

# Les maladies tropicales négligées : un modèle collaboratif au service de l'innovation scientifique et médicale

*Nathalie Strub-Wourgaft est directrice des « Maladies Tropicales Négligées » de l'ONG « Drugs for Neglected Diseases initiative » (DNDI).*

## 1 Le contexte des maladies tropicales négligées

### 1.1. Une maladie touchant les populations pauvres

Les maladies tropicales (MTN) négligées touchent

une population importante et pauvre, en particulier vivant loin des villes (**Figure 1**). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit les MTN comme tropicales, infectieuses et touchant des populations pauvres qui vivent souvent dans des zones rurales excentrées, et qu'on

1. [www.dndi.org](http://www.dndi.org)



Figure 1

Une population importante et pauvre, vivant loin des villes, est touchée par des maladies tropicales.

qualifie de « populations sans voix », qui n'ont pas de pouvoir de plaidoyer. Elles sont affectées par des maladies souvent parasitaires, bactériennes ou fongiques, transmissibles, souvent attachées à une forte morbidité<sup>2</sup> (voire mortalité)<sup>2</sup> et très souvent négligées par la recherche scientifique. Il ne s'agit pas de maladies orphelines<sup>3</sup> *stricto sensu* ; elles sont

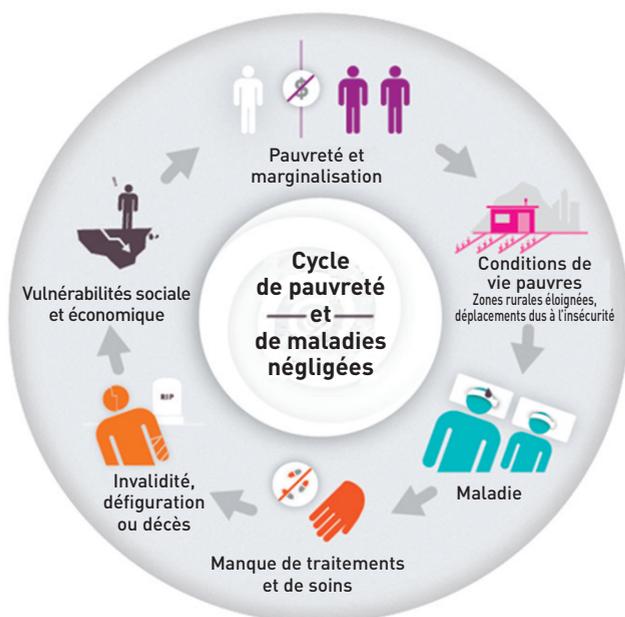
orphelines de médicaments mais ne le sont pas du tout par le nombre de patients affectés.

La **Figure 2** représente ce qu'on appelle le cercle vicieux de pauvreté : les patients sont pauvres, vivent dans de mauvaises conditions. Cela favorise l'émergence de maladies tropicales infectieuses, qui, elles-mêmes, entraînent le besoin d'aller chercher un traitement, de perdre le peu dont elles disposent pour aller à l'hôpital en quête d'un traitement, perdre de l'argent à l'hôpital, revenir, être encore plus pauvre qu'avant, et ainsi entretenir un cycle, un cercle très vicieux de pauvreté.

Figure 2

Le cercle de pauvreté : les populations pauvres vivent dans des mauvaises conditions, elles attrapent plus facilement des maladies et n'ont pas accès aux traitements.

2. Morbidité : ensemble des effets liés à une maladie ou un traumatisme. Il s'agit principalement des répercussions sur la santé, pour des durées de moyen à long terme.
3. Maladie orpheline : maladie ne bénéficiant pas de traitement efficace.



### 1.2. La recherche de médicaments

La littérature compte plus de quarante « maladies tropicales négligées » : l'OMS a décidé d'en fixer une liste précise (**Encart « Liste des maladies tropicales négligées de l'OMS »**) car elle a une obligation de montrer des résultats, mettre en place des programmes et mettre en œuvre des tentatives de solutions.

Sur la base de critères, comme l'accès à des thérapies, à de la recherche ou à des méthodes d'administration de traitement de masse, l'OMS a classé vingt maladies comme prioritaires. Le fait que ces maladies soient

### LISTE DES MALADIES TROPICALES NÉGLIGÉES DE L'OMS (en gras les maladies spécialement considérées par DNDi)

- Ulcère de Buruli
- Dengue et Chikungunya
- Dracunculose (vers de Guinée)
- **Trypanosomiase humaine africaine (maladie du sommeil)**
- **Leishmanioses (viscérales et cutanées)**
- Lèpre
- Filaire lymphatique
- **Onchocercose (cécité des rivières)**
- Rage
- Schistosomiasés (bilharziose)
- Géohelminthiases
- Trachome
- Pian
- **Maladie de Chagas**
- Taeniasis et cysticercoses
- Echinococcoses
- Infections par trematodes (douve du foie)
- **Mycétome et chromoblastomycose et autres mycoses profondes**
- Gale et ectoparasites
- Envenimations par morsure de serpent [2018]

listées par l'OMS permet aussi à des organisations comme Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) d'aller chercher des financements pour financer la recherche en vue de traiter ces maladies. DNDi est en recherche de nouveaux traitements pour les maladies suivantes : la trypanosomiase humaine africaine (la maladie du sommeil), les leishmanioses, l'onchocercose, la maladie de Chagas et le mycétome.

La **Figure 3** est la photo d'une patiente qui pourrait être en République Démocratique du Congo ; elle montre les conditions toutes simples dans lesquelles elle vit.

Face à ses difficultés à traiter les patients suivis dans le cadre de ses missions de terrain, une équipe de Médecins

Sans Frontières s'est demandée (article publié en 2002) pourquoi il n'y n'avait pas de traitement pour ces maladies. Ils ont analysé tous les médicaments mis sur le marché jusqu'aux années 2000 et ceux d'entre d'eux qui s'adressaient aux maladies tropicales négligées.

Cela a mis en évidence ce qu'on appelle le déséquilibre fatal (**Figure 4A**) : 1,1 % seulement des nouveaux médicaments enregistrés étaient consacrés à ces maladies tropicales, qui pourtant représentent 12 % de la morbidité dans le monde<sup>4</sup> : un déséquilibre très choquant.

4. MSF & the DND Working Group, 2001. Fatal Imbalance: The Crisis in R&D for Neglected Diseases. Médecins Sans Frontières.

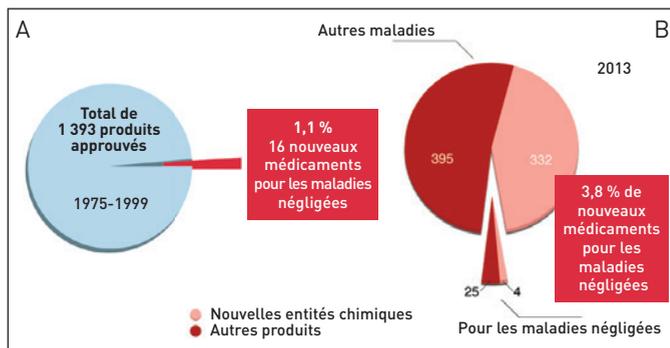


**Figure 3**

*Les mauvaises conditions d'hygiène et de vie favorisent le développement des maladies tropicales négligées.*

Figure 4

Le « fatal imbalance » [déséquilibre fatal] : avant 2002, 1,1 % des nouveaux médicaments étaient consacrés aux maladies tropicales négligées (A) ; elles représentent 3,8 % en 2013 (B).



Ce même travail a été réitéré en 2012 et publié en 2013<sup>5</sup>, afin d'analyser l'impact de la création de plusieurs organisations comme celle de DNDi. Effectivement, nous avons noté une amélioration puisque 3,8 % des médicaments enregistrés ont été développés pour des maladies tropicales négligées (Figure 4B). Mais on est encore très loin du compte : le déséquilibre persiste.

## 2 Les maladies tropicales négligées

### 2.1. La maladie du sommeil

La maladie du sommeil est transmise par la mouche Tsé-Tsé (Figure 5) et on la trouve essentiellement en région Subsaharienne, en Afrique Centrale, et très majoritairement en République Démocratique du Congo. Il existe deux parasites, mais on privilégie la forme la plus prévalente qui est celle de l'Afrique Centrale. Une forme en Afrique de l'Est tue encore



Figure 5

La mouche Tsé-Tsé est vecteur de la maladie du sommeil.

plus vite mais est moins fréquente.

La maladie se manifeste sous la forme de deux stades cliniques ; le premier évoluant toujours vers le second, et le second évoluant vers le décès du patient en l'absence de traitement. Le premier stade n'est pas très symptomatique et le deuxième donne le nom à la maladie : il y a une inversion du cycle de sommeil et de veille, et les patients présentent des signes psychiatriques très importants (ils sont très volubiles, ont des rires qui font peur). C'est une maladie qui est connotée dans les familles, dans les régions : on pense que des mauvais sorts ont été jetés, ce qui conduit à un contexte très compliqué où ces malades sont parfois cachés.

Le traitement qu'on donne dans le premier stade de la maladie ne traverse pas la barrière hémato-méningée<sup>6</sup> ; il ne peut donc tuer le parasite qui se trouve dans le système nerveux central et est responsable des symptômes neurologiques.

5. Pedrique *et coll.* The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000 -11): a systematic assessment. *Lancet Global Health* 2013.

6. Barrière hémato-méningée : barrière présente dans le cerveau entre la circulation sanguine et le système nerveux central (elle sert à réguler le milieu dans le cerveau, en le séparant du sang).

Afin de déterminer le stade de la maladie, on effectue une ponction lombaire au patient. Sur la **Figure 6**, on voit qu'elle est réalisée sans anesthésie, dans les conditions de terrain, c'est douloureux. Si la maladie est confirmée, on passe au traitement qui, jusqu'à peu, était un traitement hospitalier. L'occurrence de cette maladie, est décrite sur la **Figure 7**. Nous sommes à un moment dans l'histoire de la THA où l'endémicité de la maladie a atteint un taux historiquement bas et diminué drastiquement grâce aux campagnes de dépistage actif et aux nouveaux traitements. La situation s'améliore donc, mais on sait que cette maladie peut resurgir, particulièrement dans des zones de conflits où l'on ne peut plus aller dépister les patients et les traiter, ce qui laisse un réservoir humain. Les besoins thérapeutiques pour cette maladie restent très importants.

## 2.2. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des maladies transmises par une petite mouche des sables. Il existe une forme dite « viscérale » et une forme cutanée. Celle-ci peut être stigmatisante

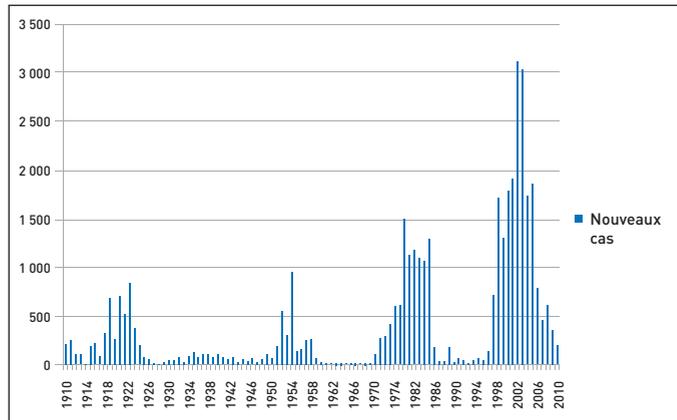
et invalidante (**Figure 8**), et se répand au rythme d'un nouveau cas toutes les deux minutes. La forme viscérale qui entraîne la mort du patient en l'absence de traitement. Dans la forme cutanée, certains patients guérissent spontanément, mais d'autres vont avoir des lésions très stigmatisantes, ou, dans la forme « dermatite post kala-azar<sup>7</sup> », créent des « papules »,

7. Dermatite post kala-azar : lésions cutanées multiples qui peuvent apparaître dans le cas d'un traitement insuffisant pour la leishmaniose.



**Figure 6**

Une ponction lombaire peut être effectuée par un médecin pour soigner les patients atteints de la maladie du sommeil.



**Figure 7**

Une recrudescence du nombre de nouveaux cas de la maladie du sommeil de 1910 à 2010 se fait ressentir par période (de 1998 à 2002 par exemple), et ce nombre ne cesse d'être plus grand pendant ces périodes qui durent une dizaine d'années à chaque fois.



**Figure 8**

Les leishmanioses (forme cutanée) ont des conséquences corporelles, telles que des déformations du visage.

Source : WHO weekly Epidemiological record, juin 2019.

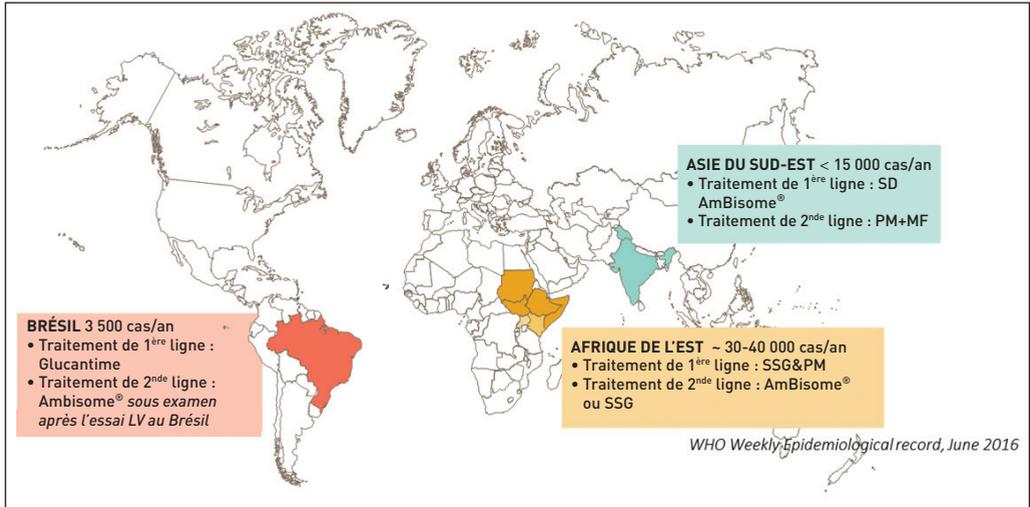


Figure 9

On recense trois foyers principaux de leishmaniose viscérale dans le monde : le Brésil, l'Afrique de l'Est et l'Asie du Sud-Est.

qui constituent un *stigma* et empêchent notamment les femmes de se marier parce qu'elles en ont honte.

La **Figure 9** illustre la distribution géographique de ces maladies. La forme viscérale est très répandue en Afrique de l'Est : Soudan, Kenya, Ouganda, Éthiopie. Elle est aussi prévalente en Inde, en particulier dans l'État du Bihar, l'État le plus pauvre du sous-continent indien. La forme cutanée touche l'ancien comme le nouveau monde :

Brésil, la Colombie, le Pérou, la Bolivie, de nombreux pays latino-américains qui ne disposent que de traitements très insuffisants.

### 2.3. La maladie de Chagas

La maladie de Chagas est une maladie très compliquée (**Figure 10**). Il s'agit d'une maladie parasitaire, transmise par la « vinchuca », une grosse punaise, insecte peu ragoûtant, qui se cache dans les fissures de murs de maisons très



Figure 10

La maladie de Chagas est présente en Amérique Latine.

rudimentaires. Le parasite est transmis après transmission des parasites par les déjections de l'insecte, après une petite piqûre qui peut passer inaperçue. Mais pour 20 à 30 % des individus atteints, on ne sait pas qui est atteint ni pourquoi, et c'est l'un des problèmes de ces maladies tropicales négligées. Certains patients vont développer silencieusement, peut-être au bout de deux ou trois dizaines d'années, une pathologie cardiaque (ou digestive parfois) dont ils vont mourir liée à une cardiomyopathie<sup>8</sup> pour laquelle il n'y a à ce jour pas de thérapie.

On estime qu'il y a environ huit millions de personnes infectées. Moins de 1 % de ces personnes sont traitées, car les traitements actuels ne sont pas satisfaisants. La maladie est encore compliquée à diagnostiquer, et il n'y a pas de volonté politique d'investir dans la prise en charge complète de ces patients...

La maladie évolue donc de manière très silencieuse chez les patients de la maladie de Chagas. Sa transmission reste compliquée et elle peut aussi être transmise au cours de la grossesse. Le professeur Peter Hotez, éminent médecin chercheur américain, spécialiste des MTNs, a publié, il y a quelques années, un article très provocateur qui avait secoué la communauté : il y développait une comparaison avec la séropositivité au virus VIH. Cette maladie est la seule des « maladies tropicales négligées » pour laquelle

il existe des associations de patients : elles essaient de mobiliser les communautés à comprendre, trouver des thérapies qui peut-être pourront prévenir l'évolution de la maladie.

#### 2.4. L'onchocercose

L'onchocercose, ou « cécité des rivières », est une maladie transmise par une mouche noire, de la famille des « similités ». C'est une maladie endémique. Elle est liée à un gros ver (*Figure 11*), qui va se nicher dans des nodules cutanés ou sous-cutanés<sup>9</sup> ; le ver femelle, caché, est régulièrement fertilisé par des vers mâles. Pendant quinze ans, elle va vivre et pondre des larves, qui vont aller sous la peau et dans les yeux, et créer les symptômes de la maladie.

Pour l'instant, le traitement consiste à éliminer les formes juvéniles de l'onchocercose. Le programme de R&D de DNDi se focalise sur l'identification d'un médicament qui éliminerait la cause de la maladie, c'est-à-dire ayant un effet sur le ver adulte, mais pour l'instant, tout ce qu'on sait faire, c'est atteindre les larves. Cette maladie entraîne des cécités : sur 36 millions de personnes, 265 000 aveugles ont été recensés (*Figure 12A*), chiffre probablement très en dessous de la réalité car avec

9. Nodules cutanés ou sous-cutanés : sensation sous la peau d'une sorte de nœud ou de boule mal délimitée, irrégulière, qui donne l'impression d'être enchâssée dans la peau (elles peuvent soulever la peau qui reste normale ou provoquer une réaction inflammatoire).

8. Cardiomyopathie : nom générique de toutes les maladies du cœur.



*Figure 11*

*L'onchocercose est due à un nématode parasite, Onchocerca volvulus.*



Figure 12

Les patients atteints d'onchocercose présentent différents symptômes, comme des démangeaisons violentes ou des troubles de la vue. Toutes les générations sont touchées et les populations pauvres sont les premières victimes car elles n'ont pas accès aux traitements.

ces maladies, l'épidémiologie est loin d'être parfaite. De nombreux patients ont des troubles de la vue, et certains souffrent de terribles prurits<sup>10</sup> (Figure 12B) : celles-ci sont tellement violentes que certains patients se suicident de leur fait. En effet, comme indiqué plus tôt, ces populations sont très pauvres et n'ont pas accès à des antihistaminiques. Actuellement, la prise en charge consiste en campagnes massives de traitements : des

agents de santé vont tous les six mois ou tous les ans dans un village et donnent systématiquement des comprimés à toute la population parce que c'est une sorte de vaccination thérapeutique préventive. On essaye de trouver des traitements meilleurs, mais nous n'y sommes pas encore.

## 2.5. Le mycétome

La dernière maladie ajoutée sur la liste de l'OMS en 2016 est le mycétome, une maladie qui est très méconnue. Le Soudan dispose actuellement d'une base de données de huit mille cas, un rien par rapport à la réalité de l'épidémiologie (Figure 13).

Cette maladie est liée à un champignon ou une bactérie, et on pense que la manière dont elle est transmise pourrait être le contact avec des écorces d'acacia quand les patients marchent pieds nus ou qu'ils s'accroupissent pour déféquer. Toujours est-il qu'une fois que le fongus pénètre dans l'organisme, il commence par faire une petite lésion (Figure 14A), une masse qui ne ressemble

Figure 13

Les cas de mycétome se localisent au Mexique, en Inde, en Afrique subsaharienne.

10. Prurit : symptôme fréquent qui recouvre une sensation de démangeaison de la peau.

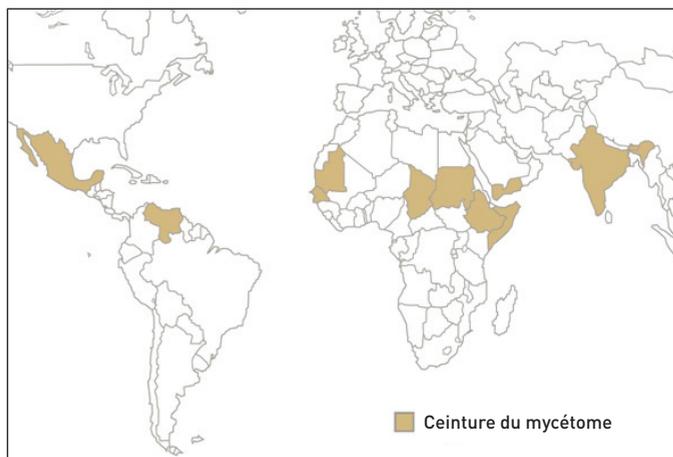




Figure 14

Le mycétome est lié à un champignon qui se développe et rentre dans le tissu cutané, faisant apparaître une masse, une boursoufflure sur la peau, qui va elle-même croître.

à rien avant de grossir ; le fungus va alors commencer à rentrer dans le tissu cutané, sous-cutané, voire dans l'os. Il va y avoir une production de grains noirs, rouges, jaunes, qui contiennent le fungus. Il n'y a pas pour l'instant de traitement anti-infectieux et le seul recours est celui de la chirurgie. C'est un chirurgien qui est devenu la figure emblématique de cette maladie. Celui-ci réalise des amputations ; la **Figure 14C** montre une photo d'une patiente qui a été amputée. La maladie évolue lentement mais elle est très souvent récidivante : de nouvelles lésions apparaissent et vont devoir faire l'objet de nouvelles amputations jusqu'à parfois atteindre un certain stade où il n'est plus possible d'amputer.

Devant toutes ces maladies, de quoi a-t-on besoin ? C'est simple : de traitements plus efficaces (**Figure 15**). On a également besoin de traitements qui ne soient plus dangereux, alors que la « médecine d'avant » proposait des traitements à base d'arsenic ou d'antimoine, très toxiques.

Les conditions dans lesquelles vivent les patients doivent être

prises en compte : il faut des produits qu'on puisse administrer dans les conditions de terrain, des traitements qui ne soient pas à répéter cinq fois par jour, qui ne nécessitent pas des infirmières toute la journée, qui ne soient pas injectables, qui puissent être stables dans les conditions de température et d'humidité tropicales. Il faut prendre conscience que le déplacement à l'hôpital est coûteux, ne bénéficiant jamais de remboursement, et qu'une prise en charge à l'hôpital entretient le cycle vicieux de pauvreté décrit précédemment.



Figure 15

Pour ces maladies tropicales négligées, on a besoin de traitements plus efficaces (bien tolérés, adaptés aux conditions d'utilisation de terrain, abordables financièrement), de partenaires industriels, d'un engagement des pays.

Il faut également, et c'est très important, des partenariats industriels pour produire et distribuer ces médicaments, à un prix raisonnable et pour un accès durable. Il faut aussi un engagement des pays : le soutien des politiques de santé nationales est indispensable.

### 3 La recherche pour lutter contre les maladies tropicales

#### 3.1. Une organisation émanant du prix Nobel de la paix

DNDi est une fondation de recherche à but non-lucratif fondée en 2003 avec les fonds du prix Nobel de la paix reçu par Médecins Sans Frontières (MSF) en 1999 et ayant comme autres membres fondateurs des instituts de recherche des pays où ces MTN sont présentes, et avec l'OMS comme membre permanent observateur. En France, l'Institut Pasteur fait partie du conseil d'administration (Figure 16).

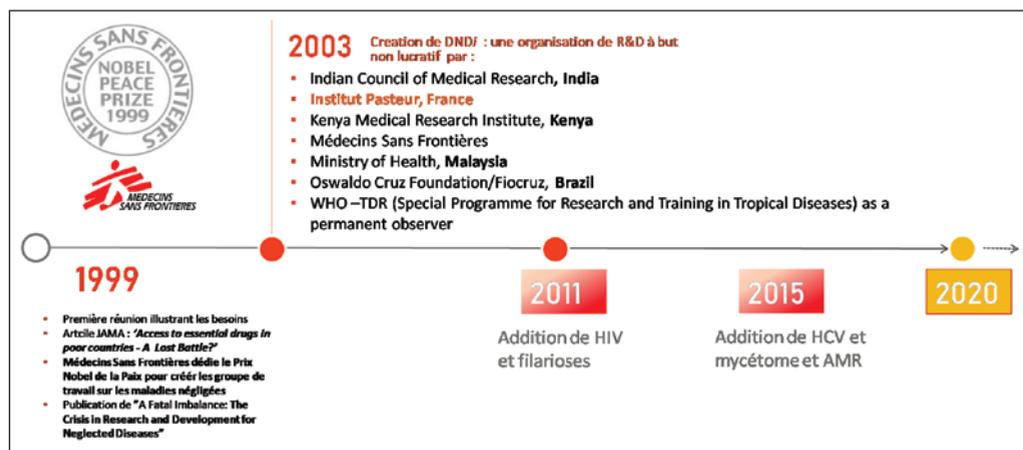
En 2011, DNDi a ajouté à son portefeuille le développement de traitements pour le sida pédiatrique, bien que ce ne

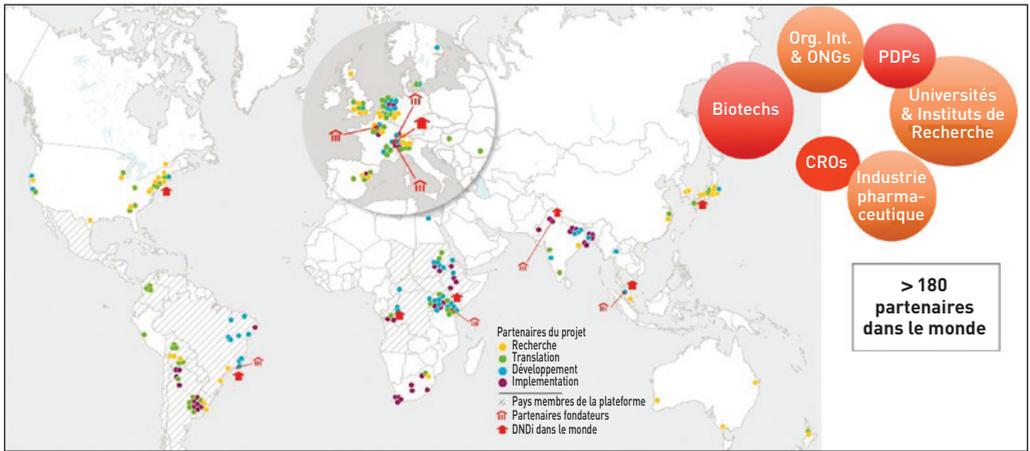
soit pas une maladie négligée *stricto sensu*. Le sida chez les enfants de moins de deux ans était complètement négligé par la recherche car les pays qui pouvaient se le permettre faisaient une bonne utilisation de la prévention de transmission materno-infantile du VIH ; cependant, celle-ci n'est pas aussi efficace et n'est pas mise à disposition assez largement en Afrique subsaharienne, donnant lieu à de trop nombreuses naissances de nouveaux-nés infectés par le VIH et pour lesquels les options thérapeutiques sont très mal adaptées. En 2015, DNDi a aussi ajouté un programme pour l'hépatite C destiné à obtenir un traitement efficace sur tous les génotypes « à un prix acceptable pour ces patients vivant dans ces zones reculées », celui-ci étant alors tout à fait inabordable et de plusieurs dizaines de milliers d'euros. Le mycétome a ensuite été ajouté au portefeuille de DNDi, puis l'antibiorésistance, dont GARDP a pris l'initiative séparément.

DNDi coordonne, en quelque sorte, un « orchestre visuel » (Figure 17). Elle possède

Figure 16

Des partenaires de recherche publics et privés se sont associés pour créer DNDi depuis 1999.





**Figure 17**

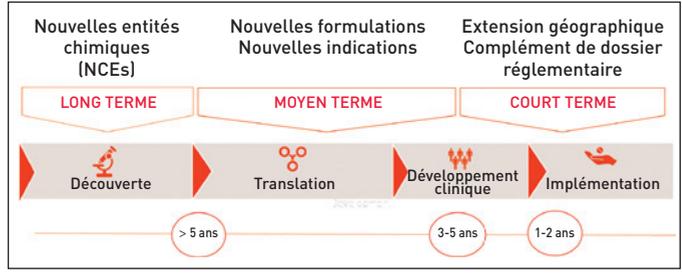
Les centres de recherche, les partenaires et les centres de développement de DNDi sont implantés partout dans le monde.

un bureau à Genève et des bureaux dans les différents pays, notamment où sont présents ses membres fondateurs : l’Afrique du Sud, le Brésil, les États-Unis, l’Inde, le Kenya, la Malaisie, la République Démocratique du Congo, le Japon.

Elle a par ailleurs des partenariats multiples, bénéficiant des collaborations et des compétences complémentaires avec qui développer des projets communs. Il s’agit d’organisations internationales comme MSF, des PDP (« *Product Development Partnership* »), des biotech, l’industrie pharmaceutique, des CRO (« *Clinical Research Organisation* ») et beaucoup de groupes académiques pour aider à identifier ses molécules, les optimiser, les développer, les enregistrer, les produire... : faire de la R&D.

(**Figure 18**) et d’investir en même temps sur des projets plus en amont. Pourquoi ?

L’expérience de MSF appelait à des réponses urgentes : selon leur témoignages du terrain dans le cas de la THA, ils rappelaient la peur des médecins de MSF au moment d’injecter le mélsarsoprol aux patients, en se disant « *j’espère que je ne vais pas tuer mon patient* », car ils savaient en effet qu’un patient sur vingt allait mourir en recevant l’injection d’arsenic. Il a été décidé rapidement de changer d’approche : après de petites études préliminaires,



**Figure 18**

DNDi a essayé dès le début d’avoir une approche pragmatique et dynamique, d’avoir des projets à court terme (extension géographique) ou moyen et long terme (allant du développement clinique à la formulation de nouvelles entités chimiques).

**3.2. Une approche pragmatique et dynamique**

Il a été décidé, depuis le début, d’adopter une approche pragmatique et dynamique, de trouver des solutions rapidement

est venue l'idée à des partenaires de DNDi de combiner le nifurtimox, développé alors pour la maladie de Chagas, avec l'eflornithine, qui par ailleurs avait été initialement développée pour le cancer, et était utilisée avec succès pour la THA, mais à raison de cinquante six perfusions étalées sur quatorze jours. L'idée a donc été de développer rapidement un traitement beaucoup moins toxique pour la trypanosomiase africaine... Pour chaque maladie, l'idée a donc été de chercher des projets apportant des solutions à court terme, comme l'extension d'un traitement à une autre zone géographique, à moyen terme comme des combinaisons de traitements ou des extensions d'indications de médicaments déjà disponibles et enregistrés, et enfin à plus long terme avec la création d'un portefeuille complet de développement.

### 3.3. Les médicaments

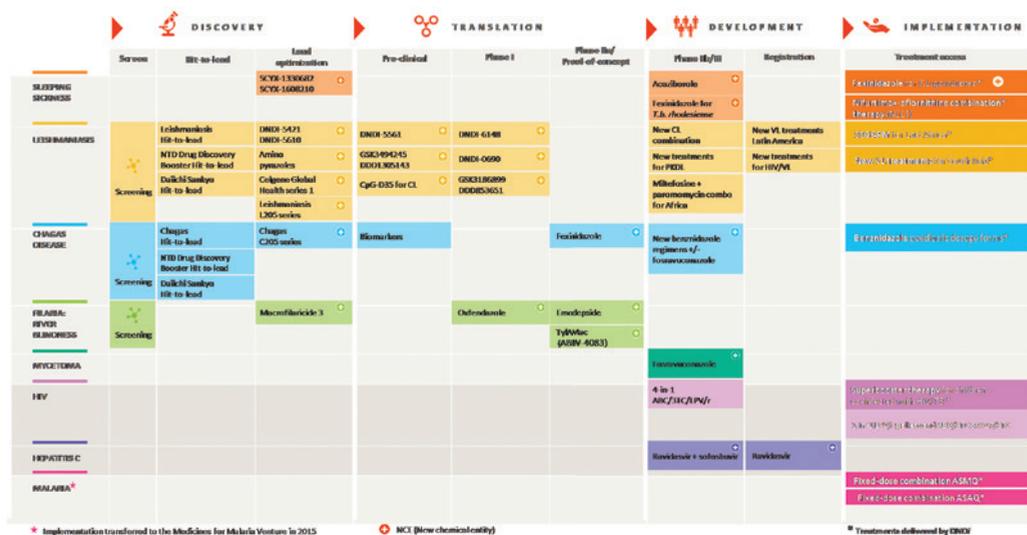
La **Figure 19** décrit le portefeuille de recherche et développement de DNDi. À gauche : identification de molécules qui vont être testées ; une cible biologique est choisie pour cela, et lorsque le test est bon, la molécule est optimisée pour qu'elle soit absorbable et qu'elle puisse être administrée ; on effectue alors des tests *in vitro* (activité intrinsèque du produit sur l'agent infectieux) puis *in vivo* chez l'animal (souris, rat, chien, singe parfois), où l'on recherche les doses et expositions nécessaires à l'efficacité chez des animaux infectés ; on teste également la toxicité potentielle du médicament

en cherchant à identifier les organes-cible potentiels. Les essais sont ensuite menés chez des volontaires sains (non infectés) en commençant à tester des doses bien inférieures (dix ou vingt fois) au seuil de détection de toxicité testé chez l'animal. Les doses sont progressivement augmentées, généralement jusqu'à identifier les doses maximales tolérées. Une fois cette phase (dite phase 1) terminée, les études de preuve d'efficacité chez les malades vont pouvoir débuter : une ou plusieurs études seront mises en place, comparant l'efficacité du nouveau traitement au traitement de référence.

L'étape suivante consiste à passer à l'enregistrement par les autorités de santé afin d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM), ou plus exactement, dans notre cas, de mise à disposition des patients. Sur la droite de la **Figure 19** se trouve la liste des traitements développés par DNDi, puis en allant vers la gauche, le degré d'avancement des projets de R&D par maladie.

Dans la maladie du sommeil, DNDi est en train de développer une molécule très originale qui appartient à la classe des oxaboroles : l'acoziborole. C'est une nouvelle entité chimique qui n'a jamais été enregistrée auparavant chez l'homme par voie systémique. Nous sommes en train de tester le fexinidazole chez les patients présentant la THA à T. brhodesiense<sup>11</sup>, qu'on trouve

11. Trypanosoma bruceirhodesiense : forme de la maladie du sommeil (3 % des cas) qui provoque une infection aiguë.



en Afrique de l'Est dans des zones forestières. Le fexinidazole est la molécule que nous avons mise sur le marché dernièrement en partenariat avec Sanofi pour la maladie du sommeil à gambiense<sup>12</sup>, la forme la plus prévalente, présente en Afrique Centrale. La forme clinique de *T. brucei* est sinon fulgurante du moins très rapide, encore traitée actuellement par le méfarsoprol, c'est-à-dire par l'arsenic. Après avoir démontré son efficacité dans la forme *T. brucei*, beaucoup plus répandue, nous avons réussi à convaincre des bailleurs de fonds de l'intérêt de tester le fexinidazole dans cette forme grave, mais plus rare, de la TSA.

Dans la leishmaniose, le portefeuille est très riche, satisfaisant. Les efforts des équipes de recherche de DNDI et ses partenaires ont permis d'identifier de nouvelles molécules,

en cours de test chez l'animal, et que l'on espère pouvoir combiner pour arriver à un traitement oral. Certaines de ces molécules sont en phase 1 ou 2. En attendant, le traitement actuel préconisé en Afrique de l'Est, et incluant encore un sel d'antimoine, est en cours d'amélioration avec une étude de phase 3 testant une combinaison efficace en Inde, et dénuée d'antimoine. De nouvelles approches thérapeutiques sont également en cours d'étude clinique pour la forme cutanée liée à la complication de la leishmaniose viscérale, « post-kala-azar dermal leishmaniasis ».

Pour la maladie de Chagas, une formulation pédiatrique du benznidazole, le traitement de référence pour la maladie de Chagas, avec le nifurtimox, a d'abord été développée. C'est un nitro-imidazole, donné pendant soixante jours, deux fois par jour, un traitement compliqué mais dont l'administration devenait très difficile pour la prise en

Figure 19

Pour chaque maladie étudiée, le développement des médicaments passe par plusieurs stades (découverte, traduction, développement, implémentation).

12. Trypanosoma brucei gambiense : forme de maladie du sommeil (97 % des cas) qui provoque une infection chronique.

charge des bébés infectés : cela impliquait en effet de couper en quatre ou en douze un comprimé de 100 mg et de le donner deux fois par jour. Le développement a été réalisé en partenariat avec Lafepe, un laboratoire public brésilien, aboutissant à un comprimé dispersible de 12,5 mg évitant de couper, écraser, et permettant d'assurer une concentration plasmatique adéquate et régulière tout au long du traitement. C'est une amélioration thérapeutique qui semble minime, mais qui change complètement la prise en charge thérapeutique. Des combinaisons thérapeutiques ont été tentées associant une nouvelle molécule, le fosravuconazole, qui était développé dans l'onychomycose<sup>13</sup> (aussi appelée mycose des ongles ou mycose unguéale) et le benznidazole, pour en réduire la durée de traitement. Le fosravuconazole appartient à la classe des azoles et avait préalablement été étudié en monothérapie mais avec des résultats insuffisants. Dans la même étude, un régime court de benznidazole en monothérapie a aussi été testé. L'étude a montré que deux semaines de ce traitement aboutissaient à des résultats semblables à ceux après huit semaines du traitement sans combinaison. Cela permet d'observer moins d'effets secondaires qu'avec un traitement classique, ce qui constitue une amélioration importante. Une discussion est en cours avec les autorités de santé quant au type de données

13. *Trypanosoma brucei rhodesiense* : forme de la maladie du sommeil (3 % des cas) qui provoque une infection aiguë.

supplémentaires à apporter pour aboutir à un changement sur la recommandation d'utilisation de ce médicament.

Par ailleurs, le fexinidazole, la molécule enregistrée pour la maladie du sommeil, est testée pour la maladie de Chagas. Deux autres molécules sont dédiées au traitement de l'onchocercose par un macrofilaricide : une première molécule venant de la médecine vétérinaire, l'emodepside, utilisée chez le chien, et une autre provenant du portefeuille du laboratoire AbbVie ; les deux molécules ayant un mécanisme d'action très différent : la première tuerait directement le ver adulte ; la deuxième, d'une certaine manière, l'affamerait en agissant sur la bactérie wolbachian, une bactérie permettant la survie du ver adulte s'attaquant au *Wolbachia*, on affame et donc élimine le ver adulte.

Sur le mycétome, le fosravuconazole, qui avait été testé pour la maladie de Chagas, s'est montré efficace *in vitro* sur le fungus, pour laquelle il n'existe pour l'instant pas de modèle animal et est testé en combinaison avec de la chirurgie chez des patients présentant une forme modérée de la maladie.

### 3.4. Les partenaires

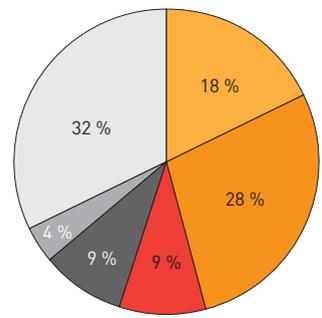
La **Figure 20** donne la liste des partenaires industriels qui travaillent avec DNDi, les classe selon les types. Une importante collaboration est établie avec des groupes académiques : ce sont 32 % des partenaires qui nous aident avec la constitution de modèles, l'épidémiologie

**Tableau**

Tableau présentant la liste des partenaires industriels de DNDi. Les partenaires changent selon la phase de développement du médicament et la maladie étudiée.

	Recherche	Translation	Développement	Implémentation
● HAT	Anac./Pfizer	MSD Sanofi	AbbVie	Bayer
● Leishmaniose	AstraZen Celgene Daiichi S. Eisai	Shionogi Takeda Novartis	Anacor/Pfizer Eisai GSK	Gilead Sanofi
● Chagas			Eisai Gilead Sanofi	Bayer Gilead Lafepe Sanofi Mundo Sano/ELEA
● Filaria	Anacor/Pfizer Bayer Sanofi	AbbVie Bayer		
● HCV			Pharco/Presidio/Pharm aniaga/Etea/Doppel	
● Pédiatric HIV			Cipia	
● Mycetoma			Eisai	
● Malaria				Sanofi Farmanguinhos Cipia Zenufa

- Pharma/Biotech
- MoH/Gouv/Hos
- PDP
- CRO
- Int. Org/NGO
- Universités/ Instituts de Recherche



**Figure 20**  
Les partenaires de DNDi.

et la rédaction de protocoles de recherche. Les CRO sont des organisations que DNDi finance pour qu'elles réalisent des statistiques, des rapports médicaux, etc. Les partenaires pays (autorités gouvernementales, ministères, hôpitaux) sont également majeurs pour la coordination avec les différentes politiques de santé.

Explicitons ici le contenu des collaborations. La phase primordiale dans la définition des programmes de DNDi est la « définition des besoins ». Les partenaires et collaborateurs sont réunis en « plateformes » : une plateforme par maladie qui consiste en un regroupement d'universités et instituts de recherche (toujours les mêmes), d'industriels, de responsables des politiques de santé par pays impliqué, de représentants des techniciens de laboratoire, des infirmiers, des médecins, des chercheurs, et de tous ceux qui vont traiter ces patients (Figure 21).

La question primordiale abordée par la plateforme est : « de quoi sont faits les besoins pour



**Figure 21**  
Des plateformes « Regional Disease Platforms » (plateformes pour les maladies régionales) ont été mises en place pour regrouper les différents partenaires afin de discuter des différentes MTN, de proposer des projets et de trouver des solutions.

chaque maladie ? Quelles sont les caractéristiques du traitement dont on a besoin pour cette maladie ? » (listées en début de chapitre). On dira par exemple : « pour la maladie du sommeil, on a besoin d'un médicament oral, de ne plus faire de ponction lombaire, de ne plus aller à l'hôpital, d'un traitement qui coûte moins de 300 €... ». Les personnes impliquées viennent expliquer leurs besoins et l'objectif est d'aboutir à un consensus qui n'est pas centré sur les performances attendues d'un produit connu, mais aspirationnel sur ce qui est attendu d'un nouveau traitement.

L'OMS publie aussi des TPP (« Target Product Profile »), qui constituent une référence publique importante. Les plateformes sont aussi dédiées à promouvoir et proposer des activités de formation à la recherche clinique. Beaucoup de temps est consacré à écouter et à former les différents acteurs de terrain. Au début des études dans la leishmaniose par exemple, les acteurs de terrain n'avaient pas effectué de recherches cliniques, ne connaissaient pas les bonnes pratiques cliniques, ne disposaient pas de dossiers médicaux standardisés et

fournis parce que les patients ne viennent consulter que lorsqu'ils souffrent d'une pathologie aiguë puis s'en vont. Les antécédents médicaux sont très peu connus : on ne sait pas s'ils sont diabétiques, s'ils ont été hypertendus, s'ils sont déprimés, etc. Ils ne viennent que pour cette pathologie, et souvent après un long parcours les amenant finalement à un centre spécialisé.

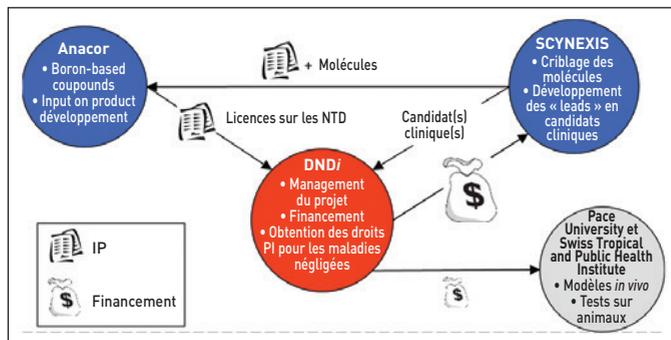
On forme les acteurs de terrain à conduire de la recherche. C'est une collaboration qui est essentielle et qui nous apprend beaucoup à réfléchir autrement, à travailler autrement, à écouter et à nous adapter.

### 3.5. L'identification des molécules

L'organigramme d'identification de molécules est schématisé sur la **Figure 22** sur l'exemple de l'acoziborole. Anacor est un laboratoire qui a été racheté par Pfizer et qui est situé en Californie. Il avait identifié des molécules et les avait envoyées par l'intermédiaire de DND à une CRO qui s'appelait Scynexis, qui a optimisé et testé la molécule

Figure 22

Pour l'identification des molécules (exemple de l'acoziborole ici), de nombreuses connexions et échanges (argent, licences...) se font entre les partenaires, DNDi et les universités partenaires. NTD = Neglected Tropical Disease.



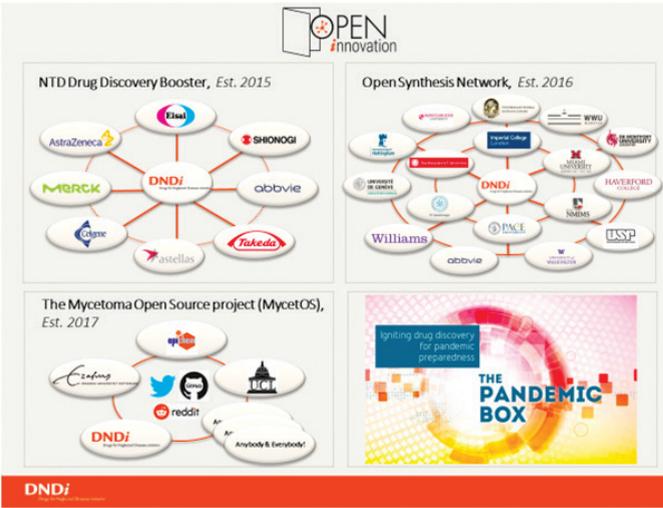


Figure 23

DNDi travaille avec de nombreux partenaires sur chaque projet, et chaque partenaire partage ses données dans un concept d'« open source ».

pour DNDi. À la suite de ce travail, DNDi a décidé de poursuivre les recherches de qualification et de la tester chez l'homme. Sur la **Figure 23** est schématisé le concept d'« open source ». Ce sont des partenariats ouverts, liés par des contrats intelligents où les différentes personnes mettent leurs données en commun dans une base avec une anonymisation de l'origine. On essaye de trouver de nouvelles molécules, on met tout dans un pot, on regarde ce qui fonctionne, puis on retourne à celui qui

a une molécule qui marche et qui accepte de partager ses ressources. Cette organisation, gérée par notre équipe de découverte (« discovery »), commence à porter ses fruits.

### 3.6. La réglementation

L'existence et le respect de procédures réglementaires est essentiel et incontournable (**Figure 24**). Le but de la recherche est d'amener un médicament « sur le marché », c'est-à-dire à son enregistrement. Il faut d'abord que les essais cliniques soient

Figure 24

La mise sur le marché des futurs médicaments est soumise à une autorité réglementaire ; l'autorisation des essais cliniques requiert en plus les autorisations de comités d'éthique. L'Agence Africaine de Médecine sera déployée dans 55 pays sur le continent africain pour la régulation éthique des médicaments.

autorisés par les agences réglementaires et les comités d'éthique : il faut une autorité qui vérifie que la science est correcte et que la protection des patients est assurée, rôle critique des comités d'éthique.

Les dispositifs réglementaires sont souvent incomplets dans les pays où sévissent ces maladies tropicales négligées : les comités d'éthique et/ou les agences réglementaires n'ont pas toujours une expérience suffisante ; beaucoup ont évalué des molécules génériques, mais très peu ont eu à assurer seuls l'expertise, l'expertise chimique, préclinique, clinique, statistique de nouveaux traitements ou de nouvelles entités chimiques.

Des processus de collaboration ont été mis en place depuis une dizaine d'années, beaucoup autour de l'OMS. Ce sont des mécanismes préconisés par DNDi car permettant d'assurer le plus possible qu'une évaluation du rapport bénéfice/risque sera conduite principalement par les destinataires, c'est-à-dire les pays qui sont responsables des décisions d'autoriser l'introduction d'un nouveau médicament chez eux, en combinant

une garantie indispensable d'une revue solide des aspects scientifiques du dossier.

Dans le cadre du médicament de la maladie du sommeil, DNDi a pu effectuer un exercice extrêmement riche grâce au soutien du comité d'éthique de l'Hôpital Necker, qui a joué le jeu, et qui a accepté pendant un jour et demi de mener une évaluation d'un protocole de recherche clinique avec des experts du Soudan, du Kenya, d'Afrique du Sud, de République Démocratique du Congo. Il s'agissait de partager l'expertise technique de Necker avec les confrères des pays d'Afrique, et aussi pour les confrères africains de partager leurs questions et réflexion sur le même projet. Ce fut un exercice vraiment formidable...

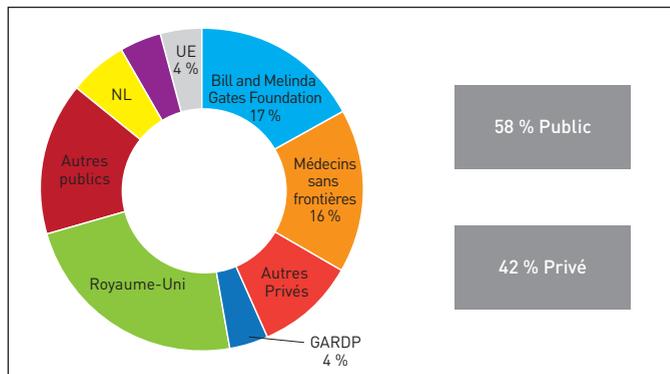
Pour le futur, une Agence Africaine sera en mesure de conduire l'ensemble des fonctions réglementaires.

### 3.7. Le financement

DNDi dispose de financements équilibrés entre des bailleurs publics et privés. La distribution des bailleurs est décrite sur la **Figure 25**. Les financements

**Figure 25**

558 M€ sont levés (sur 730 M€) par des fonds publics et privés pour délivrer seize à dix-huit traitements d'ici 2023.



privés proviennent de MSF, la Fondation Bill Gates, et d'autres fondations.

DNDi a développé huit traitements depuis 2007 (Figure 26). Le dernier est une nouvelle entité chimique enregistrée à l'Agence Européenne du Médicament et depuis peu en

République Démocratique du Congo ; il s'agit d'un traitement entièrement oral pour les deux stades de la maladie du sommeil : il n'est plus nécessaire de faire une ponction lombaire pour tous les patients, ce qui constitue une amélioration thérapeutique majeure.



Figure 26

Huit traitements ont été développés par DNDi depuis 2007.

## La clé est dans le partenariat : leçons pour le futur

Le modèle collaboratif de DNDi est dédié à l'innovation (Figure 26). Il est fondé sur le partenariat. Depuis quinze ans, nous en avons appris les clés : partager une vision globale, partager les objectifs, partager les succès, se compléter, ne pas dupliquer, se faire confiance, apprendre à se connaître... C'est le fondement que DNDi tente de réaliser dans tous nos projets, développés dans des cultures et partenariats toujours différents.



Figure 27

*Il faut continuer à encourager la collaboration dans la recherche de traitements.*

Cette stratégie est généralement gagnante : TB-Alliance vient de mettre sur le marché le prétomanide dans la tuberculose multirésistante ; MMV a développé un nouveau traitement dans le paludisme...

Ce modèle montre qu'il est possible d'apporter l'innovation aux malades jusque-là négligés.

# Partie 2

Nouvelles approches  
thérapeutiques



# Petites et grosses molécules dans le traitement des cancers

*Jean-Pierre Armand est médecin oncologue, senior consultant à l'Institut Gustave Roussy<sup>1</sup> où il a créé le Département d'innovation thérapeutique et d'essais précoces (DITEP), qui développe des recherches en phase clinique 1 sur les médicaments anticancéreux.*

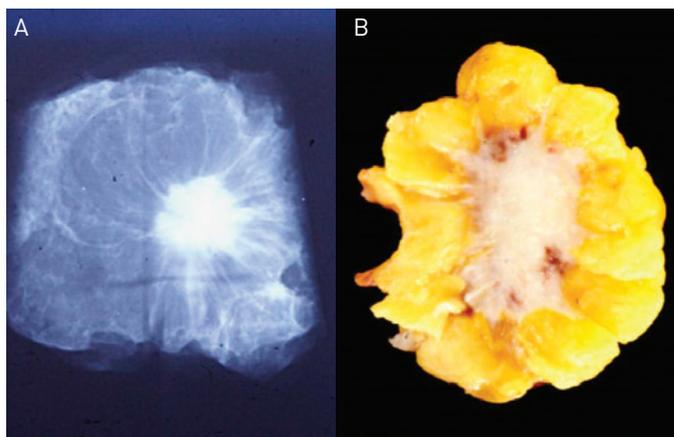
En tant que médecin, oncologue, j'ai développé des recherches dans la phase clinique 1, à savoir celle qui consiste à proposer, en oncologie, des nouveaux médicaments à des malades en échec thérapeutique. Le médecin devient alors un avocat qui a suivi le travail de recherche de molécules actives synthétisées par les chimistes, souvent depuis quinze ans, et qui essaye de faire de cette molécule un médicament.

Les médecins n'ont jamais inventé de médicament, leur art consiste simplement à

prendre un poison, à doser son action, à l'améliorer et puis essayer de démontrer que le rapport bénéfice/risque est positif. Il faut de la volonté pour ce développement très particulier et il faut être très proche des chimistes et/ou des biologistes qui ont inventé les médicaments. Le médecin travaille avec eux, respecte leur travail et essaie de faire en sorte que le résultat de cette coopération aboutisse à une molécule utile pour les malades.

Dans ce cadre, le chimiste Pierre Potier, ancien président de la Fondation de la Maison de la chimie, avait eu la grande gentillesse et la grande

1. [www.gustaveroussy.fr](http://www.gustaveroussy.fr)



**Figure 1**

Tumeur dans un cancer du sein :  
A) mammographie du sein porteur  
de la tumeur ; B) photographie de  
la tumeur.

amitié de me confier l'étude en phase 1 de ses deux grands médicaments anticancéreux, le Taxotère et la Navelbine, quand ces molécules ont quitté la dernière souris pour être proposées à l'homme.

## 1 Les traitements anticancéreux

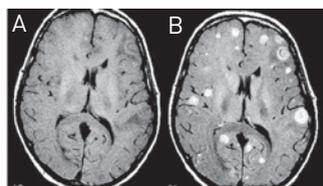
La **Figure 1A** est la mammographie d'un sein cancéreux et la **Figure 1B** est la photo de la tumeur de ce cancer du sein enlevée par le chirurgien quand il a réalisé une mastectomie, c'est-à-dire l'ablation du sein. Sur la pièce opératoire, on voit la tumeur (en blanc), avec tous ces aspects stellaires qui témoignent de l'envahissement des tissus, comme on le voit déjà sur la mammographie. On est devant une situation liée à une maladie locale, pour laquelle on utilisait la plupart du temps des traitements locaux.

Il existe différents moyens de traitement des cancers.

Les premiers **traitements locaux** dans l'histoire étaient chirurgicaux : les Égyptiens traitaient déjà chirurgicalement

les cancers. L'un des premiers progrès a été la radiothérapie qui, au-delà du scalpel, permettait de réaliser une destruction tumorale par des radiations ionisantes dans un volume défini autour de la tumeur primitive. On arrivait donc ainsi à un bien meilleur contrôle local du traitement et une limitation de son extension à distance.

En effet, lors du développement de métastases<sup>2</sup>, le traitement local ne suffit plus et un **traitement systémique** devient nécessaire. Dans ce but, au-delà des cytotoxiques<sup>3</sup>, deux types de molécules ciblées sont utilisées, des grosses et des petites, qui présentent chacune un intérêt spécifique, comme nous allons le voir par la suite. Le cancer du cerveau en particulier a des métastases (**Figure 2**), alors qu'elles sont moins fréquentes dans le cancer du sein au moment du diagnostic (entre 4 et 6 % des cas). La plupart du temps, on retrouve, avec des pourcentages différents, ces métastases au niveau de l'os, de la plèvre, du poumon, du foie ou des ganglions. On ne peut pas les traiter toutes individuellement par radiothérapie, d'où l'utilisation de traitements systémiques, qui sont la plupart du temps injectés par voie intraveineuse et par voie orale dans certains cas.



**Figure 2**

Image issue d'une IRM (Imagerie de Résonance Magnétique) du cerveau d'un patient avec des métastases. A) Non contrasté ; B) non contrasté après administration d'un révélateur (motexafin gadolinium).

2. Métastase : tumeur formée à partir de cellules cancéreuses qui se sont détachées d'une première tumeur (tumeur primitive) et qui ont migré par les vaisseaux lymphatiques ou les vaisseaux sanguins dans une autre partie du corps où elles se sont installées.

3. Cytotoxique : se dit d'une substance toxique pour une espèce de cellule.

La dernière voie qui se développe est le **traitement spécifique**, qui va permettre la médecine de précision.

## 2 Le traitement médical des cancers

### 2.1. La chimiothérapie

Dans la **Figure 3**, trois dames en hôpital de jour de chimiothérapie sont traitées pour un cancer du sein. Elles portent un fichu sur la tête car ces chimiothérapies utilisent des molécules antiprolifératives détruisant tout ce qui prolifère : les cellules malignes<sup>4</sup>, mais aussi les globules blancs, les racines des cheveux et la muqueuse intestinale. Ces thérapies sont assez brutales, avec des effets secondaires difficilement acceptables, mais elles ont guéri, par exemple des cancers généralisés des testicules, des maladies d'Hodgkin<sup>5</sup>, ou encore des lymphomes<sup>6</sup>.

Le terme chimiothérapie, signifiant un traitement d'origine chimique, est devenu un mot générique pour parler des traitements du cancer du sein et des autres types de maladies.

### 2.2. De la découverte d'une cible au médicament utile

Les traitements anticancéreux évoluent. Actuellement, nous sommes dans une situation

4. Cellules malignes : tumeurs dont la tendance est à une croissance rapide et à une généralisation.

5. Maladie d'Hodgkin : forme de cancer du système lymphatique.

6. Lymphome : cancer du système lymphatique qui se développe aux dépens des lymphocytes.

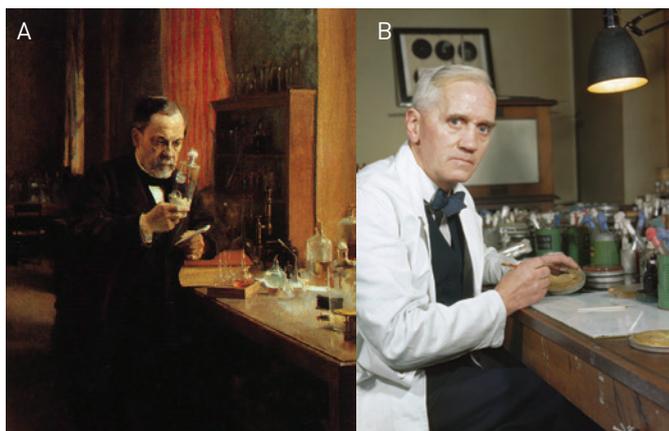


**Figure 3**

*Une salle de chimiothérapie du cancer du sein.*

semblable à celle vécue avec les antibiotiques où Pasteur découvrait le microbe mais n'avait aucun outil pour le contrôler, et cinquante ans après, Fleming, mais après beaucoup de recherches, découvrait, certes, un peu par hasard la pénicilline (**Figure 4**). Il a fallu cinquante ans pour passer de la reconnaissance d'une cible, le microbe, à un médicament utile.

