

# Les anticorps catalytiques

## Des biocatalyseurs préparés sur mesure pour le chimiste organicien

Michel Thérissod\* professeur, Hélène Thérissod\* maître de conférences, Laurent Brochard\*\* docteur ès science

La subtilisine de *Bacillus amyloliquefaciens* est une protéase à sérine. Son activité catalytique s'appuie sur une "triade catalytique" aspartate-histidine-sérine, que l'on rencontre également dans la chymotrypsine, la trypsine, certaines lipases. La liaison ester (amide) à couper est attaquée par la fonction alcool de la sérine, préalablement activée sous forme d'alcoolate par transfert du proton sur le carboxylate de l'aspartate via l'imidazole de l'histidine. C'est dire si ces trois acides aminés paraissent indispensables à l'activité de cette protéase. En 1988, des chercheurs ont fabriqué, par mutagenèse dirigée, une variante de l'enzyme, dans laquelle chaque membre de la triade était remplacé par un acide aminé neutre, l'alanine [1]. On pourrait penser que cette enzyme modifiée n'est plus active, puisque les groupements chimiques impliqués dans la catalyse ont disparu. Elle l'est cependant :  $10^6$  fois moins que l'enzyme originale. Mais en sa présence, l'hydrolyse d'une liaison amide est mille fois plus rapide que la réaction non catalysée. Il faut préciser que cette enzyme, qui a perdu ses outils catalytiques garde une affinité respectable pour ses substrats habituels.

La persistance de cette petite activité peut être considérée comme une preuve de la validité de l'hypothèse de L. Pauling (1948) [2], que l'on peut résumer ainsi : les enzymes diminuent l'énergie d'activation de la réaction qu'ils catalysent, et un des processus impliqués est une stabilisation de l'état de transition, bien mieux adapté au site actif que le substrat ou le produit de la réaction. Cet état de transition est une espèce, par nature, éphémère et instable, qui se retrouve collée au site actif par une multitude d'interactions, qui n'existent pas dans le complexe enzyme-substrat ni dans le complexe enzyme-produit. La

subtilisine mutée a perdu la triade d'acides aminés responsable de la catalyse nucléophile, mais elle a toujours les résidus du site actif capables de lier l'état de transition de la réaction d'hydrolyse et d'abaisser son énergie. *Il suffit donc, pour qu'une protéine accélère une réaction, qu'elle ait une affinité pour l'état de transition de cette réaction.*

Par nature, un état de transition est une espèce fugace, de haute énergie, de temps de vie limité, dans laquelle des liaisons covalentes sont partiellement coupées ou établies, où des charges apparaissent ou disparaissent. Si on croit connaître la structure de l'état de transition d'une réaction, on peut synthétiser une molécule stable qui lui ressemble : on a ainsi préparé un grand nombre d'inhibiteurs d'enzymes dits "analogues d'état de transition". Si on injecte à un animal un tel produit, il va réagir en produisant contre cet "antigène" (substance étrangère à l'organisme) des protéines, dites "anticorps", chargées de le neutraliser en se fixant à lui (les complexes antigènes-anticorps ont des constantes de dissociation couramment de l'ordre de  $10^{-10}$  ou mieux). Ces anticorps vont aussi avoir une certaine affinité pour l'état de transition (le vrai) de la réaction choisie, donc le stabiliser, donc accélérer la réaction.

Les premières tentatives faites au début des années 70 pour produire des anticorps catalytiques ont souffert de ce qu'elles avaient porté sur des polyclonaux, mélanges dans lesquels les anticorps catalytiques, s'ils étaient présents, étaient sans doute trop dilués. Après l'invention des anticorps monoclonaux par Kohler et Milstein en 1975 [3], l'idée est devenue plus réaliste. Les anticorps polyclonaux sont obtenus simplement à partir du sérum de l'animal immunisé ; c'est un mélange d'anticorps (plusieurs dizaines peut-être), d'affinités et de spécificités différentes vis-à-vis de l'antigène, pratiquement impossibles à séparer. Un anticorps monoclonal, au contraire, est une protéine pure, qu'on peut obtenir en grande quantité (plusieurs centaines de mg). Les premiers anticorps (monoclonaux) catalytiques ont été décrits en 1986 par la parution quasi simultanée des résultats des groupes de R. Lerner (Scripps, La Jolla, Californie) [4] et P. Schultz (Berkeley, Californie) [5]. Dans les deux cas, la réaction catalysée était l'hydrolyse d'une fonction ester ; l'haptène ayant servi à induire les anticorps était un composé contenant un groupement phosphonate mimant l'intermédiaire tétraédrique (proche de l'état de transition) qui se forme pendant l'hydrolyse (figure 1). Depuis, plusieurs dizaines d'articles

\* LGPC, Pôle Sciences, Université de La Rochelle, 17042 La Rochelle Cedex 1. Tél. : 46.45.82.68. Fax : 46.45.82.47.

\*\* 39, rue Nusement, 28100 Dreux. Tél. : 37.42.36.64.

sont parus, de nombreuses équipes se sont lancées à la chasse aux "abzymes" (ab : antibodies) et les stratégies imaginées pour l'induction des anticorps catalytiques se sont diversifiées.

## Les stratégies

### Stabilisation de l'état de transition

La méthode originelle, décrite ci-dessus, est celle qui a été la plus employée. Elle présuppose que l'on sache à quoi ressemble l'état de transition de la réaction que l'on veut étudier. La stratégie est illustrée par les deux exemples rapportés ci-dessous :

– On sait que l'hydrolyse en milieu basique d'un ester (ou d'un carbonate, ou d'un amide, ou d'un carbamate...) passe par la formation d'un intermédiaire tétraédrique chargé négativement. On peut mimer efficacement cet intermédiaire par un groupement phosphonate (ou phosphate, ou phosphonamide...) (figure 1). Nombre d'inhibiteurs de protéases et d'estérases ont été préparés selon ce principe [6]. Un simple alcool secondaire peut aussi jouer ce rôle. Dans de nombreux cas, on a montré que les anticorps dirigés contre des haptène contenant de tels groupements pouvaient catalyser des réactions d'hydrolyse [4, 5].

