

N° 490 - DÉCEMBRE 2023

l'actualité chimique

LE JOURNAL DE LA SOCIÉTÉ CHIMIQUE DE FRANCE

**BIOMARQUEURS ET
MÉDECINE DU FUTUR**

**À PROPOS
DE VERRES**

**TRANSFORMATIONS
CULINAIRES**

"Made in Europe for the World" Oui, avec vos contributions !

Analytical and Bioanalytical Chemistry



L'Actualité Chimique



Société Chimique de France

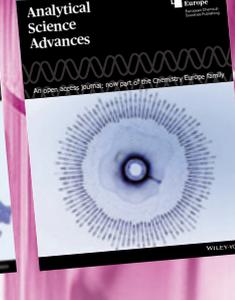
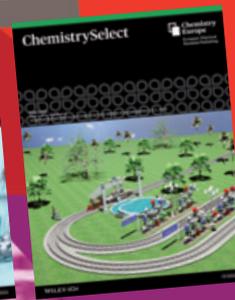
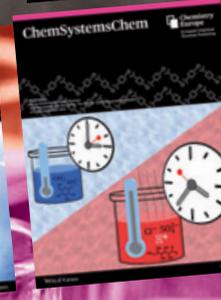
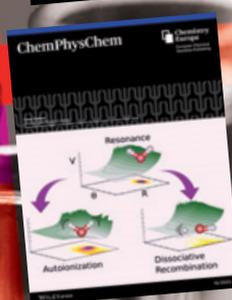
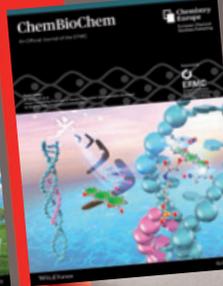
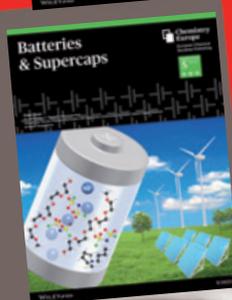
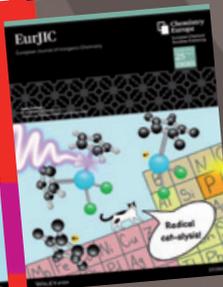
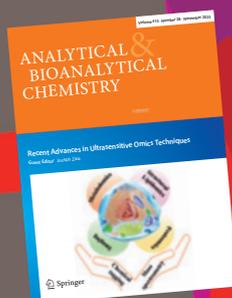
Les journaux de Chemistry Europe*

*Chemistry Europe regroupe 16 sociétés de chimie européennes, dont la SCF

- Chemistry - A European Journal
- European Journal of Inorganic Chemistry (EurJIC)
- European Journal of Organic Chemistry (EurJOC)
- Analysis & Sensing
- Analytical Sciences Advances (ANSA)
- Batteries & Supercaps
- Chemistry Europe
- ChemBioChem
- ChemCatChem
- ChemElectroChem
- ChemMedChem
- ChemPhotoChem
- ChemPhysChem
- ChemPlusChem
- Electrochemical Science Advances (ELSA)
- ChemSusChem
- ChemSystemsChem
- Chemistry - Methods
- ChemistryOpen
- ChemistrySelect
- ChemViews



WILEY-VCH



**Pour montrer la vitalité de la chimie française,
toutes ces revues attendent vos communications.**

l'actualité chimique

Édité par la Société Chimique de France

250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris

Tél. 01 40 46 71 60 – scf@societechimiquedefrance.fr

www.societechimiquedefrance.fr

Directeur de la publication : Stanislas Pommeret

Partenariats : CNRS, Fondation de la Maison de la Chimie

RÉDACTION

SCF, 28 rue Saint-Dominique, 75007 Paris

Tél. : 01 40 46 71 64 – redaction@lactualitechimique.org

www.lactualitechimique.org

Rédactrice en chef : Patricia Pineau

Rédactrice en chef adjointe : Roselyne Messal

COMITÉ DE RÉDACTION

J. Barrault, X. Bataille, C. Bresson, K. Cariou, P. Colombari,
K. Fajerberg, D. Fauque, J.-P. Foulon, J. Fournier, J.-F. Gérard,
E. Gras, N. Griffete, C. Houée-Levin, J. Lalande, F. Launay, J. Livage,
E. Marceau, V. Marvaud, P. Moisy, C. Monneret, X. Montagne,
N. Moreau, J.-M. Paris, P. Pichat, A.-V. Ruzette, S. Tencé, H. This,
H. Toulhoat, P. Walter, S. Younes

Publication analysée ou indexée par :

Chemical Abstracts, base de données PASCAL

ABONNEMENT

SCF, Martine Maman

250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris

Tél. : 01 40 46 71 60/66

abonnement@lactualitechimique.org

FABRICATION

MAQUETTE : Redouane Sahih, sahih.redouane@gmail.com

Mag Design, www.magdesign.fr, mag.design@me.com

IMPRESSION, ROUTAGE : N. Fortin & ses fils imprimeurs

94800 Villejuif, fortimprimerie@wanadoo.fr

PUBLICITÉ

FFE, 15 rue des Sablons, 75116 Paris

Tél. : 01 53 36 20 40 – www.ffe.fr

aurelie.vuillemain@ffe.fr

ISSN version papier 0151 9093

ISSN version électronique 2105 2409

© SCF 2023 – Tous droits de reproduction réservés

Dépôt légal : décembre 2023

Toute représentation ou reproduction, intégrale ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur, ou des ayants droits, ou ayant cause, est illicite (loi du 11 mars 1957, alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal. La loi du 11 mars 1957 n'autorise, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, que les copies et les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective d'une part, et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans le but d'exemple ou d'illustration.



La chimie sauve des vies

Dans un monde très perturbé par le climat, les conflits, les virus, conduisant à des conditions de vie difficiles, les chimistes, biologistes, médecins, physiciens... se mobilisent pour apporter des solutions.

Les biomarqueurs

Thème central de ce numéro et grâce à un véritable travail d'équipe remarquablement orchestré, vous allez découvrir ce que sont les biomarqueurs, à quoi servent-ils, quels objectifs et succès ont déjà été obtenus, enfin quels chemins reste-t-il à faire ? Avec modestie et confiance, connectés mondialement, tous ceux qui travaillent dans ce domaine peuvent être fiers des succès obtenus car ils sauvent déjà des vies et en sauveront d'autres.

Ce qui est fascinant, ce sont les échelles de grandeur des cibles et des instruments : du virus à l'accélérateur de particules.

Étymologie et verres

De façon inattendue, notre auteur habituel, Pierre Avenas, est revenu sur les verres, sujet très mis en avant pendant l'Année du verre. Son travail est remarquable car vous allez découvrir

le verre naturel, les noms du verre dans différentes langues (grec, latin, germaniques, celtiques, slaves), et enfin des termes qui nous sont familiers : vitro-céramique, *in vitro*, appareillage en verre, objets précieux... C'est à l'infini : un feedback à découvrir.

L'extrusion réactive

La mécano-chimie de synthèse, impliquant une réduction drastique de l'usage de solvants toxiques et dangereux, s'inscrit de façon adéquate dans une démarche de développement durable. L'extrusion réactive permet d'avoir accès à un système de synthèse en continu et ouvre la voie pour une utilisation de cette technologie dans l'industrie pharmaceutique.

Comprendre les transformations culinaires

Les fêtes de fin d'année se prêtent à la bonne cuisine, avec en arrière-plan une belle chimie et des bons instants.

Bonnes fêtes de fin d'année !

Patricia Pineau
Rédactrice en chef



| | |
|--|-------------|
| ÉDITORIAL | 1 |
| La chimie sauve des vies, par P. Pineau | 1 |
| CLIN D'ŒIL ÉTYMOLOGIQUE | 4 |
| À propos de verres, par P. Avenas | 4 |
| À PROPOS DE | 5 |
| La chimie est essentielle pour la compréhension des transformations culinaires, par H. This | 5 |
| DES BIOMARQUEURS POUR LA MÉDECINE DU FUTUR | 6-74 |
| <i>Coordinateurs : Christophe Bossuet, Carole Bresson, Christophe Junot et Pascal Mailley</i> | |
| Le programme « Focus Biomarqueurs » du CEA : recherche et développement pour une médecine du futur personnalisée, par C. Junot, C. Bresson, P. Mailley et C. Bossuet | 6 |
| Alzheimer, Parkinson : des stratégies innovantes pour la découverte de nouveaux ligands, par G. Ossard, R. Melki et E. Romero-Laboureur | 8 |
| Observer des étoiles dans le cerveau, par C. Jager, C. Jan, O. Barret et N. Van Camp | 13 |
| Marquages au CO ₂ radioactif pour l'imagerie médicale, par A. Hauwelle, D. Audisio et F. Caillé | 18 |
| L'immunoTEP, l'imagerie médicale du futur ?, par A. Dominic, B. Kuhnast et F. Taran | 23 |
| Les peptides de venins pour l'imagerie du cancer pulmonaire, par R. Baudat, E. Benoit, M. Keck, P. Kessler, C. Truillet et D. Servent | 30 |
| La PCR isotherme multiplexée en microfluidique pour la détection d'agents pathogènes, par C. Treille, K. Perez-Toralla, H. Volland, S. Simon et H. Boutal | 37 |
| Spectrométrie de masse et intelligence artificielle pour cartographier le vivant, par H. Hachemi, L. Grenga et J. Armengaud | 43 |
| La transcriptomique en cellule unique pour étudier des maladies neurodégénératives, par E. Bonnet | 49 |

| | |
|---|----|
| Utiliser le xénon pour l'étude de la barrière hémato-encéphalique ?, par F. Nghiem, C. Boutin, A. Mabondzo et P. Berthault | 54 |
| PROK1, une nouvelle cible théranostique de la prématurité spontanée ?, par M. Desseux, M. Benharouga, G. Sébire, N. Lemaître, M. Dignonnet, T. Barjat et N. Alfaïdy | 62 |
| L'intégration cérébrale des réflexes auditifs : un biomarqueur de l'hypnose ?, par H. Sid-Ahmed, J. Alayrangues, L. Langar, N. Richard, V. Albaladejo, M. Coquand-Gandit, S. Pezzani, V. Brun, D. Anglade et V. Auboïroux | 70 |

RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT 75

Principes et substances actifs

| | |
|---|----|
| Nouveaux principes actifs pharmaceutiques et actualités des substances actives phytopharmaceutiques, par J. Fournier et J.-M. Paris | 75 |
|---|----|

EN BREF 77

AGENDA 80

ACTUALITÉS DE LA SCF 81

UN POINT SUR 83

| | |
|---|----|
| Fiche n° 110 : Mécanosynthèse de médicaments par extrusion réactive, par F. Lamaty et X. Bantreil | 83 |
|---|----|

INDEX 2023 site*

* L'index est disponible uniquement en format pdf, téléchargeable librement sur le site de la revue (lien dans le sommaire en ligne de ce numéro).



Couverture :

Modélisation 3D d'anticorps « attaquant » un virus. © Adobe Stock.
Conception graphique : magdesign.fr

À propos de verres

Un solide peut avoir une structure cristalline, ou être au contraire dans un état amorphe, dit *vitreux*, celui d'une *verre*. Il y a des verres minéraux et des verres organiques polymériques, comme le verre acrylique connu sous le nom de *plexiglas*. Le nom du verre varie beaucoup d'une langue européenne à l'autre, et l'on verra que son étymologie est particulièrement surprenante dans les langues germaniques et slaves.

Le verre naturel

Comme souvent, la nature a eu l'idée avant les humains : l'obsidienne est un verre minéral naturel à forte concentration de silice, issu du refroidissement rapide d'une lave volcanique. Le nom *obsidienne*, attesté en 1765, précédemment *obsidiane*, vient du latin *obsidianus*, forme tardive de *obsianus*, employé à propos de la pierre d'Obsius (*Obsianus lapis*) par Pline l'Ancien.



Obsidienne
(Wikimedia Commons)

Selon lui en effet, « *Obsius* [un général romain] découvrit en Éthiopie » cette roche, le plus souvent de couleur noire. À ce propos, Pline écrit qu'elle « *donne une vision plus mate que le verre, et, dans les miroirs accrochés aux cloisons, ne rend en guise d'images que des ombres* ».

Le nom du verre en grec et en latin

En grec ancien, *hualos*, d'origine obscure, a désigné d'abord toute pierre naturelle transparente telle que le quartz, ou translucide telle que l'albâtre ou l'ambre jaune. Ensuite, *hualos* (néogrec *guali*) s'est appliqué aussi au verre manufacturé. On retrouve le nom grec du verre dans celui de l'acide *hyaluronique*, découvert dans l'humeur *hyaloïde*, plus connue sous le nom d'*humeur vitrée* de l'œil (cf. *L'Act. Chim.* de juil.-août 2022). En latin, le nom du verre était *vitrum*, sans étymologie connue, et ce qui surprend c'est que ce nom pouvait désigner aussi la plante nommée en grec puis en latin, *isatis*, et ensuite en français *pastel des teinturiers*, ou *guède* (*Isatis tinctoria* depuis Linné en 1753). La raison de cela est que la verrerie antique, grecque puis romaine, était colorée par les oxydes, principalement de fer, contenus dans le sable et donnant une coloration bleu vert proche de celle donnée par le pastel.



Verrerie gallo-romaine du II^e siècle (musée Saint-Rémi, Reims).

Les doublets *verre* et *vitre* (d'où *vitrail*, *vitrine*, *vitrier*...) viennent du latin *vitrum*, comme l'italien *vetro*, « verre, la matière », ou « vitre » (mais *bicchiere*, « verre à boire ») et l'espagnol *vidrio*, « verre, la matière » (mais *crystal*, « vitre », et *copa*, « verre à boire »). De *vitrum* également vient, par le bas latin *vitriolum*, l'ancien nom de l'acide sulfurique, *vitriol*, dû à l'aspect vitreux de ses sels.

Le nom du verre dans les langues germaniques et celtiques

À cause de cette coloration habituelle des verres antiques, des noms germaniques ou celtiques du verre, la matière,

remontent à la même racine indo-européenne **ghel-* que des appellations des couleurs jaune-vert-bleu dans ces mêmes langues. Ainsi le breton *glaz* ou *glas*, « bleu, vert, gris », et l'irlandais *glas*, « vert », sont en rapport avec des noms du verre comme l'anglais *glass*, l'allemand *Glas*, le danois et suédois *glas*, ou l'irlandais *glaine*, ainsi que le nom du jaune comme l'allemand *gelb* (relié lui-même à l'allemand *Gold*, « or »), ou celui du vert comme l'anglais *green*, l'allemand *grün* (avec le glissement classique entre /l/ et /r/).

Cependant, le breton *gwer*, « verre », provient du latin *vitrum*, désignant, comme on l'a vu, à la fois le verre et la couleur bleu vert du pastel. Ce qui est curieux (est-ce fortuit ?), c'est que le nom de la couleur verte en breton est aussi *gwer*, également du latin, cette fois de *viridis*, « vert ».

| français | italien | espagnol | breton |
|-----------------------|----------|----------|---------------------|
| verre (la matière) | vetro | vidrio | gwer |
| anglais | allemand | polonais | russe |
| glass | Glas | szkło | stecklo (стекло) |

Le tableau rassemble les noms du verre qui précèdent, ainsi que son nom dans des langues slaves, dont l'origine est étonnante.

Le nom du verre dans les langues slaves



Corne à boire et rhyton romain en verre du I^{er} siècle. (Creative Commons - Metropolitan Museum of Art).

Parmi les premiers récipients utilisés pour boire dans l'Antiquité, on trouve la corne à boire, fabriquée à partir de cornes d'animaux, en particulier de bovins.

Ce récipient naturel, utilisé alors comme un verre aujourd'hui, a été remplacé par des objets artificiels de même

forme pointue, et finalement munis d'un orifice à la pointe pour boire comme au goulot au lieu de boire comme dans un verre. Un tel objet antique, nommé *rhyton* (du grec *rhyton*, du verbe *rhein*, « s'écouler »), était fabriqué en céramique ou en verre. Cela explique que le nom russe du verre, la matière, *stecklo*, et les noms équivalents dans les autres langues slaves se relient au gotique *stikls*, « coupe à boire », et au vieux norrois *stikill*, « pointe d'une corne à boire », de la racine germanique **stik-*, « pointe ».

Épilogue

De *vitrum* dérivent les termes *vitriifier*, *vitrocéramique*, ou plus récemment *vitrimère*, ainsi que l'expression *in vitro* pour les expériences de biologie réalisées en laboratoire, typiquement dans de l'appareillage en verre.