Pour le cancer, ce délai de cinquante ans est maintenant raccourci parce que dès qu'on



**Figure 4**

*A) Louis Pasteur a découvert les microbes ; B) Fleming, cinquante ans plus tard, a découvert la pénicilline.*

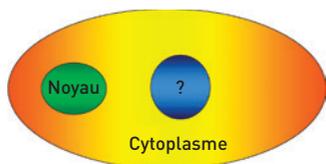


Figure 5

Biologie de la cellule telle que représentée en 1975 : les cellules étaient décrites à partir d'un noyau et d'un cytoplasme.

découvre une cible mutée responsable d'un cancer, on recherche un médicament pour la contrôler. La reconnaissance d'une cible permet ainsi le dépôt d'un brevet. On sait donc maintenant télescoper le temps qu'il fallait entre la découverte de la cible et la mise à disposition de la molécule utile.

Les connaissances sur la cellule se sont développées en cinquante ans. En 1975, quand j'ai commencé mes études en cancérologie à Toulouse, j'apprenais que la cellule était faite d'un noyau et d'un cytoplasme (Figure 5), on n'en savait pas grand-chose d'autre. Certaines se multipliaient très vite, et c'était hélas l'un des privilèges des cellules cancéreuses.

La Figure 6 illustre ce que l'on connaît actuellement sur la cellule, à savoir un système beaucoup plus complexe,

avec toute une série de voies de signalisation. C'est l'étude de la cellule cancéreuse elle-même qui a permis d'identifier toutes ces voies et leurs altérations. Celles-ci comportent elles-mêmes toute une série d'étapes, qui seront des cibles à une intervention par chimie, à un certain stade du développement cellulaire.

La complexité de ce réseau des voies de signalisation cellulaires, qui trouve une analogie étrange avec le métro parisien (Figure 7), explique l'une des difficultés du traitement du cancer. Chaque fois qu'on intervient sur une de ces étapes pour bloquer une signalisation, il se passe un événement adaptatif : la cellule trouve le moyen de contourner ce blocage par d'autres voies et d'aboutir finalement à la multiplication cellulaire.

Nous travaillons donc sur un système qui est complexe et pour lequel nous devons prévoir plusieurs cibles pour que nos interventions soient efficaces.

Ainsi, alors que la vision simple du cancer de 1970 à 2000 était celle d'une cellule qui se reproduisait plus ou moins vite et dont il fallait bloquer la prolifération (Figure 8), cette vision a évolué dans le temps.

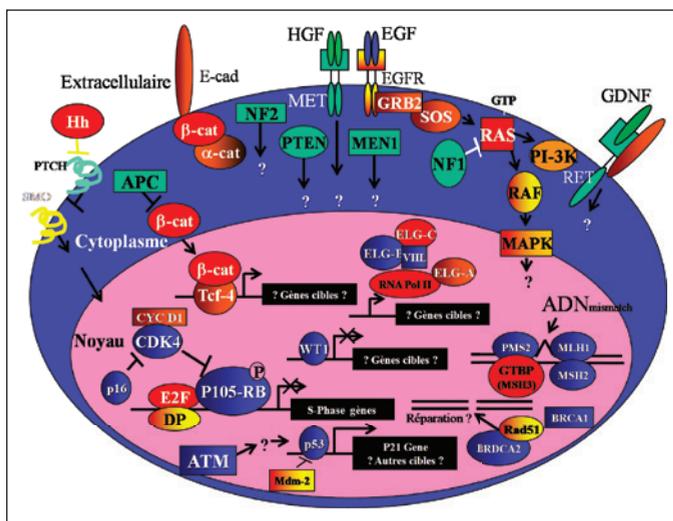


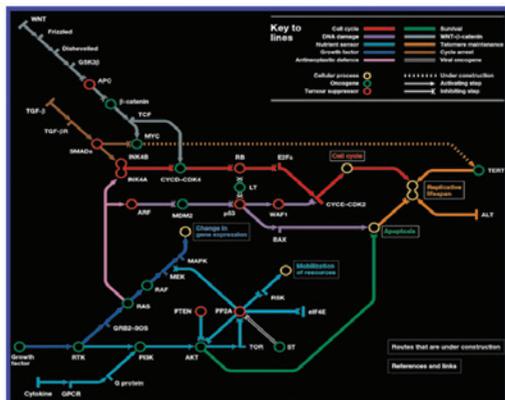
Figure 6

Biologie de la cellule actuellement : une cellule possède une organisation complexe, avec toute une série de voies de signalisation.

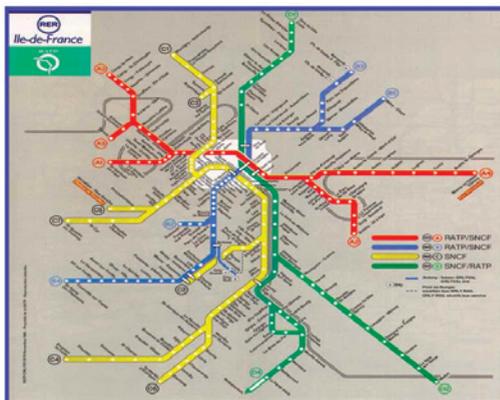
### 3 Le xx<sup>e</sup> siècle et les premières molécules anticancéreuses

Pierre Potier (Figure 9) était un grand chimiste, directeur d'un important laboratoire de recherche du CNRS, l'Institut de chimie des substances naturelles (ICSN). Quand le cancer a touché sa famille, il a décidé de le combattre et s'y

# CANCER



# PARIS



# RATP

Figure 7

Schématisation des voies de signalisation d'une cellule cancéreuse, qui se comparent au métro parisien !

investir à travers son domaine d'expertise : la chimie. Il a mis au point la dernière molécule cytotoxique du xx<sup>e</sup> siècle. Il en a confié le développement à une société française, Rhône-Poulenc (devenue Aventis puis Sanofi) pour fabriquer un premier médicament qui a actuellement une dimension mondiale et qui a rapporté des revenus importants au CNRS

grâce au brevet qu'il a déposé. Pierre Potier a permis, par son travail de chimiste à l'ICSN, d'aboutir à l'hémisynthèse du Taxol, et à la synthèse complète d'un analogue beaucoup plus puissant et plus actif, le Taxotère (Figure 9), médicament essentiel en 2020 dans le traitement du cancer du sein. Et ce n'était pas sa seule molécule anticancéreuse ! Il est rare

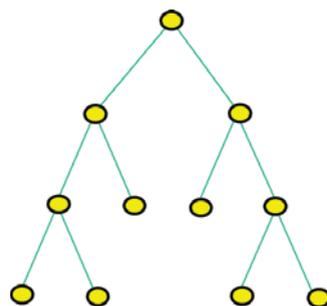


Figure 8

On est passé d'une vision simple du cancer à une vision complexe.



Figure 9

Pierre Potier a découvert ce qu'on peut considérer comme l'un des grands médicaments du xx<sup>e</sup> siècle, à savoir le Taxotère, molécule anticancéreuse dérivée des feuilles d'if.

qu'une personne crée deux molécules actives dans sa vie. Pierre Potier en a inventé une deuxième, la Navelbine, dont il a confié le développement aux laboratoires Pierre Fabre et qui est devenue un médicament de référence dans les cancers du poumon et du sein.

Les chimistes français furent très actifs dans cette deuxième moitié du  $xx^e$  siècle, qui fut une période excessivement riche dans le développement de molécules qui ont eu un développement mondial à partir d'inventions provenant la plupart du temps du CNRS, de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) ou de petites Biotech proposant secondairement leurs molécules au développement clinique des grandes compagnies pharmaceutiques.

## 4 Le $xxi^e$ siècle et le développement de la médecine de précision

### 4.1. La thérapie de ciblage des cellules tumorales

On s'oriente à présent vers de nouveaux types de médicaments

avec un meilleur ciblage des cellules tumorales. Le premier de ces anticancéreux cible un gène de fusion d'un chromosome : BCR-ABL (*Figure 10*).

Les chimistes d'une société suisse ont créé des molécules actives pour bloquer son activité : c'est la naissance du médicament Glyvec (STI-571), actif sur les leucémies et une forme de sarcome, le GIST.

Ce médicament a d'ailleurs failli disparaître parce que son marché n'était pas suffisant pour être rentable, bien que les cliniciens lui aient reconnu une activité authentique. Les médecins ont dû se battre pendant dix ans pour obtenir que cette molécule devienne un médicament, c'est-à-dire qu'elle soit développée en phases 1, 2 et 3, et enregistrée à la FDA puis proposée pour le soin. Ce type de situation n'est, hélas, pas exceptionnel pour les molécules efficaces dans les maladies orphelines.

La vision du cancer a changé entre 2000 et 2010 : la cellule tumorale peut maintenant être définie par une mutation (*Figure 11*).

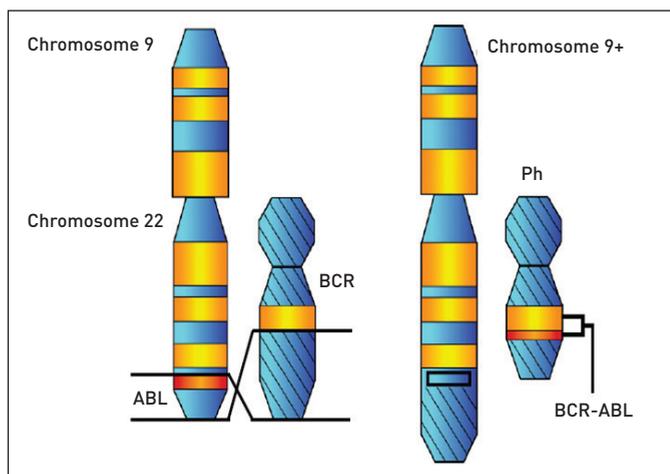


Figure 10

Médicament Glyvec (STI-571).

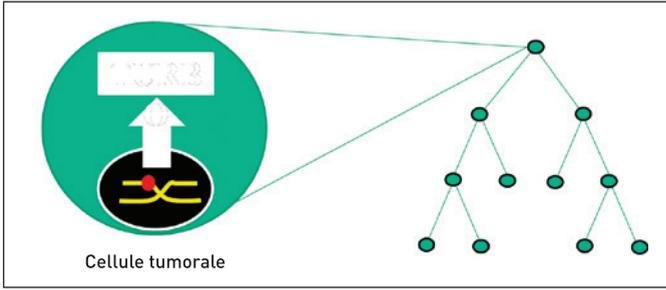


Figure 11

Au  $xx^e$  siècle, la cellule cancéreuse est définie par une mutation.

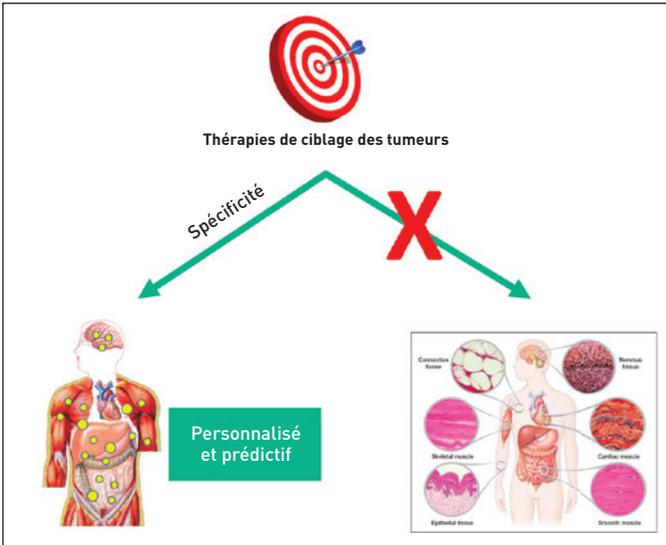


Figure 12

La médecine de précision révolutionne les thérapies anticancéreuses en ciblant la mutation seule.

La thérapie devient ciblée sur la mutation quand elle existe et est reconnue comme responsable du développement anarchique de la cellule (Figure 12), c'est pourquoi on parle de médecine de précision. On est passé à une vision différente de ce qu'était la maladie d'un organe (qu'il s'agisse du poumon ou d'une tumeur cérébrale) à une maladie identifiée par une ou plusieurs mutations, précise, prédictive de l'effet thérapeutique. Il n'y a pas un cancer du sein mais différents cancers du sein dont certains partagent des mutations avec d'autres cancers (estomac) dont le

traitement ciblé sera le même (Herceptine).

#### 4.2. Les grosses molécules en thérapie anticancéreuse : les anticorps monoclonaux

Les thérapeutiques ciblées utilisent soit de grosses molécules, soit de petites molécules : ce sont les anticorps monoclonaux issus de la biothérapie (Figure 13). Leur nom se termine par mab.

À leur côté, on retrouve les petites molécules issues de la recherche chimique, qui sont souvent des inhibiteurs de l'action de protéines, et dont les noms se terminent par nib.

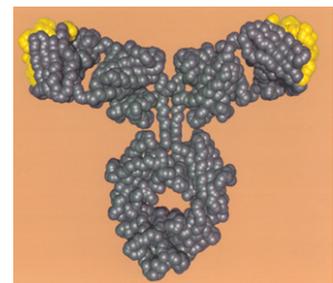


Figure 13

Les anticorps monoclonaux font partie des grosses molécules utilisées en thérapies anticancéreuses.

Actuellement, les anticancéreux de nouvelle génération se distribuent entre ces deux types de molécules.

Les grosses molécules sont beaucoup plus souvent issues du domaine de la biologie associée à la chimie que du domaine de la chimie pure. Ces molécules, fabriquées à partir de cellules mères, sont spécialement préparées et immortalisées pour produire des anticorps monoclonaux spécifiques dont la fabrication est coûteuse.

Contrairement à la synthèse par réaction chimique des petites molécules, il est très difficile de fabriquer des génériques de ces grosses molécules ; on obtient ce qui est appelé des « bio-similaires », c'est-à-dire quelque chose qui ressemble à la grosse molécule mais qui n'en est pas une copie exacte.

Ces grosses molécules doivent être injectées par voie intraveineuse, car par voie orale, elles sont détruites par l'acide chlorhydrique dans l'estomac

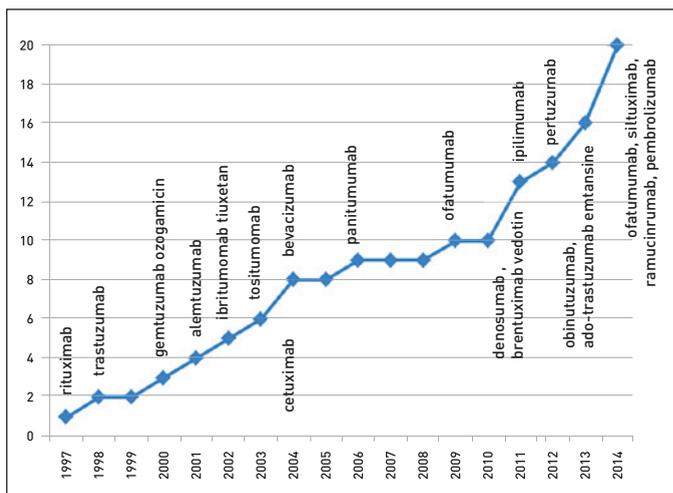
et n'auront donc aucun effet. Elles ciblent les antigènes de la surface de la cellule cancéreuse. Leur fabrication est complexe. Les laboratoires Pierre Fabre de Saint-Julien-en-Genevois (voir le **Chapitre de J.-F. Haeuw** dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020) possèdent une unité de recherche qui découvre et fabrique des anticorps monoclonaux.

La **Figure 14** montre le nombre des nouvelles molécules de ce type produites depuis 1997 : chaque année, un nouveau médicament est enregistré à la Food and Drug Administration (FDA). Ces nouveaux médicaments ont fait le succès de laboratoires comme Roche, qui actuellement a inventé beaucoup de ces molécules à travers sa filiale Genentech.

Les anticorps monoclonaux sont produits par un clone de cellules spécialisées du système immunitaire, les plasmocytes. Ils sont très largement utilisés en biologie et en médecine, à la fois comme outils de diagnostic et dans des buts thérapeutiques. Leur production *in vitro* est très difficile à cause de la faible durée de vie des plasmocytes. *In vivo*, leur production était obtenue en injectant chez l'animal un antigène donné puis en extrayant dans le sang des anticorps produits. Cette méthode très coûteuse et peu productrice a été révolutionnée : l'élaboration de la technique des hybridomes par César Milstein et Georges Köhler en 1975 a permis d'obtenir une plus grande quantité d'anticorps monoclonaux à faible coût. Cette avancée majeure leur a valu

**Figure 14**

Les anticorps monoclonaux acceptés par la FDA connaissent une croissance constante depuis 1997.



le prix Nobel de médecine en 1984. Cette technique consiste à injecter l'antigène que l'on cible à une souris puis à en prélever, au bout de quelques semaines, les cellules de la rate. Parmi ces cellules se trouvent des plasmocytes, qui secrètent des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène injecté. Ces plasmocytes sont fusionnés avec des cellules de tumeur appelées cellules myéломateuses (cellules cancéreuses immortelles) grâce à l'ajout de polyéthylène glycol (PEG), qui induit la fusion membranaire. Cela permet d'obtenir des hybridomes, qui ont la capacité de se multiplier plus rapidement que les cellules de départ et de fabriquer indéfiniment dans des incubateurs les anticorps spécifiques. On isole ainsi quelques clones cellulaires producteurs qui pourront être conservés dans l'azote liquide et font l'objet d'un brevet de fabrication particulier.

L'intérêt de l'utilisation des anticorps monoclonaux pour un traitement anticancéreux réside dans leur spécificité à détruire les antigènes ciblés des cellules tumorales. On peut soit utiliser les anticorps produits seuls (anticorps nus) qui, en s'attachant à la cellule, entraîneront sa mort, soit les anticorps associés à une autre molécule comme une toxine ou un produit radioactif. L'anticorps sert dans ce cas à amener à la cellule tumorale l'élément qui va la détruire.

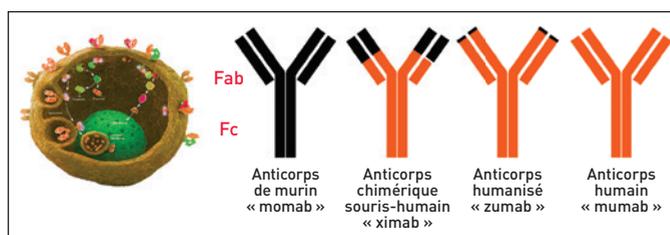
Cependant, comme la plupart des anticorps monoclonaux sont produits par des cellules de rongeurs, on peut observer une réaction immunitaire lors de leur injection chez un

patient. Cette réponse inactive progressivement l'action bénéfique de l'anticorps monoclonal ; pour remédier à ce problème, on produit des « anticorps chimériques » et des « anticorps humanisés ». Les anticorps chimériques sont obtenus par greffe de parties d'immunoglobuline humaine sur des anticorps de souris. Les anticorps humanisés sont produits par fermentation microbienne ou par des souris transgéniques. Ils sont ainsi potentiellement mieux tolérés dans l'organisme humain. La **Figure 15** montre ces différents types d'anticorps pouvant se fixer sur les antigènes de la surface de la cellule cancéreuse pour conduire à sa destruction. Leur nom permet de les reconnaître : ceux produits totalement par l'animal se terminent par momab, les chimériques se terminent par ximab, les humanisés par zumab, et ceux produits dans des cellules humaines par mumab.

On peut combiner l'action thérapeutique de ces anticorps avec celle des molécules cytotoxiques en utilisant des anticorps armés par une molécule cytotoxique très agressive que l'on ne pourrait pas injecter mais qui est ainsi guidée vers sa cible par l'anticorps : on cumule ainsi les actions destructrices de l'anticorps sur l'antigène et du cytotoxique

**Figure 15**

*Les différents types d'anticorps monoclonaux.*



sur la cellule et son environnement.

L'Herceptine, anticorps monoclonal humanisé du type zumab, est le médicament qui, s'il n'a pas révolutionné le traitement de tous les cancers du sein, a néanmoins révolutionné les 20 % de ces cancers qu'on n'arrivait pas à contrôler. Ces 20 % ont une mutation dite Her2 positive d'un antigène de surface de la cellule cancéreuse. Quand cette expression est détectée, on propose d'emblée au malade la combinaison de deux outils thérapeutiques : la chimiothérapie classique plus proche du Taxotère, combinée à l'Herceptine, ou mieux, une molécule hybride.

#### 4.3. L'action des petites molécules : un rôle inhibiteur

Les petites molécules de la seconde famille, d'origine chimique, sont souvent des *inhibiteurs de la thyrosine kinase*, enzyme jouant un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire. C'est une approche difficile de chimiste pour concevoir ces molécules qui doivent pénétrer dans la cellule pour aller cibler et inhiber avec précision la protéine en cause. Contrairement aux anticorps monoclonaux, la recherche est ici longue, mais une fois reconnue, la fabrication est peu coûteuse.

Ces petites molécules peuvent être facilement administrées

par voie orale, mais il faut rigoureusement respecter le traitement et la posologie car elles sont toxiques. Ce sont des molécules qui sont actives sur des cibles mutées ou amplifiées.

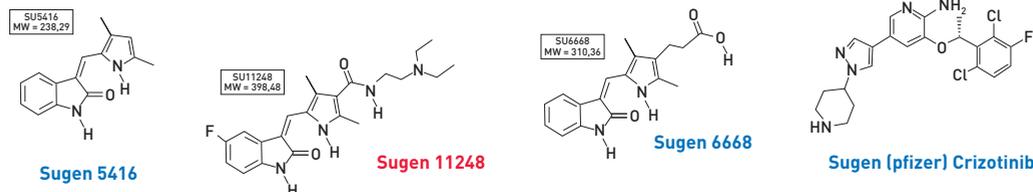
La **Figure 16** montre quelques exemples de ce type de molécules prometteuses. On peut citer le le Sugén 11249, qui a plusieurs cibles, dont la plus importante est la protéine endothéliale de croissance VEGF<sup>7</sup>. Elle favorise l'angiogenèse, indispensable à la prolifération des cellules cancéreuses. La première étude clinique, réalisée à l'Institut Gustave Roussy, a contrôlé la maladie de trois cancers du rein très résistants sur quatre, résultat ensuite confirmé sur des centaines de malades.

De la même bibliothèque Sugén, cette autre molécule, le Crizotinib, ciblant Alk, une mutation rare (5 %) du cancer du poumon, a été le premier médicament de référence dans les traitements ciblés des cancers du poumon ayant cette mutation, car 90 % des malades répondent au traitement.

7. VEGF : protéine dont le rôle dans l'organisme est de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) nécessaire pour accompagner la croissance des tissus et le développement des organes du corps humain.

Figure 16

Des petites molécules qui ont été prometteuses contre le cancer.



C'est donc une thérapie de précision, très ciblée selon le sous-type de cancer rare du poumon. Les médecins ont encore dû se battre pour faire avancer le développement de cette molécule pour une maladie orpheline.

#### 4.4. La médecine de précision et la sélectivité génétique des mutations

Pour être efficace, la médecine de précision doit sélectionner les malades pour identifier la mutation à cibler. La **Figure 17** montre une cohorte de malades atteints de cancers du sein par exemple, pour lesquels, quand on dispose d'une molécule comme l'Herceptine, on obtiendra un taux de réponse de l'ordre de 10 % peut-être, ce qui est peu, puisque 90 % auront reçu le médicament inutile.

Il faut donc identifier préalablement la mutation et ne traiter avec la molécule que les malades qui ont la mutation sur laquelle la molécule est active ; on obtient alors des réponses positives de l'ordre de 50 à 60 %.

Actuellement, on identifie ainsi dans le cancer du sein toute une série de maladies différentes qui ont des profils différents. Les mutations

sont identifiées en phases cliniques 1/2 à partir de biopsies réalisées sur les tumeurs. La **Figure 18** montre l'exemple d'une biopsie réalisée sur une métastase du cancer du foie : une aiguille creuse, avec un système à guillotine, est plantée dans la métastase, et le prélèvement est analysé par un biologiste moléculaire. Ce profil génomique évolue chez un même malade avec l'évolution dans le temps de la maladie.

Le génotypage de l'ADN des biopsies est alors réalisé par des robots ; un exemple des résultats est représenté **Figure 19**. On y observe une des mutations FGFR très peu fréquente de thyrosine-kinase qui amplifie le développement anarchique cellulaire et qui est observée dans le cancer des voies biliaires.

Comme nous disposons d'une molécule connue comme ciblant la mutation FGFR, nous l'avons proposée à ces malades, et c'est devenu le médicament de référence dans ce cancer du cholédoque avec cette mutation.

Ce cancer est certes moins fréquent que le cancer du poumon ou du mélanome. Ainsi, le traitement des vingt premiers malades qui ont une mutation spécifique a donné

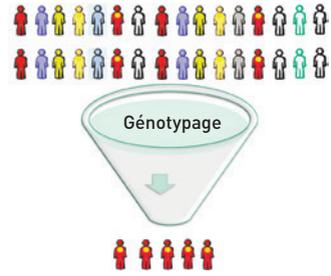


Figure 17

La médecine de précision nécessite un génotypage préalable.

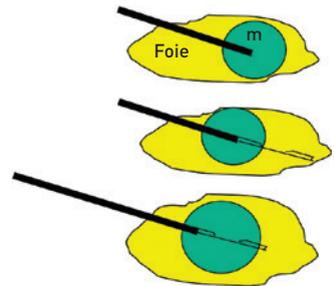


Figure 18

Schématisme d'une biopsie : l'aiguille est plantée dans la métastase.

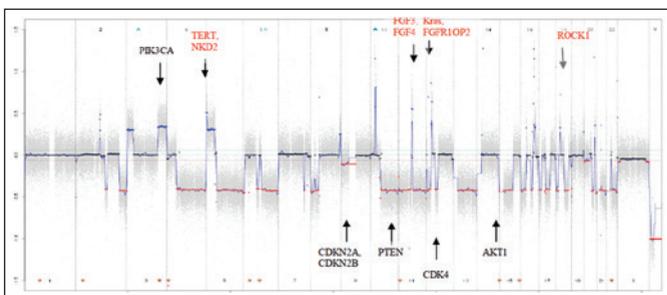


Figure 19

Le génotypage d'une tumeur met en évidence la mutation FGFR.

les résultats représentés sur la **Figure 20**. Tout ce qui est en dessous de la ligne de base montre que la tumeur a diminué, ce qui est au-dessus montre qu'elle a progressé. Quand la mutation commande effectivement la multiplication cellulaire, les résultats de disparition de tumeur sont impressionnants.

#### 4.5. Les limites rencontrées

La **Figure 21** montre l'exemple d'un mélanome pour lequel 1 kg de métastase sous-cutanée s'est développé à partir de cette tumeur noire de la peau (**Figure 21A**). La cible identifiée est ici la mutation de la protéine BRAF, qui joue un rôle fondamental dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses. Le malade a été traité avec un inhibiteur de cette mutation. Sans traitement, il serait décédé en deux mois. Après quinze semaines de traitement, la maladie a complètement disparu (**Figure 21B**). Malheureusement après vingt-trois semaines de traitement, on observe une rechute et une situation aussi désespérante qu'au début. Le génotypage de la biopsie sur cette deuxième mélanome, n'identifie plus la

mutation BRAF mais une autre nouvelle mutation, MEK.

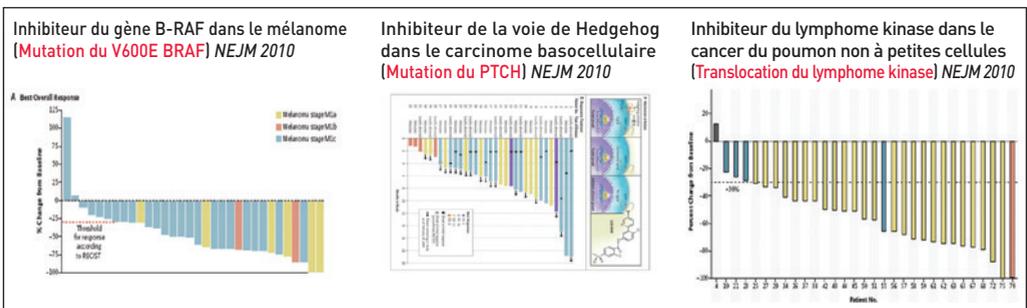
C'est là que se situe le problème de la cancérologie actuellement : il n'y a pas un seul turbo par cancer mais toutes une série de turbos potentiels, et quand on réussit à contrôler une première mutation, une deuxième se met en marche. Dans le cas de ce malade, on a contrôlé la rechute avec un anti-MEK qui a marché une deuxième fois, puis un an et demi après, il peut y avoir un redémarrage de la maladie avec une nouvelle mutation (**Figure 22**).

Dans l'exemple du mélanome, après l'échec de l'anti-BRAF, nous avons donné un anti-MEK qui a fonctionné un moment, avec le même problème de rechute et d'échappement à MEK (**Figure 23**).

On doit finalement considérer deux types de cancer : celui qu'on voudrait voir mais qu'on ne voit pratiquement jamais, le « cancer stupide », pour lequel il n'y a qu'un type de mutation, ou peu de mutations avec une seule qui est dominante. Dans ce cas, le traitement est efficace et la résistance est rare. Mais la plupart du temps, on a des cas de « cancers très intelligents », très adaptatifs avec plusieurs mutations « driver »

Figure 20

Effet d'une molécule inhibitrice sur une mutation qui commande la multiplication cellulaire



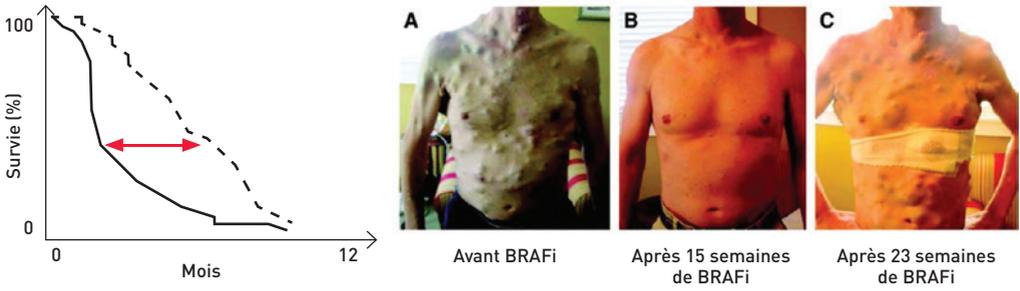


Figure 21

Photographie d'un malade atteint d'un mélanome : A) au début du traitement ; B) après quinze semaines de traitement ; C) vingt-trois semaines après le traitement.

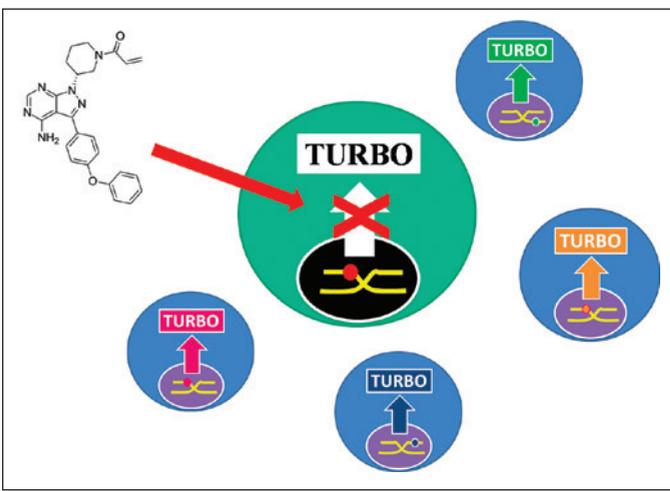


Figure 22

Les cancers sont adaptatifs.

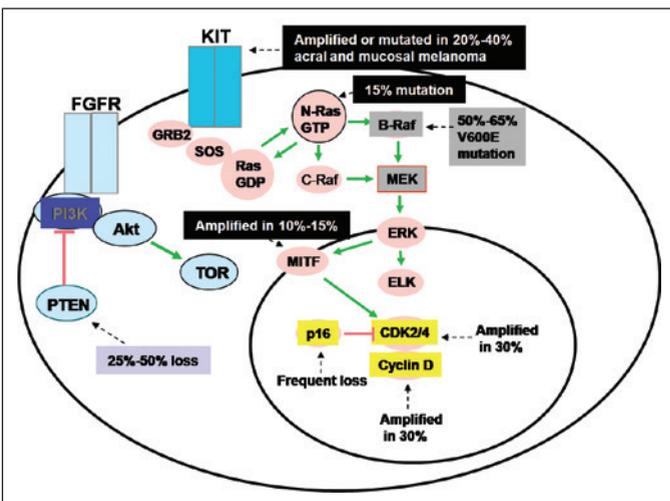


Figure 23

Les mutations possibles du mélanome sont nombreuses.

qui commandent la multiplication ; il faut dans ce cas lutter avec plusieurs molécules ensemble. On a l'impression de courir en vain après la guérison.

Cette adaptabilité des cellules cancéreuses explique la limite des thérapeutiques ciblées et cela, qu'elles utilisent des grosses ou des petites molécules.

## 5 L'immunothérapie : la thérapie qui met en jeu les cellules immunitaires

Toutes les thérapies précédentes ciblent la cellule cancéreuse soit avec un anticorps monoclonal, soit avec une petite molécule inhibitrice de la tyrosine kinase.

L'immunothérapie, elle, change de paradigme et cible directement les cellules immunitaires, les lymphocytes, dont l'action se trouve donc paralysée dans le cancer, permet son éclosion et son développement (*Figure 24*), alors qu'elle est reconnue comme « non soi ».

À partir du schéma relativement complexe de la *Figure 25*, il faut retenir que le lymphocyte T est l'acteur le plus important. C'est une cellule dendritique présentatrice d'antigènes (APC) qui va lui apporter les informations utiles à combattre le cancer (*Figure 25A*).

Ces informations passent par quelques vecteurs : antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique (CTLA4), protéine programmée 1 (PD1) ou ligand de mort cellulaire programmée (PDL1) (*Figure 25B*). On a découvert que les vecteurs

PDL1 et CTLA4 paralysaient l'activité des lymphocytes et on a fabriqué des anticorps monoclonaux anti-PDL1 et CTLA4. Deux prix Nobel de médecine ont récompensé ces travaux en 2018.

On voit sur la *Figure 26A* l'image d'un cancer du poumon avec toutes les opacités qui montrent une situation métastatique. Sur la biopsie correspondante (en bas), on peut voir quelques rares éléments cellulaires noirs, qui sont des lymphocytes mais qui n'ont pas d'activité et n'arrivent pas à contrôler la maladie. Après un traitement par un anti-PD1 (*Figure 26B*), l'image de la biopsie montre la présence de nombreux éléments cellulaires noirs, donc de lymphocytes ; ils ne sont plus inhibés mais sont actifs, comme le montre la réduction des métastases sur l'image scanner correspondante du poumon.

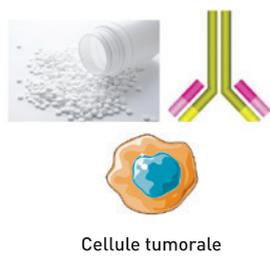
Ce nouveau champ de recherche est énorme. La *Figure 27* présente quelques-uns des anticorps actuellement en développement sur des récepteurs d'activation ou des récepteurs d'inhibition. Ils peuvent être combinés pour une plus grande efficacité (PD-1 + CTLA-4).

Un autre intérêt de l'immunothérapie est que ces lymphocytes existent dans tous les types de cancer, chez tous les malades et que l'on peut prétendre les activer pratiquement dans toutes les situations. La *Figure 28* représente la trentaine de cancers identifiés comme étant sensibles aux immunothérapies anti-PDL1. Par exemple, alors

qu'avec le mélanome on allait d'échec en échec, on observe maintenant une disparition complète et permanente même, après l'arrêt du traitement, sur 10 % des malades. C'est le cas par exemple d'un

patient jeune que nous avons traité et qui avait 100 g de métastase de mélanome dans le cerveau ; ces métastases ont disparu après deux mois de traitement, et de façon définitive après cinq mois

**Paradigme historique :**  
ciblage de cellules tumorales



**Nouveau paradigme :**  
ciblage de cellules immunitaires

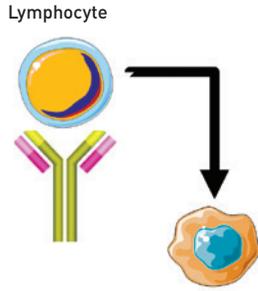


Figure 24

Dans le paradigme historique, on cible la cellule cancéreuse par une petite molécule ou un anticorps monoclonal. Avec l'immunothérapie, on passe par le lymphocyte et d'autres cellules immunologiques.

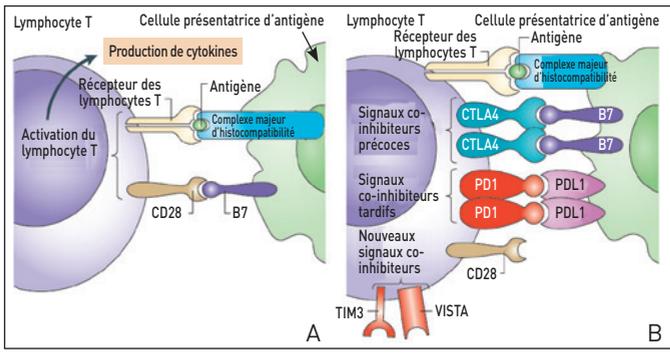


Figure 25

Schéma des interactions entre cellules et lymphocytes par ses antigènes et les récepteurs : A) lorsque le lymphocyte est activé ; B) lorsqu'il est inhibé.

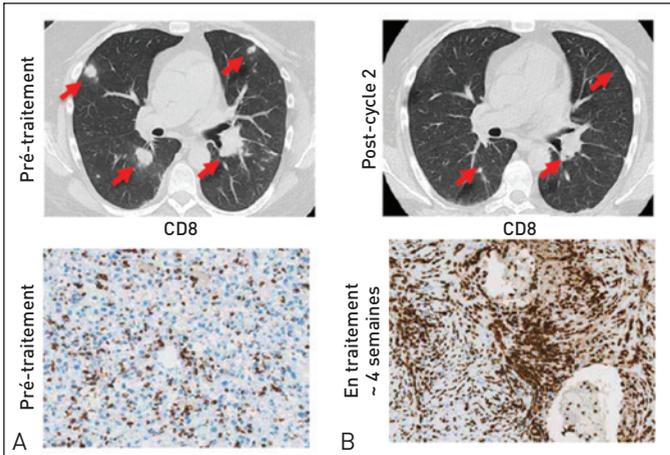


Figure 26

Photographie et biopsie de métastases dans un cancer du poumon, avant (A) et après traitement par anti-PD1 (B).

Figure 27

Anticorps de récepteurs d'activation ou d'inhibition de lymphocyte T en cours de développement.

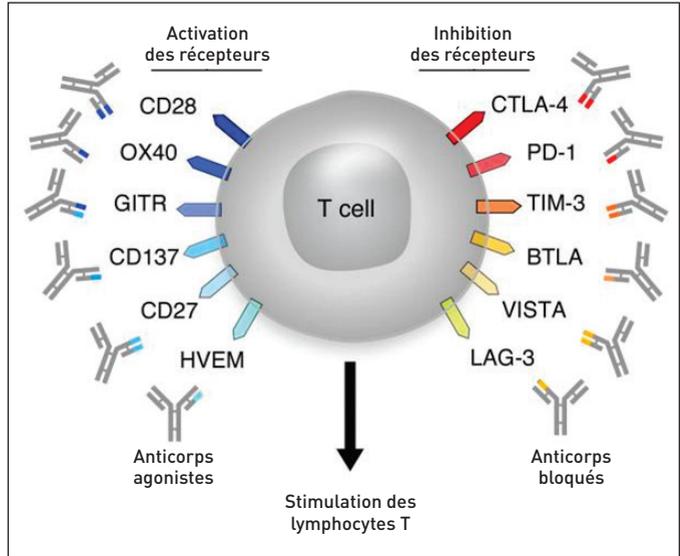
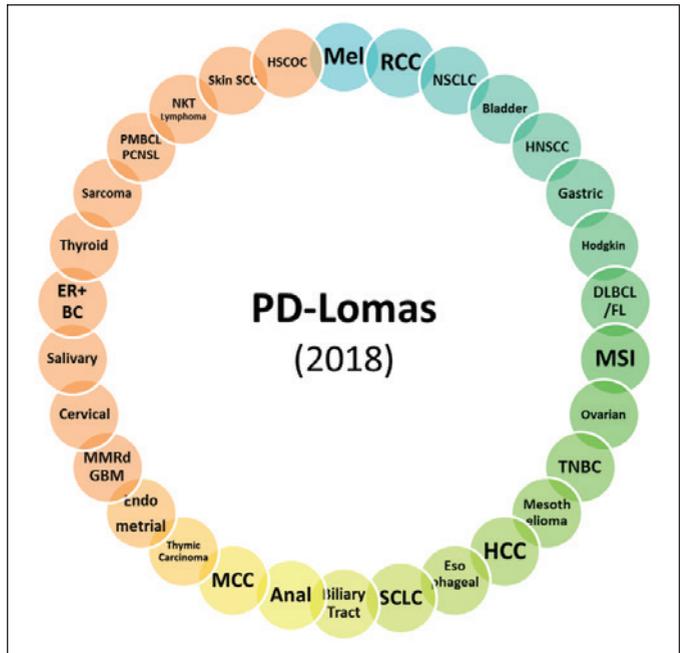


Figure 28

Les cancers sensibles aux immunothérapies anti-PDL1.



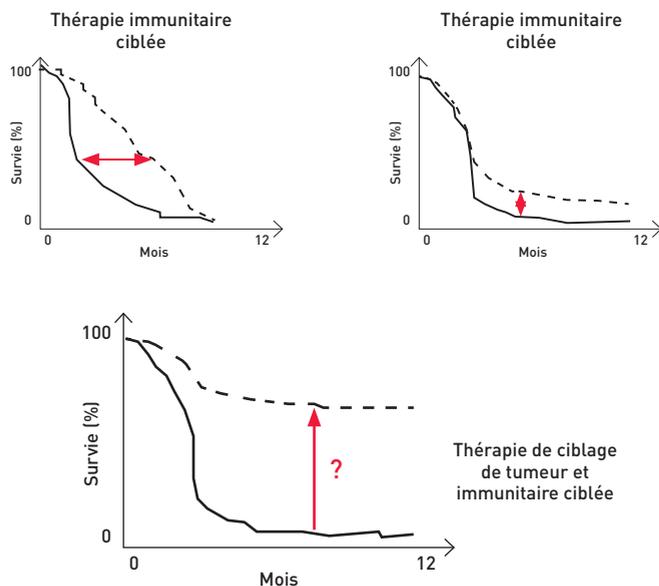
de traitement. Le travail du cancérologue a ensuite été de convaincre son entourage professionnel qu'il pouvait sans problème reprendre son activité professionnelle antérieure de pilote d'avion, trois ans après sa guérison.

Ce sont des situations qu'on n'imaginait pas avec les chimiothérapies antiprolifératives précédentes.

L'objectif actuellement est donc d'améliorer ces 10 % de réponses positives, et notamment dans le cas de l'échec

des petites molécules. La stratégie consiste donc à coupler les deux approches (**Figure 29**). On commence à mettre en place la combinaison à la fois

des thérapeutiques petites molécules ciblées et de ces anticorps monoclonaux d'immunothérapie dans plusieurs situations d'évaluation.



**Figure 29**

*La combinaison des thérapies petites molécules ciblées et immunothérapie par anticorps monoclonaux sera-t-elle la solution d'avenir ?*

## Le futur des traitements anticancéreux

Les immunothérapies sont porteuses d'espoirs mais leur toxicité reste un problème. Aucun médicament efficace n'est dénué de toxicité. Plusieurs types de toxicité se retrouvent en immunologie. La toxicité cutanée n'est pas très grave, elle peut être responsable d'un prurit (**Figure 30**). En revanche on peut avoir des toxicités hépatiques, intestinales (type maladie de Crohn), ou cela peut même conduire à une destruction de l'hypophyse<sup>8</sup>. On a donc des médicaments immunologiques qui sont très puissants, qui certes détruisent la tumeur, mais qui parfois sont mal équilibrés et se retournent contre les cellules normales de l'organisme.



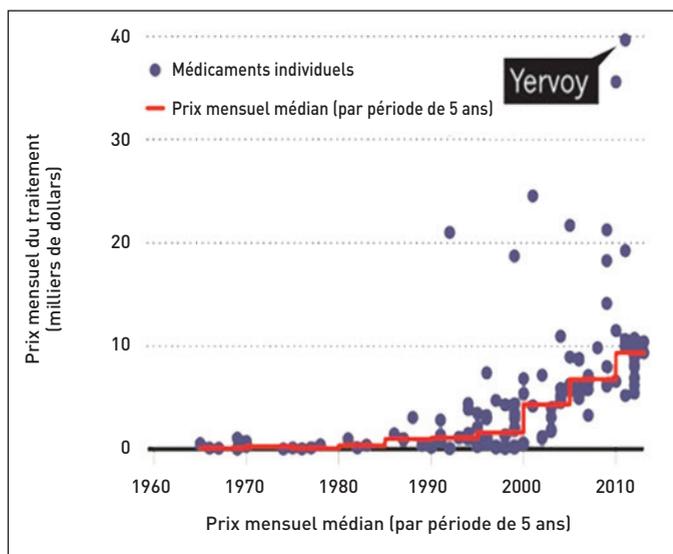
**Figure 30**

*Prurit sur des jambes, conséquence d'un traitement immunologique.*

8. Hypophyse : glande qui sécrète de nombreuses hormones.

Figure 31

Évolution du prix mensuel d'un traitement contre le cancer de 1960 à nos jours. Le coût du traitement du cancer monte en flèche avec les immunothérapies.



Il faut donc trouver un ajustement subtil dans cette immunothérapie pour garder l'efficacité, éviter la toxicité et surtout la reconnaître assez tôt pour ne pas poursuivre quand on a obtenu un bon résultat sur le contrôle de la cellule cancéreuse.

Le second handicap est le coût très élevé des traitements, en particulier à leur sortie. Les prix, certes, diminuent dans le temps quand l'utilisation du médicament est élargie à un plus grand marché (*Figure 31*), mais n'a rien de comparable aux cytotoxiques classiques.

Au-delà de la cancérologie, l'immunothérapie devrait demain avoir une place privilégiée dans les maladies neurodégénératives, ainsi que d'autres maladies chroniques.

Ainsi, en ce début du <sup>xxi</sup><sup>e</sup> siècle, petites et grosses molécules ciblées ont bouleversé les résultats observés dans le traitement des cancers. La recherche translationnelle approfondie des cancers et de leur résistance au traitement conduit à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques devant des maladies, hélas encore, aux capacités d'adaptabilité et de résistance d'une remarquable efficacité.

# Ciblage des défauts de réparation de l'ADN : nouvelles molécules et approches thérapeutiques utilisant la létalité synthétique

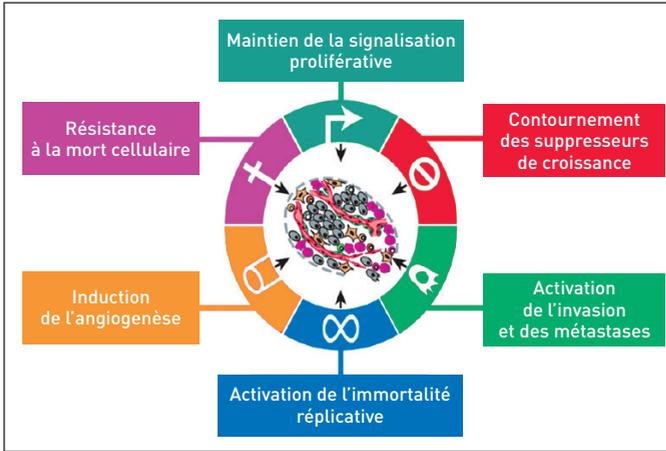
*Sophie Postel-Vinay est médecin chercheuse à l'Institut Gustave Roussy<sup>1</sup> dans le Département d'Innovation Thérapeutique et d'Essais Précoces (DITEP), qui est dédié aux essais cliniques de phase 1. Elle dirige une équipe ATIP-Avenir INSERM depuis 2018, avec une labellisation ARC recherche fondamentale, attribuée en 2019. Elle est lauréate du Prix Irène Joliot-Curie 2019 de l'Académie des Sciences.*

L'objectif de ce chapitre est de présenter les développements récents de médicaments ciblant la réparation de l'ADN, un axe dans lequel des

progrès importants en thérapie cancéreuse ont été réalisés au cours des dix dernières années.

Nous verrons brièvement les différentes voies de réparation de l'ADN et parlerons en particulier des inhibiteurs de

1. <https://www.gustaveroussy.fr/fr/institut>

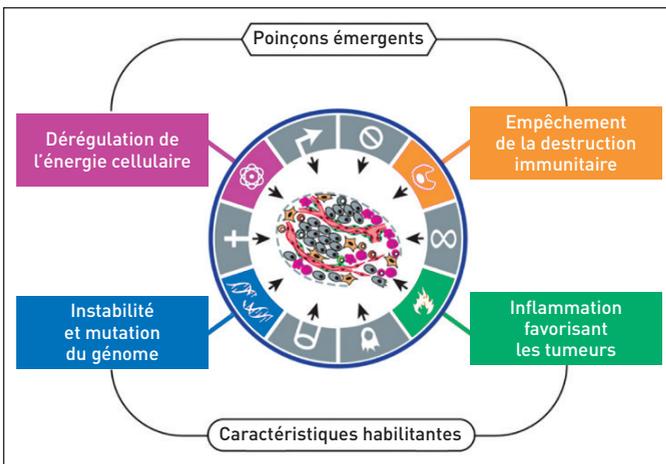


**Figure 1**

Caractéristiques de la cellule cancéreuse

Source : Hanahan D. et Weinberg R. A. (2000). *Cell*.

la protéine PARP réparatrice de l'ADN, qui sont des médicaments maintenant approuvés et qui ont été développés il y a une dizaine d'années. Nous verrons comment on peut aussi utiliser ces médicaments en combinaison avec d'autres thérapies pour jouer sur d'autres caractéristiques de la cellule cancéreuse et augmenter encore leur efficacité thérapeutique.



**Figure 2**

Caractéristiques de la cellule cancéreuse, version actualisée en 2011 par ajout de la caractéristique instabilité génétique.

Source : Hanahan D. et Weinberg R. A. (2011). *Cell*.

## 1 Le cancer et la réparation de l'ADN

### 1.1. Les caractéristiques de la cellule tumorale

Les caractéristiques de la cellule tumorale sont résumées sur la **Figure 1** : une prolifération incontrôlée, une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, une angiogenèse<sup>2</sup> incontrôlée, la capacité de métastaser<sup>3</sup>, etc.

Le schéma de **Figure 1**, paru en 2000, a été repris en 2011 avec l'ajout d'une caractéristique importante, à savoir l'instabilité génétique avec la présence de mutations en nombre beaucoup plus élevé que dans le reste des cellules de l'organisme (**Figure 2**).

### 1.2. Les syndromes de prédisposition au cancer

Des études montrent que les anomalies de la réparation de l'ADN et les syndromes de prédisposition au cancer sont très liés. Un exemple connu en observation clinique de syndrome de prédisposition au cancer est l'anémie<sup>4</sup> de Fanconi, dans laquelle les patients ont une mutation dans une voie de réparation

2. Angiogenèse : formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà existants, permettant à la cellule tumorale d'être approvisionnée en oxygène et en substances nutritives.

3. Métastase : migration de cellules à partir d'une tumeur primitive pour migrer vers une autre partie du corps et former un second foyer tumoral.

4. Anémie : appauvrissement du sang, caractérisé par la diminution des globules rouges et provoquant un état de faiblesse.

de l'ADN dans toutes les cellules de leur organisme. Ces patients sont prédisposés à développer un type particulier de cancer, généralement des cancers du sang, mais ils développent aussi des hémopathies, des taches sur la peau, des malformations des pouces. Ils sont généralement traités par chimiothérapie cytotoxique.

Un autre exemple de syndrome de prédisposition au cancer concerne les anomalies de BRCA1 et BRCA2, qui sont deux gènes intervenant dans certaines voies de réparation de l'ADN et qui prédisposent aussi à certains types de cancers. Là encore, il est intéressant de voir que les patients présentant des mutations de ces gènes dans toutes les cellules de leur organisme ne vont pas développer tous les types de cancer mais plutôt des cancers du sein, des cancers de l'ovaire, des cancers de la prostate, et plus rarement des cancers du pancréas, des cholangiocarcinomes<sup>5</sup>. Ces patients sont traités en ciblant les inhibiteurs de la protéine PARP, qui intervient dans la réparation de l'ADN.

Enfin, un troisième exemple est le syndrome de Lynch, lié à une autre mutation dans une autre protéine qui joue un rôle dans la réparation de l'ADN et induit d'autres types d'anomalies au niveau de la cellule cancéreuse.

Il est intéressant de noter que, si certains de ces cancers répondent bien aux agents ciblant la réparation de l'ADN, ils peuvent aussi

être sensibles à l'immunothérapie<sup>6</sup>. Nous verrons que c'est, entre autres, parce qu'ils accumulent certains types de mutations à la surface de la cellule cancéreuse, ce qui permet une reconnaissance beaucoup plus facile de cette cellule par les cellules immunitaires. Ces cancers sont extrêmement sensibles à de nouveaux médicaments d'immunothérapie, les anti-PD-1 (voir le **Chapitre de J.-P. Armand** dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020).

## 2 Monothérapies anticancéreuses à base d'inhibiteurs de la réparation de l'ADN

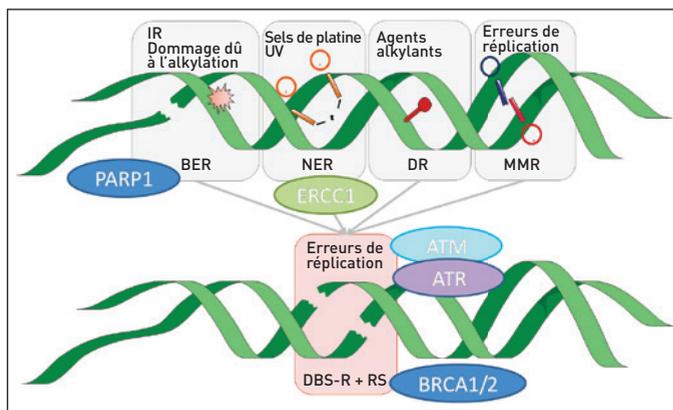
### 2.1. Résumé des voies de réparation de l'ADN

Plusieurs voies de réparation existent qui sont activées selon le type de dommage de l'ADN (**Figure 3**) :

- on peut avoir de petits dommages comme une cassure d'un simple brin ou une petite anomalie au niveau d'une base de l'ADN. La réparation passe par la voie « *Base Excision Repair* » (notée BER sur la **Figure 3**) ;
- des dommages plus compliqués peuvent se produire, comme des ponts entre deux bases, qui peuvent se situer au niveau du même brin ou au niveau de deux brins différents. Ce type d'anomalie est réparé par la voie « *Nucleotid Excision Repair* » (NER, **Figure 3**), qui

6. Immunothérapie : traitement qui vise à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme pour lutter contre les cellules cancéreuses.

5. Cholangiocarcinome : cancer des voies biliaires.



**Figure 3**

Les principales voies de réparation de l'ADN, selon le type de lésion.

est plus compliquée que la voie BER ;

- une anomalie très simple est la présence d'une base alkylée, ce qui peut être réparé par la voie « *Direct Repair* » (DR, **Figure 3**) ;

- la dernière anomalie, qui intervient dans le syndrome de Lynch, est la voie de réparation des mésappariements (MMR) : c'est ce qui se produit si l'on a par exemple une adénine qui est mise face à une cytosine<sup>7</sup>.

Il faut bien comprendre que, lorsqu'une cellule réplique son ADN, si n'importe laquelle de ces lésions n'est pas correctement réparée, cela va conduire à des cassures double brin, qui sont des lésions extrêmement toxiques pour la cellule (**Figure 3**). Si les deux brins de l'ADN sont cassés, la réparation peut néanmoins se faire par des voies spécialisées du « *double strand repair* » (DSB-R).

Nous parlerons en particulier par la suite des protéines suivantes : les protéines PARP1 interviennent dans la voie

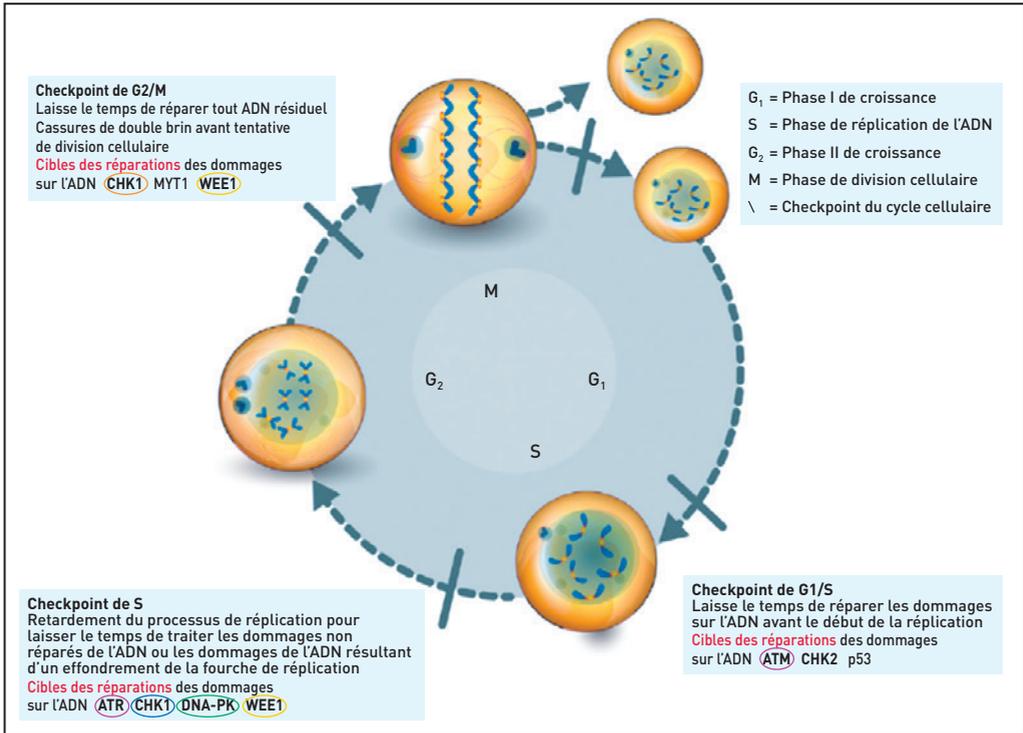
de réparation de la cassure simple brin (BER) ; les protéines BRCA1 et 2 jouent un rôle dans la voie de réparation double brin ; ERCC1 est une protéine intervenant principalement dans la voie de réparation NER. Enfin, ATM (« *Ataxia Telangectasia Mutated* ») et ATR (« *Ataxia Telangectasia and Rad3-related* ») sont deux protéines jouant également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation des cassures double brins.

Il faut aussi souligner que tous ces mécanismes de réparation dépendent aussi de la phase du cycle cellulaire (**Figure 4**). L'industrie a maintenant réussi à développer des médicaments très ciblés contre pratiquement chacune des protéines qui sont importantes dans les différentes phases de ce cycle cellulaire et qui participent à la réparation de l'ADN et au contrôle de la qualité de l'ADN de la cellule.

Notamment, on a des médicaments qui ciblent ATM, qui ciblent ATR, CHK1, qui jouent ici au niveau du checkpoint de S (mécanisme de détection des anomalies agissant pendant la phase de réplication de l'ADN) et de G2/M (mécanisme de détection des anomalies agissant pendant la phase de croissance et de préparation de la mitose), juste avant la mitose<sup>8</sup>. Ceux qui ciblent DNA-PK sont plus nombreux plus récents et ont été développés il y a moins de cinq ans. WEE-1 est également une

7. Rappelons qu'en temps normal, l'adénine s'apparie à la thymine, et la cytosine s'apparie à la guanine.

8. Mitose : division de la cellule au cours de laquelle chaque chromosome se divise pour donner lieu à deux cellules filles.



protéine qui joue au niveau de ces checkpoints S/G<sub>2</sub> et G<sub>2</sub>/M. Nous disposons donc maintenant de tout un arsenal thérapeutique de médicaments inhibiteurs de ces protéines pour cibler (donc empêcher) la réparation de l'ADN à différentes phases du cycle cellulaire.