- Dans l'autre exemple (figure 1), l'haptène mime l'apparition de charges dans l'état de transition d'une réaction d'oxydation d'un sulfure par le périodate.

### Pièges à entropie

La stratégie est très proche de la précédente, puisqu'elle consiste également en la synthèse d'un analogue d'état de transition. On pense cependant que les anticorps catalytiques correspondants agissent en réduisant les degrés de liberté des substrats sur lesquels ils agissent, plutôt qu'en stabilisant l'état de transition. En d'autres termes, le facteur touché est l'entropie d'activation de la réaction plutôt que l'enthalpie d'activation. Il y a, en contrepartie, un gros risque d'inhibition par le produit. Dans le cas de la réaction de Diels et Alder, l'haptène ressemble en fait au produit de la réaction, dont l'état de transition est proche. L'anticorps incite les substrats à se rapprocher l'un de l'autre, et le diène à adopter une conformation *s-cis* réactive (figure 2).

### Introduction de groupements responsables d'une catalyse chimique

Dans le cas de la subtilisine de *B. amyloliquefaciens*, qui interagit avec l'état de transition de la réaction, la présence d'une catalyse chimique permet de multiplier la vitesse par  $10^6$ . La présence de groupes catalytiques dans un anticorps reconnaissant le substrat peut être également efficace.

### Induction de charge

Un groupement chargé dans un haptène peut induire la présence d'un groupement de charge opposée dans l'anticorps: un acide carboxylique présent dans le site de fixation peut ainsi servir, selon qu'il est ou non protoné, à une catalyse acide ou

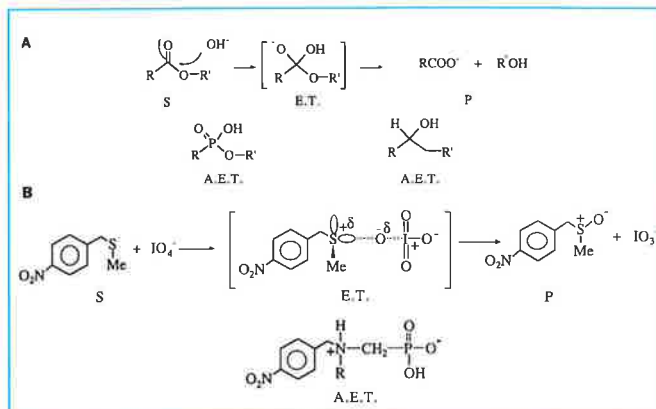


Figure 1 - Réactions catalysées par des anticorps catalytiques : A : hydrolyse d'ester ; B : oxydation d'un sulfure en sulfoxyde par le périodate. Substrats (S), produits (P), états de transition (E.T.) et analogues stables d'état de transition (A.E.T.) ayant servi d'antigène (B : Hsieh L.C., Schultz P.G. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 2167).

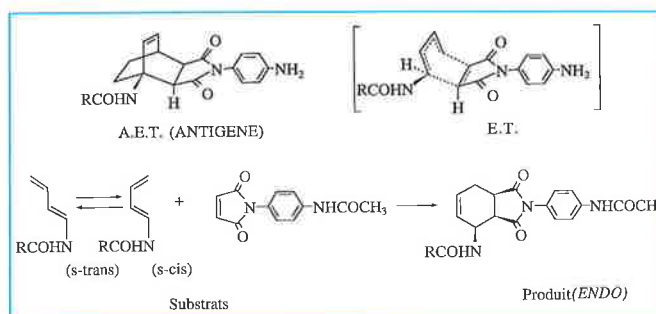


Figure 2 - Réaction de Diels et Alder catalysée par un anticorps monoclonal. L'état de transition (E.T.) et l'analogue stable utilisé pour l'immunisation sont très proches du produit (Braisted A.C., Schultz P.G., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 7430).

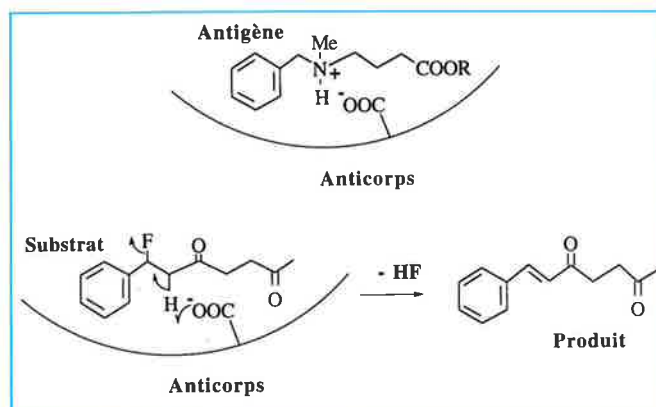


Figure 3 - Réaction d'élimination catalysée par un anticorps induit par immunisation avec un analogue chargé du substrat. La réaction est facilitée par la présence du carbonyle dans le substrat (Shokat K.M., Schultz P.G. et al., *Nature*, 1989, 338, 269 ; *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 2261).

basique générale. La charge dans l'haptène doit être placée de façon à induire une charge opposée idéalement située dans l'anticorps. La méthode a été utilisée plusieurs fois avec succès.

Ainsi, dans le cas présenté (figure 3), on a pensé que la présence d'un ammonium dans l'haptène puisse induire un groupe carboxylate dans l'anticorps (ce qui fut vérifié *a posteriori*). Le carboxylate joue le rôle d'une base qui catalyse l'élimination de HF (facilitée par la présence de la cétone). Noter que l'haptène est un analogue du substrat, et plus de l'état de transition.