Pierre AVENAS,
ex directeur de la R & D dans l'industrie chimique.
pier.avenas@orange.fr

La chimie est essentielle pour la compréhension des transformations culinaires

En matière de gastronomie moléculaire et physique, il y a lieu de bien cadrer les travaux. Faut-il répéter que la gastronomie moléculaire et physique est la discipline scientifique qui explore les mécanismes des transformations culinaires [1] ? Sans doute pas. En revanche, on peut s'interroger sur la stratégie à mettre en œuvre pour faire des « découvertes », dans ce champ, et, à ce propos, le goût – assez généralement partagé – pour la simplicité [2-3] a failli me faire faire une erreur : j'avais cru comprendre que l'on pouvait distinguer les transformations culinaires selon qu'elles s'accompagnaient ou non de modifications moléculaires, distinguant des « transformations physiques », des « transformations chimiques », des transformations (micro)biologiques, mais je viens de comprendre que non ; toutes s'accompagnent de modifications moléculaires, de sorte que la chimie a la première place.

Par exemple, quand on cuit une viande, il est clair qu'il y a des modifications des protéines dans la masse, avec les coagulations des actines, myosines, les dégradations des molécules de collagène, par exemple [4-5], et, selon les cas, il y a aussi des brunissements en surface, avec principalement des pyrolyses des protéines (les réactions aminocarbonyles, fautiveusement nommées « de Maillard », sont sans doute moins importantes qu'on ne l'a prétendu sans quantification) [6] ; en tout cas, pour les deux parties, il y a des transformations moléculaires que la chimie peut explorer.

Inversement, on pourrait penser que la découpe d'une carotte ou la production d'un blanc en neige ne met pas en œuvre de transformations moléculaires... mais cette idée est fautive, et, à ce jour, je ne connais pas de transformations culinaires pour lesquelles il n'y ait pas de transformations moléculaires.

Par exemple, quand on fait une salade de carottes et que l'on commence par peler les carottes, puis quand on divise la racine en filaments (« julienne »), la lame du couteau détruit au moins une couche de cellules sur son passage, libérant leur contenu, ce qui correspond à l'humidité qu'on voit apparaître [7]. Cela étant, la dégradation des cellules sur le passage de la lame de l'économiste ou du couteau libère des composés phénoliques et des enzymes phénoloxydases : les enzymes réagissent avec les composés phénoliques pour faire brunir les tissus végétaux coupés [8]. Il y a donc une action physique, une modification microscopique, et des transformations moléculaires.

Bien sûr, cela ne concerne qu'une couche de cellules, mais au fond, dans un rôtissage rapide où l'on ne ferait brunir que la surface, il n'y aurait également que la surface qui serait concernée. Pourrait-on distinguer les transformations culinaires selon les ordres de grandeur de quantité ou de proportion de matériau modifié ? Par exemple, distinguer une coagulation d'un blanc d'œuf, où toute la masse du matériau est transformée par la coagulation des protéines, et une modification de surface ? On peut toujours, mais à quoi cela conduit-il ?

Continuons d'explorer la question, sur des cas pratiques, notamment en considérant le battage d'un blanc d'œuf en neige. Cette fois, on part d'eau et de protéines, souvent globulaires (à savoir que les molécules de protéines sont repliées comme des pelotes), et l'on fouette pour introduire des bulles d'air. L'air n'est pas modifié, mais les protéines le sont : le cisaillement exercé par le fouet dénature les protéines, et c'est parce qu'elles sont ainsi modifiées qu'elles peuvent se placer à la surface des bulles d'air, à l'interface entre l'air et l'eau ; on doit considérer que les ponts disulfures intramoléculaires

(par exemple, pour les ovalbumines) sont dissociés, par exemple. Dans un tel cas, on calcule facilement la quantité de protéines qui sont nécessaires pour obtenir un blanc battu en neige : en considérant un volume de mousse d'un tiers de litre, une taille de bulles de 0,1 mm et deux couches de protéines à la surface de chaque bulle, on détermine une proportion de protéines modifiées de 1/10 000. C'est peu, mais quoi qu'il en soit, alors que l'on pouvait croire que l'on aurait été dans le cas d'une transformation culinaire sans modification moléculaire, on s'aperçoit que l'on s'est trompé.

La préparation d'une laitue pour une salade ? Cette fois, si l'on considère des feuilles de 10 cm², des tailles cellulaires de un micromètre et une division en deux de chaque feuille, avec une couche endommagée d'une dizaine de cellules, on calcule que la proportion de tissu végétal modifié est 1/10 000 000... mais l'effet est visible ! Et, quand on fait vraiment la salade, en la « fatiguant » avec la vinaigrette, l'effet est considérable, puisque l'huile adhère aux cires de surface, les désorganisant, et permettant l'interaction du tissu végétal avec le vinaigre, mais, aussi, avec une action mécanique dont on voit bien l'effet.

Finalement, s'il y a une transformation culinaire, c'est bien qu'il y a un effet, n'est-ce pas ? Et je crois que c'est un bon conseil, face à une transformation culinaire, de toujours considérer le phénomène d'abord du point de vue macroscopique, puis du point de vue microscopique, puis du point de vue moléculaire. Toutes ces modifications sont toujours présentes.

Ajoutons que l'importance en « quantité » (ou proportion, dans les deux cas précédents) n'est pas prépondérante : une viande grillée seulement en surface prend ce goût qui la fait apprécier, alors même que la « quantité » de transformation est faible. Et l'on ne doit pas oublier [9] qu'il y a différentes « dimensions » pour les aliments : la composition chimique, certes, mais surtout la saveur, la couleur, l'odeur, la consistance, etc. Par exemple, au premier ordre de la composition chimique, le vin n'est que de l'eau, mais la saveur brûlante de l'éthanol, présent moléculairement au deuxième ordre seulement, est prépondérante, alors que la saveur de l'eau, présente au premier ordre, est très loin dans l'ordre des saveurs.

Bref, vive la chimie !

[1] H. This vo Kientza, R. Burke, A. Kelly, C. Lavelle, Introduction, in *Handbook of Molecular Gastronomy*, R. Burke, A. Kelly, C. Lavelle, H. This (eds), CRC Press, 2021.

[2] A. Kendall, *Michael Faraday, man of simplicity*, Hassell Street Press (R.-U.), 1889.

[3] A. Einstein, *The quotable Einstein*, Princeton University Press (E.-U.), 1996.

[4] M.L. Marin, C. Casas, M.I. Cambero, B. Sanz, Study of the effect of heat (treatments) on meat protein denaturation as determined by ELISA, *Food Chem.*, 1992, 43, p. 147-150.

[5] M.E. Latorre, D.E. Velazquez, Effects of thermal treatment on collagen present in bovine *M. Semitendinosus* intramuscular connective tissue. Analysis of the chemical, thermal and mechanical properties, *Food Struct.*, 2021, 27, 100165.

[6] H. This vo Kientza, Why we should speak of glycation reactions, or of amino-carbonyl reactions, instead of Maillard reactions, *IMARS Highlights*, 2023, 18(3), www.imaronline.com.

[7] J. Dobranszki, Application of naturally occurring mechanical forces in *in vitro* plant tissue culture and biotechnology, *Plant Signal. Behav.*, 2021, 16(6), e1902656.

[8] J.-J. Macheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand, *Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*, Presses polytechniques et universitaires romandes, Collection Biologie, 2005.

[9] H. This, *Mon histoire de cuisine*, Belin, 2014.

Hervé THIS,

Directeur du Centre international de gastronomie moléculaire et physique, INRAE-AgroParisTech, Palaiseau.

* herve.this@agroparistech.fr

Le programme « Focus Biomarqueurs » du CEA

Recherche et développement pour une médecine du futur personnalisée

Les avancées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire, de la chimie (organique et analytique, notamment), de l'imagerie médicale, de la science des données et du numérique, sont amenées à transformer en profondeur les systèmes de soin et la prise en charge des patients. En effet, la perspective de pouvoir générer et intégrer massivement des données de différentes natures jette les bases d'une médecine qui se veut prédictive, préventive, personnalisée, participative, fondée sur les preuves et intégrée au parcours de vie (« médecine 6P »). Les biomarqueurs constituent un des éléments clés de cette approche, en apportant une meilleure connaissance des bases moléculaires et physiologiques des pathologies et une prise en charge individualisée des patients selon la gravité de leur maladie et/ou de la réponse aux traitements.

Les biomarqueurs peuvent être définis comme des paramètres (physiques, chimiques ou biologiques) qui témoignent de processus biologiques. Sur le plan médical, ce sont des indicateurs de diagnostic et de pronostic de pathologies, mais également d'évaluation de la réponse à un traitement. Enjeu majeur d'une médecine dite personnalisée, la découverte de nouveaux biomarqueurs doit conduire au développement de dispositifs médicaux innovants, tant au niveau *in vitro* à partir de prélèvements biologiques, qu'*in vivo* avec par exemple des méthodes d'imagerie médicale ou encore des dispositifs de monitoring portés sur/dans la personne.

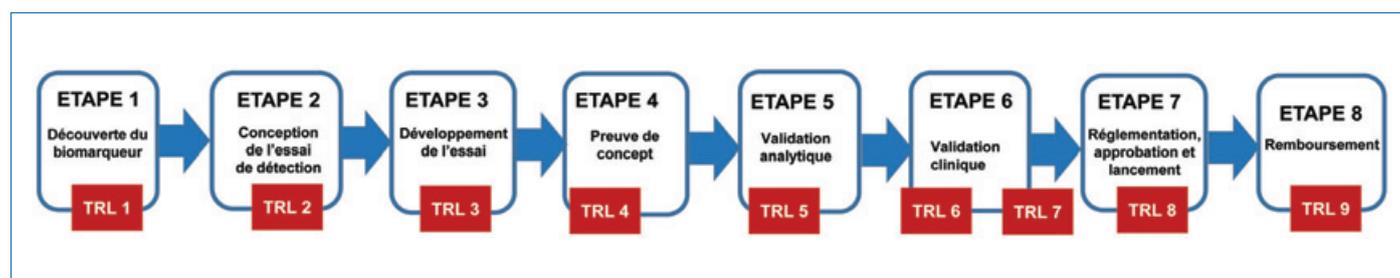
La recherche et le développement de biomarqueurs sont des processus longs et coûteux (voir figure). Ces processus reposent sur un large éventail de compétences et d'acteurs académiques et industriels : biologistes, experts des modèles de recherche préclinique *in vitro* (modèles cellulaires), et *in vivo* (modèles animaux), spécialistes en analyses biologiques à grande échelle (« omiques »*), en imagerie médicale, chimistes organiciens et analystes, technologues susceptibles de concevoir des dispositifs de mesure, de détection et de diagnostic *in vitro*, équipes de recherche clinique et industriels du diagnostic en capacité de valider des dispositifs ou des outils, de les produire, de prendre en charge les aspects réglementaires et de les commercialiser.

Malgré les efforts de recherche menés ces trente dernières années et les avancées technologiques réalisées, peu de biomarqueurs ont été identifiés et validés, et de nombreux besoins médicaux demeurent insatisfaits. Parmi les principaux freins figurent les coûts significatifs de développements, les difficultés d'acceptation de nouveaux biomarqueurs dans la prise en charge des patients, les difficultés de remboursement, mais aussi le cloisonnement des acteurs de la filière et la difficulté d'interfacer et de coordonner différentes disciplines (informatique, biologie, technologies), différents partenaires (nationaux, européens, académiques, PME) et différents écosystèmes (recherche, soins, industrie). Enfin, de nombreux verrous restent encore à lever dans le domaine de la recherche sur les biomarqueurs, tant aux niveaux de leur découverte et de leur validation que de la mise en place des tests.

Impliqué depuis sa création dans la recherche en biologie et en santé, le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) est reconnu pour ses plateformes technologiques, ses capacités de pilotage de projets multidisciplinaires et de réalisation de transferts technologiques auprès d'acteurs industriels ou sociétaux. Ces travaux sont réalisés dans le cadre de collaborations avec des équipes provenant d'autres organismes de recherche, avec des équipes cliniques et avec des industriels du diagnostic ou de la pharmacie.

Des équipes du CEA, essentiellement positionnées au sein des directions de la recherche fondamentale et de la recherche technologique, sont activement impliquées dans la recherche sur les biomarqueurs, notamment dans les domaines précliniques (modèles cellulaires et animaux) et cliniques, avec les plateformes de production de données « omiques », mais également via la conception de méthodes et outils de diagnostic (imagerie et dispositifs de diagnostic *in vitro*).

Dans ce contexte, le programme Focus Biomarqueurs, lancé en 2021, a pour objectif de renforcer les actions du CEA dans le domaine des technologies pour la médecine du futur en soutenant des projets pluridisciplinaires alliant recherches technologique, physique, chimique et biologique et menées en interaction ou collaboration étroite avec des équipes



Les principales étapes de recherche et développement d'un biomarqueur (d'après <https://biomarqueurs.aviesan.fr>).

médicales. Ce programme, financé par le CEA, soutient une vingtaine de thèses et trois projets de recherche d'une durée de deux ans.

Le programme Focus Biomarqueurs est structuré autour de trois axes thématiques : le développement d'approches et de technologies innovantes pour mesurer les biomarqueurs, la découverte et la validation biologique de biomarqueurs, et le développement de dispositifs et approches de diagnostic *in vitro* et *in vivo* et de monitoring de la personne reposant sur leur utilisation. Une attention particulière a été portée sur l'intégration le plus en amont possible d'une réflexion concernant les futures applications, conditions d'utilisation ou possibilités d'industrialisation des biomarqueurs ou des technologies qui seront conçues et/ou développées. Cette réflexion est matérialisée par la mise en place de collaborations avec des équipes de recherches précliniques et cliniques au sein mais aussi à l'extérieur du CEA.

Dans ce numéro spécial dédié au programme Focus Biomarqueurs sont regroupés onze articles qui illustrent la diversité des projets de recherche qui sont menés au sein du CEA. Une part significative des activités concerne le développement de nouveaux outils d'imagerie : nouvelles réactions chimiques pour la synthèse de traceurs d'imagerie par tomographie d'émission de positons (TEP), nouveaux outils de chimie bioorthogonale pour l'utilisation d'anticorps comme traceurs pour la TEP (« immunoTEP »), ingénierie de peptides de venins pour l'imagerie de cancers pulmonaires, découverte de nouveaux ligands pour l'imagerie cérébrale des agrégats cérébraux de protéines, évaluation pharmacologique de radioligands pour l'imagerie TEP de cellules cérébrales. Les analyses « omiques » pour la découverte de biomarqueurs sont abordées, avec l'utilisation d'approches transcriptomiques (analyse à large échelle des ARN messagers) sur cellule unique pour l'étude des maladies neurodégénératives, et le développement d'analyses métaprotéomiques permettant à la fois de cartographier les bactéries composant les microbiotes et

les interactions hôte-microbes. Est également décrite une approche amont évaluant l'utilisation du xénon en tant que sonde de résonance magnétique nucléaire pour étudier la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, qui isole le cerveau du reste de l'organisme. Les aspects liés à la découverte et à la validation biologique de biomarqueurs (deuxième axe du programme) sont illustrés par un article présentant la caractérisation d'un nouveau biomarqueur de menace d'accouchement prématuré. Enfin, le troisième axe sous-tendant le programme concerne le développement de dispositifs et approches de diagnostic *in vitro* et *in vivo* et de monitoring de la personne. Il est abordé au niveau de deux articles, l'un portant sur la détection rapide et de terrain d'agents infectieux, en combinant biologie moléculaire et microfluidique, et l'autre traitant de l'analyse mathématique de signaux de magnétoencéphalographie et d'électroencéphalographie pour l'identification de biomarqueurs de l'hypnose.

*Les approches omiques reposent sur la détection à large échelle des molécules impliquées dans les niveaux d'organisation biologique : acides nucléiques (ADN, ARN messagers), protéines et métabolites. Elles reposent sur des outils de production de données basées sur la biologie moléculaire et la chimie analytique, auxquels sont associées des approches de sciences des données qui permettent d'obtenir des signatures moléculaires caractéristiques d'états physiopathologiques.

Christophe JUNOT^{*1}, chef du département Médicaments et technologies pour la santé, **Carole BRESSON**², directrice de recherche, **Pascal MAILLEY**³, CEA senior fellow, et **Christophe BOSSUET**⁴, CEA senior fellow.

¹ Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et technologies pour la santé (MTS), Gif-sur-Yvette.

² Université Paris-Saclay, CEA, Service de physico-chimie, Gif-sur-Yvette.

³ Université Grenoble Alpes, CEA, Leti, MINATEC Campus, Grenoble.

⁴ CEA, DAM, Le Ripault, Monts.

* Christophe.Junot@cea.fr

45 **Sc** Culture **iencesChimie**
21

ENS

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE, DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Mis à disposition **CAPES et AGRÉGATION** aux épreuves orales

Site de ressources en **Chimie** pour les enseignants

Thèmes en lien avec les **PROGRAMMES D'ENSEIGNEMENT**
Contenu validé par des **CHERCHEURS**

Articles, Vidéos, Diaporamas
AGENDA, ACTUALITÉS
événements, conférences, parutions scientifiques...

