

Le processus de découverte du médicament dans l'industrie pharmaceutique

Bernard Scatton

1 sente de Saint Clair, 91940 Gometz le Chatel, France

Auteur correspondant : Bernard Scatton, bscatton@club-internet.fr

Reçu le 12 mai 2009

Résumé – Cet article fait le point sur le processus suivi dans l'Industrie Pharmaceutique pour découvrir de nouveaux médicaments innovants issus de la chimie médicinale ou des médicaments biologiques. Après quelques généralités décrivant le processus global de Recherche et de Développement (contenu des études précliniques et cliniques), les différentes étapes impliquées spécifiquement dans la phase de Recherche Amont (période allant de la conception initiale d'un programme de recherche jusqu'à la proposition d'un candidat au développement) sont analysées en détail. En ce qui concerne les composés issus de la chimie médicinale, sont successivement abordés : le choix de la cible biologique (moléculaire ou cellulaire) et sa validation fonctionnelle, les techniques de criblage des bibliothèques chimiques, la recherche de composés constituant des têtes de série chimiques optimisables, l'optimisation finale des têtes de série en candidats médicaments qui seront proposés au développement préclinique et clinique. En ce qui concerne les biomédicaments, le processus utilisé pour la génération et la production des anticorps monoclonaux humanisés (nus ou conjugués) et des protéines thérapeutiques recombinantes est discuté en détail.

Mots clés : Médicament / processus de recherche / criblage automatisé / cibles biologiques / criblage phénotypique

Abstract – The discovery process in the pharmaceutical industry.

This paper reviews the process used in the pharmaceutical industry to discover new innovative drugs originating from medicinal chemistry or biotherapeutics. After a rapid description of the global Research and Development process (preclinical and clinical studies), the different steps involved specifically in the Discovery Research phase (from the initiation of the research program to the proposal of a candidate for development) are analysed in detail. As far as compounds originating from medicinal chemistry are concerned, we discuss the choice of the biological target (molecular or cellular) and its functional validation, the process used for the screening of chemical libraries and the generation of chemical hits, the hit-to-lead process and finally the chemical optimisation of the leads into drug candidates which will be proposed for preclinical and clinical development. As far as biotherapeutics are concerned, the process used for the generation and manufacturing of humanized naked or conjugated monoclonal antibodies and recombinant therapeutic proteins is discussed in detail.

Key words: Drugs / research process / automated screening / biological targets / phenotypic screening

1 Introduction

L'industrie pharmaceutique a connu durant ces deux dernières décennies des évolutions (voire des

révolutions) qui ont radicalement transformé sa façon d'appréhender la recherche de nouveaux médicaments au laboratoire : évolution des concepts biologiques et des approches de recherche utilisées pour identifier de

Tableau 1. Contenu et durée des différentes phases de recherche et développement.

RECHERCHE		DEVELOPPEMENT			DOSSIER	VIE		
2 ans		1 à 2ans	2 ans	6 à 8 ans			1 an	Contin.
RECHERCHE D'UN POINT DE DEPART CHIMIQUE <ul style="list-style-type: none"> • Conception • Sélection cible • Développement tests • Synthèse 		OPTIMISATION <ul style="list-style-type: none"> • Affinité • Sélectivité • Absorption orale • Durée d'action • Efficacité dans modèles animaux pertinents 	EVALUATION PRECLINIQUE IN VITRO ET CHEZ L' ANIMAL <ul style="list-style-type: none"> • Développement chimique • Pharmacologie générale • Méthodes analytiques • Toxicologie • Métabolisme et pharmacocinétique • Formulation 	EVALUATION CLINIQUE CHEZ L'HOMME PHASE I Tolérance et pharmacocinétique PHASE II Activité biologique et recherche d'un effet thérapeutique Détermination de la dose optimale PHASE III Confirmation de l'effet thérapeutique et de la tolérance			PREPARATION et SOUMISSION du DOSSIER aux AUTORITES de SANTE	PRODUCTION MARKETING MANAGEMENT DU CYCLE DE VIE
50.000 à 500.000 molécules			30	10	3	1		

nouvelles cibles biologiques, connaissance de la structure tridimensionnelle de certaines cibles moléculaires, accès à une large diversité de structures chimiques, conception plus rationnelle des composés à l'aide de la modélisation moléculaire, synthèse automatisée à haut débit des composés à l'aide de la chimie combinatoire, avancées dans les techniques de criblage automatisé à haut débit, amélioration de la prédictibilité des modèles expérimentaux plus proches de la pathologie humaine grâce aux techniques de transgénèse et, enfin, avènement des médicaments biologiques (biomédicaments).

L'approche de recherche médicamenteuse reposait autrefois sur le criblage des composés dans des systèmes complexes comme l'animal entier ou les organes isolés (criblage phénotypique) : les mécanismes biologiques impliqués dans la réponse phénotypique mesurée constituaient alors dans la plupart des cas une « boîte noire ». Du fait des avancées importantes réalisées en biologie moléculaire et en biochimie à la fin des années 80 et au début des années 90, cette méthodologie a été largement abandonnée en faveur d'une approche plus moderne, rationnelle et à plus haut débit, basée sur des cibles moléculaires bien caractérisées. Ce changement de paradigme, basé sur la quantité et la vitesse, a été stimulé par le séquençage du génome humain et l'avènement d'une nouvelle ère dans laquelle il est devenu possible de connaître les séquences des gènes de toutes les cibles moléculaires

potentielles pouvant servir de base à la conception de nouveaux médicaments.

Dans cet article, nous faisons le point sur le processus de découverte du médicament au laboratoire tel qu'il est pratiqué de nos jours dans l'industrie pharmaceutique, en passant en revue les différentes étapes impliquées dans ce processus. Nous focaliserons cette revue sur la recherche des médicaments issus de la chimie médicinale (chimiothérapie) qui représente la grande majorité des médicaments actuellement sur le marché mais nous évoquerons également quelques aspects spécifiques de la recherche des médicaments biologiques (ou biomédicaments), en particulier les anticorps monoclonaux et les protéines thérapeutiques, qui sont actuellement en plein essor.

2 Généralités sur le processus de recherche et développement du médicament

Le processus de recherche et développement comprend trois grandes phases : la recherche amont, le développement préclinique et le développement clinique (Tableau 1).

La recherche amont, phase qui sera abondamment discutée dans cet article, couvre la période allant de l'idée initiale présidant au démarrage du programme de recherche et à la recherche de séries

chimiques optimisables jusqu'à la proposition d'un candidat au développement préclinique. Deux types d'approche pharmaceutique peuvent être envisagées dans cette phase : la chimie médicinale conventionnelle basée sur des petites molécules, le plus souvent actives par la voie orale, ou les médicaments biologiques généralement administrés par voie systémique.

Dans cette phase, les molécules synthétisées sont évaluées pour leur efficacité et leur sélectivité dans des tests *in vitro* sur des cellules recombinantes ou des cellules natives exprimant la cible moléculaire (ou cellulaire) puis *in vivo* dans des modèles expérimentaux, chez l'animal, représentatifs de la pathologie visée ; des études pharmacocinétiques et toxicologiques préliminaires sont également réalisées afin d'aider à la sélection du candidat médicament.

Le développement préclinique est une phase dans laquelle est réalisée la synthèse à grande échelle du produit (jusqu'à quelques kilos alors que quelques grammes seulement sont synthétisés en recherche amont), nécessitant souvent une amélioration des voies de synthèse ; la formulation du produit est optimisée et les comprimés ou suspensions qui serviront aux premières études cliniques de phase I sont préparés.

La pharmacocinétique du produit est approfondie : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination de la molécule sont évalués, chez au moins deux espèces animales, dans des tests *in vitro* et *in vivo*.

Au plan sécurité du médicament, des études de toxicologie aiguë et chronique (3 mois voire 6 mois) sont réalisées chez le rat, la souris et le chien (ou le primate) afin d'établir les doses maximales tolérées et les organes cibles du produit. À ce stade, sont également réalisées des études de génotoxicité *in vitro* ou *ex vivo* et de pré-carcinogénèse et les éventuels effets du produit sur la reproduction et le développement sont évalués chez le rongeur. Enfin, des études de pharmacologie de sécurité destinées à évaluer l'effet du produit sur les grandes fonctions physiologiques (systèmes nerveux central, cardiovasculaire, gastro-intestinal, respiratoire, rénal, endocrinien) sont réalisées.

L'ensemble de ces études permet de calculer la marge de sécurité du candidat médicament (dose toxique ou induisant des effets secondaires/dose thérapeutique potentielle dans les modèles expérimentaux de la pathologie) et de décider ou non de l'avancement du produit en phase I.

Le développement clinique comprend trois grandes phases.

La phase I consiste en des études de tolérance et de pharmacocinétique généralement conduites chez le volontaire sain (directement chez le patient dans le cas de la cancérologie). Ces études sont destinées à déterminer la dose maximale tolérée chez l'Homme

et à calculer la marge de sécurité par rapport à la dose thérapeutique potentielle déduite des études précliniques dans les modèles expérimentaux chez l'animal.

La phase II, réalisée chez quelques centaines de patients, est destinée à faire la « preuve du concept biologique » chez l'Homme dans la ou les pathologies visées. La recherche de la dose thérapeutique optimale et sa comparaison avec la dose maximale tolérée est l'objectif principal de cette phase. C'est généralement à ce stade que l'on sait si le composé évalué peut devenir un médicament.

La phase III est réalisée sur plusieurs milliers de patients et est destinée à confirmer la dose thérapeutique et la sécurité du médicament dans l'indication visée.

L'ensemble des données cliniques va ensuite servir à préparer le dossier d'enregistrement du médicament qui sera soumis aux Autorités de Santé des différents pays pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché.

Durant les phases de développement clinique et toute la durée de commercialisation du médicament, la pharmacovigilance permettra de repérer les éventuels effets secondaires inattendus du produit chez l'Homme, pouvant conduire éventuellement au retrait du produit du marché.

Une des caractéristiques du processus de recherche et développement est la très forte attrition intervenant dans les différentes phases. Selon les données accumulées par plusieurs grandes Sociétés Pharmaceutiques (Kola & Landis, 2004 ; Brown, 2007), près d'une cinquantaine de programmes de recherche sont statistiquement nécessaires pour mettre sur le marché un seul médicament. L'attrition est très forte dans la phase de recherche amont puisque, de ces 50 programmes de recherche, seuls quatorze candidats médicaments seront proposés au développement préclinique. Une forte attrition intervient également dans les phases préclinique et clinique, puisque seuls huit composés atteindront la phase I et deux candidats médicaments entreront en phase III.

Par ailleurs, les dépenses de recherche et développement pour la mise sur le marché d'une nouvelle molécule ont crû de façon exponentielle depuis une trentaine d'années, en dépit du fait que le nombre de nouveaux médicaments mis sur le marché est resté quasiment constant (voire a même décru : 18 nouvelles entités moléculaires mises sur le marché en 2006 contre 27 en 2000 ; cf. Owens, 2007). Aujourd'hui, le coût moyen de développement d'une nouvelle molécule est de l'ordre de 890 millions de dollars et continue de croître. Beaucoup d'explications ont été avancées pour justifier cette croissance des dépenses de recherche et développement : l'amélioration des standards de qualité du développement clinique qui est réalisé sur un nombre toujours plus élevé de

patients ; la demande croissante par les Autorités de Santé d'études de sûreté pour l'homologation des médicaments (incitée par exemple par le retrait du marché de l'anti-inflammatoire Vioxx, un inhibiteur de la cyclo-oxygénase-2 en 2004, en raison d'effets secondaires cardiovasculaires inattendus) ainsi que l'attitude frileuse de ces mêmes régulateurs face à des produits présentant un nouveau mécanisme d'action. Un produit majeur comme l'aspirine ne pourrait vraisemblablement pas obtenir une autorisation de mise sur le marché aujourd'hui, en raison de ses effets secondaires gastro-intestinaux très importants !

Comme le développement de nouveaux médicaments devient plus onéreux, les laboratoires doivent concentrer leurs ressources sur un plus petit nombre de projets, ce qui signifie, en conséquence, moins de médicaments homologués.

La durée de plus en plus longue du processus de recherche et développement constitue également un obstacle important à la mise sur le marché de médicaments innovants (Tableau 1). La durée de la phase de recherche amont est variable, la recherche d'une série chimique optimisable constituant l'obstacle majeur, et peut durer de 2 à 4 ans en moyenne (voire plus) en fonction de la cible biologique visée. La durée du développement préclinique, constitué essentiellement d'études réglementaires, est relativement constante, de l'ordre de 2 ans. Quant à la durée du développement clinique, elle est variable et dépendra de l'indication visée, mais on considère que sa durée moyenne est de 6 à 8 ans. Il faut ensuite compter un an pour l'examen du dossier d'enregistrement par les Autorités de Santé et obtenir l'autorisation de mise sur le marché. Globalement, il faut donc environ 10 à 12 ans en moyenne pour développer un médicament. Cette durée est à mettre en parallèle avec la durée de vie d'un brevet produit (20 ans) et montre que la durée d'exploitation d'un médicament est relativement courte (environ 8 ans) avant l'arrivée de génériques de ce produit.