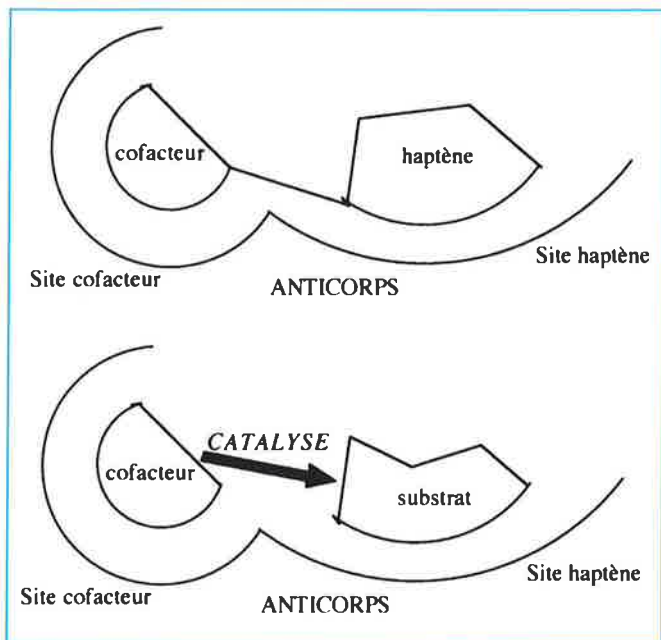


Figure 4 - Préparation d'un anticorps reconnaissant un haptène et le cofacteur qui lui est associé (pyridoxal, flavine, ion métallique, complexe...). Lors de la réaction, le cofacteur est ainsi idéalement placé pour catalyser la transformation du substrat.

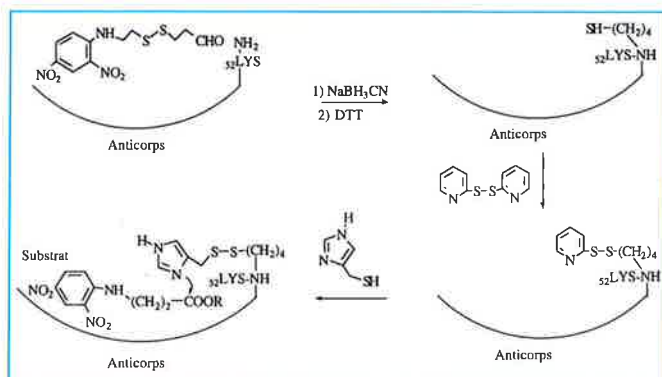


Figure 5 - Modification chimique d'un anticorps (non catalytique) spécifique d'un groupement DNP. L'introduction d'un groupe imidazole rend l'anticorps capable d'hydrolyser certains esters grâce à une catalyse nucléophile. Le substrat doit être porteur d'un DNP pour être reconnu par l'anticorps (Pollack S.J., Schultz P.G., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 1929).

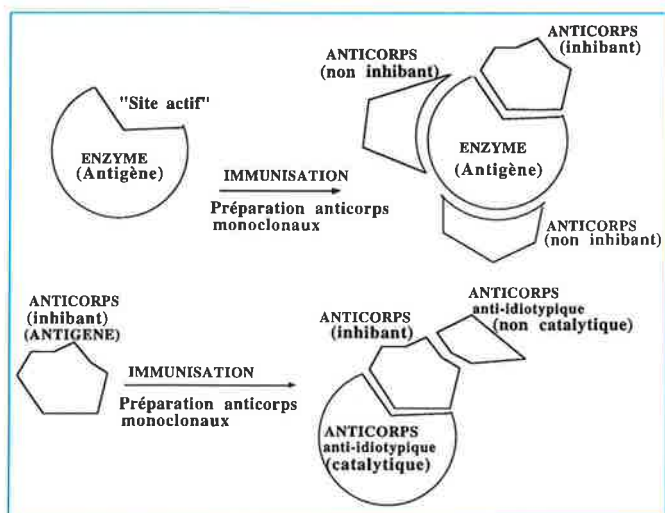


Figure 6 - Préparation d'anticorps catalytiques anti-idiotypiques. L'équipe d'Alain Friboulet, à Compiègne, a rapporté ainsi la préparation d'anticorps à activité acétylcholinestérase (Izadyar L., Thomas D. *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 8876).

### Mutagenèse dirigée

La méthode permet d'introduire à coup sûr dans le site de reconnaissance de l'anticorps un groupe catalytique (acide aminé chargé, imidazole d'histidine...). Elle suppose qu'on connaisse tout de l'anticorps qu'on veut muter (structure tridimensionnelle déduite de la diffraction des RX), donc qu'on l'a cristallisé, si possible avec son haptène, et qu'on sait le faire produire par un micro-organisme (qu'on l'a cloné). Ainsi, le remplacement d'une tyrosine par une histidine dans un anticorps spécifique de la 2,4-dinitrophénylaniline a permis de rendre cet anticorps actif dans l'hydrolyse d'un ester contenant ce groupement, au prix d'une petite diminution de l'affinité [7].

### Reconnaissance simultanée d'un cofacteur

L'haptène mime le substrat et le cofacteur correctement placés (figure 4) ; celui-ci peut être un co-enzyme [8], un complexe métallique [9], ou "simplement" (mais c'est en fait le plus difficile à réaliser) un ion métallique (Zn<sup>++</sup>) [10]. Dans ces deux derniers cas, le but avoué est la préparation d'abzymes à activité de type protéase à zinc (carboxypeptidase).

### Modification chimique

Cette stratégie n'a été utilisée à ce jour que dans deux cas. Elle consiste à introduire, par modification chimique, un groupe catalytique dans le site de fixation d'un anticorps dirigé contre le substrat qu'on veut traiter. Elle ne nécessite pas forcément de connaître les acides aminés présents. On peut envisager, par ailleurs, de toucher plusieurs acides aminés de la protéine, dont un du site de fixation. Le risque est alors de toucher un résidu nécessaire à une bonne reconnaissance.

Dans l'exemple rapporté, un anticorps non catalytique spécifique de la 2,4-dinitrophénylalanine est traité par l'haptène porteur d'un bras (linker). L'aldéhyde terminal va permettre une fixation covalente sur la protéine *via* une lysine qu'on suppose présente. Après réduction du pont disulfure, l'haptène est éliminé et remplacé par un imidazole qui catalyse l'hydrolyse d'un ester de coumarine (figure 5).