<http://culturesciences.chimie.ens.fr>

Alzheimer, Parkinson : des stratégies innovantes pour la découverte de nouveaux ligands

Résumé L'agrégation des protéines α -synucléine (α -syn) et tau et la multiplication de ces agrégats fibrillaires dans le système nerveux central jouent un rôle central dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. La conception de ligands de ces agrégats à des fins diagnostique ou thérapeutique est difficile, car chaque protéine peut adopter plusieurs conformations à l'origine d'un polymorphisme des agrégats, et donc de leurs surfaces. Via des méthodes bioinformatiques, une cartographie (appelée « pocketome ») des crevasses accessibles à la surface des polymorphes dont la structure est déposée dans la Protein Data Bank a été établie. En parallèle, un algorithme de « scaffold hopping » intégrant des ligands de l' α -syn et de tau déjà connus pour augmenter la diversité structurale des ligands a été utilisé. Cette analyse ouvre la voie à la synthèse de nouveaux ligands potentiels par des méthodes à haut débit et à la validation de la fixation de ces ligands *in vitro* et *in vivo*.

Keywords Maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, diagnostic, thérapie, alpha-synucléine, tau, pocketome, scaffold hopping.

Abstract Alzheimer, Parkinson: innovative strategies for the discovery of new ligands

The aggregation of the proteins α -synuclein (α -syn) and tau into fibrillar assemblies and the multiplication of those aggregates in the central nervous system are associated to the Parkinson's and Alzheimer's neurodegenerative diseases. Designing ligands of fibrillar α -syn and tau with diagnostic and therapeutic potential is a challenge given the multitude of conformations these proteins adopt that result in numerous polymorphs exhibiting different surfaces. Using bioinformatics analyses, a cartography (named pocketome) of the lateral clefts available for ligands binding at the surface of each polymorph using the distinct fibrillar structures available in the Protein Data Bank has been established. In parallel, a "scaffold hopping" analysis based on known ligands of fibrillar α -syn and tau to generate novel structural diversity has been performed. These new strategies will lead to new chemical candidates that will be synthesized using high-throughput experimentation, and their specificity for fibrils will be evaluated through a direct-to-biology approach.

Keywords Parkinson's disease, Alzheimer's disease, diagnosis, therapy, alpha-synuclein, tau, pocketome, scaffold hopping.

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson sont deux maladies neurodégénératives incurables à ce jour parmi les plus communes. On compte aujourd'hui en France environ 1 million de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer [1]. Cette dernière est la forme la plus commune de démence (60 à 70 % des cas [2]) dont étaient atteints plus de 50 millions de personnes dans le monde en 2019 selon l'OMS [3].

Les symptômes de ces deux maladies sont multiples. On rapporte des troubles mnésiques caractéristiques d'une forme de démence ainsi que des difficultés de reconnaissance dans la maladie d'Alzheimer. Les tremblements au repos, la raideur musculaire ou encore la lenteur à initier les mouvements (ou akinésie), qu'on peut regrouper sous le terme de rigidité posturale, sont caractéristiques de la maladie de Parkinson. Cependant, il existe de nombreux autres symptômes moins connus pour ces deux maladies, tels que de nombreux troubles psychologiques (anxiété, aphasie, dépression), du sommeil et du langage.

Aujourd'hui encore, le diagnostic d'une maladie neurodégénérative n'est basé que sur des symptômes [4]. L'identification définitive de la maladie neurodégénérative qui a précisément affecté un malade ne se fait que post-mortem au moyen d'analyses histologiques de plusieurs marqueurs neuropathologiques. La maladie d'Alzheimer se caractérise par une atrophie du cerveau, tout particulièrement de l'hippocampe, et c'est la perte de plus de 50 % de la population de neurones dopaminergiques – ou neurones à dopamine – qui amène aux premiers symptômes de la maladie de Parkinson. Les

médecins sont donc confrontés à un problème majeur dans la lutte contre ces maladies neurodégénératives : ils ne peuvent les diagnostiquer que sur la base de symptômes, et dès lors que ces pathologies sont déjà à des stades avancés.

Dans les deux maladies, on relie la présence ou non de symptômes ainsi que leur gravité à la dégénérescence des neurones, souvent accompagnée d'une neuroinflammation. En 2003, l'équipe du professeur Heiko Braak proposa une classification en stades de la maladie de Parkinson reliant les différents symptômes et l'état de la neurodégénérescence basée sur la distribution de lésions caractéristiques de cette maladie [5]. Ils sont au nombre de six (figure 1), et ce n'est qu'à partir des stades dits « mid-stage » qu'on constate l'apparition de symptômes moteurs, rendant possible un diagnostic. On peut également utiliser cette classification pour l'évolution de la maladie d'Alzheimer.

Maladies neurodégénératives et lésions neuronales

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par des dépôts protéiques extra- ou intracellulaires qui sont majoritairement constitués de protéines mal repliées. Ce sont ces dépôts qui sont responsables des pertes neuronales et donc *in fine* du déclin cognitif et de la présence de symptômes. Il a été montré que ces dépôts peuvent se propager en se multipliant – à la manière des protéines infectieuses « prion-like » [6].

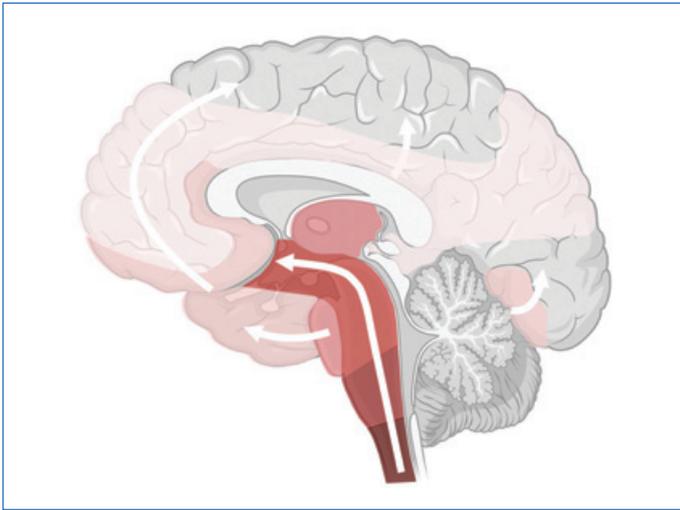


Figure 1 - Représentation graphique des stades de Braak, montrant l'évolution de la maladie de Parkinson. La sévérité décroissante de la pathologie est indiquée par les différents niveaux de couleur, du plus sombre au plus clair. Le processus pathologique ascendant correspondant à la propagation « prion-like » de l'alpha-synucléine agrégée est indiqué par les flèches blanches.

C'est en 1907 que le psychiatre et neuropathologiste Alois Alzheimer – qui donnera donc son nom à la maladie qu'il a décrite – rapporte pour la première fois des lésions neuronales extracellulaires au sein du cerveau de la patiente Auguste Deter, admise à l'hôpital de Francfort pour un cas de démence. L'analyse histologique du cerveau de la patiente permet en effet, pour la première fois, la description des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, à savoir les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires, dont les composants majoritaires seront connus bien plus tard : les peptides bêta-amyloïdes et les protéines tau, respectivement. La maladie de Parkinson est éponyme du médecin James Parkinson qui décrit pour la première fois les symptômes moteurs de cette dernière dans « An essay on shaking palsy » [7]. Parmi les premiers neurones affectés dans la maladie

de Parkinson, on peut citer les neurones à dopamine de la *substantia nigra* ; leur dégénérescence est causée par la présence de corps d'inclusion intracellulaires appelés corps de Lewy et neurites de Lewy, dont la protéine alpha-synucléine est une composante majeure.

Les peptides bêta-amyloïdes

Les peptides amyloïdes bêta sont une famille de peptides d'une longueur moyenne de 40 acides aminés (37 à 42). Ils résultent du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), et selon l'enzyme qui réalise le clivage, on obtient ou non le peptide bêta-amyloïde (figure 2).

Les protéines tau

La protéine tau est associée aux microtubules (éléments constitutifs du cytosquelette) et contribue au maintien de la structure des neurones. Il existe six isoformes résultant d'un épissage alternatif du gène codant pour la protéine. Ceux-ci suivent la nomenclature (0,1,2)N(3,4)R avec N des parties du domaine N-terminal et R des domaines de répétitions impliqués dans la liaison au microtubule. Le nombre total d'acides aminés varie ainsi de 352 (0N3R) à 441 (2N4R) et la masse moléculaire de 37 kDa à 46 kDa. Elle peut être hyperphosphorylée et se détache alors des microtubules, causant leur déstabilisation. Une fois hyperphosphorylée et détachée des microtubules, la protéine tau peut adopter une conformation lui permettant de s'agréger en fibres et de former des enchevêtrements neurofibrillaires (figure 3). L'accumulation de ces derniers est délétère pour les neurones.

Alpha-synucléine

L'alpha-synucléine est une protéine de 140 acides aminés présente en majorité au niveau des terminaisons présynaptiques. Elle est extrêmement dynamique et peut adopter des conformations riches en feuillets bêta, donnant la possibilité à ces monomères mal repliés de s'empiler pour former un protofilament. L'association de deux protofilaments constitue la fibre amyloïde d'alpha-synucléine, et l'élongation trop

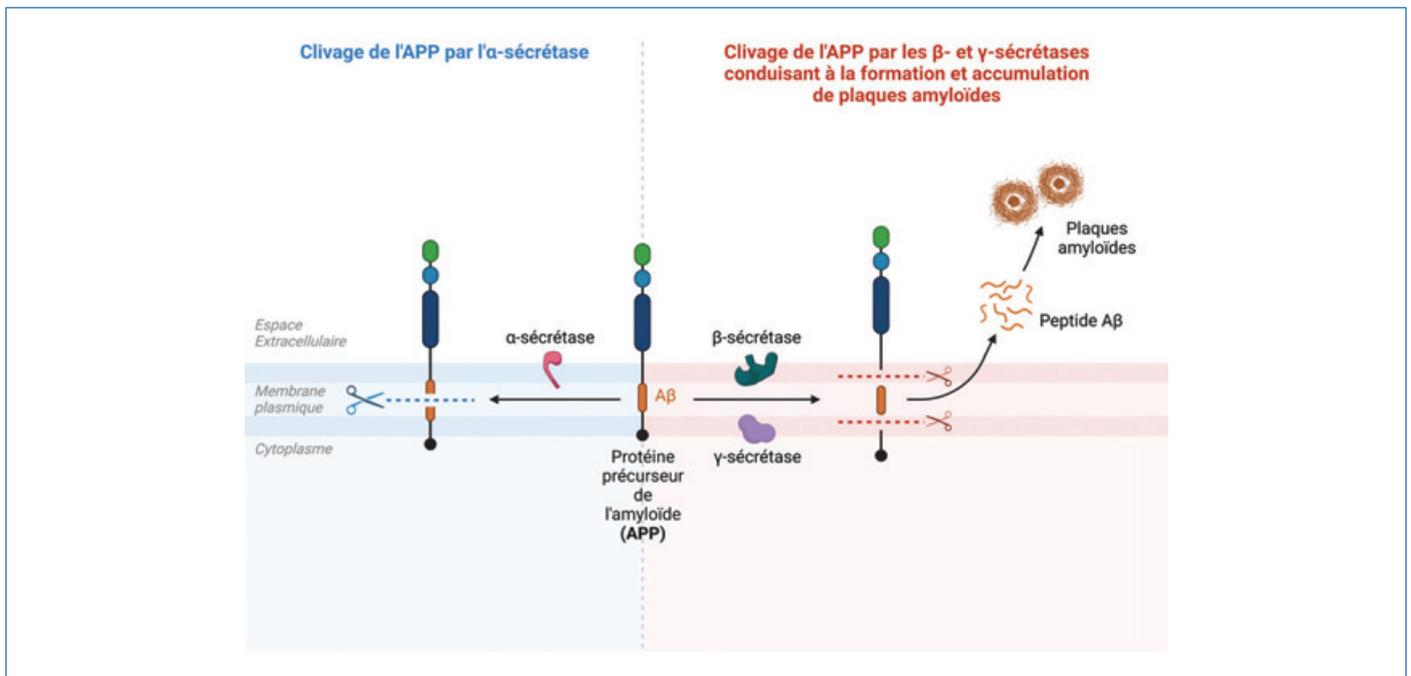


Figure 2 - Clivages possibles de la protéine précurseur de l'amyloïde. Le premier clivage par l'alpha-sécrétase coupe la protéine précurseur de l'amyloïde. Le second clivage par les bêta- et gamma-sécrétases permet la formation du peptide bêta-amyloïde, son accumulation et la formation de plaques amyloïdes extracellulaires.

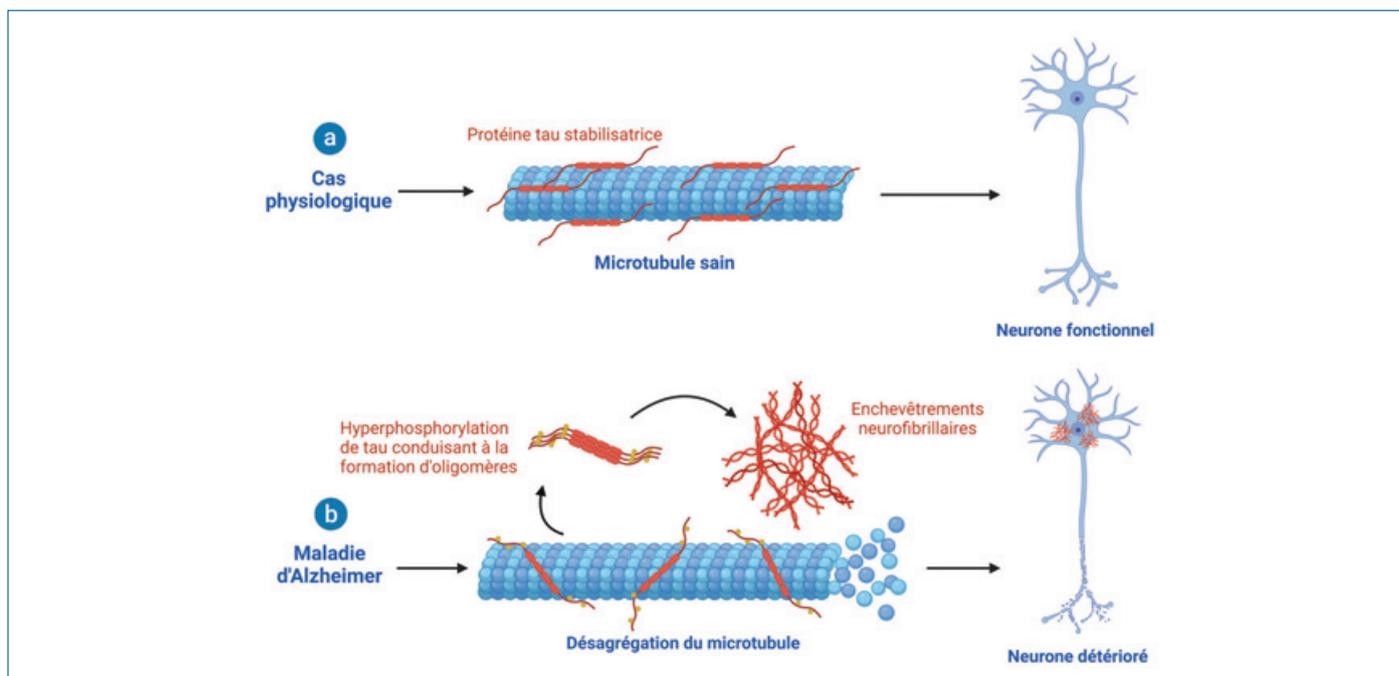


Figure 3 - Formation des enchevêtrements neurofibrillaires dans la maladie d'Alzheimer. Dans le cas physiologique, la protéine tau est associée aux microtubules, permettant leur bon fonctionnement et le maintien du cytosquelette. Dans le cas des patients atteints par la maladie d'Alzheimer, la protéine est phosphorylée dans de nombreux sites, et l'affinité de cette dernière pour le microtubule est alors moindre. À partir d'un certain stade d'hyperphosphorylation, la protéine tau se détache du microtubule et s'agrège en oligomères, puis finalement en enchevêtrements neurofibrillaires, causant la neurodégénérescence.

importante de ces fibres cause la perte de solubilité de celles-ci dans le cytosol et la formation de dépôts intracellulaires que sont les corps et neurites de Lewy (figure 4).