## 2.2. Les monothérapies anticancéreuses et le principe de la létalité synthétique

La majorité des anomalies dans le cancer sont souvent des anomalies où la protéine acquiert une fonction anormale (appelée anomalie gain de fonction) ; on cherche alors à cibler cette protéine pour l'inhiber ou la dégrader. Cibler une protéine non fonctionnelle

comme BRCA est plus difficile : comment cibler quelque chose qui est absent ou déjà endommagé ?

Le concept de létalité synthétique provient d'études réalisées sur la mouche drosophile. Il a été remarqué que si dans certaines drosophiles on inactive un gène, elles se développent correctement ; si on inactive un autre gène, elles se développent encore correctement, mais si on inactive les deux, cela aboutit à une létalité, c'est-à-dire à la mort, très tôt au cours du développement.

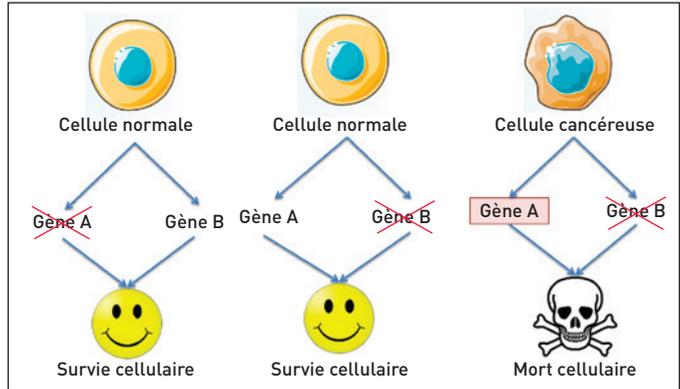
Ce principe pourrait être applicable dans les cellules cancéreuses. Considérons une cellule normale, avec le gène A, par exemple BRCA, et un autre gène B, par exemple PARP, qui fonctionnent correctement.

Figure 4

Mécanismes de réparation de l'ADN et médicaments adaptés selon la phase du cycle cellulaire.  
Source : d'après O'Connor (2015).  
*Molecular Cell.*

Figure 5

Principe de la létalité synthétique, ou recherche de la perte de fonctionnalité : la déficience de chaque gène séparément n'entraîne pas la mort cellulaire, contrairement à la déficience simultanée des deux gènes.



S'il y a une mutation de BRCA, la cellule peut survivre. Si on inhibe PARP avec un médicament, la cellule survit encore si BRCA est présent. Si en revanche on a une cellule cancéreuse avec une mutation de BRCA et que l'on inhibe PARP, la cellule va mourir (Figure 5).

C'est ce principe qui est utilisé dans le développement des médicaments qui ciblent

la réparation de l'ADN dans le cancer.

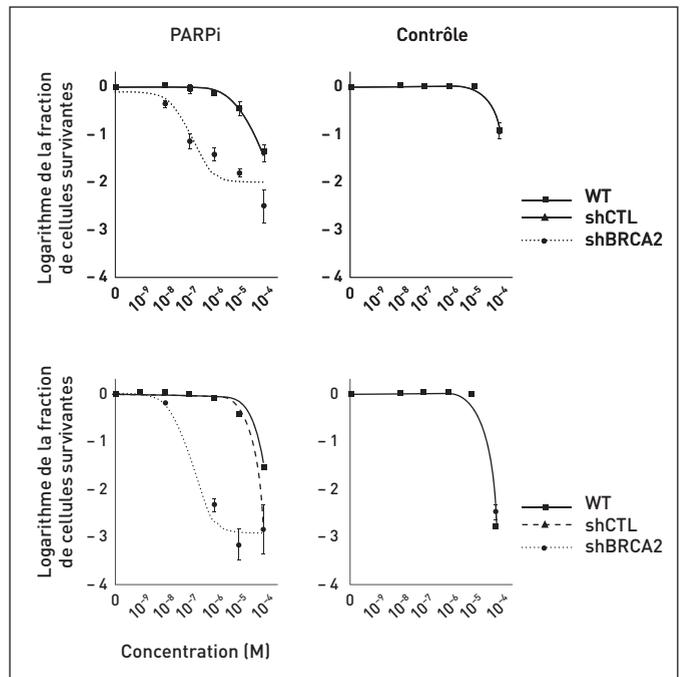
2.2.1. Inhibiteurs de PARP

Le premier inhibiteur de PARP développé a été l'Olaparib. La Figure 6 représente une courbe de survie de la cellule cancéreuse en présence de ce médicament. La concentration du médicament est portée en abscisse. Les courbes en pointillés sont celles quand

Figure 6

Comparaison des courbes de survie (représentatives du logarithme de la fraction de cellules survivantes en fonction de la concentration de médicament) pour des cellules ayant un BRCA fonctionnel et celles ayant un BRCA inactivé (shBRCA2). WT = Sauvage.

Source : d'après Farmer et coll. (2005). Nature.



l'expression de la protéine BRCA est inactivée. On voit sur les courbes de gauche que dans ce dernier cas, lorsqu'on utilise un inhibiteur de PARP (PARPi), les cellules commencent à mourir pour des concentrations faibles ( $10^{-8}$ ) de l'inhibiteur, alors qu'il faut utiliser des concentrations en inhibiteur de  $10^{-4}$  pour que les cellules commencent à mourir lorsque BRCA est actif.

Lorsqu'on expose une cellule témoin dans laquelle BRCA est

fonctionnel à un inhibiteur de PARP, elle déclenche la voie de réparation de l'ADN. Quand la cellule est BRCA déficiente, elle ne réagit pas, donc la cellule ne répare plus les lésions et va mourir.

#### Développement des inhibiteurs de PARP

Ces études précliniques ont conduit au développement de six inhibiteurs de PARP (Figure 7). On peut voir que toutes les molécules inhibitrices possèdent un noyau

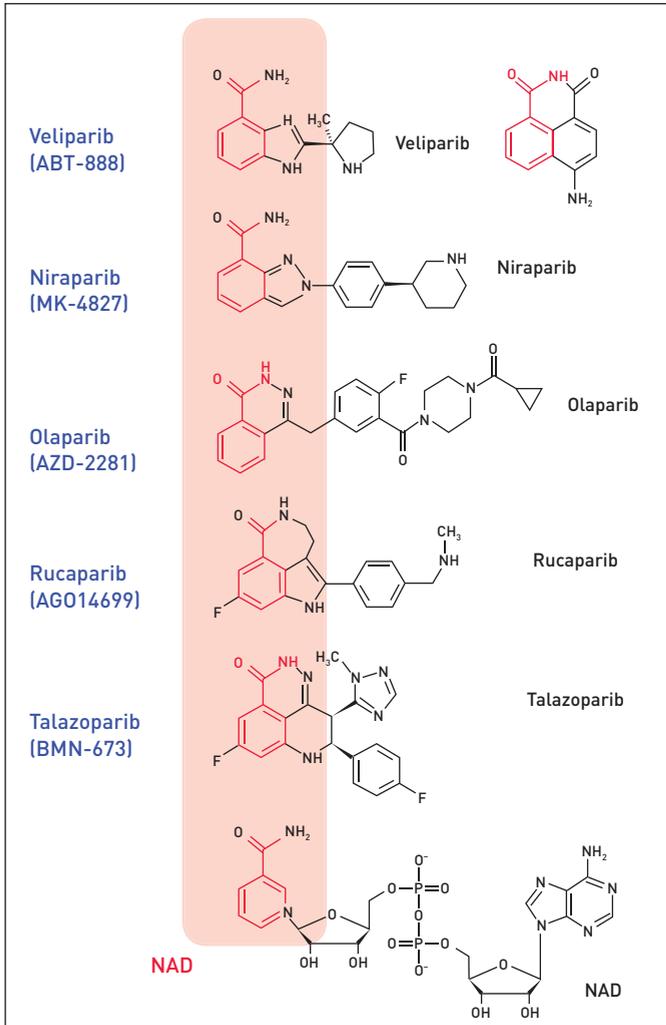


Figure 7

Les six médicaments inhibiteurs de PARP ont tous un noyau nicotinamide.

Source : d'après la présentation d'Y. Pommier, TAT 2017.

Figure 8

A) Modélisation de la protéine PARP coincée sur l'ADN ;  
 B) échelle comparative des pouvoirs de piégeage de PARP par les différents médicaments existants ;  
 C) mécanisme de formation d'un collapsus de la fourche de réplication de l'ADN.

Sources : d'après Langelier (2012). *Science* ; Lord (2017). *Science* ; Postel-Vinay (2013), *Oncogene*.

nicotinamide. La grosse molécule de la protéine PARP a en effet besoin d'un cofacteur, le NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide) pour fonctionner. Les médicaments inhibiteurs vont se mettre à la place de ce cofacteur, dans la poche du NAD<sup>+</sup> de PARP, ce qui empêche PARP de fonctionner correctement donc de réparer l'ADN. Tous les inhibiteurs développés agissent de la même manière.

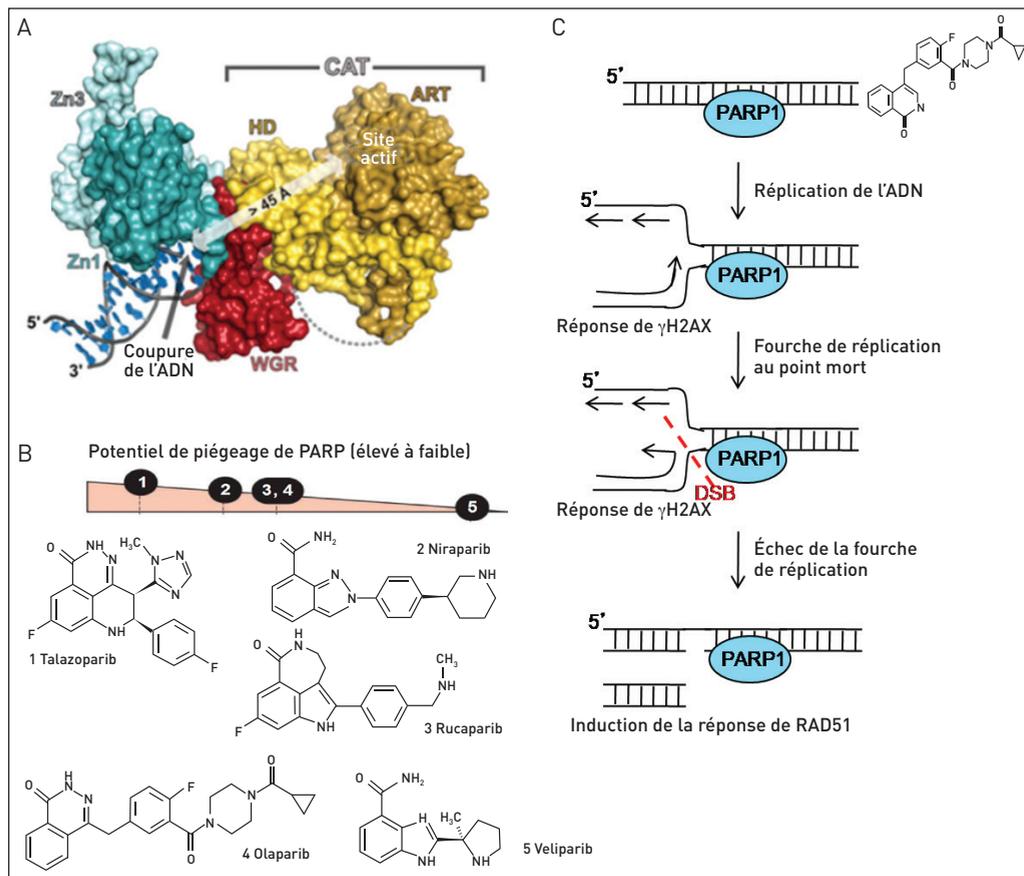
Leur différence d'efficacité réside dans leur seconde

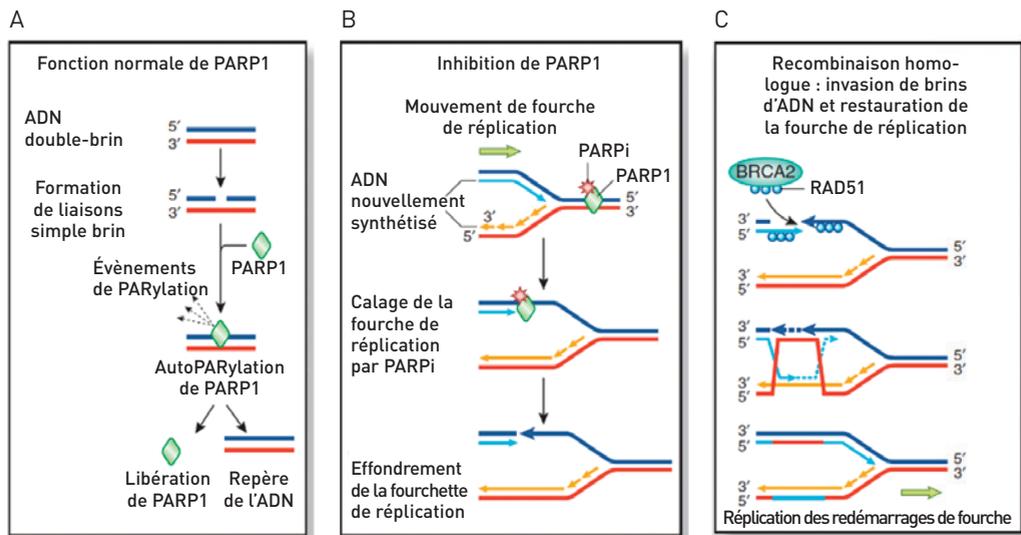
9. NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide, cofacteur présent dans la cellule et qui est nécessaire au bon fonctionnement de PARP.

propriété qui consiste à coincer PARP sur le noyau d'ADN. Quand la protéine PARP détecte une lésion de l'ADN, elle se fixe, répare puis repart. Quand un médicament inhibiteur bloque son activité, elle reste coincée, piégée. La différence entre les inhibiteurs développés est la qualité du piégeage.

**Mécanismes d'action des inhibiteurs de PARP**

La Figure 8A montre que la taille de la protéine PARP est énorme par rapport à celle de la double hélice d'ADN, donc quand PARP est coincé sur l'ADN par l'inhibiteur de PARP, la fourche de réplication de l'ADN est bloquée par





une cassure double brin, très toxique pour la cellule, et qui peut la faire mourir (**Figure 8C**). La **Figure 9** permet d'approfondir la compréhension du mécanisme d'inhibition de l'ADN. Elle montre comment PARP intervient pour réparer la coupure d'un brin d'ADN (**Figure 9A**). Et comment la fourche de réplication de l'ADN est bloquée en présence de l'inhibiteur de PARP (**Figure 9B**), ce qui entraîne l'effondrement de la fourche, conduisant à la mort de la cellule. Mais si BRCA reste présent et actif (**Figure 9C**), la fourche bloquée peut être réparée et la réplication de l'ADN pourra se faire.

*Développement des inhibiteurs de PARP dans le cancer de l'ovaire*

PARP a été clonée en 1966 et le gène BRCA a été découvert en 1984, son rôle dans le cancer initial du sein et de l'ovaire, ainsi que dans d'autres types de cancers (prostate, pancréas, etc.) (**Figure 10**), n'ayant été

découvert que plus tard. Le principe de la létalité synthétique, qui était connu depuis longtemps, a été réutilisé dans le traitement du cancer à partir de 2005, mais ce n'est qu'en 2014 que les inhibiteurs de PARP ont été approuvés dans le traitement du cancer de l'ovaire ; ils ont ensuite été approuvés par la FDA en 2018 dans le cancer de la prostate, du sein, et en 2020 dans le cancer du pancréas.

Il a donc fallu dix ans de développement entre le premier patient traité par le médicament issu de la découverte de la létalité synthétique jusqu'à l'approbation de ces médicaments en clinique.

Dans le cadre d'études cliniques en phase 1, le traitement à l'Olaparib d'une patiente atteinte d'un cancer

**Figure 9**

*A) Mécanisme de fonctionnement de PARP dans la réplication de l'ADN ; B) mécanisme de formation d'un collapsus de fourche, du fait de la présence d'un inhibiteur de PARP ; C) mécanisme de réparation de la fourche de réplication, par BRCA.*

PARP1	gène BRCA	SL	OC	PC/BC
1966	1984	2005	2014	2018

**Figure 10**

*Dates clés pour le développement des inhibiteurs de PARP.*

de l'ovaire a conduit à la diminution d'un nodule péritonéal<sup>10</sup> après quatre mois de traitement. Chez une autre patiente, le nodule péritonéal a même complètement disparu après ces quatre mois de traitement, ce qui montre l'efficacité de

ces médicaments inhibiteurs de PARP.

Cette efficacité est également bien illustrée par les courbes de survie sans progression (**Figure 11**), dans lesquelles le pourcentage de patients dont la tumeur n'a pas progressé est représenté en fonction de la durée de traitement par l'Olaparib (en bleu), inhibiteur de PARP, ou par un placebo

10. Péritonéal : du péritoine, membrane tapissant l'intérieur de l'abdomen.

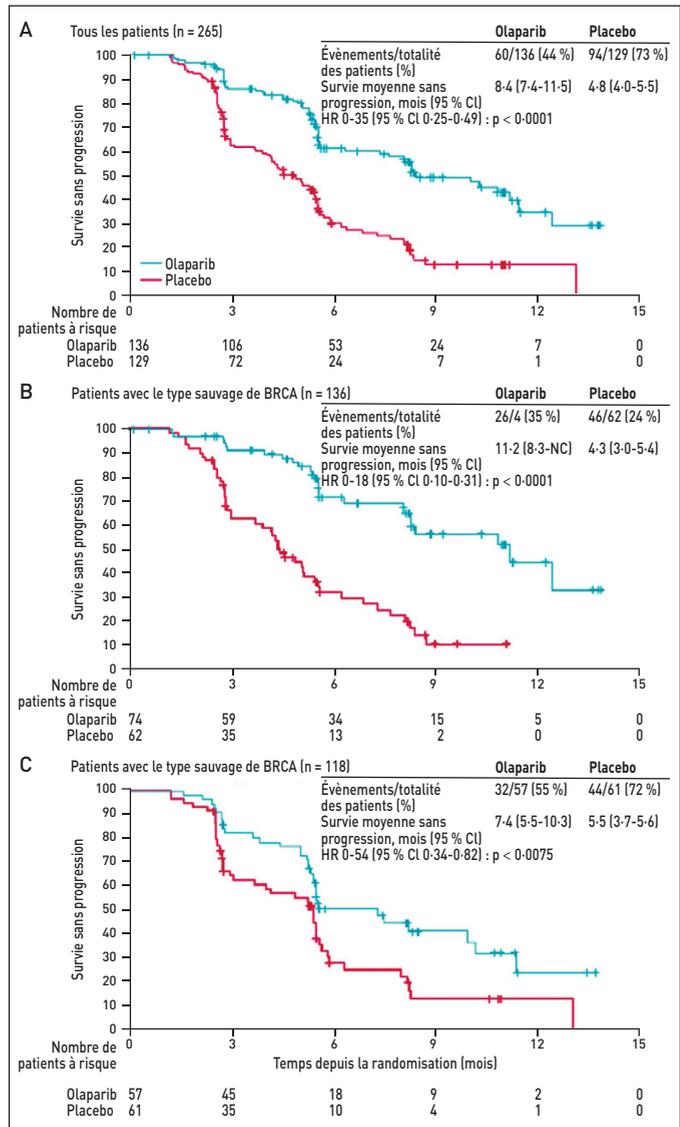


Figure 11

Comparaison des courbes de survie pour les patients traités par Olaparib (en bleu) et par placebo (en rouge).

Soruce : d'après Lederman (2014). *Lancet Oncol.*

(en rouge), dans le cancer de l'ovaire. Ces courbes représentent les résultats du premier essai clinique réalisé sur les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire sensible aux sels de platine ou muté BRCA, qui a permis l'enregistrement de ce médicament en Europe.

Les inhibiteurs de PARP sont administrés par voie orale et leur toxicité générale est connue. Pour développer un nouveau médicament, on commence par l'administrer à des patients en phases relativement avancées de la maladie et ayant déjà reçu plusieurs traitements, ce n'est donc pas forcément la meilleure population pour obtenir un maximum d'activité d'un nouveau médicament. Le médicament est ensuite administré à des patients moins prétraités, puis enfin à des patients qui sont potentiellement curables et n'ont jamais reçu d'autres traitements. Les effets toxiques de l'Olaparib sont résumés dans le **Tableau**.

**Tableau**

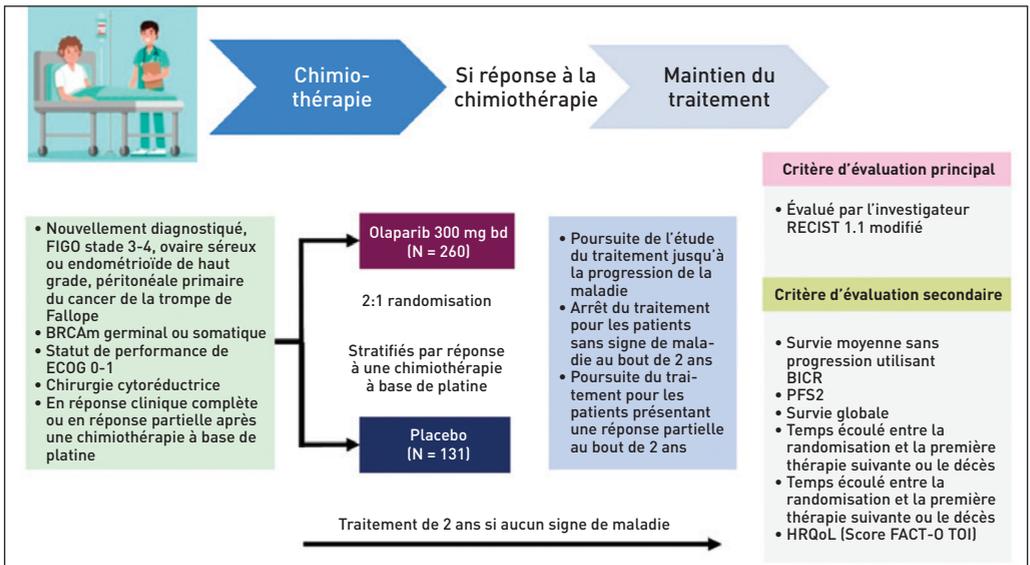
Principaux effets secondaires de l'Olaparib.

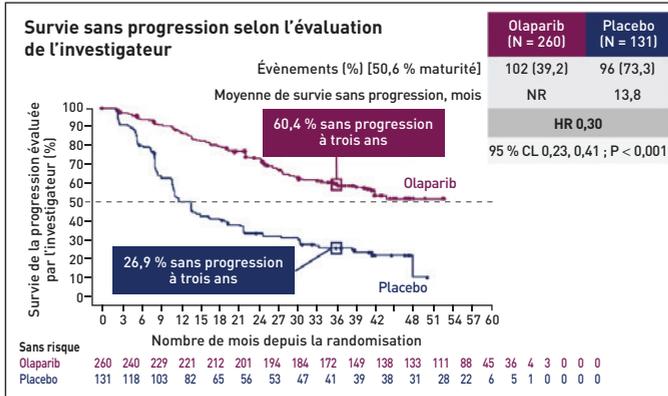
Fréquence	Type	Effet secondaire
Effet secondaire commun (30 %) – principalement Grade 1-2 (peu sévère)	Hématologique	Anémie, thrombocytopénie
	Biochimie	Augmentation de la créatinine sérique
	Gastro-intestinal	Nausée, vomissement, anorexie, stomatite, diarrhée, dysgueusie
	Général	Maux de tête, fatigue
Rare (< 1 %) mais sévère	Hématologique	MDS/AML
	Immunologique	Pneumonie

Les inhibiteurs de PARP ont ensuite été développés en première ligne dans un programme particulier, appelé « la maintenance » (**Figure 12**). Dans ce cas, le patient a déjà été soumis à un traitement standard de chimiothérapie qui a dû être arrêté malgré son efficacité, car le poursuivre aurait été trop toxique pour le patient. Les inhibiteurs de PARP ont été évalués très récemment dans ce type d'essais cliniques,

**Figure 12**

Exemple d'étude évaluant l'Olaparib en première ligne dans un traitement de maintenance.





**Figure 13**  
 Comparaison des courbes de survie des patients traités en maintenant avec l'Olaparib, et avec placebo.

les résultats sont parus en 2019 (Figure 13). Les courbes de survie montrent que parmi ces patients ayant déjà reçu une chimiothérapie, 60 % de ceux recevant un inhibiteur de PARP ont une maladie qui n'a pas progressé trois ans après le début du traitement, face aux 30 % pour ceux qui ont

reçu le placebo. Ces médicaments sont donc intéressants et efficaces dans ces maladies qui présentent les défauts de réparation de l'ADN.

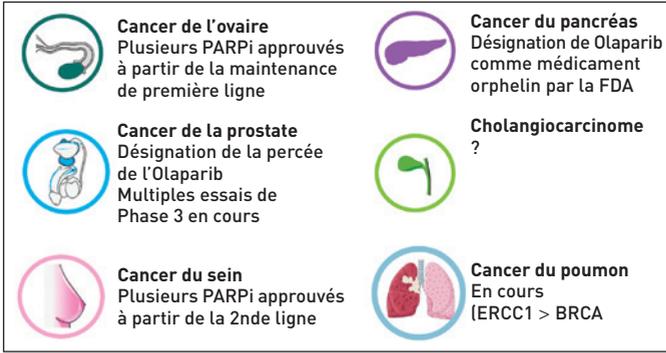
*Développement des inhibiteurs de PARP dans d'autres types tumoraux*

Plusieurs inhibiteurs de PARP qui se sont révélés actifs dans les essais cliniques ont été développés (Figure 14). Ils présentent des profils de toxicité légèrement différents, et cela peut être intéressant pour les patients d'avoir le choix entre deux inhibiteurs de PARP, par exemple en cas de problème au niveau du foie ou si le patient craint beaucoup la perte des cheveux, ce qui est très fréquent et compréhensible. Tant qu'ils ont des profils de toxicité ou d'autres caractéristiques

Relative PARP-trapping capacity <sup>a</sup> (nM) (réfs. 23/28-	Veliparib <sup>e</sup>	Olaparib	Rucaparib	Niraparib	Pamiparib <sup>e</sup>	Talazoparib
	-	++	++	++	++	+++
Single-agent dose	400 mg PO PIB	300 mg PO PIB	600 mg PO PIB	300 mg PO PIB	60 mg PO PIB	1 mg PO PIB
Toxicités <sup>b</sup> Most frequent	Nausée (30 %) Fatigue (25 %) Lymphopenia (16 %)	Nausée (58-76 %) Fatigue (29-66 %) Diarrhée (21-33 %) Dysgueusia (27 %) Headache (20-25 %)	Nausée (75 %) Fatigue (69 %) Vomissement (37 %) Diarrhée (21-33 %) Dysgueusia (27 %) LFT élévation (34 %)	Nausée (74 %) Fatigue (59 %) LFT élévation (36 %) Vomissement (34 %) Headache (26 %) Insomnie (24 %) HTN (19 %)	Limited early-phase trial data from abstract only : nausée (56 %), fatigue (40 %)	Nausée (49 %) Fatigue (50 %) Headache (33 %) Vomissement (25 %) Atopécie (25 %) Diarrhée (22 %)
Grade ≥ 3 hematological toxicities in ≥ 5 % of study population	NTD	Anémie [16-19 %] Neutropénie [5-9 %]	Anémie (19 %) Neutropénie (7 %)	Thrombocytopénia (34 %) Anémie (25 %) Neutropénie (20 %)	Limited early-phase trial data from abstract only : anémie (10,3 %), neutropénie (8,8 %)	Anémie (39 %) Neutropénie (21 %) Thrombocytopénia (15 %)
Clinical benefit <sup>c</sup>	NTD	OlympiAD (Her2-breast), HR 0,50, PFS benefit SOLO2 (relapsed ovarian maintenance), HR 0,30, PFS benefit SOLO1 (ovarian maintenance), HR 0,30, PFS benefit	ARIEL2 (relapsed ovarian), HR 0,27, PFS benefit ARIEL3 (relapsed ovarian maintenance), HR 0,23, PFS benefit	NOVA (relapsed ovarian maintenance), HR 0,27, PFS benefit	Ongoing, data not mature (NCT03427814)	EMBRACA (Her2-breast), HR 0,54, PFS benefit
Approvals <sup>d</sup>	NTD	Ovarian Breast	Ovarian	Ovarian	NTD	Breast (FDA)
	Nausée	Anémie	Foie	Plaquettes	Still early	Atopécie

© 2019 American Association for Cancer Research

**Figure 14**  
 Différents inhibiteurs de PARP, profils de toxicité et effets secondaires variés.



**Figure 15**

État des essais des inhibiteurs de PARP sur des maladies liées aux défauts de BRCA.

différentes et sont aussi efficaces, il est intéressant de développer plusieurs molécules agissant sur la même cible.

La **Figure 15** fait le point des essais utilisant des inhibiteurs de PARP dans le cas de plusieurs cancers liés aux défauts de BRCA. Plusieurs inhibiteurs ont été approuvés pour traiter le cancer de l'ovaire.

Dans le cas du cancer de la prostate, ils sont en cours de développement et les résultats d'essais cliniques de phase 3 sont attendus pour bientôt. Ils sont aussi approuvés pour les cancers du sein liés à une mutation BRCA.

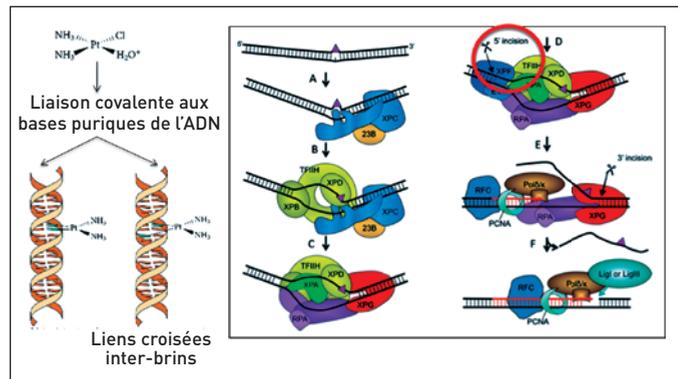
Des résultats encourageants ont également été obtenus dans le cancer du pancréas muté pour BRCA – ce cancer étant particulièrement agressif et habituellement résistant à la chimiothérapie.

Enfin, le cholangiocarcinome correspond à un cancer des voies biliaires dans lequel certains patients ont des mutations BRCA. L'efficacité des inhibiteurs de PARP n'a pas encore été explorée dans cette maladie, probablement car c'est une maladie rare.

Le cas du cancer du poumon est particulier : les mutations

BRCA sont très rares, mais il y a d'autres défauts de réparation de l'ADN qui peuvent sensibiliser aux inhibiteurs de PARP. Dans le cancer du poumon, une autre enzyme de réparation de l'ADN, ERCC1, est fréquemment déficiente. Cette enzyme répare les lésions qui distordent la double hélice d'ADN (**Figure 16**).

Dans 30 % des cancers du poumon, cette enzyme ERCC1 ne fonctionne plus, et ces cancers sont sensibles aux inhibiteurs de PARP. En effet, nous avons vu précédemment que quand PARP est coincée, cela bloque la fourche de réplication et



**Figure 16**

ERCC1, enzyme importante pour la réparation des lésions distordant la double hélice d'ADN.

Source : d'après Fagbemi et coll. (2011). DNA repair.

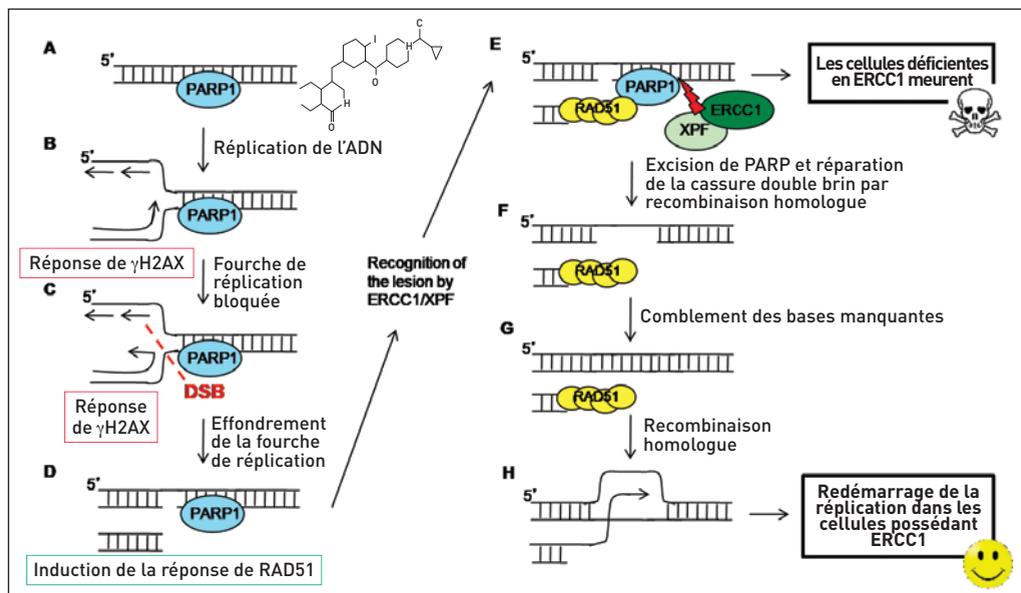


Figure 17

Létalité synthétique appliquée aux inhibiteurs de PARP et à l'ERCC1.

Source : d'après Postel-Vinay et coll. (2013). *Oncogene*.

crée une cassure très toxique pour la cellule. Si l'enzyme de réparation ERCC1 fonctionnait encore, elle chasserait PARP de l'ADN, et la cellule pourrait alors réparer son ADN et repartir. Par contre, quand ERCC1 ne fonctionne plus, la cassure ne peut être réparée et la cellule cancéreuse va mourir (Figure 17).

La Figure 18 illustre un essai clinique développé pour évaluer l'efficacité des inhibiteurs de PARP dans le cancer du poumon, dont les résultats sont attendus pour 2020.

#### Identification des patients pouvant bénéficier des inhibiteurs de PARP

Au-delà des mutations des gènes, comment sélectionner les patients pouvant bénéficier des inhibiteurs de PARP ? Pour identifier les tumeurs déficientes en une protéine donnée, on peut étudier si le gène est normal, doser la protéine et rechercher si elle est

effectivement mutée, mais on peut aussi analyser l'ensemble du génome et chercher une « signature » qui résulte d'un problème de fonctionnement au niveau de cette protéine. Cette approche est intéressante car, lorsque l'une des voies de réparation de l'ADN ne fonctionne pas dans une tumeur (Figure 19), que ce soit la protéine A, B, C ou D qui soit impliquée, il y aura la même signature au niveau du génome, et le même type de mutation sera accumulé. Ces tumeurs répondront donc au même traitement, car ce qui compte est la manière dont la voie fonctionne, davantage que de savoir exactement quelle protéine est absente ou mutée.

Cette signature peut maintenant être identifiée lorsqu'on réalise un séquençage d'ADN : par exemple, on peut identifier des transversions, des transitions, des changements de telles bases, des changements de deux nucléotides, de quatre

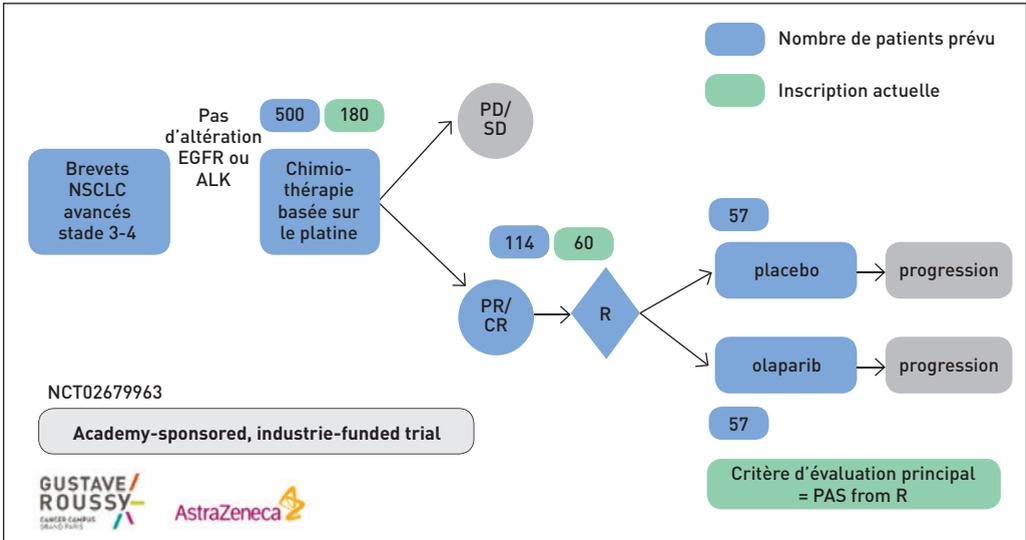


Figure 18

Essai PIPSeN, évaluant l'Olaparib en maintenance dans le cancer du poumon.

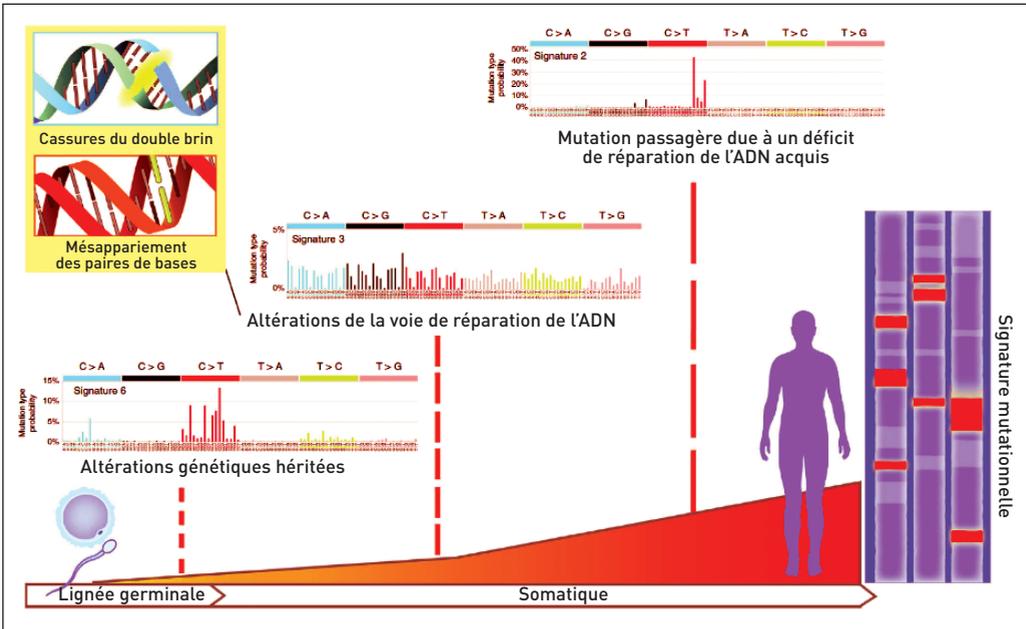


Figure 19

Procédé de détection des mutations par analyse du génome.

Source : d'après Ma et coll. (2018). Nature Communications.

nucléotides, etc. On peut ainsi identifier des signatures qui sont par exemple associées aux problèmes de fonctionnement de BRCA, et aux problèmes de la voie dans laquelle il est impliqué, qui est la voie de recombinaison homologe. Cette identification des défauts de fonctionnalité des voies de réparation de l'ADN permet de mieux sélectionner les patients pouvant bénéficier d'un traitement par inhibiteur de PARP. Prenons l'exemple du cancer de l'ovaire : certaines patientes présentent une mutation BRCA au niveau de toutes les cellules de l'organisme, d'autres ont cette mutation BRCA au niveau de la tumeur uniquement, d'autres encore n'ont pas de mutation BRCA mais ont le même défaut fonctionnel que si elles avaient une mutation BRCA ou en tout cas quelque chose de proche. Toutes ces patientes pourraient potentiellement bénéficier de traitements par des inhibiteurs de

PARP, alors que si on regardait juste la mutation BRCA, certaines d'entre elles ne seraient pas traitées. Il est donc intéressant d'identifier les défauts de fonctionnalité des voies de réparation de l'ADN dans les différents types de cancer avec les techniques de séquençage à haut débit.

### Résistance des cancers aux inhibiteurs de PARP

La résistance des cancers aux médicaments anticancéreux est un gros problème et la cellule cancéreuse retrouve presque toujours la façon de continuer à proliférer malgré les traitements (voir le [Chapitre J.-P. Armand](#) dans *Chimie et nouvelles thérapies*). Dans ce cadre de la résistance aux inhibiteurs de PARP, la cellule est capable, si BRCA est muté, par exemple par perte de quelques acides aminés, d'introduire une seconde mutation, qui permet de restaurer un cadre de lecture fonctionnant correctement pour que la protéine redevienne fonctionnelle. Les mécanismes de résistance possibles sont nombreux ([Figure 20](#)). Il faut donc essayer d'avoir des combinaisons thérapeutiques et divers angles d'attaque au niveau de la cellule afin de limiter cette résistance.

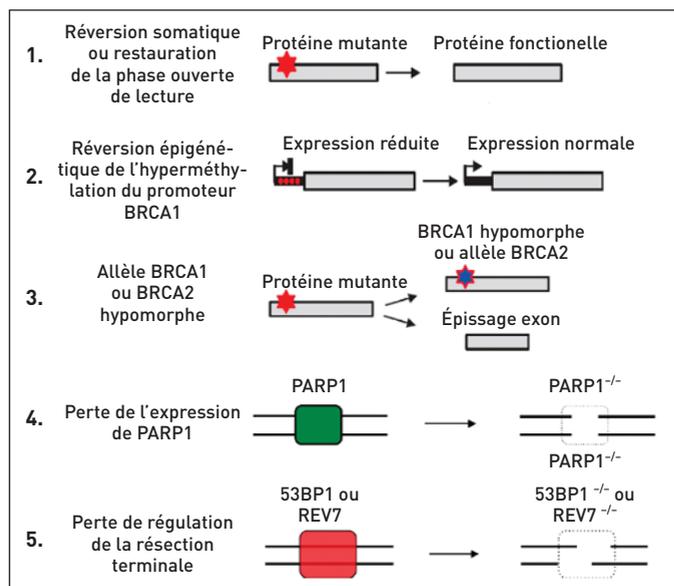
#### 2.2.2. Inhibition de la réparation de l'ADN par les inhibiteurs d'ATR

Les inhibiteurs d'ATR sont un autre exemple d'inhibiteurs de la réparation de l'ADN. Le principe est le même que pour les inhibiteurs de PARP, avec le mécanisme suivant ([Figure 21](#)) : quand une fourche de réplication de l'ADN est

Figure 20

Mécanisme de résistance aux inhibiteurs de PARP.

Source : d'après D'Andrea et coll. (2018). *DNA repair*.



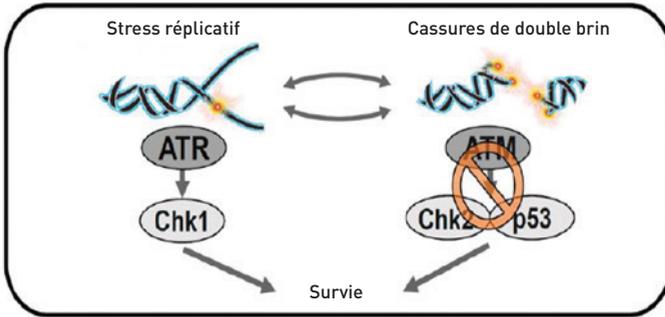


Figure 21

ATM et ATR ont des rôles distincts, mais qui se chevauchent : la létalité synthétique s'applique donc.

coincée, la protéine ATR est activée, mais si cette fourche n'est pas correctement réparée, cela conduit à une cassure double brin qui peut être réparée par la protéine ATM.

Ainsi, dans les cancers qui ont une mutation ATM, si on inhibe ATR, la réparation de l'ADN ne peut se faire, ce qui conduit à la mort cellulaire. Des mutations d'ATM sont observées dans de nombreux cancers, notamment des cancers gastriques.

Des inhibiteurs d'ATR sont actuellement en étude clinique de phase 1. La **Figure 22** montre l'image du scanner d'un patient atteint d'un cancer colorectal ayant perdu l'expression d'ATM ; on y voit la réduction d'un ganglion iliaque<sup>11</sup> sous l'effet d'un

11. Ganglion iliaque : organe lymphoïde situé au niveau du bassin représentant un site de migration des cellules tumorales et d'établissement des métastases.

traitement par inhibiteur d'ATR (zone cerclée en rouge). Sur l'image de droite, après quinze mois de traitement par un inhibiteur d'ATR, le ganglion a totalement disparu. Les inhibiteurs d'ATR sont donc, comme les inhibiteurs de PARP, des médicaments qui ciblent la réparation de l'ADN en utilisant le concept de la létalité synthétique.

Il existe encore d'autres exemples de médicaments utilisant ce concept.

### 3 Utilisation d'inhibiteurs de réparation de l'ADN en combinaison

#### 3.1. Combinaison avec la chimiothérapie

Il est intéressant d'utiliser ces médicaments en combinaison afin d'augmenter la fenêtre thérapeutique, augmenter leur

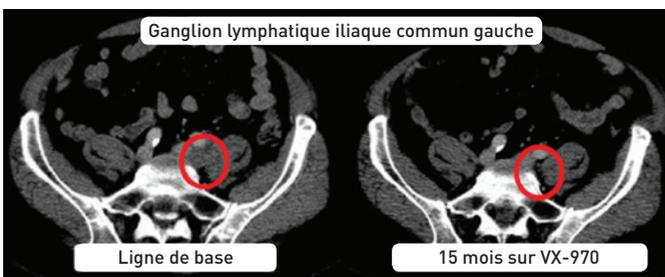


Figure 22

Diminution d'un ganglion iliaque chez un patient atteint d'un cancer colorectal sous l'effet d'un traitement inhibiteur d'ATR en présence d'une mutation ATM.

Source : d'après Yap et coll. (2016). EORTC-NCI-AACR.

effet ou pour limiter la survenue des résistances. L'une des premières combinaisons qui a été évaluée, notamment en préclinique, est celle avec la chimiothérapie. Mais si toutes les combinaisons réalisées avec la chimiothérapie en préclinique sont extrêmement efficaces, elles sont extrêmement toxiques pour les patients. À quelques exceptions près, il est généralement difficile d'administrer au patient la pleine dose de l'un ou l'autre des médicaments. Bien que des recherches soient en cours, ce n'est pas la voie qui paraît la plus prometteuse.

### 3.2. Combinaison avec les anti-angiogéniques

Un essai de combinaison avec les anti-angiogéniques a été

effectué dans le cas du cancer de l'ovaire, car les anti-angiogéniques et les inhibiteurs de PARP sont tous deux actifs dans le traitement de ce cancer.

Il a été observé un très fort bénéfice de la combinaison des deux types de médicaments versus l'inhibiteur de PARP seul, et cela chez toutes les patientes, même chez celles pour lesquelles BRCA est demeuré fonctionnel (*Figure 23*).

Cet effet a récemment été compris : les anti-angiogéniques induisent des changements au niveau des cellules tumorales, entraînant une diminution de l'expression de certaines protéines importantes dans la voie de réparation de l'ADN par recombinaison homologue, donc créent un défaut fonctionnel de cette voie, comme si BRCA était muté. Cette piste

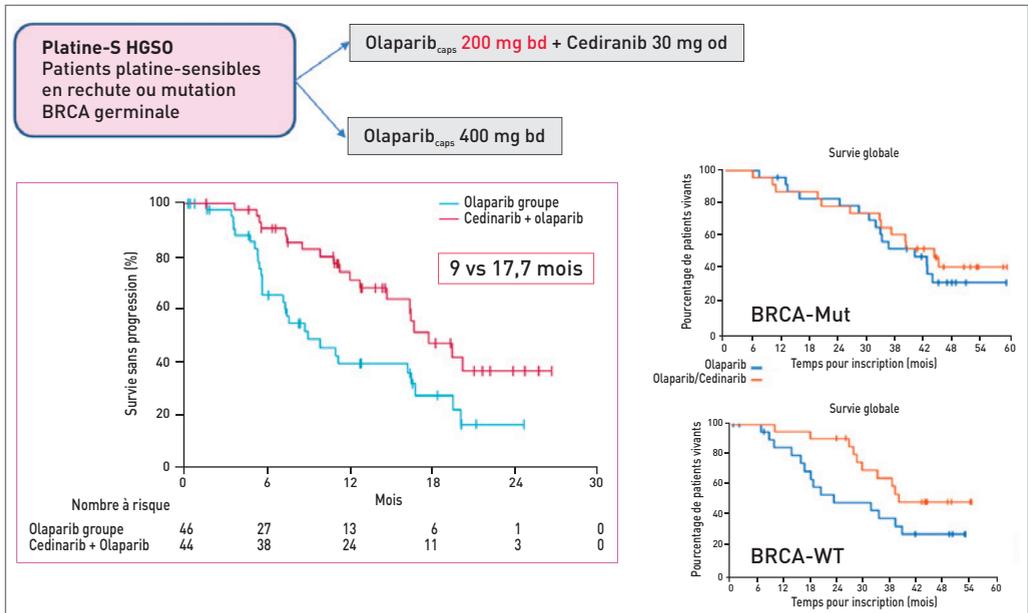
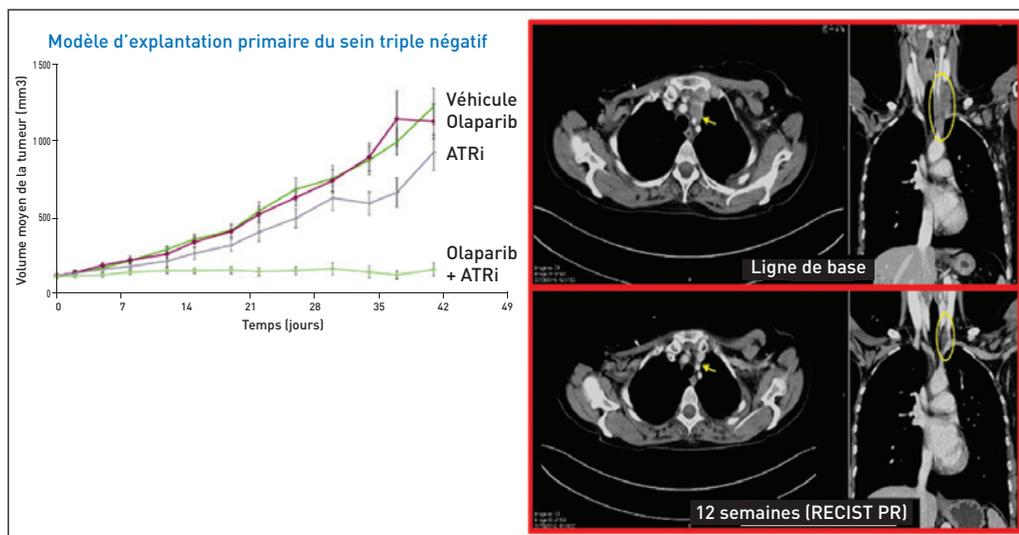


Figure 23

Comparaisons des courbes de survie pour des patients traités avec un inhibiteur de PARP seul, l'Olaparib, et avec une combinaison inhibiteur de PARP (Olaparib)-agent anti-angiogénique (Cediranib).



de combinaison est donc assez prometteuse pour les inhibiteurs de PARP.

### 3.3. Combinaison de plusieurs inhibiteurs de la réparation de l'ADN

La **Figure 24** montre l'efficacité thérapeutique de la combinaison d'un inhibiteur de PARP et d'un inhibiteur d'ATR sur un exemple de tumeur chez des souris qui résiste à l'Olaparib (qui est l'inhibiteur de PARP), et qui est aussi résistante aux inhibiteurs d'ATR. On voit qu'en donnant les deux médicaments, le volume de la tumeur diminue et l'on obtient une très bonne efficacité thérapeutique. Ce type de traitement est en cours d'exploration chez les patients avec des résultats encourageants.

### 3.4. Combinaison avec l'immunothérapie

Dans le cancer du poumon déficient en ERCC1, la thérapie standard est maintenant la

combinaison de l'immunothérapie avec la chimiothérapie à base de sel de platine. Nous avons étudié s'il y avait un lien exploitable entre l'immunothérapie et le ciblage de la réparation de l'ADN avec les inhibiteurs de PARP.

Normalement, l'ADN est localisé dans le noyau cellulaire, mais une partie peut entrer dans le cytoplasme, par exemple lors d'une infection virale, et cela génère un signal de danger dans la cellule qui induit une réponse immunitaire appelée la voie cgas-sting (**Encart : « La voie cGAS-STING »**).

**Figure 24**

*Efficacité thérapeutique de la combinaison entre inhibiteur de PARP et inhibiteur d'ATR, chez la souris (à gauche) et chez un patient (à droite).*

Source : d'après Yap et coll. (2016). EORTC-NCI-AACR.

#### LA VOIE CGAS-STING

La voie cGAS-STING est une composante du système immunitaire qui fonctionne pour détecter la présence d'ADN dans le cytoplasme et, en réponse, déclencher l'expression de gènes de l'immunité innée favorisant la réponse immunitaire et l'activation de mécanismes de défense. L'ADN se trouve normalement dans le noyau de la cellule. La localisation anormale de l'ADN dans le cytoplasme déclenche cette voie, car la cellule pense qu'il s'agit d'une infection virale ou bactérienne et cherche à se défendre.

Nous avons fait l'hypothèse qu'un médicament inhibiteur de PARP pourrait augmenter la quantité d'ADN cytoplasmique et déclencher cette réponse immunitaire, qui pourrait être bénéfique pour l'immunothérapie anticancéreuse.

Afin de tester cela, nous avons réalisé de nombreuses expériences *in vitro* (Figure 25). Lorsque la protéine ERCC1 est absente, la quantité d'ADN cytoplasmique augmente. Lorsque la cellule est en plus exposée à un inhibiteur de PARP, cette quantité augmente très fortement et passe au-dessus d'un seuil permettant d'activer cGAS-STING. Cela résulte en le relargage de cytokines<sup>12</sup>, qui favorisent la reconnaissance de la cellule cancéreuse par les cellules

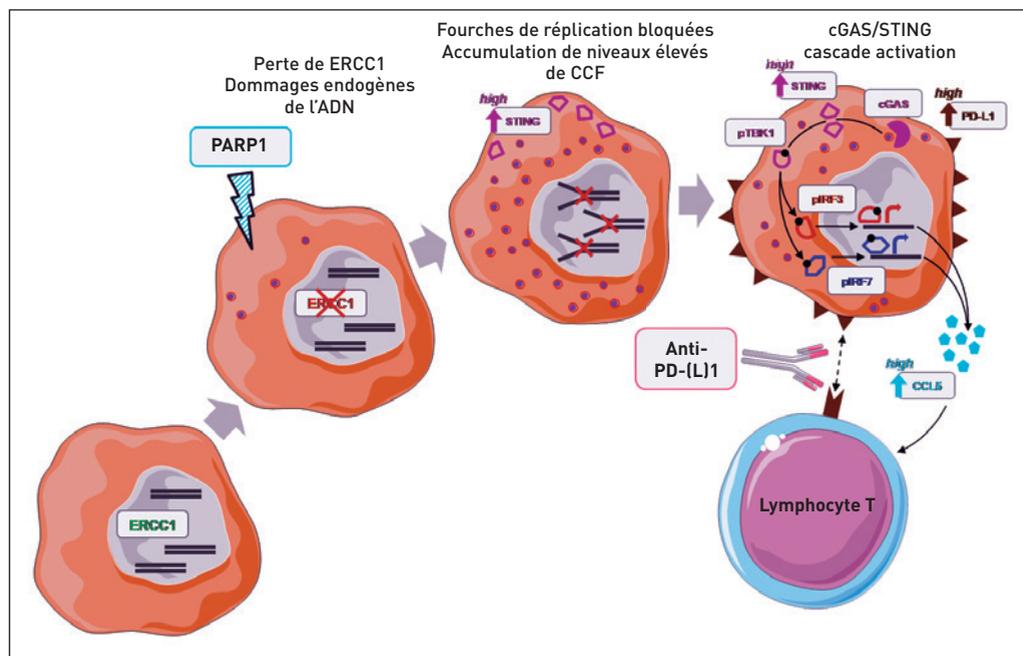
immunitaires. En parallèle, les inhibiteurs de PARP induisent l'expression de récepteurs de PD-L1 à la surface de la cellule (petits triangles noirs). Les traitements d'immunothérapie utilisant les anticorps anti PD-L1 qui bloquent ces récepteurs et permettent de restaurer l'activité des lymphocytes paraissent donc appropriés en combinaison avec les inhibiteurs de PARP. Un phénomène similaire est observé avec les cellules de cancer du sein déficientes en BRCA1.

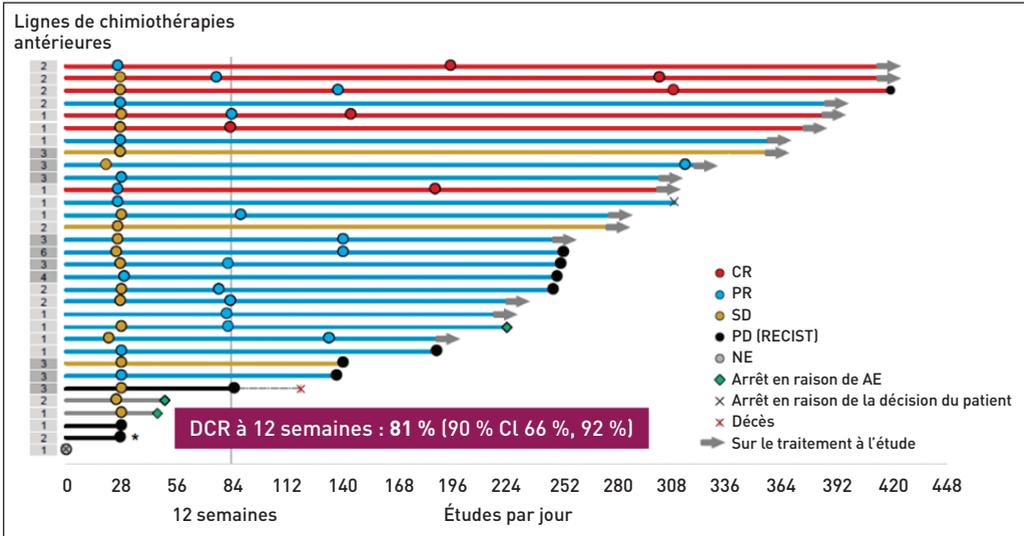
Un seul ensemble de tests cliniques a été réalisé dans plusieurs types de cancer pour évaluer cette combinaison. La Figure 26 résume les résultats sous une forme statistique appelée « table des nageurs », qui montre les réponses de plusieurs patients à cette combinaison. Chaque bande horizontale représente un patient, codé

Figure 25

Mécanisme d'activation de la voie cGAS-STING par les inhibiteurs de PARP dans une cellule de cancer du poumon déficiente en ERCC1.

12. Cytokine : substance régulant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires.





par couleur selon la réponse de la maladie au traitement. On peut voir que les patients des lignes rouges sont en réponse complète (CR, rond rouge) pour des durées très prolongées, avec des résultats

probablement assez encourageants de cette combinaison. Plus d'une cinquantaine d'essais sont actuellement en cours pour évaluer ce type de combinaison dans plusieurs types tumoraux.

Figure 26

Exemple d'essai évaluant la combinaison inhibiteur de PARP et anti-PD-L1 dans le cancer de l'ovaire (essai MEDIOLA).