### Anticorps anti-idiotypiques

En réponse à l'injection d'une enzyme E exogène, un animal produit des anticorps anti-E. Parmi ceux-ci, certains sont dits inhibants : présents en quantités stoechiométriques, ils annulent l'activité de l'enzyme. Parmi ceux-ci, certains sont spécifiques du site actif de E. En réponse à l'injection de ces anti-E (préparés monoclonaux), l'animal produit des anti-anti-E (anti-idiotypiques). Ces derniers peuvent être préparés monoclonaux ou polyclonaux. On espère retrouver ainsi dans le site de fixation une image positive du site actif de l'enzyme (figure 6). La stratégie a été utilisée avec succès par l'équipe du LTE à Compiègne [11].

### Les performances des abzymes

L'efficacité des abzymes peut être discutée en terme de vitesse de réaction et en terme de sélectivité des réactions catalysées.

## Vitesse

Par rapport à la réaction non catalysée, l'accélération due à la catalyse par abzyme est dans la majorité des cas publiés extrêmement modeste par rapport à celle due aux enzymes naturelles : parfois quelques dizaines de fois, souvent quelques centaines à quelques milliers, exceptionnellement  $10^6$  à  $10^7$  [12]. La palme revient aux anticorps antiidiotypiques mimant l'acétylcholinestérase [11]. Mis à part ce cas particulier, les meilleurs abzymes sont de l'ordre de mille fois moins actifs que les enzymes. Plus grave, le "turnover" est souvent très faible, l'abzyme s'usant excessivement vite, souvent par inhibition due au produit (souvent un nitrophénol). Le tout premier abzyme décrit avait un turnover de 1 ! [13]. On peut espérer que, dans un avenir proche, ces limitations seront levées (pour partie) par l'utilisation sur un anticorps donné des techniques évoquées plus haut, la mutagenèse dirigée en particulier. On peut cependant difficilement espérer faire aussi bien que les enzymes naturelles, résultat de quelques millions d'années de perfectionnement. Comme on va le voir dans le chapitre suivant, les anticorps catalytiques ont pour eux bien d'autres atouts !

## Nature des réactions catalysées

S'ils sont souvent décevants par leur efficacité, les abzymes sont imbattables sur le plan de la variété et de la spécificité des réactions qu'ils catalysent, qui en font des catalyseurs sur mesure. Un grand nombre de réactions différentes ont déjà été décrites. Parmi celles-ci, certaines peuvent être catalysées par des enzymes naturelles : on demande alors à l'abzyme un "plus" : spécificité plus grande, ou qui n'existe pas chez les enzymes connues (hydrolyse d'une liaison peptidique particulière, par exemple), voire inversée par rapport à l'enzyme (hydrolyse plus rapide d'un phényléster que d'un nitrophényléster par exemple). Pour d'autres réactions catalysées, il n'existe pas d'enzymes connues : Diels-Alder, réarrangement de Cope, hydrolyses d'éthers...). Quelques exemples sont rapportés ci-dessous où les abzymes montrent une spécificité remarquable :

### Hydrolyse d'esters de phényle et de nitrophényle

Les lipases, protéases, estérases naturelles hydrolysent plus rapidement les esters de nitrophényle que les esters de phényle. Si un anticorps est spécifique d'un noyau phénylique non substitué, on peut voir la sélectivité inverse [14].

### Réductions régio- et énantiosélectives

Un anticorps catalytique induit contre un haptène donné ne "voit" dans un substrat possédant plusieurs fonctions que celle présente dans la partie de la molécule ressemblant à l'haptène. C'est la situation évoquée dans la figure 7, où une seule fonction carbonyle sur les deux présentes est réduite (régiosélectivité). Le produit obtenu est en plus optiquement actif (énantiosélectivité). Il n'y a que peu de chance de trouver une déshydrogénase capable d'une discrimination aussi fine.

### Transestérification dans l'eau

Un ester activé traité dans l'eau par un alcool en présence d'une lipase ne donne pratiquement que du produit d'hydrolyse. Dans les mêmes conditions, un abzyme peut faire une

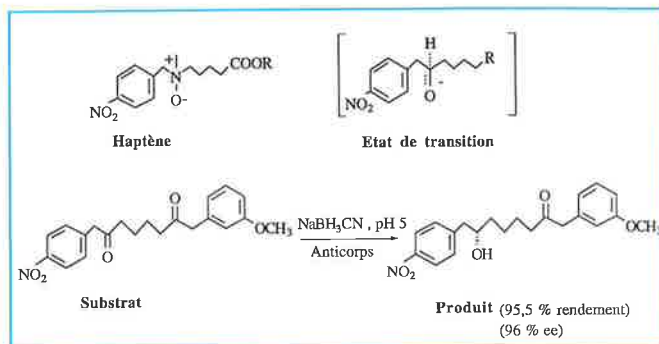


Figure 7 - Réduction régio- et énantiosélective d'une dicétoène par un anticorps catalytique (à pH 5, le cyanoborohydrure n'est pas capable seul de réduire une cétone (Hsieh L.C., Schultz P.G. et al., Science, 1993, 260, 337).

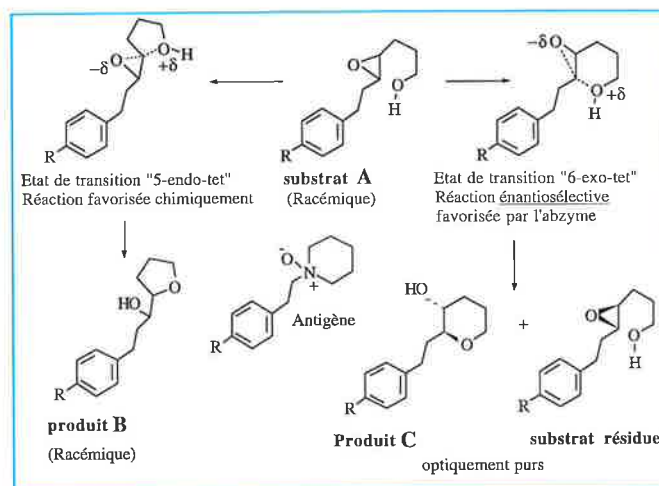


Figure 8 - Réaction cinétiquement défavorisée ("anti Baldwin") catalysée par un anticorps catalytique (Janda K.D., Lerner R.A. et al., Science, 1993, 259, 490).

transestérification, car il ne reconnaît pas l'eau comme son substrat. La réaction peut être en plus énantiosélective [15].