L'existence de polymorphisme et son implication pour la découverte de ligands

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson font partie de familles de protéinopathies. La maladie d'Alzheimer fait partie du spectre des tauopathies tout comme la maladie de Pick, la paralysie supranucléaire progressive et la maladie des grains argyrophiles, alors que la maladie de Parkinson est une forme de synucléinopathies au même titre que la démence à corps de Lewy et que l'atrophie multi-systématisée. De nombreuses données scientifiques indiquent que le polymorphisme, c'est-à-dire les nombreuses formes fibrillaires existantes résultant de l'organisation des protofilaments et/ou de la conformation de polymérisation adoptée, dans les agrégats de tau et de l'alpha-synucléine, est responsable de ces différentes pathologies. Il existe par conséquent une relation entre la structure des agrégats protéiques et la pathologie qui en résulte [8-12]. Dans le cas de l'alpha-synucléine, l'interaction entre les deux protofilaments constituant la fibre amyloïde peut varier. En collaboration avec les équipes d'Henning Stahlberg et Anja Böckmann, notre équipe a répertorié en 2019 deux structures 3D de l'alpha-synucléine qui diffèrent par l'agencement des deux protofilaments formant la fibre amyloïde [13]. Il existe aujourd'hui de nombreux polymorphes répertoriés pour les protéines tau et alpha-synucléine au sein de la Protein Data Bank (PDB).

Le polymorphisme décrit plus haut rend difficile le développement de traitements (petite molécule ou anticorps) efficaces pour lutter contre différentes synucléinopathies et tauopathies, ou les diagnostiquer avec certitude à un stade précoce. En effet, un anticorps en lien avec l'alpha-synucléine indépendamment de quelque repliement ne pourra pas être efficace

puisqu'il ne distinguera pas une forme normale, fonctionnelle, d'une forme anormale, pathologique. Il est alors indispensable de développer des anticorps ou des ligands de plus faible masse moléculaire spécifiques de conformations bien définies.

Il apparaît donc nécessaire de concevoir des ligands spécifiques – vis-à-vis d'une protéine par rapport à une autre, mais surtout d'un polymorphe par rapport à un autre – aux fibres amyloïdes, en utilisant les connaissances structurales actuelles sur les polymorphes et les pistes diagnostiques déjà existantes.

Aujourd'hui, le développement de petites molécules organiques comme ligands potentiels des fibres amyloïdes se fait essentiellement dans le domaine de radiotraceurs pour la tomographie par émission de positons (TEP). Cependant, les candidats déjà développés montrent très souvent un marquage peu, voire non spécifique, des différentes fibres amyloïdes [14], mais également un marquage important d'autres cibles [15] telles que la monoamine oxydase A [16-17].

Expertises et stratégies mises en place

Pour mener à bien ce projet, nous développons des stratégies innovantes d'études *in silico* (en collaboration avec l'Institut Pasteur) et de synthèse organique par méthode dite « HTE » (« high throughput experimentation », expérimentation à haut débit), tout en profitant des connaissances techniques de production de différentes souches fibrillaires d'alpha-synucléine et de tau.

Approches informatiques

L'existence de polymorphisme est un défi pour la conception de ligands, mais la découverte et la caractérisation de nombreuses souches par des méthodes de biologie structurale (essentiellement basées sur les données de cryomicroscopie électronique) et leur dépôt au sein de la PDB nous permettent

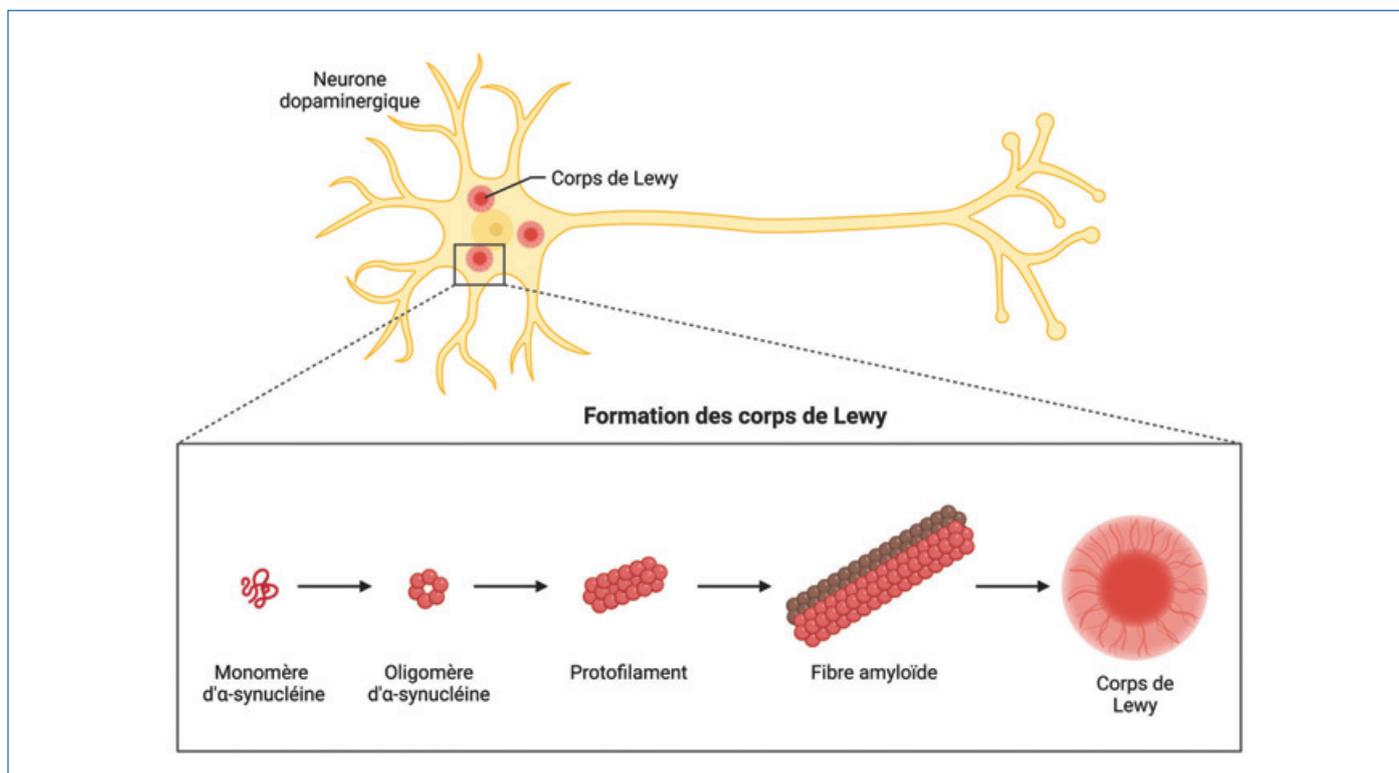


Figure 4 - Mécanisme d'agrégation de l'alpha-synucléine conduisant à la formation des corps de Lewy. On représente ici les deux protofilaments constituant de la fibre amyloïde de deux couleurs différentes (en marron et rouge) afin de permettre une meilleure visualisation. Le neurone représenté est un neurone dopaminergique car c'est le premier type de neurone à être affecté dans la maladie de Parkinson.

d'évaluer les similarités et différences existantes à la surface de ces différentes sources par des approches *in silico*. Nous avons ainsi défini des poches et des sillons créés par la position des acides aminés à la surface de ces structures et/ou leur empilement, et avons comparé les propriétés (volume, polarité, etc.) de ces poches pour créer un « pocketome » des fibres d'alpha-synucléine, de tau et du peptide bêta-amyloïde, les poches spécifiques de polymorphes étant *de facto* de meilleurs candidats pour la conception de ligands eux aussi spécifiques.

Ce pocketome de fibres amyloïdes sera par la suite projeté dans un pocketome plus vaste d'interactions protéine-protéine connues pour être inhibées par une petite molécule. Ainsi, un inhibiteur de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, impliqué dans le fonctionnement du corps humain), certainement jamais étudié sur une maladie neurodégénérative, pourrait devenir un nouveau candidat car se liant à une poche possédant des propriétés similaires à celles d'une souche fibrillaire.

La dernière approche *in silico*, intitulée « scaffold hopping » (saut structural), trouve son point de départ dans les radiotraceurs déjà développés pour l'imagerie TEP. Continuer à développer de nouveaux analogues de ces structures pour améliorer leurs propriétés serait très coûteux et avec de faibles chances de succès. Notre stratégie est donc de retenir les radiotraceurs actuels avec les meilleures propriétés, et d'utiliser l'intelligence artificielle et des méthodes de « deep learning » (par apprentissage) pour générer des molécules présentant une structure chimique différente, tout en conservant les propriétés physiques et électroniques du radiotraceur initial.

Utilisation et intérêt de la synthèse à haut débit

La synthèse à haut débit (HTE) est une synthèse miniaturisée sur plaque, généralement au format 96 puits, permettant d'optimiser rapidement une réaction chimique ou d'explorer

son champ d'application, en synthétisant 96 analogues en parallèle par une variation des synthons de départ (figure 5). Cette méthode de synthèse permet également une approche dite « direct-to-biology », donnant ainsi la possibilité de réaliser les études *in vitro* à partir de la même plaque. La synthèse HTE permet ainsi de réduire considérablement les coûts matériels, économiques et temporels dans le domaine de la chimie médicinale, où la phase de pharmacomodulation est très longue et coûteuse.

Un espoir de diagnostic précoce

Cette panoplie de stratégies innovantes devrait nous permettre à terme d'obtenir de nouveaux candidats, plus spécifiques et plus rapidement, pour la recherche diagnostique et thérapeutique des maladies de Parkinson et d'Alzheimer, en lien avec les événements moléculaires à l'origine de ces maladies. C'est un espoir de diagnostic précoce (avant même l'apparition de symptômes cognitifs) – via la génération de nouveaux types de radiotraceurs pour l'imagerie TEP – des maladies et donc de meilleurs accompagnements des patients.

Toutefois, il reste nécessaire de rappeler que les maladies neurodégénératives sont encore loin d'être tout à fait comprises et qu'elles sont multifactorielles. On peut citer le rôle de la neuroinflammation dans ces maladies [18-20], celui potentiel de certains métaux, pesticides [21] et toxines [22] dans les mécanismes d'agrégaions protéiques [23-24]. Le nombre et la disparité des facteurs potentiels impliqués dans leur émergence rendent de ce fait un unique médicament peu probable.

C'est pourquoi les stratégies établies visent à générer de nouvelles molécules, mais également à nous renseigner sur les aspects structuraux en lien avec l'existence de polymorphisme

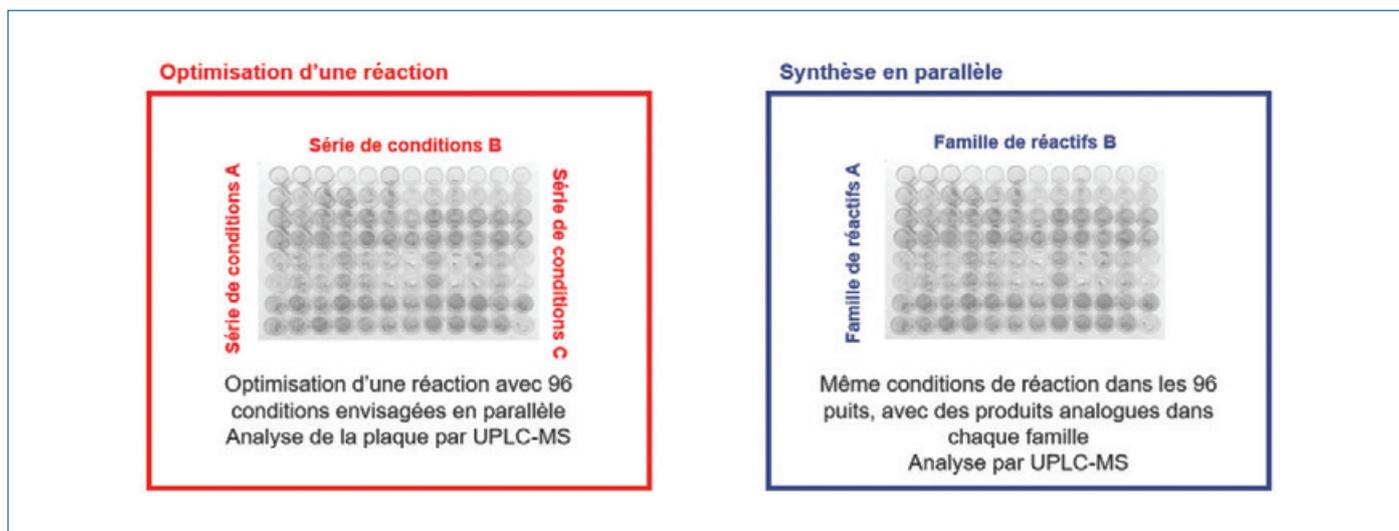


Figure 5 – Possibilités de synthèse HTE. À gauche : optimisation d'une réaction en évaluant des séries de conditions de solvant, catalyseur, base, etc. pour une réaction de travail. À droite : synthèse en parallèle d'une réaction à partir de deux familles de réactifs présentant divers analogues.

dans chaque maladie. L'établissement d'un pocketome pourra permettre à toute la communauté scientifique de comparer les structures des fibres amyloïdes entre elles, et la possibilité de projeter cette cartographie au sein d'autres bases de données structurales. Ces nouvelles informations permettront d'approvoiser la recherche de nouveaux ligands spécifiques de manière plus rationnelle et constituent une nouvelle étape de compréhension des structures fibrillaires pouvant, par exemple, amener à de nouvelles études mécanistiques de formation des différentes souches pour mieux comprendre l'existence de polymorphisme.

- [1] www.vaincrealzheimer.org/la-maladie/quelques-chiffres (consulté le 08/09/2023).
- [2] www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia (consulté le 08/09/2023).
- [3] Global status report on the public health response to dementia. Geneva, World Health Organization, **2021**.
- [4] K. Szigeti, Overcoming gaps in the treatment of neurodegenerative disease, *EbioMedicine*, **2020**, *60*, 103088.
- [5] B. Heiko *et al.*, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*, **2003**, *24*(2), p. 197-211.
- [6] P. Brundin, R. Melki, R. Kopito, Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2010**, *11*(4), p. 301-307.
- [7] J. Parkinson, An essay on the shaking palsy. 1817, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **2002**, *14*(2), p. 223-236.
- [8] W. Peelaerts *et al.*, α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration, *Nature*, **2015**, *522*(7556), p. 340-344.
- [9] A. Van der Perren *et al.*, The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies, *Acta Neuropathol.*, **2020**, *139*, p. 977-1000.
- [10] R.W.L. So, J.C. Watts, α -Synuclein conformational strains as drivers of phenotypic heterogeneity in neurodegenerative diseases, *J. Mol. Biol.*, **2023**, *435*(12), 168011.
- [11] J. Vaquer-Alicea, M.I. Diamond, L.A. Joachimiak, Tau strains shape disease, *Acta Neuropathol.*, **2021**, *142*, p. 57-71.
- [12] W. Zhang *et al.*, Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases, *Elife*, **2019**, *8*, e43584.
- [13] R. Guerrero-Ferreira *et al.*, Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils, *Elife*, **2018**, *7*, e36402.
- [14] A. Perez-Soriano *et al.*, PBB3 imaging in Parkinsonian disorders: evidence for binding to tau and other proteins, *Mov. Disord.*, **2017**, *32*(7), p. 1016-24.

- [15] M. Marquié *et al.*, Lessons learned about [F-18]-AV-1451 off-target binding from an autopsy-confirmed Parkinson's case, *Acta Neuropathol. Com.*, **2017**, *5*(1), p. 1-13.
- [16] C. Vermeiren *et al.*, The tau positron-emission tomography tracer AV-1451 binds with similar affinities to tau fibrils and monoamine oxidases, *Mov. Disord.*, **2018**, *33*(2), p. 273-281.
- [17] L. Lemoine *et al.*, Tau positron emission tomography imaging in tauopathies: the added hurdle of off-target binding, *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, **2018**, *10*, p. 232-236.
- [18] M.T. Heneka *et al.*, Neuroinflammation in Alzheimer's disease, *The Lancet Neurology*, **2015**, *14*(4), p. 388-405.
- [19] M. Jain *et al.*, Role of JAK/STAT in the neuroinflammation and its association with neurological disorders, *Ann. Neurosci.*, **2021**, *28*(3-4), p. 191-200.
- [20] L. Katsouri *et al.*, Ablation of reactive astrocytes exacerbates disease pathology in a model of Alzheimer's disease, *Glia*, **2020**, *68*(5), p. 1017-30.
- [21] A. Elbaz *et al.*, Professional exposure to pesticides and Parkinson disease, *Ann. Neurol.*, **2009**, *66*(4), p. 494-504.
- [22] M. Gerlach *et al.*, MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease, *Eur. J. Pharmacol.: Mol. Pharmacol.*, **1991**, *208*(4), p. 273-286.
- [23] J.T. Pedersen *et al.*, Rapid exchange of metal between Zn7-metallothionein-3 and amyloid- β peptide promotes amyloid-related structural changes, *Biochemistry*, **2012**, *51*(8), p. 1697-1706.
- [24] R.G. Roy, P.K. Mandal, J.C. Maroon, Oxidative stress occurs prior to amyloid A β plaque formation and tau phosphorylation in Alzheimer's disease: role of glutathione and metal ions, *ACS Chem. Neurosci.*, **2023**, *14*(17), p. 2944-54.