3 Étapes impliquées dans le processus de « recherche amont »

Malgré le nombre important de médicaments disponibles sur le marché, il existe encore aujourd'hui de nombreux besoins thérapeutiques insatisfaits. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, parmi les besoins thérapeutiques majeurs insatisfaits, on distingue les infections nosocomiales, la prévention secondaire des désordres cardiovasculaires, le diabète, le cancer, l'infarctus cérébral, le SIDA, la tuberculose, la malaria ainsi que les maladies liées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer, l'arthrose et la bronchite chronique obstructive.

Pour répondre à ces besoins, l'industrie pharmaceutique se doit de développer des médicaments « innovants » conduisant à une amélioration significative du service médical rendu. Pour être innovant, un médicament doit répondre à deux critères majeurs, à savoir : 1) constituer une avancée thérapeutique majeure et 2) posséder un mécanisme d'action original (si possible être le premier dans une nouvelle classe médicamenteuse, « *first-in-class* »). Une avancée thérapeutique majeure peut résulter de la réponse à un besoin thérapeutique non satisfait, d'une amélioration du rapport bénéfice/risque pour le patient, d'une administration plus simple et plus adaptée au patient, du traitement de l'étiologie plutôt que des symptômes de la maladie. Pour remplir ces critères, le processus de recherche va suivre un certain nombre d'étapes que nous allons décrire, en détail, dans le chapitre suivant.

Nous traiterons séparément les approches chimiothérapeutique et biothérapeutique.

3.1 Approche chimiothérapeutique

3.1.1 Processus général

Dans le processus de Recherche Amont qui conduit à la découverte de candidats au statut de médicaments qui seront proposés au développement préclinique et clinique, il existe différentes étapes clés schématiquement représentées sur la figure 1.

- La première, et probablement la plus importante, est le choix de la cible qui servira de base au programme de recherche, que ce soit une cible moléculaire bien identifiée (par exemple un récepteur, une enzyme, un canal ionique, un transporteur, etc.) ou une cible cellulaire (cellule tumorale, agent microbien pathogène, adipocyte, cellule souche, etc.). Ces cibles biologiques identifiées, comme nous le verrons plus loin, à partir de la littérature, d'une famille de gènes, d'une recherche prospective interne (transcriptomique, protéomique, génomique différentielle) ou d'une observation clinique vont subir un processus de validation fonctionnelle impliquant des modèles cellulaires *in vitro*, des souris génétiquement modifiées surexprimant ou invalidant le gène correspondant ainsi que des études de pathologie moléculaire (expression de la cible dans des tissus humains pathologiques).
- Dans le cas d'une cible moléculaire, une fois la protéine-cible validée, elle sera produite à grande échelle pour réaliser les tests de criblage biochimique automatisé *in vitro* sur lesquels seront évaluées des bibliothèques chimiques provenant du patrimoine de la Société. Dans le cas d'une cible cellulaire, un criblage phénotypique sera réalisé le plus

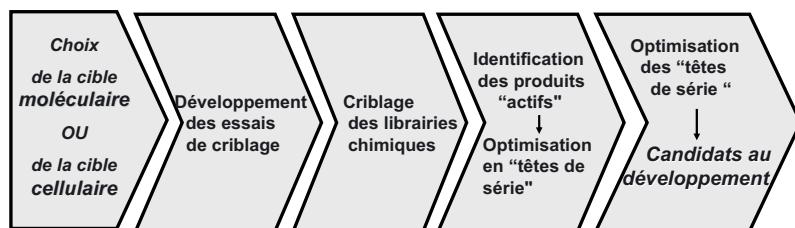


Fig. 1. Étapes impliquées dans le processus de recherche amont : approche chimiothérapeutique.

souvent sur cellules natives en culture, à partir de bibliothèques chimiques de taille plus restreinte (voir plus loin).

- Si, à la suite de ce criblage, des composés « actifs » (affinité de l'ordre du μM environ) sont repérés (environ 50 % des cas), ils seront ensuite évalués pour leur sélectivité, leur activité fonctionnelle dans des tests cellulaires (activité agoniste, antagoniste) et leur potentialité à devenir un candidat médicament (adéquation des propriétés physico-chimiques, absorption, métabolisme *in vitro*, originalité de la structure chimique et brevetabilité, faisabilité de la synthèse chimique, génotoxicité, etc.).
- Si ces critères sont remplis, un programme de recherche destiné à optimiser les « têtes de séries » en « candidats au développement » sera initié et une architecture de criblage sera élaborée (tests *in vitro* d'affinité et de sélectivité, tests fonctionnels sur cibles natives ou organes isolés, évaluation de l'absorption et de la stabilité métabolique du composé *in vitro* et *in vivo*, tests fonctionnels *in vivo*, tests pharmacologiques *in vivo* prédictifs de l'indication thérapeutique, tests de sécurité cardiovasculaire, etc.). L'optimisation des têtes de série est un processus souvent complexe car il est nécessaire d'optimiser en parallèle de nombreux paramètres, non seulement d'ordre pharmacologique et physico-chimique, mais aussi pharmacocinétique et toxicologique avant de proposer le candidat final au développement.

Examinons en détail chacune de ces étapes.

3.1.2 Choix de la cible biologique et validation fonctionnelle

Approche basée sur une cible moléculaire bien identifiée

Dans le passé, la recherche de nouvelles molécules au laboratoire reposait sur un criblage « phénotypique » *in vivo* sur un modèle animal (par exemple mesure de la pression artérielle, du transit gastro-intestinal, d'un comportement, etc.) et la ou les cibles moléculaires sur lesquelles agissait le produit n'était, bien souvent, pas connue. Cette approche de recherche, bien que

de faible capacité (4-10 produits testés par semaine en moyenne), s'est néanmoins révélée très fructueuse puisqu'elle a généré de grands médicaments tels que la cyclosporine, le taxol et la vinblastine, le clofibrate, la troglitazone, le clopidogrel, pour n'en citer que quelques uns, dont le mécanisme d'action n'a été découvert que bien plus tard.

Du fait des avancées importantes réalisées en biologie moléculaire et en biochimie à la fin des années 80, le criblage phénotypique *in vivo* a été progressivement abandonné en faveur d'un criblage biochimique *in vitro* plus rapide et à haut débit sur des cibles moléculaires bien caractérisées. Dans cette approche, les effets pharmacologiques des produits identifiés lors du criblage sont ensuite évalués sur des systèmes cellulaires natifs *in vitro*, puis sur l'animal entier, pour vérifier si l'interaction du produit avec sa cible moléculaire est bien traduite au plan fonctionnel dans les modèles expérimentaux de la pathologie visée.

Selon les estimations les plus récentes, il existerait environ 25 000 gènes codants dans le génome humain, correspondant à environ 250 000 protéines. Aujourd'hui, moins de 500 gènes ont été identifiés comme cibles moléculaires des médicaments présents sur le marché (Drews & Ryser, 1997; Landry & Gies, 2007). Ils correspondent à des enzymes, des récepteurs à sept domaines transmembranaires, des récepteurs nucléaires, des récepteurs à tyrosine kinase, des canaux ioniques, des transporteurs, des antigènes cibles d'anticorps monoclonaux, etc. En théorie, on estime que près de 3 000 à 8 000 gènes potentiels supplémentaires pourraient conduire à des thérapies innovantes plus efficaces et sélectives (Hopkins & Groom, 2002; Imming *et al.*, 2006). Il existe donc une source très abondante de cibles moléculaires potentielles à notre disposition pour élaborer de nouveaux médicaments innovants.

L'étape la plus critique dans le processus de recherche de nouveaux médicaments au laboratoire est le choix de la cible moléculaire, car elle détermine le succès potentiel du programme de recherche. Plusieurs approches, non exclusives, peuvent être utilisées :

- la plus courante est celle basée sur la littérature scientifique qui révèle souvent des cibles moléculaires possédant un fort rationnel

scientifique. La connaissance de l'étiopathogénie de la maladie est, à cet égard, une source importante de nouvelles cibles moléculaires. Par exemple, les études génétiques réalisées sur des patients souffrant d'épilepsies d'étiologies diverses ont permis d'identifier un certain nombre de gènes reliés à la maladie. Quatorze chromosomes porteurs de régions candidates associées à l'épilepsie et 42 gènes mutés connus ont été étudiés. L'identification de ces gènes a mis en évidence l'implication de certains canaux ioniques neuronaux dans cette pathologie (canalopathies), fournissant ainsi des cibles originales pour la recherche de nouveaux anti-épileptiques (Wickenden, 2002; Scheffer & Berkovic, 2003). À cet égard, les canaux chlore *ClCN2* et les canaux potassiques *KCNQ2/3* et *Kv1.1* constituent des pistes sérieuses qui sont activement poursuivies.

Les études génétiques concernant les formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer ont permis d'identifier des mutations portant sur les gènes codant pour le précurseur de la protéine β -amyloïde et conduisant à des altérations dans la signalisation liée à ce peptide. Ces mutations se traduisent par une accumulation de protéine β -amyloïde et la formation de plaques séniles (Hardy & Selkoe, 2002; Morissette *et al.*, 2009). Ces données ont permis de développer des stratégies thérapeutiques visant à réduire la formation de la protéine β -amyloïde en inhibant sa production (inhibition des β - et γ -sécrétases) ou la formation des agrégats ou bien en favorisant son catabolisme (anticorps ou vaccins dirigés contre la protéine β -amyloïde) (Pangalos *et al.*, 2007).

– Une autre approche, utilisée dans certaines sociétés pharmaceutiques en interne, repose sur la sélection des cibles biologiques par homologie structurale. Elle consiste à identifier dans le génome humain des gènes qui codent pour des protéines ayant une similitude structurale avec des membres de la même famille pour lesquels on possède déjà des ligands (petites molécules) identifiés dans la littérature chimique. Ces nouvelles protéines ont une meilleure chance de devenir des cibles moléculaires intéressantes pour un programme de recherche, puisqu'elles pourraient avoir des fonctions (ou dysfonctions) semblables à celles de la cible parente et, d'autre part, les familles de composés de synthèse déjà actives sur les protéines parentes ont une forte chance d'avoir une certaine affinité pour la protéine homologue. Il restera ensuite à optimiser chimiquement ces composés (voir plus loin) de façon à améliorer leur affinité pour cette nouvelle protéine homologue. La grande famille des canaux potassiques (à 2, 4 ou 6 domaines transmembranaires) peut se prêter à ce type d'approche dans la me-

sure où des composés affins pour certains des canaux de cette famille ont déjà été identifiés. De la même façon, les homologies existant entre les trois sous-types de récepteurs à la vasopressine ont permis de découvrir à partir de composés antagonistes des récepteurs V1a (orientés vers le traitement de l'accouchement prématuré), des antagonistes du sous-type V1b central (à activité antidépressive) et des antagonistes V2 pour le traitement des hyponatrémiés (Serradeil-Le Gal *et al.*, 2005).

– Une troisième approche est basée sur une recherche prospective utilisant la génomique, la transcriptomique ou la protéomique différentielle (Figure 2).

Dans certains cas, des gènes peuvent être sélectionnés comme cible de façon pragmatique, en fonction de leur expression différentielle dans un tissu d'intérêt. Par exemple, une enzyme exclusivement exprimée dans la prostate pourra constituer une cible pour le traitement de l'hypertrophie bénigne ou du cancer de la prostate. Dans la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G, il en existe plus d'une centaine dont on ne connaît pas encore le ligand (récepteurs orphelins) et qui peuvent constituer des cibles innovantes pour de nouveaux médicaments (Levoe & Jockers, 2008). À titre d'exemple, un récepteur orphelin localisé exclusivement dans l'habénula médiane pourra avoir un intérêt pour le traitement de certaines pathologies du système nerveux central, compte tenu de nos connaissances concernant les afférences et efférences de l'habénula médiane dans le cerveau.