### Catalyse de réactions cinétiquement défavorisées

L'alcoolyse purement chimique et non catalysée de l'époxyde **A** conduit au produit **B** via un état de transition cinétiquement favorisé (figure 8). Le produit **C**, accessible via un état de transition de plus haute énergie, n'apparaît pas (règle de Baldwin). Un abzyme induit contre un analogue de ce dernier état de transition est capable d'inverser la situation. De plus, la réaction est énantiosélective, conduisant à un produit et au substrat résiduel (l'énantiomère qui n'a pas réagi) optiquement purs.

## Mécanismes des réactions catalysées

De plus en plus de publications rapportent maintenant des résultats d'études de mécanismes de fonctionnement des anticorps catalytiques. Dans une première période de l'histoire des abzymes, les auteurs ont cherché à montrer qu'un grand nombre de réactions différentes pouvaient être catalysées par des anticorps. Ils ont à chaque fois déterminé les caractéristiques cinétiques principales de leurs meilleurs anticorps ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/k_{uncat}$ , pH optimum...). Dans un deuxième temps seulement, ils ont cherché les mécanismes mis en jeu.

Les abzymes "ordinaires" agissent en stabilisant l'état de transition, comme prévu à l'origine. On ne peut alors pas mettre en évidence de catalyse chimique [16]. Dans d'autres cas (les

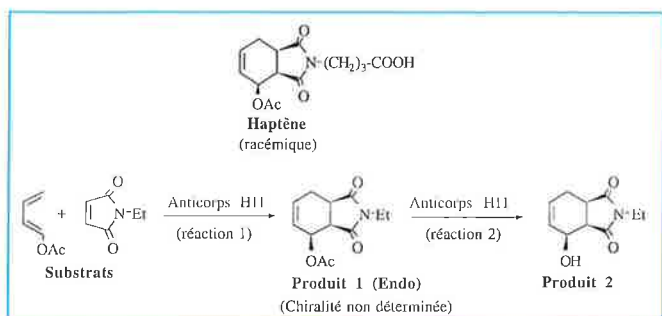


Figure 9 - Deux réactions successives catalysées par un même anticorps ; l'hydrolyse de l'acétate est sans doute due à la présence fortuite dans le site actif d'un acide aminé responsable d'une catalyse basique ou nucléophile (Suckling C.J. et al., *J. Chem. Soc. Perkin I Trans.*, 1993, 1925).

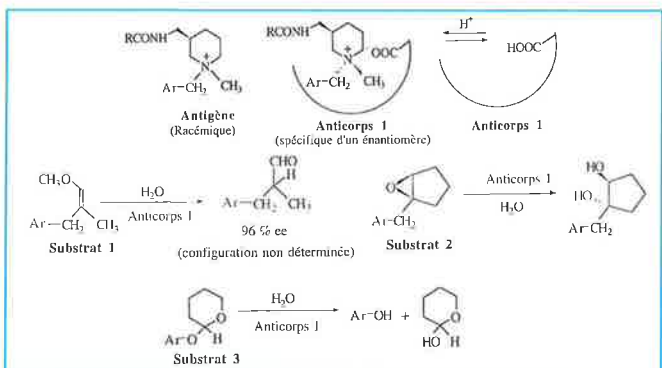


Figure 10 - Grâce au groupe carboxylique (carboxylate) induit dans l'anticorps 1 par la stratégie dite de "l'induction de charge", celui-ci peut catalyser trois réactions différentes sur trois substrats. Les substrats ont tous une analogie structurale avec l'antigène. Les réactions catalysées impliquent une attaque électrophile par l'acide carboxylique du site actif (Reymond J.L., Lerner R.A. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 3909 ; Sinha S.C., Reymond J.L. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 4893 ; Reymond J.L., Lerner R.A. et al., *Angew Chem, Int. Ed.* 30, 1991, 1711).

meilleurs abzymes ont été choisis pour faire des études mécanistiques), on voit intervenir de façon active un résidu du site de fixation (tyr, his, asp, arg [17]). Dans la stratégie dite de l'induction de charge, c'est ce qui était voulu. Dans les autres stratégies, la présence d'un groupe catalytique est purement fortuite. Dans certains cas, la catalyse est due à une diade ou une triade d'acides aminés et il peut se former un acyl-abzyme [18, 19]. Un cas intéressant, rapporté il y a peu, est celui de deux anticorps (estérolytiques) issus de la même immunisation et qui fonctionnent différemment : l'un grâce à une diade histidine-sérine, avec formation intermédiaire d'un acyl-anticorps ; l'autre, seulement quatre fois moins actif, grâce à une simple catalyse basique générale [20]. Les phénomènes mis en jeu sont alors les mêmes que dans les enzymes, avec cependant une efficacité imparfaite. Ainsi, il semble que l'anticorps capable de cliver les dimères de thymine (rétro 2 + 2 photochimique) fonctionne selon le même principe que l'enzyme naturelle correspondante (DNA photolyase) [21].

### Et avec un peu de chance

#### Un anticorps qui catalyse deux réactions différentes

Réaction 1 : cycloaddition de Diels et Alder (ce pour quoi il avait été préparé) ; réaction 2 : hydrolyse d'une fonction ester du produit ; cette dernière réaction est sans doute due à la présence fortuite d'un résidu pouvant effectuer une catalyse basique générale (figure 9).