Gaëtan OSSARD*^{1,2}, doctorant, **Ronald MELKI**¹, directeur de recherche au CNRS, et **Eugénie ROMERO-LABOUREUR**², ingénieur-chercheur au CEA.

¹Laboratoire des maladies neurodégénératives, Molecular Imaging Reseach Center, Institut Jacob, CEA.

²Laboratoire de chimie bioorganique, Service de chimie bioorganique et de marquage, Département Médicaments et technologies pour la santé, Institut Joliot, CEA, Université Paris-Saclay, INRAE.

* gaetan.ossard@cea.fr

Observer des étoiles dans le cerveau

Résumé Les astrocytes, des cellules en forme d'étoiles, représentent 20 à 40 % de la population des cellules gliales dans le cerveau. Ces cellules remplissent de nombreuses fonctions essentielles, comme le soutien aux neurones (neurotransmission, métabolisme), et participent aussi à la défense immunitaire (neuro-inflammation). Dans des conditions pathologiques telles que des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), les astrocytes subissent des changements morphologiques et fonctionnels. De nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie en tomographie par émission de positons (TEP) sont en cours de développement pour cibler spécifiquement ces astrocytes afin de suivre leur évolution au cours des maladies neurodégénératives. Ces radiotraceurs seront des outils qui permettront *in vivo* d'évaluer les différentes stratégies thérapeutiques ciblant ces cellules. L'objectif de ce projet est d'identifier si ces radioligands sont capables d'imager mais surtout de différencier des états d'activation spécifiques des astrocytes en relation avec des processus pathologiques. Pour ce faire, des approches pharmaco-TEP *in vivo* seront combinées à des études post-mortem. Les études de pharmaco-TEP permettront de définir l'affinité des radioligands pour leur cible astrocytaire et si cette affinité est modulée par l'état de réactivité des astrocytes : une information clé pour la caractérisation des radioligands et l'interprétation des résultats d'imagerie TEP en vue de leur application clinique.

Mots-clés Astrocyte, maladies neurodégénératives, imagerie TEP, analyse post-mortem, biomarqueurs.

Abstract Observing stars in the brain

Astrocytes, star-shaped cells, represent 20 to 40% of the glial cell population in the brain. These cells perform many essential functions, such as supporting neurons (neurotransmission, metabolism), and also participate in immune defense (neuroinflammation). In pathological conditions such as neurodegenerative diseases (Alzheimer, Parkinson), astrocytes undergo morphological and functional changes. New radiotracers for positron emission tomography (PET) imaging are being developed to specifically target these astrocytes in order to monitor their evolution during neurodegenerative diseases. These radiotracers are tools allowing the evaluation of different therapeutic strategies targeting these cells *in vivo*. The objective of this project is to identify whether these radioligands are capable of imaging but above all differentiating specific activation states of astrocytes in relation to pathological processes. To achieve this, *in vivo* pharmaco-PET approaches are combined with post-mortem studies. Pharmaco-PET studies will make it possible to define the affinity of radioligands for their astrocyte target and whether this affinity is modulated by the state of reactivity of the astrocytes: a key information for characterizing radioligands and interpreting PET imaging results for their clinical application.

Keywords Astrocyte reactivity, PET imaging, post-mortem analysis, neurodegenerative diseases, biomarkers.

La réactivité astrocytaire

Jusqu'à 50 % des cellules du système nerveux central (SNC) sont des cellules gliales, qui jouent un rôle important dans le développement, la plasticité et le vieillissement du SNC. Les principales populations gliales comprennent les oligodendrocytes, les cellules microgliales, les épendymocytes et les astrocytes. Ces derniers, qui doivent leur nom à leur forme en étoile (*astro*, étoile ; *cyte*, cellule), constituent la population gliale la plus abondante du SNC avec de nombreuses fonctions comme le maintien de l'homéostasie énergétique, la modulation de la plasticité synaptique, le recyclage des neurotransmetteurs et le maintien de la barrière hémato-encéphalique [1]. La recherche sur les astrocytes a mis en évidence leur impact dans des maladies du SNC, telles que la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP). En réponse à des conditions pathologiques, les astrocytes subissent de multiples changements morphologiques, fonctionnels et d'expression moléculaire, communément appelés « réactivité astrocytaire » [2].

Ainsi, des études microscopiques ont montré une modification du cytosquelette par l'augmentation d'expression des principales protéines des filaments intermédiaires des astrocytes, telles que la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), mais

aussi la nestine, la synemine ou encore la vimentine. Cette réorganisation du cytosquelette donne lieu à de multiples changements morphologiques comme l'hypertrophie astrocytaire, reconnue depuis longue date comme le signe universel de pathologie du SNC [3.] En plus des altérations morphologiques, des approches moléculaires à haut débit ont dévoilé divers changements dans le transcriptome d'astrocytes réactifs isolés de modèles animaux de différentes maladies du SNC [4]. Ces modifications morphologiques et moléculaires entraînent des changements fonctionnels, par lesquels les astrocytes perdent ou gagnent des fonctions. Ainsi, la réactivité astrocytaire a été liée à une augmentation d'expression et densité enzymatique de la monoamine oxydase B (MAO-B), comme observée dans plusieurs pathologies du SNC [2]. La MAO-B est l'un des deux sous-types d'enzymes monoamines oxydases majoritairement présent dans le cerveau (deux à trois fois plus présent que l'autre sous-type, la MAO-A) [5], qui se trouve principalement sur les membranes mitochondriales externes des astrocytes. À part leur rôle dans la désamination oxydative des neurotransmetteurs monoaminergiques tels que la dopamine ou la noradrénaline, la MAO-B est également considérée comme un facteur clé dans l'étiologie du vieillissement normal et des troubles neurologiques liés à l'âge tels que les maladies d'Alzheimer et

de Parkinson [6]. La catalyse du substrat par l'enzyme produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), source de stress oxydatif, qui peut à son tour entraîner des dommages cellulaires [7].

Les défis de l'imagerie de la réactivité astrocytaire en médecine nucléaire

La tomographie par émission de positons (TEP), technique d'imagerie nucléaire basée sur l'injection intraveineuse d'une molécule (également appelée radiotracteur) radiomarquée avec un isotope émetteur de positons (β^+) à courte durée de vie, permet d'imager plusieurs fonctions du cerveau, comme son métabolisme. Pour éviter l'interférence avec les processus biologiques, le radiotracteur est injecté à très faible dose (à dose traceuse, de l'ordre du microgramme).

Ainsi, des radiotraceurs spécifiques des cibles astrocytaires impliquées dans les remodelages morphologiques, moléculaires et fonctionnels précoces permettraient de mieux comprendre les réponses astrocytaires aux processus neuro-dégénératifs. Les radiotraceurs actuels pour l'imagerie des astrocytes réactifs sont sélectifs de la MAO-B. Le signal TEP représente la densité enzymatique de la MAO-B, considérée comme un biomarqueur d'astrogliose dans diverses pathologies du SNC [8].

Récemment, le site de liaison d'I2-imidazoline, I2BS, situé sur la partie non catalytique des MAO [9], a également été suggéré comme cible astrocytaire potentielle pour l'imagerie TEP compte tenu de la fonction physiologique des sites d'I2-imidazoline dans la régulation des niveaux de GFAP [10]. Plusieurs ligands existent pour I2BS, dont seul [^{11}C]BU99008 a des caractéristiques satisfaisantes pour être utilisé en étude clinique (bonne pénétration dans le cerveau, haute spécificité pour la cible, une pharmacocinétique adaptée à la demi-vie de l'isotope, etc.). Avec ce ligand, la réactivité astrocytaire liée au vieillissement – un processus biologique peu exploré – a pu être démontrée en comparant des sujets sains âgés de 45 à 75 ans [11]. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson à des stades précoces [12], des études cliniques utilisant [^{11}C]BU99008 ont montré un signal TEP plus élevé comparé aux sujets sains, suggérant une réactivité astrocytaire liée aux processus pathologiques.

Dans l'ensemble, ces études suggèrent le potentiel de ce ligand en tant que biomarqueur de la réactivité astrocytaire. De plus, une étude post-mortem sur le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer comparant ce ligand à un ligand de référence pour la MAO-B a relevé un schéma de liaison similaire entre les deux ligands, mais a suggéré un meilleur contraste pour le ligand BU99008 [13]. Cette même étude a également comparé les sites de liaison dans le cerveau de personnes âgées avec ceux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer. Les résultats ont montré la présence de différents sites de liaison pour le ligand, avec des affinités allant de très élevée à faible, et semblent suggérer que l'affinité de certains sites évolue entre sujets sains et patients atteints de la maladie d'Alzheimer [13], ce qui peut impacter de manière significative le signal TEP.

En résumé, des études cliniques utilisant l'imagerie TEP dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ont mis en évidence une augmentation du signal I2BS qui semble être associée à une réactivité astrocytaire autre que celle du vieillissement. Le signal mesuré en TEP est déterminé par l'affinité du ligand pour la cible et le nombre de cibles disponibles. Cependant, on ne sait pas si chez les sujets atteints de la maladie

d'Alzheimer ou de Parkinson, ce signal TEP correspond à un changement d'affinité ou à un changement de densité de cibles I2BS. Nous proposons ici une stratégie pour mieux comprendre le signal mesuré en TEP, ainsi que l'état de réactivité astrocytaire lié à ce signal TEP (figure 1). Une meilleure compréhension des biomarqueurs TEP aura un impact majeur sur les études cliniques et le développement de stratégies thérapeutiques.

Une meilleure compréhension de l'image TEP clinique grâce aux études précliniques

Contrairement aux études chez l'homme, les études précliniques sur modèle animal permettent de réaliser des études d'imagerie incluant des modulations pharmacologiques, et de réaliser des études *ex vivo* (post-mortem) chez le même animal, ce qui permet de coupler les données d'imagerie TEP obtenues *in vivo* aux données *ex vivo* obtenues par d'autres techniques telles que microscopie, séquençage à haut débit, etc. De plus, un modèle animal expérimental permet de modifier des processus biologiques de manière contrôlée, de sorte que chaque animal est son propre témoin. Ainsi, l'imagerie TEP préclinique porte une valeur importante dans la validation des radiotraceurs en tant que biomarqueur.

Dans le cadre des études précliniques, l'objectif est de déterminer les caractéristiques de liaison de [^{11}C]BU99008, ainsi que les caractéristiques de la réactivité des astrocytes afin de permettre une meilleure interprétation du signal TEP en clinique.

Caractéristiques de la liaison du ligand BU99008

In vivo, l'amplitude du signal TEP est déterminée par le rapport B_{max}/K_d , où B_{max} représente le nombre maximum de cibles disponibles et K_d (parfois noté $AppK_d$ pour « K_d apparent *in vivo* ») la constante de dissociation (inverse de l'affinité). Ces deux paramètres sont couplés et non mesurables séparément habituellement en TEP. Ainsi, pour un changement de signal TEP observé, on ne peut pas savoir si cela provient d'une modification de la densité de cibles (B_{max}), due par exemple à la mort cellulaire de l'astrocyte, ou bien de l'affinité du ligand pour la cible (K_d), due par exemple à un changement de conformation de celle-ci. Des hypothèses sont souvent faites, basées sur des connaissances *a priori* sur la cible ou le ligand, pour interpréter les résultats d'image TEP. Une approche d'imagerie pharmacocinétique et dynamique par imagerie TEP, qui consiste en la co-administration avec le radioligand d'une drogue spécifique en compétition avec le radioligand pour la cible en question, permet de répondre à ces questions, et l'ensemble de ces études d'imagerie TEP sera référencé pour la suite par l'acronyme « pharmacoTEP ». La drogue en compétition avec le radiotracteur est administrée à des doses pharmacologiques et peut être la même molécule que le radioligand, simplement non radiomarquée (ligand froid), ou une autre molécule spécifique pour la cible comme un médicament. Ainsi, lorsque la drogue co-administrée est le ligand froid, on obtient des informations sur l'affinité du radioligand lui-même. Généralement, les caractéristiques de liaison entre cible et radioligand sont établies par des études *in vitro*, mais ces expériences ne représentent pas toujours la situation *in vivo*. À ce jour, l'affinité du ligand BU99008 n'a jamais été estimée *in vivo*, et d'autant moins en fonction de la réactivité astrocytaire liée à une pathologie. Des études d'imagerie pharmaco-TEP réalisées avec le [^{11}C]BU99008 et la co-administration

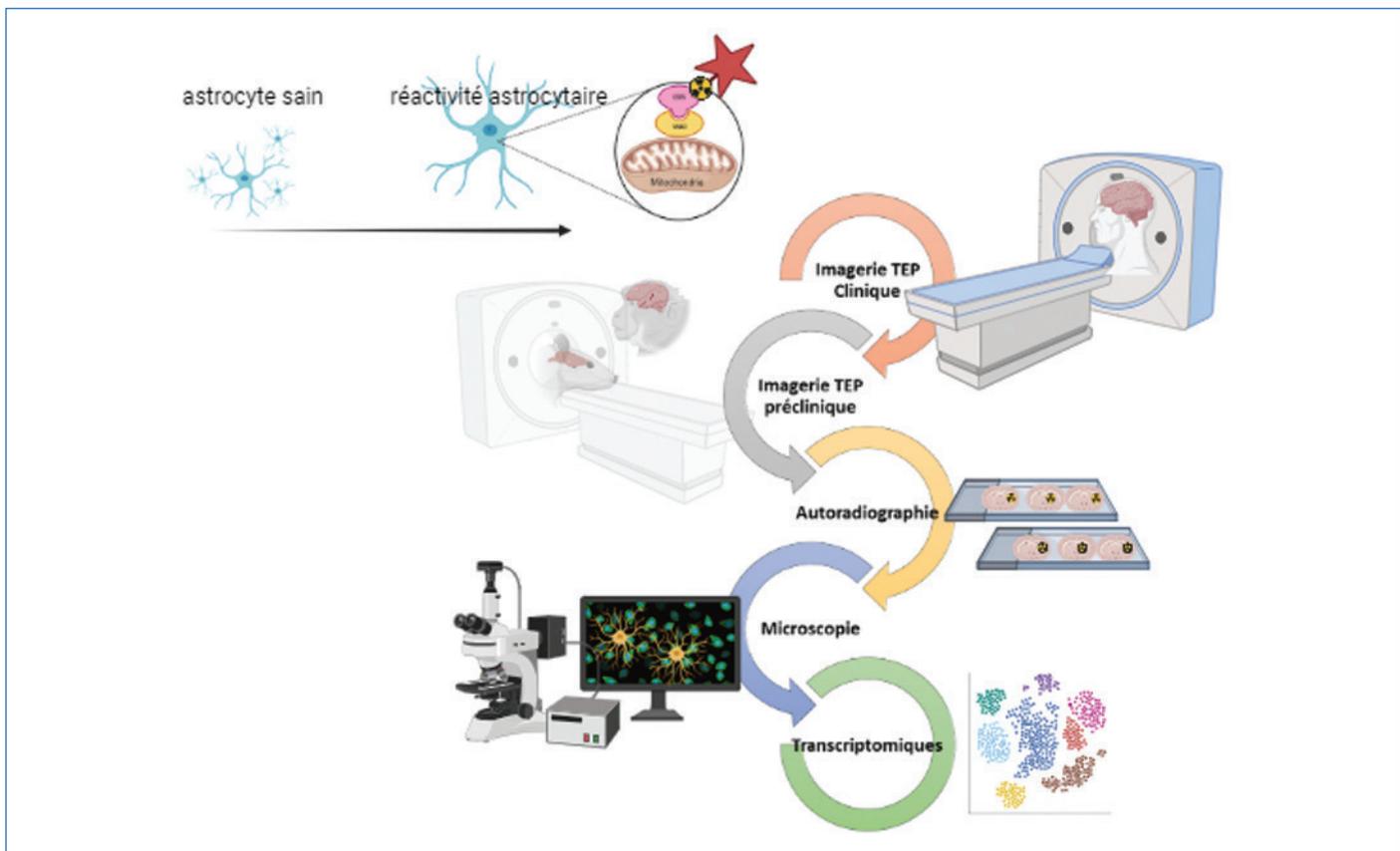


Figure 1 - Représentation schématique d'une stratégie de validation d'un radioligand ($[^{11}\text{C}]\text{BU99008}$), biomarqueur de la réactivité astrocytaire, par la création d'un continuum de données entre l'imagerie TEP *in vivo*, l'autoradiographie, la microscopie et les données transcriptomiques, afin de mieux comprendre la biologie sous-jacente à la cible du radioligand.

