

Biologie de synthèse : une nouvelle voie pour le traitement du cancer

Clément de Obaldia a pris en 2015 la codirection d'une équipe de biologie synthétique à l'iGEM d'Evry au Génopole. En 2017 il a cofondé la société Inovactis¹, dont il est président. Il aborde dans ce chapitre les applications actuelles de la biologie de synthèse en illustrant comment on peut passer d'une idée à une entreprise aujourd'hui.

1 La biologie de synthèse et la médecine

Il existe des initiatives privées qui, dès le démarrage, dès l'idée, peuvent faire naître une propriété intellectuelle et une société...

1.1. Le fléau du cancer

Aujourd'hui un homme sur deux en France et une femme sur trois connaîtra le cancer dans sa vie. Cela représentait, par exemple en 2015, 385 000 nouveaux cas (*Figure 1*).

1.2. Vers la médecine personnalisée

Face à cette problématique, un groupe d'étudiants en biologie de synthèse s'est proposé, en

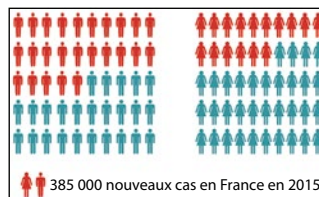


Figure 1

Aujourd'hui un homme sur deux et une femme sur trois connaîtra le cancer en France.

2015, d'apporter de nouvelles solutions.

La démarche a été de se rapprocher de la médecine personnalisée, pratique médicale qui part du patient et séquence sa tumeur avant tout traitement. Le séquençage (détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides de séquences d'ADN) est devenu une technique

1. inovactis.com

courante : 55 000 patients ont leur tumeur séquencée chaque année en France dans 29 centres de séquençage. À partir de là, on stratifie² les patients, on trouve les meilleures thérapies sur le marché, la meilleure dose et le meilleur timing (Figure 2).

L'ambition de la médecine personnalisée va bien au-delà. À partir du séquençage de la tumeur du patient, le but est la conception et la réalisation d'un médicament individuel, avec tous les enjeux logistiques que cela implique. La médecine personnalisée intègre le fait que chaque tumeur est unique et donc requiert un médicament unique.

Cette approche nous a conduit à créer une équipe d'une dizaine d'étudiants et à participer à une compétition internationale au MIT avec le projet CancerYEasT Immunotherapy,

2. L'approche stratifiée consiste à adapter le traitement au patient en fonction de ses caractéristiques biologiques.

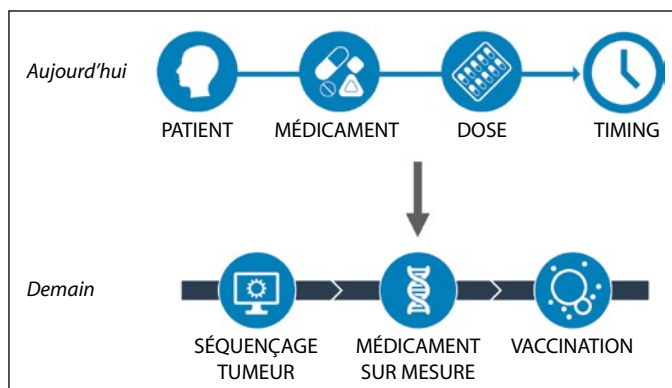


Figure 2

Une médecine personnalisée donnera un médicament conçu sur mesure, propre au patient grâce au séquençage de la tumeur : c'est un gain de temps et une efficacité accrue par rapport à la médecine d'aujourd'hui.

YETI (Figure 3). Il s'agissait de reprogrammer un organisme vivant, en l'occurrence une levure, *Saccharomyce cerevisiae*, pour lui faire produire et mettre en œuvre un médicament contre la tumeur sélectionnée.

