodies » dirigés vers le noyau d'une lignée cellulaire d'hépatocytes transfectés avec le VHB et sont capables d'affecter l'expression et la circulation des antigènes c et e du VHB (AgHBc et AgHBe) (Serruys *et al.*, 2009 ; Serruys *et al.*, 2010).

De nombreuses études ont porté sur les cancers liés au papillomavirus humain 16 (HPV16) et ont révélé la présence d'une oncoprotéine virale (E6), à l'origine de l'oncogenèse. Elle est aussi la cible des vaccins contre le cancer du col de l'utérus utilisés actuellement. Il paraît intéressant de développer de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement cette protéine, afin de limiter les effets indésirables des traitements conventionnels. Les anticorps monoclonaux n'étant pas adaptés à ces fins, c'est tout naturellement que les recherches sont focalisées sur les nanocorps. Trois VHH ont d'ores-et-déjà été isolés à partir de bibliothèques issues de la technique de « phage display » à partir de lamas immunisés. Ces VHH lient l'E6 avec des affinités de l'ordre du nanomolaire et seraient susceptibles d'ouvrir la voie à de nouvelles applications (Togtema *et al.*, 2019).

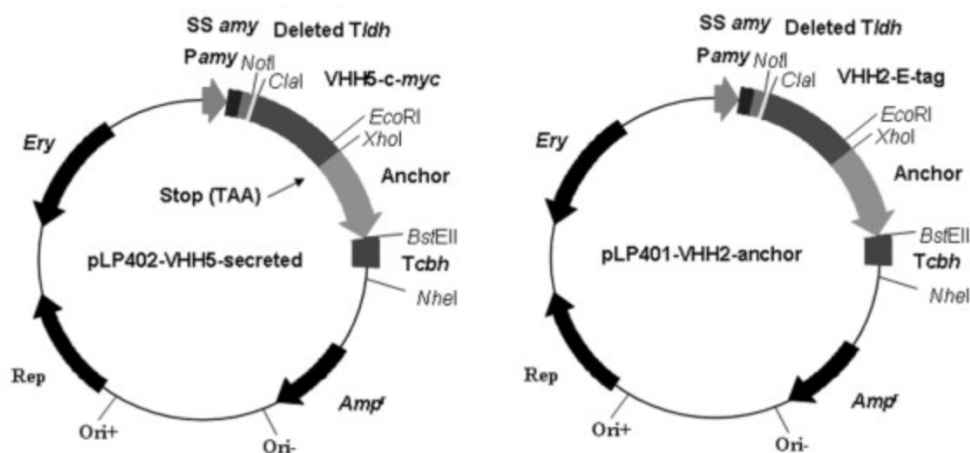
E. Applications industrielles

Dans l'industrie agroalimentaire, plus particulièrement dans la filière laitière, l'utilisation d'anticorps peut aussi être utile. En effet, des lactobacilles (*Lactococcus lactis*) – bactéries gram positives nécessaires dans le processus de fabrication de laits fermentés et de fromages – peuvent être sujettes à des infections par des phages lytiques (Ricagno *et al.*, 2006). Ces bactériophages, comme les autres phages, sont formés d'une tête, renfermant un ADN double brin, et d'une queue, impliquée dans la reconnaissance des cellules hôtes. Ils peuvent être divisés en trois groupes : les phages de type 936, c2 et P335 (Vanlandschoot *et al.*, 2011). Pour inhiber l'infection des lactobacilles, les industriels ont besoin d'agents neutralisants efficaces, simples à produire et à moindre coût.

L'immunisation d'un lama avec un bactériophage p2 (de type 936) et la sélection *in vitro* de ces fragments – capables de reconnaître la queue des phages, donc de neutraliser le phage – ont permis de produire des fragments d'anticorps (VHH5) efficaces dans cette tâche. Leur ajout dans le milieu extracellulaire a permis de diminuer l'infection des bactéries par ces phages. Le fragment

exprimé obtenu a donc été fusionné à l'étiquette c-myc au sein d'un plasmide (pLP401) pour être produit en solution directement par les lactobacilles (*L. paracasei*). De plus, il a été combiné à un deuxième fragment (VHH2) sécrété pour être ancré dans la paroi bactérienne et potentiellement améliorer la résistance des bactéries face aux phages (Figure 57) (Hultberg *et al.*, 2007).

Figure 57 : Cartographie de plasmides de Lactobacilles permettant l'expression de VHH5 et VHH2, d'après (Hultberg *et al.*, 2007).



Il a été démontré, ainsi, que les lactobacilles pouvaient résister à l'infection de certains de phages de type 936, le plus fréquent, via l'expression directe d'agents anti-phages issus de bibliothèques immunitaires de lamas (Hultberg *et al.*, 2007).

Les champignons représentent aussi un fléau dans l'agriculture, plus précisément dans la production de céréales, tant au niveau des cultures, qu'après leur récolte. Effectivement, ces champignons ont la particularité de produire des mycotoxines – métabolites secondaires toxiques – comme les aflatoxines, chez les espèces *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. Il existe plus de 20 types de ces toxines, dont B1, B2, G1 et G2 qui sont présentes naturellement chez ces champignons. B1 est particulièrement intéressante, puisque c'est la plus toxique et est connue pour être cancérigène de classe 1 chez l'homme, soit un des cancérigènes les plus puissants dans la nature. Elle représente ainsi un défi majeur dans la production de céréales, et est soumise à une réglementation stricte qui limite sa présence de 2 à 20 µg/kg de céréales. Or de nombreuses méthodes d'analyse ont été développées pour leur dosage, principalement basées sur des immunodosages. C'est ici, qu'interviennent encore les nanocorps puisqu'ils représentent des réactifs prometteurs pour la nouvelle génération d'immunodosages. Ces immunodosages sont basés sur la fusion d'un nanocorps (clone G8) et d'une petite luciférase – la nanoluciférase (Nluc) – pour former le G8-Nluc utilisé pour détecter l'aflatoxine et améliorer plus de 20 fois la sensibilité de détection, le tout en une seule étape de moins de deux heures (Ren *et al.*, 2019).

F. Développement de médicaments et réactifs

Le développement de divers médicaments innovants a déjà été décrit tout au long de cette thèse, au travers des différentes stratégies possibles. D'autres encore pourraient voir le jour dans le futur. Les nombreuses études en cours sur les nanocorps témoignent des intérêts qu'ils présentent, outre la facilité de leur production, leurs caractéristiques physico-chimiques offrent là encore de nouvelles possibilités. En effet, ces derniers conservent toutes leurs propriétés thérapeutiques après aérosolisation, lyophilisation et traitement thermique. Aussi, il sera possible de les utiliser par voie

orale, du fait de leur stabilité dans le tractus gastro-intestinal ou directement par voie inhalée, ainsi délivré directement à l'organe cible, pour obtenir une haute concentration pulmonaire et *a contrario* une faible concentration systémique, permettant de minimiser les risques d'occurrence de leurs potentiels effets secondaires (Bessalah *et al.*, 2021). Aussi, nous verrons que des modèles similaires, comme l'ALX-0171 contre le virus respiratoire syncytial (VRS), ont d'ailleurs déjà été développés par Ablynx, pour des effets antiviraux en réduisant les symptômes de l'infection chez l'animal, chez qui ils avaient été bien tolérés (Larios Mora *et al.*, 2018). Ainsi, des modèles de nanocorps humanisés pourraient voir le jour à l'avenir, notamment grâce à la présence de résidus de camélidés spécifiques conservés ou «hallmark» (F37, E44, R45 et G47), dans la région cadre 2 (FR2), qui permettent de maintenir solubilité et affinité de liaison à l'antigène des anticorps parentaux (Wu *et al.*, 2020).

a. Virus syncytial respiratoire du nourrisson

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est un Pneumovirus hivernal – virus enveloppé à ARN de la famille des Paramyxoviridae – qui infecte principalement les nourrissons avec un tropisme respiratoire. Il est particulièrement contagieux, ubiquitaire et notamment responsable d'un tiers des décès liés à des infections aiguës des voies respiratoires inférieures chez les enfants de moins d'un an et responsable d'infections graves chez les personnes âgées et immunodéprimées (Heylen *et al.*, 2017).

Afin de lutter contre son infection récurrente, diverses techniques thérapeutiques sont étudiées. L'une d'entre elles repose sur l'utilisation d'anticorps. En effet, divers laboratoires se sont penchés sur le développement de thérapie à base d'anticorps, comme par exemple le palivizumab (Synagis®), un anticorps monoclonal humanisé, mais son efficacité n'a pas pu être démontrée ; tandis que le laboratoire Ablynx vient de réaliser les études de la phase 1 pour son nanocorps administré par inhalation (Heylen *et al.*, 2017).

L'ALX-0171 est un nanocorps trimérique qui se lie au site antigénique II de la protéine F du VRS avec une affinité subnanomolaire, pour en bloquer totalement l'action. Les premières étapes de son étude ont démontré qu'il était plus efficace que le palivizumab, puisqu'il bloque la réplication de 87% des virus contre 18% pour le palivizumab, à concentration fixe. Par ailleurs, il s'est avéré efficace dans la réduction des titres nasaux et pulmonaires dans des modèles de VRS murin en administration prophylactique ou thérapeutique, là où la vaccination a échoué (Steeland *et al.*, 2015).

Là encore, l'utilisation d'un nanocorps plus petit et plus flexible qu'un anticorps traditionnel a pu améliorer l'accessibilité du site antigénique et a fortiori le développement d'un nanocorps multivalent (ALX-0171) a permis d'augmenter encore la puissance de neutralisation, d'environ 6 000 fois, par rapport à son homologue monovalent (Nb017).

Enfin, son administration directe dans les voies respiratoires par nébulisation paraît être un mode d'administration efficace, même à de faibles concentrations, et utile notamment pour les enfants. Les études en cours sur ce nouvel antiviral semblent donc offrir un avenir prometteur aux nanocorps dans la lutte contre le VRS (Detalle *et al.*, 2015).

b. Contrôle de l'agrégation plaquettaire

L'hémostase correspond à une succession d'événements à l'échelle cellulaire, permettant l'arrêt d'un saignement lors d'une brèche à la faveur d'une blessure, d'un choc ou d'une chirurgie. Cette cascade de la coagulation permet notamment la formation d'un caillot plaquettaire, sous l'action de

différents acteurs tels que le fibrinogène et le facteur de von Willebrand (vWF), une grande glycoprotéine multimérique. Parmi les troubles héréditaires de la coagulation on retrouve l'hémophilie – due à un déficit en facteur de coagulation – et la maladie de Willebrand, plus fréquente et souvent moins grave, mais qui existe sous différentes formes par un défaut qualitatif ou quantitatif du vWF (Bharati et Prashanth, 2011).

- **Rappels de la physiologie de l'hémostase**

La coagulation s'initie par une phase d'hémostase primaire via l'activation des plaquettes, leur sécrétion, adhésion et agrégation, médiées par différentes enzymes (*Figure 58*). Ensuite, une phase d'hémostase secondaire s'instaure avec la cascade de la coagulation, i.e. l'activation successive de nombreux facteurs (*Figure 59*). La coagulation s'initie lorsque le sang circulant se retrouve en contact avec le facteur tissulaire (FT), qui n'existe qu'au niveau du sous-endothélium et est donc mis en circulation lors d'une brèche vasculaire. Le FT se fixe au facteur VII qui sera activé en présence de phospholipide (PL) et de calcium (Ca^{2+}), avant d'activer le facteur X, qui activera à son tour le facteur V. Le facteur Va activé permet la transformation de prothrombine en thrombine nécessaire pour transformer le fibrinogène soluble en fibrine insoluble (Palta *et al.*, 2014).

D'autre part, le complexe FT/facteur VIIa va aussi activer le facteur IX, puis le VIII activant lui aussi le facteur X. Le facteur de von Willebrand est un acteur clé de l'hémostase primaire puisqu'il permet l'adhésion des plaquettes au site lésé et le transport du facteur de coagulation VIII. Il intervient aussi dans l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, l'inflammation et la survie tumorale. Il est synthétisé par les cellules endothéliales, le tissu conjonctif sous-endothéliale et dans une moindre proportion par les mégacaryocytes, précurseurs des plaquettes (Bharati et Prashanth, 2011).

Figure 58 : Hémostase primaire, d'après (Bazin, 2016).

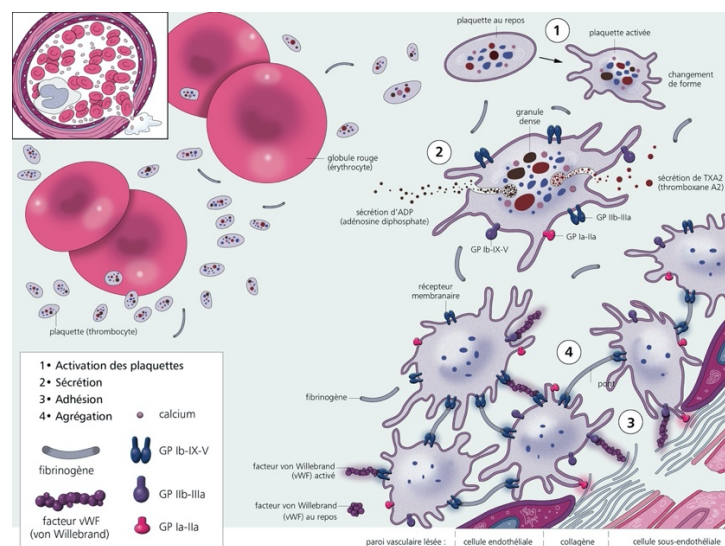
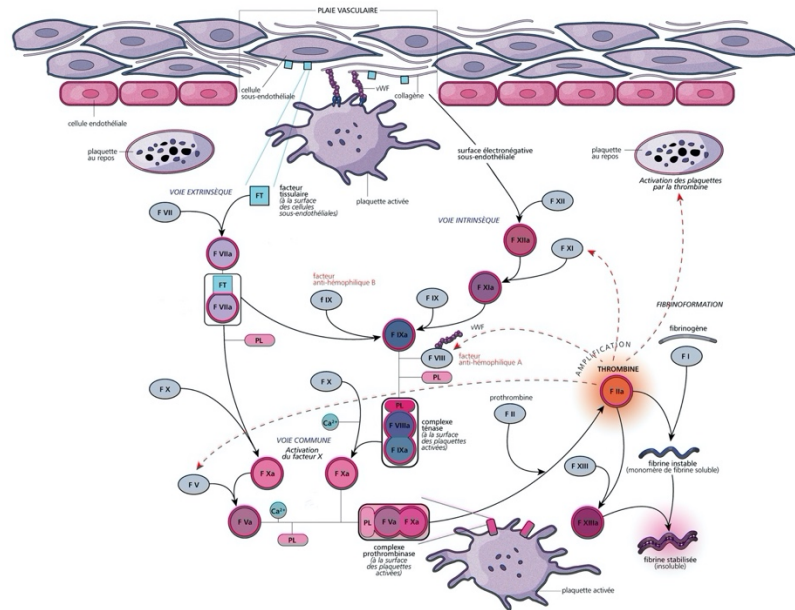


Figure 59 : Hémostase secondaire, la coagulation plasmatique, d'après (Bazin, 2016).