Source : d'après Drew (2018). SGO.

## L'inhibition de la réparation de l'ADN : une approche thérapeutique d'avenir en oncologie

La létalité synthétique est un mécanisme potentiellement intéressant pour cibler les mutations appelées « perte-de-fonction », donc à chaque fois que l'enzyme ou la protéine ne fonctionne pas ou n'est pas présente dans la cellule.

La preuve de l'efficacité clinique du concept a été établie avec les premiers inhibiteurs de PARP il y a une dizaine d'années, et, depuis, beaucoup d'inhibiteurs de PARP ont été développés ; six sont actuellement en développement clinique ou enregistrés. Beaucoup d'autres médicaments ciblant la réparation de l'ADN sont en

cours d'évaluation clinique chez l'homme, dont les inhibiteurs d'ATR.

Comme toujours en cancérologie, il faudra étudier les mécanismes de résistance, c'est-à-dire comment réussir à faire mourir la cellule lorsqu'elle trouve un moyen de contourner l'efficacité des médicaments.

Les perspectives d'avenir sont les combinaisons de traitements utilisant ces inhibiteurs de réparation de l'ADN avec l'immunothérapie, avec d'autres inhibiteurs de réparation de l'ADN, et potentiellement aussi des anti-angiogéniques.

# Recherche de sondes pharmacologiques et candidats- médicaments dans le cyber- espace

*Bruno Villoutreix est directeur de recherche à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM)<sup>1</sup>.*

Le volume croissant de données biomédicales et chimiques en libre accès sur Internet ainsi que des logiciels et centres de calcul puissants permettant de les manipuler devraient aider à la découverte de sondes pharmacologiques et de candidats-médicaments.

Nous allons présenter les grands concepts du domaine, plusieurs bases de données et des outils logiciels en ligne qui facilitent l'étude des cibles thérapeutiques et des petites molécules chimiques, notamment le criblage virtuel, les prédictions ADME-Tox et le repositionnement *in silico* des médicaments (**Figure 1**).

1. [www.inserm.fr](http://www.inserm.fr)



de Bayer publiée en 2015, on note que déjà 50 % des vingt nouvelles entités chimiques testées en phase clinique 1 avaient bénéficié d'approches bioinformatiques et chémoinformatiques.

Dans les années 2000, il existait environ 300 URL (adresse web qui permet d'identifier la ressource, son emplacement et le protocole Internet pour la récupérer) qui renvoyaient vers des bases de données et des logiciels dans le domaine du médicament au sens large. En 2019-2020 il y en a environ 3 500. Cette augmentation conséquente représente des millions d'heures de travail réalisées par des milliers de scientifiques dans le monde entier. Comme il est assez difficile d'identifier tous ces outils et services, une petite base de données a été créée, <http://www.vls3d.com>, pour les répertorier.

Certains de ces outils ne sont pas directement accessibles en ligne et doivent être installés localement. Cependant, nous nous focaliserons essentiellement ici sur les logiciels et bases de données facilement utilisables en ligne permettant de manipuler les cibles thérapeutiques comme certaines protéines et les petites molécules chimiques. Il est néanmoins important de souligner qu'il existe d'autres outils, pour par exemple faciliter le développement d'autres types de médicaments, comme les anticorps monoclonaux<sup>3</sup>.

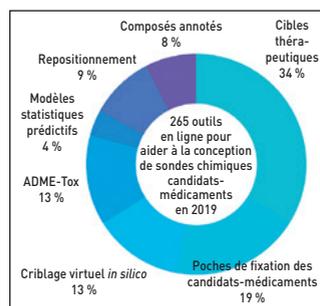
3. Anticorps monoclonaux : anticorps produits par des lymphocytes clonés partir d'une unique cellule, ce qui résulte en une homogénéité des protéines obtenues.

Les services web que nous allons aborder peuvent se regrouper en grandes catégories (**Figure 3**).

Parmi ces outils, 34 % concernent des approches pour identifier et analyser les cibles thérapeutiques et les protéines, 19 % prédisent les poches de fixation des candidats-médicaments, environ 20 % concernent le criblage<sup>4</sup> virtuel, 13 % les prévisions pharmacocinétiques et toxicité (« ADME-Tox ») et 5 % permettent de développer des modèles statistiques prédictifs. Une dizaine de pourcents des sites en ligne sont dédiés au repositionnement des médicaments, et on note qu'environ 8 % de ces sites sont des bases de données consacrées aux petites molécules chimiques.

Les principaux pays dans le monde qui offrent des services *in silico* dans le domaine du médicament, petites molécules et macromolécules, sont visibles sur la **Figure 4**. Ces pays ont été identifiés *via* de multiples recherches, notamment avec PubMed, un moteur de recherche donnant accès à la base de données bibliographique MEDLINE rassemblant en 2020 environ 30 millions d'articles scientifiques spécialisés en biologie, chimie, approches *in silico* et médecine.

4. Criblage : en pharmacologie, désigne généralement les techniques visant à identifier dans une chimiothèque des petites molécules chimiques biologiquement actives pouvant servir de base au développement de candidats-médicaments.



**Figure 3**

Répartition en 2019-2020 des 265 principaux outils en ligne et bases de données dans le domaine du médicament. Ces approches peuvent par exemple aider à la conception de molécules thérapeutiques, à la recherche de cibles impliquées dans une pathologie ou pour prédire la toxicité de certains composés chimiques.

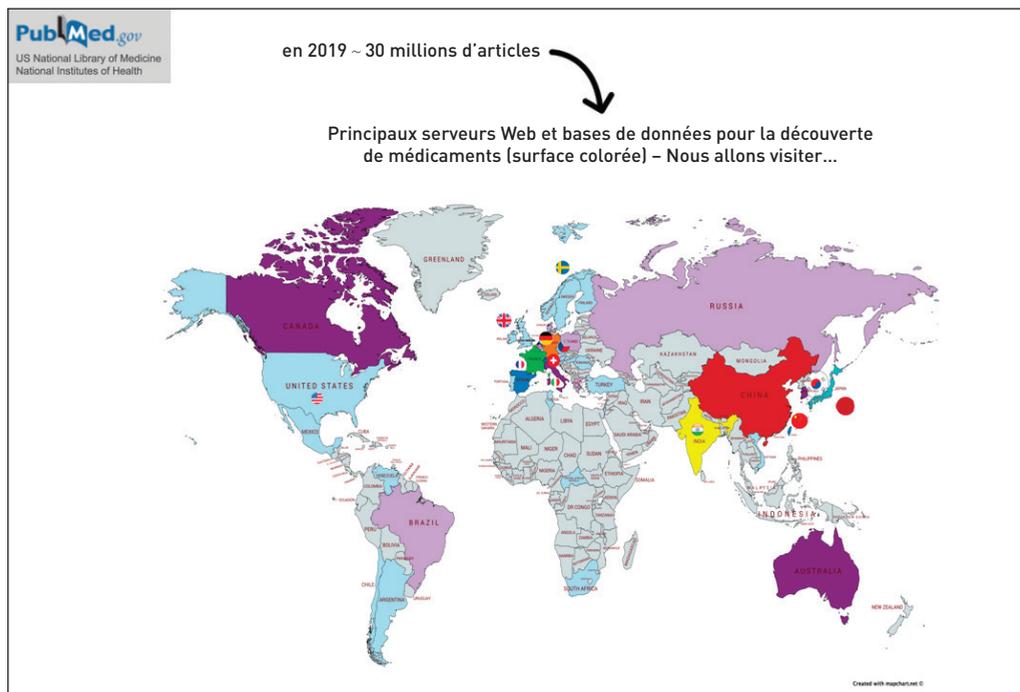


Figure 4

Les serveurs web dédiés à la conception de molécules thérapeutiques et aux études des petites molécules et macromolécules émanent de nombreux États, répartis sur les cinq continents.

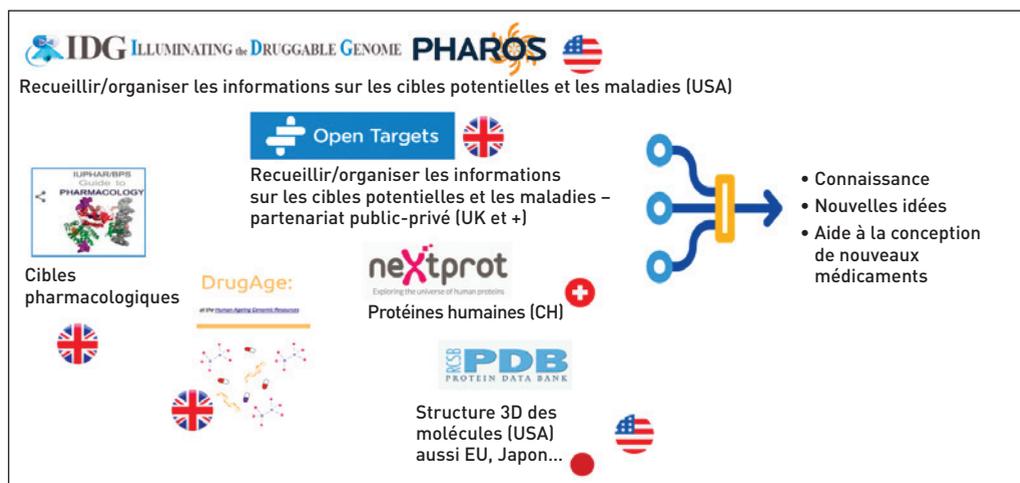
## 2 Cibles thérapeutiques et poches de fixation des ligands

La recherche de cibles, souvent des protéines, est une étape critique dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques. Les connaissances sur ces cibles d'intérêt thérapeutique et des voies de signalisation émanent des travaux de multiples laboratoires de recherche dans le monde et de grands programmes internationaux. À titre d'exemples et en nous limitant à des projets américains et européens récents, nous pouvons mentionner plusieurs bases de données qui permettent de recueillir, structurer et organiser l'information sur les

cibles potentiellement thérapeutiques, et la rendre accessible à tous (Figure 5).

Dans ces bases de données, les scientifiques vont notamment chercher si certaines cibles protéiques sont déjà connues pour être impliquées dans une pathologie, quelles sont les cibles ou les voies de signalisation qui ne sont pas encore modulées par des médicaments, et celles pour lesquelles on pourrait faire de la conception (« design ») de nouvelles molécules (PHAROS et Open Targets).

Ces bases de données peuvent être spécialisées sur les cibles pharmacologiques (IUPHAR), et certaines entièrement dédiées au vieillissement



(DrugAge). En Suisse, neXt-Prot est une base de données spécialisée sur les protéines humaines. La Protein Data Bank (PDB) répertorie les structures 3D des molécules identifiées essentiellement par cristallographie des rayons X<sup>5</sup> ou RMN<sup>6</sup>. Ce type d'information va permettre de générer de nouvelles idées et de se focaliser sur certaines niches encore très peu étudiées.

Pour qu'une petite molécule chimique puisse moduler l'activité d'une protéine cible (par exemple une protéine surexprimée dans une pathologie), il faut en général que celle-ci présente une poche de fixation ; il existe des algorithmes qui permettent de prédire ces poches et les zones

5. Cristallographie des rayons X : technique d'analyse structurale fondée sur la diffraction des rayons X.

6. RMN : Résonance Magnétique Nucléaire, phénomène basé sur les propriétés magnétiques des spins nucléaires, à l'origine d'une technique de spectroscopie permettant la détermination de structures moléculaires.

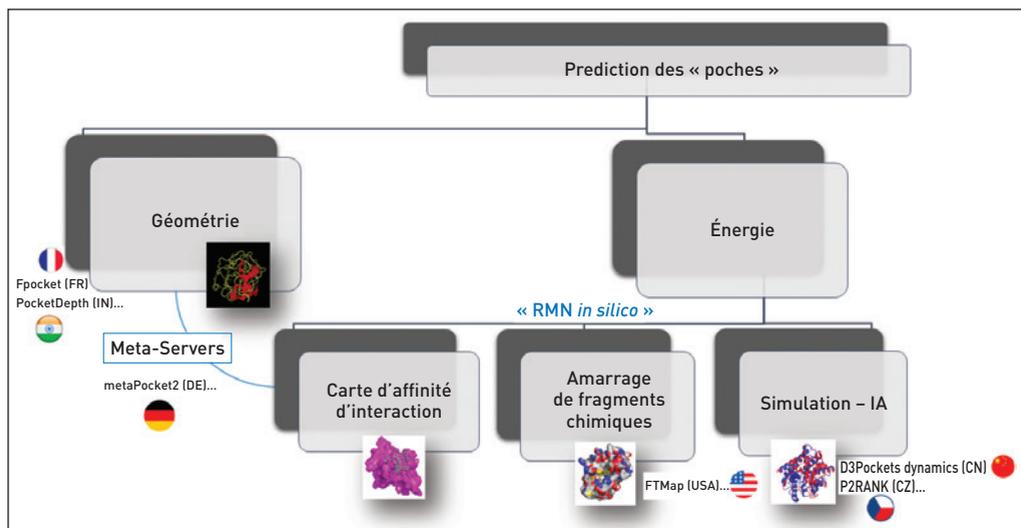
importantes pour les interactions moléculaires. Ces outils peuvent faire des prédictions avec juste la séquence d'acides aminés de la protéine, mais ils sont plus précis si l'on connaît la structure tridimensionnelle de la macromolécule en question (Figure 6).

Ces algorithmes prévisionnels sont basés soit sur la géométrie de la macromolécule (c'est le cas de services en ligne français comme Fpocket, ou indien comme PocketDepth), soit ils sont basés sur des calculs d'énergies. En effet, lorsqu'on bombarde la surface d'une macromolécule potentiellement impliquée dans une pathologie avec une petite liste d'atomes ou des fragments chimiques, il est possible de construire des cartes d'affinité d'interaction, et définir certaines zones appelées « hotspots », où des candidats-médicaments s'accrochent préférentiellement.

Ces zones sont donc utilisées pour faire de la conception de molécules capables de s'y accrocher.

Figure 5

Des bases de données pour l'innovation visant à rassembler les connaissances sur les cibles potentiellement thérapeutiques émanent souvent de grands projets internationaux.



**Figure 6**

Deux grands types d'approches pour la prédiction des « poches » existent quand on connaît la structure 3D de la cible : les approches géométriques et les approches énergétiques. Ces méthodes permettent par exemple de définir des zones où une petite molécule pourrait se fixer et ainsi fournir des informations précieuses pour d'autres types de calculs, comme le criblage virtuel.

Par exemple dans une approche comme FTMap aux États-Unis, des petits fragments chimiques bombardent virtuellement la surface de la protéine cible et, à partir de calculs d'affinité, il est alors possible de prédire des zones où des petites molécules chimiques peuvent s'accrocher.

Dans ce type de prédiction, il faut cependant aussi prendre en compte la flexibilité des macromolécules. Il existe ainsi des serveurs dédiés à l'étude de la flexibilité des poches, notamment en Chine avec D3Pockets. De plus, certains outils utilisent des méthodes d'apprentissage automatique, comme P2RANK en Tchécoslovaquie pour prédire ces poches, et combinent alors des approches statistiques, géométriques et/ou énergétiques.

Pour illustrer la notion de flexibilité, prenons l'exemple du système interleukine et son récepteur impliqué dans un certain nombre de pathologies.

Bloquer cette interaction protéine-protéine avec une petite molécule chimique pourrait être intéressant pour le développement de nouveaux médicaments, mais il faut trouver la bonne poche. Il existe plusieurs structures 3D de l'interleukine et en fonction de la structure sélectionnée, on distingue que la poche à la surface présente des cavités et des protubérances variables (**Figure 7**).

Par exemple, si l'on compare la protéine cristallisée seule (forme apo) et la protéine cristallisée en présence d'une petite molécule chimique (forme holo), il est possible de voir qu'une protubérance est présente dans la forme apo juste au milieu de la poche où se fixe le candidat-médicament. Cela correspond à un acide aminé qui bouge et se réoriente pour que le composé chimique puisse se fixer. Ainsi, si un scientifique utilise la structure apo pour rechercher une petite molécule modulatrice, les chances

de succès sont pratiquement nulles. Pourtant, au début d'un projet, seule la structure apo d'une protéine est généralement connue (structure expérimentale ou prédite par des approches théoriques). Comment faire dans cette situation ? Il est possible d'utiliser un outil comme FTMap, qui va prédire des poches, même sur la forme apo de la protéine. Les petits fragments sont positionnés pratiquement dans toute la poche de fixation du ligand sauf au niveau de la protubérance (Figure 7). Il faudra ensuite utiliser un outil d'ouverture de poche, comme le serveur TRAPP en Allemagne, pour générer des conformations alternatives de la poche. Ainsi, en combinant les approches, même à partir d'une structure apo, il est possible de prédire plusieurs poches et de les cribler ensuite *in silico* dans l'espoir d'identifier des petits composés chimiques qui iront moduler l'activité biologique de la cible en question.

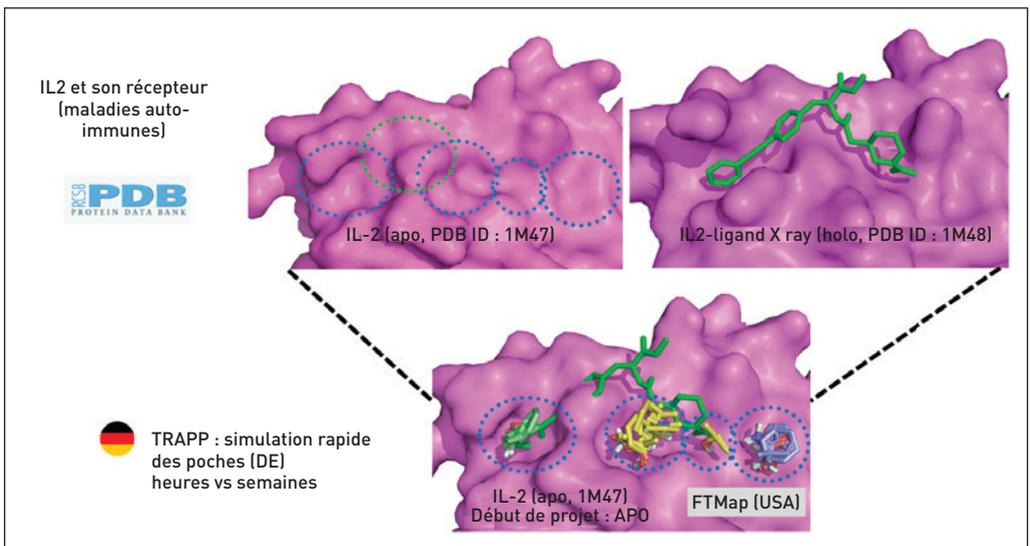
Il est aussi possible d'obtenir des informations sur l'importance d'une protéine et/ou d'une région de la protéine, ou encore de la poche de fixation, dans une pathologie en analysant les données du séquençage stockées dans de nombreuses bases de données.

Prenons l'exemple d'une protéine anticoagulante appelée antithrombine, qui fixe des médicaments comme le fondaparinux (un pentasaccharide anticoagulant qui se lie à l'antithrombine, et en se liant à cette protéine, le facteur Xa est inhibé). Nous avons travaillé avec des collaborateurs aux États-Unis et en Chine sur des familles de patients présentant des problèmes de coagulation ; ces personnes avaient une mutation ponctuelle dans certaines régions de l'antithrombine. Il existe de très nombreuses approches *in silico* pour analyser ce type de mutations. Un des objectifs est d'essayer de comprendre la relation entre le changement

**Figure 7**

À l'aide des données disponibles dans la PDB, il est possible de déterminer la zone de fixation d'une petite molécule chimique sur une protéine avec un outil comme FTMap et d'explorer la flexibilité possible de la poche identifiée avec par exemple le serveur TRAPP.

Source : Structures 3D des protéines utilisées dans cet exemple : Arkin et coll. (2003). PNAS.

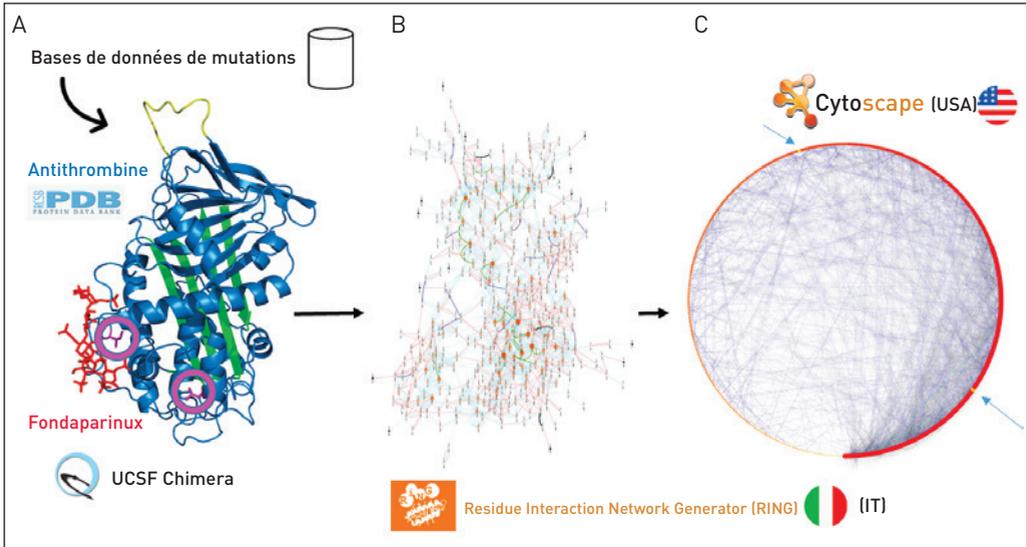


d'acide aminé et le phénotype observé chez le malade. Nous avons dans un premier temps localisé les mutations ponctuelles identifiées chez les patients sur la structure 3D de la protéine avec des logiciels gratuits comme Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) ou PyMol (<https://pymol.org/>) (**Figure 8A**). Dans ce cas précis, nous avons l'avantage de disposer de la protéine co-cristallisée avec un médicament. On pouvait donc voir qu'une mutation était directement dans la poche de fixation du médicament et pourrait donc altérer la liaison entre la petite molécule et la protéine. L'autre mutation était plus loin de cette poche, elle pourrait jouer plusieurs rôles, sur la stabilité de la protéine ou encore sur la dynamique du système avec perturbation à distance de la fixation du médicament, etc.

Pour aller plus loin dans l'analyse des mutations ou dans le cas où il n'y a pas de structure 3D protéine-médicament, il peut être intéressant de calculer, à partir du fichier PDB de la protéine étudiée, toutes interactions non covalentes entre tous les acides aminés de la protéine et créer ainsi un réseau d'interactions (**Figure 8B**). Cette analyse a été réalisée avec le serveur Italien RING. Chaque cercle représente un acide aminé (les nœuds du réseau) et, entre les cercles, les petits traits (les arêtes du réseau) représentent les interactions non covalentes. Il est alors possible de visualiser en 2D des informations tridimensionnelles telles que les liaisons hydrogène, les ponts salins...

(**Figure 8B**). On peut ensuite transformer ces données d'interactions complexes en un autre type de visualisation avec le logiciel gratuit Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) : ici tous les acides aminés sont projetés sur un cercle (petits points rouges) et ils sont classés selon le nombre d'interactions non covalentes (**Figure 8C**). Les résidus qui ont un grand nombre d'interactions non covalentes ont généralement un rôle majeur dans la structure et stabilité de la protéine. Une mutation dans ces régions peut entraîner un déficit de la protéine étudiée et une pathologie associée à la fonction de celle-ci. Une mutation d'un résidu faiblement connecté avec son environnement mais qui a un effet important sur le traitement peut donner des pistes sur l'importance de certaines régions de la poche de fixation du médicament et aider à la conception de nouvelles molécules si la mutation est fréquente dans la population. Dans le cas de l'antithrombine, les résultats des approches *in silico* suggéraient une perturbation directe et indirecte de la fixation du médicament induite par les mutations, en accord avec les travaux expérimentaux.

Plus généralement, en analysant les substitutions d'acides aminés chez les patients avec plusieurs outils informatiques et diverses approches expérimentales (biochimie, biologie moléculaire et biophysique), il devient possible dans certains cas de comprendre pourquoi les malades réagissent ou pas à un traitement, et ainsi de générer des nouvelles



**Figure 8**

Les outils de visualisation permettent de gagner en connaissance. A) Structure 3D de la protéine antithrombine co-cristallisée avec un médicament anticoagulant, le fondaparinux, visualisée avec le logiciel Chimera. Des mutations ponctuelles identifiées dans des bases de données ou après séquençage de patients sont soulignées par des cercles ; B) visualisation du réseau d'interactions non covalentes présent dans cette protéine avec localisation des acides aminés mutés après traitement par le logiciel RING ; C) utilisation du logiciel Cytoscape pour analyser les données de RING afin de caractériser les interactions non covalentes de chaque acide aminé. Ce type d'analyse aide à comprendre l'impact des substitutions sur la structure et la fonction de la protéine, et dans certains cas facilite la conception de candidats-médicaments.

Source : Dinarvand et coll. (2018). *J. Thromb Haemost.*

hypothèses pour changer de traitement ou pour rechercher de nouveaux médicaments.

Toutes ces bases de données dédiées aux cibles et tous ces outils logiciels permettant de les analyser vont donc constituer une étape importante dans la recherche de candidats-médicaments ou de sondes pharmacologiques. L'étape suivante consiste à rechercher des petites molécules qui modulent ces cibles.

### 3 Les petites molécules et le criblage virtuel

Les petites molécules chimiques sont aussi stockées dans un certain nombre de

bases de données. On y trouve des petites molécules provenant des extraits de plantes : des plantes utilisées pour la médecine traditionnelle chinoise, des plantes utilisées pour la médecine ayurvédique<sup>7</sup>, d'autres venant d'un certain nombre de régions du monde (Figure 9).

D'autres bases de données donnent accès aux propriétés physiques de ces petites molécules chimiques. Dans la « Protein Data Bank », on trouve des macromolécules et des petites molécules co-cristallisées avec une cible

7. Médecine ayurvédique : médecine traditionnelle originaire de l'Inde.

Figure 9

De très nombreuses bases de données spécialisées et contenant des informations au format adapté pour le traitement informatique sont disponibles sur Internet.



thérapeutique ou une macromolécule. Dans la Cambridge Structural Database ou dans la Crystallography Open Database, les structures 3D expérimentales de plus d'un million de petites molécules chimiques sont répertoriées. Certaines bases de données sont spécifiquement dédiées aux inhibiteurs d'interactions protéine-protéine. On trouve aussi des petites molécules virtuelles, c'est-à-dire qui n'ont pas encore été synthétisées. C'est le cas de la base de données Suisse (GDB-17), qui contient 166 milliards de molécules qui n'ont pas encore été synthétisées. La navigation dans cet espace chimique quasiment infini, avec des outils informatiques, va certainement permettre à terme de générer de nouvelles connaissances et des nouveaux médicaments.

Afin d'identifier rapidement des molécules chimiques qui modulent les cibles thérapeutiques potentielles, il est pertinent d'acheter les composés car on ne peut pas tous les synthétiser. En effet, pour synthétiser 1 000 composés en quantité suffisante, il faut souvent plusieurs mois de travail. Pour aider les scientifiques, plusieurs bases de données

contiennent des catalogues de molécules que l'on peut acheter à des sociétés de chimie. Par exemple, à San Francisco, la base ZINC répertorie environ 80 millions de petites molécules existantes auprès des vendeurs et plus d'un milliard de composés virtuels facilement synthétisables. On peut aussi sélectionner pour certains projets des bases de données plus spécifiques comme par exemple celles qui contiennent uniquement des macrocycles, ou uniquement des petits peptides.

Il existe également des bases de données contenant des médicaments qui sont déjà sur le marché et des molécules en phase clinique comme DrugBank au Canada. Certaines bases répertorient des petites molécules qui ont été testées avec des approches de criblage expérimental haut débit, comme par exemple PubChem et ChEMBL. Ces bases de données annotées sont très intéressantes pour réaliser des études grande échelle *in silico* sur par exemple tout le protéome humain, ou pour développer des modèles statistiques prédictifs. D'autres bases de données concernent les extraits de produits alimentaires ou

des molécules annotées sur Wikipédia.

Une quantité d'informations considérable est donc maintenant disponible et augmente de jour en jour. Ces informations ne peuvent pas être traitées par le cerveau humain. Il faut donc des logiciels et des applications informatiques pour manipuler les données et en extraire de la connaissance.

Le logiciel DataWarrior (<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>), gratuitement disponible, permet de manipuler assez facilement autour d'un million de molécules. Il fonctionne sur tous les systèmes informatiques. L'utilisateur peut ouvrir un fichier de molécules téléchargé d'une base de données ou récupérer directement des molécules sur ChEMBL ou Wikipédia (Figure 10). Des tutoriels en français sont disponibles sur Radar web création (<https://www.radarweb.fr/>), ils expliquent

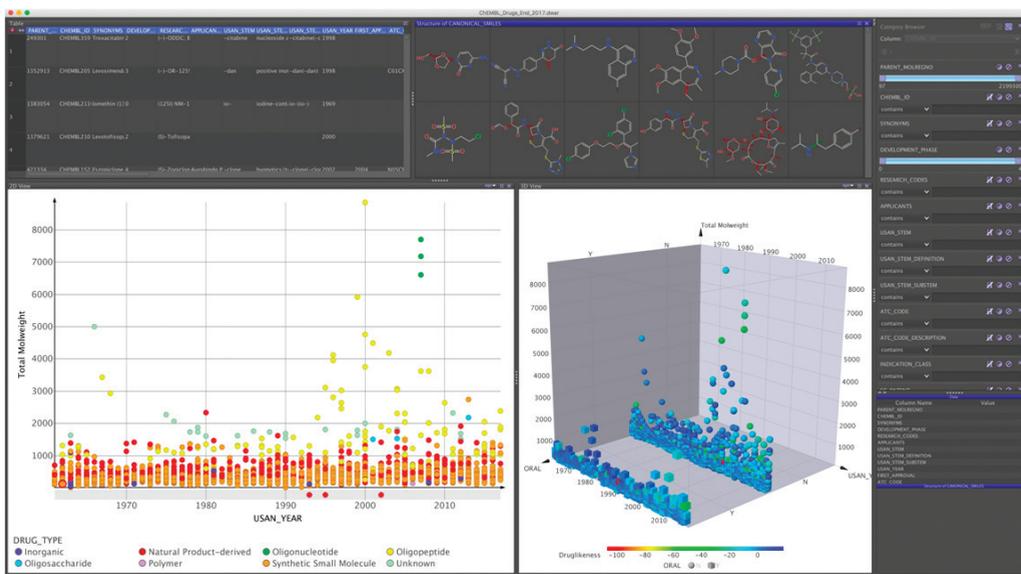
comment prendre en main ce logiciel un peu complexe.

En ouvrant DataWarrior, plusieurs fenêtres sont visibles. Une sorte de tableau Excel décrit les composés, avec des représentations 2D et/ou 3D des molécules. Dans l'exemple sur la Figure 10, une base de médicaments est ouverte et visualisée via des graphes en 2D et 3D. Ces molécules peuvent alors être classées par années, en fonction de leur origine, naturelle ou synthétique, de leur nature biochimique, de leur poids moléculaire, ou encore de leur mode d'administration.

Le criblage expérimental (ou « *high-throughput screening* », HTS, pour souligner le caractère haut débit de l'approche) est une technique de référence pour la recherche de petites molécules agissant sur une cible. Dans la pratique, il consiste à tester en parallèle l'action de dizaines de milliers de petites molécules chimiques sur une cible que

Figure 10

Le logiciel de visualisation et d'analyse de données DataWarrior ([www.openmolecules.org](http://www.openmolecules.org) ; *tutoriel : [www.radarweb.fr](http://www.radarweb.fr)*) est disponible gratuitement et marche sur tous les OS.



l'on estime importante pour une pathologie ou une fonction biologique au moyen d'un automate dans le but d'identifier des touches qui vont agir sur la cible.

Avec la miniaturisation et l'automatisation des tests biologiques, l'automate peut évaluer 100 000 molécules par jour environ (voire plus), mais les coûts sont énormes. Le criblage virtuel, dans sa version la plus simple, transpose *in silico* certaines idées du criblage expérimental. Le criblage virtuel a pour objectif principal de réduire le nombre de molécules à tester expérimentalement. Ainsi, une chimiothèque de plusieurs millions (ou milliards) de composés ou de milliers de médicaments peut être utilisée.

Ensuite, le criblage virtuel *per se* sera initié. On distingue deux grandes stratégies de criblage virtuel qui peuvent être couplées dans certaines circonstances : celles qui utilisent les propriétés structurales des petites molécules chimiques bioactives – on parle alors de criblage virtuel basé sur la structure des ligands (« *ligand-based virtual screening* », LBVS) – et des approches basées sur la structure tridimensionnelle (3D) de la cible (« *structure-based virtual screening* », SBVS).

Dans la pratique et à titre d'exemple, à partir d'une chimiothèque électronique initiale contenant un million de petites molécules, le criblage virtuel permettra, en quelques heures de calculs (ou en quelques minutes de calcul sur un cluster puissant), de générer une liste d'environ

500 composés potentiellement actifs à tester expérimentalement. Sur ces 500 molécules analysées en tubes à essai, il y aura inmanquablement un nombre important de molécules inactives mais aussi une petite liste de molécules bioactives. Dès lors, au lieu de tester expérimentalement un million de composés, seules 500 molécules seront analysées dans le tube à essai.

#### 4 Intelligence artificielle et apprentissage automatique

Les approches d'intelligence artificielle pour prédire l'importance d'une cible ou certaines propriétés des composés chimiques sont encore émergentes. Dans d'autres domaines que le médicament ou la chimie, on connaît par exemple le traitement du langage naturel, qui est un sous-domaine de l'intelligence artificielle. Ces approches regroupent par exemple les programmes de reconnaissance vocale et les autres applications liées aux mots dits ou écrits. Certaines de ces approches sont modifiées pour faciliter la recherche de molécules potentiellement thérapeutiques. L'intelligence artificielle est aussi connue dans le domaine du traitement et de la reconnaissance des images. Ces algorithmes peuvent être adaptés pour le traitement d'images de petites molécules chimiques et ainsi aider à par exemple prédire la toxicité d'un composé.

Toute une série d'autres algorithmes permet de classer ou de construire des

modèles statistiques, notamment de prédire si un composé peut être actif sur une cible ou toxique chez l'homme (**Figure 11**).

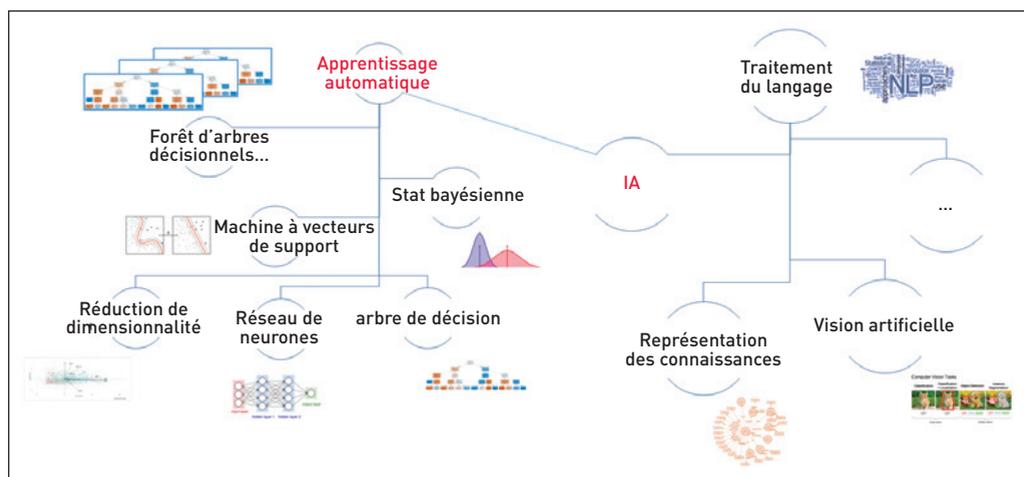
Dans le domaine de la chimie, certaines de ces approches sont plus connues sous le nom de méthodes QSAR (« *Quantitative Structure Activity Relationship* »). Ces techniques permettent de relier par une relation mathématique les descripteurs moléculaires, soit à l'activité biologique, soit à une propriété (physico-chimique ou pharmacocinétique). De tels modèles statistiques, basés sur des descripteurs moléculaires calculés, sont le point de départ de nombreux processus de sélection de molécules. Ces modèles sont souvent construits à partir d'un jeu de référence (par exemple des molécules annotées de ChEMBL), appelé jeu d'apprentissage, permettant de sélectionner le(s) descripteur(s) le(s) plus adapté(s) dans la construction d'un modèle. Les modes de construction de ces modèles peuvent être relativement

simples (régression linéaire...) ou plus sophistiqués (algorithme génétiques, réseaux de neurones, forêts aléatoires...). De nos jours, d'autres algorithmes peuvent être utilisés comme les réseaux de neurones convolutifs (exemple du « *deeplearning* »).

Le calcul des descripteurs et le développement des modèles statistiques sont complexes. Heureusement, certains services dédiés aux petites molécules sont disponibles en ligne, comme ChemSAR en Chine (**Figure 12**). Dans ce cas, l'utilisateur récupère les informations à partir d'une base de données comme ChEMBL, PubChem ou DrugBank. Les molécules sont insérées dans le système informatique qui nettoie les données et calcule toute une série de descripteurs moléculaires. Le système va ensuite utiliser différentes approches statistiques pour créer des modèles statistiques prédictifs. La qualité et la performance des modèles peuvent alors être visualisées. Le modèle statistique mathématique généré par le système

**Figure 11**

*L'intelligence artificielle et les méthodes d'apprentissage automatique permettent d'apprendre des données et de développer des modèles mathématiques prédictifs. Certaines de ces prédictions visent à évaluer les propriétés ADME-Tox des petites molécules et ainsi réduire la nécessité de recourir à l'expérimentation animale.*



de manière quasi automatique peut ensuite être utilisé et appliqué pour prédire l'activité de nouveaux composés.

## 5 Prédications ADME et de la toxicité

Dans le cadre du développement thérapeutique, les composés chimiques doivent non seulement être actifs sur les bonnes cibles mais ils vont aussi devoir être absorbés, distribués, métabolisés, et excrétés (« ADEME »). De plus, ils doivent être peu ou pas toxiques. Le voyage d'un médicament dans l'organisme est représenté de façon très schématisée sur la **Figure 13**. L'administration par voie orale d'un médicament fait intervenir le passage à travers toute une série de membranes biologiques et les petites molécules vont aussi interagir avec un grand nombre de macromolécules. Certains de ces processus et événements peuvent être reproduit *in silico*.

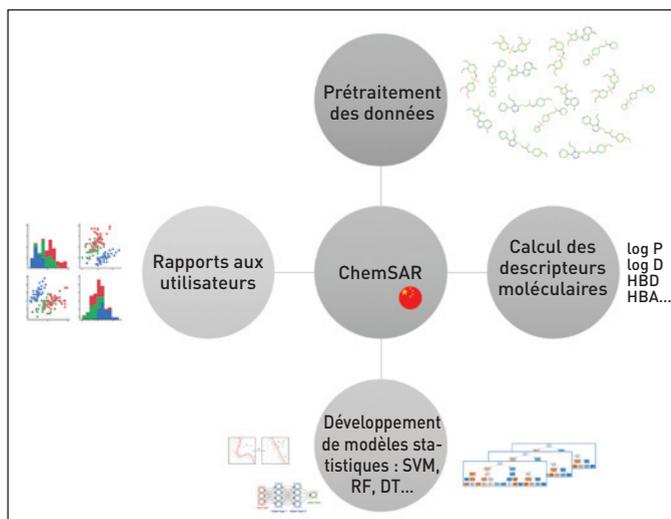
Généralement, deux séries d'analyses sont effectuées

sur les petites molécules. Une première étape implique le nettoyage des chimiothèques. Il s'agit de la standardisation de l'écriture des molécules et d'un filtrage ADME-Tox faisant appel à plusieurs règles empiriques s'appuyant souvent sur l'analyse de molécules connues et des médicaments existants. Nous avons développé un logiciel gratuit en ligne, FAF-Drugs, qui permet de préparer une chimiothèque avant un criblage ou de filtrer des molécules virtuelles avant la synthèse. Les fichiers sont soumis à toute une série de calculs et de filtres, à l'issue desquels les molécules sont soit rejetées car elles ne respectent pas des règles ADME simples ou parce qu'elles sont potentiellement toxiques, soit acceptées ou soit considérées comme de qualité intermédiaire (**Figure 14**). On dispose aussi de toute une série d'outils de visualisation qui permettent de mieux caractériser les produits. Des règles développées dans l'industrie pharmaceutique sont aussi

Figure 12

Des systèmes de gestion des données permettent un traitement automatisé des informations récoltées sur les bases de données afin de développer des modèles statistiques prédictifs.

Source: d'après Dong et coll. (2017). *J. Cheminform.*



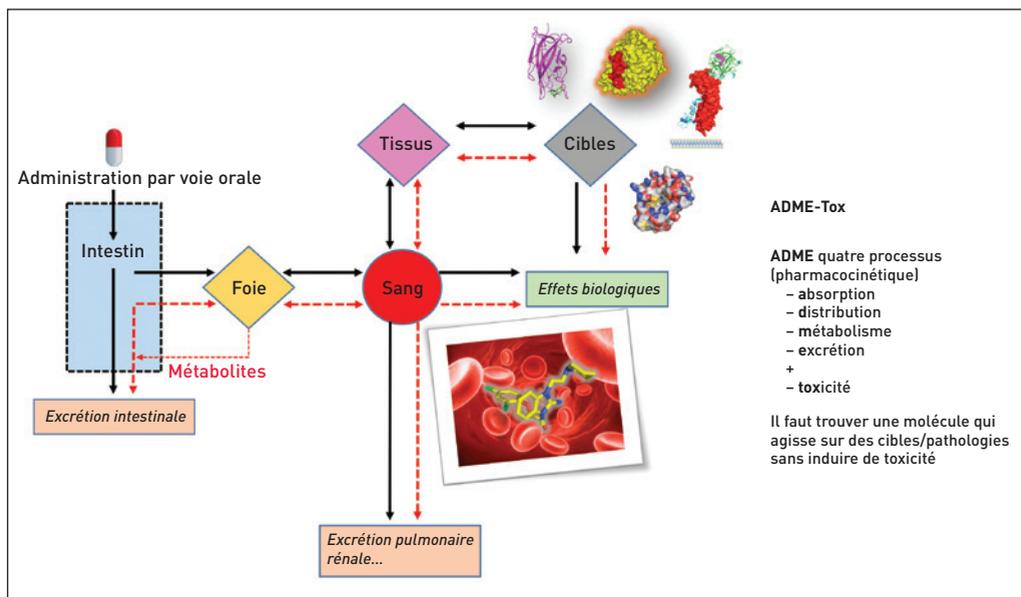


Figure 13

Le devenir d'un médicament administré oralement dans l'organisme : un voyage en plusieurs étapes. La pharmacocinétique, parfois désignée sous le nom de « ADME », étudie le devenir du médicament dans l'organisme après son administration. On distingue généralement plusieurs phases : absorption, distribution, métabolisme (transformation en produit actif ou inactif) et élimination (excrétion). Certaines de ces phases peuvent être prédites in silico. De plus, il est important de prédire si un composé peut être toxique. Dans ce cas, certains modèles prédictifs sont utilisés en parallèle des approches expérimentales et peuvent même dans certaines circonstances remplacer l'expérimentation animale.

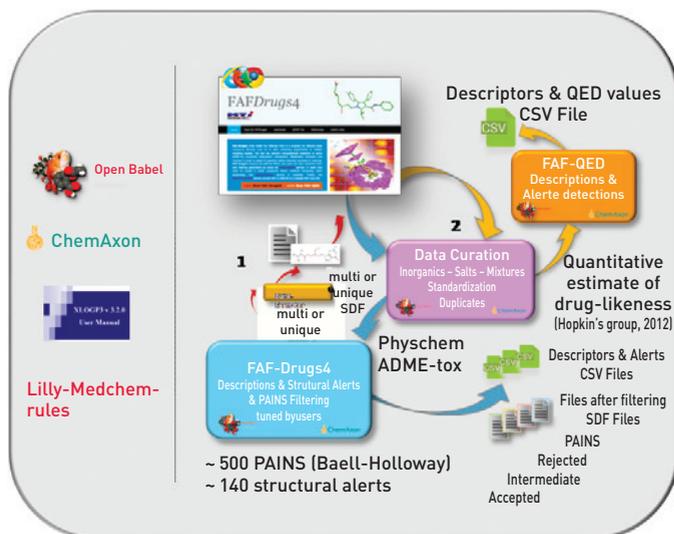


Figure 14

FAF-Drugs est un logiciel en ligne accessible gratuitement qui permet, grâce à un traitement de données, de prédire certaines propriétés ADME-Tox simples et filtrer une chimiothèque avant ou après un criblage expérimental ou virtuel.

implémentées. Si une molécule commence à allumer plusieurs feux rouges et se projette en outre assez mal dans un certain nombre de diagrammes ADME, alors le composé est rejeté.

Ce premier niveau de filtrage est utilisé en amont du développement du candidat-médicament. Ensuite, pendant les phases d'optimisation des molécules (par exemple optimisation de l'affinité pour la cible, amélioration des paramètres ADME...), il est nécessaire d'affiner de plus en plus la recherche de toxicité potentielle, sachant qu'il y a des liens étroits et très complexes entre paramètres ADME et toxicité.

Après des années d'optimisation, une molécule peut par exemple atteindre le stade de la pharmacologie de sécurité préclinique. À ce stade, il est possible de coupler certaines approches expérimentales avec l'utilisation de modèles statistiques prédictifs beaucoup plus spécifiques que ceux utilisés dans un outil comme FAF-Drugs. L'objectif de cette étape est notamment d'essayer au maximum d'anticiper des interactions possibles entre une petite molécule et certaines cibles connues pour être dangereuses pour la santé si elles sont touchées par un composé. L'idée sous-jacente est de protéger les volontaires sains qui rentrent en phase 1, et ensuite les patients qui vont participer aux phases cliniques, et au final d'essayer de minimiser les échecs au cours du développement, ou même après la mise sur le marché.

Il est donc critique de détecter le plus tôt possible si une

petite molécule chimique « touche » peut avoir des effets indésirables sur les systèmes physiologiques, et notamment sur les organes vitaux comme le cerveau, le cœur, le poumon. Il existe des listes de protéines cibles qui ont été publiées par l'industrie pharmaceutique et dans les laboratoires de recherche académiques qu'il faut éviter. Un premier jeu fait état d'une quarantaine de cibles à ne pas toucher ou à toucher de manière contrôlée. Dans la pratique, il y en a environ 150, ou 200 si on veut être plus exhaustif. Au niveau *in silico*, un objectif peut être de développer des modèles statistiques mathématiques prédictifs pour chacune de ces cibles et répondre à la question : est-ce que cette molécule qui inhibe une cible thérapeutique va aussi interagir avec une cible dangereuse pour la santé ?

Prenons l'exemple du canal potassique, hERG, qui est très important puisque son blocage par une petite molécule peut entraîner des arrêts cardiaques. Un certain nombre de médicaments ont été retirées du marché parce qu'ils bloquent ce canal hERG, notamment certains antihistaminiques, mais aussi d'autres molécules.

L'astémizole, retiré du marché (dont on voit la formule en 2D sur la [Figure 15](#)), est un exemple type. Cette molécule peut aussi être représentée par un code beaucoup plus adapté à une manipulation informatique qu'une image, le code SMILES. Ce code peut être copié et collé dans un outil suédois, PTP, qui va évaluer (un modèle statistique pour

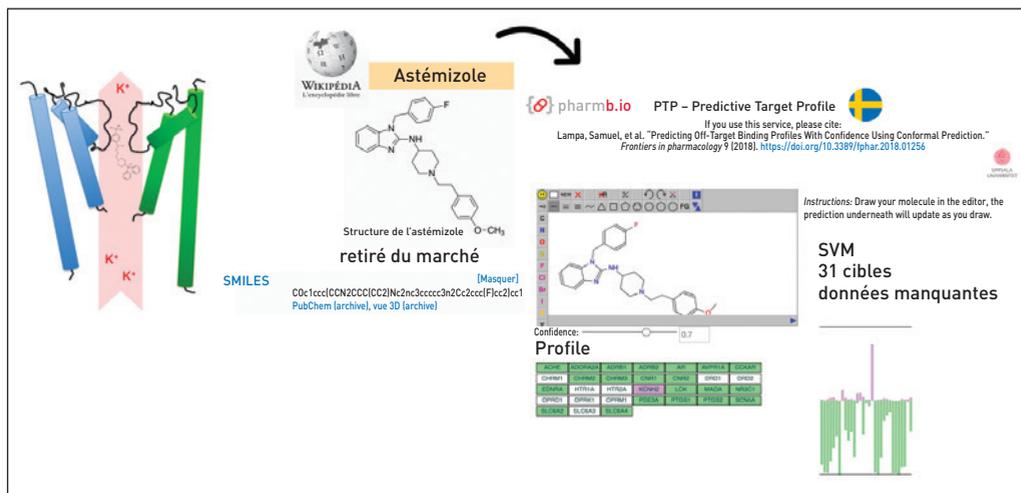


Figure 15

Le service PTP en Suède (<http://ptp.service.pharmb.io/>) permet de tenter de prédire l'interaction entre une molécule chimique et 31 cibles à ne pas toucher pour un développement thérapeutique comme le canal potassique hERG.

chaque cible a été construit à partir de molécules annotées extraites notamment de ChEMBL si ce composé peut interagir avec 31 cibles dangereuses pour la santé. À ce jour, il n'y a pas encore assez de données libres pour construire un modèle mathématique pour toutes les cibles à éviter, mais c'est une étape.

complémentaires. En comparant les étapes de découvertes classiques d'un médicament et les étapes de repositionnement, on note une réduction de temps de développement considérable (Figure 16). En effet, dans le cas du repositionnement, plusieurs étapes ne sont plus nécessaires et un certain nombre de connaissances ADME-Tox sont déjà établies. Plusieurs composés

## 6 Le repositionnement de molécules au service de l'innovation

Pour certains projets, comme dans le cas d'urgence sanitaire ou des maladies rares, il peut être pertinent d'utiliser des médicaments qui existent déjà pour essayer de traiter ou soulager les patients. Le repositionnement ou la réutilisation des médicaments signifie tester des molécules déjà connues pour une maladie différente de celle pour laquelle elles ont été développées. Cela peut se faire avec des approches expérimentales de criblage, mais les méthodes *in silico* peuvent être beaucoup plus rapides et/ou

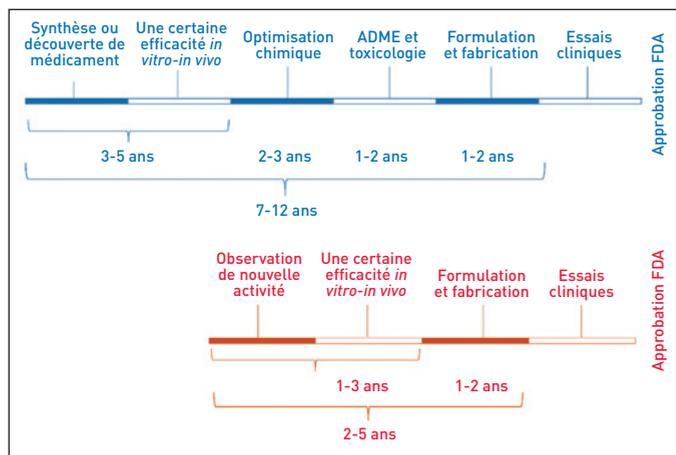


Figure 16

Les approches informatiques peuvent guider les projets de repositionnement de médicaments.

ont déjà été repositionnés sur d'autres pathologies ces dernières années comme par exemple le thalidomide.

Plusieurs approches *in silico* peuvent être utilisées pour le repositionnement comme par exemple les méthodes basées sur les signatures transcriptomiques<sup>8</sup>, sur les connaissances des ligands et sur la connaissance tridimensionnelle des cibles.

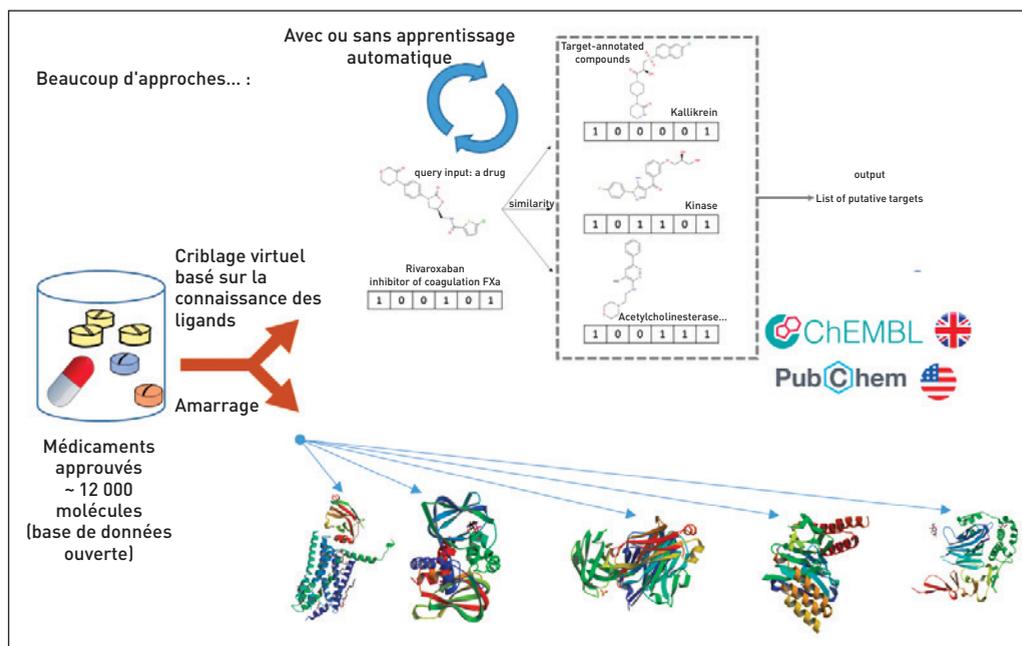
On dispose dans les bases de données ouvertes d'environ 12 000 molécules thérapeutiques qui sont sur le marché dans tous les pays ou seulement dans certains pays, et donc de composés chimiques qui sont déjà connus et administrés chez l'homme. Pour illustrer cette notion de repositionnement *in silico*, nous allons nous limiter à deux grands types de méthodes : les approches basées sur la connaissance des ligands et les approches basées sur la connaissance de la structure 3D des cibles (Figure 17).

Dans certains cas, nous savons que des cibles sont importantes dans une pathologie. Pour identifier les cibles qui pourraient être touchées

par des médicaments connus, nous pouvons effectuer un criblage virtuel basé sur la connaissance des ligands. Sur l'exemple présenté sur la Figure 17, la molécule à tester (« query ») est constituée de plusieurs groupes chimiques, elle est transformée en un vecteur de 1 et de 0 (notion d'empreintes moléculaires). Chaque fois qu'un fragment chimique (par exemple un cycle aromatique) du composé étudié se trouve dans une petite base de données sélectionnée par l'utilisateur, on donne la valeur 1, et quand le fragment chimique est absent, on lui met la valeur 0. Chaque médicament à tester est ainsi transformé en une suite de 0 et 1, ce qui permet de traiter rapidement les informations en informatique. Nous procédons de la même manière sur des millions de molécules annotées (nous connaissons au niveau expérimental certaines cibles touchées par ces composés) présentes dans des bases de données comme ChEMBL ou PubChem. Il est ensuite possible de calculer la similarité entre un médicament étudié et une petite molécule annotée. Si cette similarité est importante, nous pouvons suggérer que le médicament étudié se fixe aussi sur la cible de la petite molécule de ChEMBL ou PubChem.

Prenons l'exemple d'une molécule anticoagulante bloquant le facteur 10 de la coagulation. Il est possible de traduire sa formule chimique en une série de 0 et 1. Ce médicament peut être comparé, après un calcul de similarité, à toutes les molécules

8. Signature transcriptomique : le transcriptome est l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome. L'analyse transcriptomique peut caractériser le transcriptome d'un tissu particulier, d'un type cellulaire, ou de comparer les transcriptomes entre différentes conditions cliniques. Ce type d'étude peut donner des pistes sur des cibles importantes pour une pathologie et sur des molécules qui pourraient rééquilibrer le système biologique perturbé.



qui se trouvent dans une base de données, donc actuellement à environ deux millions de composés. Le calcul suggère que la molécule anticoagulante peut aussi se fixer sur d'autres cibles, comme certaines kallikreines. Si ces kallikreines sont importantes pour la pathologie que l'on étudie, il est alors possible de tester expérimentalement cette hypothèse pour valider ou non la prédiction *in silico*.

L'autre approche, présentée sur la [Figure 17](#), est géométrique et énergétique, basée sur la structure de la cible et sur l'amarrage de la petite molécule. On connaît la structure 3D expérimentale de milliers de cibles (environ 150 000 en 2020), mais on a aussi environ 35 millions de modèles structuraux théoriques construits par homologie déposés dans des bases de données. On dispose ainsi d'une certaine couverture

du protéome<sup>9</sup> humain, couverture qui devrait être pratiquement complète dans les dix années à venir.

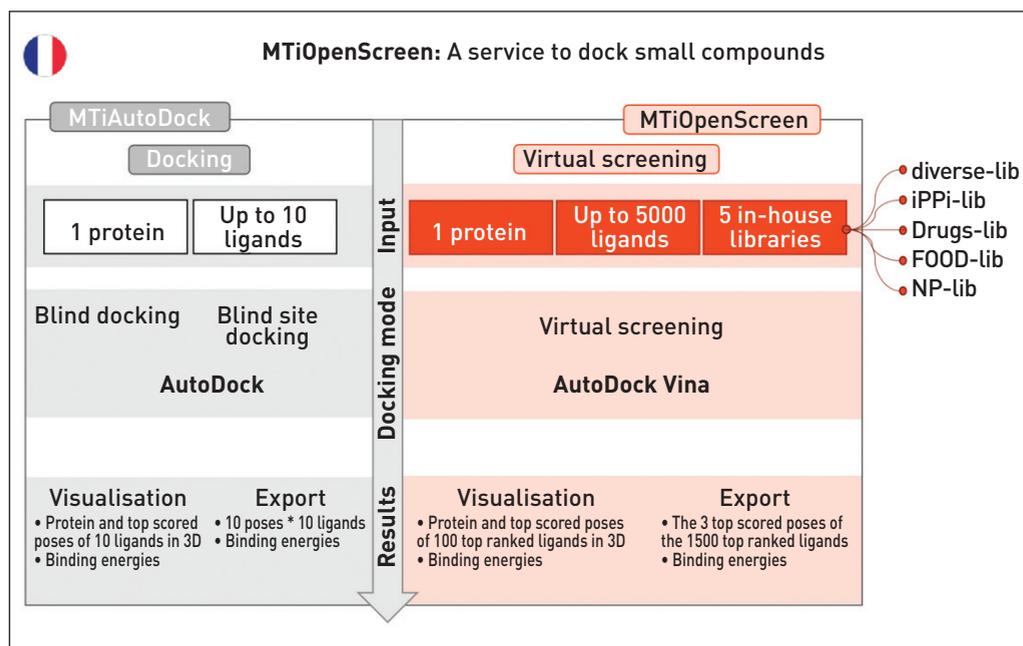
Dans cette approche de repositionnement basée sur la connaissance de la structure 3D des cibles, un calcul d'amarrage des petites molécules-médicaments sur chacune de ces cibles est réalisé afin d'obtenir un score prédictif d'affinité entre toutes les petites molécules étudiées et toutes les cibles. Cela permet de tester rapidement un grand nombre de composés sur de multiples cibles. Même si les calculs d'affinités sont encore peu précis, on réalise bien le gain de temps et la réduction des coûts que peut constituer ce type d'approche. En effet, on n'a plus à tester tous les composés

9. Protéome : ensemble des protéines exprimées au sein d'un système biologique défini.

**Figure 17**

Deux exemples d'approches *in silico* pour repositionner des molécules chimiques.