2 Les recherches en cours pour une médecine personnalisée

2.1. Les biosenseurs pour mieux cibler le cancer

Il faut d'abord définir ce qu'est un biosenseur³, dont la Figure 4 donne le principe. Les biosenseurs servent à détecter une molécule cible (en rouge sur le schéma). On va trouver une protéine capable de se lier à cette molécule cible, capable

3. Biosenseur : dispositif détecteur biologique associant l'échantillon à étudier – ici, du matériel biologique – et l'élément capteur, biologique également.



Figure 3

Cancer YEasT Immunotherapy (YETI) est un projet d'étudiants qui a pour but de reprogrammer la levure *Saccharomyce cerevisiae* à l'aide de la biologie de synthèse.

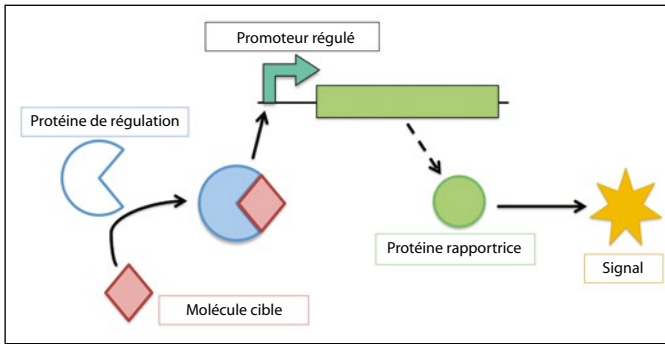


Figure 4

Action du biosenseur pour la détection d'une molécule cible : une protéine se lie à la molécule cible, ce nouveau complexe va activer un promoteur qui va transcrire le gène rapporteur. La protéine rapportrice fluorescente va permettre la détection de la molécule cible.

ensuite d'activer un promoteur⁴. Le promoteur est ce qui active la transcription d'un gène. Puis on va placer une dernière brique dans notre schéma qui est la brique de

la protéine rapportrice, c'est-à-dire une protéine qu'on peut détecter, qui sera visible : on utilise souvent des protéines fluorescentes issues d'une méduse.

4. Promoteur : exemple de bio-brique, une région de l'ADN située à proximité d'un gène indispensable à la transcription de l'ADN en ARN.

La mise au point d'un biosenseur ouvre la voie vers des applications diverses. Ainsi, un projet présenté durant la compétition iGEM (**Encart : « La Fondation iGEM »**) était

LA FONDATION iGEM (INTERNATIONAL GENETICALLY ENGINEERED MACHINE)

La Fondation iGEM^a (**Figure 5**) est une organisation à but non-lucratif créée à l'origine autour du MIT (Massachusetts Institute of Technology) pour promouvoir les applications de la biologie de synthèse.

Elle anime des programmes en direction des étudiants (section « Competition »), en direction d'équipes de recherche (section « Laboratoires ») et de gestion de banques de données (section « Enregistrement »). Elle offre ainsi à plus de 300 équipes du monde entier, soit des milliers de participants, l'occasion de vivre une très belle aventure humaine mais surtout constitue une possibilité créatrice incroyable.

L'iGEM constitue et met à disposition une véritable « bibliothèque du vivant », un concept rendu possible par la biologie de synthèse. Il s'agit d'une bibliothèque de « bio-briques^b » qu'on peut comparer à des pièces de lego ; on peut les assembler parce qu'elles sont standardisées. L'un des apports de la biologie de synthèse, qui permet cette approche, est la standardisation de ces briques du vivant.

La bibliothèque propose plus de 20 000 briques. Cela correspond à une combinatoire possible phénoménale entre toutes ces bio-briques et des possibilités d'innovation sans limite.



Figure 5

iGEM propose une compétition pour les jeunes qui regroupe plus de 300 équipes du monde entier et des milliers de participants.