- **Maladie de Willebrand**

Le nanocorps, AU/VWFA- 11, dérivé d'un lama immunisé reconnaît spécifiquement la forme activée du facteur de von Willebrand (vWF) et permet de connaître les niveaux de vWF activé dans un échantillon de sérum (Wesolowski *et al.*, 2009). D'autres VHH sont développés comme réactifs anti-thrombiques, donc contre la formation de caillots sanguins, par inhibition complète de vWF. Un nanocorps a d'ailleurs terminé les essais cliniques en phase Ib, le nanocorps bivalent, ALX-0081, monospécifique dirigé contre le domaine A1 de la glycoprotéine sanguine vWF. L'étude a permis de montrer que les injections par voie intra-veineuse étaient bien tolérées et qu'elles permettaient d'inhiber la coagulation médiée par le vWF. Cependant, bien que ce nanocorps n'ait pas augmenté le risque d'hémorragie, il n'a pas permis de réduire son nombre de manière significative par rapport à l'abciximab, anticorps monoclonal chimérique utilisé en tant qu'antiagrégant plaquettaire en empêchant la fixation du fibrinogène. Les essais sur l'ALX-0081 comme facteur anti-thrombotique ont donc été interrompus. Néanmoins, l'ALX-0681, un variant de l'ALX-0081, nanocorps bivalent humanisé, ou Caplacizumab est actuellement le premier nanocorps commercialisé et administré par voie sous-cutanée, pour la prise en charge de purpuras thrombopéniques (PTT) depuis 2018. Les résultats précliniques avaient démontré que son utilisation était sûre et permettait d'empêcher l'apparition rapide de la maladie dans un modèle de babouin, avant les essais cliniques tout aussi concluants (Steeland *et al.*, 2016 ; Arbabi-Ghahroudi, 2017).

c. Traitements anti-venins ou « plantivenins »

Récemment, l'OMS a inclus l'envenimation par morsure de serpent sur la liste des maladies tropicales négligées, afin de mobiliser les efforts scientifiques vers l'élaboration de nouvelles thérapies. Diverses pistes ont été suivies et celles basées sur l'utilisation d'IgG humaines ou de nanocorps de camélidés, semblent prometteuses. En effet, ces molécules plutôt sûres lors de leur injection chez l'homme et peuvent être développées pour cibler diverses toxines d'intérêts, comme l' α -cobratoxine (α -Cbtx), composant le plus létal du venin de *Naja kaouthia*, ou cobra à monocle (Richard *et al.*, 2013).

Cependant, le développement de cocktails d'anticorps recombinants pourrait permettre d'obtenir des antivenins plus performants que les antivenins dérivés du plasma d'animaux, car ces derniers contiennent généralement une grande proportion (> 80%) d'anticorps antitoxines immunologiquement non pertinents. Ainsi, en ajustant la composition de l'antivenin à un nombre minimal de composants fonctionnels sélectionnés, le profil de sécurité et les coûts de production pourraient être améliorés.

Par ailleurs, les bibliothèques de nanocorps sont facilement manipulables, ce qui permet d'améliorer leurs caractéristiques et donc d'en faire des traitements toujours plus efficaces. Une technique innovante basée sur l'utilisation de vecteur d'expression dans des plantes, permet la formulation de « plantivenom ». Une immunisation de camélidés avec des cocktails venins de différentes espèces de serpents, comme *Crotalus simus*, *Crotalus scutulatus* and *Bothrops asper*, a été réalisée pour en extraire les séquences VHH spécifiques. Puis une sélection de quatre bibliothèques par phage display a été réalisée avec une étape de sélection supplémentaire contre quatre fractions de venin de *B. asper*, correspondant aux groupes d'activité des toxines. Enfin une transfection dans un vecteur, le pGVHH-His, permettant leur expression sous forme polyclonale et humanisée, pour réduire leurs effets immunogènes a permis d'obtenir des « pluribodies », avec une composition polyclonale et donc une activité antivenin améliorée. Enfin, la production de ces pluribodies sera possible par les plantes après agro-infiltration sous vide, pour obtenir un cocktail approprié d'anticorps de combinaisons variée, et donc reconnaissant même des toxines mineures. L'infection d'une plante, de l'espèce *Nicotiana benthamiana*, permet ainsi l'expression par des végétaux de molécules chimériques renommées « plantivenins » ou « plantivenom » (Julve Parreño *et al.*, 2018).

Ces dernières ont été testées *in vivo* et offraient une protection contre un large éventail de toxines à doses létales chez les souris. Cependant, une étude approfondie des coûts de production et des rendements de production de ces molécules par les plantes comme système d'expression sera nécessaire pour en justifier le développement, mais il n'en reste pas moins sûr que la recherche sur le développement d'anti-venin à base de nanocorps ne fait que commencer, que ce soit pour des venins de serpents ou d'autres espèces comme les araignées, les scorpions ou encore les abeilles (Knudsen et Laustsen, 2018 ; Julve Parreño *et al.*, 2018).

d. Perspectives de traitement des troubles neurodégénératifs

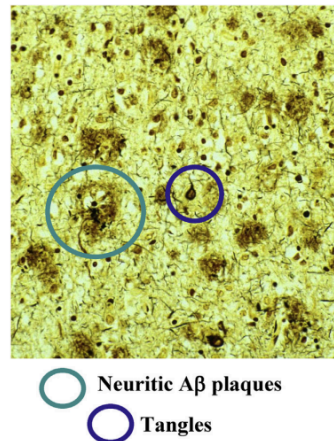
Les troubles neurodégénératifs sont caractérisés par la perte progressive de populations de neurones ; ils sont souvent dus à des anomalies de protéines, à l'origine d'agrégats protéiques. L'étude de ces maladies suggère que ces anomalies peuvent se propager de cellules en cellules le long de voies anatomiquement connectées (Dugger et Dickson, 2017). A l'heure actuelle, aucun traitement modulateur ou neuroprotecteur n'existe contre les troubles neurodégénératifs, seuls les traitements symptomatiques sont alors disponibles. Avec le vieillissement des populations, l'impact socio-économique de ces maladies risque pourtant d'augmenter davantage. Le recours aux nanocorps pourrait permettre le passage de la BHE et une utilisation intracellulaire, en tant qu'intrabodies, pour interférer avec la pathogénèse de ces maladies et donc limiter leur développement (Steeland *et al.*, 2016).

- **La maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer (MA) est donc associée à une accumulation de protéines insolubles, l'amyloïde A β agrégées (Figure 60). A l'instar des perspectives de traitement de l'amyloïdose, l'utilisation d'anticorps spécifiques de ces protéines permettrait d'éviter leur agrégation et semble

prometteur. Pour rappel, les plaques A β se forment par clivage protéolytique de la protéine précurseur amyloïde (APP) grâce à des enzymes, comme la BACE-1 (Beta-site APP-cleavage enzyme), une aspartyl protéase transmembranaire. Des nanocorps spécifiques des précurseurs, sous forme d'intrabodies, sont capables d'inhiber la formation de fibrilles A matures ; reste à savoir si cette inhibition serait favorable pour limiter le développement de la maladie (Miller et Messer, 2005 ; Wesolowski *et al.*, 2009).

Figure 60 : Photomicrographie de plaques amyloïdes A β et d'inclusions intra-cytoplasmiques neurofibrillaires chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer, d'après (Zigmond *et al.*, 2015).

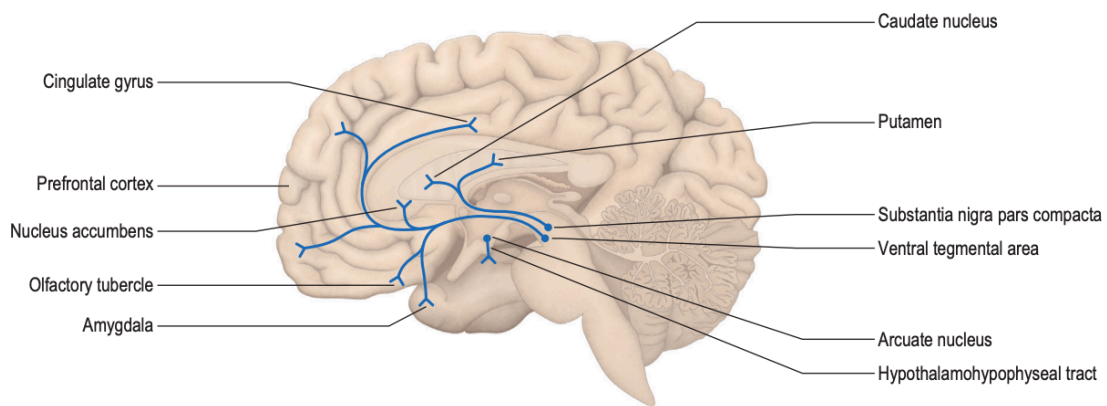


Une autre approche consiste à réduire les taux de peptides A libres dans le plasma, avec un nanocorps biparatopique, le BI 1034020, mais les effets indésirables observés et la stimulation de l'agrégation de l'amyloïde laissent penser qu'il est nécessaire trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est pourquoi, l'inhibition de la BACE-1 qui semble diminuer les concentrations d'A β dans le cerveau, étudiée depuis les années 2000 avec divers inhibiteurs, est actuellement à l'étude aussi pour des nanocorps (Steeland *et al.*, 2016 ; Coimbra *et al.*, 2018).

- **La maladie de Parkinson**

La maladie de Parkinson (MP), deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente chez l'homme, est caractérisée d'une part par un mauvais repliement de l' α -synucléine (α -syn), protéine abondante dans le cerveau et d'autre part de la perte de neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra* (substance noire ou locus niger), au niveau du mésencéphale et du diencephale (Figure 61). Le mécanisme de l'agrégation et de la toxicité de l' α -syn n'est pas complètement résolu, mais semblerait être un cible thérapeutique intéressante (De Genst *et al.*, 2010).

Figure 61 : Neurones dopaminergiques et leurs principales projections, d'après (Crossman *et al.*, 2015).

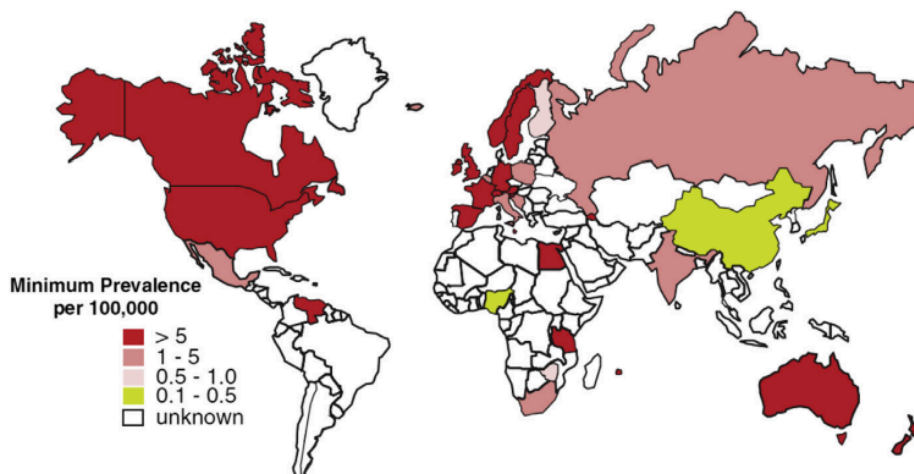


Aussi, une stratégie de traitement vise à diminuer les taux intracellulaires d' α -syn afin de prévenir un mauvais repliement, son agrégation et sa toxicité, grâce à des nanocorps dirigés contre divers épitopes de la partie C-terminale de cette dernière, les NbSyn2 et NbSyn87. Cependant, ces nanocorps se lient aussi bien aux formes monomériques que fibrillaires, ils n'empêchent donc pas leur agrégation, et restent toujours accessibles. Malgré leur incapacité à empêcher l'agrégation de ces protéines, ces nanocorps peuvent agir comme sondes moléculaires et ont permis d'élucider les structures complexes et les mécanismes d'agrégation de ces protéines (De Genst *et al.*, 2010 ; Guilliams *et al.*, 2013).

- **La maladie de Huntington**

La maladie de Huntington (MH) est une atteinte neuropsychiatrique génétique autosomique dominante progressive de la coordination musculaire et s'accompagne généralement de troubles du comportement et présente dans de nombreux pays (Figure 62) (Steeland *et al.*, 2016).