Des approches sont basées sur la structure chimique des ligands et sur la connaissance de ligands annotés présents dans des bases de données, d'autres approches sont basées sur des techniques d'amarrage moléculaire.



**Figure 18**

MTiOpenScreen (<http://drugmod.rpbs.univ-paris-diderot.fr/index.php>) est un serveur pour le criblage virtuel basé sur la structure 3D des cibles.

expérimentalement, mais seulement ceux identifiés par les approches *in silico*.

Nous avons développé un serveur, MTiOpenScreen, dédié à l'amarrage des petites molécules et au criblage virtuel. Plusieurs banques de molécules sont déjà préparées pour les utilisateurs et notamment une banque de médicaments : Drugs-lib (Figure 18).

Pour développer ce serveur, il faut dans un premier temps préparer les banques de petites molécules. Pour cela, il est nécessaire d'extraire les données publiées dans différents pays, les agréger, éliminer les doublons et certains toxicophores, et effectuer toute une série de calculs pour aboutir à la base de données finale. Il faut aussi prédéfinir un certain nombre de règles pour ne sélectionner que les molécules qui sont adaptées à l'amarrage (Figure 19).

Ensuite, il faut un algorithme d'amarrage. Dans notre cas, nous n'avons pas redéveloppé une méthode mais implémenté deux outils libres publiés aux États-Unis, AutoDock et AutoDock Vina. La prochaine étape de développement du serveur est d'automatiser les processus pour faciliter le travail des utilisateurs, créer une interface intuitive et tester les outils afin de valider sur des exemples connus que les calculs sont corrects. Enfin, nous pouvons tester le serveur sur des nouvelles cibles et valider expérimentalement la pertinence de l'approche. Pour ce faire, nous avons par exemple étudié une protéine impliquée dans l'angiogenèse<sup>10</sup> et le cancer avec nos collaborateurs de Bordeaux (Figure 20). Cette protéine est cristallisée et on

10. Angiogenèse : processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

a pu, avec ce type d'approche et en moins d'une heure de calculs, identifier plusieurs antifongiques qui semblent bloquer l'activité catalytique

de cette protéine. Ces composés antifongiques ont été validés expérimentalement et des brevets ont été déposés.

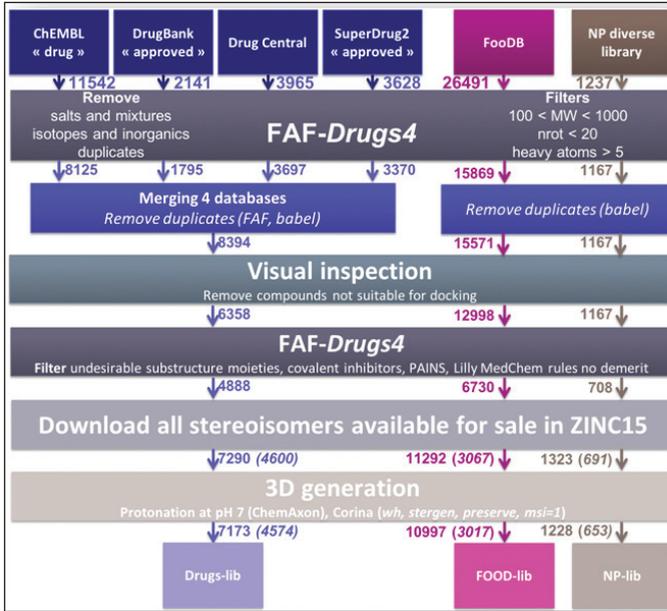


Figure 19

Un travail de nettoyage, de sélection et de fusion des bases de données est nécessaire afin de les rendre prêtes à l'emploi. Les critères ont été définis par les concepteurs du serveur.

**Repositionnement de plusieurs médicaments antifongiques sur une protéine convertase (1 h)**

Les PC peuvent activer une métalloprotéase (métalloprotéinase matricielle) et jouer un rôle dans l'angiogenèse tumorale

Figure 20

Utilisation du serveur MTiOpenScreen : il a été possible d'identifier des médicaments antifongiques qui ne sont pas connus pour se fixer sur les protéines convertases par notre approche informatique. Ces médicaments semblent bloquer l'activité de cette protéine impliquée dans l'angiogenèse et certains cancers. C'est une première étape dans notre processus de repositionnement.

## Les perspectives de la pharmaceutique *in silico*

La conception de molécules candidats-médicaments en ligne est maintenant possible : les bases de données et les algorithmes peuvent être utilisés pour faire la conception de ces molécules (*Figure 21*).

Il reste encore des points complexes à résoudre :

- les données manquantes : par exemple dans le cadre du profilage pharmacologique, toute une série d'informations manquent sur un certain nombre de cibles ; il en est de même pour plusieurs types de prédictions de toxicité ;
- le manque d'uniformité de l'étiquetage des données : un travail de nettoyage important est à faire ;

- les options dans les services en ligne et l'identification des erreurs dans les prédictions : les algorithmes implémentés en ligne ne peuvent pas offrir toutes les options possibles aux utilisateurs car il est nécessaire de simplifier l'interface afin de permettre à des scientifiques qui ne travaillent pas dans le domaine *in silico* d'utiliser les services sans avoir besoin de coder ou sans se perdre dans des dizaines d'options complexes. Pour identifier les erreurs, il est possible dans certains cas de fournir un score de pertinence des calculs, mais le meilleur moyen reste encore d'étudier l'algorithme et de bien comprendre la force et la faiblesse des méthodes qui sont utilisées en arrière-plan.

Néanmoins le côté positif est qu'il est maintenant possible de concevoir des petites molécules-médicaments ou d'essayer d'optimiser des petites molécules « touches » avec ces approches en ligne. Ces observations sur les petites molécules chimiques sont aussi pertinentes pour les peptides et pour toute une

série de produits biologiques, protéines thérapeutiques et anticorps monoclonaux, pour lesquels l'utilisation de l'intelligence artificielle couplée à la bioinformatique structurale est en train d'émerger à très grande vitesse. Avec ces approches *in silico*, il est possible de tester de nombreuses hypothèses dans un délai très court, ce qui permet de réduire un certain nombre de travaux expérimentaux et de se focaliser sur ce qui est le plus important. De plus, ce type de recherche génère de nouvelles idées et, dans un certain nombre de cas, permet même de réduire de manière significative l'expérimentation animale.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, ces ressources *in silico* sont non seulement importantes pour la recherche mais aussi pour l'enseignement. En effet, elles aident les étudiants à mieux comprendre certains sujets de recherche et certaines notions complexes. De plus, les services en ligne représentent une véritable vitrine de compétences, d'ailleurs on voit qu'un pays comme la Chine, qui était peu présent sur les outils en ligne dans le domaine du médicament il y a 5-6 ans, y est maintenant extrêmement actif avec pratiquement une publication scientifique dans le domaine toutes les semaines.

Ces approches *in silico* sont incontournables et pourtant restent insuffisamment utilisées en France. De plus, ces approches ne sont pas encore implémentées en France en cas d'urgence sanitaire alors qu'elles sont rapides et peuvent donner un éclairage nouveau sur de multiples questions scientifiques. Il va donc falloir combler au plus vite cette lacune. Le manque d'experts en bioinformatique structurale, chemoinformatique et autres disciplines récentes dans les cercles décisionnels et l'entre-soi expliquent en partie cette situation.



# Le microbiote, acteur et levier de santé

*Joël Doré est directeur de recherche à l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) et directeur scientifique de MetaGenoPolis<sup>1</sup>.*

Nous sommes microbiens, les microbes interagissent avec nous en permanence et nous sommes en symbiose<sup>2</sup> avec eux. En termes de connaissance scientifique, le microbiote est un domaine en évolution rapide, notamment celui du microbiote intestinal.

## 1 L'humain microbien : écosystème, symbiose

La relation symbiotique entre le microbiote et l'humain s'installe dès la naissance, où, venant d'un environnement virtuellement stérile, nous rencontrons les micro-organismes, en commençant par ceux d'origine maternelle lors d'une naissance par voie

basse. Dans les premiers mois de la vie nous développons notre microbiote en même temps que nous construisons nos défenses naturelles – notre système immunitaire (*Figure 1*).

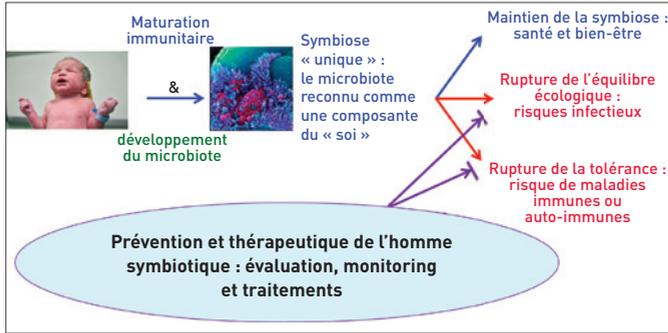
Cette évolution conduit à une symbiose unique où le microbiote, comme n'importe quelle cellule ou n'importe quel organe, est reconnu par les défenses naturelles comme faisant partie du soi, et quand il n'y a pas cette reconnaissance, quand il n'y a pas symbiose, il y a maladie. Cette symbiose est essentielle pour le maintien dans la durée de la santé et du bien-être.

Le microbiote contribue à un grand nombre des fonctions trophiques<sup>3</sup>, il accompagne

1. [www.mgps.eu](http://www.mgps.eu)

2. Une symbiose décrit une relation durable entre deux organismes vivants qui profite à chacun d'eux.

3. Fonction trophique : contribution à la nutrition et à la croissance des organes et des tissus.



**Figure 1**

La relation symbiotique hôte-microbes est initiée à la naissance par la rencontre avec des micro-organismes d'origine maternelle et environnementale. Après la naissance, le nouveau-né va simultanément développer son microbiote et maturer ses défenses naturelles.

le développement de nos organes. Il contribue, sur le plan métabolique, à la dégradation de certains composés alimentaires que les enzymes humaines ne savent pas dégrader. Il exerce une fonction de barrière, protection contre la prolifération de microbes de l'environnement. Quand il est installé et stable, il nous protège. Il stimule en permanence le système de défenses naturelles, produit également des petites molécules qui exercent un rôle signal, et agissent à tous les niveaux de l'organisme, y compris au niveau du cerveau.

Quand le système se dérègle et que l'on a une rupture d'équilibre, au niveau écologique, de cette organisation de microbes les uns avec les autres, la fonction de barrière disparaît avec apparition d'un risque infectieux. Quand la rupture est au niveau de la tolérance immunitaire, ce déséquilibre est associé à un risque accru de maladie auto-immune ou immune en général.

La construction de connaissances dans ce domaine a pour vocation d'aider à développer des stratégies de prévention ou de thérapeutique de l'homme microbien symbiotique pour

mieux évaluer, mieux suivre et mieux traiter cette symbiose.

Cinquante mille milliards, c'est le nombre de bactéries avec lequel chacun de nous interagit en permanence, chaque seconde de notre vie ; et c'est seulement le nombre des bactéries, car il y a aussi des virus, des champignons, des levures et de nombreux autres micro-organismes. Ils sont présents sur la peau, mais aussi dans le système urogénital, au niveau de la sphère orale, dans la bouche, dans les bronches, jusque dans les poumons, et bien sûr au niveau du tube digestif où se trouve la plus grande richesse et la plus grande diversité de microbes (Figure 2).

Nous savons maintenant qu'il y a 23 000 gènes dans le génome humain, mais en face de ces 23 000 gènes, et notamment au niveau intestinal, on est capable de compter en moyenne, par individu, 600 000 gènes microbiens qui contribuent, de façon essentielle, à de nombreuses fonctions (Figure 3).

## 2 Le scanner métagénomique

Le scanner métagénomique<sup>4</sup> est l'information génétique qui concerne le microbiote intestinal, la génomique fait référence au génome de l'homme, la métagénomique fait référence à ce qu'on appelle le métagénome, qui est l'ensemble des génomes

4. La métagénomique étudie le microbiote par séquençage et analyse des génomes de plusieurs individus d'espèces différentes dans un milieu donné.

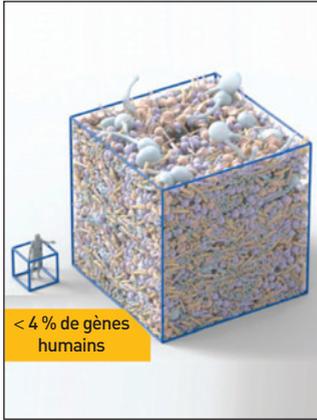


Figure 2

Localisation des microbiotes associés à l'organisme humain : ils sont autochtones (nul besoin d'être réalimentés en micro-organismes) et spécifiques des niches écologiques qu'ils occupent.

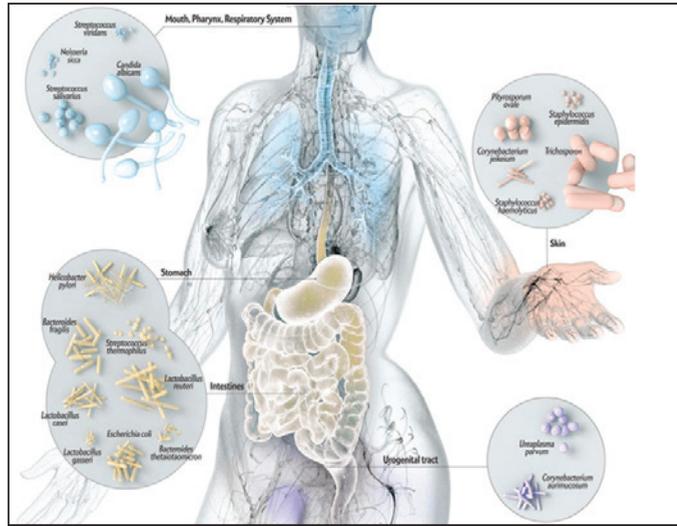


Figure 3

Le nombre de gènes humains représente moins de 4 % du génome microbien par individu.

combinés des microbes dominants d'un écosystème, en l'occurrence de l'intestin.

C'est une révolution technologique dont le développement a commencé dans les années 2001-2002 : le principe est d'extraire, à partir d'un échantillon intestinal humain (selles ou contenus d'intestin), l'information génétique et de séquencer de façon massive les gènes présents, en vue de construire un catalogue de référence des gènes (Figure 4).

La construction de ce catalogue de référence a fait

l'objet de grands projets à l'international : à la fois au niveau américain (le « Human Microbiome Program ») et au niveau européen : les projets Meta HIT (« Metagenomics of the Human Intestinal Tract ») et IHMS, qui ont été portés par la Commission européenne. Ces derniers ont permis de construire un catalogue de références sur dix millions de gènes et d'établir des procédures standardisées aujourd'hui appliquées dans le monde entier, ce qui représente un atout majeur pour le futur de la métagénomique.

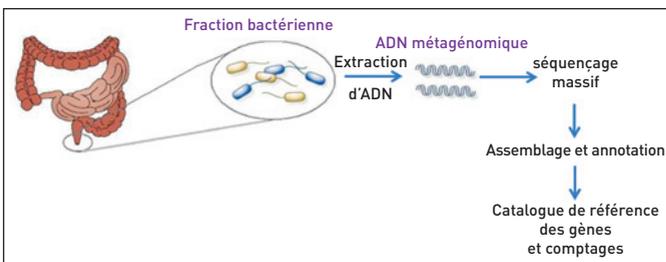


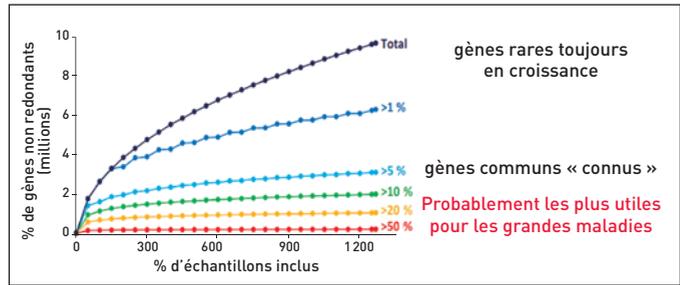
Figure 4

Principe du scanner métagénomique à partir d'un prélèvement intestinal humain.

Source : d'après Qin Nature (2010) ; Li Nature Biotech (2014).

Figure 5

Nombre de gènes non redondants en fonction du nombre d'individus caractérisés. Chacune des courbes est associée à un groupe de gènes présent sur un pourcentage donné dans la population caractérisée.



La **Figure 5** est extraite d'une étude de 2014 du programme Meta HIT qui portait sur un échantillon de 1 267 individus, européens, chinois et américains. On observe que plus le nombre d'individus caractérisés est grand, plus le nombre de gènes rares augmente, le plateau n'étant pas encore atteint.

En revanche, les points rouges de la **Figure 5** correspondent aux gènes présents sur environ la moitié de la population étudiée. On atteint dans ce cas rapidement un plateau, qui indique que l'on caractérise assez bien les gènes qui sont les plus partagés dans la population humaine. Ils correspondent à des gènes de micro-organismes conservés entre individus : le noyau métagénomique (**Figure 5**).

Un travail semblable réalisé à l'Institut national de la recherche sur l'alimentation, l'agriculture et l'environnement (INRAe) sur

des animaux, notamment sur le porc et le poulet, a conduit à des observations comparables au sens où l'on met en évidence une énorme richesse en espèces métagénomiques, mais dont une grande partie n'est pas connue par la culture au laboratoire.

Au sein du microbiote humain on identifie une petite vingtaine d'espèces qui sont retrouvées presque systématiquement quand on caractérise un grand nombre des individus humains dans la partie occidentale de la planète (**Figure 6**). C'est une petite vingtaine par rapport à en moyenne deux cents espèces par individu, donc une toute petite fraction de la richesse microbienne que l'on héberge en permanence.

La question s'est posée de savoir si l'on pouvait caractériser la composition du microbiote de l'individu « humain moyen ». Sur la **Figure 7** est représentée, sous la forme de

Figure 6

Noms de micro-organismes très conservés au sein d'une grande population d'individus occidentaux.

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> SL3 3	<i>Bacteroides</i> sp. 2_2_4
<i>Roseburia intestinalis</i> M50 1	<i>Bacteroides</i> sp. D4
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	<i>Bacteroides dorei</i>
<i>Bacteroides</i> sp. 9_1_42FAA	<i>Ruminococcus obeum</i> A2-162
<i>Ruminococcus</i> sp SR1 5	<i>Ruminococcus lactaris</i>
<i>Coprococcus comes</i> SL7 1	<i>Bacteroides capillosus</i>
<i>Bacteroides</i> sp. 2_1_7	<i>Bacteroides finegoldii</i>
<i>Bacteriodes xylanisolvens</i> XB1A	<i>Clostridium</i> sp. M62 1
<i>Ruminococcus torques</i> L2-14	<i>Clostridium nexile</i>

dômes, la densité de la population humaine en fonction de la composition de son microbiote intestinal. On observe que l'on a non pas une, mais des organisations préférentielles, qui sont appelées entérotypes<sup>5</sup>, et qui sont dominées, pour chacune des trois (Figure 7), par un genre bactérien particulier. Pour comprendre ce résultat vraiment inattendu, l'importance de nombreux paramètres a été étudiée. Une relation entre cette distribution de l'écologie intestinale humaine et des habitudes alimentaires a rapidement été mise en évidence. Il a été montré que les habitudes alimentaires occidentales, notamment dominées par des aliments transformés, favorisaient l'entérotipe *Bacteroides*, tandis qu'une alimentation riche en fruits et légumes favorisait les entérotypes *Ruminococcus* et *Prevotella*. Ce travail a aussi montré qu'il y avait une relation entre l'entérotipe et la richesse en gènes du microbiote intestinal.

La courbe en bleu de la Figure 8 représente le nombre d'individus observés, dans une cohorte de trois cents, en fonction du nombre de gènes observés dans le métagénome, par individu. La moyenne du nombre de gènes est d'environ 600 000, mais avec des variations d'un individu à l'autre allant de moins de 200 000 à plus de 800 000 gènes. Remarquons que la courbe de distribution des gènes présente un épaulement, du côté

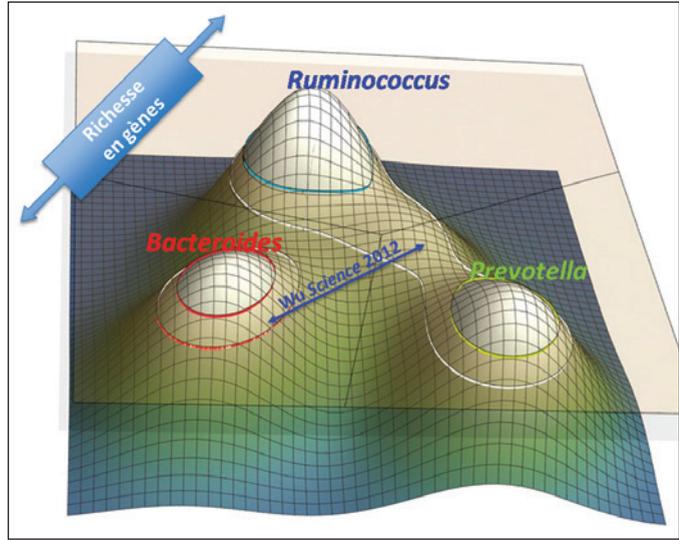


Figure 7

Représentation de la densité de population humaine sous forme de dômes qui traduit des organisations préférentielles des microbiomes humains appelées les entérotypes.

Source : Arumugam (2011). Nature ; Costea (2018). Nature Microbiol.

des microbiotes pauvres, et un vrai pic du côté des microbiotes riches (Figure 8). Dans la population humaine on trouve effectivement des individus à microbiote pauvre, potentiellement de façon stable toute leur vie, et des individus à microbiote riche. On a même su identifier des espèces qui sont des signatures de l'appartenance à l'une ou l'autre de ces deux catégories.

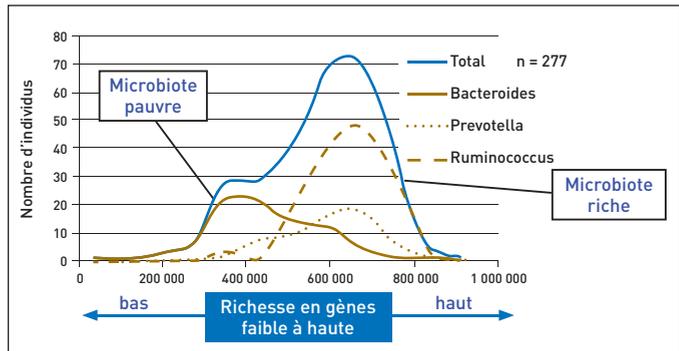
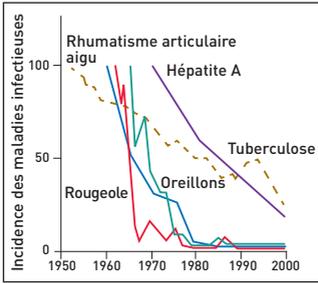


Figure 8

Nombre d'individus en fonction de la richesse en gènes qui traduit la répartition de la population entre des individus qui ont un microbiote pauvre et des individus qui ont un microbiote riche.

Source : d'après Le Chatelier (2013). Nature ; Cotillard (2013). Nature.

5. Entérotipe : organisation préférentielle de la composition du microbiote et dominée par un des trois types bactériens : le type *Bacteroides*, le type *Prevotella* et le type *Ruminococcus*.



**Figure 9**

Courbe de l'incidence des maladies infectieuses en fonction du temps entre 1950 et 2000 qui traduit une diminution voire une éradication de ces maladies grâce aux progrès médicaux et à l'hygiène de vie qui évolue.

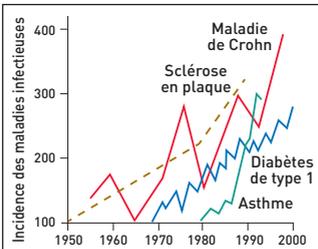
Source : d'après Bach J.-F., N. Eng. J. Med(2002).

### 3 La dysbiose, une symbiose altérée dans les maladies auto-immunes

Des modifications du microbiote ont été identifiées entre des individus en bonne santé et des malades, notamment des malades atteints de maladies chroniques. Ce déséquilibre du microbiote a été appelé dysbiose. On se rend compte aujourd'hui que la dysbiose est en fait une altération de la symbiose entre le microbiote et l'hôte. L'un des éléments moteurs des recherches menées dans ce domaine a été l'observation, dans le contexte d'études épidémiologiques, d'une augmentation progressive, régulière et incontrôlée des maladies chroniques, alors que dans le même temps les progrès fantastiques de la médecine entre 1950 et 2000 avaient conduit à une réduction impressionnante de

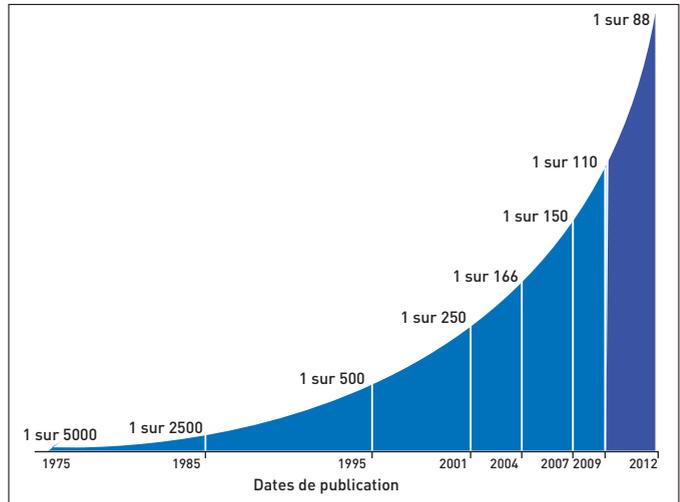
l'incidence des maladies infectieuses, voire une éradication pour certaines (Figure 9).

Les maladies chroniques sont des maladies qui touchent le système immunitaire (Figure 10). C'est le cas des maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn, des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques ou le diabète de type 1, des maladies allergiques comme l'asthme. Dans la même tendance, on a le diabète de type 2, l'obésité, certains cancers, et aujourd'hui des maladies neurologiques, neurodégénératives comme Parkinson ou Alzheimer, ou neuropsychiatriques comme la schizophrénie, l'autisme, la dépression résistante ou le syndrome bipolaire. Dans ce contexte, la courbe d'augmentation d'incidence de l'autisme (Figure 11) est impressionnante avec aujourd'hui, selon



**Figure 10**

Courbe de l'incidence des maladies chroniques en fonction du temps entre 1950 et 2000, qui traduit une évolution croissante et incontrôlée de ces maladies en raison des transitions récentes telles que le mode et l'environnement de naissance, la nutrition, les habitudes de vie et l'exposition aux xénobiotiques.



**Figure 11**

Courbe de l'incidence de l'autisme aux États-Unis d'Amérique entre 1975 et 2012.

Source : CDC, 2012.

le dernier recensement, une naissance sur cinquante aux États-Unis qui est, ou sera pendant sa vie, concernée par l'autisme, et une sur cent cinquante en Europe, dans des pays comme la France ou le Royaume-Uni. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) nous dit qu'une personne sur quatre sera concernée en 2025 par l'une ou l'autre de ces maladies chroniques dont on ne contrôle pas l'augmentation aujourd'hui. Cette « épidémie » pourrait représenter une menace globale en termes de santé, et dans tous les cas c'est un moyen de souligner un besoin urgent de repenser la nutrition préventive et la médecine par rapport à cette situation.

Il est difficile d'être catégorique sur les changements potentiellement déclencheurs de cette augmentation des maladies chroniques. On évoque des changements autour de tout ce qui entoure la naissance, le mode de naissance, l'environnement de naissance, notamment l'augmentation vertigineuse du recourt à la césarienne dans certains pays ; quelques pays ont recours à la césarienne pour neuf naissances sur dix,

aussi à travers plusieurs générations on imagine bien que cela aurait un effet majeur sur la biologie humaine.

Les habitudes alimentaires, notamment la diminution des fibres alimentaires, ont un impact fort, il en est de même pour l'exposition aux composés xénobiotiques<sup>6</sup>, issus de la chimie et auxquels notre organisme humain n'était pas tout à fait préparé. Notre corps est capable de s'adapter, mais peut-être pas aussi rapidement que ce à quoi nous sommes exposés.

La comparaison de patients atteints de ces maladies chroniques avec des sujets en bonne santé a d'abord et avant tout mis en évidence une altération du microbiote intestinal pour les premiers (Figure 12). Il est apparu progressivement que l'on avait en réalité affaire à une altération de la symbiose entre l'hôte et ses microbes. L'altération du microbiote s'accompagne ainsi très souvent d'une perméabilité intestinale, d'une inflammation, qui,

6. Xénobiotique : substance étrangère présente dans le corps d'un organisme vivant (exemples : additifs alimentaires, pesticides, médicaments...).

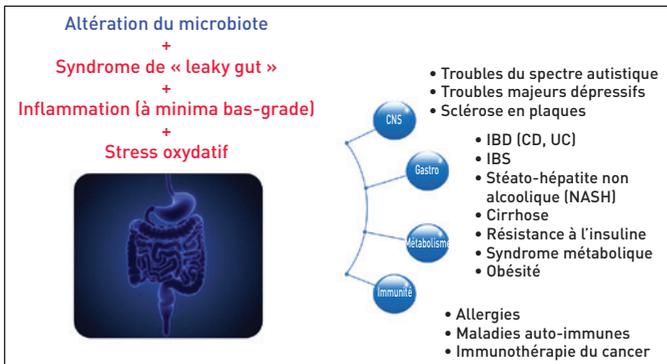
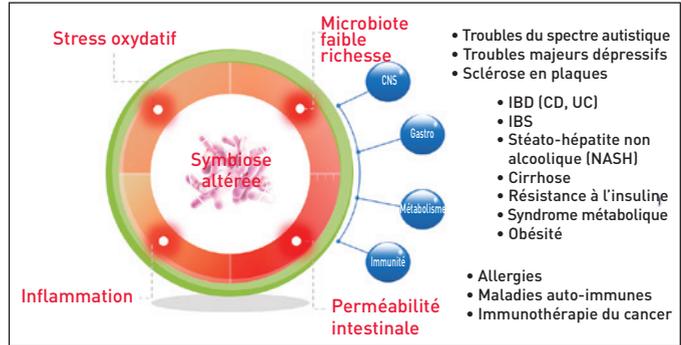


Figure 12

Altération du microbiote intestinal : la dysbiose vue comme une altération de la symbiose microbiotes-hôte.

Figure 13

Altération de la symbiose entre l'hôte et ses microbes illustrant les quatre « leviers » s'entretenant par causalités circulaires.



à minima, va être ce que l'on appelle une inflammation de bas-grade, d'un stress oxydatif<sup>7</sup> chronique.

On peut ainsi avoir une altération du microbiote qui est, même si c'est une conséquence, un facteur d'augmentation de la perméabilité intestinale ; les deux se combinent pour entraîner de l'inflammation qui elle-même va entraîner du stress oxydatif,

lequel va potentiellement altérer encore plus le microbiote intestinal.

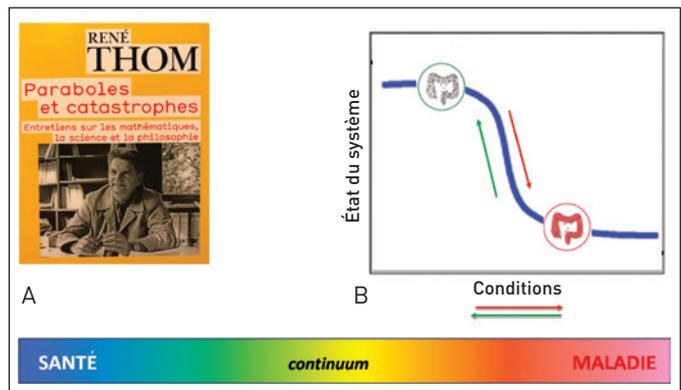
Dans ces conditions, pour la grande majorité, il n'existe pas de prévention ni de traitement aujourd'hui pour ce qui implique un cercle vicieux (Figure 13). Quand on a de telles causalités circulaires, il n'y a plus de continuum entre un état A initial de santé et un état B final de maladie, mais potentiellement une situation de rupture, le cercle vicieux entretenant un nouvel équilibre pathologique.

7. Stress oxydatif : dans l'organisme, des molécules liées à l'oxygène, appelées radicaux libres, sont très réactives et, bien que nécessaires à l'organisme, lorsqu'elles sont en excès et que les protecteurs antioxydants ne peuvent plus les contrôler, conduisent à un état de stress oxydatif : elles attaquent les constituants du vivant et favorisent les maladies chroniques.

Ce point est illustré par les travaux de René Thom (Figure 14A), un mathématicien français qui, en 1983, avait commencé à parler d'hystérésis : quand il existe un continuum (Figure 14B), on

Figure 14

Continuum entre deux états. On a un équilibre entre les états de santé et de maladie avec passage d'un état à un autre sous l'impact de conditions de stress avec une aptitude à revenir à l'état initial. C'est le cas le plus fréquent pour le microbiote lors d'un traitement d'antibiotiques. Ces comportements de systèmes complexes ont été transcrits dans *Paraboles et catastrophes*, entretiens sur les mathématiques, la science et la philosophie, René Thom (1983).



a finalement, sous l'impact de conditions de stress, une modification du système (flèche rouge) ; mais si on enlève les conditions de stress, on observe une résilience, c'est-à-dire l'aptitude du système à revenir à son état initial (flèche verte).

Mais en cas de causalités circulaires, on a une situation où il existe deux états d'équilibre, par exemple l'état de santé et l'état de maladie, mais où la bascule de l'état de santé vers l'état de maladie active le cercle vicieux, fait perdurer l'état de maladie.

Si le système est peu stressé, dans la plupart des cas la résilience reste possible, mais si le stress pousse le système (l'écosystème) au-delà de sa robustesse, il va potentiellement basculer dans l'état d'équilibre alternatif avec un cercle vicieux (Figure 15). Dans ce cas, la transition est comme une bille qui bascule d'une vallée vers une autre vallée, d'un attracteur vers un autre. Dans ces situations, le retour à l'état initial devient très compliqué, et, même si on élimine les conditions de stress qui ont conduit à cette

bascule, l'écosystème peut rester longtemps dans cet état perturbé, qui est peut-être l'état caractérisant un grand nombre de maladies chroniques aujourd'hui. Il faudra peut-être supprimer tous les stress possibles pour espérer repasser à un état de santé, et potentiellement pouvoir reconstruire complètement le système.

Cette discussion s'appuie sur les travaux de Marten Scheffer<sup>8</sup> sur la transition critique, concept qui s'applique à la fois dans des systèmes naturels (changements climatiques), mais aussi dans la société (crises économiques).

Dans le cas de l'altération de la symbiose hôte-microbiote, avec effectivement cette situation d'altération avec des causalités circulaires, le concept de la transition critique conduit à proposer l'existence d'au moins quatre leviers actionnables, à la fois pour le diagnostic, pour la prédiction, pour la prévention et pour la thérapie (Figure 16).

8. Scheffer M., Critical transition in nature and society (2009).

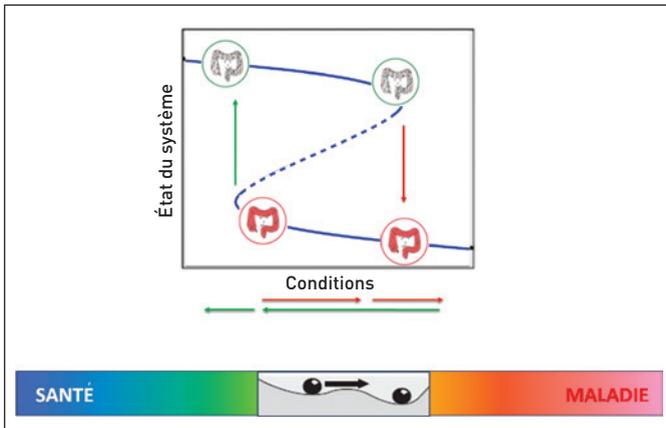
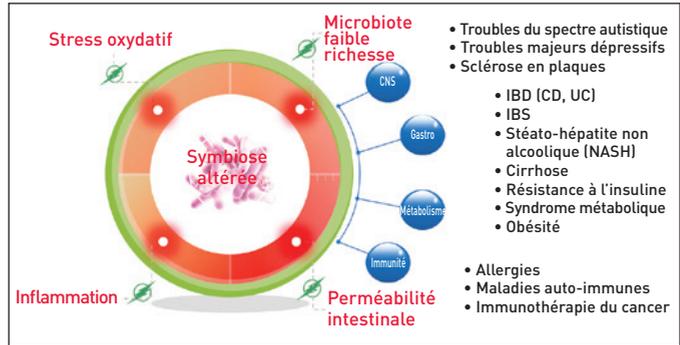


Figure 15

En réalité, on a un équilibre entre deux états : une situation de possible résilience (vert) et un état d'équilibre alternatif (rouge). Au-delà d'un seuil de stress défini par l'écosystème, le système bascule dans l'état d'équilibre alternatif.

Figure 16

Quatre domaines pour rétablir la symbiose hôte-microbes.



Aujourd'hui, la prévention s'intéresse principalement à la nutrition préventive via la modulation du microbiote intestinal, tandis que la thérapie et la médecine ciblent principalement la modulation de l'inflammation. On peut envisager des perspectives d'innovation assez importantes si l'on intègre cette vision plus globale du système pour gérer les altérations de la symbiose hôte-microbes.

#### 4 Altération de la symbiose hôte-microbes et implications translationnelles

Quatre domaines peuvent être identifiés comme cibles potentielles d'innovation liées au microbiote pour prévenir et soigner les altérations de la symbiose hôte-microbe (Figure 17).

#### 4.1. Stratification et monitoring par le microbiote

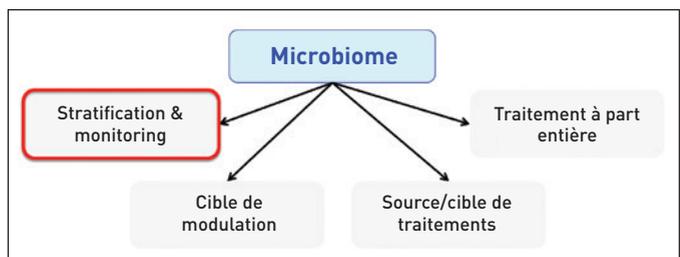
Le premier domaine concerne l'utilisation de la connaissance du microbiote pour aider à suivre et stratifier la population en fonction du microbiote intestinal. Revenons sur la courbe de distribution de la population en fonction de la richesse en gènes (Figure 18). La partie gauche concerne les populations de faible richesse en gènes (appelée *paucibiose*, *pauci* pour peu et *biose* pour vie), et la partie droite concerne les populations riches en gènes.

Si on sépare, au sein de ces populations, les individus obèses (courbe en orange) des individus non obèses (courbe en vert), on observe alors une distribution qui est vraiment bimodale, avec une zone de rupture entre les deux.

Il a été montré que la paucibiose est associée, dans

Figure 17

Quatre leviers sont actionnables dans l'altération de la symbiose hôte-microbes avec des causalités circulaires.



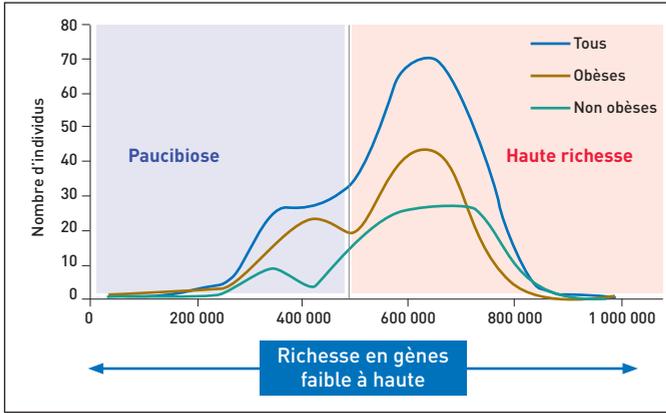


Figure 18

Distribution bimodale avec rupture du nombre d'individus en fonction de la richesse en gènes qui traduit la répartition de la population entre des individus avec une faible richesse en gènes, la paucibiose et d'autres individus qui ont un microbiote riche.

le contexte particulier du surpoids et de l'obésité, à des paramètres métaboliques de santé altérés comme le taux de cholestérol dans le sang, ou à des phénomènes inflammatoires. Cette population, dans le cas du surpoids et de l'obésité, ne répond pas à une restriction calorique et à un régime alimentaire qui a vocation à faire perdre du poids. De la même façon, c'est dans ce fragment de population, dans le contexte des maladies hépatiques graves, qu'on observe les conditions les plus sévères et celles qui progressent le plus rapidement.

On a également montré que dans l'immunothérapie du cancer par des molécules biologiques, la paucibiose peut être associée à une non-réponse au traitement. On voit donc que la paucibiose est un stratifiant important en termes de santé.

#### 4.2. Le microbiote comme cible de modulation

Le microbiote peut être une cible de modulation en thérapie. Prenons l'exemple d'une intervention nutritionnelle

chez les sujets en surpoids et obèses qui consistait à leur apporter un régime ne contenant que 1 500 kcal par jour, avec peu de graisse, un peu plus de protéines pour jouer sur la perception de satiété, une grande richesse et une grande diversité de fibres alimentaires. Il a été montré que les réponses de cette population, qu'on pouvait séparer au départ en microbiotes riches et microbiotes pauvres, évoluaient beaucoup : dans ce cas, la paucibiose peut être corrigée par le régime (Figure 19).

La CRP est un marqueur d'inflammation globale que l'on peut faire baisser beaucoup plus facilement chez les individus ayant un microbiote riche que chez les individus ayant un microbiote pauvre (Figure 20). La paucibiose est un prédicteur de non-réponse au régime alimentaire.

Mais on a aussi montré qu'avec le régime qui contenait une grande richesse et une grande diversité de fibres alimentaires, on est capable d'accroître la richesse du microbiote des individus qui au départ avaient un microbiote appauvri d'environ 25 %, et de

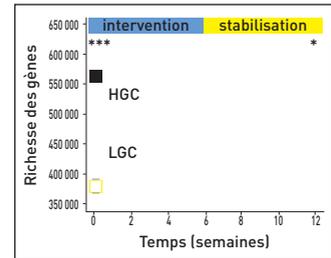


Figure 19

La paucibiose peut être corrigée par le régime alimentaire. HGC : microbiotes riches ; LGC : microbiotes pauvres.

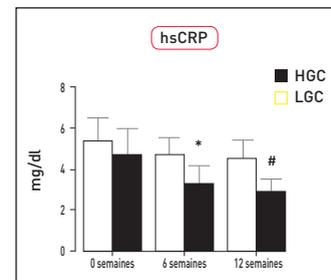


Figure 20

Réponse à un régime alimentaire riche en fibre : évolution de la CRP, marqueur d'inflammation en fonction du temps pour les microbiotes riches (HGC) et les microbiotes pauvres (LGC), traduisant une décroissance plus facile de ce marqueur pour les microbiotes riches. HGC : high gene count ; LGC : low gene count.

les amener presque au niveau des individus qui au départ avaient un microbiote riche. On peut ainsi espérer, ce faisant, les mettre dans une situation plus favorable pour répondre au régime alimentaire.

#### 4.3. Le microbiote comme source et cible de traitements

Le microbiote peut être une source ou/et une cible de traitements. On utilise les connaissances générées par la métagénomique pour étudier ce qu'on appelle le dialogue entre les bactéries et les cellules. Ce sujet a énormément été étudié pour caractériser l'interaction délétère entre les microbes pathogènes agresseurs et nos cellules.

Les études sont réalisées sur des cellules humaines cultivées dans des plaques de microfiltration. Ces systèmes cellulaires sont ensuite activés par une souche pathogène afin d'étudier le dérèglement du fonctionnement de la cellule (Figure 21).

Une approche analogue permet d'étudier la relation entre bactéries non pathogènes du microbiote dominant et systèmes cellulaires modèles. Dans ce cas, une fraction bactérienne est obtenue à partir d'échantillons intestinaux humains afin d'en extraire l'ADN (l'information métagénomique). L'ADN est découpé en morceaux de quarante à cinquante gènes, qui sont injectés dans un vecteur d'expression et introduits dans *Escherichia coli*, une bactérie très facile à cultiver au laboratoire. Ces bactéries, porteuses d'un bout de génome d'une bactérie intestinale, sont mises en contact avec les cellules humaines afin d'identifier les gènes et les molécules qui confèrent la bio-activité, en l'occurrence la possibilité de dialoguer avec nos cellules.

Ce type d'étude a permis d'explorer les mécanismes du dialogue qui concernent la modulation des défenses immunitaires mais aussi la prolifération cellulaire, la

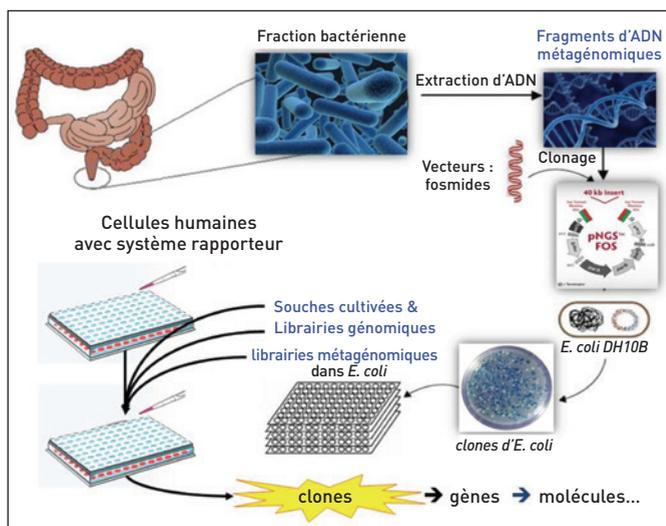


Figure 21

Processus expérimental de construction de banques métagénomiques et de reconnaissance des dialogues entre les bactéries et les cellules humaines.

différenciation cellulaire, la production du mucus au niveau intestinal, le métabolisme et notamment la fixation des graisses, ainsi que des signaux appelés endocrines, qui sont des signaux de la relation entre l'intestin et le cerveau.

Ces recherches sur la connaissance du dialogue entre les bactéries et les cellules vont avoir une pertinence dans les maladies inflammatoires, dans les cancers, dans les maladies métaboliques comme l'obésité-diabète, ainsi que dans les maladies neurodégénératives ou neuropsychiatriques.

#### 4.4. Le microbiote comme traitement à part entière

La caractérisation des micro-organismes intestinaux présentant un intérêt dans des fonctions telles que la modulation de l'immunité, l'inflammation, la perméabilité intestinale, a mis en évidence des espèces bactériennes particulièrement intéressantes. Leur bio-activité est bien documentée et un tout nouveau domaine de traitement propose aujourd'hui de les utiliser comme bio-thérapeutiques vivants, c'est-à-dire de les cultiver en masse, de les encapsuler dans des gélules pour les administrer aux patients.

Cette approche a conduit à la création d'un grand nombre de petites sociétés (Figure 22) qui se donnent comme objectif de tester ces bactéries dans des essais cliniques de phases 1, 2 et 3. Ces nouveaux médicaments contiennent des micro-organismes vivants dans les gélules qui, à travers le transit

<i>Bacteroides fragilis</i>	PSA	Mazmanian	-
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	MAM?	Sokol, Langella	Netbiotix
<i>Eubacterium hallii</i>	?	Nieuwdorp	Caelus
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Amuc_1100	Cani, de Vos	A-mansia
<i>Roseburia intestinalis</i>	flagellin	Kelly	4D Pharma
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	metabolism	Bernallier	" "
<i>Hafnia alvei</i>	clpb	Fetissof	Targedys
Mixed spore formers	?	Honda	Vedanta
Segmented filamentous bacteria	?	Cerf-Bensussan	-
<i>Christensenella spp</i>	?	Ley	LNC
...oncobiotics...	?	Zytvogel	EverImmune

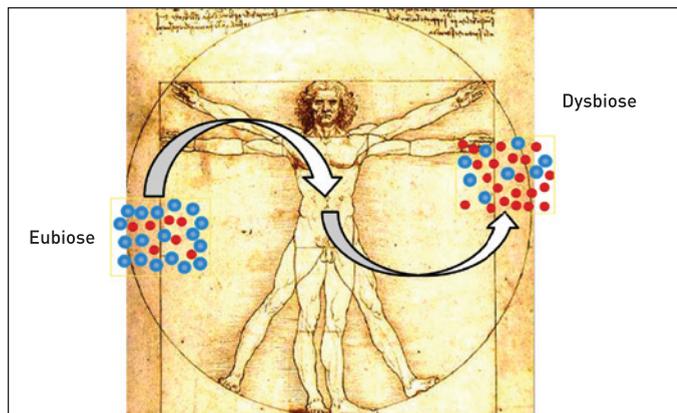
intestinal, vont se réactiver et vont potentiellement pouvoir s'installer dans l'intestin.

À l'extrême, si l'objectif est de remplacer un microbiote intestinal déséquilibré par celui d'un individu en bonne santé, l'ensemble de l'écosystème peut alors être utilisé comme médicament, c'est le transfert complet du microbiote intestinal, ce qu'on appelle la transplantation fécale (Figure 23).

Cela est pratiqué aujourd'hui quotidiennement dans un contexte particulier. Cette option thérapeutique est approuvée, reconnue par les agences réglementaires à

**Figure 22**

Liste de bactéries (genre et espèces) exprimant des fonctions bénéfiques, molécules actives parfois identifiées par les équipes scientifiques et sociétés qui travaillent sur les bactéries-médicaments issues du microbiote normal.



**Figure 23**

L'homme de Vitruve de Léonard de Vinci présenté ici pour illustrer le remplacement d'un microbiote en état de dysbiose par un microbiote en état d'eubiose.

travers le monde, pour une seule indication qu'on appelle l'infection récidivante à *Clostridium difficile*. *Clostridium difficile* est une bactérie pathogène qui, à l'hôpital, peut parfois s'implanter dans l'intestin d'un individu qui a été traité par exemple par un antibiotique et qui a un microbiote intestinal déséquilibré, ce qui ouvre une porte écologique pour le pathogène qui va dans ce cas s'implanter. La transplantation fécale est dans ce cas un traitement écologique pour une maladie écologique. Des chercheurs hollandais et américains ont montré que, par comparaison avec la Vancomycine, qui est le traitement standard, la transplantation fécale peut guérir, au sens d'éradiquer le pathogène, beaucoup plus efficacement. Plus de 80 % de succès sont obtenus avec un seul

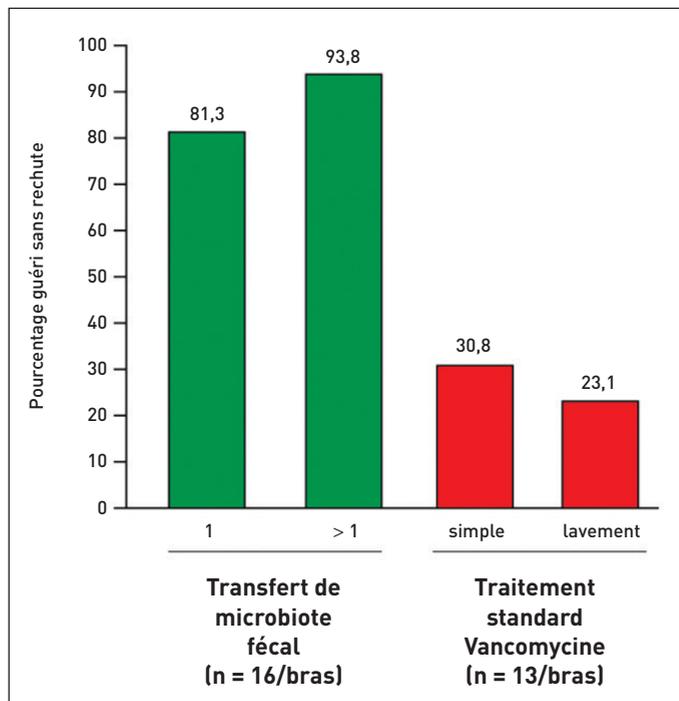
transfert de microbiote et on atteint plus de 90 % de succès quand on en fait un deuxième ou un troisième, alors que la Vancomycine donne au mieux une éradication chez 30 % des patients (Figure 24).

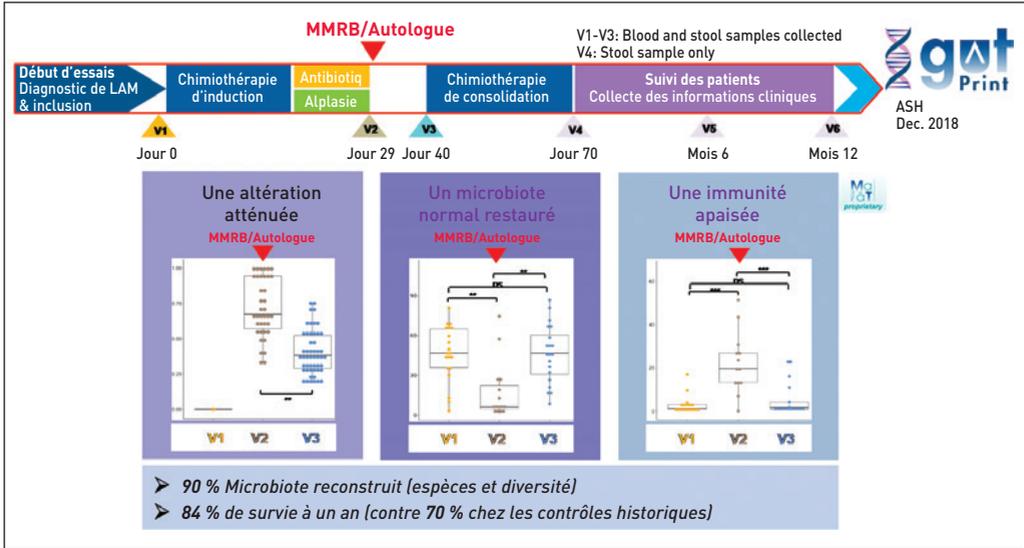
L'effet d'un transfert autologue de microbiote (où le patient est son propre donneur) a été étudié par la Société Maat Pharma sur vingt-cinq patients atteints de leucémie aiguë myéloïde. Un échantillon de selles est prélevé sur le patient au moment du diagnostic, avant le traitement par chimiothérapie. Cet échantillon est conditionné, congelé à -80 °C puis réadministré au patient après les premières phases de traitement. Le microbiote est caractérisé avant le prélèvement, puis après le traitement de chimiothérapie, et enfin dix jours après la réadministration (Figure 25).

Figure 24

Histogramme comparant le pourcentage d'éradication du pathogène pour les méthodes de transfert de microbiote fécal et de traitement standard par Vancomycine.

Source : d'après van Nood [2013].  
New England Journal of Medicine.





On voit que le microbiote intestinal est considérablement altéré par le traitement, chimiothérapie et antibiotiques, puis reconstruit à près de 90 % au niveau des espèces et de la diversité. Les composantes du microbiote normal les plus partagées dans la population humaine sont fortement diminuées mais peuvent être

réimplantées complètement à l'identique.

Dans le même temps, l'orage inflammatoire faisant suite au traitement disparaît. Sur ce petit nombre de patients, la survie à un an est améliorée et passe de 70 à 84 %. Bien que ce chiffre n'ait pas une grande valeur statistique, ce traitement présente néanmoins un potentiel thérapeutique intéressant.

**Figure 25**

*Biothérapie Maat Pharma de restauration du microbiote : preuve du concept dans la leucémie myéloïde aiguë.*

## Symbiose et santé : les messages de vos microbiotes

Le microbiote est personnel, il est assez stable au fil du temps, et c'est donc une source de biomarqueurs intéressants. La faible richesse en gènes et en espèces du microbiote est vraiment un marqueur récurrent des pathologies immunes dont l'incidence augmente depuis soixante ans. Le microbiote peut fournir des signatures de risques de maladies, d'aggravations ou de réponses ou de non réponses à un traitement nutritionnel ou à un traitement de

thérapie, par exemple dans le cancer.

La valorisation des signatures (cliniques/population générale) exigerait :

- un processus complètement standardisé pour le rendre opérationnel ;
- un support numérique sécurisé, validé au plan éthique et réglementaire ;
- l'inscription dans un processus de remboursement.

Le suivi à envisager à terme est celui de la symbiose. Aujourd'hui on est capable de photographier le microbiote intestinal de façon très fine, mais on n'a pas encore développé tous les outils pour caractériser pleinement la symbiose. Caractériser finement l'état de l'immunité est compliqué et pas encore complètement établi.

La nutrition est un levier majeur à travers notamment le végétal, les fibres alimentaires, les polyphénols, et aussi à travers les microbes vivants qu'on ingère, et ce sont des bioactifs stratégiques pour à la fois maintenir, préserver, ou quand elle a été dérégulée, restaurer la symbiose entre l'hôte et ses microbes.

# Partie 3

Vecteurs d'innovation  
industrielle



# Immunoconjugués cytotoxiques, anticorps « armés » contre le cancer

Marie-Priscille Brun est responsable du groupe Immunoconjugués au sein de la plateforme Integrated Drug Discovery chez Sanofi R&D.

## 1 Les immunoconjugués, une réalité thérapeutique

Les immunoconjugués cytotoxiques sont des anticorps armés pour combattre le cancer. Ils sont une réalité thérapeutique pour un certain nombre de patients : cinq ont été approuvés sur le marché, dont quatre sont dédiés aux tumeurs liquides, que ce soit des leucémies<sup>2</sup> ou des lymphomes<sup>3</sup>, et un au cancer

du sein (*Figure 1*). Ce dernier immunoconjugué est la combinaison du trastuzumab avec l'emtansine, une drogue de chimiothérapie (voir le *Chapitre de J.-P. Armand* dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020).

Aujourd'hui la recherche est très active dans ce domaine avec plus de quatre-vingts produits en développement clinique autour de plus de 600 essais cliniques. Cinq de ces produits sont dans des phases très avancées de pré-enregistrement, et on espère que davantage arriveront sur le marché pour les patients.

1. [www.sanofi.com/fr](http://www.sanofi.com/fr)

2. Leucémie : cancer du sang.

3. Lymphome : cancer qui touche les globules blancs.



Figure 1

Les immunoconjugués sur le marché en novembre 2019.

### 1.1. Définition d'un immunoconjugué

Un immunoconjugué (en anglais *antibody-drug-conjugate*, ADC) est une molécule complexe qui résulte de la conjugaison (accrochage) entre un anticorps et un agent cytotoxique par le biais d'un « agent de liaison » (espaceur, « linker » en anglais) (Figure 2). L'agent cytotoxique (*cyto*, cellule en grec) est une molécule tueuse de cellules.

Les immunoconjugués cytotoxiques utilisent des molécules très puissantes : 100 à 1 000 plus puissantes que le Taxotère® (voir le **Chapitre J. Cossy** dans *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020). Ces molécules ne sont pas utilisables en tant que telles en chimiothérapie car elles sont beaucoup trop toxiques. En revanche, les conjuguer à un anticorps qui cible un antigène de surface spécifique de la tumeur permet de faire une chimiothérapie ciblée à la tumeur, et

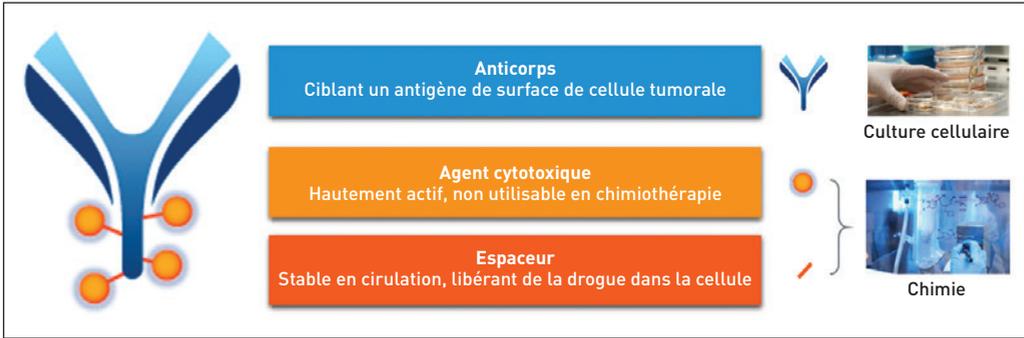
ainsi d'utiliser ce type d'agent cytotoxique en clinique.