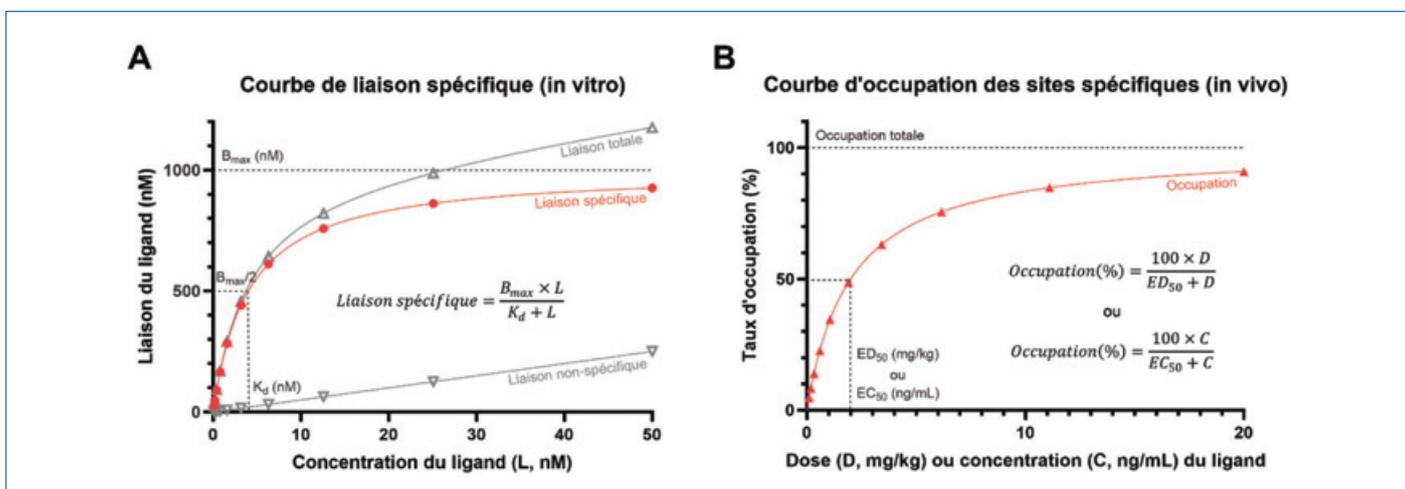


Figure 2 - A) Courbes *in vitro* de liaison totale, non spécifique et spécifique. La courbe de liaison spécifique permet d'estimer la constante de dissociation (K_d) ainsi que la densité de cibles (B_{max}). B) Courbe *in vivo* d'occupation des sites qui permet d'estimer ED_{50} ou EC_{50} .

du BU99008 (ligand froid) à des doses pharmacologiques, réalisées chez le même animal avant et après l'induction d'une réactivité astrocytaire, fournissent des informations sur l'affinité de BU99008 *in vivo* (avant induction), ainsi que sur toute modification potentielle de l'affinité du ligand ou de la densité de la cible due à l'expression de l'I2BS ou à des changements morphologiques (après induction).

Des études de saturation sont généralement effectuées *in vitro* utilisant le $[^3\text{H}]\text{BU99008}$ pour mesurer l'affinité de BU99008 [13]. Pour ces études, différents tubes contenant des homogénats de cerveaux sont incubés avec des concentrations croissantes d'activité du radioligand. La gamme de concentrations est choisie telle que le niveau d'occupation (ou

de saturation) des cibles aille de faible (peu de cibles liées au ligand) à très élevé (la plupart des cibles sont liées au ligand) (figure 2A). La radioactivité fixée dans les échantillons est comptée et ces mesures permettent d'obtenir une courbe de liaison totale (spécifique + non spécifique) en fonction de la concentration du ligand. Pour déterminer la liaison non spécifique, les homogénats sont incubés dans un deuxième jeu de tubes contenant la même gamme de concentrations de radio-traceur mais dans lesquels un excès de ligand froid correspondant à une dose saturante (occupant 100 % des sites spécifiques) est ajouté. Ces mesures permettent d'obtenir une courbe de liaison non spécifique en fonction de la concentration du ligand. La courbe de liaison spécifique est alors

obtenue en soustrayant la courbe de liaison non spécifique de la courbe de liaison totale. Cette courbe est ensuite analysée par régression non linéaire pour déterminer des paramètres tels que l'affinité du ligand pour sa cible (K_d) ainsi que la densité de cibles (B_{max}) (figure 2A). L'équation de la régression non linéaire est décrite ici dans le cas d'un seul site de liaison spécifique (figure 2A). Il est également possible d'utiliser des équations plus complexes qui permettent de tester la possibilité de plusieurs sites de liaison [13].

Pour les études *in vivo* de pharmacotEP, on procède de façon similaire. La drogue co-injectée à des doses pharmacologiques avec le radioligand va occuper une partie des sites spécifiques, et ainsi moins de sites seront disponibles pour le radioligand, ce qui va engendrer une diminution du signal TEP. Plusieurs études pharmacotEP sont réalisées, avec une gamme de doses de drogue correspondant à une faible occupation des sites (faible diminution du signal TEP), à une forte occupation des sites, voire à saturation totale (forte diminution du signal TEP), permettant une modulation du signal TEP. Cela permet de générer une courbe de saturation *in vivo* équivalente à celle obtenue *in vitro*. Le pourcentage d'occupation des sites est ensuite calculé en fonction de la dose ou de la concentration plasmatique de la drogue. Une analyse de cette courbe par régression non linéaire permet alors d'obtenir des paramètres tels que l' ED_{50} (dose pour laquelle le signal TEP a diminué de moitié, ou de façon équivalente, pour laquelle 50 % des sites spécifiques sont occupés par la drogue), ou l' EC_{50} (concentration plasmatique pour 50 % d'occupation) (figure 2B). Classiquement en pharmacologie, ED_{50} et EC_{50} sont définies par rapport à l'effet maximum d'un médicament et représentent la puissance de celui-ci. Ici, ces deux mesures sont définies par rapport au taux d'occupation des sites spécifiques et représentent deux analogues pharmacologiques de la constante de dissociation K_d . Il est en fait possible, avec des données supplémentaires telles que la fraction de ligand libre dans le plasma, ou bien une estimation de la concentration de ligand libre dans le cerveau, d'obtenir une estimation *in vivo* de K_d (parfois noté $AppK_d$) ainsi que B_{max} .

Ainsi, les études *in vivo* de pharmacotEP permettent une mesure de l'affinité du radioligand pour la cible spécifique. Et dans le cadre d'induction de réactivité astrocytaire dans des modèles animaux, elles permettent une évaluation d'une modification potentielle de l'affinité. Cette information permettra un éclairage nouveau sur les résultats cliniques récents obtenus par imagerie TEP avec [^{11}C]BU99008.

Analyses post-mortem en support des données *in vivo*

L'affinité de l'I2BS pour BU99008 chez des patients atteints de la maladie Alzheimer ne serait pas tout à fait la même que chez des sujets âgés, mais la biologie sous-jacente à ce changement d'affinité n'est pas connue. L'hypothèse que la réactivité astrocytaire induite par les maladies neurodégénératives génère certaines modifications au niveau d'I2BS, différentes de celles induites par le vieillissement, reste à démontrer. Si les changements d'affinité impactés par un changement de conformation peuvent être considérés comme des modifications fonctionnelles de la réactivité astrocytaire, l'établissement d'un lien avec l'expression moléculaire et avec les changements morphologiques de ces mêmes astrocytes réactifs contribuera à une meilleure compréhension de l'état de réactivité astrocytaire, et par conséquent du signal TEP [^{11}C]BU99008 en tant que biomarqueur de la réactivité astrocytaire.

L'expression moléculaire des astrocytes réactifs est analysée en évaluant le taux de transcription de différents gènes dans des conditions pathologiques. Si la RT-qPCR, la réaction en chaîne par polymérase quantitative à partir d'un échantillon d'ARN, est utile pour quantifier l'expression de quelques gènes, elle ne peut détecter que des séquences connues et identifiées au préalable. En revanche, la transcriptomique, plus précisément le séquençage de l'ARN (RNA-Seq), permet d'étudier à la fois la séquence et la quantité de tous les ARN dans un échantillon biologique. De plus en plus d'études TEP cliniques combinent des données d'expression génique, provenant d'atlas cérébraux en libre accès, avec des données d'imagerie *in vivo*, afin d'améliorer la compréhension des voies biologiques ou des mécanismes pathologiques qui sous-tendent l'imagerie des maladies neurodégénératives. Ainsi, une étude clinique combinant l'imagerie TEP du [^{11}C]BU99008 avec des données transcriptomiques, provenant des banques de données, a bien confirmé la contribution des cellules astrocytaires au signal TEP, mais a suggéré également l'implication d'autres cellules gliales et des neurones. Pour une comparaison plus détaillée du signal TEP avec les données transcriptomiques, et ceci au niveau individuel, l'utilisation de modèles précliniques est essentielle pour obtenir des informations plus spécifiques liées à un phénotype à un moment donné. En effet, à part l'augmentation d'expression attendue de certains gènes, comme la GFAP, la vimentine, S100 β (impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et la réponse immunitaire dont l'expression est augmentée dans les astrocytes réactifs) ou encore le TNF- α (une cytokine pro-inflammatoire produite par les astrocytes en réponse à des lésions ou à l'inflammation), l'analyse transcriptomique pourra contribuer à identifier de nouvelles protéines, et potentiellement des cibles thérapeutiques, jouant un rôle dans la réactivité astrocytaire observée par l'imagerie TEP du [^{11}C]BU99008. Pour une analyse encore plus poussée jusqu'au niveau cellulaire, ce qui permettrait d'identifier les différents sous-types d'astrocytes, il faudrait procéder au séquençage de l'ARN d'une seule cellule (scRNA-seq), après triage cellulaire d'échantillons de tissus, et ceci couplé à une étude de liaison cellulaire du radioligand. Néanmoins, les difficultés techniques d'une telle approche résident dans la possibilité de récupérer suffisamment de cellules vivantes n'ayant pas subi de modifications significatives lors de la dissociation du tissu et du tri cellulaire.

Une autre approche pour mieux caractériser la liaison d'un radioligand TEP consiste à coupler les données TEP *in vivo* à des données de microscopie *in vitro*. En effet, la microscopie optique ou fluorescente permet de visualiser des protéines d'intérêt dans les cellules après marquage par immunohistochimie ou immunofluorescence des coupes tissulaires. L'immunofluorescence présente l'avantage de permettre un marquage multiple afin d'étudier simultanément la présence et la localisation de plusieurs protéines dans la même section de tissu. Sachant que l'I2BS n'a pas d'anticorps spécifique, que des antagonistes I2BS font augmenter l'immunoréactivité GFAP et que l'I2BS se trouve sur la MAO-B, il serait donc intéressant de coupler le signal TEP à la présence de ces deux protéines, la GFAP et la MAO-B. De plus, des études transcriptomiques pourraient également diriger le choix vers d'autres cibles pour une corrélation du signal TEP avec des données de microscopie. Étant donné que la résolution de l'imagerie TEP, de l'ordre du μm , est loin de la résolution microscopique, de l'ordre du μm , une autre technique souvent utilisée en

intermédiaire pour combler l'écart entre les deux techniques est l'autoradiographie. Cette méthodologie, effectuée *ex vivo* ou *in vitro*, se base sur l'incubation des coupes tissulaires radiomarquées avec une émulsion ou un film photographique. L'immunohistochimie ou fluorescence est ensuite effectuée sur les mêmes coupes ou sur des coupes adjacentes. Ainsi, un continuum de données peut être créé entre l'imagerie TEP *in vivo*, l'autoradiographie, la microscopie et les données transcriptomiques, afin de mieux comprendre le signal TEP issu de [¹¹C]BU99008 en tant que biomarqueur de la réactivité astrocytaire.

Vers les études cliniques

Compte tenu du rôle central des astrocytes dans les conditions physiologiques et pathologiques, l'identification de biomarqueurs de la réactivité astrocytaire permettrait de mieux comprendre l'implication des astrocytes dans les processus pathologiques, et d'évaluer des stratégies thérapeutiques dirigées contre l'astrocyte réactif. Récemment, des études cliniques ont présenté le radioligand [¹¹C]BU99008 comme un biomarqueur de la réactivité astrocytaire précoce dans les maladies neurodégénératives. Cependant, il n'existe que peu de données disponibles sur sa cible, I2BS, et sur les caractéristiques des astrocytes réactifs ciblés par ce radioligand. Pour y répondre, nous proposons une stratégie qui permet de coupler les caractéristiques de liaison entre le radioligand et sa cible à l'expression de la cible *in vivo*. Ces études précliniques doivent permettre de valider les biomarqueurs, mais également de mieux concevoir les futures études cliniques qui utiliseront ces biomarqueurs.

- [1] A. Verkhratsky, M. Nedergaard, Physiology of astroglia, *Physiol. Rev.*, **2018**, 98(1), p. 239-389.
- [2] C. Escartin *et al.*, Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions, *Nat. Neurosci.*, **2021**, 24(3), p. 312-325.
- [3] W.L. Andriezen, The neuroglia elements in the human brain, *Br. Med. J.*, **1893**, 2(1700), p. 227-230.
- [4] S. Das, Z. Li, A. Noori, B.T. Hyman, A. Serrano-Pozo, Meta-analysis of mouse transcriptomic studies supports a context-dependent astrocyte reaction in acute CNS injury versus neurodegeneration, *J. Neuroinflammation*, **2020**, 17(1), 227.
- [5] J.H. Meyer, J. Braga, Development and clinical application of positron emission tomography imaging agents for monoamine oxidase B, *Front. Neurosci.*, **2022**, 15 (www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.773404).
- [6] M.J. Kumar, J.K. Andersen, Perspectives on MAO-B in aging and neurological disease, *Mol. Neurobiol.*, **2004**, 30(1), p. 77-89.
- [7] E.O. Olufunmilayo, M.B. Gerke-Duncan, R.M.D. Holsinger, Oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative disorders, *Antioxidants*, **2023**, 12(2) (www.mdpi.com/2076-3921/12/2/517).
- [8] Y. Liu, H. Jiang, X. Qin, M. Tian, H. Zhang, PET imaging of reactive astrocytes in neurological disorders, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2022**, 49(4), p. 1275-87.
- [9] F. Tesson *et al.*, Localization of I2-imidazoline binding sites on monoamine oxidases, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270(17), p. 9856-61.
- [10] G. Olmos, R. Alemany, P.V. Escriba, J.A. García-Sevilla, The effects of chronic imidazoline drug treatment on glial fibrillary acidic protein concentrations in rat brain, *Br. J. Pharmacol.*, **1994**, 111(4), p. 997-1002.
- [11] M.A. Mohamed *et al.*, Astroglialosis in aging and Parkinson's disease dementia: a new clinical study with 11C-BU99008 PET, *Brain Commun.*, **2022**, 4(5), fcac199.
- [12] C.A. Parker, D.J. Nutt, R.J. Tyacke, Imidazoline-I2 PET tracers in neuroimaging, *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 24(12), 9787.
- [13] A. Kumar *et al.*, Astroglial tracer BU99008 detects multiple binding sites in Alzheimer's disease brain, *Mol. Psychiatry*, **2021**, 26(10), p. 5833-47.

Chloé JAGER*, doctorante, **Caroline JAN**, ingénieure de recherche, **Olivier BARRET**, chercheur, et **Nadja VAN CAMP**, directrice de recherche, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, MIRCen, Laboratoire des maladies neurodégénératives, Fontenay-aux-Roses.

* chloe.jager@cea.fr

SCF Chemical Biology Symposium 2024

Chemistry meets Biology



A meeting organized by SCF-ChemBio
at the frontiers between Chemistry and Biology

ON THE CAMPUS OF UNIVERSITY PARIS SACLAY
BÂTIMENT HENTI MOISSAN

January 24-26, 2024

<https://scf-chembio2024.com>

Marquages au CO₂ radioactif pour l'imagerie médicale

Résumé De nouvelles réactions chimiques de valorisation du CO₂ permettent aujourd'hui d'accéder à des molécules originales radiomarquées au carbone-11, un isotope de choix pour l'imagerie tomographique par émission de positons. Ces radiotraceurs innovants et jusque-là inaccessibles ouvrent la voie vers l'exploration de nouveaux biomarqueurs impliqués dans de nombreuses pathologies.

Mots-clés Radiomarquage, carbone-11, imagerie TEP, dioxyde de carbone.