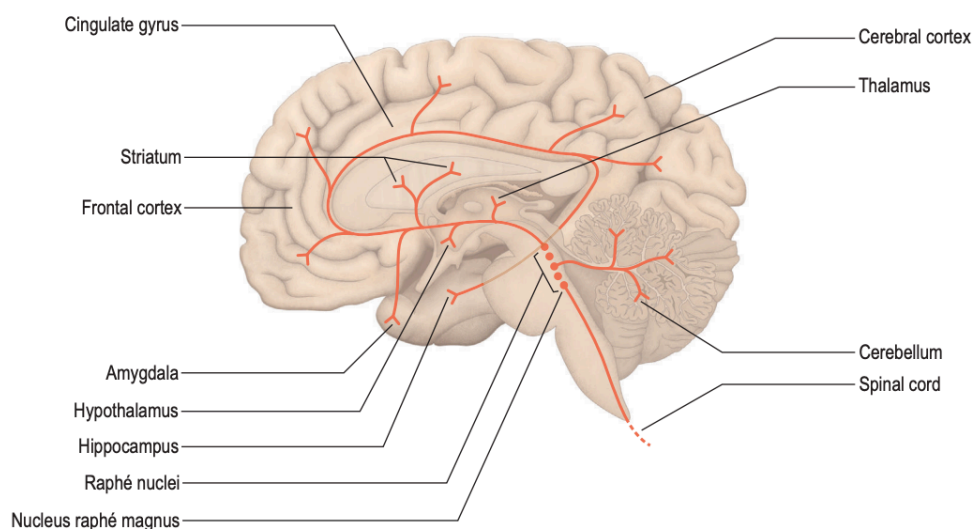
Figure 62 : Prévalence mondiale de la maladie de Huntington en 2011, d'après (Zigmond *et al.*, 2015).



Ces signes sont dus à la mort cellulaire de neurones dans le striatum et à la perturbation des circuits corticaux-striataux. Le striatum est une structure nerveuse paire, impliquée dans le mouvement involontaire, la douleur, la prise de décision, les addictions ou encore la cicatrisation,

notamment grâce aux cellules nerveuses dopaminergiques (*Figure 63*) (Crossman *et al.*, 2015). A l'origine de cette affection, se trouve entre autres une mutation du gène de la huntingtine (IT15), par expansion d'une répétition CAG, qui entraîne la formation d'une protéine mutante la protéine Huntingtin (mHTT) mal repliée avec un étirement polyglutamine allongé dans le domaine N-terminal. L'approche thérapeutique basée sur les nanocorps, s'appuie sur l'hypothèse que la mutation de cette protéine entraîne un gain de toxicité et donc le ciblage de cette protéine par des nanocorps pourrait atténuer la maladie. Les premiers VHH se liant à la protéine mHTT ont été identifiés, cependant comme ils se lient aussi à la protéine sauvage, en raison de leur grande homologie de séquence, ils pourraient bloquer les effets neuroprotecteurs de cette dernière. Des travaux supplémentaires s'avèrent donc nécessaires pour l'élaboration d'un outil thérapeutique satisfaisant dans le traitement de la MH (Ramaswamy *et al.*, 2007 ; Zigmond *et al.*, 2015 ; Schut *et al.*, 2015).

Figure 63 : Neurones sérotoninergiques et leurs principales projections, d'après (Crossman *et al.*, 2015).



- **La dystrophie oculopharyngée**

La dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP) partage de grandes similitudes avec la maladie de Huntington et est caractérisée par un affaiblissement progressif de certains muscles. Elle est causée par la répétition de triplets (GCG) dans le gène PABPN1 qui code pour une répétition polyalanine à l'extrémité N-terminale de la protéine nucléaire 1 de liaison polyA (PBAN1). Cette mutation entraîne la présence d'inclusions intranucléaires constituées de filaments tubulaires non ramifiés dans les fibres musculaires (Steeland *et al.*, 2016).

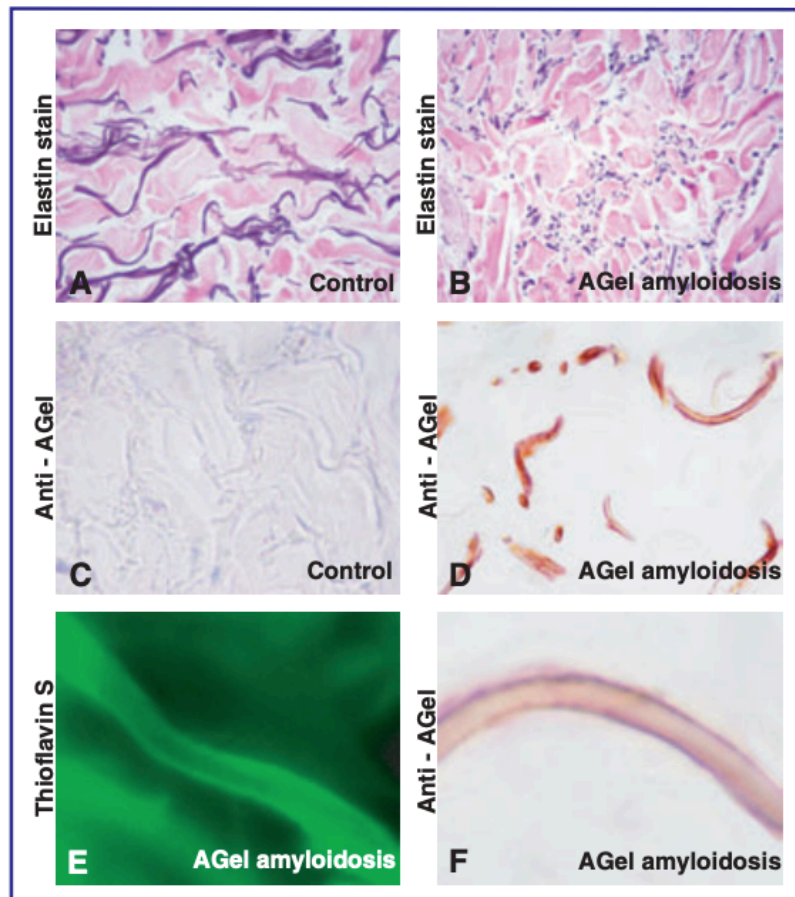
Des nanocorps ciblant le domaine hélicoïdal de la PABN1 mutante ont été générés et exprimés sous formes d'intrabodies nucléaires, comme le NB 3F5. Cet anticorps issu de lama a permis d'empêcher l'agrégation de manière dose-dépendante, mais aussi l'élimination des agrégats déjà existants. Ces résultats prometteurs ont été confirmés dans un modèle de DMOP affectant les myocytes de drosophile (Verheesen *et al.*, 2006 ; Chartier *et al.*, 2009).

- **Autres applications**

D'autres amyloïdoses héréditaires et sporadiques pourraient se voir traitées à l'avenir avec le développement des nanocorps en tant qu'outils thérapeutiques. Certaines recherches portent sur ces maladies plus rares, comme l'amylose ou amyloïdose héréditaire à gelsoline (HGA), qui est une

forme d'amyloïdose systémique à transmission autosomique dominante, à l'origine d'une neuropathie périphérique crânienne et sensorielle, une dystrophie du réseau cornéen et une *cutis laxa* ou dermatolyse, peau plissée à cause d'un défaut du tissu conjonctif. Une mutation entraîne là encore une accumulation de peptides (AGel), à cause d'un mauvais repliement et d'une protéolyse pathologique par la furine (Figure 64). Des nanocorps étudiés ont permis de protéger la gelsoline de la protéolyse et même réduire l'accumulation de gelsoline dans l'endomysium musculaire et améliorer sa contractilité (Kiuru-Enari et Haltia, 2013 ; Steeland *et al.*, 2016).

Figure 64 : Fibres élastiques dans l'HGA, d'après (Kiuru-Enari et Haltia, 2013).



Légende : (A,B) Fibres élastiques (violet foncé) dans le derme d'un individu sain et fragmentation et perte des fibres élastiques dans le derme d'un patient atteint de HGA. Coupes de paraffine, coloration résorcine-fuchsine de Weigert, grossissement original x200. (C,D) Immunohistochimie comparative de l'AGel de peau de contrôle et de patient, où les fibres sont encerclées par un matériau fortement immunoréactif, grossissement x350. (E) Immo fluorescence en thioflavine S montre un dépôt d'amyloïde entourant une fibre élastique. (F) Forte immunoréaction avec l'anti-AGel, grossissement x1400.

D'autres mécanismes entrent aussi en jeu dans la survenue de maladies neurodégénératives, comme l'apoptose induite par stress oxydatif médiée par la protéine Bax, mise en évidence dans la MA et la MP (Warner, 1999). Des VHH ont donc été développés comme intrabodies afin d'inhiber ce phénomène, en limitant l'effondrement du potentiel de membrane mitochondriale, responsable de l'homéostasie. De nouvelles perspectives sont ainsi étudiées à l'aide des nanocorps pour ces maladies (Gueorguieva *et al.*, 2006).

- **Les maladies à prions**

Un prion est un agent pathogène constitué d'une protéine normale PrP^c au repliement ou à la conformation anormale PrP^{Sc}, qui se propage et s'accumule dans le système nerveux central (SNC) de l'hôte, dans des vacuoles. Impliqué dans diverses maladies fatales chez l'homme – la maladie de Creutzfeldt-Jakob, l'insomnie fatale familiale (IFF), le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (SGSS) – et chez l'animal – l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et la tremblante des petits ruminants notamment – le prion est à l'origine d'une dégénérescence du SNC. Abskharon *et al.* ont démontré que le nanocorps Nb 484 en se liant à la partie hydrophobe de la PrP, la stabilise et inhibe la propagation des prions par inhibition compétitive *in vitro* dans un modèle murin, sans présenter de neurotoxicité sur les tranches de cerveau en culture. Le Nb 484 présente donc un potentiel thérapeutique indéniable contre les maladies à prions (Abskharon *et al.*, 2019).

- **Limites rencontrées dans le traitement des maladies neurodégénératives**

Bien que les nanocorps aient déjà été utilisés comme intrabodies, pour permettre la livraison du gène codant à la surface des cellules neuronales d'intérêts, il est actuellement nécessaire d'utiliser des vecteurs lentiviraux. L'utilisation de ces derniers chez l'homme doit encore être validée. En effet, le modèle développé pour cibler spécifiquement les astrocytes repose sur l'utilisation d'un lentivirus modifié affichant des IgG anti-GLAST comme surface d'attachement. Ces molécules ont effectivement montré un tropisme pour les astrocytes lors de leur injection dans le cerveau de souris, mais n'ont pas encore été validés pour une utilisation chez l'homme (Fassler *et al.*, 2013).

D'autre part, pour être efficaces ces nanocorps doivent être capables de passer la BHE, afin d'atteindre le cytosol des cellules cibles et en quantité suffisante. Les nanocorps peuvent passer cette barrière par divers mécanismes. D'abord, le transport spontané en conditions pathologiques est permis grâce à leur petite taille ou leur point isoélectrique (pI) élevé, mais les quantités de nanocorps récupérés au sein du cerveau restent trop faibles pour admettre un effet thérapeutique pour le moment. Ensuite, la transcytose médiée par les récepteurs (RMT) est possible via la liaison des nanocorps avec des molécules permettant leur navette, comme la transférine, la clathrine, le facteur de croissance analogue à l'insuline ou la lipoprotéine de basse densité. C'est le cas pour un nanocorps généré contre la protéine prion PrP^{Sc}, le Nb PrioV3, qui traverse la BHE grâce à une RMT médiée par la clathrine. D'autres protéines fortement exprimées par les cellules endothéliales du cerveau pourraient jouer le rôle de médiateurs pour améliorer l'absorption des nanocorps au niveau du cerveau, mais de plus amples recherches à ce sujet seront nécessaires pour passer l'obstacle que reste la BHE dans le traitement des maladies neurodégénératives (Steeland *et al.*, 2016).

e. Une perspective de traitements antipelliculaires

Malassezia furfur est une levure anthropophile commensale de la flore de notre cuir chevelu. Des études de cette flore ont permis de mettre en évidence le rôle de *Malassezia furfur* dans le développement de pellicules ou de certaines maladies de peau, telles que le psoriasis. En effet, ces champignons sont retrouvés en plus grande quantité chez les personnes atteintes de pellicules par rapport à celles qui n'en ont pas et leur diminution de nombre permet de réduire la sévérité de ce signe clinique (Dolk *et al.*, 2005).

Les traitements usuellement utilisés dans le cadre de cette affection reposent sur l'utilisation de shampoing à base d'antifongiques tels que le kétoconazole, les hydroxypyridones, la pyrithione de zinc, ou encore le disulfure de sélénium (Mayser *et al.*, 2003). Une nouvelle perspective de traitement est permise avec l'utilisation d'anticorps à domaine unique. En effet, des nanobodies

capables de se lier à la protéines Malf1 de *M. furfur* sont sélectionnés grâce à des techniques de phage display pour être capable de se lier même en présence d'agents dénaturant présents dans les shampoings (i.e. urée ou guanidine HCl). La sélection de VHH capables de se fixer à Malf1 dans de telles conditions a permis de mettre en évidence la présence d'une lysine en position 44 qui serait impliqué à la fois dans la stabilité de la molécule et de sa liaison à l'antigène. Cette étude a donc permis de développer des anticorps de lamas spécifiques de Malf1, capables de se lier à cette protéine mycosique dans un environnement extérieur extrême (Dolk *et al.*, 2005).

Ainsi, un shampoing à base d'anticorps à domaine unique pourrait être développé dans les années à venir, bien qu'il reste encore à prouver que ces anticorps inhibent la croissance des *Malassezia* pour être utilisé en tant que traitement antipelliculaire.