### Et avec beaucoup de chance (et de talent)...

Cinq réactions différentes catalysées par des anticorps préparés contre un unique haptène !

L'haptène a été préparé selon la stratégie de l'induction de charge. La présence (supposée) d'une fonction acide carboxylique dans le site de fixation de l'anticorps permet d'accélérer des réactions acido-catalysées, sur des substrats ressemblant à l'haptène utilisé (figure 10)

- Un anticorps qui catalyse trois réactions différentes (figure 10) :

- 1) Hydrolyse énantiosélective d'un éther d'énol.
- 2) Hydrolyse énantiosélective d'époxyde.
- 3) Hydrolyse d'acétal.

- D'autres anticorps produits contre le même haptène catalysent d'autres réactions (figure 11) :

- 4) Époxydation énantiosélective.
- 5) Réarrangement-1,2 type Wagner-Meerwein.

## Préparation des anticorps monoclonaux catalytiques

### Aujourd'hui : par fusion cellulaire

La technique, un peu lourde à mettre en œuvre pour un laboratoire de chimie, a été mise au point initialement par Kohler et Milstein en 1975 [3]. Elle consiste à faire fusionner des cellules cancéreuses (immortelles) de myélome avec des cellules spléniques de souris immunisées pour produire des hybridomes (immortels) excréant des anticorps. Le rendement (au sens où on parle du rendement d'une réaction chimique) des opérations de fusion et de sélection des hybridomes est dérisoire, puisqu'à partir des 1 à 2.10<sup>8</sup> cellules d'une rate de souris, on sélectionne quelques dizaines de clones dont quelques uns (parfois un seul ! [11]) sont catalytiques. Même si l'haptène est bien choisi, on peut craindre de ne pas obtenir d'anticorps catalytiques parce que l'échantillonnage est insuffisant. On a, en tout cas, peu de chance de tomber sur les meilleurs possibles. Autre problème : les quantités importantes d'anticorps nécessaires à une utilisation comme catalyseur dans un laboratoire de chimie. Elles nécessitent la production chez la souris sous forme d'ascites. Cette utilisation discutable de l'animal sera à terme proscrite, et une autre méthode de production en masse d'anticorps monoclonaux devra être employée. Malgré ces limitations, l'ensemble de la technologie a fait ses preuves.

### Demain

La production d'anticorps catalytiques se fera *via* les banques combinatoires [22]. Cette technologie utilise les techniques de biologie moléculaire, et permet, en principe, de préparer rapidement, à partir de l'ARN prélevé sur l'animal immunisé, un échantillonnage de plusieurs millions d'anticorps différents. Par les techniques de chromatographie d'affinité, on peut ensuite isoler les anticorps spécifiques du substrat à transformer, et faire un premier test d'activité. L'ensemble ne prend en principe que deux à trois semaines (contre au minimum trois mois pour la technique classique qui ne permet de produire que quelques centaines d'anticorps différents). Les anticorps intéressants seront ensuite exprimés chez des micro-organismes et produits dans leur milieu de

culture. On échappe ainsi presque entièrement à l'utilisation d'animaux et aux difficiles techniques de culture cellulaire. En plus, par le jeu des combinaisons aléatoires, la technique permet de fabriquer des anticorps qui n'existeraient pas *in vivo*.

## Prouver l'activité abzymatique

Les anticorps sont toujours issus de milieux très riches en enzymes (liquides d'ascite, milieux de culture *in vitro* pour les monoclonaux, sérum sanguin pour les polyclonaux). Même après purification, la probabilité de présence d'une "contaminase" reste importante. Le chercheur peut se sentir plus serein si l'abzyme catalyse une activité pour laquelle il n'y a pas d'enzyme connue (mais l'enzyme n'est elle pas inconnue parce qu'on ne l'a jamais recherchée ?). La situation est plus délicate si l'anticorps mime une activité enzymatique naturelle. Vue son efficacité réduite ( $10^3$  à  $10^6$  moins actif qu'une enzyme), on l'utilise à des concentrations importantes, conditions dans lesquelles l'éventuelle contamination, même faiblement présente, se révèle. Seule l'accumulation de preuves peut alors convaincre. Celles-ci sont entre autres :

- L'inhibition de la catalyse par l'antigène ; cet élément, toujours présenté comme une preuve, est pourtant très discutable : si l'antigène est un analogue d'état de transition de la réaction étudiée, ce doit être un excellent inhibiteur de l'enzyme contaminante qui catalyse la même réaction.
- L'absence d'activité d'un anticorps produit par un hybridome issu de la même fusion et au même stade de purification.
- La constance de l'activité spécifique après plusieurs purifications successives, et parmi celles-ci, au moins une chromatographie d'affinité.
- Dans le cas d'une préparation polyclonale, la montée en parallèle du titre en anticorps et de l'activité catalytique dans le sérum de l'animal en fonction du temps pendant les quelques semaines que dure l'immunisation [23].
- Des caractéristiques différentes entre l'anticorps préparé et l'enzyme naturelle correspondante, si elle existe ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ , inhibiteurs spécifiques [11]).
- Les abzymes, enfin, se différencient des enzymes par une sélectivité accrue vis-à-vis de leurs substrats possibles (régio-, stéréosélectivité). Cette différence peut être assez marquée pour constituer une preuve de l'activité abzymatique.

## Perspectives

### Les progrès technologiques en cours

#### Le mélange des stratégies

Dans l'exemple rapporté *figure 12*, l'haptène possède un groupement chargé (induction de charge) et un alcool secondaire (mimant l'état de transition tétraédrique de l'hydrolyse d'un ester). L'abzyme correspondant n'est en plus actif qu'en présence d'ions  $Zn^{++}$  (cofacteur) qui active la fonction carbonyle de l'ester.