Source : http://igem.org/Press_Kit

^a <http://igem.org>

^b Bio-brique : séquence d'ADN conforme à un assemblage standard par enzyme de restriction. Les bio-briques sont utilisées comme blocs de construction pour concevoir des assemblages de briques individuelles ou de groupes de briques pouvant ensuite être intégrées dans des cellules vivantes afin de construire de nouveaux systèmes biologiques.

relatif à la bioremédiation⁵ de l'atrazine, une molécule pesticide. Grâce au biosenseur, *Escherichia coli* était capable de détecter l'atrazine dans son milieu et, après la détection, de produire une enzyme dégradant ce pesticide.

Pour le traitement du cancer, nous avons travaillé sur la production d'un biosenseur délivrant des molécules capables de détruire les cellules cancéreuses, provoquant leur suicide (apoptose), à savoir la perforine⁶ et la granzyme⁷ (Figure 6). La perforine, comme son nom l'indique, perce la paroi de la cellule cancéreuse ; cela permet à la granzyme, une protéase⁸, d'entrer et d'induire le suicide de la cellule. Ce que

le biosenseur détectait, c'était l'environnement hypoxique de la tumeur (le manque d'oxygène dans l'environnement de la tumeur), caractéristique des tumeurs plus agressives qui métastasent.

2.2. L'encapsulation des levures

Le biosenseur est introduit *via* une levure capable de le produire et de le sécréter dans l'organisme. Le problème de ces levures est que, certes elles produisent et sécrètent, mais, injectées dans le corps humain, elles sont rapidement phagocytées et détruites et n'ont pas le temps d'agir. Pour ralentir leur dégradation on les a encapsulées dans des billes d'alginate⁹. Pour démontrer que ce conditionnement préserve l'activité, on a encapsulé des levures qui produisaient la GFP¹⁰, la molécule fluorescente verte de la méduse, la

5. Bioremédiation : décontamination de milieux pollués au moyen de techniques issues de la dégradation chimique ou d'autres activités d'organismes vivants.

6. Perforine : protéine cytolytique (qui tue les cellules) sécrétée par les lymphocytes T CD8+.

7. Granzyme : un des moyens d'action des cellules immunitaires cytotoxiques, qui sont dans ce cas les lymphocytes T, pour lyser (scinder) leur cible. La perforine permet aux granzymes d'entrer dans les cibles où l'enzyme va dégrader les protéines et induire la mise en apoptose (mort cellulaire) de la cible.

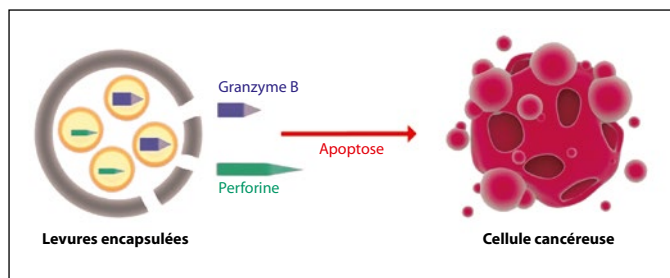
8. Protéase : aussi appelée peptidase, enzyme qui coupe les liaisons peptidiques des protéines.

9. Billes d'alginate : utilisées en médecine pour encapsuler des médicaments ou des substances biologiques fragiles comme les enzymes. Les alginates sont des polysaccharides obtenus à partir d'une famille d'algues brunes : les laminaires ou les fucus.

10. GFP : « Green Fluorescent Protein », protéine issue d'une méduse ayant la propriété d'émettre une fluorescence de couleur verte.

Figure 6

Apoptose des cellules cancéreuses induite par les levures : le biosenseur détecte l'environnement hypoxique d'une cellule, caractéristique d'une tumeur. Une fois détectée, la granzyme B et la perforine, présentes dans les levures encapsulées, permettent l'apoptose de la cellule cancéreuse.



protéine qu'on peut détecter (**Figure 7**). On observe qu'en effet l'activation par un sucre est bien efficace : il y a bien fluorescence et donc activation des levures empaquetées. Ce résultat a été obtenu en 2015.