G. Molécules anti-virales pour les plantes ou « plantibodies »

Les enjeux sociaux et économiques actuels imposent d'améliorer constamment les rendements de l'agriculture. Au cours des décennies passées, la gestion des infections des plantes reposait principalement sur la lutte contre les vecteurs de maladies virales ou sur l'acquisition de résistances à ces maladies directement au sein du génome des plantes. Aujourd'hui, les progrès réalisés dans le domaine des biotechnologies permettent de développer de nouvelles techniques de luttés contre ces infections virales. En effet, la création de plantes génétiquement modifiées produisant des anticorps dirigés contre ces infections virales serait une formidable avancée. Ce principe d'immunomodulation d'abord appliqué chez les mammifères est donc réalisé chez les plantes sous le nom de « plantibodies ». Cependant, les anticorps conventionnels s'avèrent être peu adaptés. C'est alors que l'utilisation d'anticorps à domaine unique intervient, puisque leur petite taille, leur capacité à fixer des épitopes peu accessibles, ou encore leurs autres propriétés intrinsèques (stabilité thermique, haute solubilité aqueuse, bonne pénétration tissulaire...) en font des candidats adaptés à la lutte contre les maladies virales de plantes.

Certains chercheurs se sont particulièrement intéressés au virus du flétrissement de la fève (Broad Bean Mottle Virus ou BBMV), du genre Fabavirus, un phytovirus à ARN cosmopolite, qui infecte de nombreuses plantes dicotylédones ou légumineuses, telles que *Cicer arietinum* (le pois chiche), *Pisum sativum* (le pois fourrager) et *Vicia faba* (la féverole ou fève). Ce virus a un impact économique important puisqu'il peut être responsable d'une perte de rendement de 35 à 55 % dans les cultures du pourtour méditerranéen où il sévit particulièrement.

Ce virus d'un diamètre de 26 nm est constitué d'une enveloppe protéique icosaédrique, soit 20 faces triangulaires, elles-mêmes constituées de 180 sous-unités polypeptidiques identiques regroupées en structures pentagonales et hexagonales. C'est cette enveloppe qui sera utilisée comme structure antigénique impliquée dans l'immunisation de dromadaires pour la production d'anticorps dirigés contre le virus BBMV.

Les techniques de phage-display ont ensuite permis d'isoler et d'identifier des nanocorps spécifiques du BBMV. Tous ces anticorps reconnaissent un seul épitope sur le virus. Par ailleurs, un seul nanocorps provient d'un VHH germinal tandis que tous les autres sont issus de recombinaisons de VH avec les gènes D-Jh et qualifié de nanocorps « VH-like »; certainement puisque les nanocorps préfèrent interagir avec des surfaces d'antigène concaves.

L'atténuation de l'infection a été démontrée *in vitro*, puis *in vivo* avec l'expression des nanocorps dans des feuilles de fève, ces dernières ont été protégées efficacement contre l'infection du BBMV via la liaison nanocorps-virus. Pour réaliser cette expérience, les feuilles de la plante ont

été infiltrées avec des agrobactéries contenant un vecteur exprimant ces nanocorps : l'agro-infiltration est donc un procédé biologique permettant l'expression transitoire d'un gène, en utilisant un vecteur biologique introduit de manière mécanique dans la plante. Cependant contrairement au virus, les nanocorps n'ont pas migré dans l'ensemble des feuilles de la plante, mais sont restés localisés au sein des feuilles infiltrées. Il faut donc encore générer des plantes transgéniques pour déterminer la stabilité et la quantité de nanocorps nécessaires à la plante dans son intégralité pour être efficacement protégée (Ghannam *et al.*, 2015).

Conclusion : Nanocorps, de petits anticorps avec de grandes indications

Le système immunitaire adaptatif est un élément crucial de la lutte contre les agents pathogènes qui menacent à chaque instant le devenir des vertébrés. Bien qu'il semblerait que les anticorps produits soient capables de fixer un nombre infini d'épitopes, en réalité ce n'est certainement pas le cas. Les répertoires germinaux ont ainsi évolué pour augmenter d'autant plus cette diversité, afin de protéger l'organisme contre le milieu extérieur. Ensuite, la pression de sélection a sûrement permis l'évolution de ces molécules clés de la réponse immunitaire à médiation humorale, notamment chez des espèces possédant un microbiote digestif particulièrement vaste. C'est à partir des années 90 qu'il faudra donc composer avec la révélation de l'existence d'anticorps homodimériques, au détour d'une découverte fortuite. Ces anticorps s'avèrent être tout aussi efficaces que leurs homologues hétérodimériques, jusqu'alors seuls connus. En effet, depuis lors, le dogme de l'association de chaînes légères et de chaînes lourdes pour former une immunoglobuline est révolu (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Les camélidés sont pour l'heure les seuls mammifères connus pour avoir développé ces nouveaux instruments de la réponse immunitaire à médiation humorale, et disposent ainsi de deux types d'anticorps pour une réponse toujours plus efficace. En effet, ces anticorps à domaine unique ou communément appelés nanocorps maintenant – bien que minicorps serait un terme plus adapté d'après leur taille réduite (15 kDa) – disposent de formidables qualités biochimiques et moléculaires. Ils sont composés de quatre régions conservées (les régions cadres) entourant trois régions hypervariables déterminant la complémentarité (CDR), dont le CDR3, qui possède une longue boucle saillante, participe pour plus de 60 à 80% de la liaison à l'antigène et permet d'accéder aux épitopes « cachés », cryptiques et concaves. D'autres qualités peuvent leur être attribuées, telle qu'une faible immunogénicité, une robustesse physique ou chimique, avec une stabilité dans des conditions défavorables de pH, de température, de pression ou la présence de protéases (Weiss et Verrips, 2019).

L'immunisation de camélidés contre des cibles d'intérêt conduit à la maturation *in vivo* des répertoires d'anticorps à domaine unique (HCAb) et conventionnels. La construction de bibliothèques de phages est réalisée par clonage de répertoires de HCAb amplifiés avec peu de modifications. Le potentiel de clonage direct des répertoires de nanocorps à partir de camélidés immunisés, la taille réduite des bibliothèques nécessaires pour la technique de « phage display » et la facilité de clonage et d'expression des nanocorps permettent l'élaboration simplifiée de ces outils performants, comparé aux anticorps conventionnels (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Leurs diverses aptitudes en font des molécules particulièrement adaptées aux manipulations appliquées à la recherche, aux techniques de diagnostic et de traitement et leur caractère hydrophile permet leur expression dans des systèmes de production économiques – bactéries ou levures. Ils offrent ainsi de nouvelles perspectives et notamment de nouvelles voies d'administration de traitement, facilité pour les patients. Leur petite taille peut parfois représenter un frein à leur utilisation, puisque leur clairance rénale est inadaptée à certaines utilisations thérapeutiques, ou ne permet pas une neutralisation suffisamment efficace, mais là encore, leur facilité de manipulation permet leur modification pour résoudre ces problèmes.

Comme le souligne Arbabi-Ghahroudi, « si l'esprit d'entreprise a certainement catalysé l'exploration des nanocorps en tant que produits commercialisables, les restrictions en matière de propriété intellectuelle peuvent être partiellement responsables du délai relativement long entre la découverte de ces biomolécules et leur entrée sur le marché pharmaceutique. » En effet, initialement le brevet était seulement détenu par la société belge d'Ablynx, avant qu'elle ne collabore avec Merck & Co., Eddingpharm et AbbVie pour développer de nouveaux nanocorps. Néanmoins, la publication de nouveaux travaux remet en perspective les connaissances déjà acquises à leur propos et décrivent ainsi souvent de nouvelles applications innovantes (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Au travers de cette thèse nous avons passé en revue divers domaines d'applications biologiques des nanocorps, de leur utilisation en recherche fondamentale jusqu'à leur développement comme réactif diagnostique ou de molécules thérapeutiques. Ce travail a donc pour vocation de mettre en exergue les connaissances actuelles sur l'utilisation des nanocorps ; mais il faudra sans aucun doute redéfinir sans cesse les contours de notre connaissance à leur sujet, puisque nous ne sommes qu'à l'orée de leur utilisation médicale, aussi bien en médecine humaine que vétérinaire.

Ils ont suscité un intérêt croissant ces dernières années et sont actuellement au cœur de divers essais cliniques. Ils présentent néanmoins certaines limites d'utilisation, en passant de leur recyclage, leur efficacité et innocuité pour l'homme, et sont aussi soumis au développement de nouvelles molécules concurrentes. Ainsi, ils devront encore être étudiés pour répondre à certaines interrogations à leur sujet et passer dans la pratique clinique quotidienne.

De même, l'utilisation d'animaux dans le domaine de la recherche soulève un certain nombre de questions éthiques : le bien-être animal est au cœur des enjeux actuels. Bien qu'ils ne soient utilisés que dans les premières phases de recherches, les camélidés doivent être élevés et surveillés durant plusieurs semaines pour le déroulement des étapes d'immunisation. Certains auteurs précisent que les conditions de bien-être animal sont respectées lors de leurs manipulations, mais les conditions de détention et d'élevage ne sont que rarement évoquées. Les expérimentateurs privilégient en général l'utilisation de jeunes adultes (4 à 5 ans), en bonne santé, avec des paramètres sanguins, un comportement et un appétit normaux (Vincke *et al.*, 2012). Les camélidés bénéficient d'une semaine d'acclimatation dans leur nouvel environnement avant le début des protocoles et les manipulations sont réalisées par le personnel habilité, afin de réduire au maximum leur stress – qui pourrait être à l'origine d'une immunosuppression (Pardon *et al.*, 2014). Cependant, les camélidés ne sont pas encore reconnus comme animaux de laboratoires et les normes en vigueur varient incontestablement d'un pays l'autre. Il est donc possible de se demander si le bien-être est réellement garanti et contrôlé sur le terrain, pour les camélidés, et ce, dans tous les pays les exploitant. Néanmoins, Sanofi, le leader français de développement des nanocorps, à l'instar des autres laboratoires utilisant des animaux, est tenu de respecter la règle obligatoire des 3R – Réduire, Raffiner, Remplacer – fondement d'une pratique éthique lors d'utilisation d'animaux dans le domaine de la recherche. Il s'engage même à replacer les animaux après leur utilisation (*Figure 65*).

Figure 65 : Un groupe de lamas placés au Grand Refuge de la Société Protectrice des Animaux (SPA), France, par la société Sanofi.



Pour conclure, la conformation de ces anticorps à domaine unique permet une utilisation polyvalente en tant qu'agoniste ou agent effecteur lorsqu'ils sont fusionnés à d'autres molécules. Agents diagnostiques et thérapeutiques pour de nombreuses affections, virales, bactériennes, parasitaires, tumorales, neurodégénératives ou les envenimations, les nanocorps n'en finissent pas de nous surprendre. C'est ainsi, qu'à l'avenir, lamas et autres camélidés pourraient bien détenir la solution contre l'émergence ou le traitement de nouvelles pandémies.

Liste des références bibliographiques

- ABBOTT N.J., PATABENDIGE A.A.K., DOLMAN D.E.M., YUSOF S.R., BEGLEY D.J. (2010) Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37(1), 13-25
- ABSKHARON R., WANG F., WOHLKONIG A., *et al.* (2019) Structural evidence for the critical role of the prion protein hydrophobic region in forming an infectious prion. *PLoS Pathog.* 15(12), e1008139
- AGGARWAL B.B. (2014) Editorial: Balancing Tumor Necrosis Factor Receptor I and Tumor Necrosis Factor Receptor II Jointly for Joint Inflammation. *Arthritis Rheumatol.* 66(10), 2657-2660
- ALKHOWAILED M., SHARIQ A., ALQOSSAYIR F., *et al.* (2020) Impact of meteorological parameters on COVID-19 pandemic: A comprehensive study from Saudi Arabia. *Inform. Med. Unlocked* 20, 100418
- ALLEGRA A., INNAO V., GERACE D., *et al.* (2018) Nanobodies and Cancer: Current Status and New Perspectives. *Cancer Invest.* 36(4), 221-237
- AMRI E., MAMBOYA F. (2012) Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance : a Review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 8(2), 99-104
- ARBABI-GHAHROUDI M. (2017) Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook. *Front. Immunol.* 8, 1589
- AREZUMAND R., ALIBAKHSHI A., RANJBARI J., RAMAZANI A., MUYLDERMANS S. (2017) Nanobodies As Novel Agents for Targeting Angiogenesis in Solid Cancers. *Front. Immunol.* 8, 1746
- ARNAOUT R., LEE W., CAHILL P., *et al.* (2011) High-Resolution Description of Antibody Heavy-Chain Repertoires in Humans. *PLoS One* 6(8), e22365
- AUDENHOVE I.V., IMPE K.V., RUANO-GALLEGO D., *et al.* (2013) Mapping cytoskeletal protein function in cells by means of nanobodies. *Cytoskeleton* 70(10), 604-622
- BAKSHI S., SANZ GARCIA R., VAN DER WEKEN H., *et al.* (2020) Evaluating single-domain antibodies as carriers for targeted vaccine delivery to the small intestinal epithelium. *J. Controlled Release* 321, 416-429
- BANIHASHEMI S.R., HOSSEINI A.Z., RAHBARIZADEH F., AHMADVAND D. (2018) Development of specific nanobodies (VHH) for CD19 immuno-targeting of human B-lymphocytes. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 21(5), 455-464
- BARD F., CANNON C., BARBOUR R., *et al.* (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6(8), 916-919
- BAZIN D. (2016) Physiologie de l'hémostase. In *MHEMO.* [<https://mhemmo.fr/les->

pathologies/physiologie-de-lhemostase/] (consulté le 29/10/2021).