Abstract Radioactive CO₂ labelings for medical imaging

New chemical reactions for the valorization of CO₂ enable today to access to original molecules radiolabeled with carbon-11, an isotope of choice to perform positron emission tomography imaging. These innovating radiotracers, inaccessible until present, pave the way to the targeting of new biomarkers involved in a variety of pathologies.

Keywords Radiolabeling, carbon-11, PET imaging, carbon dioxide.

Le carbone-11 : un radio-isotope de choix pour l'imagerie médicale

Le carbone est l'élément prépondérant de la majorité des composés biologiquement actifs issus de l'industrie pharmaceutique. L'une des principales sources de carbone reste le dioxyde de carbone, dont l'utilisation et le recyclage sont des enjeux majeurs de la transition écologique et un challenge de premier plan pour l'humanité en ce XXI^e siècle. La valorisation du CO₂ grâce au développement de nouvelles réactions chimiques et son incorporation dans des molécules d'intérêt biologique devient alors un vaste champ de recherche qui connaît une forte expansion depuis le début des années 2000. Et l'imagerie médicale n'échappe pas à ce paradigme puisque le CO₂ est également la source primaire du carbone-11, radio-isotope émetteur de positons (β^+ de 960 keV) à demi-vie courte ($t_{1/2} = 20,4$ minutes) utilisé pour fabriquer des radiopharmaceutiques pour l'imagerie tomographique à émission de positons (TEP) [1].

La TEP est une technique d'imagerie moléculaire quantitative de très haute sensibilité qui occupe une place de choix dans tous les services de médecine nucléaire du monde pour son efficacité dans le diagnostic oncologique. Elle nécessite l'utilisation d'un radiotraceur, une molécule radioactive associant un vecteur biologique (une molécule possédant des propriétés intéressantes) à un radio-isotope émetteur de positons. Parmi ces radio-isotopes, le carbone-11 est un élément de choix par la prépondérance du carbone dans les molécules

organiques. En effet, le carbone-11 permet de faire du concept de marquage isotopique, c'est-à-dire du marquage d'une molécule sans modification de sa structure chimique et donc de ses propriétés biologiques, une réalité. Potentiellement, tous les médicaments pourraient être radiomarqués au carbone-11, ouvrant alors à l'imagerie TEP une ressource inestimable de molécules aux propriétés biologiques presque infinies pour une très grande variété de biomarqueurs. L'imagerie TEP de ces biomarqueurs devient alors un outil puissant pour le diagnostic précoce, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, le suivi thérapeutique ou encore le développement de nouveaux médicaments [2].

Malheureusement, les applications du carbone-11 sont aujourd'hui limitées par sa courte demi-vie, mais surtout par la faible diversité des techniques chimiques de radiomarquage disponibles. En effet, le [¹¹C]CO₂ qui est la source primaire de carbone-11 (voir encadré figure 1) est une molécule thermodynamiquement stable sur le plan chimique, ce qui rend son introduction directe dans des molécules complexes particulièrement difficile. La méthode la plus fréquemment employée consiste à transformer le [¹¹C]CO₂ en agent de méthylation comme l'iodure de méthyle ([¹¹C]CH₃I) ou le triflate de méthyle ([¹¹C]CH₃OTf) (encadré figure 1). Ces procédés multi-étapes sont chronophages (10-15 minutes), un inconvénient de taille pour l'utilisation d'un radio-isotope à demi-vie courte. De plus, cette approche par méthylation ne permet d'introduire l'atome de carbone-11 que sous la forme d'un groupe-méthyle sur un hétéroatome comme l'oxygène, l'azote

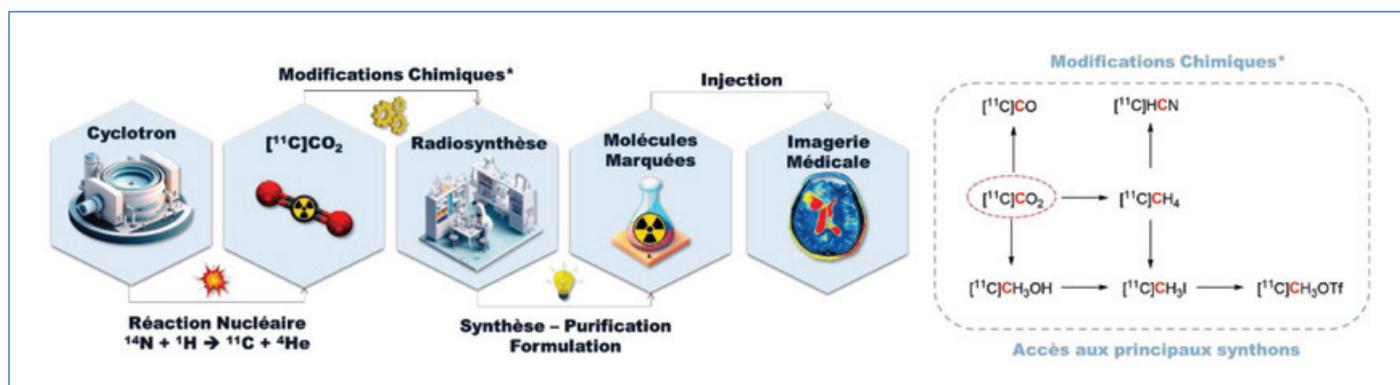


Figure 1 - La vie d'un radiotraceur marqué au carbone-11 depuis la production du radio-isotope en cyclotron jusqu'à son utilisation en imagerie médicale.

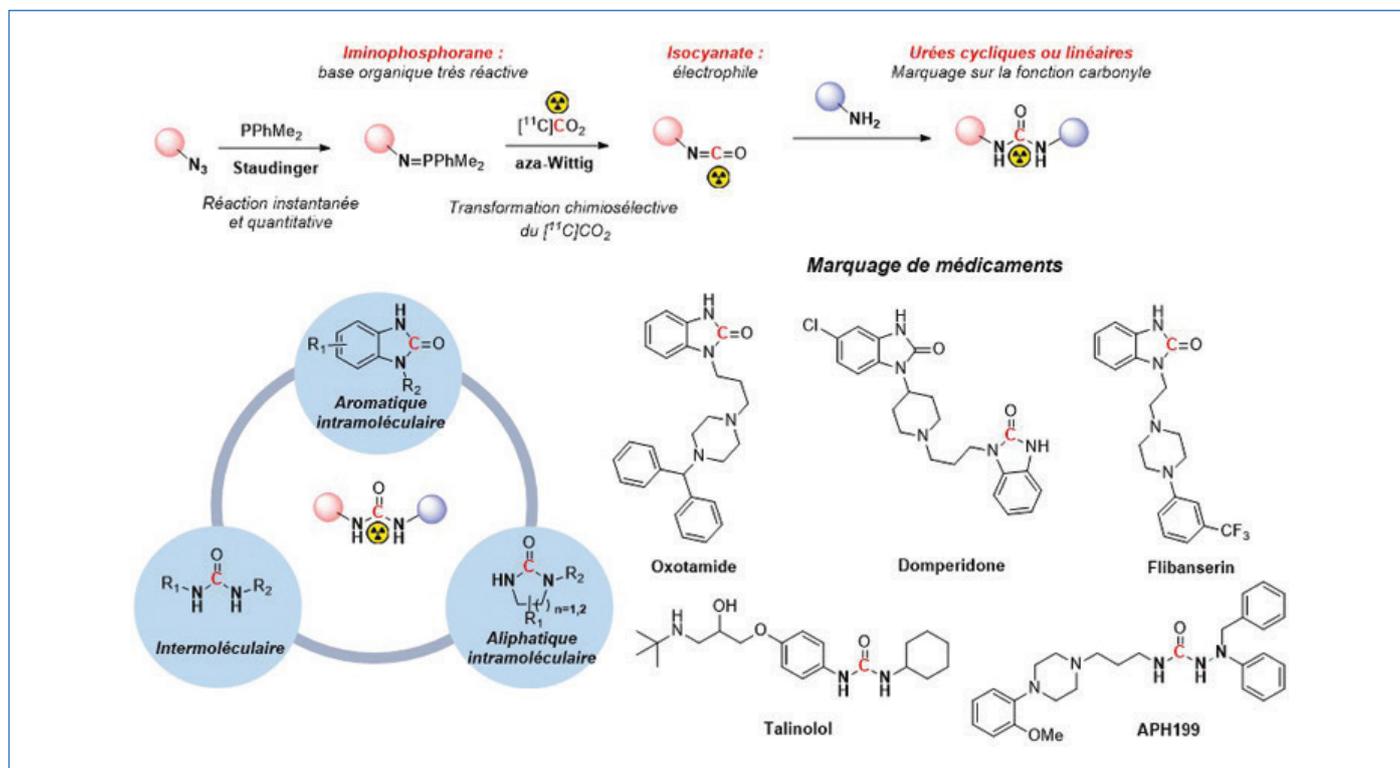


Figure 2 - La réaction tandem Staudinger/aza-Wittig permet de piéger le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ pour former des urées aromatiques et aliphatiques, cycliques ou linéaires, radiomarquées au niveau de la fonction carbonyle.

ou le soufre, limitant drastiquement l'éventail de radiopharmaceutiques disponibles pour l'imagerie TEP. Bien qu'il existe des alternatives à la méthylation, celles-ci sont rarement utilisées car elles demandent le plus souvent des conditions de réaction chimique dures (hautes températures, utilisation d'additifs chimiques agressifs, pH extrêmes) non compatibles avec des molécules biologiquement actives complexes [3]. Le développement de nouvelles méthodologies capables de transformer rapidement le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ pour l'introduire dans des structures chimiques complexes en une seule opération serait alors extrêmement bénéfique pour diversifier la palette de radiotraceurs marqués au carbone-11 disponibles pour l'imagerie TEP.

Dans ce domaine, les travaux menés en collaboration entre deux laboratoires du CEA, le Service de chimie bioorganique et de marquage (SCBM) et le Service hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), ont permis de nombreuses avancées dans le domaine du radiomarkage au carbone-11 par le développement de méthodes innovantes, rapides et en conditions douces d'utilisation du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Ces méthodes ont permis de synthétiser de nouveaux radiotraceurs, médicaments marqués isotopiquement et dont certains ont pu être utilisés en imagerie TEP préclinique *in vivo*.

Main dans la main ! Le tandem Staudinger/aza-Wittig pour piéger le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

La formation d'isocyanates ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{O}$) en tant qu'intermédiaires réactionnels revêt une importance capitale dans l'accès à des motifs fonctionnels d'intérêt tels que les fonctions urée ou carbamate. L'accès à cet intermédiaire réactionnel pour des méthodes de marquage au carbone-11 repose couramment sur le piégeage de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ par une amine, suivi d'une réaction de déshydratation selon des conditions de type Mitsunobu ou par utilisation de POCl_3 [4]. Cependant, il est

important de souligner la faible tolérance de ces méthodes à une diversité de groupements fonctionnels. Grâce à la réactivité intrinsèque générée par la nucléophilie de l'azote des iminophosphoranes ($\text{N}=\text{P}$), ces derniers démontrent une capacité à réagir avec le carbone électrophile du CO_2 selon une réaction de type aza-Wittig, donnant accès à la fonction isocyanate de façon chimiosélective et avec des rendements élevés. Ainsi, cette méthode a rendu possible l'accès à de nombreux motifs à fonction carbonyle arborant une position optimale pour un marquage isotopique au carbone-11.

Urées cycliques et linéaires

La fonction urée est fréquemment rencontrée au sein de divers composés d'intérêt pharmaceutique. Néanmoins, malgré sa pertinence avérée, les méthodes permettant son radiomarkage au carbone-11 demeurent actuellement limitées et montrent une compatibilité fonctionnelle restreinte. Historiquement, l'introduction du carbone-11 dans cette fonction reposait sur l'utilisation de ^{11}C -phosgène, une substance hautement toxique nécessitant l'utilisation d'équipements spéciaux qui limitent son utilisation à seulement quelques laboratoires dans le monde [5].

Par conséquent, en raison de cette nécessité évidente de développer des alternatives plus accessibles pour la radiosynthèse d'urées diversement substituées, une réaction tandem Staudinger/aza-Wittig a été développée pour permettre d'accéder à diverses urées cycliques [6] et linéaires [7] radiomarquées au carbone-11 en présence d'une phosphine et de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (figure 2). En effet, la réaction de Staudinger entre un azoture aromatique ou aliphatique et la diméthylphénylphosphine – la phosphine représentant le meilleur compromis entre réactivité et facilité d'utilisation – produit instantanément et quantitativement un iminophosphorane, une puissante base organique capable de piéger le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. S'en suit une réaction intramoléculaire d'aza-Wittig menant à la

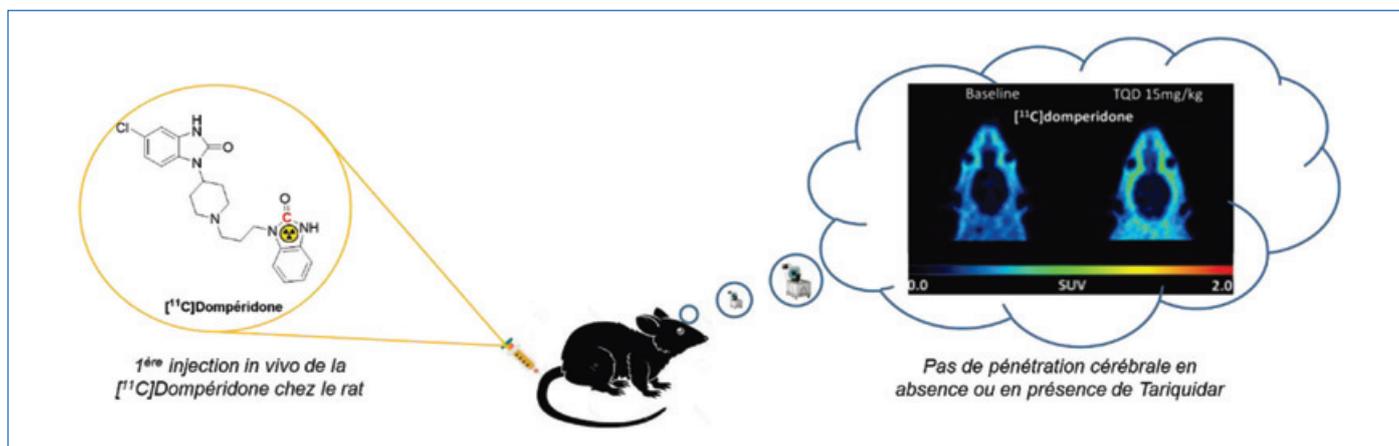


Figure 3 - Imagerie TEP cérébrale de la [^{11}C]dompéridone chez le rat en présence ou en absence de tariquidar, un inhibiteur de la P-gp.

formation d'un isocyanate marqué au carbone-11. La réaction d'une amine sur cet isocyanate, de façon intra- ou intermoléculaire, conduit à la formation d'une librairie de molécules marquées au carbone-11, avec des rendements allant de 40 à 99 % en des temps records (< 5 minutes) compatibles avec la courte demi-vie de l'isotope. Réalisée dans des conditions douces, cette réaction tandem a également permis le radiomarquage de médicaments complexes comme la dompéridone (antiémétique) ou l'oxatomide (antihistaminique) et également d'un peptide.

Application à l'imagerie TEP

Grâce aux excellents résultats obtenus avec cette réaction tandem Staudinger/aza-Wittig, la dompéridone (Motilium®), un antiémétique largement prescrit dans le monde, a pu être radiomarkée au carbone-11 pour la première fois [8]. La dompéridone possède des effets secondaires cérébraux rares mais graves à cause de son affinité pour les récepteurs dopaminergiques D2. Elle est aussi un substrat de la P-glycoprotéine (P-gp), une protéine d'efflux située au niveau de la barrière hémato-encéphalique et protégeant en temps normal le cerveau d'une exposition à ce médicament. Cependant, des interactions médicamenteuses avec des inhibiteurs de cette P-gp pourraient être responsables des effets secondaires cérébraux de la dompéridone. L'imagerie TEP de la [^{11}C]dompéridone a alors permis d'étudier la pharmacocinétique du passage cérébral de ce médicament *in vivo* chez le rat en présence de tariquidar (TQD), un inhibiteur de la P-gp (figure 3). Cette étude a permis de démontrer que, contrairement à une idée reçue, la dompéridone n'est pas sensible à l'inhibition de la P-gp, suggérant que les effets secondaires cérébraux observés avec ce médicament ne sont pas dus à un défaut de fonctionnement de cette protéine d'efflux.

Le cas des carbamates

Moins nucléophile que l'azote, l'oxygène de la fonction alcool peut tout de même réagir avec un isocyanate pour former un carbamate, une fonction également présente dans de nombreuses molécules biologiquement actives [9]. En particulier, les carbamates cycliques sont relativement représentés en raison de leur stabilité métabolique notable. L'application de la réaction tandem Staudinger/aza-Wittig à des azotures hydroxylés en présence de diméthylphénylphosphine et de [^{11}C]CO₂ a permis d'étendre la portée de cette séquence à la radiosynthèse de carbamates cycliques à cinq ou six chaînons marqués au carbone-11 sur la fonction carbonyle [10].