Un paramètre important pour ces immunoconjugués est le nombre de molécules cytotoxiques que l'on conjugue par anticorps et qui définit ce qu'on appelle le DAR, « *drug-to-antibody ratio* ».

Les immunoconjugués sont des molécules complexes. Les anticorps sont produits par culture cellulaire. L'agent cytotoxique et l'agent de liaison, puis le produit d'assemblage entre l'espaceur et l'agent cytotoxique, sont produits par la chimie organique de synthèse. Il s'agit ensuite de conjuguer cette entité chimique sur l'anticorps. L'immunoconjugué est donc obtenu par mariage de la petite molécule chimique avec la grosse molécule biologique.

### 1.2. Mode d'action d'un immunoconjugué

Ce type de molécule, administré par injection intraveineuse,



circule dans le sang. À l'approche de la tumeur, l'ADC reconnaît l'antigène de surface de la tumeur qu'il cible. Il se fixe à l'antigène pour former un complexe immunoconjugé-antigène, qui peut alors être internalisé par la cellule, c'est-à-dire qu'il pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose<sup>4</sup>, et forme une vésicule<sup>5</sup>. Cette vésicule subit ensuite différents processus intracellulaires, entre autres l'acidification, la fusion avec des vésicules contenant des enzymes protéolytiques<sup>6</sup>, la dernière étape étant la formation du lysosome<sup>7</sup>, où l'anticorps est dégradé et la molécule active libérée soit par la dégradation de l'anticorps, soit parce que l'agent de liaison est clivable. Dans tous les cas, la molécule cytotoxique libérée peut alors atteindre sa cible dans la cellule cancéreuse, que ce soit la

4. Endocytose : mécanisme qui permet à des molécules de pénétrer dans certains types de cellules.

5. Vésicule : cavité, petit sac membraneux.

6. Enzyme protéolytique : enzyme brisant les liaisons des protéines.

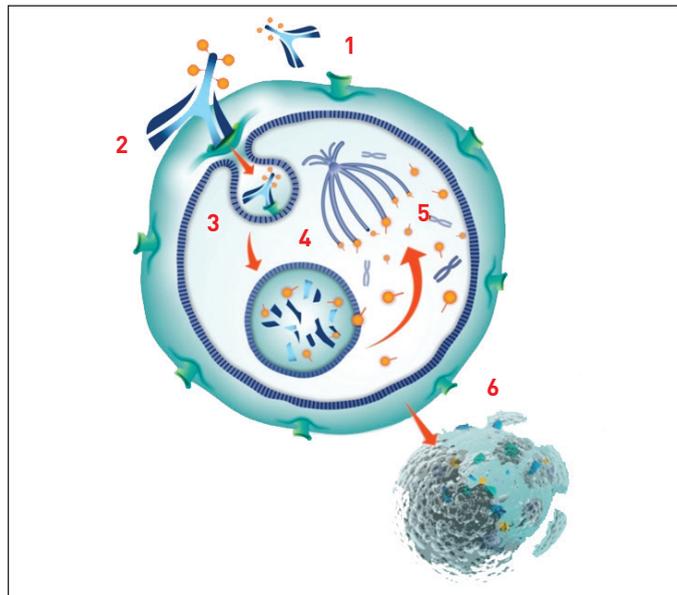
7. Lysosome : organelle cellulaire contenant des enzymes qui dégradent la plupart des molécules biologiques.

tubuline<sup>8</sup> (dans l'exemple de la **Figure 3**) ou l'ADN. Une fois

8. Tubuline : protéine structurale des microtubules, un constituant majeur du cytosquelette. Celui-ci est le squelette filamentueux (ensemble de polymères) formé dans le cytoplasme, qui est la partie située entre le noyau et la membrane de la cellule, dont le rôle est de contrôler la forme des cellules.

**Figure 2**

*L'immunoconjugé est l'association d'un anticorps et d'un cytotoxique par le biais d'un agent de liaison (« espaceur »).*



**Figure 3**

*Les étapes du fonctionnement de l'immunoconjugé : 1) fixation sur l'antigène de surface ; 2) et 3) endocytose ; 4) dégradation à l'intérieur du lysosome formé ; 5) rupture de l'agent de liaison et libération de la molécule cytotoxique qui cible la tubuline ; 6) mort de la cellule cancéreuse.*

la cible atteinte, la molécule exerce son activité pharmacologique et induit la mort de la cellule tumorale.

Le but de cette approche « immunoconjugués » est d'améliorer la fenêtre thérapeutique de la chimiothérapie (Figure 4). La chimiothérapie présente une fenêtre thérapeutique étroite définie par le ratio entre la dose maximale tolérée et la dose minimale active, et, le plus souvent, ces deux doses sont très proches. L'approche « immunoconjugués » permet non seulement d'augmenter la dose maximale tolérée en diminuant la toxicité *via* le ciblage de la tumeur par l'anticorps, mais aussi d'augmenter l'efficacité par une distribution optimale de molécules cytotoxiques très actives dans la tumeur.

## 2 Optimisation d'un immunoconjugué cytotoxique

Pour optimiser l'efficacité d'un immunoconjugué, on peut agir sur les trois de ses composantes, mais également sur l'antigène tumoral (Figure 5). L'optimisation de ce type de composé est complexe.

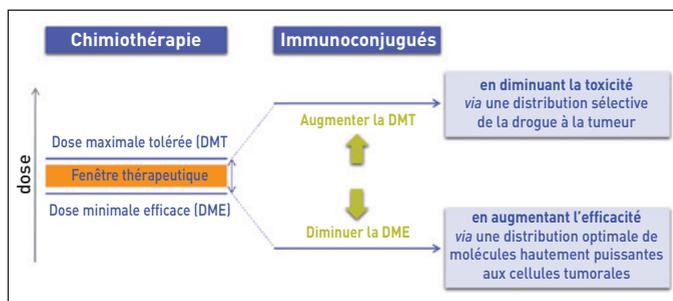
L'antigène tumoral, protéine de surface de la cellule tumorale que va reconnaître

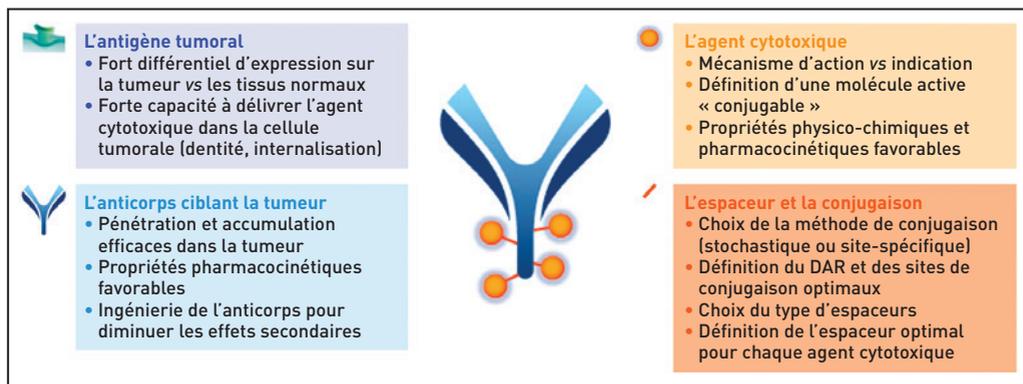
l'anticorps, doit être le plus fortement exprimé possible sur la tumeur avec une expression moindre dans les tissus normaux. Idéalement, on aimerait avoir un anticorps qui soit spécifique de la tumeur, mais ce type d'antigène est rarissime, en particulier dans le cas du cancer, et on a plutôt un antigène qui est surexprimé sur la tumeur par rapport aux tissus normaux ; il faut donc chercher un antigène qui ait le différentiel le plus important possible. L'antigène doit aussi avoir la capacité d'internaliser de façon efficace le cytotoxique à l'intérieur de la cellule cancéreuse.

L'anticorps est responsable de la distribution de la molécule à la tumeur, donc de la pénétration et de l'accumulation du cytotoxique dans la tumeur. Du fait de la taille de ce type de molécule, l'anticorps influence la pharmacocinétique de la molécule, c'est-à-dire, entre autres, sa durée de vie et sa distribution dans l'organisme. Par ailleurs, il est possible, grâce aux progrès importants réalisés ces dernières années en ingénierie des protéines, de modifier de façon spécifique cet anticorps pour conférer à l'immunoconjugué des propriétés telles que ses effets secondaires soient diminués.

Figure 4

L'utilisation d'immunoconjugués permet de diminuer la toxicité tout en augmentant l'efficacité du traitement.





Les propriétés des anticorps relevant davantage du domaine de la biologie et de la biotechnologie, focalisons-nous sur l'optimisation chimique du système, c'est-à-dire sur l'agent cytotoxique, sur l'agent de liaison et sur la conjugaison des molécules. L'objectif de cette optimisation multiparamétrique est de maximiser l'index thérapeutique de ce type de composé.

### 2.1. Les types d'agents cytotoxiques et les paramètres d'optimisation

Cette approche nécessite l'utilisation de molécules cytotoxiques très puissantes. Au début du développement des immunoconjugués, ont été conjuguées des molécules de chimiothérapie classique, qui en fait n'étaient pas suffisamment puissantes pour avoir

une efficacité clinique. On utilise maintenant des molécules actives à des concentrations de l'ordre du picomolaire ( $10^{-12}$  moles par litre), soit mille fois plus actives que le Taxotère®.

La connaissance du mécanisme d'action de la molécule est très importante pour optimiser l'efficacité (Figure 6). Comme pour une petite molécule cytotoxique classique, il faut optimiser les propriétés physico-chimiques, à savoir les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisation<sup>9</sup> et d'excrétion. La molécule doit pouvoir être conjuguée avec l'anticorps, donc il faut pouvoir introduire,

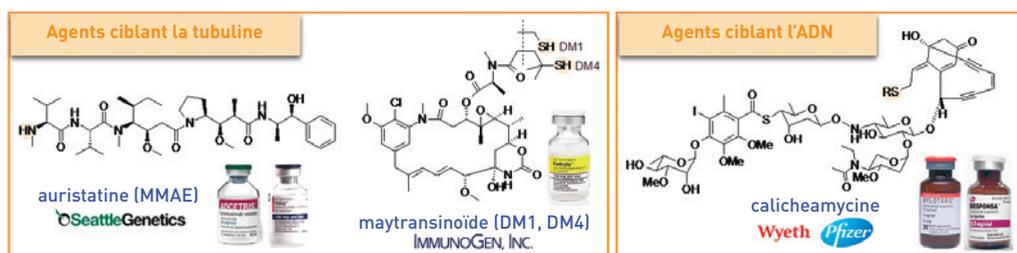
9. Métabolisation : transformation biochimique dans le cadre du métabolisme, c'est-à-dire processus de dégradation et de synthèse organique chez l'être vivant.

Figure 5

Les paramètres d'optimisation des immunoconjugués.

Figure 6

Exemples d'agents cytotoxiques composant des immunoconjugués sur le marché.



à un endroit sur la molécule, un agent de liaison (espaceur) qui permettra ensuite de libérer la molécule active dans la cellule.

Enfin, il faut que la synthèse chimique de tout cet ensemble soit relativement aisée. Les composés qui sont utilisés sont dans une très grande majorité, voire quasiment à 100 %, des molécules dérivées de produits naturels (voir le *Chapitre de J. Cossy* dans *Chimie et nouvelles thérapies*).

Pour les cinq produits sur le marché en novembre 2019, les agents cytotoxiques se divisent en deux grands mécanismes d'action (*Figure 6*) :

- les agents qui ciblent la tubuline : la tubuline est l'un des constituants du cytosquelette de la cellule qui intervient au moment de la division cellulaire et sur laquelle les chromosomes vont aller se positionner pour être répartis entre les deux cellules filles ;
- les agents qui ciblent l'ADN, composant vital pour toute cellule.

On trouve, dans la famille des agents ciblant la tubuline,

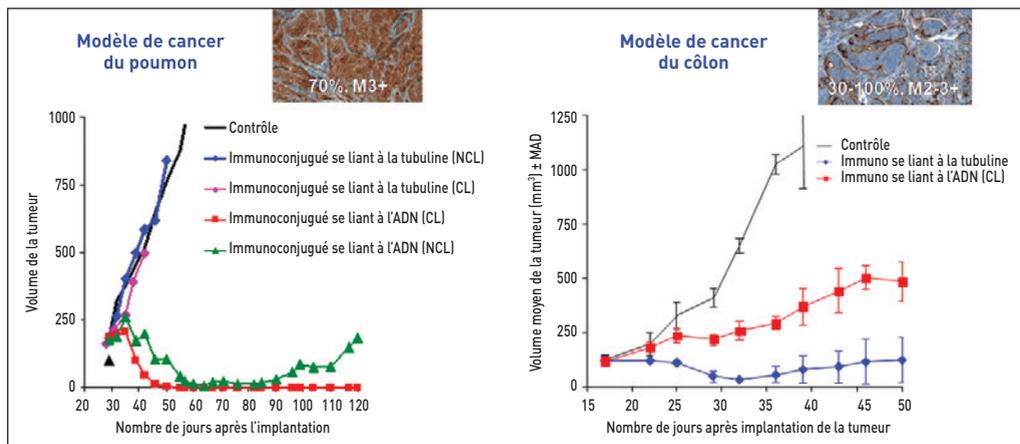
l'auristatine (MMAE) et les maytansinoïdes (DM1, DM4), dérivés du maytansinol. Comme agent ciblant l'ADN, citons la calichéamicine. De nombreux autres cytotoxiques ont été développés, qui ciblent la tubuline ou l'ADN, ou présentent d'autres mécanismes d'action.

Chez Sanofi, nous avons commencé à travailler dans le domaine des ADC en collaboration avec ImmunoGen, Inc., et nous avons démarré la phase clinique 3 d'un ADC au premier trimestre 2020, avec le DM4. Nous avons également développé, en interne, nos propres cytotoxiques, un agent ciblant la tubuline et un agent ciblant l'ADN que nous utilisons désormais dans nos projets de recherche.

Selon le type de cancer, l'efficacité de l'ADC dépend du mécanisme d'action de l'agent cytotoxique qui le compose. Sur la *Figure 7* sont représentées des données d'efficacité préclinique observées chez la souris dans un modèle du cancer du poumon et dans un modèle du cancer du côlon. Dans les deux cas, ont été

**Figure 7**

Données d'efficacité de deux immunoconjugués dans deux modèles de cancers différents.



testés des ADC composés du même anticorps conjugué soit à un agent ciblant la tubuline, soit à un agent ciblant l'ADN. On voit que dans le cas du cancer du poumon, seuls les immunoconjugés avec un agent ciblant l'ADN sont actifs. Dans le cadre du cancer du côlon, c'est l'ADC avec un agent ciblant la tubuline qui se révèle être le plus puissant. Il a été montré, dans le **Chapitre de J.-P. Armand** (dans *Chimie et nouvelles thérapies*), qu'en fonction de leur mécanisme d'action, les agents de chimiothérapie ne sont pas actifs de la même façon dans toutes les indications, et c'est vrai aussi dans le cas des immunoconjugés.

## 2.2. Optimisation de l'agent de liaison

La nature de l'agent de liaison va définir la structure de la molécule active qui sera libérée dans la cellule. La **Figure 8** montre l'exemple de la monométhylauristatine E (MMAE). Il s'agit d'un agent antiméiotique qui inhibe la division cellulaire en bloquant la polymérisation de la tubuline. L'agent de liaison à l'anticorps monoclonal est dans ce cas peptidique. Il est stable en circulation mais clivé après internalisation

dans les cellules par une enzyme présente dans les lysosomes, la cathepsine (qui reconnaît le motif entouré en bleu sur la **Figure 8**). Comme décrit sur la **Figure 9**, après clivage par l'enzyme, l'espaceur *para*-aminobenzylcarbamate (entouré en vert sur la **Figure 8**) subit une élimination intramoléculaire pour relarguer la monométhylauristatine E (MMAE, entourée en rouge sur la **Figure 8**).

Deux autres types d'agents de liaison clivables sont également utilisés, que l'on retrouve par exemple dans les immunoconjugés avec la calichémine, antibiotique antitumoral qui a été testé sur les hémopathies myéloïdes :

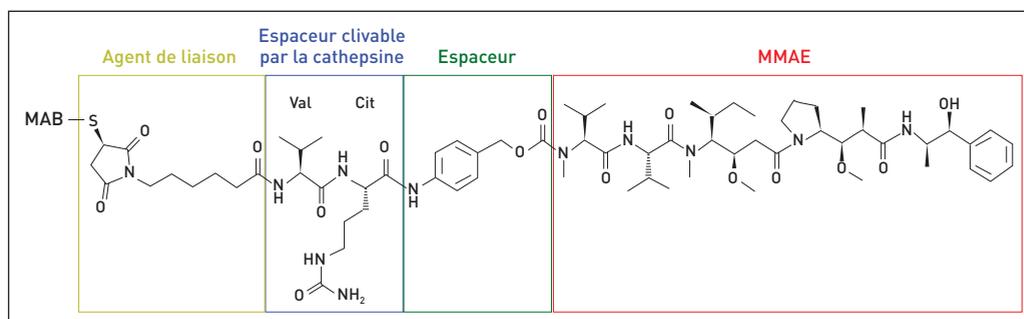
- le premier motif clivable est du type hydrazide<sup>10</sup>, sensible au pH. Cette sensibilité va permettre le clivage dans l'endosome<sup>11</sup>, c'est-à-dire la

10. Fonction hydrazide : une liaison simple azote-azote (hydrazine) avec quatre substituants, l'un d'eux étant un groupe acyle -COR.

11. Endosomes : sous-compartiments de la cellule, ou organites (organelles), sur lesquels les vésicules d'endocytose s'accrochent et fusionnent pour relarguer leur contenu (les molécules qui étaient à la surface de la cellule et qui ont été internalisées à l'intérieur d'une vésicule d'endocytose).

**Figure 8**

Structure d'un immunoconjugé anticorps (MAB)-MMAE. La partie de l'agent de liaison composé des acides aminés valine (Val) et citrulline (Cit) est clivée par la cathepsine à l'intérieur des cellules tumorales.



première petite vésicule formée après l'internalisation de la molécule dans la cellule ;

- le deuxième motif clivable est une liaison disulfure<sup>12</sup>, qui va être réduite dans le cytoplasme de la cellule pour y libérer le dérivé de calichéamicine, qui agit ensuite sur l'ADN.

Sont également utilisés des agents de liaison non clivables du fait de leur nature chimique, comme par exemple dans les immunoconjugués avec le maytansinoïde DM1. Il n'y a pas de motif entre l'anticorps et la molécule cytotoxique qui puisse être clivé, que ce soit par une enzyme ou par des conditions physiologiques. En revanche, dans le lysosome, la partie anticorps va être dégradée par les protéases et va finir par libérer l'ensemble agent cytotoxique, espaceur et acide aminé sur lequel l'agent cytotoxique a été conjugué (**Figure 9**). Dans ce cadre, il se forme un métabolite avec un

acide aminé, donc zwitterionique<sup>13</sup>. Ce type de molécule passe difficilement les membranes et il lui est difficile par exemple de sortir de la cellule dans laquelle il a été internalisé pour être actif sur les cellules voisines, contrairement au dérivé MMAE beaucoup plus polaire, qui, lui, sera capable de sortir de la cellule pour entrer dans une cellule voisine et exercer son activité toxique à distance.

Le type d'agent de liaison et le mécanisme de dégradation peuvent se traduire par une différence d'efficacité *in vivo* des conjugués. La **Figure 10** présente des données obtenues à partir d'immunoconjugués réalisés avec le même anticorps, le même cytotoxique, ils ne diffèrent que par la nature de l'agent de liaison.

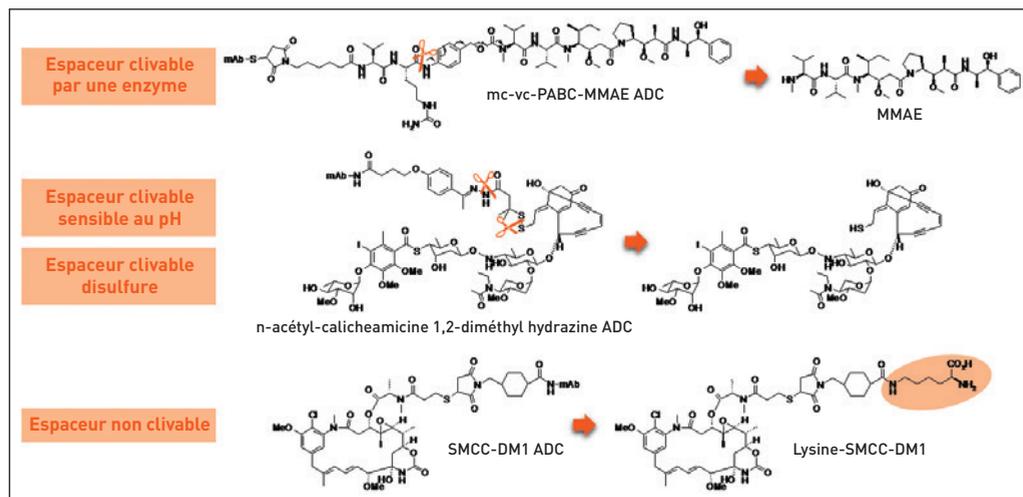
Un agent de liaison non clivable, que ce soit à la dose de 0,3 mg/kg ou de 0,6 mg/kg, n'est pas efficace, seul un

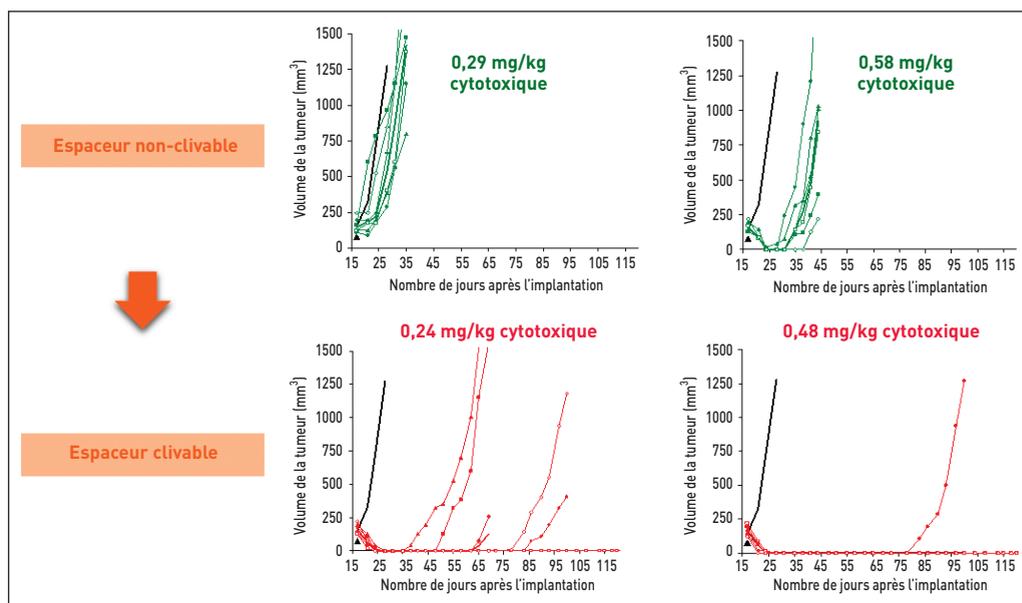
**Figure 9**

Les différents types d'agents de liaison et leur mode de clivage pour libérer la molécule cytotoxique.

12. Liaison disulfure : liaison simple entre deux atomes de soufre, -S-S-.

13. Zwitterionique : ion qui comporte une charge positive et une charge négative.




**Figure 10**

La nature de l'agent de liaison joue un rôle critique sur l'efficacité cytotoxique *in vivo* des immunoconjugués.

léger retard de croissance des cellules cancéreuses est observé à la plus forte dose.

Quand l'agent de liaison non clivable est remplacé pour un agent de liaison clivable, les deux doses induisent des régressions importantes de la tumeur, encore plus flagrantes avec la dose la plus forte. La nature chimique de l'agent de liaison joue donc un rôle critique dans l'activité *in vivo* des molécules.

### 2.3. Les méthodes de conjugaison

Les méthodes historiques et conventionnelles consistent à conjuguer les cytotoxiques sur les acides aminés présents à l'état naturel sur les anticorps. Ces acides aminés naturels sont de deux types :

- les lysines, qui portent une amine primaire sur leur chaîne latérale (Figure 11), sont nombreuses et accessibles à la

surface d'un anticorps (étoiles rouges de la Figure 11), donc on peut aisément les conjuguer.

- les cystéines, qui proviennent de ponts disulfure (-S-S-) formés entre les différentes chaînes de l'anticorps, peuvent être réduites pour générer une fonction thiol (-SH), que l'on peut utiliser pour la conjugaison.

Dans les deux cas, l'immunoconjugué est un mélange d'espèces, et le nombre de molécules cytotoxiques greffées par anticorps, ou DAR, (« drug-to-antibody ratio », drugs/Ab de la Figure 10), est une moyenne. Dans le cas des lysines, pour un DAR moyen de 4, on observe une répartition gaussienne avec des DAR allant de 0 à 9. Dans le cas des cystéines provenant des ponts disulfure naturels, l'hétérogénéité du mélange est plus faible dans la mesure où il n'y a que quatre ponts disulfure qui peuvent être réduits.

Depuis quelques années, avec le développement de l'ingénierie des protéines, on a évolué vers des conjugaisons sur des sites spécifiques. Sur le bas de la **Figure 11**, est représentée

une conjugaison avec un DAR de 2 quasiment exclusif qui permet d'avoir un produit homogène, une caractérisation analytique facilitée, et aussi de pouvoir moduler plus aisément

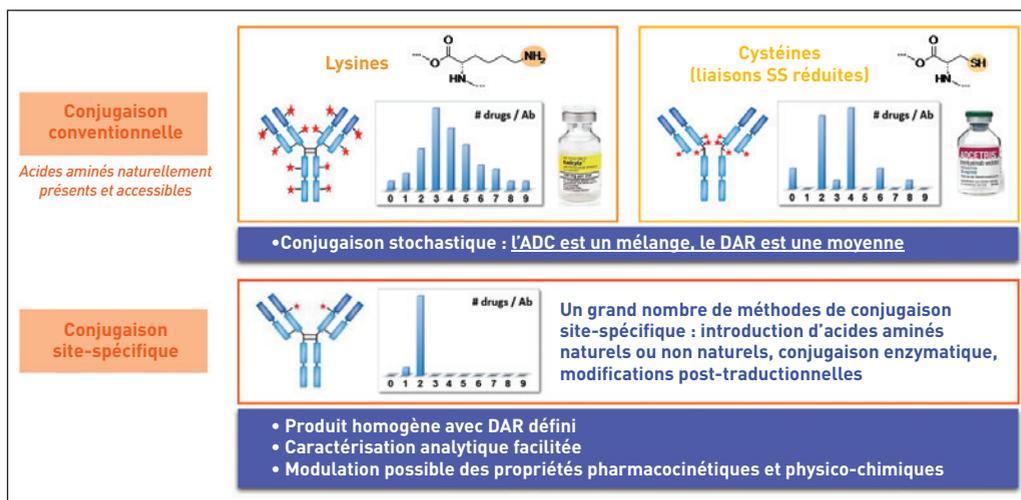


Figure 11

Méthodes de conjugaison et influence du site de conjugaison sur la stabilité et l'efficacité de l'immunoconjugé.

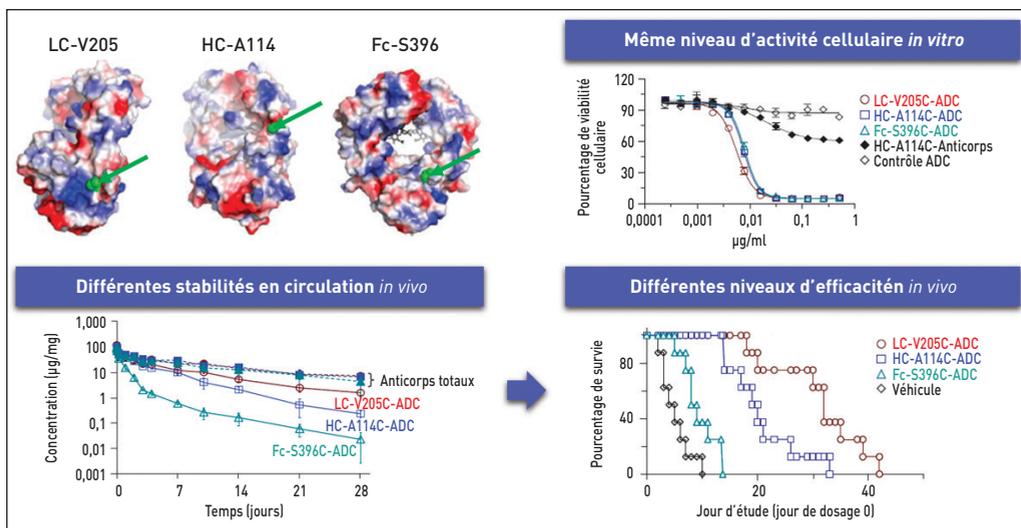


Figure 12

Le site de conjugaison a une influence importante sur la stabilité et l'efficacité de l'immunoconjugé.

Source : Shen B.-Q. et coll. (2012). Nat Biotechnology, 30 :184.

les propriétés pharmacocinétiques et physico-chimiques de la molécule.

Non seulement le type de conjugaison est important, mais aussi la position où cette conjugaison est réalisée. Sur la **Figure 12** sont comparés trois ADC avec trois sites de conjugaison spécifiques différents indiqués en vert, toutes choses égales par ailleurs (anticorps, agent

cytotoxique, agent de liaison, chimie de conjugaison et DAR). *In vitro*, sur un modèle cellulaire, on ne voit pas de différence en termes d'activité entre les trois molécules. La différence est observée quand on passe *in vivo* à la fois en termes de stabilité en circulation et en termes d'efficacité : la molécule la plus stable (en rouge) s'avère être la molécule la plus efficace.

## L'avenir des immunoconjugués cytotoxiques

Les immunoconjugués cytotoxiques sont aujourd'hui une réalité thérapeutique pour les patients atteints de certains cancers. La fenêtre thérapeutique est clairement le paramètre clé à optimiser et maximiser pour atteindre le succès en clinique, c'est-à-dire atteindre l'efficacité avant la toxicité. Ces molécules complexes résultent d'une combinaison unique entre biotechnologie et chimie. Leur optimisation est multiparamétrique au niveau de leurs différents composants : l'anticorps, l'agent cytotoxique, l'agent de liaison et la conjugaison. Le développement de ces nouveaux médicaments demande un travail d'équipe pluridisciplinaire.



# Développement d'un immunokonjugé cytotoxique ciblant le récepteur de l'IGF-1

Jean-François Haeuw travaille au Centre d'immunologie<sup>1</sup> des Laboratoires Pierre Fabre situé à proximité de la frontière suisse.

La **Figure 1** représente le site de Saint-Julien-en-Genevois des Laboratoires Pierre Fabre, situé dans la vallée genevoise.

## 1 Présentation du récepteur du facteur de croissance IGF-1

### 1.1. Un récepteur membranaire

Le récepteur de l'IGF-1 est un récepteur du facteur de croissance IGF-1, ou « *Insulin-like*

*Growth Factor 1* » ; on parle aussi de l'IGF-1 récepteur, IGF-1R. Il appartient à la même famille que le récepteur de l'insuline<sup>2</sup> (**Figure 2**), avec lequel il partage une forte homologie (environ 60 %). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface de certaines cellules des épithéliums glandulaires.

2. Insuline : hormone protéique sécrétée dans le pancréas et favorisant l'absorption du glucose (sucre) dans le sang vers les cellules du corps.

1. [www.cjpf.com](http://www.cjpf.com)

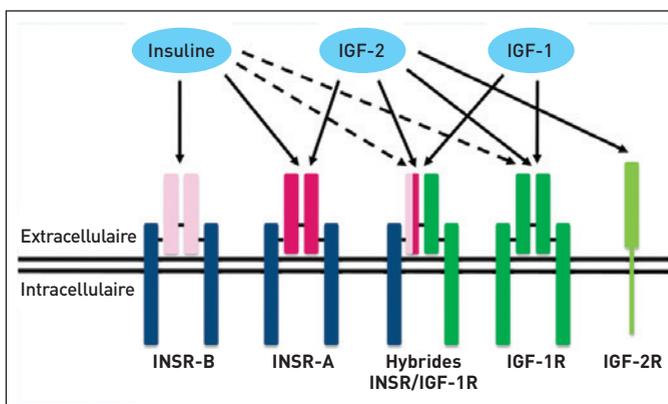


Figure 1

Site R&D du Centre d'Immunologie Pierre Fabre (CIPF) à Saint-Julien-en-Genevois. À droite, le bâtiment de recherche et développement, à gauche, l'unité de production pour les études cliniques.

Figure 2

La famille des récepteurs membranaires des facteurs de croissance : insuline, IGF-1 et IGF-2. Les récepteurs de l'insuline (INSR-A et B) et de l'IGF-1 (IGF-1R) sont des hétérotétramères, tandis que le récepteur de l'IGF-2 (IGF-2R) est un monomère. Les récepteurs hybrides sont constitués d'hétérodimères INSR/IGF-1R.



L'IGF-1R est un tétramère<sup>3</sup> formé de deux sous-unités alpha extracellulaires et deux sous-unités bêta, qui sont en

partie intracellulaires et possèdent un domaine tyrosine kinase<sup>4</sup>. Il peut fixer les ligands

3. Tétramère : polymère composé de quatre sous-unités d'oligomères (petits polymères).

4. Tyrosine kinase : enzyme agissant comme « interrupteur » d'activation/désactivation de nombreuses fonctions cellulaires.

IGF-1 et IGF-2, mais l'affinité de l'IGF-1 est quinze à vingt fois plus forte que celle de l'IGF-2.

### 1.2. Un acteur de la croissance cellulaire

L'IGF-1R est généralement considéré comme un récepteur contrôlant la croissance cellulaire, alors que l'IR est plutôt considéré comme un récepteur contrôlant le métabolisme énergétique. La liaison de l'IGF-1 à son récepteur induit à l'intérieur de la cellule une cascade de signalisations conduisant à la croissance, à la différenciation cellulaire et finalement à la survie cellulaire (Figure 3). La fixation du ligand provoque l'auto-phosphorylation du domaine tyrosine kinase sur certains résidus tyrosine, ce qui stimule l'activité tyrosine kinase envers certains substrats ou adaptateurs protéiques (Shc et IRS). La transduction du signal active ensuite les voies

intracellulaires des MAP-kinases (MEK, ERK) et de la PI3-kinase (AKT, mTOR). Ces mécanismes sont utiles pour la croissance des cellules normales, mais particulièrement appréciés des cellules tumorales pour leur permettre notamment de se multiplier au sein de la tumeur. Chez l'homme, l'IGF-1R est essentiel pour le développement de l'embryon et possède aussi d'importantes fonctions chez l'adulte.

Au niveau de la tumeur, l'IGF-1R est impliqué dans les phénomènes de tumorigenèse<sup>5</sup>, d'angiogenèse<sup>6</sup> et de métastase<sup>7</sup> ; il joue aussi un rôle

5. Tumorigenèse : étapes de formation de tumeurs.

6. Angiogenèse : processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà existants.

7. Métastase : expansion de la tumeur cancéreuse dans une autre partie du corps par migration de cellules tumorales par voie sanguine.

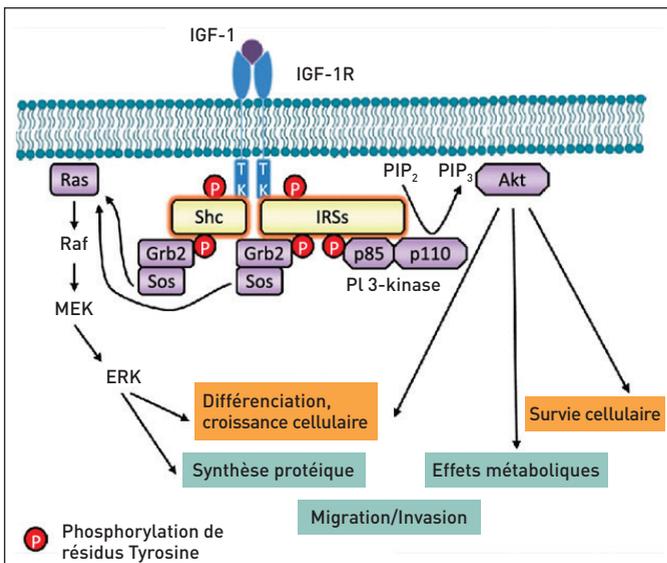


Figure 3

Schéma des mécanismes intracellulaires impliquant l'IGF-1 et l'IGF-1R.

contre l'apoptose<sup>8</sup> dans les cellules tumorales.

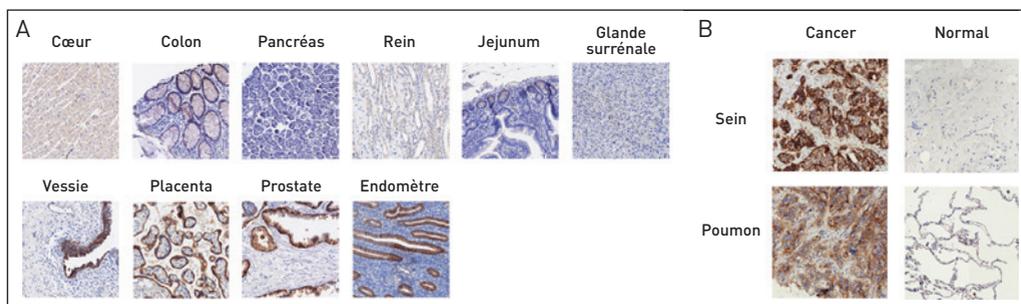
### 1.3. Pourquoi cibler l'IGF-1R ?

Quatre raisons ont motivé l'équipe du CIPF à cibler ce récepteur et à développer une approche de type immunoconjugué cytotoxique :

- l'IGF-1R est associé à la tumorigenèse, à la métastase et à la résistance à certains traitements anticancéreux ;
- une expression différentielle de ce récepteur, entre les tissus normaux et les tissus tumoraux, est observée dans de nombreux types de cancers, incluant des cancers majeurs comme le cancer du poumon et le cancer du sein ;
- de nombreuses études cliniques réalisées dans le domaine de l'oncologie ont montré l'innocuité de certains anticorps nus, non armés, dirigés contre cette cible chez l'homme et dont les essais ont pour la plupart été arrêtés, principalement pour manque d'efficacité ;
- et enfin, l'IGF-1R est aussi internalisé après liaison du ligand et de certains anticorps.

Figure 4

Expression de l'IGF-1R sur des coupes de tissus normaux (A) et tumoraux (B). Photographies microscopiques obtenues après marquage de coupes tissulaires avec un anticorps anti-IGF-1R.



Un immunoconjugué cytotoxique (« *antibody drug conjugate* », ADC, en anglais) est une molécule complexe qui résulte de la conjugaison entre un anticorps et un agent cytotoxique par le biais d'un linker (espaceur) (voir aussi le [Chapitre de M.-P. Brun](#) dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020).

### 1.4. Expression de l'IGF-1R

Un différentiel d'expression de l'IGF-1R entre les tissus normaux et les tissus tumoraux a été démontré par immunohistochimie<sup>9</sup>. La [Figure 4](#) compare les photographies obtenues à partir de tissus normaux ([Figure 4A](#)) et tumoraux ([Figure 4B](#)). L'expression de ce récepteur est majoritairement intracytoplasmique<sup>10</sup> dans la majorité des organes vitaux humains, ce qui limitera le ciblage de ces tissus par un anticorps. Une expression membranaire de l'IGF-1R à la surface des cellules,

9. Immunohistochimie : méthode de localisation de protéines dans les cellules d'un échantillon de tissu par l'utilisation d'anticorps.

10. Intracytoplasmique : à l'intérieur du cytoplasme de la cellule.

8. Apoptose : mécanisme de déclenchement d'autodestruction des cellules.

notamment épithéliales<sup>11</sup>, est observée dans la vessie, le placenta, la prostate et l'endomètre. Pour ces tissus, l'expression est modérée à forte.

La **Figure 4B** permet d'observer la forte expression de l'IGF-1R sur des échantillons prélevés dans la tumeur (cancer du sein et du poumon), en comparaison avec des échantillons normaux adjacents prélevés chez les mêmes patients juste à côté de la tumeur.

## 2 Des immunoconjugués pour cibler l'IGF-1R

### 2.1. État de l'art

Plusieurs groupes pharmaceutiques, dont les Laboratoires Pierre Fabre en partenariat avec Merck & Co (**Figure 5**), ont développé des anticorps anti-IGF-1R non armés mais, par manque d'efficacité, le développement de ces anticorps en oncologie a été stoppé entre la phase clinique 1 et la

11. Cellules endothéliales : cellules « épineuses » étant liées entre elles et permettant de créer une couche protectrice continue.

phase clinique<sup>12</sup> 3. L'anticorps Ganitumab de la société Amgen est actuellement en phase 3 pour différents types de sarcomes.

Le seul immunoconjugué cytotoxique en cours d'évaluation clinique est développé par les Laboratoires Pierre Fabre. Il est actuellement en phase clinique 1.

### 2.2. Mécanisme d'action de l'immunoconjugué cytotoxique

Après fixation sur l'IGF-1R, l'ADC est internalisé dans des vésicules mantelées<sup>13</sup>, qui fusionnent ensuite avec les lysosomes<sup>14</sup>. À l'intérieur des lysosomes, l'anticorps et l'antigène sont dégradés. Enfin, la libération du médicament dans

12. Phase clinique : phase de test d'un médicament ou d'un traitement pour évaluer son efficacité et la tolérance de l'homme vis-à-vis de celui-ci.

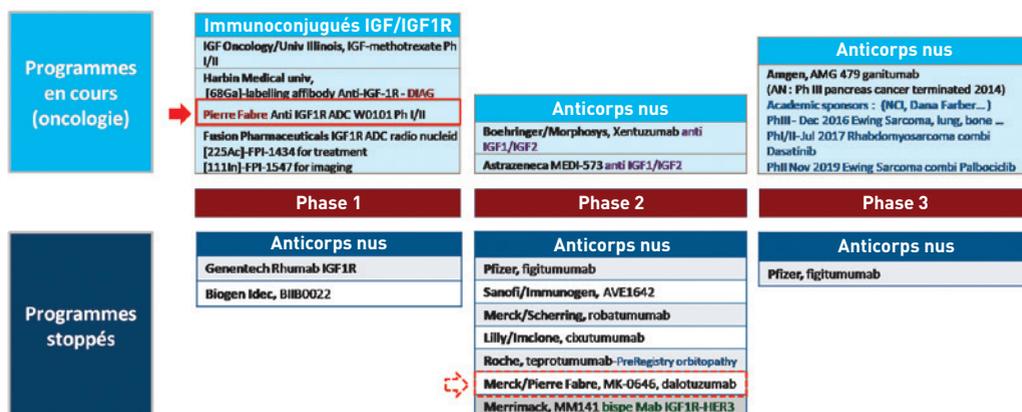
13. Vésicule mantelée : structure dans le cytoplasme pouvant stocker, transporter ou encore digérer des déchets cellulaires.

14. Lysosome : organe cellulaire présent dans le cytoplasme des cellules, responsable de la digestion intracellulaire.

**Figure 5**

Programmes ciblant l'IGF-1R et ses ligands stoppés et en cours de développement clinique en oncologie.

Mab = « monoclonal antibody » : anticorps monoclonal.



le cytoplasme aboutit à la mort de la cellule (**Figure 6**).

### 2.3. Génération et sélection de l'anticorps pour l'immunoconjugué

L'anticorps anti-IGF-1R sélectionné pour synthétiser l'ADC a été généré chez la souris par la technique dite des hybridomes<sup>15</sup>. Trois étapes de criblage successives, basées sur différents tests *in vitro* et *in silico*, ont permis de sélectionner l'anticorps 208F2 (**Figure 7A**) :

- criblage primaire : test *in vitro* de liaison sur cellules tumorales (lignée humaine de cancer du sein MCF-7) et d'internalisation : sélection de 20 anticorps ;
- criblage secondaire : mesures d'affinité pour la cible ; tests de réactivité croisée avec l'IGF-1R de macaque et de liaison à l'IR : sélection de 5 anticorps ;

- criblage tertiaire : cartographie épitopique, effets sur la prolifération cellulaire et la phosphorylation du récepteur, études *in silico* de développabilité et d'humanisabilité : sélection de l'anticorps 208F2.

La mesure par cytométrie de flux<sup>16</sup> (**Figure 7B**) de la fixation de l'anticorps 208F2 sur des cellules tumorales (MCF-7) en fonction du temps montre qu'il disparaît de la surface des cellules assez rapidement, avec un temps de demi-vie<sup>17</sup> d'environ 11 minutes.

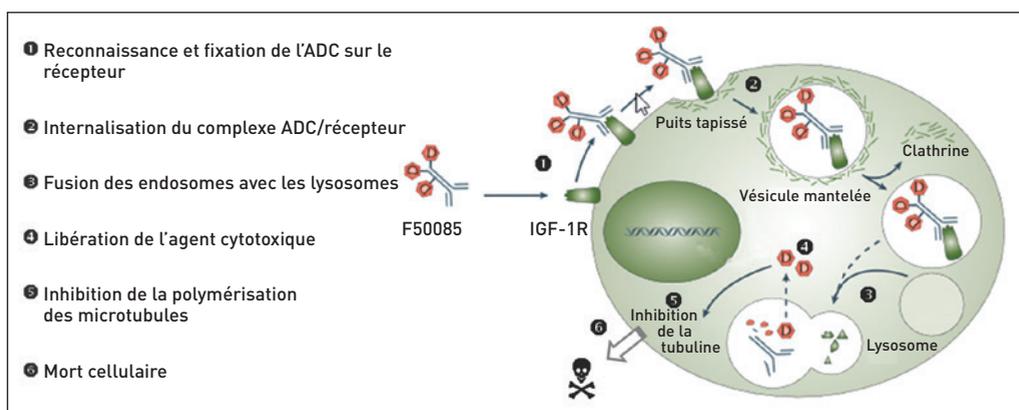
La cytométrie montre également que le 208F2 ne se fixe pas sur des cellules exprimant uniquement le récepteur de l'insuline, contrairement à un anticorps anti-insuline récepteur commercial (**Figure 7C**).

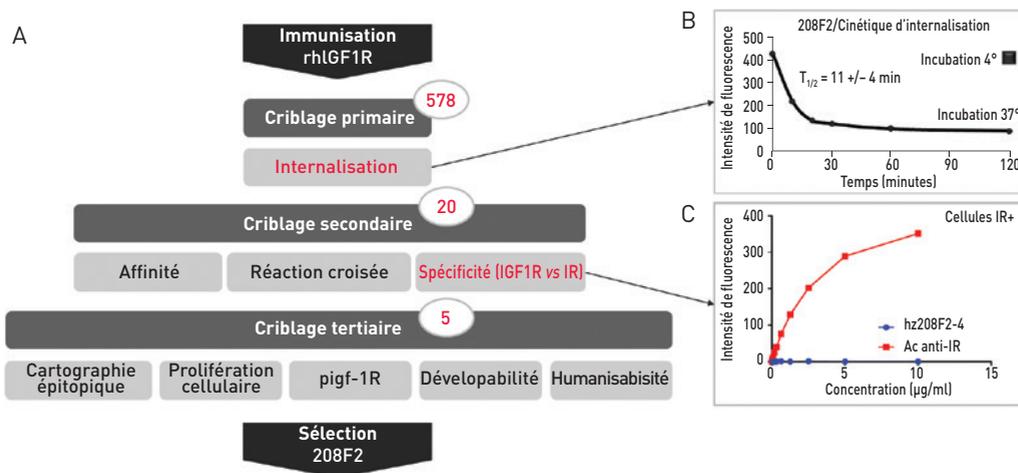
15. Hybridome : cellule provenant de l'hybridation entre des globules blancs (cellules lymphoïdes) et des cellules cancéreuses provenant de la moëlle osseuse (cellules myéломateuses).

16. Cytométrie de flux : technique de comptage et de mesure des propriétés des cellules (taille, morphologie, présence de marqueurs).  
17. Temps de demi-vie : temps pour lequel il ne reste que la moitié de la concentration initiale du composé.

**Figure 6**

Mécanisme d'action de l'ADC.





**Figure 7**  
Génération et sélection de l'anticorps anti-IGF-1R 208F2. A) Étapes de criblage des anticorps ; B) internalisation du complexe 208F2/récepteur dans les cellules tumorales MCF-7 en fonction du temps ; C) évaluation de la fixation du 208F2 sur des cellules exprimant uniquement l'IR.

**2.4. Synthèse et purification de l'ADC**

Une fois sélectionné, cet anticorps obtenu chez la souris a été « humanisé » (voir le *Chapitre de J.-P. Armand* dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*), pour aboutir à sa forme hz<sup>18</sup>. La *Figure 8* montre la structure de l'immunoconjugué cytotoxique hz208F2, sur lequel a été réalisée la conjugaison de l'agent cytotoxique (lien avec un espaceur).

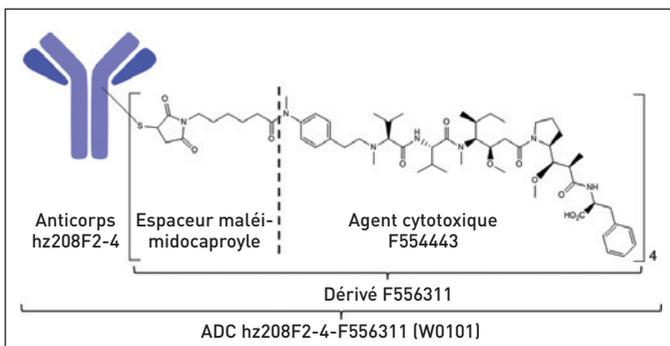
la polymérisation<sup>19</sup> de la tubuline<sup>20</sup>, ont été évalués afin de sélectionner le composé codé F556311, comportant l'agent cytotoxique F554443 et un espaceur de type maléimido-caproyle (*Figure 8*).

Ce composé est ensuite couplé sur les résidus cystéine inter-chaîne de l'anticorps

19. Polymérisation : formation d'un polymère (macromolécule) à partir d'un grand nombre d'une ou plusieurs unités de répétition appelées monomères.

20. Tubuline : protéine structurelle des microtubules, soit le constituant majeur du cytosquelette, la partie permettant à la cellule de se déplacer et de se nourrir.

18. Forme hz : forme humanisée d'un anticorps, c'est-à-dire utilisable en thérapie.



**Figure 8**  
Structure de l'immunoconjugué cytotoxique hz208F2-F556311.

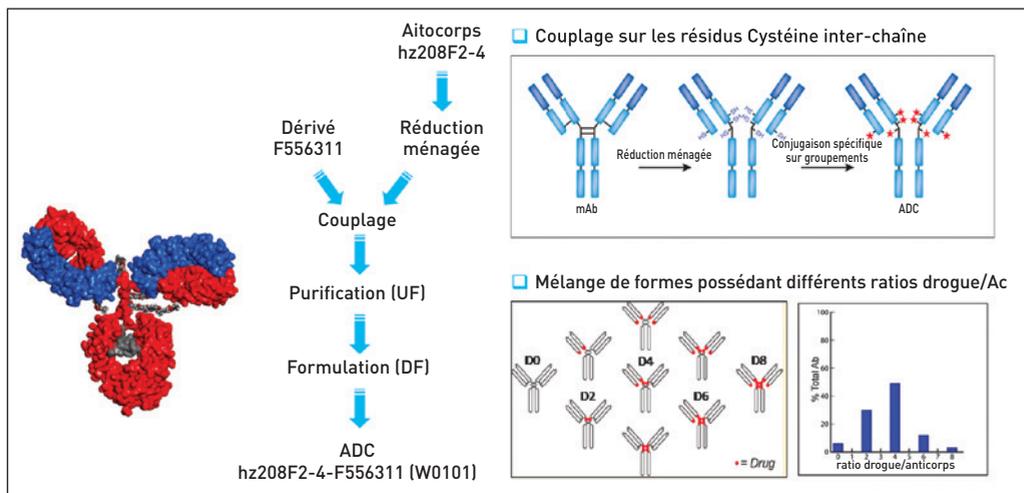


Figure 9

Synthèse, purification et formulation de l'ADC.

après réduction<sup>21</sup> ménagée (Figure 9). Le résultat de la synthèse est un mélange : on mesure un DAR<sup>22</sup> (« drug-to-antibody ratio ») de 4, mais il s'agit en fait d'un mélange d'entités comportant zéro à huit composés cytotoxiques (Figure 9, D0 à D8).

La Figure 9 décrit les différentes étapes du procédé de production de l'ADC. Après opérations de couplage, l'ADC est purifié par ultrafiltration tangentielle<sup>23</sup> afin d'éliminer le dérivé cytotoxique résiduel non couplé et formulé dans un tampon de conservation.

21. Réduction : réaction chimique où des ions ou des atomes d'une molécule gagnent des électrons.

22. DAR (« drug-to-antibody ratio ») : nombre de molécules cytotoxiques conjuguées à un anticorps.

23. Ultrafiltration tangentielle : ultrafiltration très fine avec une membrane laissant passer les molécules ayant une masse moléculaire inférieure à 30 kDa.

## 2.5. Analyse de l'ADC

Différentes méthodes physico-chimiques permettent d'analyser l'ADC W0101. À titre d'exemple, on peut citer les méthodes chromatographiques de tamisage moléculaire<sup>24</sup> et d'interaction hydrophobe utilisées pour déterminer respectivement le pourcentage de formes agrégées et le DAR. La Figure 10 présente les résultats d'analyse de lots d'ADC produits à différentes échelles, comprises entre 4 mg et 40 g, par chromatographie d'interaction hydrophobe. Les profils chromatographiques et les mesures du DAR moyen, comprises entre 3,7 et 4,3, confirment une très grande reproductibilité du procédé.

24. Tamisage moléculaire : technique de séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme.

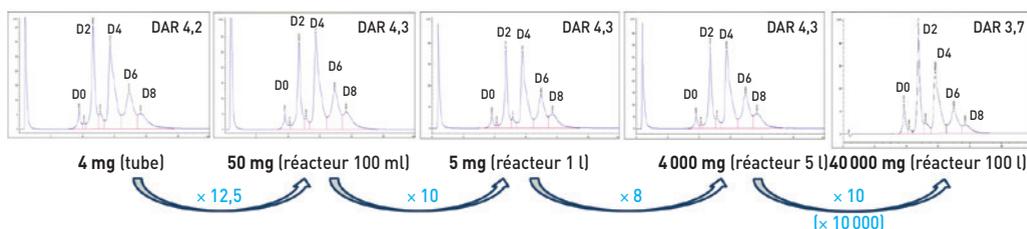


Figure 10

Analyse de lots d'ADC produits à différentes échelles par chromatographie d'interaction hydrophobe. Cette analyse permet de déterminer le DAR moyen pour chaque lot.

## 2.6. Le couplage ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de l'anticorps

Des analyses de cytométrie de flux ont été réalisées afin de vérifier que le couplage ne modifiait pas les propriétés fonctionnelles de l'anticorps. Les **Figures 11** et **12** montrent une superposition des courbes de fixation et d'internalisation de l'anticorps non conjugué et de l'ADC, confirmant que les propriétés fonctionnelles de l'anticorps sont conservées après synthèse de l'ADC.

## 2.7. Analyse de l'activité de l'immunoconjugué sur des cellules

La cinétique d'internalisation de l'ADC a été étudiée par microscopie confocale<sup>25</sup> après incubation à 37 °C à différents temps, sur des cellules tumorales (MCF-7) exprimant assez fortement l'IGF-1 récepteur (**Figure 13**). Sur les clichés, on repère : le noyau cellulaire coloré en bleu, l'ADC en vert, un marqueur du lysosome (la protéine Lamp-1) en rouge et,

25. Microscopie confocale : technique de microscopie permettant d'obtenir une représentation tridimensionnelle d'un objet macromoléculaire (ici, cellules).

lorsqu'il y a colocalisation, une coloration jaune apparaît.

À t<sub>0</sub>, la localisation de l'ADC est essentiellement au niveau membranaire ; après 15 minutes d'incubation, une forte proportion de l'ADC se situe dans des vésicules à l'intérieur de la cellule, et celle-ci augmente encore après 30 et 60 minutes d'incubation. De plus, une colocalisation avec le marqueur des lysosomes est observée après 30 et 60 minutes d'incubation. Après 2 heures, l'ADC n'est plus détecté, celui-ci étant dégradé dans les lysosomes.

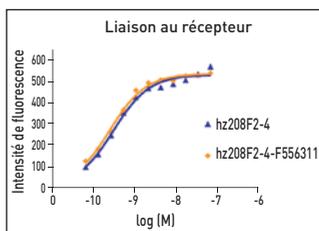


Figure 11

Comparaison de la fixation de l'anticorps non conjugué et de l'ADC sur des cellules tumorales exprimant l'IGF-1R. Des cellules MCF-7 sont incubées à 4 °C en présence de concentrations croissantes de l'anticorps et de l'ADC. La fixation est mesurée par cytométrie de flux.

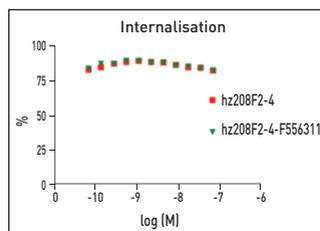


Figure 12

Comparaison de l'internalisation des anticorps seuls ou conjugués (ADC) par des cellules tumorales exprimant l'IGF-1R. Des cellules MCF-7 sont incubées à 37 °C en présence de concentrations croissantes de l'anticorps et de l'ADC. Le pourcentage d'internalisation est déterminé après analyse par cytométrie de flux.

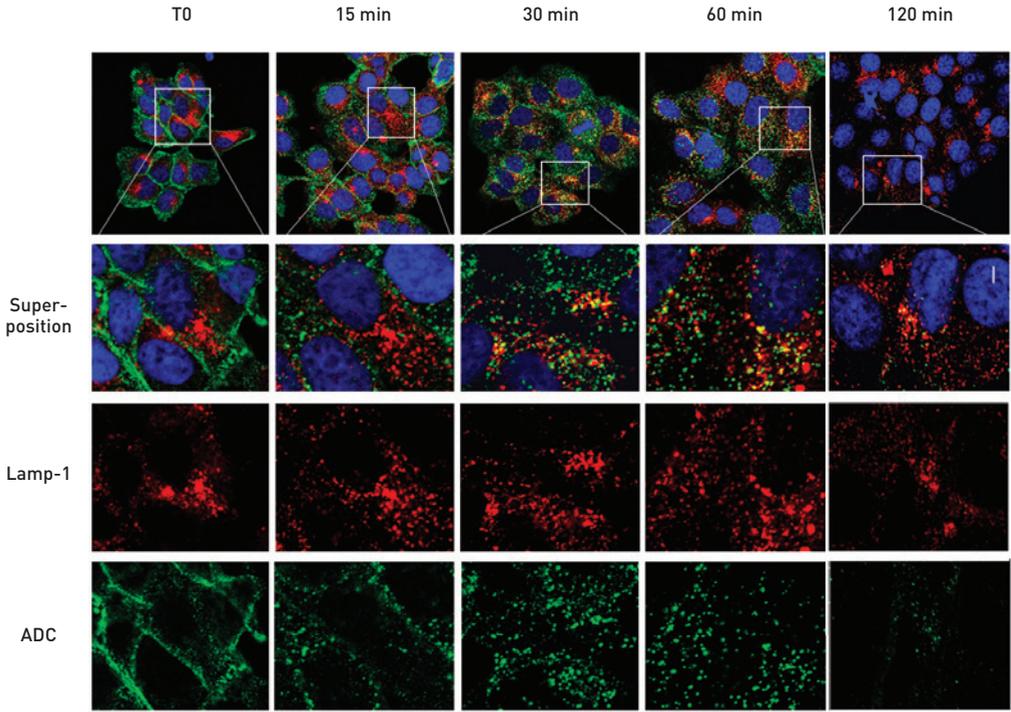


Figure 13

Mécanisme d'internalisation de l'ADC W0101 par les cellules tumorales.