2.3. L'immunothérapie

Durant la compétition, nous avons enfin réalisé une preuve de concept sur des souris atteintes de mélanome avec des levures agissant comme immunothérapie¹¹. Cependant, dans le cadre de la « compétition » iGEM, il n'était pas possible de breveter ce nouveau traitement anticancéreux et de générer la propriété intellectuelle indispensable pour une création d'entreprise.

Nous avons travaillé pendant deux ans pour développer et caractériser une levure optimisée, beaucoup plus efficace pour provoquer la régression tumorale avec une preuve de concept établie sur le cancer de la peau agressif, le mélanome, chez la souris.

Ce travail a été une longue phase de développement nécessaire à la création d'une entreprise, une période de « traversée du désert » où les travaux de laboratoire doivent être poursuivis mais où l'application n'est pas encore commerciale. Les financements ont été largement aidés par diverses subventions. La reconnaissance de la qualité des objectifs a été due à un

11. Immunothérapie : traitement qui consiste à administrer des substances qui vont stimuler les défenses immunitaires de l'organisme afin de lutter contre différentes maladies.



Figure 7

Levures produisant la GFP (molécule fluorescente de la méduse) encapsulées. Qu'elles aient été induites (photo du bas) ou non (photo du haut), la protéine fluoresce, donc les levures, même encapsulées, ont accès à leur milieu.

écosystème performant qui nous a donné l'accompagnement nécessaire.

Notons ici que les vertus de la biologie de synthèse ont permis de réduire considérablement le temps de développement, parce qu'elle permet de screener¹² très rapidement un nombre important de molécules. Dans notre cas, il s'agissait d'« armer » des levures contre la tumeur et de sélectionner les meilleures levures afin de retenir les plus efficaces.

3 Le projet d'Inovactis dans la lutte contre le cancer

Le procédé d'Inovactis de lutte contre le cancer s'appuie sur les propriétés du système immunitaire.

12. Screener : en français cribler. Dans les domaines de la pharmacologie, biochimie, génomique et protéomique, le screening correspond aux techniques visant à étudier et identifier dans les chimiothèques et ciblothèques des molécules aux propriétés nouvelles, biologiquement actives.

3.1. L'immunité cellulaire : les cellules dendritiques

L'immunité cellulaire repose sur de nombreux acteurs, dont l'un d'eux est central : les cellules dendritiques¹³ (Figure 8). Ces cellules coordonnent l'activation des lymphocytes tueurs¹⁴, les CD8, qui vont détruire les cellules cancéreuses et que l'on veut activer contre la tumeur.

13. Cellules dendritiques : cellules du système immunitaire présentatrices d'antigènes et des dendrites - prolongements cytoplasmiques. Elles permettent entre autres le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative.

14. Lymphocytes tueurs : aussi appelés TCD8, car ils portent à leur surface un marqueur CD8, ou lymphocytes T cytotoxiques. Ils détruisent les cellules infectées. Ces cellules sont dites cytotoxiques car elles sont elles-mêmes capables de détruire des cellules cibles qui présentent des antigènes spécifiques.

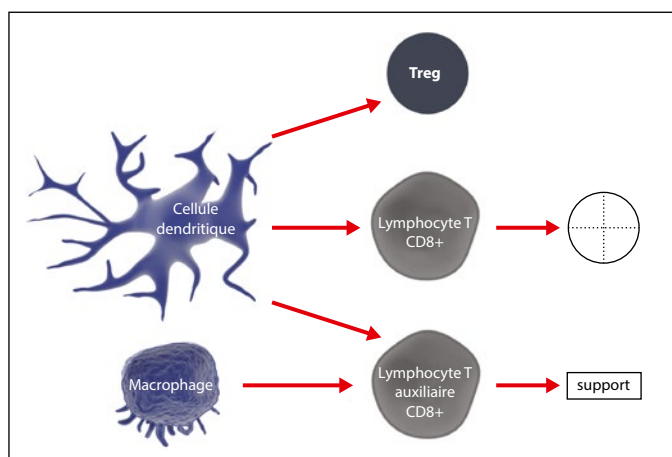


Figure 8

Rôle des cellules dendritiques dans l'organisme : activation des CD8+ ou lymphocytes tueurs et à l'aide des macrophages, des CD4+ qui vont produire des cytokines et soutenir la réponse immunitaire, et enfin inhibition des T régulateurs.