Les stratégies transcriptomique et protéomique consistent à rechercher des variations d'expression de gènes ou des protéines correspondantes dans des tissus pathologiques par rapport à des tissus sains à travers la mesure des ARN messagers (analyse des signaux d'hybridation à l'aide de puces ADNc = transcriptomique) ou des protéines elles-mêmes (électrophorèse bidimensionnelle sur gels avec identification des protéines d'intérêt par spectrométrie de masse = protéomique) (Figure 2). Par exemple, des échantillons de tissus cérébraux provenant de modèles animaux d'épilepsie peuvent être utilisés dans ce type d'analyse. Les gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée constituent des candidats potentiels au statut de cible moléculaire. La recherche bio-informatique *in silico* dans les bases de données génomiques humaines publiques ou privées, comparant tissus épileptiques et tissus sains, peut apporter des éléments décisionnels quant à la sélection de la cible moléculaire; mais le plus souvent la validation de la cible biologique est réalisée par génomique fonctionnelle à l'aide de souris transgéniques dont le gène d'intérêt est invalidé ou surexprimé et par l'analyse du phénotype correspondant (voir ci-dessous). Les

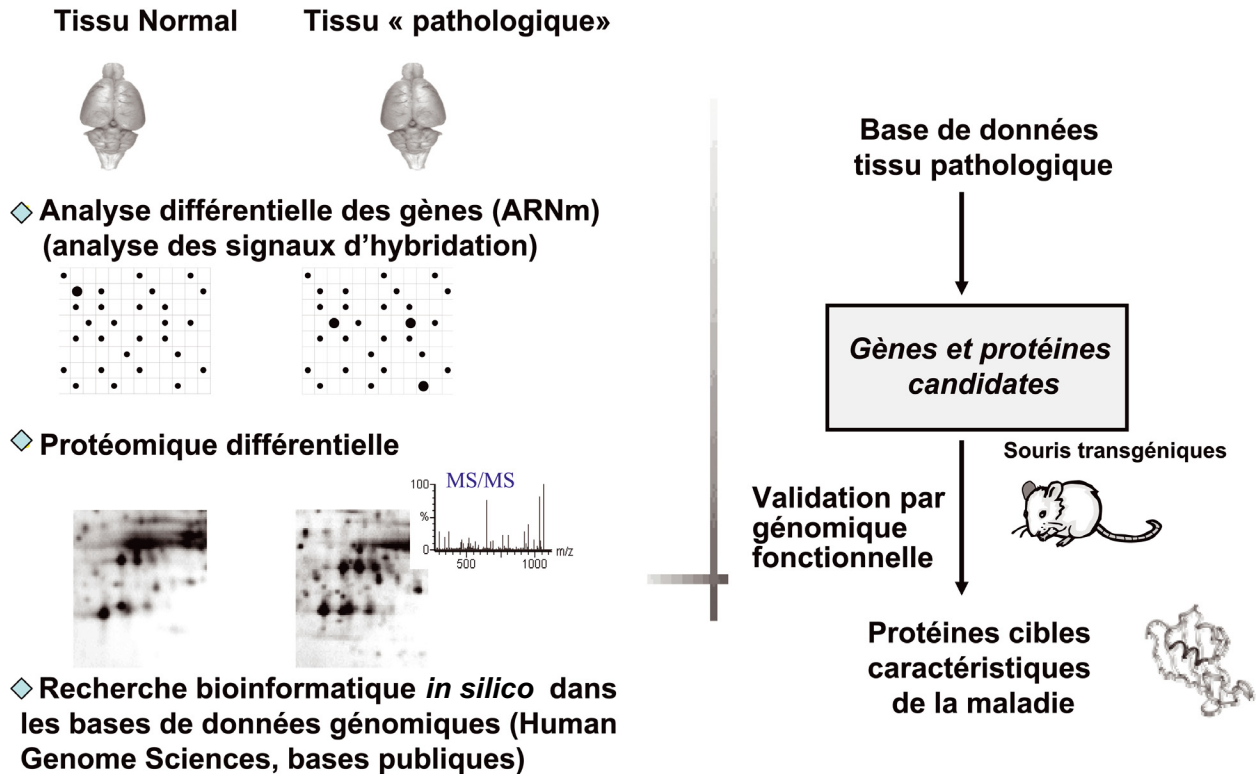


Fig. 2. Stratégies transcriptomique et protéomique pour l'identification des cibles biologiques.

biopsies cérébrales humaines peuvent aussi être utilisées comme filtres pour sélectionner des cibles potentielles (par exemple en utilisant l'hybridation *in situ* de la cible étudiée sur tissu cérébral épileptique comparé au tissu sain).

Le choix du modèle expérimental pour l'identification de nouvelles cibles biologiques par analyse transcriptomique/protéomique est crucial (Anders & Vielhauer, 2007). Il n'existe malheureusement pas de modèle universel reproduisant l'ensemble des événements moléculaires impliqués dans le processus pathologique conduisant au développement d'une épilepsie mais certains modèles d'épileptogénèse (développement progressif d'un *status epilepticus* induit par *kindling* (embrasement), traitement au kainate ou à la pilocarpine, crises convulsives secondaires induites par un traumatisme crânien) se sont révélés intéressants. Les modèles génétiques (souches d'animaux avec des crises récurrentes spontanées dues à des mutations ou des modifications induites d'expression de gènes spécifiques ou avec des crises réflexes) représentent une approche alternative focalisée sur une étiologie unique.

À titre d'illustration, les événements moléculaires prenant place dans le cerveau durant le processus d'épileptogénèse ont été analysés par plusieurs auteurs à travers la signature transcriptionnelle associée

au processus de *kindling* amygdalien (stimulation électrique répétée pendant plusieurs jours de l'amygdale jusqu'à l'obtention de convulsions généralisées) dans l'hippocampe chez le rat. Dans cette structure cérébrale, une centaine de gènes sont surexprimés durant le *kindling* et une dizaine réprimés. Les gènes régulés appartiennent à des familles très variées : récepteurs, canaux ioniques, protéines sécrétées, gènes contrôlant la plasticité synaptique ou impliqués dans la transduction du signal, enzymes, facteurs de transcription, etc.). Par exemple, dans l'étude précédente, le gène codant pour la neurotrophine BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) était fortement surexprimé (environ 3 fois) après *kindling*, un effet confirmé par PCR quantitative, ainsi que le gène codant pour le récepteur TrkB (*tropomyosin receptor kinase B*) du BDNF (He *et al.*, 2002; Gorter *et al.*, 2006).

Il est important de souligner que les processus biologiques dans leur globalité sont plus importants que les variations individuelles des gènes/protéines (identifiées par les différentes approches moléculaires telles que la transcriptomique, la protéomique ou même la génétique) qui doivent être intégrées au sein de réseaux biologiques si l'on espère avancer dans la compréhension des mécanismes sous-jacents aux pathologies. Le choix final d'une cible moléculaire peut ainsi porter sur une protéine présente en amont ou en

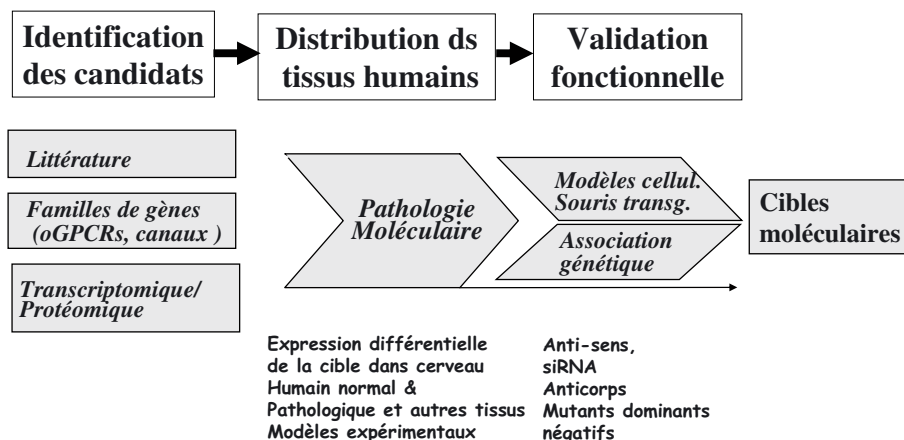


Fig. 3. Processus général de validation de la cible moléculaire. oGPCRs = récepteurs orphelins à 7 domaines transmembranaires.

aval de celles modulées par la situation pathologique dans la chaîne des événements biochimiques conduisant à la dérégulation du système biologique.

Une fois la cible moléculaire identifiée, il s'agit ensuite de s'assurer que la modulation de cette cible entraîne bien les effets fonctionnels recherchés sur des systèmes biologiques intégrés. Pour ce faire, ces protéines cibles vont subir un processus de validation fonctionnelle *in vitro* (Figure 3) impliquant des cellules recombinantes ou natives en utilisant des ARN interférents, des oligonucléotides antisens, des anticorps inactivants ou des mutants dominants négatifs (Zavitz *et al.*, 2008).

Des souris transgéniques surexprimant ou invalidant le gène correspondant à la protéine cible seront ensuite utilisées pour caractériser les conséquences phénotypiques et biochimiques associées à ces manipulations génétiques. Si l'on reprend l'exemple précédent où une surexpression du BDNF et de son récepteur correspondant TrkB a été observée dans un modèle de *kindling* amygdalien chez le rat, des études ultérieures ont montré que l'inactivation conditionnelle de BDNF et TrkB, respectivement, réduit ou abolit le *kindling* amygdalien chez la souris (He *et al.*, 2004). Ces résultats, associés au fait que la surexpression de BDNF induit des effets pro-convulsivants et que le BDNF augmente l'excitabilité de l'hippocampe, suggèrent que le récepteur TrkB pourrait constituer une cible moléculaire intéressante pour le traitement de l'épilepsie du lobe temporal (Tsai, 2006). Des études de pathologie moléculaire (expression de la cible dans des tissus humains pathologiques ou des modèles expérimentaux) ainsi que des études d'association génétique pourront compléter la validation fonctionnelle des cibles moléculaires (Figure 3).

– Enfin, il ne faut pas négliger le fait que de nouvelles cibles moléculaires peuvent émerger d'une

observation clinique inattendue. Par exemple, la découverte des effets stimulants du cannabis sur l'appétit (en particulier pour des aliments riches en carbohydrates) a constitué le point de départ de la recherche d'antagonistes du récepteur cannabinoïde de type 1 pour le traitement de l'obésité et du syndrome métabolique, conduisant à la découverte du rimonabant qui s'est révélé actif en clinique dans ces pathologies.

Le choix définitif de la cible moléculaire pour le démarrage d'un programme de recherche dépendra d'un certain nombre de critères, tels que l'état de la connaissance physiopathologique concernant cette cible, les indications cliniques potentielles, l'originalité du mécanisme visé, l'état de la concurrence, le coût et la durée du développement et le potentiel commercial du composé agissant sur cette cible biologique. Quelle que soit la confiance que l'on puisse avoir dans la validation fonctionnelle d'une cible moléculaire, il faut bien réaliser qu'à ce stade il ne s'agit au mieux que d'une « hypothèse de travail » et que la validation définitive de la cible ne sera apportée que par les études de phase II de « preuve de concept » chez le patient.

Le processus global de validation fonctionnelle d'une cible moléculaire est relativement long (environ 2 ans), compte tenu du délai nécessaire à la préparation des souris transgéniques et aux croisements nécessaires pour obtenir le fonds génétique adéquat. Ce délai associé au fait que, lors du criblage des bibliothèques chimiques, on ne trouve des composés possédant une affinité significative pour la cible biologique et exploitables en termes d'optimisation, au mieux, que dans 50 % des cas (le succès étant bien sûr variable en fonction de la classe de cible testée, Macarron, 2006), a conduit certaines Sociétés Pharmaceutiques à recourir à une approche plus

rapide et pragmatique pour la validation des cibles moléculaires. Lorsqu'une cible moléculaire présente un certain intérêt théorique, elle est d'emblée sélectionnée à risque (sans validation fonctionnelle) pour réaliser un criblage à partir des bibliothèques chimiques existantes afin de trouver un « outil pharmacologique » ayant une affinité et une sélectivité pour cette cible suffisantes pour réaliser une validation fonctionnelle sur des modèles cellulaires *in vitro*, voire sur des modèles expérimentaux *in vivo* de la pathologie si le produit est bien absorbé. En suivant cette stratégie, on peut savoir rapidement si la cible moléculaire est valide et, si oui, un programme d'optimisation de l'outil pharmacologique en candidat médicament peut être rapidement élaboré.

Approche de recherche basée sur une cible cellulaire

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'approche de criblage phénotypique utilisée autrefois par l'industrie pharmaceutique a été largement abandonnée, depuis une vingtaine d'années, en faveur d'une approche plus réductionniste, bien que plus rationnelle, basée sur des cibles moléculaires bien caractérisées. Cependant, la reconnaissance des limitations de l'approche de recherche basée sur des mécanismes biochimiques définis (voir par exemple Sams-Dodd, 2005; Butcher, 2005) a conduit récemment à la renaissance de l'approche phénotypique *in vitro* qui présente l'avantage d'être une approche intégrée permettant de découvrir soit des composés possédant des mécanismes d'action multiples et convergents (composés « polypharmacologiques »), soit un ou des mécanismes d'action totalement insoupçonnés. Beaucoup de médicaments actuellement sur le marché doivent leurs qualités médicinales uniques à leur action simultanée sur plusieurs cibles moléculaires. C'est le cas de nombre de composés psychotropes comme les antipsychotiques utilisés dans le traitement de la schizophrénie (Kubinyi, 2003). En cancérologie, le sunitib (Sutent)[®], un inhibiteur simultané de plusieurs kinases (dont les récepteurs du PDGF = *Platelet Derived Growth Factor* et du VEGF = *Vascular Endothelial Growth Factor*) impliquées dans la prolifération cellulaire et l'angiogénèse tumorale, est indiqué pour le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales et des carcinomes rénaux avancés (Frantz, 2005).