### 3 Activité anti-tumorale de l'immunoconjugué

#### 3.1. Cytotoxicité *in vitro* sur cellules tumorales et normales

La cytotoxicité de l'immunoconjugué a été évaluée dans un premier temps sur une série de lignées tumorales d'origine humaine – en fait six types de cellules listés sur la [Figure 14](#), avec des niveaux d'expression d'IGF-1R faibles pour la lignée Hs746t, à forts pour les cellules MCF-7. La viabilité des cellules *in vitro* a été mesurée après incubation pendant 6 jours à 37 °C en présence de concentrations croissantes en ADC. L'ADC induit une très forte cytotoxicité sur les

lignées MCF-7 et NCI-H2122 exprimant fortement l'IGF-1R, avec une viabilité < 10 % aux concentrations d'ADC les plus élevées. Une faible cytotoxicité est par contre observée pour les lignées Hs746t et SBC5 exprimant très faiblement l'IGF-1R.

Ces résultats démontrent une étroite corrélation entre le niveau d'expression d'IGF-1R et la cytotoxicité induite par l'ADC.

Cette corrélation entre cytotoxicité et niveau d'expression a ensuite été démontrée sur des cellules humaines normales. En effet, la cytotoxicité observée sur les cellules normales, qui expriment plus faiblement l'IGF-1R, est beaucoup plus faible que celle

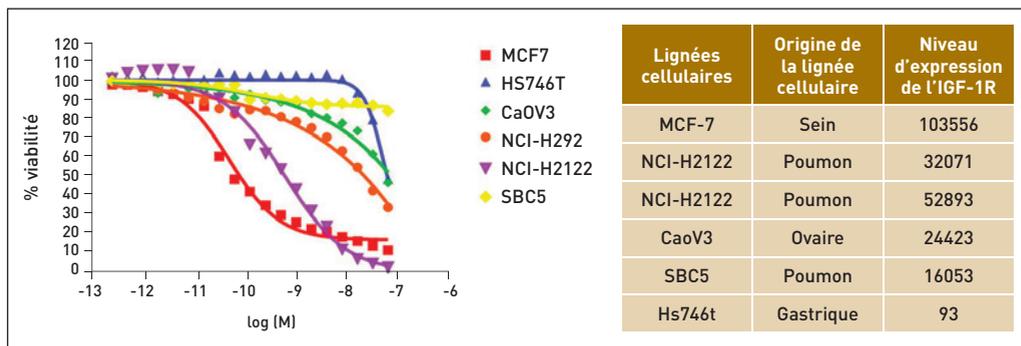


Figure 14

Cytotoxicité in vitro de l'ADC W0101 sur des cellules tumorales de différents organes humains.

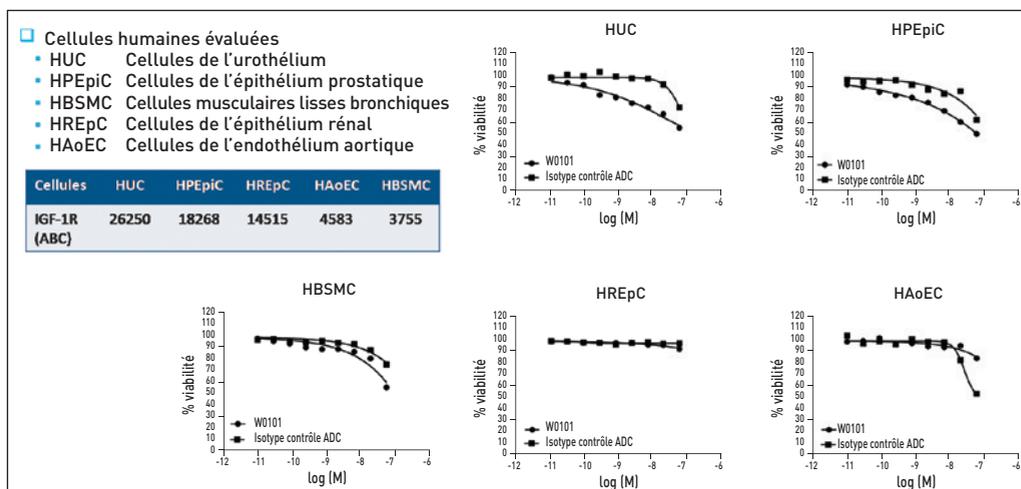


Figure 15

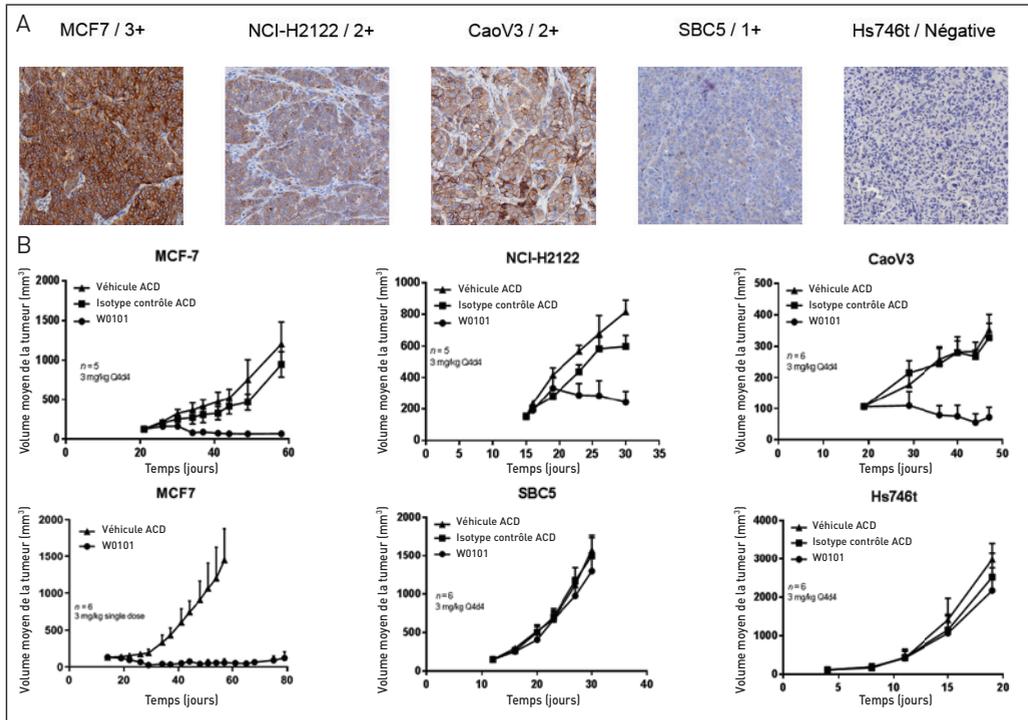
Cytotoxicité in vitro de l'ADC W0101 sur différentes cellules normales. L'effet de l'ADC W0101 est comparé à celui d'un ADC contrôle.

induite sur les cellules tumorales exprimant fortement l'IGF-1R (Figure 15).

### 3.2. Activité antitumorale in vivo

L'activité antitumorale de l'ADC a été évaluée dans des modèles de xénogreffe chez la souris (Figure 16). Une très forte activité, avec régression de la tumeur, est observée sur le modèle de cancer du sein

MCF-7 exprimant fortement l'IGF-1R (expression 3+). Cette activité est plus faible sur les modèles exprimant plus modestement la cible (2+) : régression tumorale partielle dans le modèle de cancer de l'ovaire CaoV3 et progression stabilisée dans le modèle de cancer du poumon NCI-H2122. Aucune activité n'est observée dans les autres modèles exprimant très faiblement l'IGF-1R.



**Figure 16**

Activité antitumorale de l'ADC W0101 sur différents modèles de xénogreffe. A) Évaluation du niveau d'expression de l'IGF1R par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs. Photographies obtenues après marquage de coupes de tumeurs prélevées chez des souris greffées avec des cellules tumorales humaines ; B) Activité antitumorale dans des modèles de cancer du sein (MCF-7), du poumon (NCI-H2122 et SBC5), de l'ovaire (CaoV3) et gastrique (Hs746t). Des doses de 3 mg/kg de l'ADC sont administrées aux animaux greffés par voie intraveineuse. Deux schémas d'administration ont été évalués : un schéma Q4d4 consistant en quatre injections espacées de quatre jours, et un schéma consistant en une dose unique. L'activité de l'ADC W0101 est comparée à celle d'un ADC contrôle.

## Un immunoconjugué cytotoxique prometteur dans la lutte contre le cancer

Les études précliniques décrites dans ce chapitre ont permis de démontrer la spécificité de l'ADC W0101 pour l'IGF-1R et l'absence de liaison à l'IR. Les activités antitumorales *in vitro* et *in vivo* sont étroitement corrélées au niveau d'expression de la cible. Cet ADC constitue une nouvelle option thérapeutique très prometteuse pour les patients dont la tumeur surexprimera

l'IGF-1R. Un premier essai clinique est en cours chez des patients ayant des tumeurs solides (référence de l'essai : NCT03316638). L'objectif de cet essai est d'évaluer la tolérance des patients au traitement et identifier les éventuels effets secondaires.

*L'auteur remercie Barbara Akla, Matthieu Broussas, Alain Beck, Mariya Pavlyuk, Éric Chetaille et Nathalie Corvaia pour leur contribution au travail décrit dans ce chapitre.*



# L'innovation diagnostique au service de la médecine personnalisée pour la prise en charge du sepsis et des maladies infectieuses

*Alexandre Pachot est Directeur des Partenariats de recherche chez Biomérieux<sup>1</sup>, une société française, historiquement lyonnaise, fondée en 1963 par Alain Mérieux, dont le grand-père était un élève de Louis Pasteur, et maintenant pilotée par son fils Alexandre Mérieux.*

D'après la conférence d'Alexandre Pachot

<sup>1</sup>. [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)

Ce chapitre a pour objet d'illustrer l'importance que représente le diagnostic dans la prise en charge des patients, et en particulier pour des maladies infectieuses. Le diagnostic *in vitro* est considéré aujourd'hui comme étant essentiel dans environ 70 % des décisions médicales, pour autant, il ne représente que 2 % des dépenses de santé. C'est sans doute quelque chose qui va évoluer dans le temps puisque c'est la pierre angulaire de ce qu'on appelle la médecine personnalisée, qui a réellement transformé le domaine de l'oncologie et qui est en train de transformer aussi le domaine des maladies infectieuses.

## 1 Présentation du sepsis

### 1.1. Les symptômes du sepsis

Prenons l'exemple d'un patient que nous appellerons Maxime : il a 54 ans, il n'a pas particulièrement d'antécédents médicaux. Il est en pleine forme, il travaille. Son chirurgien cardiologue lui diagnostique un anévrisme aortique<sup>1</sup>. Il a une chirurgie programmée et est pris en charge dans un grand centre hospitalo-universitaire. La chirurgie se passe très bien mais trois jours plus tard, il a un pic de fièvre et a des difficultés à respirer. Cinq jours plus tard, il se retrouve dans un service de réanimation avec une défaillance pulmonaire importante qui nécessite une assistance de ventilation. Il a également une défaillance cardiovasculaire majeure avec une chute de tension persistante. Ce patient a un choc septique.

Le sepsis, ou le choc septique, qui est la forme la plus grave du sepsis, est défini comme étant une infection grave. C'est un syndrome, une situation clinique qui est provoquée par une infection, et en réponse à cette infection, l'organisme va surréagir, aboutissant au final à des défaillances d'organes, en l'occurrence ici, une défaillance pulmonaire et cardiovasculaire (**Figure 1**).

Cet exemple est loin d'être un cas isolé, puisqu'on considère

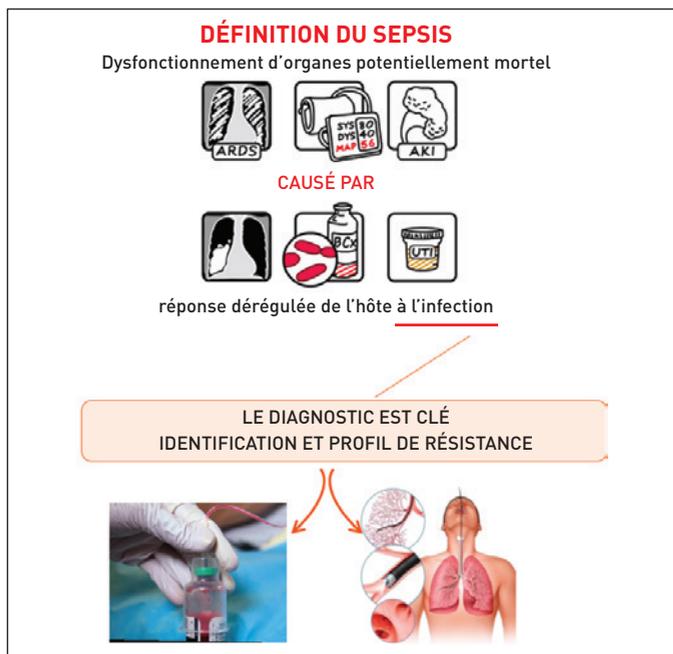


Figure 1

*Le choc septique est une infection qui touche des organes vitaux et qui peut causer le décès du patient. Il est essentiel de mettre en place rapidement une antibiothérapie à spectre large car le retard de traitement par un antibiotique adapté augmente la mortalité.*

1. Anévrisme aortique : dilatation locale de l'aorte, qui est la plus grosse artère du corps, elle part du cœur et se divise en bas du dos pour irriguer les jambes.

qu'il y a environ trente millions de cas de sepsis dans le monde chaque année, et c'est probablement sous-estimé. On envisage que ce chiffre va doubler d'ici 2050, notamment à cause du vieillissement de la population. On considère également qu'il y a un décès lié au sepsis toutes les trois à quatre secondes dans le monde.

Pour autant, c'est très peu connu du grand public, une des raisons pour lesquelles, notamment, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en a fait une priorité mondiale depuis 2017.

### 1.2. Le diagnostic : clé pour l'identification des agents pathogènes et du profil de résistance aux antibiotiques

Quand un patient est pris en charge pour un sepsis, le clinicien et le réanimateur sécurisent les organes vitaux, ce qu'ils font très bien pendant les toutes premières heures, notamment dans les pays occidentaux. L'objectif du clinicien est d'identifier l'origine du sepsis, en l'occurrence l'infection, et de mettre le patient sous antibiotiques le plus rapidement possible. On sait en effet que chaque heure de retard de mise en place d'une antibiothérapie efficace est fortement corrélée à une augmentation du décès du patient dans les heures ou les jours qui suivent. À ce moment-là, le problème du clinicien est qu'il ne connaît pas l'identité de la bactérie ou du pathogène responsable de l'infection. Il est donc obligé d'utiliser une antibiothérapie à large spectre, généralement un cocktail d'antibiotiques,

pour pouvoir couvrir la bactérie responsable (**Figure 2**).

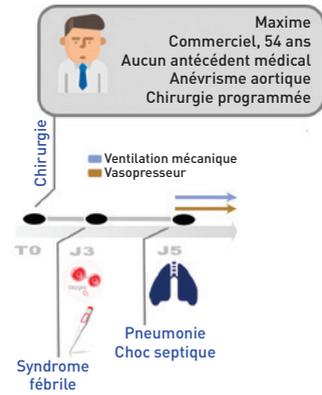
Le deuxième objectif du clinicien est d'ajuster ce traitement antibiotique le plus rapidement possible, et cela, pour deux raisons principales :

- éviter que le patient soit traité par des médicaments dont il n'a pas besoin : certains de ces antibiotiques peuvent en effet être toxiques pour certains organes, notamment au niveau du rein. Cela peut également complètement perturber son microbiote intestinal, dont on connaît de plus en plus l'importance pour la santé humaine (voir le **Chapitre de J. Doré** dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020) ;

- une raison sociétale : les résistances aux antibiotiques émergent du fait de leur surutilisation. Or, de moins en moins de nouveaux antibiotiques sont découverts et sont mis sur le marché. Nous avons donc une sorte de bombe à retardement entre nos mains, et on envisage, d'ici 2050, environ dix millions de morts liés au fait que nous n'aurons plus d'antibiotiques efficaces dans certaines situations cliniques. Pour ces deux raisons, individuelle et sociétale, il est vraiment important d'adapter l'antibiothérapie du patient. C'est pourquoi le diagnostic est un facteur clé qui prend à ce niveau toute sa valeur.

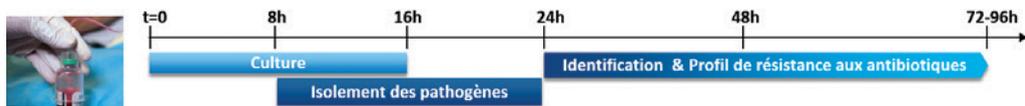
Afin d'identifier les agents pathogènes et leur profil de résistance aux antibiotiques, on réalise deux prélèvements sur le patient :

- un prélèvement sanguin pour réaliser une hémoculture, car le clinicien et le



**Figure 2**

*Les problèmes du traitement du choc septique par une antibiothérapie à spectre large est la résistance aux antibiotiques qui augmente, tandis que le retard de traitement par un antibiotique adapté augmente la mortalité.*



**Figure 3**

Les étapes microbiologiques pour identifier les agents pathogènes et leurs profils de résistance aux antibiotiques.

réanimateur veut écarter l'hypothèse d'une généralisation de l'infection au niveau systémique, au niveau du sang, qui est un signe d'aggravation ;

- un prélèvement pulmonaire puisque, au vu de la clinique de l'exemple choisi, on envisage qu'il y a une grande chance que l'infection soit d'origine pulmonaire.

## 2 Identification et profil de résistance des agents pathogènes responsables de l'infection

L'objectif de la microbiologie est de fournir le plus rapidement possible au clinicien la carte d'identité du ou des pathogènes responsables de l'infection, ainsi que leurs profils de résistance aux antibiotiques ou de susceptibilité aux antibiotiques. C'est un domaine qui a, comme beaucoup de domaines de la biologie, bénéficié de deux types d'innovations :

- les innovations incrémentales, à savoir celles qui permettent de faire évoluer des approches anciennes en les rendant plus performantes ;
- les innovations de rupture grâce à de nouvelles approches technologiques.

L'analyse microbiologique repose généralement sur trois ou quatre étapes : la mise en culture pour faire proliférer la bactérie au laboratoire, l'isolement des agents pathogènes,

puis l'utilisation de différentes techniques qui permettent de les identifier et de définir leur profil de résistance (**Figure 3**).

### 2.1. La mise en culture

L'hémoculture fait partie des examens bactériologiques anciens ayant bénéficié d'innovations en termes d'automatisation pour avoir des lectures des bouteilles d'hémoculture le plus régulièrement possible et rendre le résultat au clinicien plus rapidement (**Figure 4**). Les hémocultures ont également bénéficié d'innovations au niveau de la composition du milieu de culture à l'intérieur des bouteilles, afin d'optimiser la capacité de prolifération des bactéries et donc d'avoir un rendu de résultat plus rapide auprès du clinicien.

Le deuxième type de prélèvement qui, dans notre exemple, est un prélèvement pulmonaire est directementensemencé dans des boîtes de Pétri. Ces milieux de culture solides font aussi partie des approches anciennes de la microbiologie, mais qui ont énormément bénéficié d'innovations chimiques dans leur composition pour les rendre de plus en plus riches et de plus en plus spécifiques. Par exemple, sur la **Figure 5** (à droite), on observe ce qu'on appelle des milieux chromogéniques : à partir de la morphologie de la colonie qui a poussé sur la boîte de Pétri ou de sa couleur dans différents milieux



**Figure 4**

L'hémoculture, un examen bactériologique consistant à rechercher la présence de germes (microbes) dans le sang, est maintenant automatisée. À droite : capteur de CO<sub>2</sub> contenant un indicateur de pH.

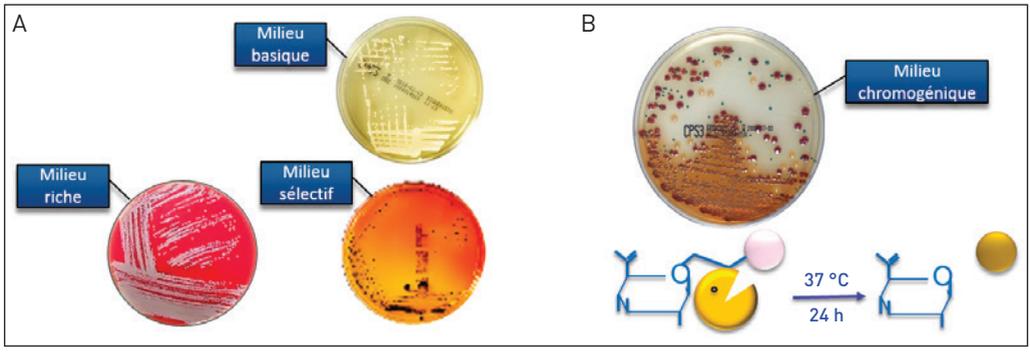


Figure 5

Boîte de Pétri pour l'analyse des agents pathogènes.

(à gauche), on peut déjà avoir une information sur l'espèce bactérienne responsable de l'infection.

**2.2. Isolement des pathogènes**

Historiquement, l'identification des pathogènes repose sur des techniques colorimétriques qui analysent leurs caractéristiques biochimiques et enzymatiques (Figure 6A). Ces outils ont également été automatisés ces dernières décennies.

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques

supposés ou connus. On utilise du papier buvard imprégné d'antibiotiques à une certaine dose et que l'on dépose sur la boîte de Pétri : la bactérie sensible va disparaître autour du papier buvard (Figure 6B).

**2.3. Les nouvelles technologies d'identification**

**2.3.1. La spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est la première technologie de rupture qui, ces dernières années, a réellement transformé la microbiologie. La colonie bactérienne est récupérée à la surface de la boîte de culture, puis déposée sur

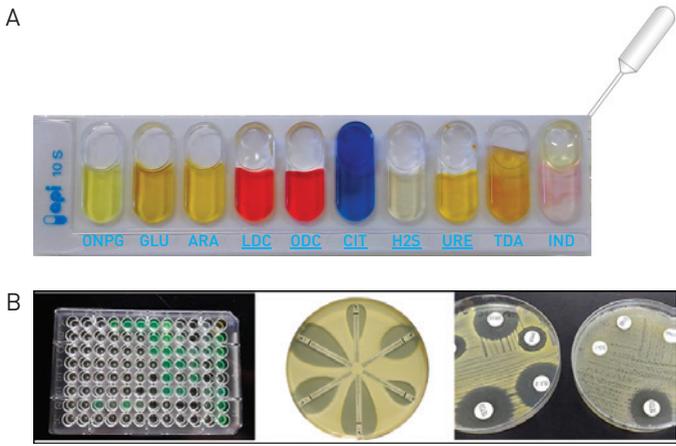


Figure 6

A) Les techniques colorimétriques permettent d'analyser les caractères biochimiques et enzymatiques des pathogènes ; B) l'antibiogramme permet de tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'antibiotiques.

une lame (**Figure 7** à gauche) et protégée par une matrice d'ionisation<sup>2</sup> à la surface de la colonie. L'ensemble est déposé dans le spectromètre de masse du type MaldiToF<sup>3</sup>, où un rayonnement laser provoque une désorption, puis une ionisation des molécules. Un panel de molécules avec des poids et des charges différentes est émis. En fonction du temps de vol de ces molécules jusqu'au détecteur, on obtient un profil spécifique de l'espèce bactérienne présente dans la colonie.

Le très grand progrès pour l'analyse microbiologique est l'obtention de l'information en quelques minutes alors qu'auparavant, plusieurs heures voire plusieurs jours étaient nécessaires pour identifier la colonie bactérienne.

2. Matrice d'ionisation : sert à protéger la molécule qui pourrait être endommagée par le faisceau laser.

3. MaldiToF : appareil de spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser, qui va exciter la molécule, avec un analyseur à temps de vol, qui permet de différencier les molécules.

### 2.3.2. Le FilmArray<sup>®</sup> pour un ajustement rapide et ciblé des antibiothérapies

Les progrès de la biologie moléculaire ont transformé la microbiologie. La PCR (« *polymerase chain reaction* ») est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir des millions de copies de fragments d'ADN. Cette technique ancienne consiste à utiliser des enzymes d'amplification d'acides nucléiques<sup>4</sup>, soit pour détecter la présence d'un gène, soit pour quantifier le nombre de copie d'acides nucléiques dans un prélèvement biologique (**Figure 8**). Utilisée dans le domaine de la recherche au départ, cette technologie est maintenant largement utilisée dans le domaine du diagnostic. Son accès de manière intégrée et automatisée a été rendu possible grâce à de nouveaux outils, notamment la technologie FilmArray<sup>®</sup>, développée par Biofire, une société de Salt Lake City devenue

4. Acides nucléiques : motifs moléculaires constitutifs de notre ADN et de notre ARN.

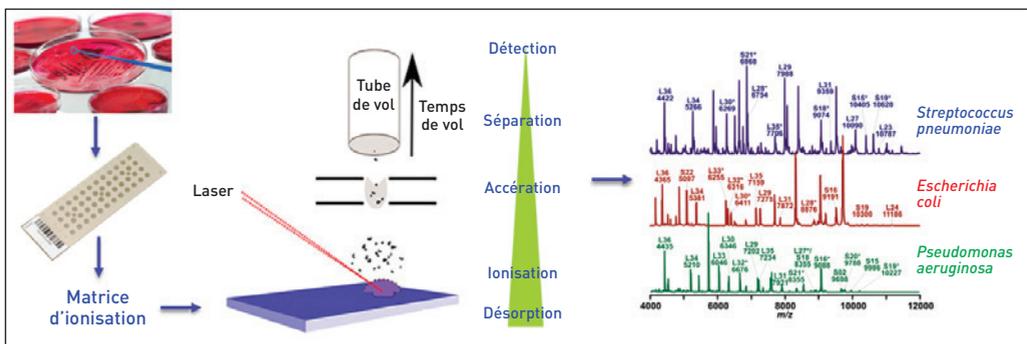
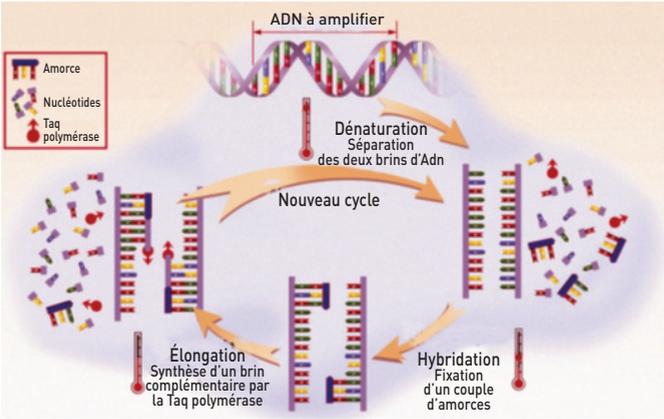


Figure 7

La spectrométrie de masse permet d'analyser les agents pathogènes présents dans une colonie bactérienne.



**Figure 8**

Principe de la PCR (« polymérase chain reaction »), technique d'amplification de l'ADN.

maintenant une société du groupe Biomérieux.

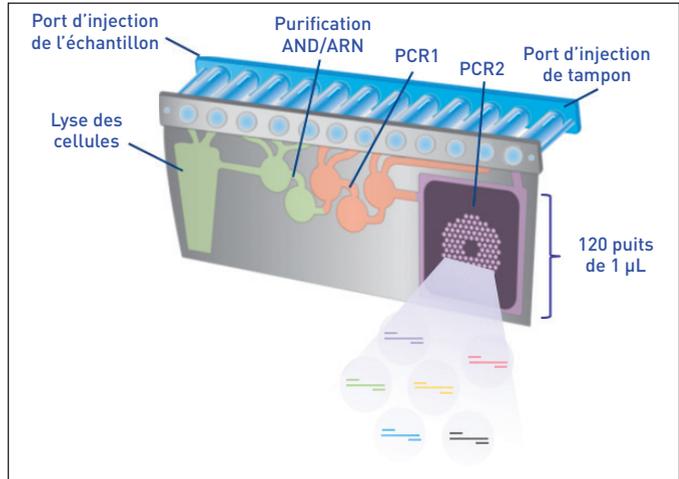
Le principe repose sur l'utilisation d'un dispositif médical automatisé, de la taille d'une main environ, dans lequel toutes les étapes de la technique PCR sont intégrées (Figure 9). Le prélèvement biologique du patient (dans notre exemple, un prélèvement pulmonaire) est déposé dans le « port d'injection » ; à l'autre extrémité est déposé un tampon qui réhydrate les réactifs à l'intérieur de la poche réactionnelle.

Toutes les étapes de la PCR sont intégrées à l'intérieur de la poche : la lyse des cellules (destruction de la membrane cellulaire), l'extraction des acides nucléiques, puis une première PCR qui cible les pathogènes généralement responsables d'infections pulmonaires.

Ensuite, une deuxième PCR (que l'on appelle PCR nichée, ou *nested-PCR*) est mise en place sur la partie à droite pour rechercher la présence d'un certain nombre de bactéries ou de virus responsables d'infections pulmonaires à partir

de l'analyse des gènes de ces agents pathogènes. On peut même obtenir une information sur le profil de résistance puisqu'on peut rechercher la présence ou non de certains gènes liés à la résistance aux antibiotiques.

Cette technique est réellement une avancée importante dans la mesure où elle permet en moins d'une heure d'avoir



**Figure 9**

Principe de fonctionnement de la technologie de BioFire, FilmArray®, qui permet de cibler les pathogènes responsables de l'infection, puis de faire une analyse génétique des pathogènes qui donnera la liste des virus et bactéries présents.

l'information permettant au clinicien d'ajuster rapidement l'antibiothérapie.

### 2.3.3. Le séquençage

Les cliniciens utilisent beaucoup l'information phénotypique, c'est-à-dire l'ensemble des données observables d'un organisme, notamment à l'échelle cellulaire. La prochaine révolution technologique qui va impacter la microbiologie est probablement le séquençage<sup>5</sup>.

Le séquençage a énormément progressé en termes de délai de rendu de résultats, ainsi qu'en termes de profondeur de séquençage et de robustesse (Figure 10). Il trouvera naturellement une place dans le domaine de la microbiologie parce qu'il permet en particulier d'avoir une analyse beaucoup plus globale du génome bactérien.

Aujourd'hui, le séquençage n'est pas encore un outil utilisé en routine, mais plutôt dans des laboratoires spécialisés. Mais les techniques de séquençage auront incontestablement, dans quelques années, une place dans le domaine de la microbiologie. Certains suggèrent que l'analyse par séquençage permettra peut-être de remplacer toutes les étapes de la microbiologie et que l'on pourrait avoir l'identification, le profil de résistance, et même prédire le dosage d'antibiotiques qui est nécessaire d'être administré au patient. Il y a néanmoins encore énormément de chemin pour le démontrer.



Figure 10

Le séquençage a considérablement progressé en termes de robustesse grâce à l'outil informatique.

## 3 Les nouveaux systèmes de diagnostic en développement

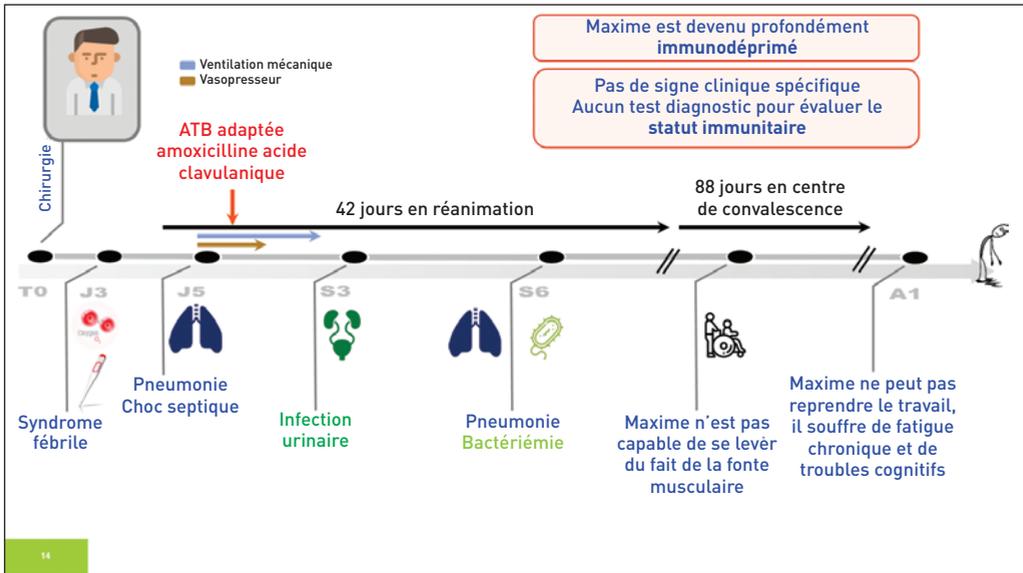
### 3.1. L'évaluation du statut immunitaire des patients

Reprenons l'exemple initial du patient sur lequel a été identifiée, au niveau pulmonaire, une bactérie appelée *Klebsiella Pneumoniae* (Figure 11), qui n'est pas particulièrement résistante, ce qui a permis au clinicien d'adapter l'antibiothérapie et d'utiliser un antibiotique classique, moins toxique, l'Augmentin®. Puisque le patient a été pris en charge correctement et rapidement, dans un service clinique spécialisé, on pouvait penser que les choses allaient bien se dérouler.

Pour autant, le patient n'a pas évolué de cette façon puisque trois semaines après son arrivée en réanimation, il a également fait une infection urinaire. Six semaines après son arrivée en réanimation, il fait une nouvelle infection pulmonaire : il a une bactériémie<sup>6</sup> avec une hémoculture positive. Au total, il est resté 42 jours en réanimation. Quand il pouvait finalement quitter la réanimation, il était incapable de se lever, parce qu'il était resté alité pendant très longtemps, ce qui avait entraîné une fonte musculaire majeure. Il a donc été envoyé dans un service de convalescence pendant plus de 80 jours. Au final, il présentait des troubles cognitifs et une fatigue chroniques. Un an plus

5. Séquençage : détermination de l'ordre des nucléotides présents dans l'ADN.

6. Bactériémie : présence de bactéries dans le sang.



tard, il n'a ainsi toujours pas repris le travail.

Au total, il aura été traité 35 jours par des antibiotiques, et le coût direct de son hospitalisation aura été de plus de 275 000 euros, le coût d'un jour de réanimation, d'hospitalisation et de réanimation étant extrêmement élevé.

Comment cela peut-il arriver alors que la prise en charge précoce du patient a été optimale ? Tout simplement parce qu'on ne s'est en fait intéressé qu'à une facette du problème, l'infection, qui n'est que le déclencheur du syndrome septique, alors que le patient est finalement entré dans une phase de défaillance immunitaire profonde et persistante qui explique la récurrence de ses infections pendant son séjour en réanimation, malgré le fait que les antibiotiques étaient efficaces dès le départ.

Aujourd'hui on ne dispose strictement d'aucun outil pour caractériser le statut

immunitaire des patients de manière reproductible et standardisée, permettant d'avoir une information assez globale de l'état de bonne santé ou de mauvaise santé immunitaire, information pouvant être transmise au clinicien et au réanimateur pour adapter la prise en charge du patient.

Deux nouvelles technologies arrivent, qui semblent avoir une chance de pouvoir résoudre ce problème.

### 3.2. Le test fonctionnel immunitaire (IFA)

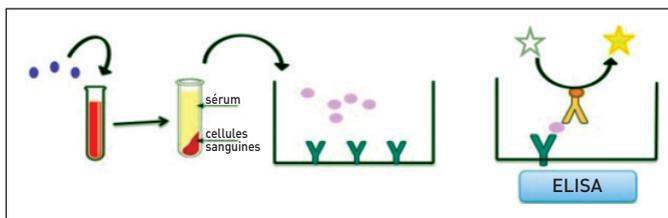
La première technologie, qui est considérée comme étant le test de référence pour les immunologistes, consiste à mesurer si le système immunitaire du patient est fonctionnel ou pas. Des cellules prélevées sur le patient sont stimulées *ex vivo* avec un agent stimulant assez général et global. Ces cellules sont incubées pendant quelques heures à 37 °C,

Figure 11

Évolution de l'état de santé du patient Maxime.

Figure 12

La stimulation *ex vivo* des cellules pour tester le système immunitaire n'est pas utilisée en clinique de routine.



et leur capacité de réponse est mesurée, notamment en dosant une cytokine<sup>7</sup> qui est produite par les cellules circulantes comme les lymphocytes<sup>8</sup> et les monocytes<sup>9</sup> ; cette mesure permet de voir si le système immunitaire est fonctionnel (Figure 12).

Le problème est que ces outils ne sont pas du tout reproductibles, pas du tout pratiques à utiliser au laboratoire, donc encore assez peu utilisés en clinique de routine.

Des efforts d'automatisation sont en cours de développement notamment basée sur la microfluidique en gouttes développée avec les laboratoires de recherche de l'École supérieure de physique et de chimie industrielles de la ville de Paris (ESPCI). Elle consiste

à encapsuler les cellules du patient dans des gouttes (Figure 13). Dans la matrice de la goutte, a été mis un stimulant permettant de stimuler la cellule à l'intérieur, donc dans un milieu de réaction extrêmement confiné. Cela permet de mesurer la réaction cellulaire très rapidement après la simulation. À ce stade, cette technologie est encore assez futuriste, mais prometteuse.

### 3.3. Biomarqueurs transcriptomiques

Le deuxième test en cours de développement est basé sur la transcriptomique (Figure 14), qui est l'étude des ARN messagers. Ces molécules remplissent dans les cellules vivantes une fonction de support intermédiaire de l'information contenue dans l'ADN (gènes). Elles sont formées par la transcription de gènes de l'ADN dont elles sont une copie. Leur rôle est de transporter cette information recueillie dans le noyau de la

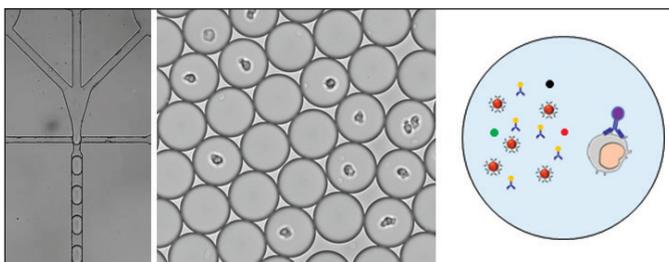
7. Cytokine : substance fabriquée par le système immunitaire qui permet de réguler la production de différentes cellules.

8. Lymphocyte : cellule présente dans le sang ayant pour but de défendre le système immunitaire.

9. Monocyte : type de lymphocyte.

Figure 13

La microfluidique permet d'encapsuler les cellules du patient dans des gouttes, à l'intérieur desquelles leur réponse à une stimulation peut être mesurée plus rapidement.



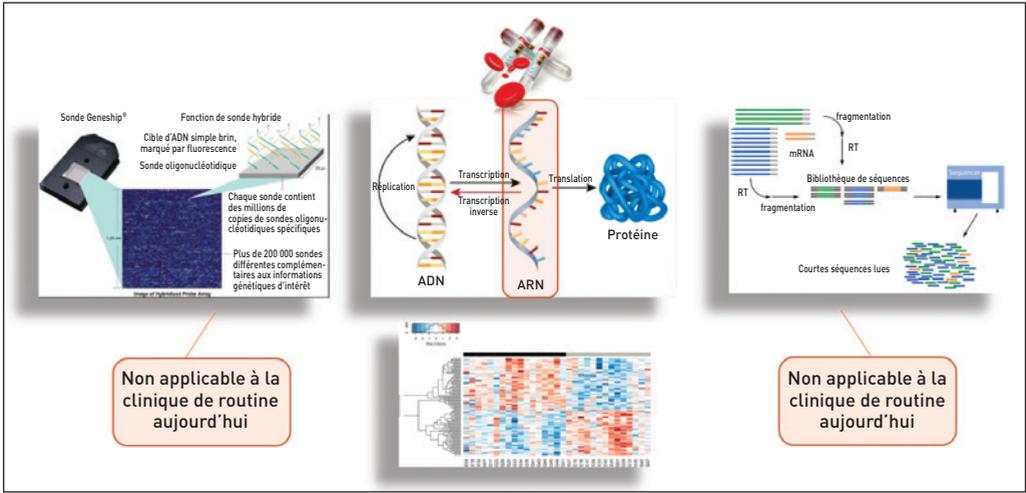


Figure 14

La transcriptomique permet, grâce à l'analyse des ARN messagers, d'identifier des biomarqueurs caractérisant le système immunitaire du patient.

cellule vers le cytoplasme où elle sera traduite en protéine. Les puces à ADN, et plus récemment le séquençage ARN, permettent la quantification systématique de ces ARN messagers et donc d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données. Ces technologies sont toutefois réservées à la recherche et ne peuvent pas

être utilisés en routine, et en l'occurrence dans le domaine de la réanimation. Ces outils nous ont néanmoins permis d'identifier des marqueurs intéressants que l'on peut maintenant quantifier de manière totalement automatisée grâce à la technologie FilmArray® décrite plus haut (Figure 15), et ce, avec un délai de rendu de résultats tout à fait adapté à la clinique et un

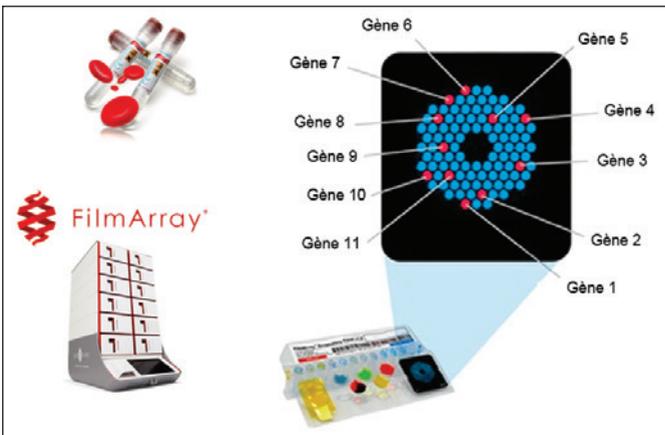


Figure 15

Identification d'ARN messagers (en rouge), marqueurs de l'état immunitaire du patient.

accès 7 jours sur 7, 24 heures sur 24.

L'utilisation de ce test fonctionnel immunitaire et de ces biomarqueurs aurait permis au clinicien de caractériser l'état immunitaire du patient que nous avons pris comme exemple. Il aurait même été intéressant d'avoir un niveau basal du statut immunitaire du patient avant la chirurgie et de mesurer ensuite en réponse l'évolution de son statut immunitaire (*Figure 16*).

Si dans un cas, le patient montrait une récupération progressive de son statut immunitaire vers l'homéostasie, le clinicien aurait pu continuer à le prendre en charge normalement, voire même anticiper, peut-être, sa sortie de réanimation. En l'occurrence, dans l'exemple traité, le patient a sans doute eu une persistance de la défaillance immunitaire, qui explique ses infections

récurrentes. Le clinicien, s'il avait eu connaissance de cette défaillance, aurait pu optimiser sa prise en charge et diminuer le risque infectieux.

On peut également envisager, dans un futur probablement proche, d'utiliser des immunothérapies qui permettraient de restaurer le statut immunitaire du patient, l'aideraient à récupérer, et donc à prévenir les infections secondaires.

Ce qui est très intéressant, c'est que les thérapeutiques qui ont été énormément développés dans le domaine de l'oncologie (voir le *Chapitre de J.-P. Armand* dans *Chimie et nouvelles thérapies*) ont également un potentiel pour ce genre d'application, en particulier les thérapeutiques qui permettent de réveiller le système immunitaire et donc de pouvoir l'aider lui-même à se protéger contre les complications infectieuses.

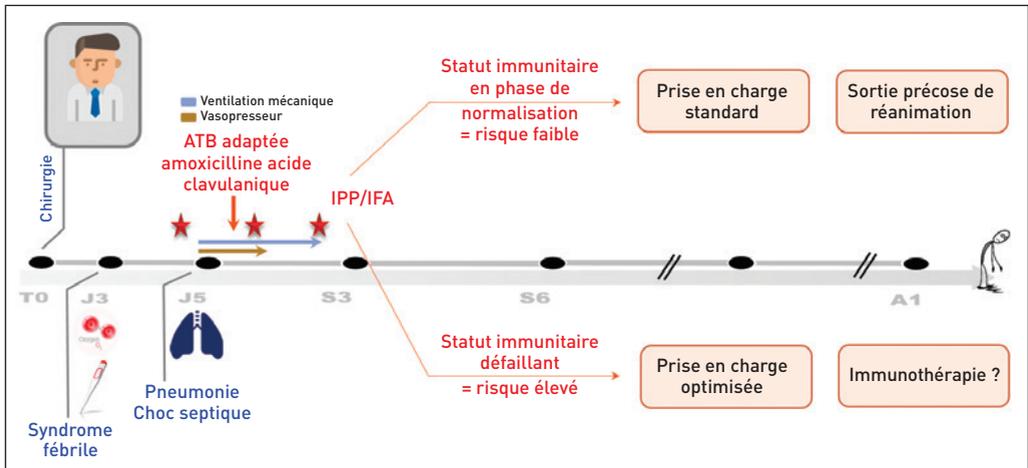


Figure 16

Prise en charge du patient si les deux techniques, test fonctionnel immunitaire (IFA) et identification des biomarqueurs du système immunitaire, sont disponibles.

## L'avenir de la médecine personnalisée dans les maladies infectieuses

Il est clair que dans le domaine des maladies infectieuses, la médecine personnalisée est nettement moins avancée que dans le domaine de l'oncologie avec, sans doute une dizaine ou une quinzaine d'années de retard, même si un antibiogramme permet une thérapeutique plus personnalisée.

Il est clair que les choses vont évoluer et que la biologie moléculaire va jouer un rôle sans doute essentiel dans cette évolution, à la fois sur le volet pathogène, mais également sur le volet de la réponse de l'hôte.

Comme dans beaucoup de domaines, on va évoluer vers des technologies d'analyse beaucoup plus complexes permettant de caractériser le système immunitaire des patients.

Nous avons vu que de nouveaux outils vont être mis sur le marché, mais la R&D s'intéresse aussi à beaucoup d'autres répertoires : la métabolomique<sup>10</sup>, la génomique<sup>11</sup>, etc., qui vont générer une énorme quantité de données très difficiles à interpréter pour le clinicien. Donc l'avenir repose aussi sur la création des outils qui permettront d'intégrer ces informations et les rendre facilement utilisables par le clinicien.

10. Métabolomique : étude des différents métabolites, qui sont créés lors d'un métabolisme comme les acides gras dans le corps humain.

11. Génomique : étude des génomes, ensembles de gènes dont on étudie le fonctionnement à l'échelle génomique.



# Chimie fine et pharmacie

Gérard Guillaumot est directeur scientifique dans l'entreprise pharmaceutique Seqens<sup>1</sup>.

Afin d'illustrer la contribution des sociétés de chimie fine au développement des molécules actives et de montrer comment elles participent à la chaîne de valeurs du médicament aujourd'hui, remettons tout d'abord le marché pharmaceutique dans son contexte, avant d'expliciter quatre expertises typiques du travail des sociétés de chimie fine.

## 1 Contexte général

### 1.1. Contexte  conomique

Le marché pharmaceutique mondial est un marché de 1 000 milliards d'euros en 2018. Les principes actifs représentent environ 7 % de cette somme, soit 82 milliards, dont 75 sur les petites molécules inférieures à 1 000 daltons<sup>2</sup>, avec une croissance

annuelle de 6   7 %. Les entités biologiques représentent aujourd'hui 7 milliards d'euros avec une croissance plus importante.

Les sociétés communément appelées CRO<sup>3</sup> (« *Contract Research Organization* ») s'occupent des « phases amont » de la caractérisation ( valuation, toxicologie) et représentent 50 % des capacités nécessaires et qui sont sous-traitées par les sociétés pharmaceutiques. Les CDMO<sup>4</sup> (« *Chemical Development Manufacturing Organization* ») comme Seqens, plutôt présentes sur les phases aval, ne représentent que 25 % des capacités sous-traitées par ces mêmes sociétés.

3. CRO : « *Contract Research Organization* », soit société de recherche contractuelle, entreprise qui fournit ses services dans le domaine de la recherche biomédicale.

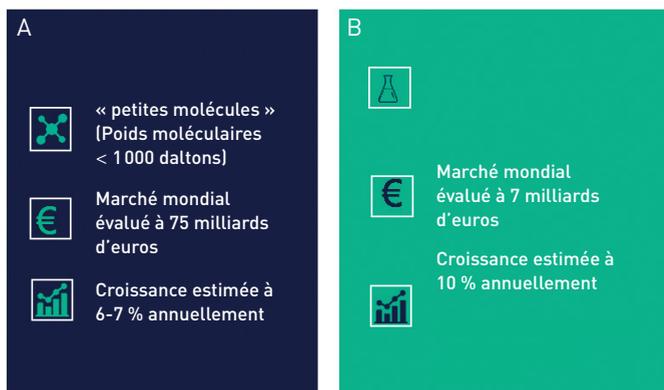
4. CDMO : entreprise sous-traitante ou d'externalisation dans la fabrication de produits pharmaceutiques.

1. [www.seqens.com/fr/](http://www.seqens.com/fr/)

2. Dalton : unité de masse atomique utilisée en biologie, correspondant environ à 1 g/mol.

Figure 1

Contexte économique des entreprises de chimie fine sur le développement et la production de matières premières spécifiques, d'intermédiaires avancés et de principes actifs : A) petites molécules ; B) entités biologiques.



Un rappel pour bien se représenter la taille relative des entités moléculaires thérapeutiques : les « petites molécules thérapeutiques » sont inférieures à 1 000 daltons, les polypeptides inférieurs à 5 000, les fragments d'anticorps à 25 000, les protéines enzymatiques de 50 000 à 100 000 daltons et les anticorps monoclonaux<sup>5</sup> sont supérieurs à 100 000 daltons. Seqens est actif sur la partie verte de la *Figure 1* : les petites molécules thérapeutiques et les protéines enzymatiques.

5. Anticorps monoclonal (ou MAB, « *monoclonal antibody* » en anglais) : anticorps reconnaissant le même antigène créé par une même lignée de lymphocytes B.

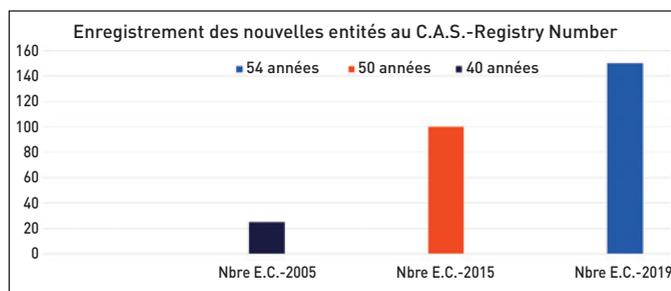
## 1.2. Contexte scientifique

Début 2019, date historique, la 150 000 000<sup>e</sup> structure a été enregistrée par le Chemical Abstract de l'American Chemical Society (*Figure 2*), l'institution qui donne un numéro à chaque molécule nouvelle identifiée (base de données C.A.S.-R.N.). De 1962 à 2005, 25 millions de molécules ont ainsi été enregistrées. De 2005 à 2015, 75 millions ont été rajoutées, ce qui est considérable. Et de 2015 à 2019, il y a encore eu 50 millions de molécules de plus d'inventoriées, et cette tendance va encore s'accroître.

La *Figure 3* donne une molécule dont Seqens est le premier producteur mondial, la molécule d'aspirine, qui a été la première molécule active découverte et isolée ; plus

Figure 2

Évolution de l'enregistrement des molécules de synthèse dans la Base de données du Chemical Abstract (C.A.S.-R.N.).



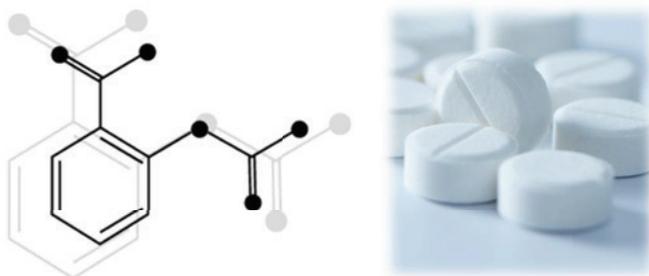


Figure 3

Molécule d'aspirine (acide acétylsalicylique).

précisément découverte en 1829, synthétisée en 1853 et obtenue industriellement en 1897. Il a donc fallu quarante ans pour qu'elle soit industrialisée. La consommation française, aujourd'hui, est de 1 500 tonnes par an.

Sur la **Figure 4** est représentée la molécule d'insuline<sup>6</sup>. Elle est constituée d'un

enchaînement d'acides aminés, deux chaînes polypeptidiques liées par des liaisons (des ponts disulfure<sup>7</sup>). Cette molécule est trente fois plus grosse que l'aspirine. Ici, il s'agit de l'insuline humaine ; il existe de nombreuses autres insulines qui sont toutes distinguées dans les bases de données par un identifiant propre.

6. Insuline : hormone protéique créée dans le pancréas qui favorise l'absorption du sucre (glucose) dans le sang.

7. Pont disulfure : liaison entre deux atomes de soufre (-S-S-).

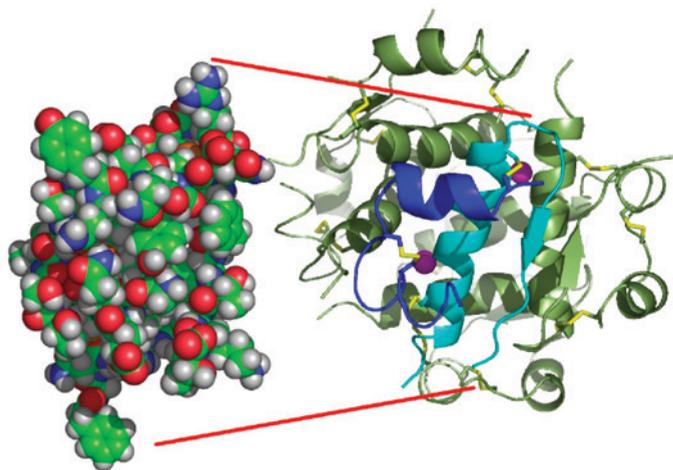


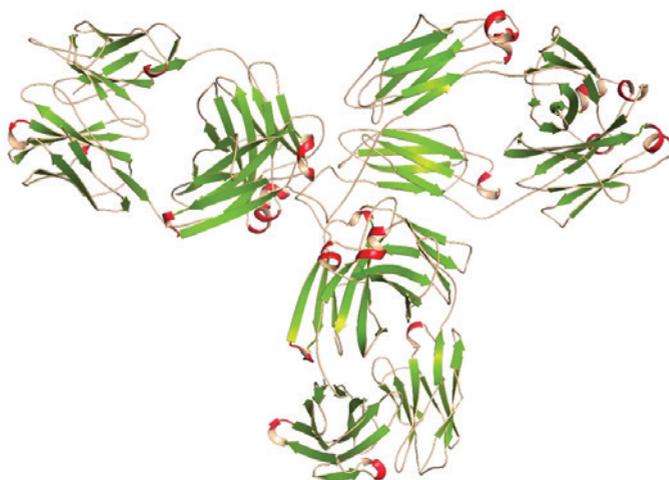
Figure 4

Représentation spatiale de l'insuline humaine.

Source : Wikipédia, licence cc-by-2.5, Isaac Yonemoto.

Figure 5

Représentation spatiale  
d'un anticorps monoclonal  
(« KEYTRUDA », 149 000 Da).



La **Figure 5** donne un exemple d'anticorps monoclonal qui comprend plusieurs chaînes protéiques. C'est encore trente fois plus gros que l'insuline donc neuf cents fois plus gros que l'aspirine. On peut concevoir qu'une telle molécule puisse traverser les membranes cellulaires et pénétrer dans les cellules.

## 2 Comparaison des exemples actuels et passés

La société Seqens (**Encart : « Seqens, en quelques chiffres »**) a acquis au fil des ans quatre expertises typiques de son métier : la chimie enzymatique, la chimie en flux, l'étude des formes solides et le développement de méthodes analytiques.

### 2.1. La chimie enzymatique

La chimie enzymatique a considérablement évolué en cinquante ans. En 1987 à titre d'exemple, la résolution de l'hydroxyméthylbenzodioxane

avait été réalisée au laboratoire, et cette molécule servait à cibler les récepteurs de la sérotonine<sup>8</sup> (**Figure 7**). À l'époque, on accédait uniquement à des enzymes commercialement disponibles. Ces enzymes étaient essentiellement efficaces dans des milieux aqueux et avec une limitation de température à 40 °C.

Cela nous a amenés par la suite, dans les années 2000-2005, à acquérir une société de biotechnologies française, Proteus, basée à Nîmes, spécialisée dans les micro-organismes extrémophiles et disposant d'une large gamme de protéines catalytiques. Cela nous donnait également accès aux techniques de criblage à haut débit<sup>9</sup> pour obtenir les meilleurs clones possibles (**Figure 8**). De plus, la possibilité d'utiliser des

8. Sérotonine : neurotransmetteur dans le système nerveux central.

9. Criblage à haut débit : technique combinatoire, souvent automatisée, visant réaliser la synthèse de grandes quantités de molécules en même temps.

## SEQENS, EN QUELQUES CHIFFRES

Seqens (**Figure 6**) est une CDMO, 3 200 collaborateurs, 1 milliard de chiffre d'affaires, 1 000 clients sur trois continents (en Asie, en Europe et au Canada) et 300 scientifiques.



Figure 6

Seqens dans le monde.

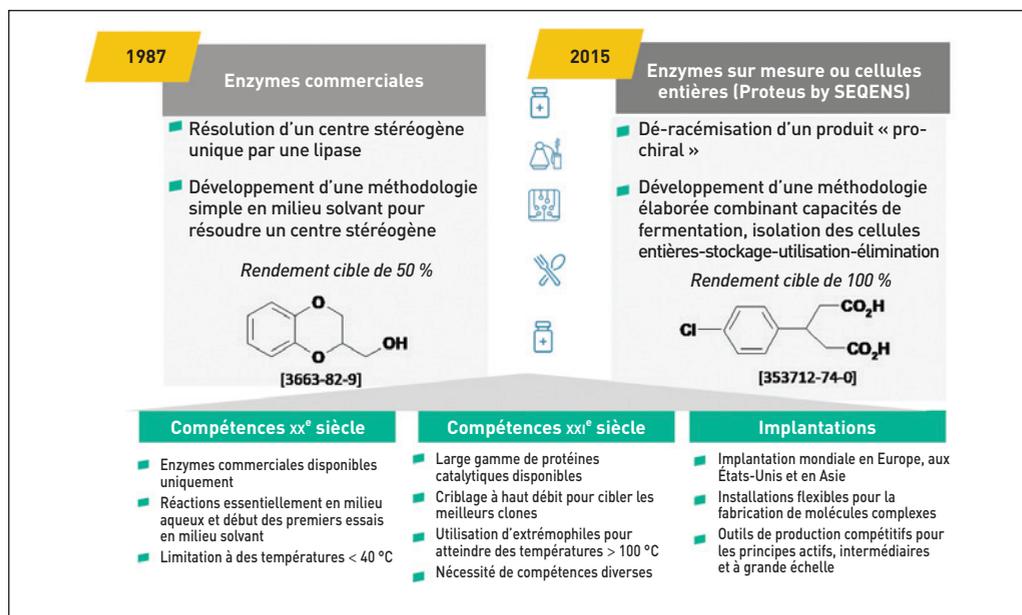


Figure 7

Histoire de la chimie enzymatique dans le secteur de la pharmacologie et évolution des rendements de production.