Leur efficacité peut être limitée par ce qu'on appelle les T régulateurs¹⁵ présents dans l'environnement de la tumeur, provoquant une immunosuppression¹⁶, qui fait que même si le système immunitaire est présent, il n'attaque pas la tumeur ; il faut donc également inhiber ces T régulateurs. Enfin, il faut également activer les « cellules de soutien » qui produisent certaines cytokines¹⁷ et soutiennent la réponse immunitaire.

Il y a déjà eu des vaccinations à cellules dendritiques par le passé, par exemple dans le cancer de la prostate ; ces approches ont certes montré leur sécurité et leur faisabilité, mais leur efficacité demeurerait limitée. Il fallait en effet prélever les précurseurs des cellules dendritiques du patient, les modifier par ingénierie génétique et les réinjecter ensuite chez le patient (Figure 9). Ces étapes sont

15. Lymphocytes T régulateurs : sous-population de lymphocytes T ayant la propriété d'inhiber la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs. Ils sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire.

16. Immunosuppression : inhibition de l'activation du système immunitaire. Elle peut être induite par une intoxication, la radioactivité, certaines maladies comme le VIH, ou naturellement enclenchée par l'organisme dans certaines conditions.

17. Cytokines : substances solubles de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules ou tissus agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Ces molécules sont essentielles à la communication des cellules de l'organisme.

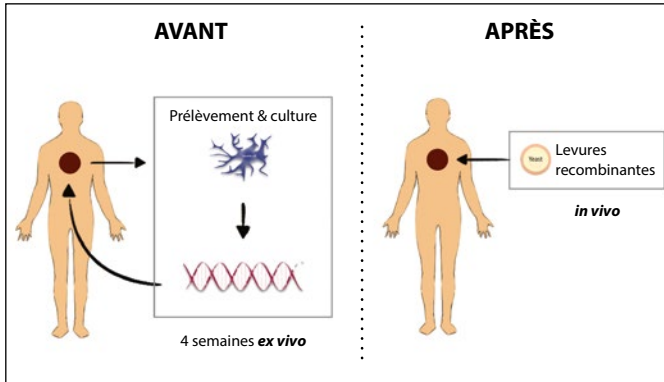


Figure 9

Progrès liés à la vaccination par des cellules dendritiques : avant, nécessité de prélèvement, de culture et de réinjection quatre semaines après ; aujourd'hui, aucun prélèvement, les levures recombinantes sont injectées in vivo.

longues et coûteuses, et tous les paramètres ne peuvent pas être maîtrisés de façon optimale. En revanche, la biologie de synthèse permet de délivrer directement les antigènes tumoraux, qui sont les marqueurs des cellules cancéreuses, *in vivo*, sans réaliser aucun prélèvement sur le patient. En particulier, cette activation passe par l'utilisation de levures spécifiquement armées pour réaliser ce travail.

3.2. Mécanisme d'action contre les cellules cancéreuses chez Inovactis

Les levures – soit environ un demi-milliard de levures à chaque injection – sont injectées directement sous la peau du patient. Elles ne présentent aucun problème de toxicité, ce ne sont rien d'autre que de la levure de boulanger, et, après des millénaires de consommation de pain et de bière, nous avons développé une tolérance naturelle pour ces levures.