#### L'induction hétérologue

Cette stratégie a été récemment introduite par le groupe du

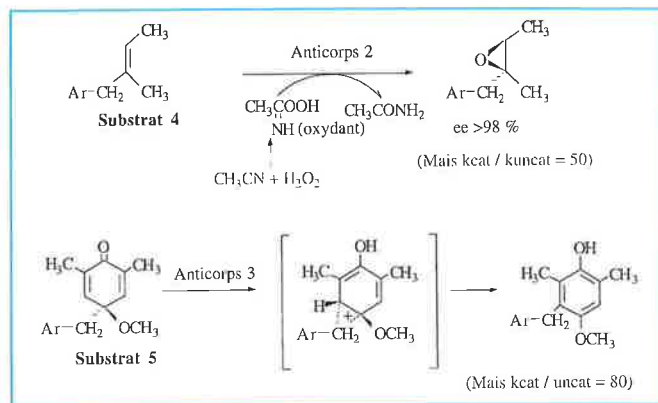


Figure 11 - Deux autres anticorps monoclonaux préparés à partir du même antigène catalysent d'autres types de réaction (Koch A., Lerner R.A. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 803 ; Chen Y., Lerner R.A. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1994, 33, 1607).

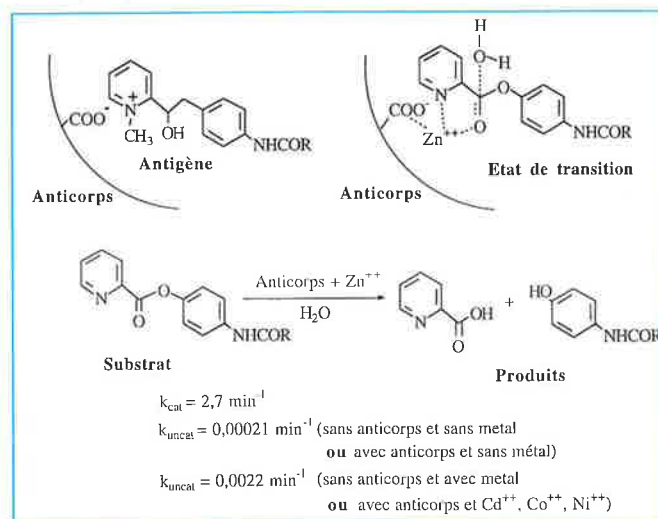


Figure 12 - L'anticorps préparé possède dans son "site actif" un carboxylate, induit par une charge positive dans l'antigène ; il est, en outre, conçu pour avoir de l'affinité pour l'état de transition de la réaction à catalyser ; il sait aussi lier un ion  $Zn^{++}$  (cofacteur). Pratiquement, la réaction ne marche qu'en présence de ce métal (Wade W.S., Lerner R.A. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 4906).

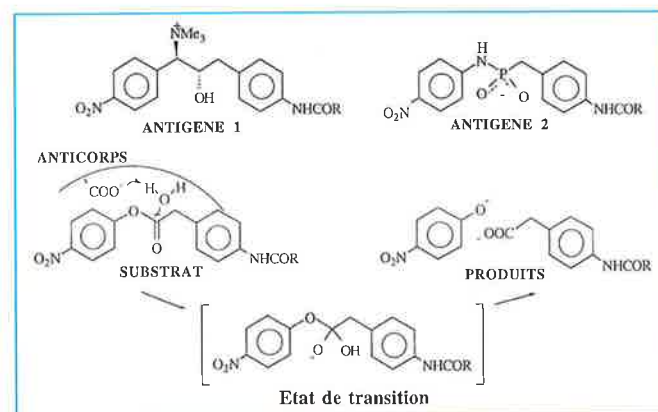


Figure 13 - Un anticorps monoclonal peut être préparé en réponse à deux antigènes injectés successivement à l'animal : le premier antigène (chargé positivement) va induire un carboxylate ; le deuxième va plutôt induire la capacité à lier l'état de transition tétraédrique et chargé (Suga H., Masamune S. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 6026).

MIT. Elle consiste à immuniser un animal successivement avec deux antigènes structurellement assez proches pour que les lymphocytes activés par le premier s'adaptent au second. Dans l'exemple de la *figure 13*, le premier antigène (1) est

chargé positivement pour induire un carboxylate dans l'anticorps qui pourra effectuer une catalyse basique. Les rappels sont ensuite faits avec un autre antigène (2), structuralement très proche du premier, mais porteur d'un élément nouveau (ici, un groupement mimant l'état de transition de l'hydrolyse en milieu basique d'un ester). Pour le chimiste, l'avantage est de pouvoir présenter les éléments d'un immunogène idéal dans des molécules différentes, plutôt que de tenter la synthèse scabreuse d'une seule molécule complexe.

#### L'immunisation *in vitro*

Cette technique permet de gagner plusieurs semaines sur le délai nécessaire à la préparation classique des anticorps par fusion cellulaire [24].

#### Détection précoce et sensible de l'activité

Dans la pratique courante, l'activité n'est testée que sur les clones sélectionnés pour leur bonne affinité pour l'antigène (1 ou 2 dizaines de clones généralement), après culture *in vitro* ou en ascites. Échappent ainsi aux tests plusieurs dizaines de clones "moyens" du point de vue de la reconnaissance, mais peut-être très actifs. Inversement, on fait pousser et on teste des dizaines de clones sélectionnés pour leur bonne affinité, mais qui ne sont pas actifs. Quand la production d'anticorps *via* les banques combinatoires sera routinière, se seront des millions de clones qui devront être testés. Un test rapide, précoce, sensible de l'activité s'imposera alors.