BEGHEIN E., VAN AUDENHOVE I., ZWAENEPOEL O., *et al.* (2016) A new survivin tracer tracks, delocalizes and captures endogenous survivin at different subcellular locations and in distinct organelles. *Sci. Rep.* 6(1), 31177

BEGHEIN E., GETTEMANS J. (2017) Nanobody Technology: A Versatile Toolkit for Microscopic Imaging, Protein–Protein Interaction Analysis, and Protein Function Exploration. *Front. Immunol.* 8, 771

BEHAR G., SIBÉRI L S., GROULET A., *et al.* (2008) Isolation and characterization of anti-FcγRIII (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells. *Protein Eng. Des. Sel.* 21(1), 1-10

BEREK C., BERGER A., APEL M. (1991) Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67(6), 1121-1129

BESSALAH S., JEBABI S., MEJRI N., *et al.* (2021) Perspective on therapeutic and diagnostic potential of camel nanobodies for coronavirus disease-19 (COVID-19). *3 Biotech* 11(2), 89

BHARATI K.P., PRASHANTH U.R. (2011) Von Willebrand Disease: An Overview. *Indian J. Pharm. Sci.* 73(1), 7-16

BLANCHETOT C., VERZIJL D., MUJIĆ-DELIĆ A., *et al.* (2013) Neutralizing Nanobodies Targeting Diverse Chemokines Effectively Inhibit Chemokine Function. *J. Biol. Chem.* 288(35), 25173-25182

BORDON Y. (2016) The many sides of Paul Ehrlich. *Nat. Immunol.* 17(S1), S6-S6

BRADLEY M.E., DOMBRECHT B., MANINI J., *et al.* (2015) Potent and Efficacious Inhibition of CXCR2 Signaling by Biparatopic Nanobodies Combining Two Distinct Modes of Action. *Mol. Pharmacol.* 87(2), 251-262

BURGER P.A. (2016) The history of Old World camelids in the light of molecular genetics. *Trop. Anim. Health Prod.* 48(5), 905-913

CAO L., LIU X., LIN E.-J.D., *et al.* (2010) Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell* 142(1), 52-64

CARTER P. (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1(2), 118-129

CHAPMAN R.W., PHILLIPS J.E., HIPKIN R.W., *et al.* (2009) CXCR2 antagonists for the treatment of pulmonary disease. *Pharmacol. Ther.* 121(1), 55-68

CHARTIER A., RAZ V., STERRENBURG E., *et al.* (2009) Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies in vivo. *Hum. Mol. Genet.* 18(10), 1849-1859

CHI X., LIU X., WANG C., *et al.* (2020) Humanized single domain antibodies neutralize SARS-CoV-2 by targeting the spike receptor binding domain. *Nat. Commun.* 11(1), 4528

COIMBRA J.R.M., MARQUES D.F.F., BAPTISTA S.J., *et al.* (2018) Highlights in BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Front. Chem.* 6, 178

- CONRATH K.E., LAUWEREYS M., GALLEN M., *et al.* (2001) β -Lactamase Inhibitors Derived from Single-Domain Antibody Fragments Elicited in the Camelidae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(10), 2807-2812
- CONRATH K.E., WERNERY U., MUYLDERMANS S., NGUYEN V.K. (2003) Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev. Comp. Immunol.* 27(2), 87-103
- COPPIETERS K., DREIER T., SILENCE K., *et al.* (2006) Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 54(6), 1856-1866
- CORTEZ-RETAMOZO V., LAUWEREYS M., GH G.H., *et al.* (2002) Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer* 98(3), 456-462
- CORTEZ-RETAMOZO V., BACKMANN N., SENTER P.D., *et al.* (2004) Efficient Cancer Therapy with a Nanobody-Based Conjugate. *Cancer Res.* 64(8), 2853-2857
- CROSSMAN A.R., NEARY D. (2015) *Neuroanatomy: an illustrated colour text*, 5th. ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, Elsevier
- CROWE J., BORASHI D., RAPPUOLI R. (2015) *Antibodies for Infectious Diseases*, ASM Press. Washington,
- DANQUAH W., MEYER-SCHWESINGER C., RISSIEK B., *et al.* (2016) Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci. Transl. Med.* 8(366), 366ra162
- DAVIES D.R., PADLAN E.A., SHERIFF S. (1990) Antibody-Antigen Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 59(1), 439-473
- DE GENST E., SAERENS D., MUYLDERMANS S., CONRATH K. (2006) Antibody repertoire development in camelids. *Dev. Comp. Immunol.* 30(1-2), 187-198
- DE GENST E.J., GUILLIAMS T., WELLENS J., *et al.* (2010) Structure and Properties of a Complex of α -Synuclein and a Single-Domain Camelid Antibody. *J. Mol. Biol.* 402(2), 326-343
- DE GROEVE K., DESCHACHT N., DE KONINCK C., *et al.* (2010) Nanobodies as Tools for In Vivo Imaging of Specific Immune Cell Types. *J. Nucl. Med.* 51(5), 782-789
- DE LOS RIOS M., CRISCITIELLO M.F., SMIDER V.V. (2015) Structural and genetic diversity in antibody repertoires from diverse species. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 33, 27-41
- DE BRUIN R.C.G., LOUGHEED S.M., VAN DER KRUK L., *et al.* (2016) Highly specific and potently activating V γ 9V δ 2-T cell specific nanobodies for diagnostic and therapeutic applications. *Clin. Immunol.* 169, 128-138
- DE MARCO A. (2011) Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microb. Cell Factories* 10(1), 44
- DESMYTER A., SPINELLI S., BOUTTON C., *et al.* (2017) Neutralization of Human Interleukin 23 by Multivalent Nanobodies Explained by the Structure of Cytokine-Nanobody Complex. *Front. Immunol.* 8, 884
- DETALLE L., STOHR T., PALOMO C., *et al.* (2015) Generation and Characterization of ALX-0171,

a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(1), 6-13

DING L., TIAN C., FENG S., *et al.* (2015) Small Sized EGFR1 and HER2 Specific Bifunctional Antibody for Targeted Cancer Therapy. *Theranostics* 5(4), 378-398

DOLK E., VAN DER VAART M., LUTJE HULSIK D., *et al.* (2005) Isolation of Llama Antibody Fragments for Prevention of Dandruff by Phage Display in Shampoo. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1), 442-450

DOMANSKA K., VANDERHAEGEN S., SRINIVASAN V., *et al.* (2011) Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic β 2-microglobulin variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(4), 1314-1319

DONG J., THOMPSON A.A., FAN Y., *et al.* (2010) A Single Domain Llama Antibody Potently Inhibits the Enzymatic Activity of Botulinum Neurotoxin by Binding to the Non-Catalytic Alpha-Exosite Binding Region. *J. Mol. Biol.* 397(4), 1106-1118

DONG J., HUANG B., WANG B., *et al.* (2020) Development of humanized tri-specific nanobodies with potent neutralization for SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* 10(1), 17806

DOUGALL W.C., PETERSON N.C., GREENE M.I. (1994) Antibody-structure-based design of pharmacological agents. *Trends Biotechnol.* 12(9), 372-379

DUARTE J.N., CRAGNOLINI J.J., SWEE L.K., *et al.* (2016) Generation of Immunity against Pathogens via Single-Domain Antibody–Antigen Constructs. *J. Immunol.* 197(12), 4838-4847

DUGGER B.N., DICKSON D.W. (2017) Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9(7), a028035

DUMOULIN M., CONRATH K., VAN MEIRHAEGHE A., *et al.* (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci.* 11(3), 500-515

DUNN M.J., (1986) Gel electrophoresis of proteins. Amsterdam, Elsevier

ESPARZA T.J., MARTIN N.P., ANDERSON G.P., GOLDMAN E.R., BRODY D.L. (2020) High affinity nanobodies block SARS-CoV-2 spike receptor binding domain interaction with human angiotensin converting enzyme. *Sci. Rep.* 10(1), 22370

ESTELL D. (2006) Adapting Industry Practices for the Rapid, Large-Scale Manufacture of Pharmaceutical Proteins. *In Engineering and Vaccine Production for an Influenza Pandemic, Bridge* 36 (3), 39-44

EWERT S., CABBILLAU C., CONRATH K., PLÜCKTHUN A. (2002) Biophysical Properties of Camelid V_{HH} Domains Compared to Those of Human V_H 3 Domains †. *Biochemistry* 41(11), 3628-3636

EYCKERMAN S., TITECA K., VAN QUICKELBERGHE E., *et al.* (2016) Trapping mammalian protein complexes in viral particles. *Nat. Commun.* 7(1), 11416

FARAJPOUR Z., RAHBARIZADEH F., KAZEMI B., AHMADVAND D. (2014) A nanobody directed to a functional epitope on VEGF, as a novel strategy for cancer treatment. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 446(1), 132-136

FASSLER M., WEISSBERG I., LEVY N., *et al.* (2013) Preferential Lentiviral Targeting of Astrocytes in the Central Nervous System. *PLoS One* 8(10), e76092

FENG M., GAO W., WANG R., *et al.* (2013) Therapeutically targeting glypican-3 via a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(12), E1083-E1091

FERNANDES C.F.C., PEREIRA S. dos S., LUIZ M.B., *et al.* (2017) Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of Neglected Tropical Diseases. *Front. Immunol.* 8, 653

FUKUMURA D., KLOPPER J., AMOOZGAR Z., DUDA D.G., JAIN R.K. (2018) Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15(5), 325-340

GAI J., MA L., LI G., *et al.* (2021) A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential. *Medcomm* 2(1), 101-113

GARAICOECHEA L., OLICHON A., MARCOPPIDO G., *et al.* (2008) Llama-Derived Single-Chain Antibody Fragments Directed to Rotavirus VP6 Protein Possess Broad Neutralizing Activity In Vitro and Confer Protection against Diarrhea in Mice. *J. Virol.* 82(19), 9753-9764

GAUJOUX-VIALA C. (2017) Évaluation de l'activité de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum. Monogr.* 84(4), 343-346

GHANNAM A., KUMARI S., MUYLDERMANS S., ABBADY A.Q. (2015) Camelid nanobodies with high affinity for broad bean mottle virus: a possible promising tool to immunomodulate plant resistance against viruses. *Plant Mol. Biol.* 87(4-5), 355-369

GHOBRIL I.M., WITZIG T.E., ADJEI A.A. (2005) Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA. Cancer J. Clin.* 55(3), 178-194

GOLDMAN E.R., ANDERSON G.P., LIU J.L., *et al.* (2006) Facile Generation of Heat Stable Antiviral and Antitoxin Single Domain Antibodies from a Semi-synthetic Llama Library. *Anal. Chem.* 78(24), 8245-8255

GOUGH P., MYLES I.A. (2020) Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Front. Immunol.* 11, 585880

GRAY M.A., TAO R.N., DEPORTER S.M., SPIEGEL D.A., MCNAUGHTON B.R. (2016) A Nanobody Activation Immunotherapeutic that Selectively Destroys HER2-Positive Breast Cancer Cells. *Chembiochem* 17(2), 155-158

GRIFFIN L.M., SNOWDEN J.R., LAWSON A.D.G., *et al.* (2014) Analysis of heavy and light chain sequences of conventional camelid antibodies from *Camelus dromedarius* and *Camelus bactrianus* species. *J. Immunol. Methods* 405, 35-46

GRODZKI A.C., BERENSTEIN E. (2010) Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 588, 15-26

- GROOT A.J., KHATTABI M.E., SACHS N., *et al.* (2009) Reverse proteomic antibody screening identifies anti adhesive VHH targeting VLA-3. *Mol. Immunol.* 46(10), 2022-2028
- GUEORGUIEVA D., LI S., WALSH N., *et al.* (2006) Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. *FASEB J.* 20(14), 2636-2638
- GUILLIAMS T., EL-TURK F., BUELL A.K., *et al.* (2013) Nanobodies Raised against Monomeric α -Synuclein Distinguish between Fibrils at Different Maturation Stages. *J. Mol. Biol.* 425(14), 2397-2411
- HAGE D.S. (1999) Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. *Clin. Chem.* 45(5), 593-615
- HAMERS-CASTERMAN C., ATARHOUCHE T., MUYLDERMANS S., *et al.* (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363(6428), 446-448
- HANKE L., VIDA KOVICS PEREZ L., SHEWARD D.J., *et al.* (2020) An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. *Nat. Commun.* 11(1), 4420
- HARMSSEN M.M., VAN SOLT C.B., HOOGENDOORN A., *et al.* (2005) Escherichia coli F4 fimbriae specific llama single-domain antibody fragments effectively inhibit bacterial adhesion in vitro but poorly protect against diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 111(1), 89-98
- HARMSSEN M.M., FIJTEN H.P.D., DEKKER A., EBLÉ P.L. (2008) Passive immunization of pigs with bispecific llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease and porcine immunoglobulin. *Vet. Microbiol.* 132(1), 56-64
- HARMSSEN M.M., VAN SOLT C.B., FIJTEN H.P.D. (2009) Enhancement of toxin- and virus-neutralizing capacity of single-domain antibody fragments by N-glycosylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84(6), 1087-1094
- HARMSSEN M.M., DE HAARD H.J. (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(1), 13-22
- HERCE H.D., DENG W., HELMA J., LEONHARDT H., CARDOSO M.C. (2013) Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells. *Nat. Commun.* 4(1), 2660
- HEUKERS R., DE GROOF T.W.M., SMIT M.J. (2019) Nanobodies detecting and modulating GPCRs outside in and inside out. *Curr. Opin. Cell Biol.* 57, 115-122
- HEYLEN E., NEYTS J., JOCHMANS D. (2017) Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* 127, 1-12
- HUANG L., GAINKAM L.O.T., CAVELIERS V., *et al.* (2008) SPECT Imaging with ^{99m}Tc-Labeled EGFR-Specific Nanobody for In Vivo Monitoring of EGFR Expression. *Mol. Imaging Biol.* 10(3), 167-175
- HUET H.A., GROWNEY J.D., JOHNSON J.A., *et al.* (2014) Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *MAbs* 6(6), 1560-1570
- HULTBERG A., TREMBLAY D.M., DE HAARD H., *et al.* (2007) Lactobacilli expressing llama VHH

fragments neutralise Lactococcusphages. *BMC Biotechnol.* 7(1), 58

HULTBERG A., TEMPERTON N.J., ROSSEELS V., *et al.* (2011) Llama-Derived Single Domain Antibodies to Build Multivalent, Superpotent and Broadened Neutralizing Anti-Viral Molecules. *PLoS One* 6(4), e17665

HUNTE C., MICHEL H. (2002) Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12(4), 503-508

HUO J., LE BAS A., RUZA R.R., *et al.* (2020) Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27(9), 846-854