Ces levures vont délivrer deux choses aux cellules dendritiques : d'une part une cible,

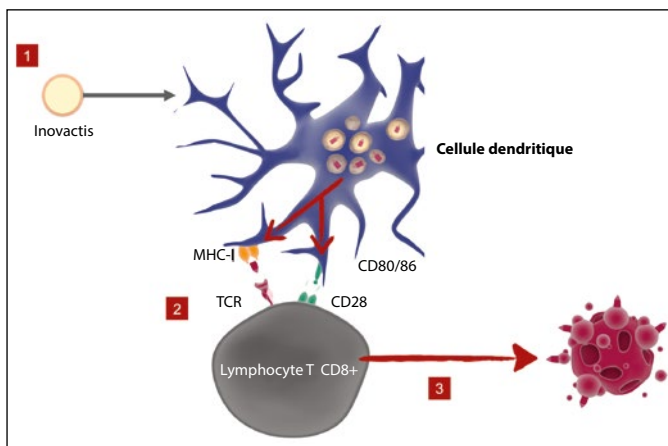
les antigènes, les marqueurs cancéreux, et d'autre part un « signal de danger » qu'on appelle un signal de costimulation¹⁸ (Figure 10). Autrement dit, elles sont un adjuvant naturel. Ensemble elles vont activer les lymphocytes tueurs qui vont détruire les cellules cancéreuses portant les mêmes marqueurs. On voit qu'il s'agit de thérapies très ciblées.

Le problème de cette thérapie est de définir la cible de la façon la plus pertinente. Le séquençage de l'ADN nous donne accès à l'ensemble du génome de la tumeur. Le séquençage de la tumeur coûte 1 000 dollars – bien loin des 3 milliards de dollars et treize années de développement qui ont été nécessaires pour le séquençage du Génome Humain. Mais que faire du séquençage de la tumeur du patient ?

18. Signal de costimulation : signal donné à une cellule par une autre et qui régule l'activation, la prolifération, la survie ou la différenciation de la cellule qui le reçoit. Ce signal est un des trois signaux permettant l'activation des lymphocytes T, il est aussi appelé signal de danger.

Figure 10

Mécanisme d'action de la levure chez Inovactis en trois étapes. Premièrement, les levures sont injectées sous la peau du patient. Deuxièmement, elles délivrent aux cellules dendritiques les antigènes et un signal de costimulation qui vont activer les lymphocytes tueurs. Troisièmement, ces lymphocytes vont détruire les cellules cibles.



3.3. Une médecine personnalisée du cancer

À partir du séquençage de la tumeur du patient on va rechercher ce qu'on appelle les néo-antigènes¹⁹ (Figure 11), qui sont des marqueurs cancéreux mutés par rapport au même marqueur présent dans les cellules saines.

On sélectionne les marqueurs mutés pour éviter la toxicité car lors d'une immunothérapie, on pourra également détruire les cellules saines. Il y a eu beaucoup de réactions auto-immunes avec inhibiteurs du frein immunitaire, avec par exemple des diabètes de type I où le système immunitaire détruisait le pancréas, ou encore des hépatites. Donc aujourd'hui on veut aller sur de la médecine personnalisée également pour s'affranchir de cette toxicité qui proviendrait de la sélection de cibles non spécifiques.

Quand on a identifié des marqueurs à cibler, il faut vérifier

qu'ils soient bien exprimés par les cellules cancéreuses. On réalise donc un « RNA-SEQ²⁰ » sur les cellules cancéreuses et on peut également vérifier que ces néo-antigènes soient exprimés à la surface des cellules cancéreuses. Une fois établie la liste de ces antigènes, on utilise les ressources de la biologie de synthèse (le châssis) pour présenter les différents marqueurs cancéreux au système immunitaire.

Le processus se termine par la vaccination du patient.