#### Utilisations potentielles

Elles sont *a priori* illimitées en chimie fine, puisqu'on peut produire des catalyseurs sur mesure, hypersélectifs pour un substrat donné. Ils seront les bienvenus dans le domaine de la chimie des groupements protecteurs de composés multifonctionnels (sucres par exemple). L'utilisation dans les processus industriels se heurtera aux mêmes réticences que celles exprimées vis-à-vis des enzymes. Celles-ci sont dues au coût élevé et à la fragilité des biocatalyseurs (mais les immunoglobulines sont dans l'ensemble plus stables que les enzymes). Surtout, les abzymes sont des catalyseurs d'efficacité encore limitée, et leur production en masse pose problème. Parce que les quantités nécessaires sont plus faibles, l'utilisation dans le domaine biomédical est plus prometteuse à court terme. En thérapeutique, les anticorps sont utilisables comme vecteurs de molécules actives, pour amener celles-ci à l'organe cible [25]. Un anticorps catalytique peut être à la fois vecteur, grâce à sa spécificité, et outil, grâce à son activité : il pourrait aller couper une liaison peptidique ou glycosidique particulière sur une (glyco)protéine virale, par exemple. Alternativement, conjugué à un autre anticorps vecteur, spécifique lui de l'organe à soigner, un anticorps catalytique pourrait être chargé d'activer une prodrogue passant à proximité de la cible. Mieux, si le bien fondé de la stratégie des anticorps catalytiques anti-idiotypiques se confirme, on peut envisager que les anticorps soient produits par le malade lui-même, immunisé par l'antigène adéquat. On a identifié à ce jour deux anticorps catalytiques naturels, vraisemblablement anti-idiotypiques dans le sérum de patients atteints de maladies auto-immunes [26, 28]. D'après les auteurs qui s'intéressent à ce sujet, le phénomène serait moins rare qu'il paraît de prime abord [27]. Immuniser un malade pour qu'il produise des anticorps cataly-

tiques est une vision futuriste, mais pas irréaliste.

Dans le domaine de la chimie analytique, les abzymes pourraient donner un nouvel essor à la technologie des biosenseurs [14]. Il est possible ainsi de préparer une électrode répondant spécifiquement à la substance qu'on veut doser (on a préparé un anticorps qui hydrolyse spécifiquement la cocaïne [29] ; la réaction libère des ions H<sup>+</sup>, de telle façon qu'une électrode à cocaïne branchée sur un pH-mètre permettrait de doser simplement cette drogue). Les essais d'utilisation des anticorps en solvants organiques profitent de l'expérience acquise avec les enzymes. Il semble, comme on aurait pu le penser, que les deux types de biocatalyseurs aient les mêmes contraintes, soit pour simplifier : un solvant le moins polaire possible, et une quantité minimum d'eau pour fonctionner [30].

Mais, comme d'habitude, les utilisations les plus intéressantes des abzymes seront celles qu'on n'a pas encore prévues.

#### Références

- [1] Carter P., Wells J.A., *Nature*, **1988**, 332, p. 564.
- [2] Pauling L., *Nature*, **1948**, 161, p. 707.
- [3] Kohler G., Milstein C., *Nature*, **1975**, 256, p. 495.
- [4] Tramontano A., Janda K.D., Lerner R.A., *Science*, **1986**, 234, p. 1566.
- [5] Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G., *Science*, **1986**, 234, p. 1570.
- [6] Wolfenden R., *Ann. Rev. Biophys.*, **1976**, 5, p. 271.
- [7] Baldwin E. Schultz P. G., *Science*, **1989**, 245, p. 1104.
- [8] Cochran A.G., Schultz P.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, p. 9414.
- [9] Iverson L.I., Lerner R.A., *Science*, **1989**, 243, p. 1184.
- [10] Iverson B.L., Iverson S.A., Roberts V.A., Getzoff E.D., Tainer J.A., Benkovic S.J., Lerner R.A., *Science*, **1990**, 249, p. 659.
- [11] Izadyar L., Friboulet A., Rémy M-H., Roseto A., Thomas D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, p. 8876.
- [12] Tramontano A., Ammann A.A., Lerner R.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, p. 2282.
- [13] Tramontano A., Janda D., Lerner R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83, p. 6736.
- [14] Balckburn G.F., Talley D.B., Booth P.M., Durfor C.N., Martin M.T., Napper A.D., Rees A.R., *Anal. Chem.*, **1990**, 62, p. 2211.
- [15] Fernholz E., Schloeder D., Liu K.K-C., Bradshaw C.W., Huang H., Janda K.D., Lerner R.A., Wong C.H., *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, p. 4756.
- [16] Haynes M.R., Stuna E.A., Hilvert D., Wilson I.A., *Science*, **1994**, 263, p. 646.
- [17] Nakatani T., Uneshita R., Hiratake J., Shinkazi A., Suzuki T., Nakajima H., Oda J., *Biomed. Chem.*, **1994**, 2, p. 457.
- [18] Stewart J.D., Liotta L.Z., Benkovic S.J., *Acc. Chem. Res.*, **1993**, 26, p. 396.
- [19] Wirsching P., Ashley J.A., Benkovic S.J., Janda K.D., Lerner R.A., *Science*, **1991**, 252, p. 680.
- [20] Guo J., Huang W., Zhou G.W., Fletterick R.J., Scanlan T.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, p. 1694.
- [21] Jacobsen J.R., Cochran A.G., Stephans J.C., King D.S., Schultz P.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, p. 5453.
- [22] Posner B., Smiley J., Lee I., Benkovic S., *TIBS*, **1994**, 19, p. 145.
- [23] Stephens D.B., Iverson B.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, 192, p. 1439.
- [24] Stahl M., Goldie B., Bourne S.P., Thomas N.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, p. 5164.
- [25] Baghawe K.D., *J. Control Release*, **1994**, 28, p. 187.
- [26] Paul S., Sun M., Mody R., Tewary H.K., Stemmer P., Massey R.J., Gianferrara T., Mehrotra S., Dreyer T., Meldal M., Tramontano A., *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, p. 13142.
- [27] Paul S., Li L., Kalaga R., Wilkins-Stevens P., Stevens F.J., Solomon A., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, p. 15257.
- [28] Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A., Bogomolova A.E., Smirnov I.V., Gabilov A.G., *Science*, **1992**, 256, p. 665.
- [29] Landry D.W., Zhao K., Yang G.X-Q., Glickman M., Georgiadis T.M., *Science*, **1993**, 259, p. 1899.
- [30] Okahata Y., Yamaguchi M., Tanaka F., Fujii I., *Tetrahedron*, **1995**, 51, p. 7673.