HUSSACK G., HIRAMA T., DING W., MACKENZIE R., TANHA J. (2011) Engineered Single-Domain Antibodies with High Protease Resistance and Thermal Stability. *PLoS One* 6(11), e28218

IQBAL U., ALBAGHDADI H., LUO Y., *et al.* (2010) Molecular imaging of glioblastoma multiforme using anti-insulin-like growth factor-binding protein-7 single-domain antibodies. *Br. J. Cancer* 103(10), 1606-1616

JÄHNICHEN S., BLANCHETOT C., MAUSSANG D., *et al.* (2010) CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(47), 20565-20570

JAMAL S.M., BELSHAM G.J. (2013) Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet. Res.* 44(1), 116

JANSSENS R., DEKKER S., HENDRIKS R.W., *et al.* (2006) Generation of heavy-chain-only antibodies in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(41), 15130-15135

JULVE PARREÑO J.M., HUET E., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN A., *et al.* (2018) A synthetic biology approach for consistent production of plant-made recombinant polyclonal antibodies against snake venom toxins. *Plant Biotechnol. J.* 16(3), 727-736

JUNG D., GIALLOURAKIS C., MOSTOSLAVSKY R., ALT F.W. (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24(1), 541-570

KANG G., HU M., REN H., *et al.* (2021) VHH212 nanobody targeting the hypoxia-inducible factor 1 α suppresses angiogenesis and potentiates gemcitabine therapy in pancreatic cancer in vivo. *Cancer Biol. Med.* , 18(3), 772-787

KAUFMANN S.H.E. (2008) Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat. Immunol.* 9(7), 705-712

KENDREW J.C. (1963) Myoglobin and the Structure of Proteins: Crystallographic analysis and data-processing techniques reveal the molecular architecture. *Science* 139(3561), 1259-1266

KENNETH M., WEAVER C. (2017) Janeway's Immunobiology, 9th Edition, New York, GS Garland Science

KIJANKA M., DORRESTEIJN B., OLIVEIRA S., VAN BERGEN EN HENEGOUWEN P.M. (2015) Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomed.* 10(1), 161-174

KIURU-ENARI S., HALTIA M. (2013) Hereditary gelsolin amyloidosis. *In Handbook of Clinical*

Neurology. Amsterdam, Elsevier, 115 pp 659-681

KNUDSEN C., LAUSTSEN A.H. (2018) Recent Advances in Next Generation Snakebite Antivenoms. *Trop. Med. Infect. Dis.* 3(2), 42

KOCH-NOLTE F., REYELT J., SCHÖSSOW B., *et al.* (2007) Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *FASEB J.* 21(13), 3490-3498

KOIDE S. (2009) Engineering of recombinant crystallization chaperones. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19(4), 449-457

KOSAKA N., OGAWA M., CHOYKE P.L., KOBAYASHI H. (2009) Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer. *Future Oncol.* 5(9), 1501-1511

KRÜGER C., HULTBERG A., MARCOTTE H., *et al.* (2006) Therapeutic effect of llama derived VHH fragments against *Streptococcus mutans* on the development of dental caries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72(4), 732-737

KÜGLER J., ZANTOW J., MEYER T., HUST M. (2013) Oligopeptide M13 Phage Display in Pathogen Research. *Viruses* 5(10), 2531-2545

LADENSON R.C., CRIMMINS D.L., LANDT Y., LADENSON J.H. (2006) Isolation and Characterization of a Thermally Stable Recombinant Anti-Caffeine Heavy-Chain Antibody Fragment. *Anal. Chem.* 78(13), 4501-4508

LAH J., MARIANOVSKY I., GLASER G., *et al.* (2003) Recognition of the Intrinsically Flexible Addiction Antidote MazE by a Dromedary Single Domain Antibody Fragment: Structure, Thermodynamics of Binding, Stability, and Influence on Interactions with DNA. *J. Biol. Chem.* 278(16), 14101-14111

LAM A.Y., PARDON E., KOROTKOV K.V., HOL W.G.J., STEYAERT J. (2009) Nanobody-aided structure determination of the EpsI:EpsJ pseudopilin heterodimer from *Vibrio vulnificus*. *J. Struct. Biol.* 166(1), 8-15

LAPLAGNE D.A., ZYLBERMAN V., AINCIART N., *et al.* (2004) Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins* 57(4), 820-828

LARIOS MORA A., DETALLE L., GALLUP J.M., *et al.* (2018) Delivery of ALX-0171 by inhalation greatly reduces respiratory syncytial virus disease in newborn lambs. *MAbs* 10(5), 778-795

LAURSEN N.S., FRIESEN R.H.E., ZHU X., *et al.* (2018) Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science* 362(6414), 598-602

LEDSCGAARD L., KILSTRUP M., KARATT-VELLATT A., MCCAFFERTY J., LAUSTSEN A.H. (2018) Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins* 10(6), 236

LEOW C., FISCHER K., LEOW C., *et al.* (2017) Single Domain Antibodies as New Biomarker Detectors. *Diagnostics* 7(4), 52

LI T., VANDESQUILLE M., KOUKOULI F., *et al.* (2016) Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J. Controlled Release*

LI T., QI S., UNGER M., *et al.* (2016) Immuno-targeting the multifunctional CD38 using nanobody. *Sci. Rep.* 6(1), 27055

LÖFBLOM J., FELDWISCH J., TOLMACHEV V., *et al.* (2010) Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Lett.* 584(12), 2670-2680

LU R., ZHAO X., LI J., *et al.* (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395(10224), 565-574

MASSON E. (2011) Principes de la spectrométrie de masse. In *EM-Consulte*. [<https://www.em-consulte.com/article/678574/principes-de-la-spectrometrie-de-masse>] (consulté le 06/10/2021).

MAUSSANG D., MUJIĆ-DELIĆ A., DESCAMPS F.J., *et al.* (2013) Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo. *J. Biol. Chem.* 288(41), 29562-29572

MAYSER P., ARGEMBEAUX H., RIPPKKE F. (2003) The hair strand test - a new method for testing antifungal effects of antidandruff preparations. *J. Cosmet. Sci.* 54(3), 263-270

MCMURPHY T., XIAO R., MAGEE D., *et al.* (2014) The Anti-Tumor Activity of a Neutralizing Nanobody Targeting Leptin Receptor in a Mouse Model of Melanoma. *PLoS One* 9(2), e89895

MERCKAERT T., ZWAENEPOEL O., GEVAERT K., GETTEMANS J. (2021) An AKT2-specific nanobody that targets the hydrophobic motif induces cell cycle arrest, autophagy and loss of focal adhesions in MDA-MB-231 cells. *Biomed. Pharmacother.* 133, 111055

MILLER T.W., MESSER A. (2005) Intrabody applications in neurological disorders: progress and future prospects. *Mol. Ther.* 12(3), 394-401

MISHRA D., MISHRA A., CHATURVEDI V.K., SINGH M.P. (2020) An overview of COVID-19 with an emphasis on computational approach for its preventive intervention. *3 Biotech* 10(10), 435

MUYLDERMANS S. (2001) Single domain camel antibodies: current status. *Rev. Mol. Biotechnol.* 74(4), 277-302

MUYLDERMANS S., CABBILLAU C., WYNS L. (2001) Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem. Sci.* 26(4), 230-235

MUYLDERMANS S. (2013) Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 82(1), 775-797

MUYLDERMANS S. (2021) A guide to: generation and design of nanobodies. *FEBS J.* 288(7), 2084-2102

NAGY P., WERNERY U., BURGER P., JUHASZ J., FAYE B. (2021) The impact of COVID-19 on Old World Camelids and their potential role to combat a human pandemic. *Anim. Front.* 11(1), 60-66

NGUYEN V.K., HAMERS R., WYNS L., MUYLDERMANS S. (2000) Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J.* 19(5), 921-930

- OLICHON A., SURREY T. (2007) Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 282(50), 36314-36320
- OMS (2022) Trypanosomiase humaine africaine (maladie du sommeil). [[https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))] (consulté le 29/10/2021).
- PADLAN E.A. (1990) On the nature of antibody combining sites: Unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 7(2), 112-124
- PALTA S., SAROA R., PALTA A. (2014) Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58(5), 515-523
- PANT N., HULTBERG A., ZHAO Y., *et al.* (2006) Lactobacilli Expressing Variable Domain of Llama Heavy-Chain Antibody Fragments (Lactobodies) Confer Protection against Rotavirus-Induced Diarrhea. *J. Infect. Dis.* 194(11), 1580-1588
- PARDON E., LAEREMANS T., TRIEST S., *et al.* (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* 9(3), 674-693
- PÉREZ J.M.J., RENISIO J.G., PROMPERS J.J., *et al.* (2001) Thermal Unfolding of a Llama Antibody Fragment: A Two-State Reversible Process. *Biochemistry* 40(1), 74-83
- PERKINS S.J., OKEMEFUNA A.I., FERNANDO A.N., *et al.* (2008) X-ray and neutron scattering data and their constrained molecular modeling. *Methods Cell Biol.* 84, 375-423
- PEYRASSOL X., LAEREMANS T., GOUWY M., *et al.* (2016) Development by Genetic Immunization of Monovalent Antibodies (Nanobodies) Behaving as Antagonists of the Human ChemR23 Receptor. *J. Immunol.* 196(6), 2893-2901
- PORTER R.R. (1973) Structural Studies of Immunoglobulins. *Science* 180(4087), 713-716
- PUNT J., STRANFORD S.A., JONES P.P., OWEN J.A. (2019) Kuby Immunology, 8th Edition, New York, W. H. Freeman
- RAJAEI S., DABBAGH A. (2020) The immunologic basis of COVID-19: a clinical approach. *J. Cell. Mol. Anesth.* 5(1), 37-42
- RAMASWAMY S., SHANNON K.M., KORDOWER J.H. (2007) Huntington's Disease: Pathological Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell Transplant.* 16(3), 301-312
- RASMUSSEN S.G.F., DEVREE B.T., ZOU Y., *et al.* (2011) Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477(7366), 549-555
- REID K.B.M., SIM R.B. (2008) Molecular aspects of innate and adaptive immunity, Cambridge, RSC publishing.
- REITER Y., SCHUCK P., BOYD L.F., PLAKSIN D. (1999) An antibody single-domain phage display library of a native heavy chain variable region: isolation of functional single-domain VH molecules with a unique interface Edited by I. A. Wilson. *J. Mol. Biol.* 290(3), 685-698

- REN W., LI Z., XU Y., *et al.* (2019) One-Step Ultrasensitive Bioluminescent Enzyme Immunoassay Based on Nanobody/Nanoluciferase Fusion for Detection of Aflatoxin B1 in Cereal. *J. Agric. Food Chem.* 67(18), 5221-5229
- RENN A., FU Y., HU X., HALL M.D., SIMEONOV A. (2020) Fruitful Neutralizing Antibody Pipeline Brings Hope To Defeat SARS-Cov-2. *Trends Pharmacol. Sci.* 41(11), 815-829
- RICAGNO S., CAMPANACCI V., BLANGY S., *et al.* (2006) Crystal Structure of the Receptor-Binding Protein Head Domain from Lactococcus lactis Phage bIL170. *J. Virol.* 80(18), 9331-9335
- RICHARD G., MEYERS A.J., MCLEAN M.D., *et al.* (2013) In Vivo Neutralization of α -Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (VHHs) and a VHH-Fc Antibody. *PLoS One* 8(7), e69495
- RIES J., KAPLAN C., PLATONOVA E., EGHLIDI H., EWERS H. (2012) A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods* 9(6), 582-584
- ROMAN T., LECOINTRE G., CHARLEMAGNE J. (2001) Évolution de la diversité des anticorps chez les vertébrés osseux. *Méd./Sci.* 17(8-9), 897
- ROODINK I., FRANSEN M., ZUIDSCHERWOUDE M., *et al.* (2010) Isolation of targeting nanobodies against co-opted tumor vasculature. *Lab. Invest.* 90(1), 61-67
- ROTHBAUER U., ZOLGHADR K., TILLIB S., *et al.* (2006) Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* 3(11), 887-889
- RUDOLPH M.J., VANCE D.J., CHEUNG J., *et al.* (2014) Crystal Structures of Ricin Toxin's Enzymatic Subunit (RTA) in Complex with Neutralizing and Non-neutralizing Single Chain Antibodies. *J. Mol. Biol.* 426(17), 3057-3068
- SADEGHIAN-RIZI T., BEHDANI M., NAGHAVI-AL-HOSEINI F., *et al.* (2020) Optimization of Anti-CXCL10 Nanobody Expression Using Response Surface Methodology and Evaluation of its Anti-metastatic Effect on Breast Cancer cells. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 26, 3(1), 1399-1407
- SADEGHNEZHAD G., ROMÃO E., BERNEDO-NAVARRO R., *et al.* (2019) Identification of New DR5 Agonistic Nanobodies and Generation of Multivalent Nanobody Constructs for Cancer Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 20(19), 4818
- SAERENS D., STIJLEMANS B., BARAL T.N., *et al.* (2008) Parallel selection of multiple anti-infectome Nanobodies without access to purified antigens. *J. Immunol. Methods* 329(1-2), 138-150
- SALMI M., JALKANEN S. (2005) Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat. Rev. Immunol.* 5(10), 760-771
- SAPRA P., ALLEN T.M. (2003) Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.* 42(5), 439-462
- SCHATZ D.G., OETTINGER M.A., SCHLISSEL M.S. (1992) V(D)J Recombination: Molecular Biology and Regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 10(1), 359-383
- SCHOOFF M., FAUST B., SAUNDERS R.A., *et al.* (2020) An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science* 370(6523), 1473-1479