Dans certains cas, la (ou les) cible moléculaire qui sous-tend les réponses phénotypiques observées peut être identifiée rétrospectivement (déconvolution de la cible, Terstappen *et al.*, 2007) et peut servir ultérieurement, non seulement à élucider les mécanismes biologiques de la maladie, mais aussi à réaliser un programme d'optimisation chimique des molécules, plus rationnel, basé sur cette cible

moléculaire, rejoignant ainsi l'approche précédente basée sur une cible moléculaire.

Dans cette approche de recherche, le choix de la cible cellulaire sera orienté par la pathologie visée et la validation fonctionnelle sera réalisée à l'aide des composés identifiés lors du criblage phénotypique. Ainsi, dans le domaine de l'oncologie, on pourra rechercher des substances inhibant spécifiquement la prolifération ou induisant une apoptose de certains types de cellules cancéreuses *in vitro* (cellules leucémiques, par exemple). Dans le domaine des antimicrobiens ou antiparasitaires, on recherchera des composés toxiques pour la bactérie ou le parasite ou inhibant sa prolifération. Dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, on peut rechercher, à partir de cultures de neurones murins, des substances favorisant la neurogénèse ou bien rechercher des composés stimulant la prolifération et/ou la différenciation de cellules souches adultes de rat (prélevées à partir de la zone sous-ventriculaire) en neurones dans le but de compenser la perte neuronale intervenant dans l'hippocampe et d'autres régions cérébrales dans cette pathologie. Dans d'autres pathologies comme la sclérose en plaques, caractérisée par une démyélinisation importante au niveau du SNC, on peut imaginer de rechercher des substances stimulant la différenciation des progéniteurs des oligodendrocytes en oligodendrocytes matures générateurs de myéline afin de favoriser la réparation neuronale endogène. À l'inverse, pour le traitement de l'obésité, on s'intéressera plutôt à des substances inhibant la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures afin de diminuer les réserves de triglycérides.

Dans certains cas, on peut utiliser des systèmes cellulaires plus intégrés pour le criblage phénotypique. Ainsi, des tranches, ou des cultures organotypiques, d'hippocampe peuvent être utilisées pour mesurer, à l'aide de multi-électrodes, l'influence de composés sur une activité épileptiforme évoquée, voire même spontanée (tranches provenant d'animaux ayant développé des crises spontanées post-*status epilepticus*) (Steidl *et al.*, 2006).

Selon les cas, le marqueur d'efficacité des molécules testées pourra être morphologique, physiologique (sécrétion), biochimique, électrophysiologique, voire génomique (mesure de l'expression d'un gène en réponse à une substance pharmacologique).

3.1.3 Criblage des bibliothèques chimiques

Cibles moléculaires (Figure 4)

L'étape suivante dans le processus de recherche du candidat médicament repose sur la production de la protéine cible humaine à partir de systèmes recombinants (par exemple, cas d'une enzyme exprimée

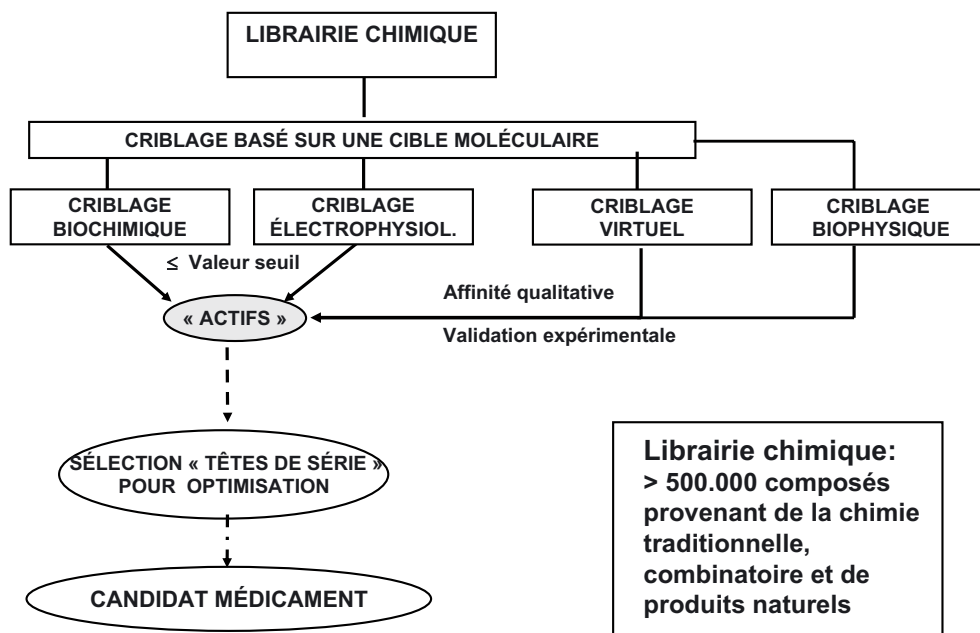


Fig. 4. Types de tests utilisés pour le criblage des bibliothèques chimiques.

à partir d'une cellule hôte comme *E. Coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*) ou la création d'une lignée cellulaire stable exprimant la protéine cible humaine (cellules CHO ou HEK293 transfectées dans le cas des récepteurs et canaux ioniques), puis sur l'élaboration d'un test de criblage biochimique ou électrophysiologique à partir de ce matériel biologique (Proudfoot, 2008; Wermuth, 2008). Dans certains cas, lorsque des cellules natives expriment fortement un récepteur, il est possible de réaliser le criblage sur cette lignée (cellules SH-SY5Y de neuroblastome humain, par exemple).

Lorsqu'il existe des variations génétiques sur la séquence biologique de la cible, il sera nécessaire de choisir le variant le plus pertinent pour le criblage (idéalement celui exprimé préférentiellement dans la pathologie visée). Par exemple, le récepteur histaminergique H₃ humain comprend vingt isoformes différentes publiées dont six ont une affinité importante pour le ligand naturel (Wellendorph *et al.*, 2002) et il est important de cibler le variant le plus significatif pour la pathologie visée.

Deux types de criblage automatisés peuvent être envisagés : le criblage à haut débit (HTS = *high throughput screening*) réalisé à l'aide de robots (capacité moyenne de criblage 50–100 000 composés testés par semaine) et le criblage à moyen débit (MTS = *medium throughput screening*) réalisé à l'aide de stations de travail semi-automatisées (capacité de criblage : 10 000 composés par semaine). Les tests sont miniaturisés et réalisés sur des micro-volumes dans des plaques à 96, 384, voire 1536 puits.

Les bibliothèques chimiques utilisées pour le criblage sont généralement issues du patrimoine chimique de la Société Pharmaceutique accumulé depuis de nombreuses années et résultant d'une chimie traditionnelle mais aussi plus récemment de la chimie combinatoire automatisée (*cf.* Kumar *et al.*, 2008) ou d'extraits de produits naturels issus de plantes ou de la fermentation de microorganismes (Newman *et al.*, 2008).

En général, pour le criblage HTS, une bibliothèque focalisée d'environ 500 000–600 000 molécules représentatives de l'ensemble du patrimoine chimique de la Société (et organisées par familles chimiques) est utilisée. Pour le criblage MTS, une bibliothèque plus restreinte de 25 000 ou 50 000 composés sera utilisée. La diversité chimique associée à ces bibliothèques, de taille moyenne, peut paraître relativement modeste lorsqu'on la compare au nombre théorique possible de composés existant dans l'univers chimique estimé à 10⁴⁰–10¹⁰⁰ (Macarron, 2006), mais elle est souvent suffisante pour identifier des composés ayant une affinité pour la cible biologique compatible avec le démarrage d'un programme d'optimisation chimique.

Le criblage *in vitro* sur des cibles moléculaires identifiées présente un certain nombre d'avantages : le mécanisme d'action est choisi dès le départ et peut donc être original et conduire à une nouvelle classe thérapeutique de médicament ; les tests de criblage sont automatisés et miniaturisés, ce qui entraîne fiabilité, rapidité et économie ; ce type de criblage « au hasard » permet de détecter des substances chimiques actives difficiles à concevoir par les moyens classiques ; le criblage est réalisé directement sur la cible moléculaire

humaine et non animale, ce qui évite l'écueil des différences d'affinité inter-espèces; ce type de test se prête aussi à évaluer des mélanges de composés dont on pourra ultérieurement isoler le principe actif (y compris les produits naturels); enfin, ces tests réalisés *in vitro* économisent considérablement les animaux.

Les informations biochimiques générées à partir de ce criblage seront ensuite confrontées aux structures chimiques des molécules à l'aide d'ordinateurs puissants et stockées dans une base de données centrale afin d'exploiter les relations structure-activité pertinentes qui serviront au chimiste pour démarrer le programme éventuel d'optimisation chimique.

Différentes techniques de criblage peuvent être utilisées (voir Figure 4). La plus classique repose sur un test biochimique : par exemple, recherche d'une compétition vis-à-vis de la liaison de ligands radioactifs à des membranes provenant d'un tissu d'intérêt, mesure d'une activité enzymatique, mesure d'un second messenger (AMP cyclique, IP3, kinases faisant partie de la signalisation cellulaire), changement d'activité d'un gène rapporteur, mesure de l'interaction entre protéines par technologie FRET (*fluorescence resonance energy transfer*).

En ce qui concerne les canaux ioniques, les techniques de criblage ont rapidement évolué dans les dernières années permettant, maintenant, d'appréhender plus facilement ce type de cibles moléculaires. Ainsi, la plupart des canaux calciques ou sodiques peuvent être criblés de façon automatique à l'aide de sondes fluorescentes (Fluo-4, FMP) sensibles aux variations du potentiel de membrane et de fluorimètres FLIPR avec une forte capacité (environ 600 000 molécules par campagne de criblage). D'autres canaux ioniques (potassiques, cations monovalents) sont plus difficiles à appréhender et nécessitent l'utilisation de techniques de mesure de flux de rubidium par absorption atomique (canaux potassiques) ou de *patch-clamp* automatisé dont la capacité de criblage reste néanmoins encore limitée à 25 000–50 000 composés par campagne.

Lorsque le criblage biochimique/électrophysiologique à haute capacité s'avère impossible à pratiquer et lorsque la structure tridimensionnelle de la cible moléculaire est connue (site actif d'une kinase ou site orthostérique d'un récepteur par exemple), il est possible d'utiliser la technique de criblage virtuel (Langer & Bryant, 2008). La structure tridimensionnelle de la protéine-cible peut, dans certains cas, être obtenue à partir d'études de cristallographie aux rayons X et de RMN ou bien l'on peut construire un modèle par homologie avec des protéines voisines et ensuite identifier le site de liaison des ligands (Hillish *et al.*, 2004). Le criblage virtuel consiste à présenter au site actif toute une série de structures chimiques (« *docking* ») et à évaluer leur ajustement au site de liaison (affi-

nité qualitative, « *scoring* ») (Langer & Bryant, 2008). Un grand avantage de ce type d'approche est que les librairies chimiques utilisées pour le criblage *in silico* peuvent être constituées non seulement des librairies internes mais aussi de librairies commerciales externes de grande taille (1 ou 2 millions de molécules), voire de librairies virtuelles, imaginées par le chimiste, augmentant ainsi la couverture de l'espace chimique. Les composés ayant les scores les plus élevés seront ensuite validés expérimentalement dans un test biochimique, par exemple, afin de mesurer leur affinité quantitative (Figure 4). Ces composés pourront ensuite servir de base pour un programme ultérieur d'optimisation chimique. Dans ce cadre, une optimisation de la structure chimique *in silico* pourra être réalisée au préalable et seules les molécules ayant le plus de chance de posséder une forte affinité pour la cible moléculaire seront synthétisées.

Une technique, encore expérimentale, de criblage biophysique a été récemment mise au point (Annis *et al.*, 2007). Celle-ci ne s'applique qu'aux protéines cibles solubles. Elle consiste à mettre la protéine soluble en présence d'un mélange de composés à tester (par exemple 200 composés) dont la masse moléculaire est unique. Après incubation, la protéine et les composés qui sont liés sont séparés des composés non liés par chromatographie d'exclusion de taille. Après séparation des composés affins et de la protéine par chromatographie, ceux-ci sont identifiés par spectrométrie de masse; ces composés ayant une masse unique, il sera aisé de les identifier puis d'évaluer leur affinité quantitative pour la cible dans un test biochimique *in vitro*. Cette approche biophysique est intéressante lorsque le criblage HTS par les techniques classiques n'est pas possible ou lorsqu'il s'est révélé infructueux. De plus, elle permet d'interroger tous les sites possibles de liaison d'un composé à sa cible biologique, incluant les sites de modulation allostérique.