**Figure 8**

Le criblage à haut débit permet de tester une large gamme de variants permettant de cibler le plus actif.

Source : Proteus, Nîmes.

micro-organismes extrêmophiles donnait accès à des systèmes enzymatiques opérant à des températures supérieures à 100 °C, ce qui nous a permis de cibler le précurseur du baclofène<sup>10</sup> avec un rendement de 100 % grâce à la présence d'un carbone prochiral<sup>11</sup> dans la structure d'un précurseur de cette molécule.

La **Figure 8** montre, à titre d'exemple, des plaques à 96 puits qui permettent de faire du criblage avec différentes protéines et de localiser les clones les plus actifs, mis en évidence par une réaction colorimétrique.

## 2.2. La chimie en flux (fluidique)

Une deuxième expertise qui se développe aujourd'hui est la chimie en flux<sup>12</sup> (**Figure 9**). Notre première expérience date de 1988, où il s'agissait de travailler sur un

réarrangement de type Claisen [3,3]<sup>13</sup>, une réaction qui dégageait tant de chaleur qu'on était incapable de la mener au-delà de 50 ou 100 grammes faute de savoir évacuer les calories produites. Le problème avait été résolu, à l'époque, en réalisant un montage artisanal et en réalisant la mise au point par une approche méthodologique de type « essai-erreur ». Début 2019, un appareil commercial a été acheté pour faire ce qu'on appelle de la « flow » (la fluide), « *flow chemical* » ou « *flow synthesis* », une technique qui nous permet de réaliser des réactions qui avaient été jusque-là sous-traitées en Asie sur les vingt à trente dernières années. Ces réactions, notamment de dimérisation<sup>14</sup>, de nitration<sup>15</sup>, de réduction, aujourd'hui, peuvent désormais être reprises dans nos usines françaises. Les techniques de « flow » permettent d'atteindre des pressions et

10. Baclofène : molécule ayant un effet myorelaxant c'est-à-dire un effet de relaxation musculaire.

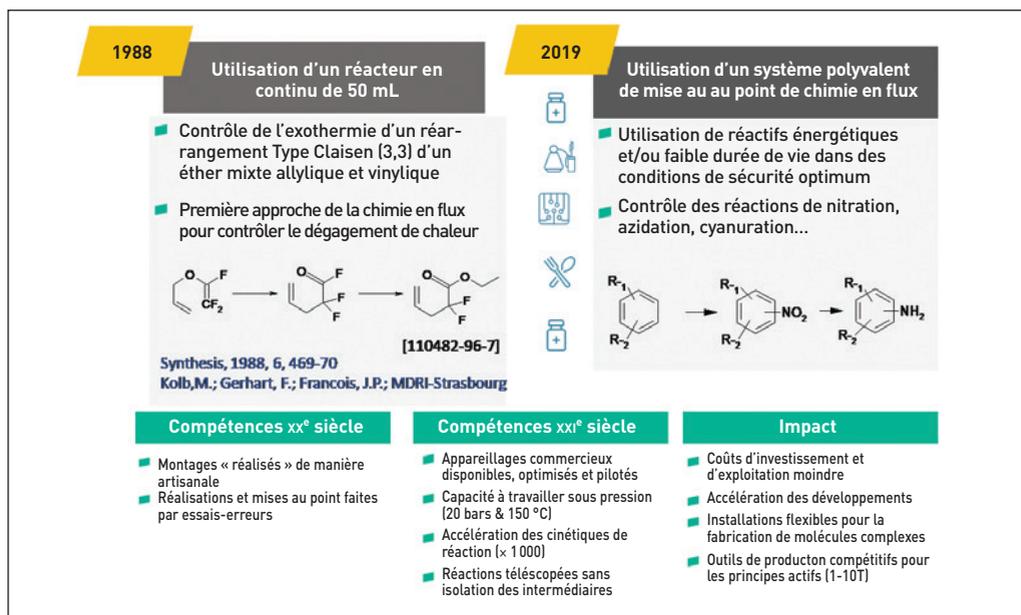
11. Carbone prochiral : carbone achiral pouvant être converti en carbone chiral en une seule étape de réaction chimique.

12. Chimie en flux : utilisation d'installations permettant de réaliser des réactions chimiques en continu sans utiliser des réacteurs fermés.

13. Réarrangement de Claisen : réaction chimique faisant intervenir des alcènes et conduisant à la formation d'une liaison carbone-carbone.

14. Dimérisation : production d'un polymère (ici avec deux motifs répétitifs) à partir de deux monomères (motifs) différents.

15. Nitration : réaction permettant d'introduire un ou plusieurs groupements nitro (-NO<sub>2</sub>) dans une molécule.



des températures importantes (20 bars/150 °C), ce qui conduit à des accélérations de cinétiques d'un facteur 1 000.

La **Figure 10A** montre un montage tel qu'on en faisait en 1992. En l'occurrence, c'est un montage pour faire de l'ozonolyse<sup>16</sup>. Pour comparaison, le type d'appareil utilisé en 2019 qui est maintenant disponible commercialement et qui est devenu commun dans les sociétés de chimie fine : **Figure 10B**. Pour illustrer le progrès accompli : dans un réacteur industriel, il n'est pas rare de voir des temps de 10 heures de réaction, pendant lesquelles le réactif réagit avec un substrat. Grâce aux technologies de « flow », il est possible de réaliser la même réaction en 36 secondes. Les

conséquences sont fondamentales et il en résulte des possibilités démultipliées pour la chimie fine d'aujourd'hui.

### 2.3. L'étude des formes solides

La plupart des médicaments ou des principes actifs

Figure 9

La chimie en flux a connu des progrès considérables depuis une trentaine d'années (comparaison 1988-2019).

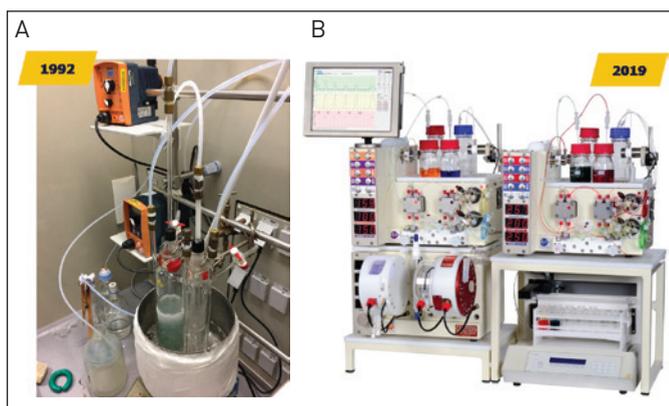


Figure 10

Pour la chimie en flux, nous sommes passés d'un montage dédié (A) à une unité flexible multi-réactionnelle (B) (comparaison 1992-2019).

Source : B) www.vapourtec.com/

16. Réaction chimique faisant intervenir de l'ozone (O<sub>3</sub>) et permettant d'oxyder un alcène et ainsi produire deux fonctions carbonyle (C=O).

commercialisés sont des formes solides (Figure 11). Dans les années 1990, ces formes solides étaient caractérisées par une approche classique : mesure des points de fusion, et présence de solvates ou d'hydrates, la forme cristalline était observée au microscope optique. Mais en 1998, il y a eu un problème grave de polymorphisme<sup>17</sup> sur un médicament antisida, le Ritonavir. La société productrice a ainsi dû retirer l'ensemble de sa production du marché car les profils de dissolution n'étaient plus les mêmes et l'efficacité du médicament n'était plus la même dans les conditions habituelles d'administration.

Maintenant, en 2019, les caractérisations des formes

solides sont considérablement plus approfondies. On regarde la taille des cristaux, le polymorphisme, la filtrabilité, la microscopie électronique à balayage<sup>18</sup>, la diffraction X<sup>19</sup> sur les poudres et les analyses thermogravimétriques<sup>20</sup> sont devenus des méthodes de routine.

Sur la Figure 12, par exemple, sont représentées des photos de cristaux obtenus au laboratoire dans le cadre d'un contrôle de cristallisation

Figure 11

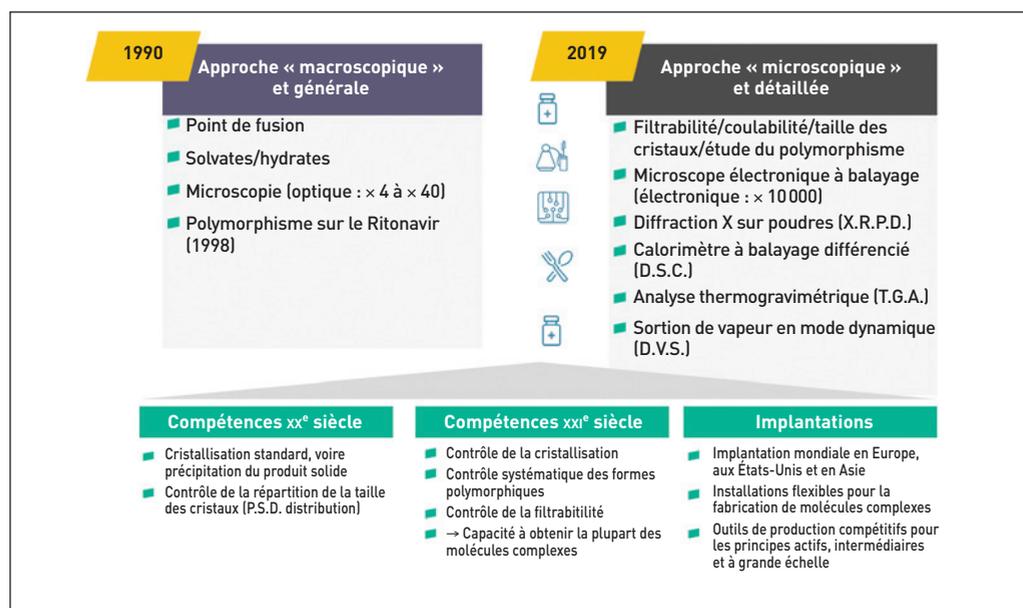
Évolution des différents types d'analyse des formes solides (comparaison 1990-2019).

17. Polymorphisme : capacité d'un composé à changer de forme spontanément en fonction des conditions du milieu dans lequel il est présent.

18. Microscopie électronique à balayage : technique de microscopie ayant une résolution comprise entre 0,4 et 20 nanomètres.

19. Diffraction des rayons X : technique d'analyse de solides reposant sur la diffusion élastique de rayons X par un solide donnant lieu à des interférences d'autant plus marquées que la matière est ordonnée (cristallin).

20. Thermogravimétrie : techniques d'analyse étudiant la variation de masse d'un échantillon par rapport au temps, à une température donnée.



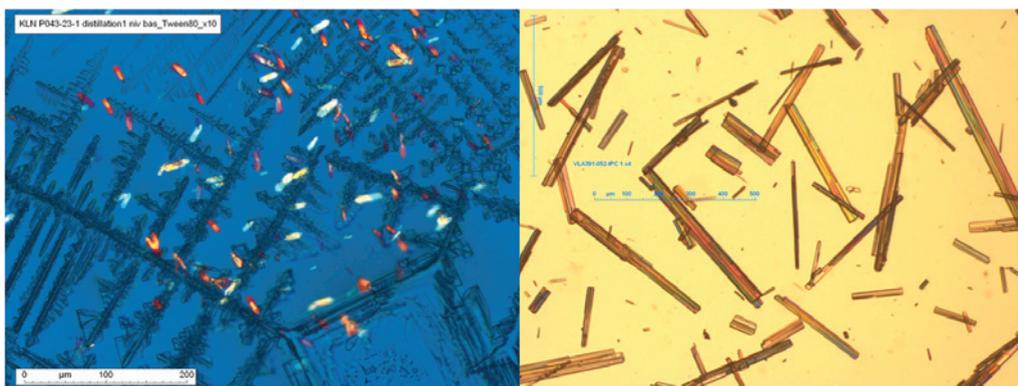


Figure 12

Des cristaux contrôlés en laboratoire.

pratiqué aujourd'hui. D'un côté, on observe un maillage<sup>21</sup>, de l'autre, c'est beaucoup plus erratique ; la présence d'un mélange de formes cristallines peut ainsi être mise en évidence.

21. Maillage : association orientée de deux ou plusieurs cristaux identiques.

#### 2.4. Développement et validation de méthodes analytiques

Les méthodes analytiques, à la fois basées sur des appareillages et des méthodologies d'utilisation (Figure 13), sont devenues des facteurs de sélection extrêmement importants dans le choix des

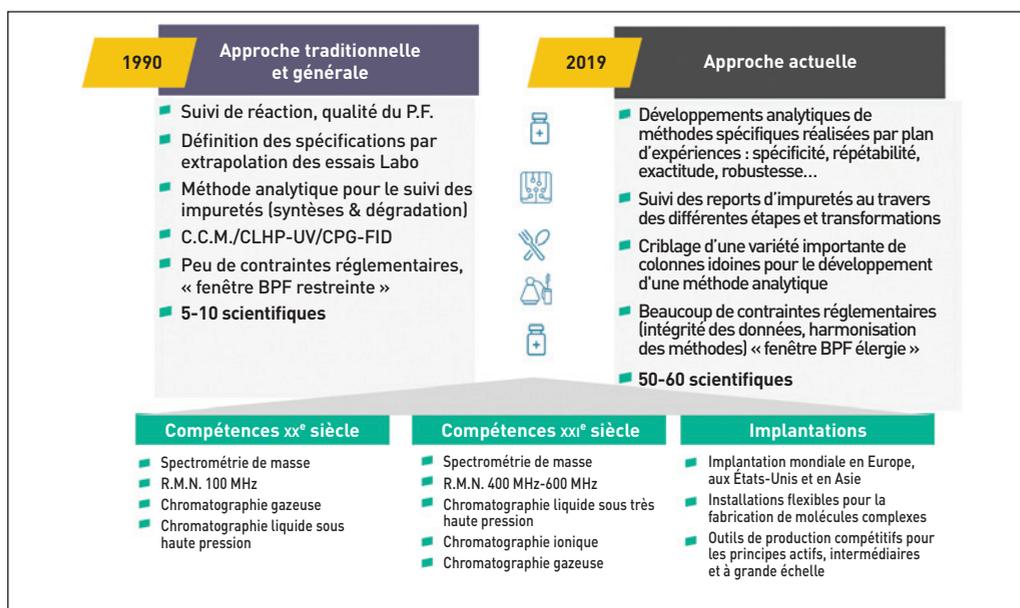


Figure 13

Évolution des techniques d'analyse dans l'élaboration de procédés industriels (comparaison 1990-2019). CCM : chromatographie sur couche mince ; CLHP-UV : chromatographie liquide haute pression ultra-violet ; CG-FID : chromatographie gazeuse à ionisation de flamme.

sociétés de sous-traitance. En 1990, des suivis de réactions étaient effectués, la qualité du produit fini était bien-sûr contrôlée. Des méthodes analytiques étaient établies pour le suivi des impuretés de synthèse ou de dégradation, mais avec des contraintes réglementaires nettement plus légères que celles appliquées aujourd'hui. Pour un groupe de vingt scientifiques

au laboratoire de synthèse, entre cinq et dix scientifiques se trouvaient en développement analytique. En 2019, il y a plus de scientifiques en développement analytique qu'en laboratoire de synthèse parce que les contraintes qualité et réglementaires sont devenues beaucoup plus importantes : le nombre d'étapes de synthèses augmente, les séquences deviennent de plus

### LES PROGRÈS DE LA QUALITÉ GRÂCE À LA TECHNOLOGIE

Pour récapituler l'évolution de ces trente dernières années dans la chimie pharmaceutique, on peut souligner qu'elle a permis une offre beaucoup plus importante de structures chimiques beaucoup plus complexes (Figure 14). C'est le résultat de l'évolution des méthodes de synthèse en chimie, accompagnées par des méthodes analytiques rapides et pertinentes et appuyées par la maîtrise de cristallisations très élaborées.

L'implication pour des sociétés comme Seqens consiste à maîtriser un panel élargi de technologies, comme le criblage à haut débit, mais aussi la maîtrise précise des conditions de réactions rendue accessible par des analyses en continu extrêmement rapides.

Il est clair que toutes ces évolutions technologiques ont permis l'émergence de nouvelles expertises qui contribuent à un meilleur contrôle des productions et à une plus grande variété dans l'offre de structures chimiques disponibles.

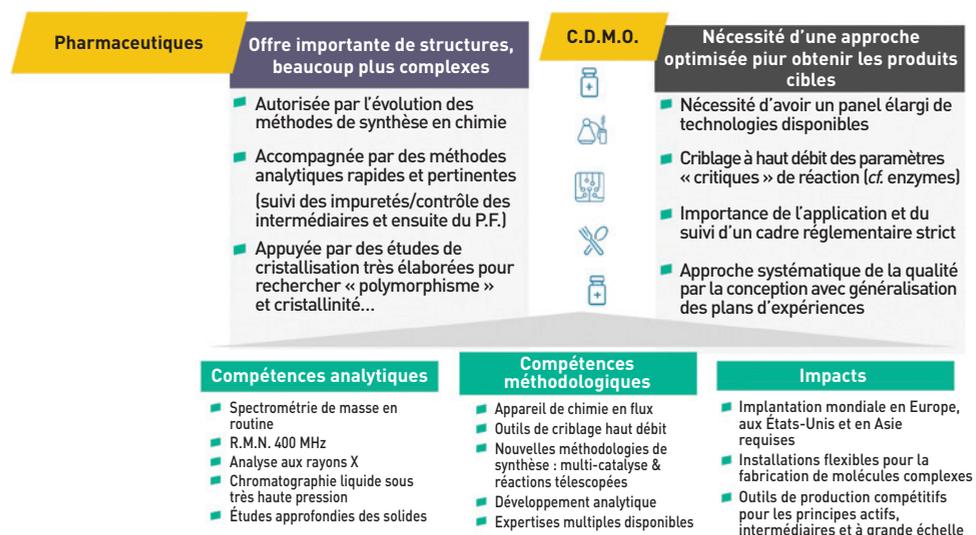


Figure 14

Lien entre l'industrie pharmaceutique et les évolutions de protocoles de développement dans les CDMO.

en plus compliquées, et il y a nécessité de suivi des impuretés au travers des différentes étapes, un criblage préalable pour le choix des colonnes dans le développement de méthodes analytiques, des plans d'expériences pour obtenir les meilleures conditions expérimentales... Cela a été un bouleversement et cette évolution reste un point d'inflexion sur nos métiers.

### 3 La nouvelle industrie pharmaceutique

Ni sur le plan de l'approche technique de la synthèse chimique, ni sur les performances de niveau de qualité si essentielles à l'industrie pharmaceutique, les entreprises du  $xx^e$  siècle n'approchaient celles d'aujourd'hui.

On en trouve des exemples dans les progrès relatifs à la qualité et aux façons dont l'industrie d'aujourd'hui approche la question par des nouveaux protocoles, par exemple la gestion « totale » de la qualité

« de la conception au produit fini » (*Encart : « Les progrès de la qualité grâce à la technologie »*).

On en voit aussi l'illustration dans l'élargissement stupéfiant des performances de cette industrie en termes de complexité des structures moléculaires qu'elle sait aujourd'hui synthétiser et caractériser. Tout cela est la conséquence des formidables progrès scientifiques et techniques des cinquante dernières années.

Le Voxilaprevir (*Figure 15*) fait partie du panel de molécules qui ont permis de pratiquement éradiquer l'hépatite C. Il est présenté ici pour illustrer la complexité des molécules que l'industrie est aujourd'hui capable de produire : 8 centres stéréogènes<sup>22</sup>, une masse molaire de 868 daltons et une synthèse qui nécessite 40 étapes !

22. Centre stéréogène : centre asymétrique (par exemple un carbone dans une structure tétragonale).

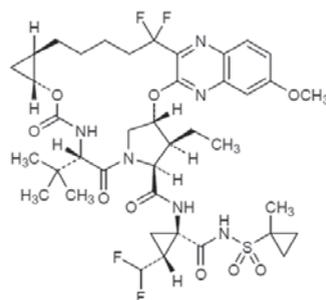


Figure 15

Le Voxilaprevir.

## Les défis à portée de main pour le $xxi^e$ siècle

Qu'est ce qui nous permet de contribuer avec tant d'efficacité à l'élaboration des entités chimiques et thérapeutiques du  $xxi^e$  siècle ? C'est la capacité à prendre en compte la complexité croissante de ces molécules parce que nous maîtrisons un éventail d'outils analytiques très performants, et le fait de disposer de l'expertise scientifique nécessaire pour en extraire le potentiel, pour ensuite adapter les protocoles

expérimentaux et appliquer les méthodologies idoines.

Cela nous permet de mettre en place des méthodologies de développement pertinentes : criblages à haut débit, optimisation des séquences, approches systématiques de la qualité par la conception.

Par ailleurs, nous sommes capables d'optimiser une transposition industrielle à partir des études au laboratoire, que ce soit en rationalisant le choix des séquences réactionnelles, ou celui des techniques de mise en œuvre (utilisation de la fluidique ? Sélection de réacteurs spécifiques ou réacteurs classiques à double enveloppe par exemple ?).

Les succès spectaculaires déjà obtenus vont se généraliser. À l'horizon, se trouve une chimie capable de relever les défis, de traiter les problèmes, qu'ils soient techniques, économiques ou environnementaux, et surtout d'offrir à l'homme des solutions préservant l'avenir.

# L'édition du génomome : une révolution en marche

D'après la conférence de Philippe Duchateau

*Philippe Duchateau est directeur Scientifique du groupe Collectis<sup>1</sup>.*

## 1 Histoire et origine de l'édition génomique

L'édition génomique est une révolution en marche. Elle permet de changer un gène de façon sélective à un endroit voulu. Si cette technologie peut faire peur, elle entrera dans tous les cas de plus en plus dans les laboratoires de biologie.

Telle la voiture Ford T, symbole de la révolution industrielle (*Figure 1*), l'édition du génome en est une aussi importante.

Tout a commencé il y a dix-huit mille ans quand les hommes

ont commencé à se sédentariser. Ils ont dû alors domestiquer l'environnement – les animaux, les plantes – et ont créé l'agriculture (*Figure 2*). Avec l'agriculture, nous avons commencé à améliorer les plantes en les hybridant, en les croisant, en les sélectionnant... Nous faisons ainsi de la modification du génome sans le savoir.

Il y a neuf mille ans, l'épi de maïs d'origine n'était pas aussi grand qu'un petit doigt ; on arrive aujourd'hui à des épis de trente centimètres. C'est aussi le cas pour les bovins, on arrive aujourd'hui, juste par sélections et croisements, à

1. [www.collectis.com](http://www.collectis.com)



Figure 1

Des revues prestigieuses comme Science, « 2015-Breakthrough of the year », ou le National Geographic, « The DNA Revolution », mentionnent sur leurs couvertures une révolution dans la génomique qui serait comparable à la révolution industrielle du XIX<sup>e</sup> siècle.



Figure 2

Les processus de sédentarisation des hommes sont aussi synonymes des débuts de l'intérêt des hommes pour l'agriculture.

des vaches qui peuvent produire jusqu'à soixante litres de lait par jour. Toute cette évolution de l'agriculture relevait déjà de la modification du génome.

Ce n'est qu'en 1953 que la structure de l'ADN a été élucidée, avec sa célèbre double

hélice et cette structure en fermeture éclair appariant différentes bases nucléiques, A, G, T, C – A avec T et G avec C (Figure 3).

L'ADN se constitue en chromosomes (vingt-deux chromosomes plus les chromosomes sexuels chez l'homme), qui

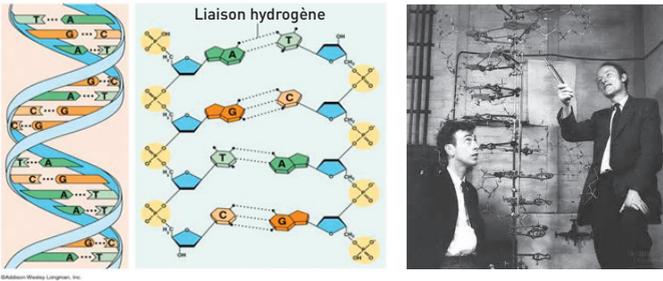


Figure 3

L'ADN, dont la structure a été découverte par James Watson et Fredrick Crick, a une forme hélicoïdale et a pour caractéristique l'emboîtement des paires de bases, A avec T et G avec C. Un génome correspond à 2x3 milliards de paires de bases, soit 20 000 gènes.

sont contenus dans un noyau, lui-même contenu dans une cellule. C'est l'assemblage de cellules, environ  $10^{13}$  dans notre organisme, qui nous constitue (Figure 4).

Les gènes portés par l'ADN définissent tout être vivant (Figure 5) : de la bactérie, du virus, à la forme de notre oreille et à notre taille ; ils peuvent aussi présenter un défaut et être responsables de maladies génétiques.

aléatoires et croisements, aujourd'hui on a développé des outils d'une précision remarquable qui permettent d'aller modifier finement l'ADN, à la base près. On ne fait plus confiance au hasard, on décide exactement de la modification qu'on veut faire dans le génome, avec une meilleure sécurité du résultat, car on sait exactement ce qu'on fait, alors que la plupart des plantes que nous avons aujourd'hui dans nos champs ont été générées aléatoirement par des bombardements de rayons ionisants, suite à quoi on sélectionnait simplement la plante aux propriétés qui nous intéressaient.

Nous n'en sommes plus là aujourd'hui, mais nous sommes entrés dans l'aire de la précision chirurgicale. Cela

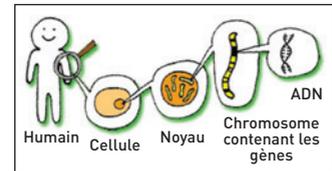


Figure 4

L'ADN dans l'organisme est contenu dans des chromosomes contenus dans des noyaux, qui eux-mêmes appartiennent aux cellules de l'organisme humain.

## 2 Mise en pratique de l'édition du génome

### 2.1. Principe

L'édition du génome consiste à aller directement d'un génome A à un génome modifié. Alors qu'auparavant tout se faisait par sélection, mutations



Figure 5

La diversification du vivant s'illustre par la forme des oreilles, les différentes races de chiens, ainsi que par les maladies génétiques comme le gigantisme et le gonflement de certaines parties du corps telles que le visage (enfant bulge<sup>2</sup>).

2. *Bulge* en anglais signifie renflement, bombement : l'enfant est donc ici atteint d'une maladie qui fait gonfler son épiderme.

s'obtient évidemment grâce à des outils : on veut aller adresser le point où l'on veut effectuer une modification et couper dans le génome à ce point précis. Pour cela, on utilise des enzymes, qu'on appelle des nucléases<sup>3</sup> (Figure 6). La Figure 7 représente la structure tridimensionnelle d'une nucléase.

L'ADN est constitué de briques, les nucléotides A, T,

G et C. Une succession de six briques (Figure 7A) correspond à 4 096 combinaisons possibles (Figure 7B). Si on les compare à un génome composé de trois milliards de bases paires, les chances d'avoir des coupures dans le génome sont innombrables. Avec des enzymes qui reconnaissent six nucléotides, leur spécificité est faible, et ce sont approximativement plus d'un million de coupures dans le génome qui vont intervenir. Autant dire que la cellule est morte.

Si l'on considère douze nucléotides, on a seize millions de

3. Nucléase : enzyme capable de couper des liaisons d'acide nucléique, par exemple qui relie deux bases de l'ADN.

Figure 6

Coupeure d'un brin hélicoïdal d'ADN pour y remplacer un gène.

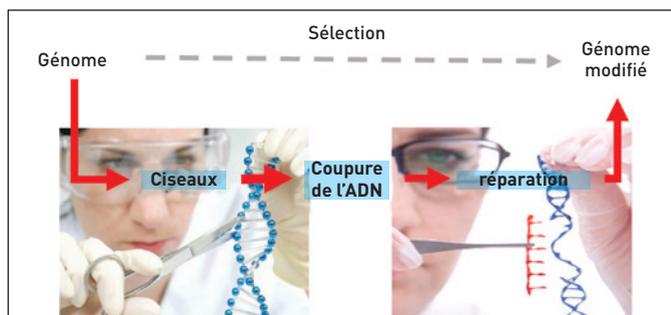


Figure 7

L'ADN est constitué par deux brins hélicoïdaux emboîtés, sur lesquels s'entortillent des nucléases qui reconnaissent des séquences d'ADN qu'ils vont couper.

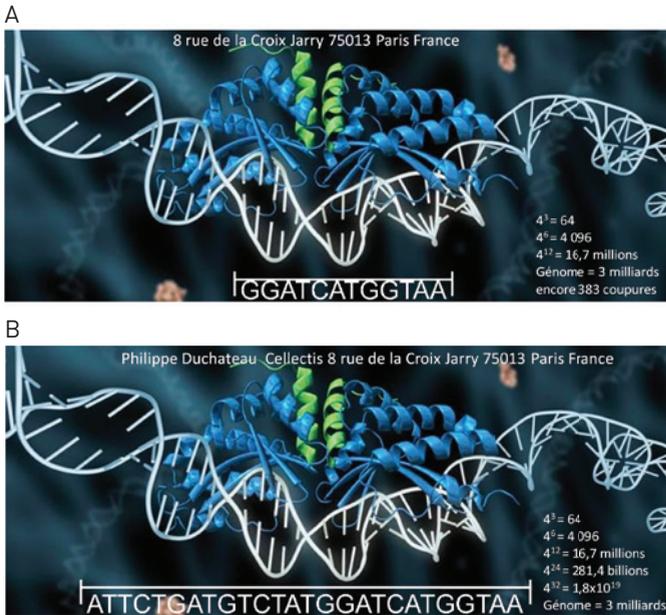


Figure 8

Plus les nucléases reconnaissent des séquences d'ADN longues, plus le ciblage sera sélectif.

combinaisons possibles (Figure 8A). Il reste encore environ quatre cents coupures possibles aléatoires dans le génome ; c'est encore très imprécis. Au laboratoire, on utilise des nucléases qui reconnaissent trente-deux paires de bases ; donc cela donne des combinaisons de l'ordre de deux cent quatre-vingt billions de possibilités (Figure 8B).

Si on compare ce chiffre au chiffre de trois milliards de paires de bases dans le génome, on voit que les chances de trouver cette séquence aléatoirement dans le génome sont virtuellement de zéro. Ce qui veut dire que quand on crée une enzyme pour cibler une séquence précise dans le génome, la probabilité pour qu'elle aille couper ailleurs est pratiquement nulle. On arrive ainsi à des outils assez spécifiques pour qu'on se permette de

faire de l'édition de génome dans des grands génomes tels que le génome humain.

## 2.2. Les outils

Aujourd'hui quatre grands outils sont à notre disposition pour cibler des séquences longues sur un ADN. Dans les années 1980, on a mis au point des *méganucléases* (Figure 9A), des enzymes qui viennent de la levure et reconnaissent entre douze et quarante nucléotides, ce qui est assez spécifique. Malheureusement, l'ingénierie des protéines nécessaire pour créer les séquences artificielles était difficile et demandait plusieurs mois de travail.

Ensuite sont arrivées les *protéines à doigts de zinc* (Figure 9B), un peu plus simples, puisque c'était un assemblage d'unités dont chacune reconnaît trois paires de bases. On pouvait assembler

ces unités pour aller cibler une séquence spécifique dans l'ADN. Malheureusement, les spécificités de ces unités sont interdépendantes, donc pas complètement prédictibles : la spécificité globale de la nucléase à doigts de zinc en pâtit donc.

Dans les années 2010, sont arrivées les *TALEN* (Figure 9C), comme les *protéines à doigts de zinc*, ce sont des enzymes chimériques dans le sens où l'on associe une protéine qui va se lier à l'ADN avec un site catalytique<sup>4</sup> qui, lui, a la propriété de couper l'ADN. Cette protéine qui se fixe à l'ADN est constituée d'une série de répétitions absolument identiques, à l'exception de deux acides aminés responsables de l'interaction avec un seul nucléotide. On définit alors un code où l'un de ces domaines

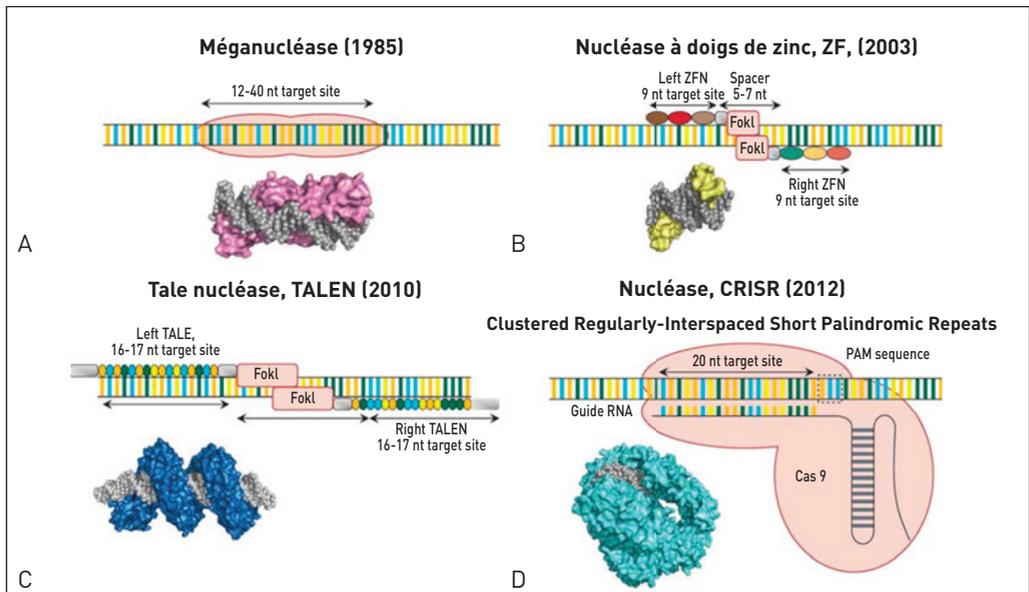
(en jaune), va reconnaître le G, le bleu va reconnaître le A, le vert va reconnaître le T. Il suffit d'assembler ces petites répétitions pour former une protéine qui va reconnaître la séquence ADN choisie. Il est relativement simple de créer ce genre de protéines et en une semaine on obtient une nucléase qui va couper exactement la séquence souhaitée.

Très récemment est apparue la technique *CRISPR* (Figure 9D) (voir aussi *Chimie et biologie de synthèse, les applications*, EDP Sciences, 2019). Le principe est le même, la seule différence est que la fixation à l'ADN est commandée par un brin d'ARN. C'est l'enzyme Cas9, un complexe protéine-ARN, qui va se fixer à l'ADN génomique en fonction de la séquence d'ARN, ce qui est très pratique et rapide. Tous les laboratoires peuvent maintenant se dispenser de faire de l'ingénierie de protéines : on commande un brin d'ARN

Figure 9

De nombreuses expériences utilisant différentes nucléases ont été réalisées de 1985 à 2012.

4. Site catalytique : site particulier d'une enzyme où ont lieu les différentes interactions.



choisi, on le reçoit le lendemain, et l'on peut réaliser les expériences.

Tous ces outils, qui ne servent qu'à couper les brins d'ADN, constituent en fait seulement la toute première étape de l'édition de génome. Ensuite, c'est la cellule qui fait le reste.

### 2.3. Méthode

L'édition de génome du gène A peut être effectuée de plusieurs façons (**Figure 10**). On fait d'abord agir une nucléase à chaque côté de la coupure pour couper le gène. La cellule met ensuite en jeu son système de réparation de son ADN pour pouvoir survivre et continuer à se multiplier. Éventuellement cette opération peut reconstituer la cible de la nucléase et celle-ci va continuer à couper. Une succession de coupures/relication<sup>5</sup> s'installe.

Les procédés de réparation de l'ADN ne sont pas infaillibles,

5. Ligation : signifie, en biochimie, la fixation d'une enzyme coupée. Ici, on va donc avoir une ligation après une coupure induite dans l'ADN.

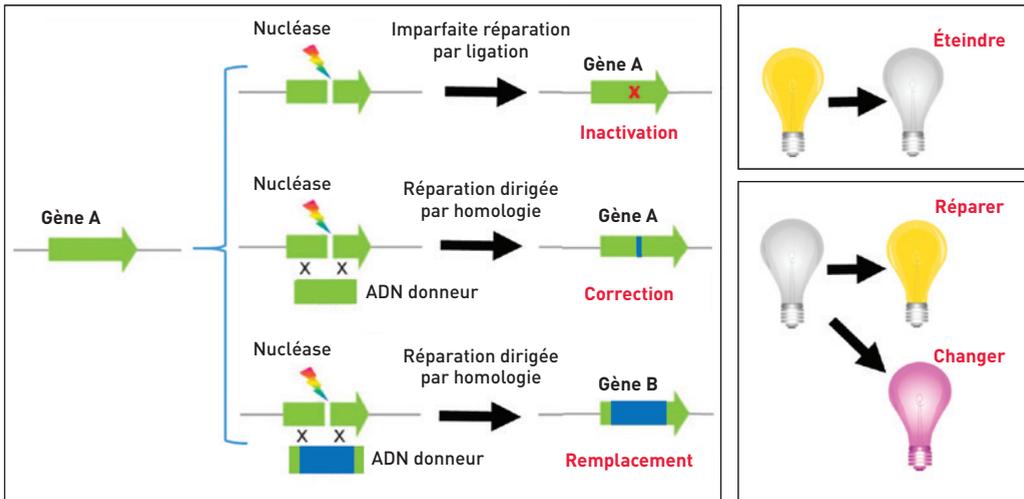
ils vont faire des erreurs. Au bout d'un certain temps on va avoir une petite délétion d'ADN ou une petite insertion d'ADN (des erreurs dans sa séquence), qui aboutissent à l'inactivation de ce gène. C'est ce que schématise la **Figure 10** (à droite) avec l'image d'une ampoule : l'ampoule brille (jaune) et les nucléases viennent l'éteindre définitivement.

Maintenant, si en plus de la nucléase on amène un morceau d'ADN complémentaire à chaque côté de la coupure, des mécanismes de réparation de l'ADN vont faire que la cellule va utiliser cet ADN pour recopier et intégrer tout ce qu'il y a dans ce morceau d'ADN complémentaire. C'est grâce à ce mécanisme qu'on arrive maintenant à corriger des mutations. Une maladie génétique avec une mutation peut être corrigée avec ce genre d'approche.

On peut même aller beaucoup plus loin, et faire en sorte que cette portion d'ADN que l'on amène avec la nucléase soit un nouveau gène, ou même

**Figure 10**

Une nucléase, en agissant sur un gène, peut induire différents types de réparation : si la réparation est imparfaite (si elle se fait par ligation), cela mènera à l'inactivation du gène. Si la réparation se fait par homologie, le gène sera soit corrigé, soit remplacé. L'édition de génome est donc analogue à une ampoule qui s'éteint (en haut, synonyme de l'inactivation du gène) ou qui change de couleur (en bas, synonyme de la réparation ou de la correction du gène).



une série de gènes. Grâce à ce mécanisme où la cellule va recopier le morceau d'ADN ajouté, on arrive même à remplacer un gène A par un gène B.

C'est ce qui est schématisé avec notre ampoule qui ne marche plus : on peut la réparer – c'est la correction de mutation – ou on peut carrément lui faire changer de couleur – c'est le remplacement de gène.

### 3 Une révolution en devenir

#### 3.1. Une multitude d'applications

Ces possibilités d'édition du génome ouvrent des perspectives d'applications phénoménales. Citons quelques exemples dans le domaine thérapeutique (**Figure 11**) :

- on peut créer des moustiques qui propagent les nucléases et rendent stérile leur population ;

ce contrôle de la population d'insectes est à l'étude pour la suppression du paludisme ;

- on peut aller couper des virus ou des voies d'entrée des virus dans les cellules ;

- on peut créer des modèles pour étudier les maladies comme le cancer ;

- on peut étudier finement, à la base près, la fonction d'un gène ;

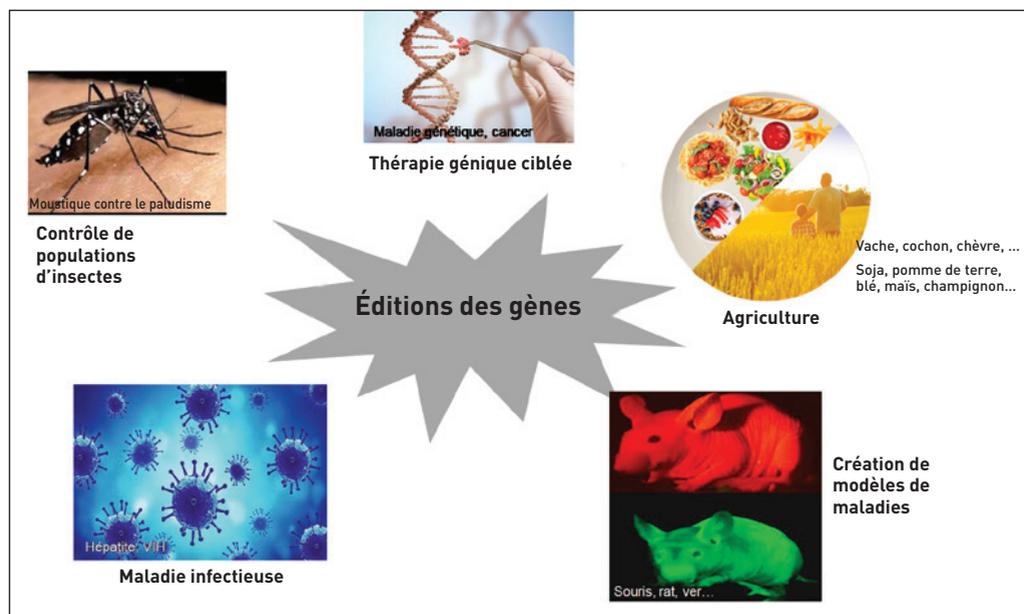
- ces techniques ont également des possibilités phénoménales en agriculture. On a aujourd'hui des sojas par exemple, qui produisent une huile très proche des caractéristiques de l'huile d'olive ;

- on sait faire des pommes de terre qui ne produisent pas d'acrylamide<sup>6</sup> lorsqu'elles sont

6. Acrylamide : 2-propénamide (amide acrylique), un composé organique qui se forme lors de la cuisson à haute température de certains composés (notamment les aliments riches en glucides et en protéines).

Figure 11

L'édition de gènes est déjà une réalité : des applications sont possibles en élevage d'insectes, agriculture, maladies infectieuses, création de modèles de maladies sur des souris, des vers...



au froid et qui donc vont se conserver.

Les possibilités sont vastes : il n'y a pas une journée sans que cent publications n'apparaissent sur des applications de l'édition du génome en biologie.

Sans aller plus loin, donnons en revanche deux exemples de traitement par la thérapie génique : sur le sida et sur le lymphome.

Le xx<sup>e</sup> siècle a été le siècle de la chimie, mais le xxi<sup>e</sup> siècle verra l'avènement de tout ce qui est produit biologique, de ce qu'on appelle les « cellules-médicaments », mot qui implique la combinaison du « *genome editing* » et de la thérapie cellulaire (Figure 12). Pour les réaliser, on prend par exemple les cellules d'un patient d'une maladie génétique, on les met en culture, on réalise une édition de génome pour supprimer l'origine de la maladie (correction ou insertion de matériel génétique) ; on lui réinjecte ensuite les cellules modifiées (Figure 13).

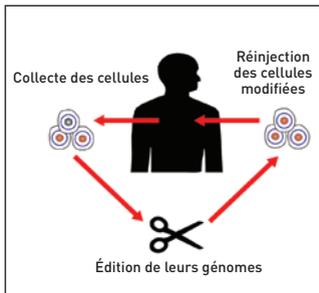


Figure 13

On suit un processus cyclique d'extraction des cellules, d'édition de leur génome et de réinjection des cellules modifiées dans l'organisme.

### 3.1. Exemple du sida

Un des premiers essais de thérapie génique a porté sur des applications antisida. Timothy Brown (Figure 14A, à gauche) avait le sida et aussi la malchance d'avoir une leucémie, pour laquelle il a été traité par une greffe de moelle. À leur grande surprise, les médecins se sont aperçus que le patient était également guéri de son sida.

Ils se sont aperçus que le donneur de moelle en fait avait une mutation dans un gène, le gène CCR5. La protéine codée par ce gène est la porte d'entrée du virus dans les lymphocytes T (cellules du système immunitaire). Cette mutation inhibait l'entrée du virus et le développement du sida. Leur démarche a été de généraliser : « *alors on va reproduire cela avec l'édition des génomes !* ». Matt Sharp (Figure 14B à droite) est le

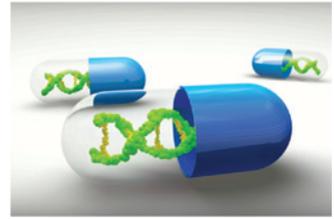


Figure 12

La médecine du xxi<sup>e</sup> siècle va s'appuyer sur les connaissances acquises en édition de génome au xx<sup>e</sup> siècle, et combiner l'édition de génome et la thérapie cellulaire, en créant des cellules-médicaments.

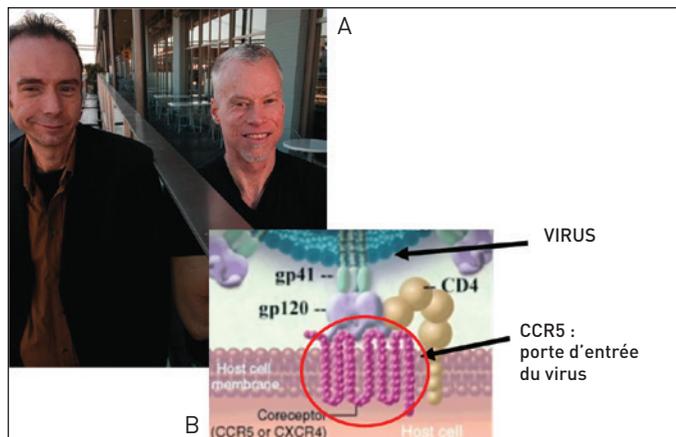
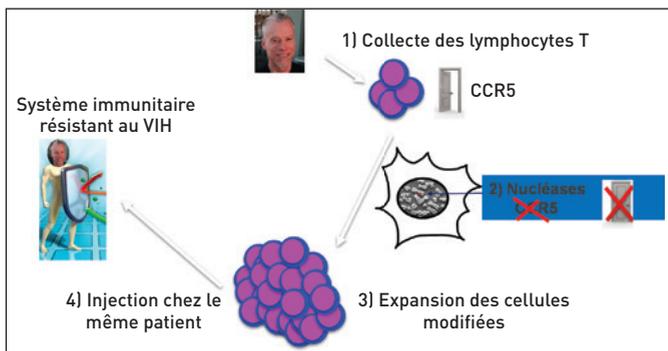


Figure 14

A) Timothy Brown (à gauche) a été la première personne guérie du sida ; Matt Sharp (à droite) est la personne ayant bénéficié du premier essai de thérapie génique anti-VIH. B) Le virus du sida entre dans l'organisme et le contamine via le gène CCR5, qui, pour Timothy Brown, avait subi une mutation.

Figure 15

Des lymphocytes T (cellules immunitaires) ont été collectés chez le patient, sur lesquelles on a fait agir une nucléase, empêchant l'atteinte par le VIH. Ces cellules ont été cultivées pendant quelques jours pour être réinfusées chez le patient, se retrouvant ainsi avec des lymphocytes T résistants à l'infection du virus HIV.



premier malade à avoir été traité de cette façon.

On a donc collecté des lymphocytes T de Matt Sharp, avec la porte grande ouverte pour l'entrée du virus du sida à l'intérieur (Figure 15). On a ensuite fait agir une nucléase sur ces cellules, de sorte à condamner l'entrée, on a cultivé pendant quelques jours les cellules, que l'on a ré-infusé chez le patient. Les lymphocytes T de ce patient étaient devenus résistants à l'infection du virus VIH.

### 3.2. Exemple du lymphome

Un autre exemple sur lequel nous travaillons au laboratoire concerne l'immunothérapie. Nous nous intéressons à l'aspect de l'immunothérapie qui consiste à travailler sur les lymphocytes T. Notre système immunitaire est une police qui surveille notre organisme pour savoir si tout va bien : pas d'infections, de virus, de bactéries ni de cellules hors contrôle. Ce sont les lymphocytes T qui effectuent ce travail de reconnaissance et destruction des cellules cancéreuses. Mais celles-ci ont développé des moyens pour paralyser ces lymphocytes T censés les attaquer.

Le patient représenté sur la Figure 16 était atteint d'un lymphome<sup>7</sup> ; on lui a prélevé de ses lymphocytes T, on les a modifiés et réinjectés ; quelques temps après on voit que son lymphome a complètement disparu. L'immunothérapie ici consiste ainsi à rééduquer le système immunitaire, qui a été dérégulé par les cellules tumorales, et lui permettre de passer outre les signaux négatifs qu'elles lui envoient.

Pour mettre en œuvre cela, on part de cellules de donneurs sains. On isole les lymphocytes T et on y introduit un récepteur artificiel spécifique d'un antigène exprimé sur les tumeurs (Figure 17) afin que le lymphocyte T puisse s'y fixer et détruire la tumeur.

Le schéma de la Figure 17 ne fonctionne cependant pas car le lymphocyte T venant d'un donneur sain, en plus d'agir sur la tumeur, reconnaît l'ensemble des molécules de l'organisme du patient comme cellules étrangères et va les détruire, entraînant sa mort !



Figure 16

Les cellules cancéreuses développent des mécanismes d'induction de tolérance face à l'organisme. L'immunothérapie consiste à abolir peu à peu cette tolérance : elle permet par exemple de faire disparaître, après douze jours, un gonflement de la peau.

7. Lymphome : cancer du système lymphatique, qui est le principal élément du système immunitaire de l'organisme.

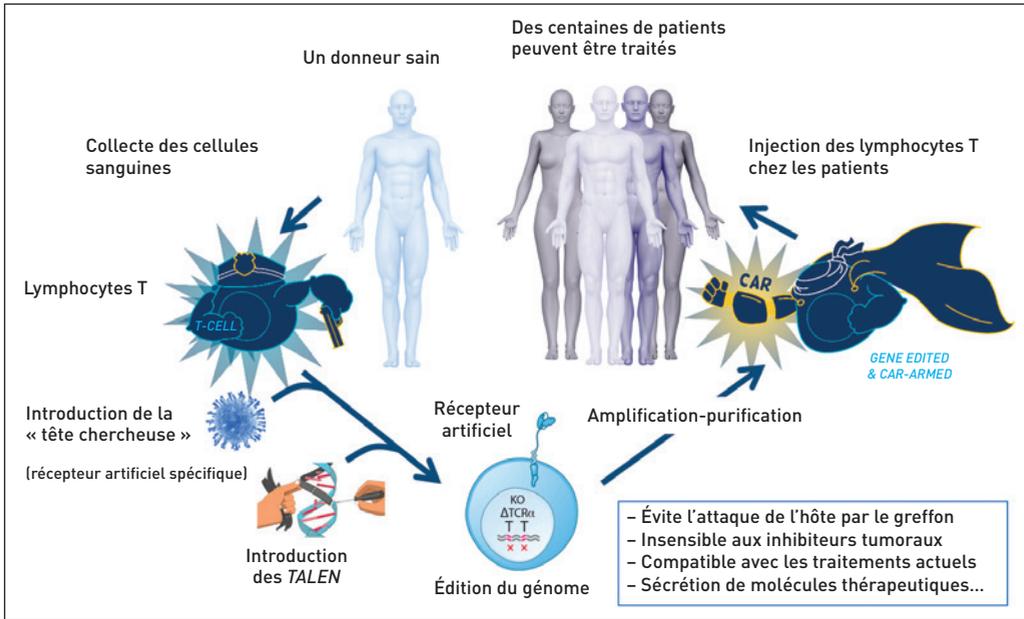


Figure 17

L'immunothérapie se met en pratique en collectant des cellules sanguines, ici des lymphocytes T, extraites d'un organisme sain, en introduisant des têtes chercheuses (ici TALEN), puis en les injectant à des patients malades après un processus d'amplification et de purification.

L'édition de génome permet de contourner cette difficulté fondamentale. Nous introduisons des *TALEN* pour inhiber par édition de génome les gènes responsables de cette attaque de l'autre par les lymphocytes T exogènes. On peut d'ailleurs en outre amener d'autres fonctionnalités à ces lymphocytes T.

L'édition de gène peut être utilisée pour modifier des récepteurs inhibiteurs ou pour rendre les cellules compatibles avec les traitements actuels. On peut même faire mieux ; on peut insérer des gènes, qui ne seront actifs que quand les lymphocytes T seront au contact de la tumeur, et commenceront à ce moment-là à sécréter des molécules à intérêt thérapeutique, qui

aideront les lymphocytes T à éradiquer la tumeur.

### 3.3. Exemple de la leucémie

Finissons par l'exemple du traitement de la leucémie, dont la preuve de principe a été établie en 2016. Deux jeunes enfants étaient atteints de leucémie ; tous les traitements avaient été tentés mais à chaque fois le cancer récidivait. Les parents, par l'intermédiaire de leur médecin, ont contacté Cellectis pour demander accès à cette nouvelle technologie qui n'avait jamais été testée chez un patient. En une seule dose, ces leucémies ont été vaincues.

Le traitement n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît car l'immunothérapie par les lymphocytes T peut induire des



Figure 18

*Il est maintenant possible de traiter et guérir des patients de leucémie, même de jeunes enfants.*

effets secondaires graves : au contact de la tumeur, le lymphocyte T non seulement va commencer à tuer la tumeur, mais aussi il va se multiplier, envoyant des signaux d'inflammation à tout l'organisme.

Chez cette petite patiente, nous n'avons pas utilisé ses propres lymphocytes T, mais des cellules provenant d'un donneur sain modifiées pour exprimer un récepteur spécifique de sa leucémie (*Figure 18*).

On a également retiré un récepteur situé à la surface des lymphocytes T pour éviter

l'attaque de tout son organisme, et pour que ces lymphocytes T soient vraiment spécifiques de la tumeur. Par ailleurs, on a retiré un autre gène, CD52, qui était cible d'un anticorps utilisé pour le traitement de ces leucémies. Une seule injection, en 2006, a suffi. Aujourd'hui cette petite fille est complètement guérie, sans aucun traitement en cours contre son cancer.

Ce n'est encore que le début de ces techniques, l'enfance de l'immunothérapie, l'enfance de l'édition du génome.

## L'édition du génome : un avenir prometteur

Nous pouvons rêver sur les possibilités que l'édition du génome ouvre dans le domaine de la thérapie. Pour penser « biologie moderne » aujourd'hui, il faut intégrer la génomique, la métabolique, l'édition de gènes, la synthèse d'ADN.

Aujourd'hui on peut synthétiser des chromosomes entiers. Dans le futur, il est sûr que l'on pourra synthétiser des micro-organismes complètement *de novo*<sup>8</sup>, sans support.

Et on commence déjà à penser à faire revivre des espèces éteintes...

8. *De novo* : terme utilisé en biologie pour caractériser quelque chose de nouvellement synthétisé.

# Chimie et nouvelles thérapies

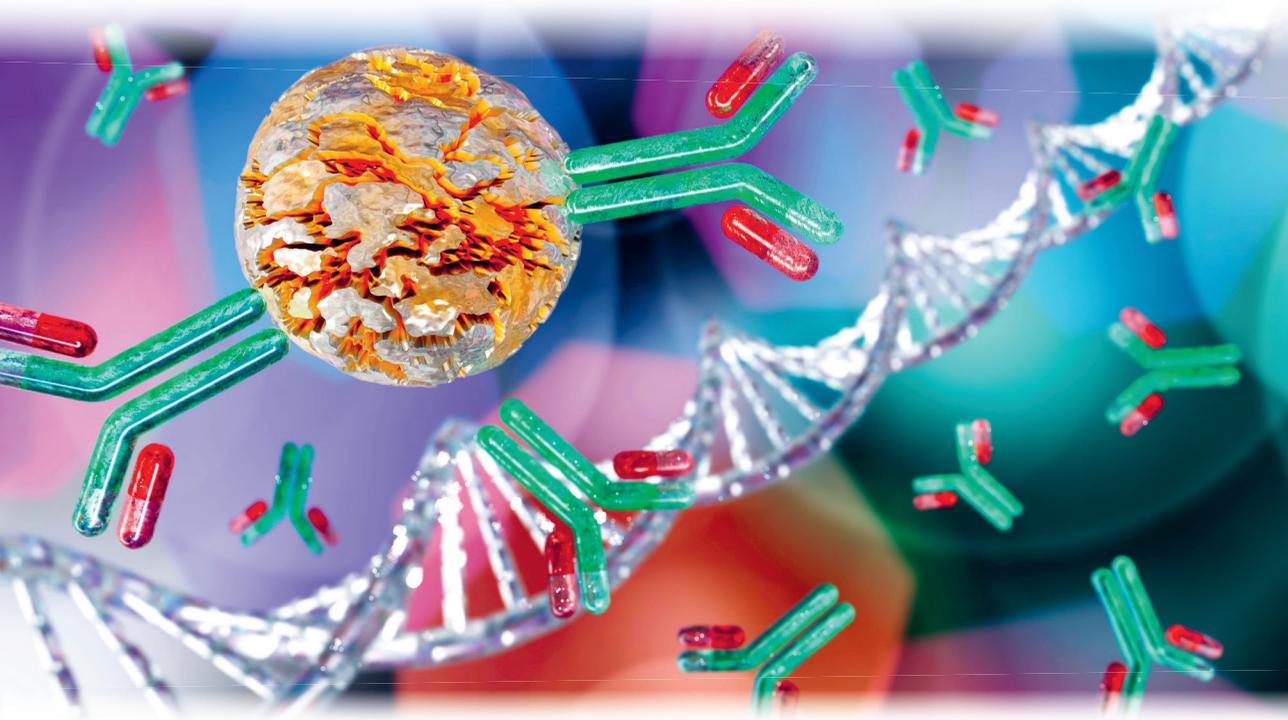
Acteurs ou bénéficiaires, nous sommes tous spectateurs sidérés de l'ampleur des progrès de la médecine. Ils sont la conséquence des découvertes du xx<sup>e</sup> siècle, en particulier sur la biologie moléculaire et le génome. La recherche du xxi<sup>e</sup> siècle a ensuite pu bouleverser nos connaissances sur le fonctionnement du vivant au niveau moléculaire

et sur l'extraordinaire ingéniosité des mécanismes moléculaires en jeu.

Des spécialistes présentent et expliquent ces connaissances qui ont permis tant de réalisations thérapeutiques et ouvert tant de perspectives. On verra par exemple comment elles permettent d'identifier et de bloquer les effets nocifs des dysfonctionnements moléculaires, comme ceux qui conduisent à l'apparition de métastases dans les cancers.

Tout ce qui est « molécule » est « chimie », et les collaborations entre biologie, médecine et chimie sont si essentielles que sans elles, rien ne serait arrivé. Cela est vrai pour les nouvelles thérapies, ainsi que pour la recherche pharmaceutique. Les méthodes d'analyse chimique ouvertes par le numérique (le criblage des molécules) lui donnent une efficacité presque inimaginable.

La recherche fondamentale se traduit souvent par des innovations industrielles. L'apparition de l'inquiétant coronavirus (Covid-19) jette une lumière spectaculaire sur les besoins en nouvelles thérapies, avec l'objectif de vaccins et de traitements.



ISBN : 978-2-7598-2469-4

Prix : 25 €

 edp sciences

[www.edpsciences.org](http://www.edpsciences.org)