Le point clé est que tout ce processus thérapeutique doit être plus rapide que la progression de la maladie chez le patient : il s'agit d'avoir une logistique performante ! D'après nos experts et d'après les premiers essais cliniques de phase I qui ont été lancés chez l'homme à la fois en Europe en 2017 et aux

20. RNA-SEQ : également appelé séquençage de l'ARN. Technologie qui utilise le séquençage à haut débit pour identifier et quantifier l'ARN issu de la transcription du génome à un moment donné.

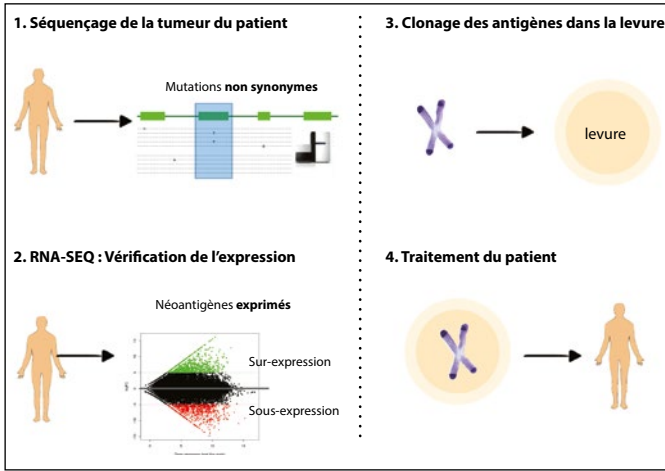


Figure 11

Quatre étapes de la médecine personnalisée du cancer : séquençage de la tumeur, vérification de l'expression des néo-antigènes pour que la thérapie soit spécifique aux cellules malades, clonage des antigènes dans la levure et enfin vaccination du patient.

États-Unis sur de la vaccination personnalisée – essais qui résultent tout de même de la régression totale dans le cas du mélanome –, il faut pouvoir être dans un timing entre six et huit semaines depuis la biopsie du patient

jusqu'à la vaccination, donc travailler dans un délai court. Ici, la biologie de synthèse est une technique déterminante parce qu'elle standardise toutes les étapes (les briques) et permettent de cloner rapidement.

Entreprendre en biologie de synthèse

Quelle méthode adopter pour entreprendre aujourd'hui en biologie de synthèse ? Au départ, on reçoit une formation académique, mais il manque la formation pratique en biologie de synthèse. Pour l'acquérir, il y a la « Compétition iGEM », qui propose des équipes partout, au Génopole, à Paris-Saclay, à l'Institut Pasteur... Ces équipes vont permettre de mettre les mains dans le cambouis, d'apprendre à diriger un projet scientifique en biologie de synthèse et de tester ses idées (**Figure 12**).

Ensuite, il faut s'entourer d'experts qui peuvent vous accompagner pour évaluer l'idée par rapport à l'état de l'art. En l'occurrence, nous nous sommes associés à l'Institut Curie pour toutes nos expérimentations. Ensuite, il faut



Figure 12

Quatre points fondamentaux pour entreprendre en biologie de synthèse : une formation, une idée, un accompagnement et des aides publiques.

bien sûr l'accès à un laboratoire et être accompagné de chargés d'affaires pour la vision business, juridique et propriété intellectuelle. Le SHAKER est un dispositif lancé à Génomole permettant de mettre des équipements mutualisés, un laboratoire de pointe à disposition de jeunes docteurs ou d'étudiants qui ont des idées et qui ont besoin de matériel pour réaliser une preuve de concept. Évidemment, il faut terminer par les aides publiques, à savoir BPI France, qui apporte une aide financière incomparable, mais également le réseau Pépite qui fournit des aides pour l'entrepreneuriat.

Aujourd'hui donc, en biologie de synthèse, on va beaucoup plus vite qu'auparavant grâce à des processus mieux standardisés. Demain, ceux qui se lancent dans l'aventure pourraient devenir la licorne française en biologie de synthèse. Il y a de la place pour l'innovation !