Il est important de souligner que toutes les techniques de criblage décrites précédemment ne sont pas mutuellement exclusives mais peuvent être complémentaires et réalisées en parallèle afin d'enrichir la variété structurale des composés issus du criblage.

Cibles cellulaires (criblage phénotypique)

Bien que le criblage phénotypique *in vivo* soit encore pratiqué dans certains laboratoires pour des indications thérapeutiques où il n'existe pas d'alternative, il est remplacé, de plus en plus, par le criblage phénotypique *in vitro*.

Contrairement au criblage sur une cible moléculaire bien identifiée, le criblage phénotypique *in vitro* est réalisé sur un système cellulaire intégré (cellules en culture, organe isolé, tranches de tissu), des bactéries ou parasites, voire même des organismes

modèles tels que poissons zèbres ou nématodes (comme *C. Elegans*) (Austen & Dohrmann, 2005) sans idée préconçue sur la ou les cibles biochimiques mises en jeu et la réponse mesurée est une réponse intégrée (prolifération et différenciation cellulaire, neuritogénèse, changement de polarité de la cellule, sécrétion hormonale; expression de gènes cibles, consommation d'ATP, etc.).

De par sa nature, le criblage phénotypique a un débit limité. Cependant, ce débit dépend du paramètre mesuré. Lorsqu'un test biochimique (par exemple, mesure de l'apoptose par fragmentation de l'ADN) est pratiqué, il n'est pas rare de pouvoir tester près de 30 000 composés, un chiffre voisin de la capacité du MTS pratiqué sur certaines cibles moléculaires.

Des améliorations techniques récentes pourraient conduire rapidement à une augmentation de la capacité du criblage phénotypique. Ainsi, des logiciels performants d'analyse d'image se sont développés et permettent la mesure à haut débit des changements de forme de la cellule de manière entièrement automatisée (applicable par exemple à la mesure de l'effet de composés sur la neuritogénèse ou la différenciation des cellules souches) (criblage HCS = *high content screening*). Des appareillages mesurant de façon simultanée l'expression de gènes en réponse à l'action d'un composé sur une cellule sont actuellement développés. Ces avancées technologiques devraient, dans un futur proche, favoriser la renaissance de l'approche phénotypique (Butcher, 2005).

3.1.4 Des composés trouvés « actifs » en criblage aux « têtes de série » optimisables

Comme nous l'avons évoqué précédemment, dans au moins 50 % des cas, il n'est pas possible de trouver des composés reconnaissant avec une affinité suffisante la cible biologique ou ayant une structure chimique acceptable pour pouvoir envisager le démarrage d'un programme de recherche. Par contre, dans le cas d'un résultat positif durant la campagne de criblage, il va falloir s'assurer que les composés trouvés « actifs » ont les qualités requises pour devenir des « têtes de série » optimisables chimiquement. À ce stade, on vérifiera que le composé actif dans le test de criblage initial, généralement réalisé à une seule concentration, a une affinité suffisante (de l'ordre du μM) dans un test fonctionnel (effet agoniste ou antagoniste), une sélectivité acceptable par rapport à d'autres cibles moléculaires et des propriétés physicochimiques (masse moléculaire, solubilité, log P, pKa), et pharmacocinétiques (perméabilité intestinale, métabolisation) adéquates pour être considéré comme « tête de série ».

Dans le détail, le processus est le suivant : dans une première étape, on élimine les composés dont la

structure chimique n'est pas exploitable (par exemple des composés pouvant générer des radicaux libres soit eux-mêmes soit *via* leurs métabolites potentiels); d'autre part, étant donné que le criblage initial est toujours réalisé sur des produits en solution dans le diméthylsulfoxyde, on vérifie l'identité chimique et la pureté du composé testé (par spectrométrie de masse) et l'on mesure l'affinité réelle pour la cible (K_i ou CE_{50} ; voir Nowicki & Scatton, 2008 pour l'expression des résultats) du produit préparé à partir de la poudre elle-même; dans certains cas, afin d'enrichir l'environnement chimique autour des « têtes de série », on pratique un criblage additionnel de composés structuralement apparentés aux composés trouvés « actifs » et appartenant au patrimoine chimique mais non inclus dans la librairie utilisée pour la campagne de criblage.

Dans un deuxième temps, on mesurera l'activité fonctionnelle *in vitro* des composés sélectionnés (puissance et efficacité) dans un ou plusieurs tests sur cellules natives d'origine humaine et animale ou transfectées. La sélectivité des composés par rapport à des cibles moléculaires homologues (famille de sous-types de récepteurs par exemple) et des cibles associées à des effets secondaires potentiels sera également évaluée. En parallèle, on évaluera *in silico* les propriétés physicochimiques des composés (solubilité, perméabilité, potentialité à devenir un médicament, etc.) et leur génotoxicité potentielle à l'aide de logiciels adaptés, ainsi que l'originalité de la structure chimique, sa brevetabilité et la faisabilité de la synthèse chimique.

Des tests *in vitro* visant à évaluer l'absorption et le métabolisme du composé seront aussi réalisés. Enfin, dans certains cas où le produit est suffisamment afin pour servir d'emblée d'outil pharmacologique, on évaluera l'activité *in vivo* du composé dans un test simple chez l'animal.

Ce processus permet ainsi d'avoir une connaissance approfondie des avantages et désavantages des différentes séries chimiques évaluées et de faire le choix d'une ou de plusieurs séries chimiques pouvant servir de base au programme de recherche proprement dit.

3.1.5 Optimisation des têtes de série en candidats médicaments

La première étape dans le démarrage d'un programme de recherche, qu'il soit basé sur une cible moléculaire ou cellulaire, est d'élaborer une architecture de criblage (voir Nowicki & Scatton, 2008) permettant l'optimisation des analogues structuraux synthétisés *de novo* par les chimistes médicaux (par synthèse traditionnelle ou synthèse automatisée à haut débit) en candidats au développement (Figure 5).

Cette étape comporte des tests primaires réalisés *in vitro* avec des valeurs seuils (« *cut off* ») permettant d'évaluer : 1) l'affinité pour la cible moléculaire

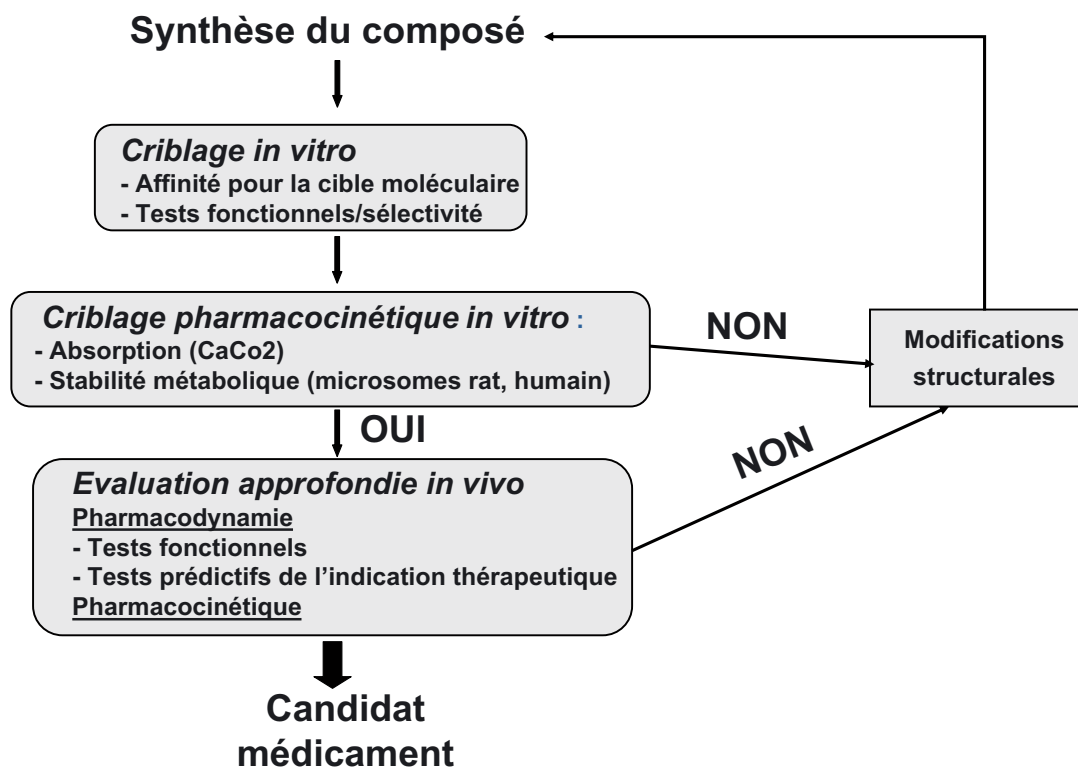


Fig. 5. Processus d'optimisation des têtes de série.

humaine et d'autres espèces pharmacologiques (rongeur, chien, primate) ou pour la cible cellulaire et 2) la sélectivité du composé (sur environ 30 cibles moléculaires ou sur un panel de cellules tumorales solides et liquides, par exemple, dans le cas d'une cible cellulaire). Des tests fonctionnels secondaires sur cellules natives exprimant la cible moléculaire à un niveau physiologique ou sur organes isolés sont ensuite effectués. Ces tests secondaires permettent également de juger de la pénétration cellulaire du composé. Pour certaines cibles, comme les récepteurs à sept domaines transmembranaires, il sera important d'évaluer les effets des produits sur différentes voies de signalisation, en raison des variations possibles du profil agoniste/antagoniste selon la voie de signalisation et la protéine G impliquée (*cf.* récepteur β_3 par exemple, Sato *et al.*, 2008).

Si les composés sélectionnés répondent aux objectifs fixés, on évalue alors leur absorption *in vitro* sur cellules CaCo2 humaines (lignée tumorale de cancer du colon) et leur stabilité métabolique *in vitro* sur microsomes hépatiques humains et de différentes espèces animales (Figure 5). Il y a quelques années, une des principales causes d'attrition des molécules durant le processus d'optimisation était la pharmacocinétique : 39 % des causes d'attrition en 1991. Grâce à la réalisation précoce d'études pharmacocinétiques

durant le processus d'optimisation, cette attrition est tombée à moins de 12 % en 2001 (Brown, 2007).

Si les produits synthétisés ne répondent pas aux pré-requis, des modifications structurales sont réalisées afin d'améliorer les paramètres mesurés.

La modélisation moléculaire est un outil précieux pour le chimiste médicinal dans l'optimisation des molécules. Les études de co-cristallisation du ligand et de sa cible biologique lorsqu'elles sont possibles apportent des informations structurales clés (en particulier, distances entre les différents substituants de la molécule et les acides aminés du site actif de la cible) qui permettent de déterminer rapidement les modifications à apporter à la molécule parente (Rondeau & Schreuder, 2008). Ces dernières années, le développement de la synthèse automatisée à haut débit (aussi appelée synthèse parallèle) de bibliothèques chimiques a également permis d'accélérer le processus d'optimisation des molécules (Kumar *et al.*, 2008). Cette technique consiste à générer de façon automatique un ensemble de molécules à partir d'un squelette de base auquel on greffe des substituants variés. Des bibliothèques de l'ordre d'une centaine de molécules permettent d'explorer rapidement certaines hypothèses de travail dans l'espace chimique.

Le passage réussi du composé à travers les cribles *in vitro* précédemment évoqués permet d'envisager

ensuite son évaluation *in vivo* ou *ex vivo*, tout d'abord dans des tests fonctionnels qui permettent de s'assurer que le produit a bien atteint sa cible moléculaire (ou cellulaire lorsque c'est possible) puis dans des tests pharmacologiques *in vivo* prédictifs de la ou des indications thérapeutiques (Figure 5).

De nombreux types d'essais fonctionnels *ex vivo* ou *in vivo* peuvent être réalisés : déplacement de la liaison *ex vivo* ou *in vivo* de ligands radioactifs dans le tissu d'intérêt, mesure *ex vivo* d'une activité enzymatique ou d'un processus biologique (coagulation, fibrinolyse, par exemple), mesure de paramètres électrophysiologiques (électrocardiogramme, électroencéphalogramme), antagonisme des effets physiologiques d'un agoniste exogène administré par voie systémique ou locale ou d'un agoniste endogène (par exemple, antagonisme de la sécrétion d'ACTH induite par l'injection de vasopressine ou par un stress chez le rat (Serradeil-Le Gal *et al.*, 2005). Dans certains cas, ces tests sont transposables à l'homme et peuvent être réalisés en phase I pour s'assurer que le produit atteint bien sa cible biologique chez l'homme à la dose étudiée (biomarqueurs).