- SCHROEDER H.W., CAVACINI L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125(2), S41-S52
- SCHUT M.H., PEPERS B.A., KLOOSTER R., *et al.* (2015) Selection and characterization of llama single domain antibodies against N-terminal huntingtin. *Neurol. Sci.* 36(3), 429-434
- SENGER K., HACKNEY J., PAYANDEH J., ZARRIN A.A. (2015) Antibody Isotype Switching in Vertebrates. *Results Probl. Cell Differ.* 57, 295-324
- SERRUYS B., VAN HOUTTE F., VERBRUGGHE P., LEROUX-ROELS G., VANLANDSCHOOT P. (2009) Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice. *Hepatology. Baltim. Md* 49(1), 39-49
- SERRUYS B., VAN HOUTTE F., FARHOUDI-MOGHADAM A., LEROUX-ROELS G., VANLANDSCHOOT P. (2010) Production, characterization and in vitro testing of HBcAg-specific VHH intrabodies. *J. Gen. Virol.* 91(Pt 3), 643-652
- SHAKER G.H., MELAKE N.A. (2012) Use of the single cell gel electrophoresis (comet assay) for comparing apoptotic effect of conventional antibodies versus nanobodies. *Saudi Pharm. J.* 20(3), 221-227
- SHARPE M.E., LATHAM M.J., REITER B. (1969) The Occurrence of Natural Antibodies to Rumen Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 56(3), 353-364
- SHEAHAN T.P., SIMS A.C., GRAHAM R.L., *et al.* (2017) Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med.* 9(396), eaal3653
- SHI Y., WANG Y., SHAO C., *et al.* (2020) COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ.* 27(5), 1451-1454
- SMOLEN J.S., ALETAHA D., MCINNES I.B. (2016) Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 388(10055), 2023-2038
- SORIA LOPEZ J.A., GONZÁLEZ H.M., LÉGER G.C. (2019) Alzheimer's disease. *In Handbook of Clinical Neurology.* Amsterdam, Elsevier, 167 pp 231-255
- SPINELLI S., FRENKEN L., BOURGEOIS D., *et al.* (1996) The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3(9), 752-757
- STALIN RAJ V., OKBA N.M.A., GUTIERREZ-ALVAREZ J., *et al.* (s. d.) Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. *Sci. Adv.* 4(8), eaas9667
- STEELAND S., PUIMÈGE L., VANDENBROUCKE R.E., *et al.* (2015) Generation and Characterization of Small Single Domain Antibodies Inhibiting Human Tumor Necrosis Factor Receptor 1. *J. Biol. Chem.* 290(7), 4022-4037
- STEELAND S., VANDENBROUCKE R.E., LIBERT C. (2016) Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov. Today* 21(7), 1076-1113
- STIJLEMANS B., DE BAETSELIER P., CALJON G., *et al.* (2017) Nanobodies As Tools to Understand, Diagnose, and Treat African Trypanosomiasis. *Front. Immunol.* 8, 724
- STRELTSOV V.A., VARGHESE J.N., MASTERS C.L., NUTTALL S.D. (2011) Crystal Structure of

the Amyloid- β p3 Fragment Provides a Model for Oligomer Formation in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 31(4), 1419-1426

SUN S., DING Z., YANG X., *et al.* (2021) Nanobody: A Small Antibody with Big Implications for Tumor Therapeutic Strategy. *Int. J. Nanomedicine* 16, 2337-2356

SUTHERLAND D.B., SUZUKI K., FAGARASAN S. (2016) Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. *Immunol. Rev.* 270(1), 20-31

SZYNOL A., DE SOET J.J., SIEBEN-VAN TUYL E., BOS J.W., FRENKEN L.G. (2004) Bactericidal effects of a fusion protein of llama heavy-chain antibodies coupled to glucose oxidase on oral bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(9), 3390-3395

TALBOT A., BENICHOU N., BOUTBOUL D., *et al.* (2020) Maladies des chaînes lourdes. *Rev. Francoph. Lab.* n°521, 72-80

TANAKA T., LOBATO M.N., RABBITTS T.H. (2003) Single Domain Intracellular Antibodies: A Minimal Fragment For Direct In Vivo Selection of Antigen-specific Intrabodies. *J. Mol. Biol.* 331(5), 1109-1120

TARR A.W., LAFAYE P., MEREDITH L., *et al.* (2013) An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission. *Hepatology* 58(3), 932-939

THE NOBEL FOUNDATION (1901) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1901. [<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1901/summary/#:~:text=The%20Nobel%20Prize%20in%20Physiology%20or%20Medicine%201901%20was%20awarded,victorious%20weapon%20against%20illness%20and>], (consulté le 26/01/2021).

THUENG-IN K., THANONGSAKSRIKUL J., SRIMANOTE P., *et al.* (2012) Cell Penetrable Humanized-VH/VHH That Inhibit RNA Dependent RNA Polymerase (NS5B) of HCV. *PLoS One* 7(11), e49254

THYS B., SCHOTTE L., MUYLDERMANS S., *et al.* (2010) In vitro antiviral activity of single domain antibody fragments against poliovirus. *Antiviral Res.* 87(2), 257-264

TIAN B., WONG W.Y., HEGMANN E., *et al.* (2015) Production and Characterization of a Camelid Single Domain Antibody-Urease Enzyme Conjugate for the Treatment of Cancer. *Bioconjug. Chem.* 26(6), 1144-1155

TILLIB S.V., IVANOVA T.I., VASILEV L.A., *et al.* (2013) Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Res.* 97(3), 245-254

TOGTEMA M., HUSSACK G., DAYER G., *et al.* (2019) Single-Domain Antibodies Represent Novel Alternatives to Monoclonal Antibodies as Targeting Agents against the Human Papillomavirus 16 E6 Protein. *Int. J. Mol. Sci.* 20(9), 2088

TONEGAWA S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302(5909), 575-581

TZENG S.-R., KALODIMOS C.G. (2012) Protein activity regulation by conformational entropy. *Nature* 488(7410), 236-240

UNKELESS J.C., SHEN Z., LIN C., DEBEUS E. (1995) Function of human Fc γ R1A and Fc γ R1IB.

Semin Immunol, 7(1), 37-44

UTSUMI S., KARUSH F. (1964) The Subunits of Purified Rabbit Antibody. *Biochemistry* 3(9), 1329-1338

VAN IMPE K., BETHUYNE J., COOL S., *et al.* (2013) A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 15(6), R116

VANDENBROUCKE K., DE HAARD H., BEIRNAERT E., *et al.* (2010) Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol.* 3(1), 49-56

VANLANDSCHOOT P., STORTELEERS C., BEIRNAERT E., *et al.* (2011) Nanobodies®: New ammunition to battle viruses. *Antiviral Res.* 92(3), 389-407

VASHISHTHA V.M., KUMAR P. (2021) Development of SARS-CoV-2 vaccines: challenges, risks, and the way forward. *Hum. Vaccines Immunother.* 17(6), 1635-1649

VERHEESEN P., DE KLUIJVER A., VAN KONINGSBRUGGEN S., *et al.* (2006) Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyA-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Hum. Mol. Genet.* 15(1), 105-111

VINCKE C., GUTIÉRREZ C., WERNERY U., *et al.* (2012) Generation of Single Domain Antibody Fragments Derived from Camelids and Generation of Manifold Constructs. *In Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology.* Totowa, NJ, Humana Press, pp 145-176

VODOVAR D., ABOAB J., SILVA S., TOURNIER N., pour la Commission de recherche translationnelle de la SRLF (2019) Comprendre la tomographie par émission de positons (TEP) — une modalité d'imagerie pour la réanimation ? *MIR* 28(4), 347-352

VUCHELEN A., PARDON E., STEYAERT J., *et al.* (2013) Production, crystallization and X-ray diffraction analysis of two nanobodies against the Duffy binding-like (DBL) domain DBL6 ϵ -FCR3 of the *Plasmodium falciparum* VAR2CSA protein. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69(Pt 3), 270-274

WAGNER T.R., OSTERTAG E., KAISER P.D., *et al.* (2021) NeutrobodyPlex-monitoring SARS-CoV-2 neutralizing immune responses using nanobodies. *EMBO Rep.* 22(5), e52325

WANG H., MENG A.-M., LI S.-H., ZHOU X.-L. (2017) A nanobody targeting carcinoembryonic antigen as a promising molecular probe for non-small cell lung cancer. *Mol. Med. Rep.* 16(1), 625-630

WARD E.S., GÜSSOW D., GRIFFITHS A.D., JONES P.T., WINTER G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341(6242), 544-546

WARNER H.R. (1999) Apoptosis: A Two-edged Sword in Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 887(1), 1-11

WEISS R.A., VERRIPS C.T. (2019) Nanobodies that Neutralize HIV. *Vaccines* 7(3), 77

WESOLOWSKI J., ALZOGARAY V., REYELT J., *et al.* (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*

198(3), 157-174

- WHEELER J.C. (2012) South American camelids - past, present and future. *J. Camelid Sci.* 5, 1-24
- WILSON I.A., STANFIELD R.L. (1994) Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4(6), 857-867
- WU Y., LI C., XIA S., *et al.* (2020) Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 27(6), 891-898.e5
- XIANG Y., NAMBULLI S., XIAO Z., *et al.* (2020) Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2. *Science* 370(6523), 1479-1484
- YOO T.J., ROHOLT O.A., PRESSMAN D. (1967) Specific Binding Activity of Isolated Light Chains of Antibodies. *Science* 157(3789), 707-709
- YU F., WANG Y., XIAO Y., *et al.* (2014) RP215 single chain fragment variable and single domain recombinant antibodies induce cell cycle arrest at G0/G1 phase in breast cancer. *Mol. Immunol.* 59(1), 100-109
- YU S., XIONG G., ZHAO S., *et al.* (2021) Nanobodies targeting immune checkpoint molecules for tumor immunotherapy and immunoimaging (Review). *Int. J. Mol. Med.* 47(2), 444-454
- ZEMLIN M., KLINGER M., LINK J., *et al.* (2003) Expressed Murine and Human CDR-H3 Intervals of Equal Length Exhibit Distinct Repertoires that Differ in their Amino Acid Composition and Predicted Range of Structures. *J Mol Biol*, 334(4):733-49
- ZHANG Q., WU L., LIU S., *et al.* (2020) Targeted nanobody complex enhanced photodynamic therapy for lung cancer by overcoming tumor microenvironment. *Cancer Cell Int.* 20(1), 570
- ZHENG L., WANG L., AJANI J., XIE K. (2004) Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer* 7(2), 61-77
- ZIGMOND M.J., ROWLAND L.P., COYLE J.T. (2015) Neurobiology of brain disorders: biological basis of neurological and psychiatric disorders. Amsterdam, Elsevier

Annexe 1 : Les antigènes tumoraux, variables cibles thérapeutiques des nanocorps

TYPE TUMORAL	NANOCORPS	CIBLES ET AVANTAGES	APPLICATION THERAPEUTIQUE	REFERENCES
	Nb anti-EGFR 7D12 couplé à un fluorochrome IRDye800CW : 7D12-IR	EGFR (Récepteur du facteur de croissance épidermique) : fixation 30 min après injection, uniquement sur la tumeur	Couplage à de l'albumine de souris : inhibition de la croissance tumorale par compétition	(Sun et al., 2021)
CARCINOMES COLORECTAUX, PULMONAIRES, MAMMAIRES, OVARIENS	Nb anti-CEA : cAb-CEA5	ACE (Antigène carcinoembryonnaire) : glycoprotéine spécifique des tumeurs d'origine épithéliale	Couplage à une b-lactamase de E. cloacae P99 : enzyme qui catalyse les réactions de formation de molécules cytotoxiques à partir de céphalosporine et permet la réduction et guérison	(Cortez-Retamozo et al., 2004 ; Wang et al., 2017)
ADENOCARCINOME DU CANAL PANCREATIQUE	Nb anti-HIF-1 α : VHH212	Domaine PAS-B de HIF-1 α (Facteur-1 α inducible par l'hypoxie) : facteur de transcription qui assure l'homéostasie endosomatique de l'oxygène et favorise donc la prolifération et les métastases des cellules tumorales en régulant l'angiogenèse et le métabolisme du glucose	Co-traitement à la gemcitabine : diminution de la résistance au traitement de gemcitabine et donc inhibition du développement du cancer dans le modèle de xénogreffe sur modèle murin	(Groot et al., 2009 ; Kang et al., 2021)
MELANOME	Nb anti-leptine : anti-LepR	LepR (Récepteur à la leptine) : hormone impliquée dans la croissance tumorale	Injection locale à faible dose d'Ac anti-LepR : diminution de la taille de la tumeur	(McMurphy et al., 2014)

		par effet mitogène et angiogénique	et diminution de l'angiogénèse	
CARCINOME PULMONAIRE NON A PETITES CELLULES	Nb anti-CEA-CAM6 : AFAIKL2	CEACAM6 : antigène tumoral de surface	Couplage à un fragment d'enzyme uréase (L-DOS47) : convertit l'urée endogène en ammoniac cytotoxique	(Tian et al., 2015)
ADENOCARCINOME MAMMAIRE	Nb anti-CapG	CapG : protéines constituant le cytosquelette d'actine, investie dans la dissémination de la tumeur	Inhibition de la CapG : réduit la formation de métastases	(Van Impe et al., 2013)
CARCINOME DU COLON	Nb multivalents anti-DR5 : Nb28, DR5Nb1, TAS266, IgG2 et IgG3	DR5 (Récepteur de mort 5) : récepteur transmembranaire impliqué dans la voie de signalisation de mort cellulaire dépendante des caspases	Induction de l'apoptose de cellules tumorales du cancer du côlon in vitro et dans certains modèles in vivo	(Huet et al., 2014 ; Allegra et al., 2018 ; Sadeghian-Rizi et al., 2020)
CARCINOME HEPATOCELLULAIRE (CHC)	Nb anti-GPC3 : HN3	GPC3 (Glypican 3) : protéine exprimée uniquement dans les cellules de tumeur du foie	Inhibition de la croissance cellulaire et blocage du développement tumoral	(Feng et al., 2013)
MYELOME MULTIPLE (MM)	Nb anti-CD38 : 1053	CD38 (ADP ribosidyldihydrolyase cyclique) : glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, la transduction du signal et la signalisation du calcium, aussi présente chez les cellules du MM	Couplage à une toxine bactérienne (PE38) formant une immunotoxine : cytotoxicité dirigée contre les cellules dérivées de MM	(Ting Li et al., 2016)
MYELOME MULTIPLE (MM)	Nb anti-c-MET	c-MET : récepteur tyrosine kinase du facteur de croissance des hépatocytes (HGF)	Inhibition de l'incorporation de thymidine des cellules ANBL- 6 et INA-6 contrôlée par le HGF, permet donc le blocage de la migration et adhésion des cellules du MM	(Allegra et al., 2018)