L'avènement des techniques de transgénèse a permis d'améliorer les tests *in vivo* prédictifs de la pathologie et il est maintenant possible, dans certains cas, de mimer chez l'animal différents aspects de la maladie. Par exemple, des souris doubles transgéniques, exprimant le gène humain muté codant pour le précurseur de la protéine β -amyloïde et la préséniline-1, ou triples transgéniques surexprimant, en plus, la protéine tau humaine, présentent, comme chez le malade souffrant de maladie d'Alzheimer, des altérations pathologiques caractéristiques telles que présence de dépôts de protéine β -amyloïde, hyperphosphorylation et agrégation de la protéine tau avec dégénérescences neurofibrillaires; neuroinflammation caractérisée par la présence de cellules microgliales et astrogliales, et perte neuronale au niveau de l'hippocampe ainsi que des déficits cognitifs intéressant la mémoire de travail et spatiale (Morrissette *et al.*, 2009). Dans certains cas, où l'affinité des composés synthétisés pour la cible biologique animale est faible par rapport à celle qu'ils possèdent pour la cible humaine (cas classique des antagonistes des récepteurs aux chimiokines ou aux neurokinines), il est possible d'humaniser les souris en leur faisant exprimer le gène humain correspondant (souris *knock-in*) et ainsi disposer d'un modèle expérimental utilisable pour caractériser le produit et prédire la dose thérapeutique humaine.

Enfin, le profil pharmacocinétique du produit est complété par des études *in vitro* puis *in vivo* dans les espèces pharmacologiques afin d'établir la relation pharmacocinétique/pharmacodynamie et d'évaluer la dose potentiellement active en clinique. Sont évalués à ce stade l'efflux cellulaire du composé par les pompes

membranaires Pgp, la clairance de la molécule et de ses métabolites majeurs par des hépatocytes humains en culture et la contribution des divers cytochromes P450 au métabolisme de la molécule (pour évaluer les possibles interactions médicamenteuses), ainsi que l'inhibition ou l'induction de ces cytochromes par la molécule (Boussery *et al.*, 2008). Des études *in vivo* portant sur la pharmacocinétique et la distribution du composé et de ses métabolites les plus importants chez le rongeur et d'autres espèces utilisées en toxicologie complètent le profil du produit.

Des tests de sécurité cardiovasculaire *in vitro* (affinité pour le canal Herg en particulier, dont le blocage peut conduire à des arythmies), et des tests de génotoxicité et d'hépatotoxicité sont également pratiqués à ce stade et permettent d'établir la marge de sécurité du composé par rapport à ses effets adverses.

L'optimisation des têtes de série en candidats médicaments est un processus relativement complexe (schématiquement représenté sur le « diagramme en toile d'araignée », Figure 6) car il est nécessaire d'optimiser en parallèle de nombreux paramètres (affinité et sélectivité pour la cible biologique, protection brevetaire, propriétés physicochimiques, profil pharmacocinétique et pharmacodynamique, activité dans les modèles expérimentaux de la pathologie visée, absence de génotoxicité, d'hépatotoxicité, d'embryofoetotoxicité, d'effets cardiovasculaires délétères, etc.) avant de proposer le candidat final au développement.

À ce stade, il sera temps de déposer un brevet. Un brevet est un titre de propriété industrielle garantissant au détenteur (inventeur ou compagnie) de cette invention des droits exclusifs dans des territoires donnés pour une durée de 20 ans à partir de la date de dépôt de la demande de brevet. Il empêche une tierce partie d'utiliser l'invention sans le consentement du détenteur du brevet et permet au détenteur d'entamer une procédure judiciaire envers quiconque enfreint ses droits brevetaires. Un brevet garantit à la compagnie un retour sur son investissement de recherche. Trois critères sont nécessaires pour déposer un brevet : 1) la nouveauté : l'invention ne doit pas faire partie de l'état de l'art, c'est-à-dire ne pas avoir été divulguée au public avant la date de dépôt de la demande de brevet ; 2) l'inventivité : l'invention ne doit pas être considérée comme évidente pour l'homme de l'art ; 3) l'invention doit être susceptible d'application industrielle. Différents types de brevets peuvent être déposés dans les domaines chimiques et pharmaceutiques : brevet portant sur un produit, un procédé, une association, une nouvelle application thérapeutique d'un produit existant ou une nouvelle forme galénique.

Lorsque le candidat médicament répond à l'ensemble des pré-requis (Figure 6), il sera proposé au développement préclinique pour réaliser les études prévues dans cette phase (voir Section 2).

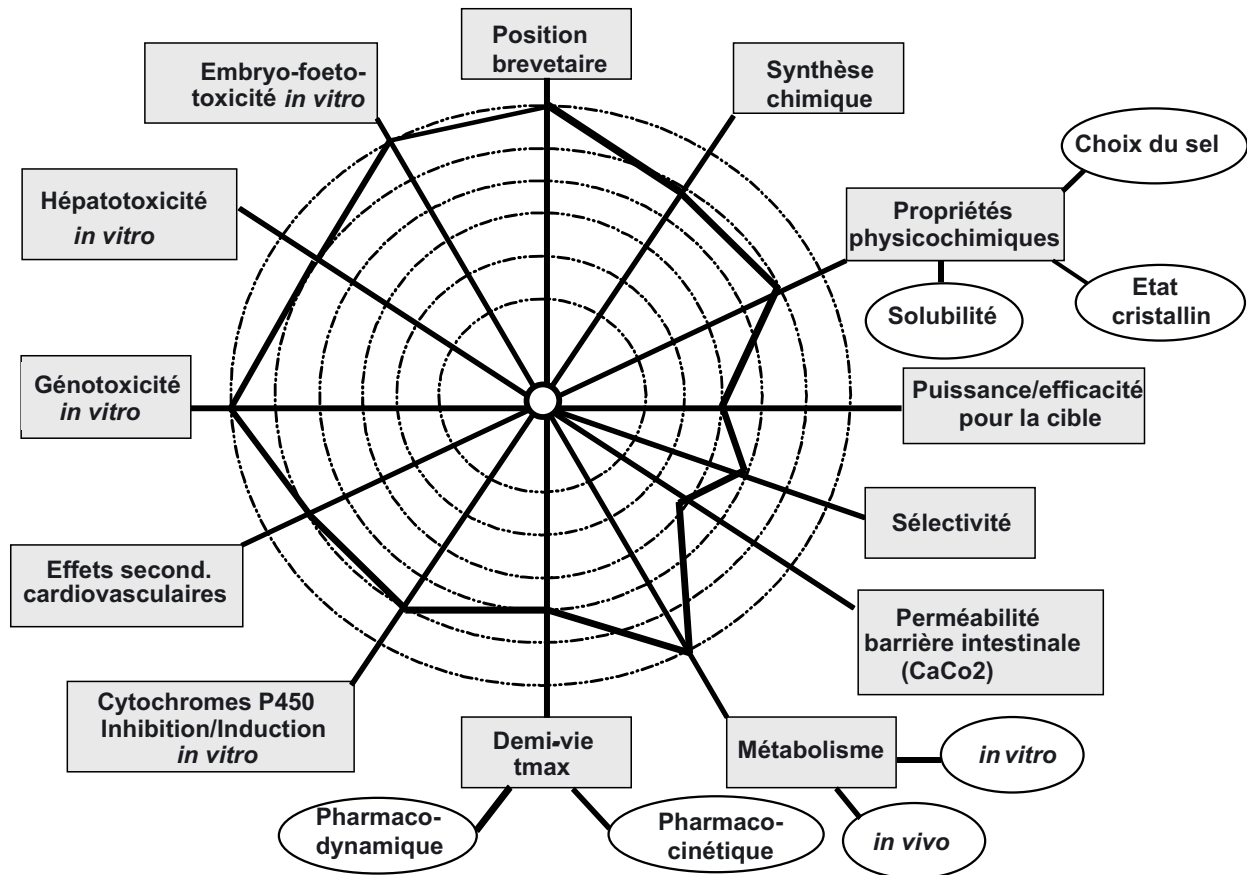


Fig. 6. L'optimisation multi-paramétrique des têtes de série. Diagramme en toile d'araignée. Pour chaque paramètre mesuré (figurant dans les rectangles à la périphérie de la toile), plus le segment partant du centre vers la périphérie est long, plus le critère correspondant est respecté.

3.2 Approche biothérapeutique (biomédicaments)

Les biomédicaments ont connu une croissance spectaculaire durant la dernière décennie, particulièrement dans des pathologies présentant un fort besoin thérapeutique non satisfait telles que cancer, maladies métaboliques, pathologies infectieuses ou maladies auto-immunes (Reichert *et al.*, 2005).

Il existe plusieurs catégories de médicaments biologiques :

- les anticorps monoclonaux nus ou conjugués à des agents cytotoxiques,
- les protéines thérapeutiques recombinantes ou extraites de milieux biologiques,
- les protéines modifiées (récepteurs solubles, protéines pièges ou « traps »),
- les autres molécules biologiques non protéiques (ARN interférents par exemple),
- la thérapie génique.

Nous ne discuterons dans ce chapitre que des deux premières approches pour lesquelles il existe actuellement de nombreux produits sur le marché. La thérapie

génique qui consiste à délivrer à l'aide d'un vecteur viral (adénovirus génétiquement inactivé) un gène thérapeutique dans un tissu cible, bien que prometteuse, n'en est encore qu'au stade de l'expérimentation clinique (nombreuses études de phase II) ; quant aux ARN interférents, si l'approche est fascinante, elle en est encore aux balbutiements en ce qui concerne une possible application clinique.

Selon les estimations, le marché biopharmaceutique est en plein essor (Reichert *et al.*, 2005) et devrait atteindre 12 à 15 % du marché pharmaceutique mondial en 2010 (Halioua, 2005). Parmi les médicaments biologiques, les anticorps monoclonaux ont connu la plus forte croissance : +48 % par an entre 1999 et 2004 (Halioua, 2005).

Du fait de la capacité des anticorps à se lier avec une forte affinité et spécificité à un antigène donné, l'immunothérapie passive constitue une thérapie prometteuse pour un grand nombre de pathologies. Les progrès des techniques d'immunisation et de biologie moléculaire ont permis de créer initialement des anticorps chimériques souris/homme puis,

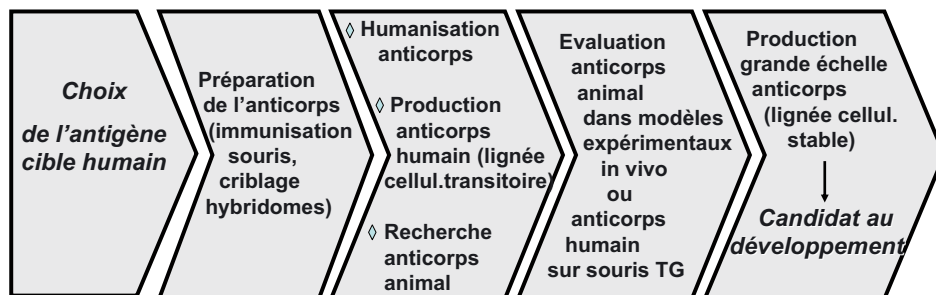


Fig. 7. Étapes impliquées dans le processus de recherche amont : approche biothérapeutique/anticorps monoclonaux.

plus récemment, des anticorps entièrement humanisés (Carter, 2006).

Comme pour les médicaments chimiothérapeutiques, il existe différentes étapes clés dans le processus de découverte des anticorps monoclonaux candidats qui seront proposés au développement préclinique et clinique et qui sont schématiquement représentées sur la figure 7.

- La première est le choix de l'antigène cible. La connaissance de la physiopathologie de la maladie peut, évidemment, être déterminante pour le choix de cet antigène. Par exemple, la connaissance du rôle majeur joué par le TNF dans le processus inflammatoire intervenant dans l'arthrite rhumatoïde a conduit à générer un anticorps actuellement commercialisé (Etanercept)[®], dirigé contre cette protéine (Venkateshan *et al.*, 2009). Dans le domaine broncho-pulmonaire, la reconnaissance du rôle important joué par l'interleukine-4 dans la crise asthmatique (Andrews *et al.*, 2006) a conduit au développement d'anticorps entièrement humanisés, dirigés contre cette cible, et actuellement en phase II d'expérimentation clinique dans l'asthme sévère à modéré.

Dans le cas du cancer, la connaissance de la biologie de la tumeur, de son hétérogénéité et de ses capacités d'adaptation apportée par les études génomiques, transcriptomiques et protéomiques, de son instabilité génétique (translocations, mutations) et des altérations épigénétiques, la caractérisation des cellules souches tumorales et de l'angiogénèse associée à la tumeur sont autant d'éléments déterminants intervenant dans le choix de l'antigène cible. Il est également important dans cette pathologie de choisir des cibles surexprimées par la cellule cancéreuse mais ne jouant pas un rôle vital essentiel pour la cellule normale. Par exemple, le Rituximab, un anticorps utilisé pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens, est dirigé contre l'antigène CD20 exprimé spécifiquement sur les cellules malignes de la lignée lymphocytaire B mais pas par les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes ou d'autres organes (Schrama *et al.*, 2006).

Dans d'autres cas, l'approche biothérapeutique pourra être envisagée lorsqu'il aura été impossible de trouver, lors des campagnes de criblage, des petites molécules reconnaissant une cible moléculaire donnée telle que récepteur ou canal ionique et lorsqu'il est possible d'utiliser la voie systémique pour le traitement de cette pathologie.

- La deuxième étape consiste en la préparation de l'anticorps. La technique la plus courante consiste à immuniser des souris à l'aide de l'antigène humain et à cribler les bibliothèques d'hybridomes (générés par fusion stable de cellules de myélome immortalisées avec les lymphocytes B provenant des souris immunisées) de façon à sélectionner l'anticorps le plus pertinent en terme d'activité sur l'antigène cible (et éventuellement en terme d'induction d'activité effectrice cytotoxique) (Carter, 2006). Ce procédé nécessite néanmoins l'humanisation ultérieure de la partie variable de l'anticorps afin de pouvoir l'utiliser chez l'homme (Carter, 2006). Il existe une autre alternative qui consiste à préparer d'emblée des anticorps entièrement humanisés à l'aide de souris chez lesquelles on a remplacé les gènes codant pour les immunoglobulines par leur équivalent humain (chaînes lourdes VH et kappa légères) (Lonberg, 2005); les chaînes constantes de l'anticorps souris (Fc) ne sont pas remplacées, ce qui présente l'avantage que les souris ne sont pas immunocompromises et peuvent servir à réaliser les études de preuve du concept, la portion Fc de l'anticorps souris étant remplacée par son équivalent humain après la sélection de l'anticorps. Une autre technique (dite du « phage display »), consiste à sélectionner l'anticorps à partir d'un antigène cible et d'une bibliothèque de bactériophages de grande taille (20 milliards) exprimant une large diversité d'anticorps humains (Hoogenboom, 2005). On peut ainsi, après plusieurs passages, isoler des anticorps humains spécifiques dirigés contre des antigènes complexes, pouvant être internalisés, et reconnaissant éventuellement différentes espèces animales ce qui facilitera les études ultérieures chez l'animal. Des anticorps bi-spécifiques dirigés simultanément

contre deux antigènes distincts peuvent aussi être générés par ces techniques.

- Pour les anticorps préparés à partir de souris normales, il sera nécessaire de les humaniser grâce à des techniques variées telles que resurfaçage, remplacement de résidus critiques sur les chaînes légères et lourdes, greffe de fragments variables, et de modifier éventuellement la glycosylation afin de moduler la demi-vie de l'anticorps (Carter, 2006). Selon les cas, le fragment Fc sera modifié de façon à minimiser ou au contraire à augmenter (visée cancer) la fonction effectrice (CDC = *complement-dependent lysis* et ADCC = *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) et l'effet pro-apoptotique de l'anticorps (Carter, 2006).
- L'étape suivante concernera la production et la purification de l'anticorps tout d'abord à partir d'une lignée cellulaire transitoire de mammifère (de façon à produire les petites quantités d'anticorps nécessaires à sa caractérisation pharmacologique en recherche amont), puis à partir d'une lignée stable qui servira à la production à grande échelle (à l'aide de fermenteurs) en vue des études précliniques et cliniques. Un système d'expression utilisant des cellules CHO (*chinese hamster ovary cells*) transfectées est souvent utilisé pour sélectionner le clone ayant la croissance et la productivité la plus forte et la stabilité la meilleure au cours des différentes générations.

Après purification par des méthodes analytiques classiques (chromatographie d'affinité, par échange d'ions, sur gel d'hydroxyapatite), l'affinité pour l'antigène et la spécificité de l'anticorps pour la cellule ou le tissu cible visés seront évaluées *in vitro* par des techniques variées (FACS, biacore, immuno-précipitation, hybridation *in situ*). On évalue également l'affinité de l'anticorps pour d'autres espèces pharmacologiques pouvant être utilisées ultérieurement pour les études *in vivo* (réactivité croisée). Comme pour les composés issus de la chimie médicinale, des études évaluant les effets de l'anticorps dans des modèles fonctionnels *in vitro* sur des cellules cibles humaines sont ensuite entreprises afin de caractériser son mécanisme d'action. Des changements phénotypiques (prolifération) ou biochimiques (phosphorylation, expression de gènes, etc.) sont mesurés. Pour les anticorps destinés au traitement de certains types de cancers, on évalue sur des lignées cellulaires porteuses de l'antigène leur capacité à induire une mort cellulaire directe par apoptose ou indirecte *via* la reconnaissance par le fragment Fc des récepteurs Fc γ R localisés à la surface des cellules sanguines NK (*natural killer*) ou des macrophages ou *via* la liaison du complément à la cellule cible (Carter, 2006). Pour les anticorps qui seront conjugués ultérieurement à une substance cytotoxique

(voir plus loin), la capacité d'internalisation sur une cellule tumorale cible est également évaluée à ce stade.

- Avant d'aborder les études de pharmacologie *in vivo*, des études de pharmacocinétique *in vivo* sont généralement réalisées chez une ou deux espèces (souris, primate) utilisées en pharmacologie et en toxicologie après administration unique et répétée de doses croissantes de l'anticorps. Un test ELISA (anticorps de chèvre reconnaissant l'anticorps humain) est nécessaire pour mesurer les concentrations circulantes de l'anticorps humain après son administration intraveineuse ou sous-cutanée. La mesure de l'absorption et de la demi-vie plasmatique est particulièrement importante à ce stade car elle va déterminer la dose et la fréquence d'administration de l'anticorps chez l'homme. La présence d'anticorps dirigés contre l'anticorps thérapeutique administré peut également être évaluée dans ces études.
- La dernière étape avant la proposition du candidat médicament au développement devra être la démonstration *in vivo* de l'efficacité de l'anticorps dans un modèle expérimental de la pathologie visée. Dans le cas où l'anticorps humanisé est également reconnu par certaines espèces animales, on retrouve une situation analogue à celle rencontrée pour les substances issues de la chimie médicinale et les mêmes modèles expérimentaux peuvent être utilisés (par exemple un modèle d'asthme induit par un allergène chez le primate). Dans le cas où l'anticorps humain n'est pas reconnu par d'autres espèces, on peut utiliser pour ces études un anticorps de substitution (« *surrogate* ») spécialement élaboré pour être reconnu par la souris ou le primate. Une autre alternative consiste à utiliser des souris transgéniques. Par exemple, des souris transgéniques surexprimant le gène muté du précurseur de la protéine β -amyloïde peuvent être utilisées pour évaluer des anticorps monoclonaux dirigés contre certaines régions ou formes ou configurations (oligomérique, agrégats) de la protéine β -amyloïde afin d'évaluer leur capacité à prévenir l'apparition des plaques amyloïdes et des altérations cognitives chez cette espèce (voir Thakker *et al.*, 2009). Enfin, dans le domaine de la cancérologie, l'utilisation de modèles de xénogreffes chez la souris immunodéprimée permet aisément l'évaluation des anticorps thérapeutiques *in vivo*. Dans ces modèles, des fragments de tumeurs humaines ou des cellules en suspension provenant d'une lignée tumorale humaine exprimant l'antigène visé sont implantées en sous-cutané chez des souris immunodéprimées; celles ci reçoivent l'anticorps par voie intraveineuse ou sous-cutanée à différentes doses et le poids de la tumeur est

mesuré à différents temps après l'implantation (voir Nowicki & Scatton, 2008). L'efficacité de l'anticorps, seul ou en association avec des agents cytotoxiques, sur différents types de tumeurs solides ou liquides à différents stades, peut ainsi être estimée. Ces études permettent aussi de déterminer la dose maximale tolérée et de calculer la marge de sécurité par rapport à la dose thérapeutique.

Après l'entrée de l'anticorps thérapeutique en développement, il suivra les mêmes étapes que celles précédemment décrites pour les composés chimiothérapeutiques.

Les approches thérapeutiques utilisées en oncologie pour la destruction des cellules tumorales ont évolué durant ces dernières années. Bien que la chimiothérapie conventionnelle basée sur des agents cytotoxiques reste un outil de choix dans l'arsenal thérapeutique, des thérapies plus « ciblées » dirigées sur des voies biologiques particulièrement actives dans la cellule tumorale mais non actives ou redondantes dans la cellule normale (certaines kinases par exemple) ont vu le jour plus récemment (Gleevec[®], Herceptin[®], Iressa[®]) (Adams & Weiner, 2005). Une évolution nouvelle dans la thérapie ciblée du cancer est celle des anticorps thérapeutiques conjugués à une substance cytotoxique (Wu & Senter, 2005). L'anticorps humanisé dirigé contre un antigène très exprimé sur la cellule cancéreuse mais absent sur la cellule normale est couplé à la substance cytotoxique (inhibiteur de la tubuline ou de la polymérisation des microtubules) *via* un agent de couplage chimique (« linker »). Après son administration, l'anticorps thérapeutique conjugué est reconnu par la cellule tumorale, le complexe antigène-anticorps est internalisé et la substance cytotoxique libérée, conduisant à la lyse de la cellule tumorale (Wu & Senter, 2005). Du fait de l'absence d'antigène cible sur les cellules normales, la toxicité de ce type d'immuno-conjugué est relativement faible comparé à celle d'un agent cytotoxique.

Un exemple d'anticorps conjugué utilisé actuellement pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës est le Mylotarg[®] composé d'un anticorps humanisé dirigé contre l'antigène CD33 lié chimiquement à la calichéamycine, un agent cytotoxique (Stasi, 2008).

Les protéines thérapeutiques occupent également une place importante et croissante dans l'arsenal thérapeutique actuel, bien que moindre que celle des anticorps monoclonaux. Parmi les plus connues, citons l'hormone de croissance, les insulines humaines modifiées, l'érythropoïétine, le G-CSF, les facteurs de la coagulation sanguine, les interférons et les enzymes comme l'urate oxydase (Fasturtec[®]). Par exemple, des modifications portant sur certains acides aminés clés dans les chaînes A et B de la molécule d'insuline humaine ont permis de modifier la formation des agrégats (les interactions entre hexamères d'insu-

line ont une influence déterminante sur la libération de la molécule active à partir de son site d'injection) et de développer de nouvelles insulines (comme Lantus[®], Apidra[®]) possédant un profil pharmacologique amélioré permettant, en particulier, d'éviter l'hypoglycémie associée à l'injection d'insuline naturelle et de mimer la sécrétion physiologique d'insuline (Owens *et al.*, 2008; Hartman, 2008).

Globalement, une fois la protéine cible définie, les étapes impliquées dans le processus de production des protéines thérapeutiques recombinantes sont voisines de celles suivies pour les anticorps thérapeutiques (Figure 7) (Tolner *et al.*, 2007). La première étape consiste en la recherche et l'optimisation d'un système cellulaire d'expression et de purification de la protéine : après clonage du gène codant pour la protéine sélectionnée, la plupart des protéines thérapeutiques actuellement sur le marché (érythropoïétine, G-CSF, tPA) sont produites avec un bon niveau d'expression dans des cellules de mammifère (comme les cellules CHO) qui secrètent et glycosylent la protéine d'une façon similaire à la protéine naturelle (Zavitz *et al.*, 2008). Des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *K. Lactis* peuvent aussi être utilisées avec succès mais le profil de glycosylation de la protéine sécrétée est souvent différent de la protéine de mammifère et une étape supplémentaire de modification post-translationnelle devra être ajoutée dans le processus final de production de la protéine. Les étapes suivantes consisteront à évaluer la pharmacologie *in vitro* (affinité pour la cible, spécificité, effets fonctionnels) puis *in vivo* (en particulier dans des modèles expérimentaux prédictifs de la pathologie visée) de la molécule pour prouver son efficacité. Après mise au point d'un test ELISA, des études de pharmacocinétique *in vivo* seront réalisées dans les diverses espèces pharmacologiques et des tests de sécurité seront pratiqués avant de proposer la protéine thérapeutique au développement.