<p>GLIOME DE HAUT GRADE (GHG)</p>	<p>Nb anti-EGFR : ENb</p>	<p>EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique</p>	<p>Inhibition de la signalisation de l'EGFR : réduit la croissance et l'invasivité des GHG in vitro et in vivo et amorce l'apoptose induite par TRAIL</p>	<p>(Allegra et al., 2018)</p>
<p>LYMPHOME B</p>	<p>Nb anti-BAFF : anti-BAFF64, anti-BAFF52 et anti-BAFFG3</p>	<p>BAFF : facteur d'activation des cellules B, permet la survie des cellules B malignes</p>	<p>Réduction de la prolifération des cellules cancéreuses in vitro</p>	<p>(Allegra et al., 2018)</p>
<p>ADENOCARCINOME MAMMAIRE</p>	<p>Nb anti-AKT2 : Nb8 et Nb9</p>	<p>AKT2 : kinase impliquée dans les voies de signalisation cellulaire</p>	<p>Réduction de la phosphorylation du motif hydrophobe d'AKT2 dans les cellules stimulées par l'IGF-1, affecte la phosphorylation et les niveaux d'expression de la voie (PI3K)-AKT et induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, une autophagie et des changements dans le cytosquelette</p>	<p>(Merckaert et al., 2021)</p>

Annexe 2 : Rôles de TNFR1 et TNFR2 évalués indépendamment dans divers modèles de souris et données disponibles chez l'homme

		Mouse Models	
		TNFR1 ^{-/-} (or blockade)	TNFR2 ^{-/-} (or blockade)
Outcomes Improved	<p>Neuro</p> <ul style="list-style-type: none"> Experimental autoimmune encephalitis (EAE; model of acute demyelination disease) <i>via</i> reduced immune cell infiltration across blood brain barrier (84) Retinal detachment induced photoreceptor degeneration (85)[§] Early phase heat hyperalgesia after CFA injection (86)[§] Late phase heat hyperalgesia after CFA injection (86)* Mechanical pain (87) Pain mediated by NMDA activation of lamina II neurons (86) <p>Gastrointestinal</p> <ul style="list-style-type: none"> High fat induced liver steatosis (88) Total peripheral nutrition (TPN) induced epithelial barrier function loss (89) <p>Infection/Inflammation/Allergic</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Staphylococcus aureus</i> sepsis <i>via</i> T-cell anergy (90) Sterile endotoxemia (91) LPS induced bone loss (92) LPS-induced systemic apoptosis of non-granulocyte bone marrow cells (93) Cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis (94)* Loss of small in olfactory dysfunction and chronic rhinitis models (95) <i>Chlamydia pneumoniae</i> induced atherosclerosis (96)[§] Allergic contact dermatitis model (reduced allergen uptake but not migration of dendritic cells (DC) into lymph nodes) (97)[§] <p>Cardio-renal</p> <ul style="list-style-type: none"> Transverse aortic constriction model of cardiac stress <i>via</i> Stat3 (98) Mesenchymal stem cell as treatment of cardiac ischemia (99)* Femoral artery ligation model of ischemia (100)* Heart failure model (101)* Thrombosis model (102)* <p>Endocrine</p> <ul style="list-style-type: none"> Adrenalectomy model of Addison's (103) <p>Pulmonary</p> <ul style="list-style-type: none"> Transgenic model of spontaneous COPD; TNFR1^{-/-} improved more than TNFR2^{-/-} mice (104) 	<p>Neuro</p> <ul style="list-style-type: none"> EAE if selectively deleted in monocytes/macrophages (105) Retinal detachment induced photoreceptor degeneration (85)[§] Neuronal loss (but not motor function) in SOD1-G93A model of ALS (106) Early phase heat hyperalgesia after CFA injection (86)[§] <p>Gastrointestinal</p> <ul style="list-style-type: none"> Rhesus rotavirus-induced biliary atresia (107) Trinitrobenzene sulfonic acid colitis (108)* DSS colitis (109)* <p>Infection/Inflammation/Allergic</p> <ul style="list-style-type: none"> Allergic contact dermatitis model (reduced DC migration but not allergen uptake) (97)[§] Chronic TNFα induced inhibition of TCR-dependent, but not TCR independent T-cell activation (110) <i>Chlamydia pneumoniae</i> induced atherosclerosis (96)[§] <p>Endocrine</p> <ul style="list-style-type: none"> Adrenalectomy model of Addison's (103) <p>Pulmonary</p> <ul style="list-style-type: none"> Transgenic model of spontaneous COPD; TNFR1^{-/-} improved more than TNFR2^{-/-} mice (104) <p>Cancer</p> <ul style="list-style-type: none"> Breast cancer cell line challenge (111) 	
Outcomes Worsened	<p>Neuro</p> <ul style="list-style-type: none"> Post-exercise recognition memory (112) HSV-1 ocular infection (113) <p>Gastrointestinal</p> <ul style="list-style-type: none"> Trinitrobenzene sulfonic acid colitis (108)* DSS colitis (109)* <p>Infection/Inflammation/Allergic</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Roseomonas mucosa</i> treatment of atopic dermatitis (114)[§] <p>Cardio-renal</p> <ul style="list-style-type: none"> Angiotensin II infusion induced hypertension; TNFR2 not evaluated (115) 	<p>Neuro</p> <ul style="list-style-type: none"> Theiler murine encephalomyelitis virus epilepsy model (116) EAE if selectively deleted in microglia (105) or whole (117) <p>Gastrointestinal</p> <ul style="list-style-type: none"> Cell mediated colitis (118) <p>Infection/Inflammation/Allergic</p> <ul style="list-style-type: none"> Cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis (94)* <i>Roseomonas mucosa</i> treatment of atopic dermatitis (114)[§] <p>Cardio-renal</p> <ul style="list-style-type: none"> Mesenchymal stem cell as treatment of cardiac ischemia (99)* Femoral artery ligation model of ischemia (100)* Heart failure model (101)* Thrombosis model (102)* 	

Human Data

	TNFR1-specific	TNFR2-specific
Associations	<p>Neuro</p> <ul style="list-style-type: none"> Elevations a/w worse sleep in patients with depression; reductions a/w improved sleep and symptoms after infliximab treatment (119) <p>Gastrointestinal</p> <ul style="list-style-type: none"> Elevations predict post-liver transplant need for dialysis and overall mortality (120) <p>Infection/Inflammation/Allergic</p> <ul style="list-style-type: none"> Increased expression on T-cells of patients with atopic dermatitis (121) Reduction a/w clinical improvement of lupus after atorvastatin therapy (122) Higher expression on alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis (123)* Nebulized anti-TNFR1 reduced inflammation in pulmonary endotoxin challenge (124) <p>Endocrine</p> <ul style="list-style-type: none"> In diabetics presenting to an ER with shortness of breath, elevations associated with short-term mortality, HR, BMI, and renal function; was not significant when adjusting for CRP (125) Elevations predictive of renal disease in diabetics (126–128), <p>Cancer</p> <ul style="list-style-type: none"> Elevations a/w worse outcomes in patients with GVHD after a BMT with ablative conditioning (129) <p>Monogenic Disorders [all reviewed in (130)]</p> <ul style="list-style-type: none"> TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS); mutations in <i>TNFRSF1A</i> Haploinsufficiency of A20 (HA20); mutations in <i>TNFAIP3</i> OTULIN-related autoinflammatory syndrome (ORAS); mutations in <i>FAM105B</i> LUBAC deficiency; mutations in <i>HOIP/HOIL</i> or <i>SHARPIN</i> RIPK1 associated immunodeficiency and autoinflammation; mutations in <i>RIPK1</i> X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency (X-EDA-ID); mutations in <i>IKBKG/NEMO</i> RELA haploinsufficiency; mutations in <i>RELA</i> 	<p>Infection/Inflammation/Allergic</p> <ul style="list-style-type: none"> Higher expression on lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis (123)* <p>Cancer</p> <ul style="list-style-type: none"> Tissue expression higher in breast cancer cells versus healthy breast tissue (131) <p>Monogenic Disorders</p> <ul style="list-style-type: none"> ADAM17/TACE deficiency a/w reduced LPS-stimulated TNFα and sTNFR2 in PBMC (132, 133),

Mouse models included in the table indicate selective deletion or antibody blockade of TNFR1 or TNFR2. Models using only TNFR double knockout mice were not included. Human data for diseases associated with changes in one TNFR (serum or tissue) are shown. *indicates opposing effects of TNFR deletion (for example, deletion of TNFR1 worsening outcomes while deletion of TNFR2 improving them); †indicates similar effects of TNFR deletion where both were assessed independently. LPS, lipopolysaccharide; DSS, dextran sodium sulfate; COPD, chronic obstructive pulmonary disorder; HSV-1, herpes simplex virus 1; TCR, T-cell receptor; ER, emergency room; HR, heart rate; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; GVHD, graft versus host disease; BMT, bone marrow transplant; CFA, complete Freud's adjuvant; LPS, lipopolysaccharide; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; a/w, associated with.

PARTICULARITÉS DES ANTICORPS DE LAMA ET AUTRES CAMÉLIDÉS ET LEURS INTÉRÊTS THÉRAPEUTIQUES

AUTEUR : Eileen SCHNEIDER

RÉSUMÉ :

Il s'est écoulé quelques dizaines de millions d'années depuis l'émergence des anticorps conventionnels jusqu'à la découverte en 1993 des anticorps à domaines uniques (sdAbs ou VHH) dépourvus de chaînes légères, également connus sous le nom de nanocorps, chez les lamas et autres camélidés. Les raisons de leurs conditions d'apparition ne sont pas encore totalement élucidées, mais il ne fait aucun doute qu'ils doivent permettre une réponse immunitaire adaptative remarquable chez ces espèces de camélidés (*Camelus dromedarius* et *Camelus bactrianus*), de lamas et alpagas (*Lama glama*, *Lama pacos* et *Lama guanicoe*), de vigognes (*Vicugna vicugna* et *Vicugna pacos*), mais aussi de poissons cartilagineux, chez lesquels ils sont également présents. En effet, une pression de sélection a certainement permis leur émergence au sein de taxons variés, où ils sont retrouvés, circulants dans le plasma, en diverses proportions. Leurs caractéristiques morphologiques et physico-chimiques, à savoir leur petite taille (~15kDa), leur haute affinité, leur forte spécificité, leur faible immunogénicité, leur modularité, leur simplicité de production, leur stabilité et résistance à des conditions environnementales extrêmes, leur permettent de devenir des outils de biotechnologie intéressants. Leur production, basée sur l'immunisation de camélidés, et leur sélection via des techniques de « phage display », permet de produire de grandes bibliothèques d'anticorps, et à faible coût. Actuellement à l'étude, et parfois même en cours de développement, les nanocorps trouvent des domaines d'application dans les milieux de la recherche, la médecine et l'industrie. Outils d'imagerie médicale, thérapie contre le cancer, dépistage précoce et perspectives de traitement de la maladie d'Alzheimer, développement de médicaments et vaccins, outils diagnostics, sont autant de possibilités qui s'offrent aux nanocorps. Ces petites molécules ont indéniablement un avenir prometteur devant elles.

MOTS CLÉS :

IMMUNITÉ, IMMUNISATION, ANTICORPS, NANOCORPS, INTÉRÊTS THÉRAPEUTIQUES, BIOTECHNOLOGIE, CAMELIDÉS, LAMA

JURY :

Président : Dr Matthias KOHLHAUER

Directrice de thèse : Dr Delphine LE ROUX

Examinatrice : Dr Véronica RISCO-CASTILLO

CHARACTERISTICS OF LLAMA AND OTHER CAMELID ANTIBODIES AND THEIR THERAPEUTIC BENEFITS

AUTHOR: Eileen SCHNEIDER

SUMMARY:

A few tens of millions of years have passed since they emerged, until 1993 and the discovery of single-domain antibodies (sdAbs or VHH) lacking light chains, also known as nanobodies, in llamas and other camelids. The reasons for their appearance are not yet fully elucidated, but there is no doubt that they should allow a remarkable adaptive immune response for these species of camelids (*Camelus dromedarius* and *Camelus bactrianus*), llamas and alpacas (*Lama glama*, *Lama pacos* and *Lama guanicoe*), vicuñas (*Vicugna vicugna* and *Vicugna pacos*) or cartilaginous fish, in which they are also found. Indeed, natural selection pressure has certainly allowed their emergence within various taxa, where they are found, circulating in the plasma, in various proportions. Their morphological and physico-chemical characteristics, namely their small size (~15kDa), their high affinity, their strong specificity, their low immunogenicity, their modularity, their simplicity of production, their stability and resistance to extreme environmental conditions, makes them interesting biotechnology tools. Their production, based on the immunization of camelids, and their selection via phage display techniques allows the manufacture of large antibody libraries at low cost. Currently under study and sometimes even under development, nanobodies have applications in various fields such as research, medicine and industry. Medical imaging tools, cancer therapy, early detection of Alzheimer's disease, development of vaccines, diagnostic tools, are all possibilities offered by nanobodies. Thus, these small molecules certainly have a promising future ahead of them.

KEYWORDS:

IMMUNITY, IMMUNIZATION, ANTIBODIES, NANOBODIES, THERAPEUTIC INTEREST, BIOTECHNOLOGY, CAMELIDS, LLAMA

JURY:

Chairperson: Dr Matthias KOHLHAUER

Thesis Director: Dr Delphine LE ROUX

Reviewer: Dr Véronica RISCO-CASTILLO