4 Conclusion

Nous avons vu, tout au long de cette revue, que la recherche dans l'industrie pharmaceutique s'est profondément transformée au cours des dernières décennies et que le nombre de cibles biologiques disponibles pour élaborer de nouvelles thérapies s'est considérablement accru grâce au décryptage du génome humain, permettant d'attaquer la maladie en plusieurs points de la cascade physiopathologique. On peut espérer que cette transformation portera ses fruits et que de nouveaux médicaments innovants, basés sur des concepts originaux, émergeront de cette approche pour satisfaire les nombreux

besoins thérapeutiques actuels et, en particulier, des médicaments agissant non plus sur la symptomatologie mais sur l'étiologie des maladies. Dans cette quête, il sera nécessaire de diversifier les approches et de ne négliger aucune piste pouvant être une source d'innovation, comme l'approche phénotypique ou l'observation clinique.

Quelles évolutions futures peut-on envisager pour la recherche pharmaceutique ?

Une première évolution en marche est le développement de la recherche translationnelle que l'on peut définir globalement comme une aide à la traduction des résultats expérimentaux obtenus au laboratoire en applications cliniques, autrement dit, une aide au transfert à la clinique des connaissances pré-cliniques sur un candidat médicament (Butler, 2008). L'utilisation au laboratoire et en clinique des mêmes biomarqueurs d'activité du médicament (marqueurs biologiques, liaison de ligands radioactifs, électrophysiologie, imagerie, génomique, etc., cf. Section 3.1.5) devrait permettre d'améliorer la prédictibilité des modèles expérimentaux et, par là même, de réduire l'attrition intervenant durant la phase de développement clinique. À titre d'exemple, on utilise de plus en plus au laboratoire l'imagerie par IRM et la mesure du métabolisme par micro-TEP (tomographie par émission de positons) pour estimer, de façon longitudinale, l'efficacité antitumorale de composés dans des modèles de xénogreffe chez la souris. L'IRM cérébrale est également utilisée pour évaluer l'effet préventif ou curatif d'un produit sur le processus de démyélinisation ou de dégénérescence cérébrale intervenant respectivement dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques ou de maladie d'Alzheimer chez la souris (Borsook *et al.*, 2006).

Une autre évolution importante de la recherche pharmaceutique à prévoir est celle des thérapies dites personnalisées. Le développement des techniques de génomique, telles que génotypage, séquençage et expression de gènes permet d'envisager, dans le futur, un traitement adapté aux caractéristiques du patient. Le génotypage systématique du patient permettra d'identifier les gènes impliqués dans la réponse au médicament et de choisir le traitement le plus adapté pour le patient (Hayden, 2009). Un exemple récent est celui du trastuzumab (Herceptin®) pour le traitement du cancer du sein : seules les femmes ayant une surexpression du récepteur Her-2/neu (25–30 % de la population) répondent au traitement par cet anticancéreux (Adams & Weiner, 2005). Les biomarqueurs pharmacogénétiques pourront également être utilisés pour stratifier les populations de patients lors des essais cliniques de nouvelles molécules et améliorer l'homogénéité de la population étudiée, permettant ainsi de réaliser les études pivots avec

seulement la population-cible. Dans le domaine de la pharmacocinétique, il existe de nombreux variants du cytochrome 2 D6 impliqué dans le métabolisme de nombreux médicaments avec trois phénotypes dominants qui contribuent à des variations individuelles importantes dans le métabolisme du médicament et donc dans la réponse du patient au traitement. Le génotypage des patients permettra d'adapter la posologie en fonction du patient et d'éviter les interactions médicamenteuses (Pangalos *et al.*, 2007).

Une dernière évolution que l'on commence à envisager est celle de la thérapie réparatrice, c'est-à-dire l'utilisation de molécules pouvant stimuler les processus de réparation endogène de différents tissus affectés par les processus pathologiques, par exemple, en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules souches adultes en cellules matures (Zhou *et al.*, 2008). Les besoins sont immenses dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'insuffisance cardiaque, la maladie d'Alzheimer, l'infarctus cérébral et cardiaque, pour ne citer que quelques exemples.

Enfin, pour stimuler la recherche de thérapeutiques innovantes, il est indispensable que recherches publique et privée collaborent étroitement à tous les niveaux (cibles biologiques, modèles expérimentaux, génétiques, biomarqueurs, etc.). De plus, des alliances de recherche entre Sociétés pharmaceutiques elles-mêmes, ou entre Sociétés pharmaceutiques et Biotechnologiques, doivent se nouer pour exploiter la richesse des approches de recherche envisageables pour générer les médicaments de demain et accélérer le passage des découvertes théoriques aux applications thérapeutiques.

Références

- Adams G.P., Weiner L.M., Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 2005, 23, 1141-1157.
- Anders H.J., Vielhauer V., Identifying and validating novel targets with *in vivo* disease models: Guidelines for study design. *Drug Discov Today*, 2007, 12, 446-451.
- Andrews A.L., Holloway J.W., Holgate S.T., Davies D.E., IL-4 receptor α is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets. *J Immunol*, 2006, 176, 7456-7461.
- Annis D.A., Nickbarg E., Yang X., Ziebell M.R., Whitehurst C.E., Affinity selection-mass spectrometry screening techniques for small molecule drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11, 518-526.
- Austen M., Dohrmann C., Phenotype-first screening for the identification of novel drug targets. *Drug Discov Today*, 2005, 10, 275-282.
- Borsook D., Becerra L., Hargreaves R., A role for fMRI in optimizing CNS drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 1-14.

- Boussery K., Belpaire F.M., Van de Voorde J., Physiological aspects determining the Pharmacokinetic properties of drugs. In « The practice of Medicinal Chemistry », Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 637-654.
- Brown D., Unfinished business: target-based drug discovery. *Drug Discov Today*, 2007, 12, 1007-101.
- Butcher E.C., Can cell systems biology rescue drug discovery? *Nat Rev*, 2005, 4, 461-467.
- Butler D., Crossing the valley of death. *Nature*, 2008, 453, 840-842.
- Carter P., Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6, 343-357.
- Drews J., Ryser S., The role of innovation in drug development. *Nat Biotechnol*, 1997, 15, 1318-1319.
- Frantz S., Playing dirty. *Nature*, 2005, 437, 942-943.
- Gorter J.A., van Vliet E.A., Aronica E., Breit T., Rauwerda H., Lopes da Silva F., Wadman W.J., Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 2006, 26, 11083-11110.
- Halioua E., Evolution of biopharmaceutical and CMO market. IBC Biopharma contract manufacturing and partnering symposium, 2005.
- Hardy J., Selkoe D.J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, 297, 353-356.
- Hartman I., Insulin analogs: impact on treatment success, satisfaction, quality of life, and adherence. *Clin Med Res*, 2008, 6, 54-67.
- Hayden E.C., Personalized cancer therapy gets closer. *Nature*, 2009, 458, 131-132.
- He X.P., Minichiello L., Klein R., McNamara J.O., Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trkB receptors in the mossy fiber pathway of adult mouse hippocampus. *J Neurosci*, 2002, 22, 7502-7508.
- He X.P., Kotloski R., Nef S., Luikart B., Parada L.F., McNamara J.O., Conditional deletion of trkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron*, 2004, 43, 31-42.
- Hillish A., Pineda L.F., Hilgenfeld R., Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discov Today*, 2004, 9, 659-669.
- Hoogenboom H.R., Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnol*, 2005, 23, 1105-1116.
- Hopkins A., Groom C., The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1, 727-730.
- Imming P., Sinning C., Meyer A., Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Rev*, 2006, 5, 821-834.
- Kola I., Landis J., Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3, 711-715.
- Kubinyi H., Drug research: myths, hype and reality. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2, 665-668.
- Kumar K., Wetzel, S., Waldmann H., Biology oriented synthesis and diversity oriented synthesis in compound collection development. In « The practice of Medicinal Chemistry », Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 187-209.
- Landry Y., Gies, J.P., Drugs and their molecular targets : an updated overview. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008, 22, 1-18.
- Langer T., Bryant S.D., *In silico* screening: hit finding from database mining. In « The practice of Medicinal Chemistry », Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 210-227.
- Levoye A., Jockers R., Alternative drug discovery approaches for orphan GPCRs. *Drug Discov Today*, 2008, 12, 52-58.
- Lonberg N., Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol*, 2005, 23, 1117-1125.
- Macarron R., Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discov Today*, 2006, 11, 277-279.
- Morrisette D.A., Parachikova A., Green K.N., La Ferla, F.M., Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 2009, 284, 6033-6037.
- Newman D.J., Craag G.M., Kingston D., Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In « The practice of Medicinal Chemistry », Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 159-186.
- Nowicki J.P., Scatton B., Measurement and expression of drug effects. In « The practice of Medicinal Chemistry », Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 73-84.
- Owens J., 2006 drug approvals: finding the niche. *Nat Rev*, 2007, 6, 99-101.
- Owens, D.R., Bolli F.I., Bolli G.B., Beyond the era of NPH insulin-long-acting insulin analogs: chemistry, comparative pharmacology, and clinical application. *Diabetes Technol Ther*, 2008, 10, 333-349.
- Pangalos M.N., Schechter L.E., Hurko O., Drug development for CNS disorders: Strategies for balancing risk and reducing attrition. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6, 521-532.
- Proudfoot J.R., High-throughput screening and drug discovery. In «The practice of Medicinal Chemistry», Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 144-158.
- Reichert J.M., Rosensweig C.J., Faden L.B., Dewitz M.C., Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol*, 2005, 23, 1073-1078.
- Rondeau J.M., Schreuder H., Protein crystallography and drug discovery. In « The practice of Medicinal Chemistry », Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 605-634.
- Sams-Dodd F., Target-based drug discovery: is something wrong? *Drug Discov Today*, 2005, 10, 139-147.
- Sato M., Hutchinson D., Evans B., Summers R., The β_3 -adrenoceptor agonist 4-[[[(hexylamino) carbonyl]amino]-N-[4-[2-[[[(2S)-2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenoxy)propyl]amino]ethyl]-phenyl]-benzenesulfonamide(L755507) and antagonist (S)-N-[4-[2-[[3-[3-(acetamidomethyl)phenoxy]-2-hydroxypropyl]amino]-ethyl]phenyl]benzenesulfonamide (L748337) activate different signaling pathways in chinese hamster ovary-K1 cells stably expressing the human β_3 -adrenoceptor. *Mol Pharmacol*, 2008, 74, 1417-1428.

- Scheffer I.E., Berkovic S.F., The genetics of human epilepsy. *TIPS*, 2003, 24, 428-433.
- Schrama D., Reisfeld R.A., Becker J.C., Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5, 147-159.
- Serradeil-Le Gal, C., Wagnon J., Tonnerre B., Roux R., Garcia G., Griebel G., Aulombard A., An overview of SSR149415, a selective nonpeptide vasopressin V1b receptor antagonist for the treatment of stress-related disorders. *CNS Drug Rev*, 2005, 11, 53-68.
- Stasi R., Gemtuzumab ozogamicin: an anti-CD33 immunoconjugate for the treatment of acute myeloid leukaemia. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8, 527-540.
- Steidl E.M., Neveu E., Bertrand D., Buisson B., The adult rat hippocampal slice revisited with multi-electrode arrays. *Brain Res*, 2006, 1096, 70-84.
- Terstappen G.C., Schlüpen C., Raggiaschi R., Gaviraghi G., Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat Rev*, 2007, 6, 891-903.
- Thakker D., Weatherspoon M., Harrison J., Keene T., Lane D., Kaemerrer W., Stewart G., Schafer L., Intracerebroventricular amyloid- β antibodies reduce cerebral amyloidangiopathy and associated microhemorrhages in aged Tg2576 mice. *PNAS*, 2009, 106, 4501-4506.
- Tolner B., Smith L., Hillyer T., Bathia J., Beckett P., Robson L., Sharma S.K., Griffin N., Vervecken W., Contreras R., Pedley R.B., Begent R.H.J., Chester K.A., From laboratory to phase I/II cancer trials with recombinant biotherapeutics. *Europ J Cancer*, 2007, 43, 2515-2522.
- Tsai S.J., TrkB partial agonists: Potential treatment strategy for epilepsy, mania and autism. *Medical Hypotheses*, 2006, 66, 173-175.
- Venkateshan S.P., Sidhu S., Malhotra S., Pandhi P., Efficacy of biologicals in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacology*, 2009, 83, 1-9.
- Wellendorph P., Goodman M., Burstein E.S., Nash N.R., Brann M.R., Weiner D.M., Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H₃ receptor. *Neuropharmacology*, 2002, 42, 929-940.
- Wermuth C.G., Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In "The Practice of Medicinal chemistry", Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 125-143.
- Wickenden A.D., Potassium channels as anti-epileptic drug targets. *Neuropharmacology*, 2002, 43, 1055-1060.
- Wu A.M., Senter P.D., Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol*, 2005, 23, 1137-1146.
- Zavitz K.H., Bartel P.L., Hobden A.N., Drug targets, target identification, validation and screening. In « The Practice of Medicinal chemistry », Wermuth C. (Ed.). Academic Press, 2008, pp. 106-122.
- Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A., *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β cells. *Nature*, 2008, 455, 627-632.