Tout comme pour la formation d'urées, de très bons rendements sont obtenus (50-80 %) pour la plupart des substrats, qu'ils soient aromatiques ou aliphatiques. Cette réaction tandem a donc été également appliquée à la radiosynthèse de médicaments complexes comme la chlorzoxazone (relaxant musculaire) ou le fenspiride (bronchodilatateur).

Et la lumière fut ! Photoréduction du [^{11}C]CO₂ pour des réactions de carbonylation

Le radiomarquage au carbone-11 de la fonction carbonyle est un enjeu majeur pour le développement de nouveaux radiotraceurs innovants pour l'imagerie TEP. Si la réaction tandem Staudinger/aza-Wittig permet d'obtenir des urées et carbamates radiomarkés, les réactions de carbonylation utilisant du monoxyde de carbone (CO) sont un outil inestimable pour fabriquer des fonctions carbonyles de type aldéhyde, cétone, ester, amide, etc. [11].

Cependant, la réduction du [^{11}C]CO₂, source primaire de carbone-11 produite en cyclotron, en [^{11}C]CO n'est pas triviale, bien qu'il existe des méthodes de réduction à très hautes températures ou via l'utilisation de réactifs disilylés [12]. Dans le but de développer une méthode rapide, efficace et universellement applicable à tous les laboratoires pour la réduction du [^{11}C]CO₂ en [^{11}C]CO, une méthode photochimique a été développée, tirant à la fois profit des propriétés électrochimiques des complexes de rhénium carbonylés et des propriétés des complexes de ruthénium en tant que photosensibilisateur (figure 4). Ainsi, ce duo de complexes métalliques, en présence de BIH (1,3-diméthyl-2-phénylbenzimidazole) comme donneur d'électrons et de phénol comme source de protons, a permis, sous irradiation de lumière bleue et en conditions douces (température ambiante, pression atmosphérique), de réaliser la réduction de [^{11}C]CO₂ en [^{11}C]CO en 5 minutes et avec une conversion de 30 % comparable aux meilleures méthodes existantes jusqu'alors [13]. Une élimination instantanée et sélective du [^{11}C]CO₂ restant par passage sur une garde de soude permet d'obtenir du [^{11}C]CO de très haute pureté (> 99 %). Ce dernier peut alors être utilisé dans des réactions de carbonylation comme le démontre la preuve de concept réalisée par amino-carbonylation catalysée au palladium ayant permis la radiosynthèse du [^{11}C]N-hexyl-4-méthoxybenzamide marqué sur la fonction carbonyle. Le radiotraceur a été obtenu avec un bon rendement global de 25 % à partir du [^{11}C]CO₂ et une activité molaire de 30 GBq/μmol compatible avec une utilisation *in vivo*.

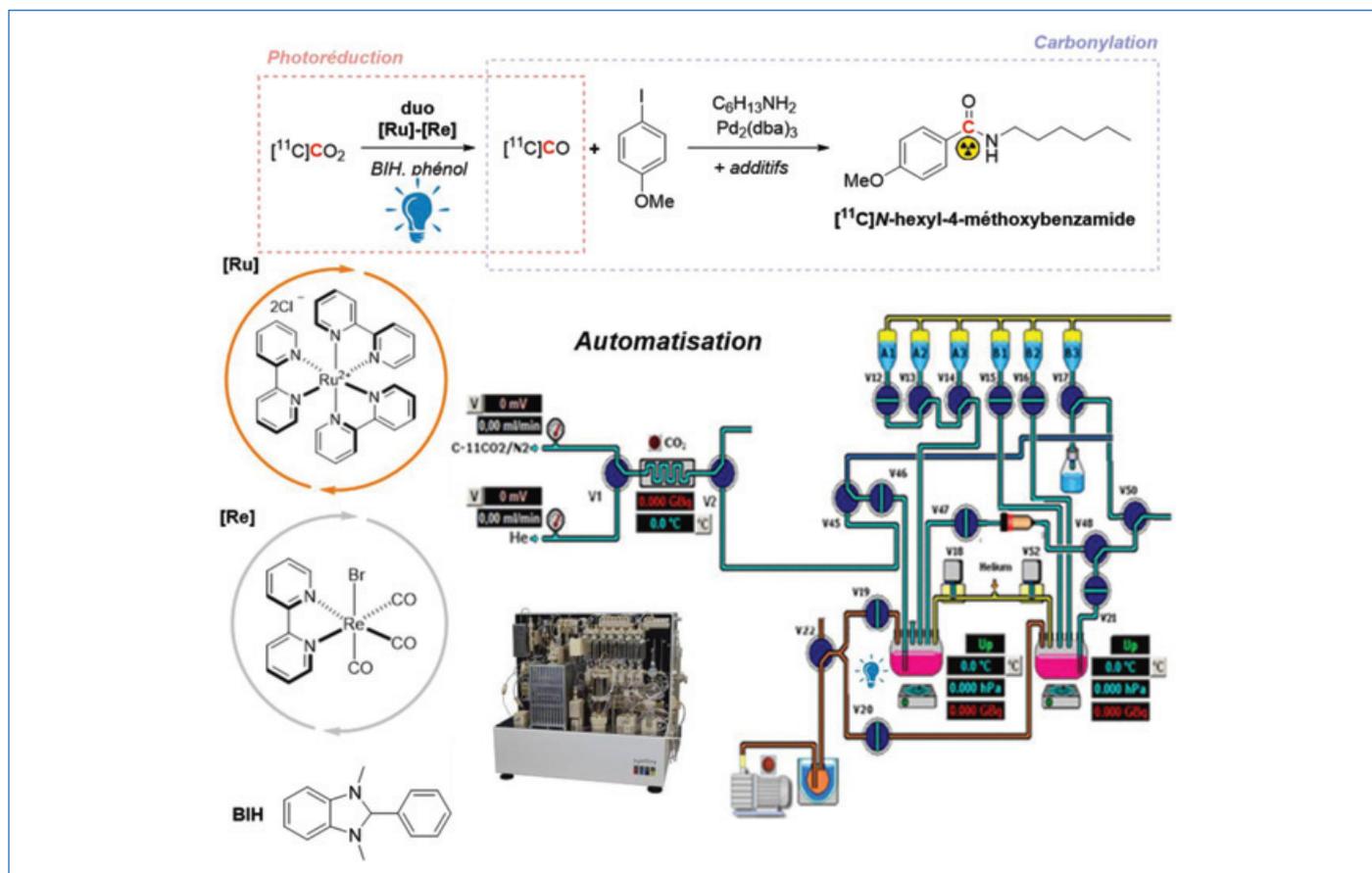


Figure 4 - Photoréduction du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ assistée par des complexes de rhénium et ruthénium pour des réactions de radiocarbonylation au carbone-11.

L'ensemble du procédé a pu être automatisé pour offrir une bonne reproductibilité et permettre à d'autres laboratoires de radiochimie d'appliquer cette méthode innovante.

Un changement radical ? Réactions de carboxylation photo-induites

Le CO_2 est un réactif permettant aussi l'introduction de la fonction acide carboxylique grâce à des réactions de carboxylation, le plus souvent par un mécanisme à deux électrons. Les procédés faisant appel à l'emploi du radical anion $\text{CO}_2^{\cdot-}$ demeurent quant à eux peu fréquents en raison du haut potentiel de réduction du CO_2 ($E_0 = -2,21$ V/électrode au calomel saturée dans le DMF), rendant sa formation particulièrement difficile. Cependant, des avancées récentes ont permis de mettre en lumière la génération de cet intermédiaire dans des conditions douces par réaction photocatalytique entre un sel de formate, un photocatalyseur et un thiol permettant le transport d'hydrogène entre les différents réactifs [14]. L'accès au radical anion $\text{CO}_2^{\cdot-}$ et son utilisation en tant qu'espèce radicalaire nucléophile pour l'introduction de la fonction acide carboxylique se sont alors largement popularisés. Néanmoins, l'application de ces mécanismes mono-électroniques au $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ pour le radiomarquage au carbone-11 reste inexplorée.

Ainsi, dans l'optique de transposer les résultats existants à la chimie du carbone-11, la génération *in situ* du radical anion radioactif $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2^{\cdot-}$ a été réalisée grâce à un équilibre redox entre le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ radioactif produit par le cyclotron et du $\text{CO}_2^{\cdot-}$ non radioactif (figure 5). Ce dernier est généré par réaction photochimique sous lumière bleue entre du formate de potassium et le 4DPAIPN, un photocatalyseur (PC) organique.

L'équilibre entre les deux espèces est atteint en quelques minutes et l'utilisation d'un excès de formate de potassium permet d'augmenter la quantité de radical anion radioactif $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2^{\cdot-}$ formé. Ainsi, ce dernier peut réagir dans des réactions d'hydrocarboxylation d'alcènes par une addition de Giese dans un procédé « one-pot » permettant d'obtenir une bonne conversion radiochimique (39 %) sur un composé modèle [15].

Une fois automatisée, cette réaction d'hydroxycarboxylation photo-induite a permis d'obtenir plusieurs médicaments marqués au carbone-11 comme un dérivé de l'ibrutinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase de Burton, ou l'oxaprozine, un anti-inflammatoire non stéroïdien déjà radiomarké au carbone-11 en deux étapes via un réactif de Grignard [16]. Si l'utilisation d'un large excès de formate de potassium (et donc de CO_2 non radioactif) par rapport au $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ n'a pas d'influence négative (au contraire) sur le rendement de la réaction, elle dégrade en revanche l'activité molaire (la quantité de radioactivité par rapport au nombre de mole) du radiotraceur. Par exemple, la $[^{11}\text{C}]\text{oxaprozine}$ est obtenue avec une activité molaire de 74 MBq/ μmol , environ 1 000 fois plus faible qu'un radiotraceur standard pour des applications en imagerie. Néanmoins, en fonction du biomarqueur ciblé ou de l'objectif de l'étude d'imagerie, une activité molaire élevée n'est pas forcément nécessaire. Comme preuve de concept de la faisabilité d'injection *in vivo* d'un radiotraceur produit par cette méthode de marquage, la biodistribution de la $[^{11}\text{C}]\text{oxaprozine}$ a été réalisée par imagerie TEP *in vivo* chez la souris. Cette étude confirme l'élimination hépatobiliaire connue pour ce médicament, ainsi que sa faible distribution extravasculaire dans le cerveau et la plupart des organes périphériques.

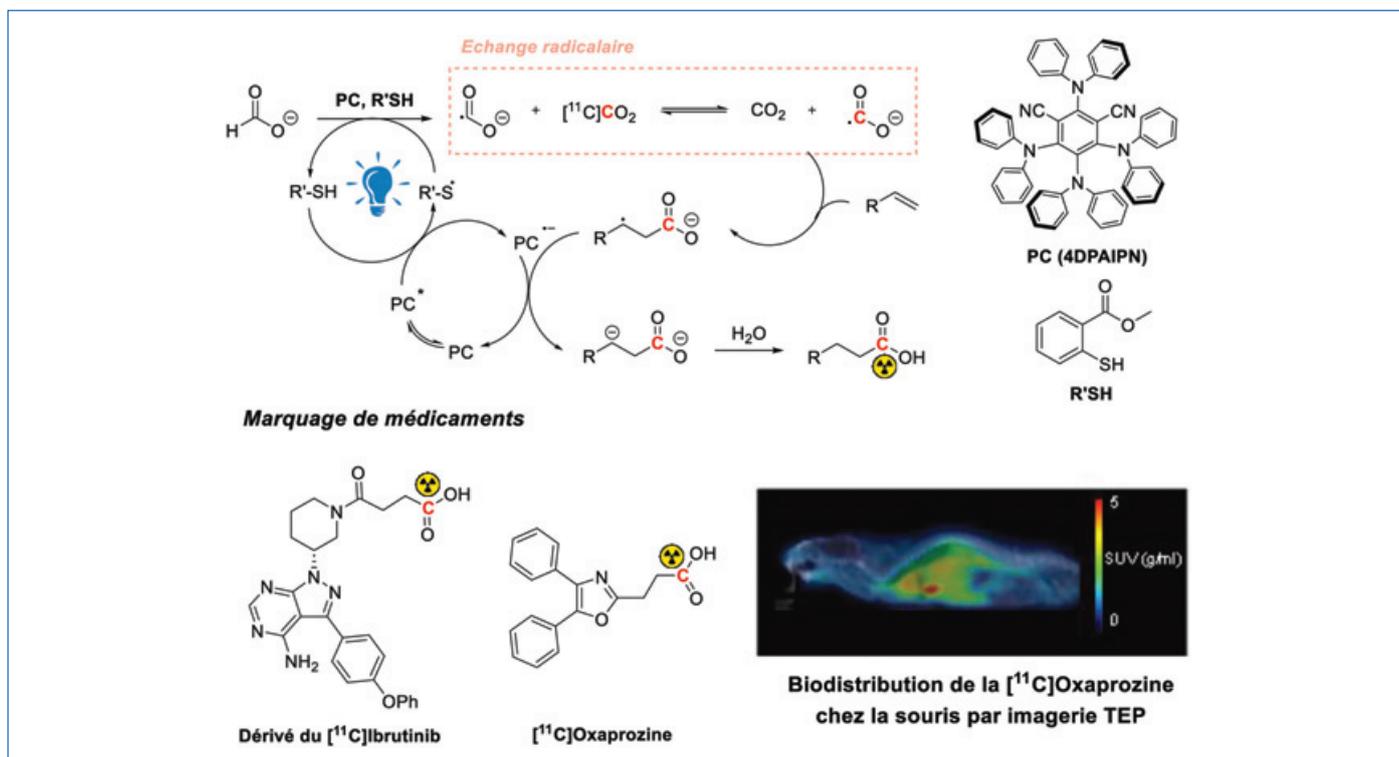


Figure 5 - Formation du radical-anion $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2^{\cdot-}$ par échange radicalaire photo-induit pour la carboxylation d'alcènes. Application à la radiosynthèse de la $[^{11}\text{C}]\text{oxaprozine}$ dont la biodistribution a été réalisée par imagerie TEP *in vivo* chez la souris.

C'est quoi la suite ?

Le développement de nouvelles méthodes de marquage originales réalisé en collaboration entre le CEA-SCBM et le CEA-SHFJ a permis d'exploiter le potentiel du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, source primaire de carbone-11 produit en cyclotron. Malgré la faible réactivité de ce gaz radioactif, ces méthodes tirant parti du caractère électrophile du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ ont permis de réaliser des marquages au carbone-11 rapides, efficaces et en conditions douces pour accéder à de nouveaux radiotraceurs jusque-là inatteignables avec les méthodes standards de la littérature. Ces approches ont été automatisées pour mener à des procédés robustes et reproductibles dans n'importe quel centre de radiochimie. Leur utilité a été démontré dans des applications à l'imagerie TEP *in vivo*.

Il reste néanmoins de nombreux challenges pour la chimie du carbone-11 pour laquelle certains verrous résistent. En particulier autour de la synthèse de précurseurs secondaires du carbone-11. En effet, s'il existe plusieurs approches pour la synthèse du monoxyde de carbone $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ et son application dans des réactions de carbonylation, la fabrication de l'ion cyanure $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ pour l'incorporation de la fonction nitrile ou encore du cation trifluorométhane $[^{11}\text{C}]\text{CF}_3^+$ reste à explorer bien que de récentes approches soient prometteuses [17-18]. Ces motifs chimiques souvent présents dans les molécules d'intérêt biologique permettraient d'élargir encore l'éventail des radiotraceurs disponibles pour l'imagerie TEP.

- [1] N.S. Goud *et al.*, Carbon-11: radiochemistry and target-based PET molecular imaging applications in oncology, cardiology, and neurology, *J. Med. Chem.*, **2021**, 64(3), p. 1223-59.
 [2] G. Boscutti, M. Huihan, J. Passchier, Use of carbon-11 labelled tool compounds in support of drug development, *Drug Discov. Today Technol.*, **2017**, 25, p. 3-10.
 [3] A. Pees, M. Chassé, A. Lindberg, N. Vasdev, Recent developments in carbon-11 chemistry and applications for first-in-human PET studies, *Molecules*, **2023**, 28(3), p. 931.
 [4] A.A. Wilson, A. Garcia, S. Houle, O. Sadovski, N. Vasdev, Synthesis and application of isocyanates radiolabeled with carbon-11, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17(1), p. 259-264.
 [5] T. Fukumura, $[^{11}\text{C}]\text{phosgene}$: synthesis and application for development of PET radiotracers, *Nucl. Med. Biol.*, **2021**, 92, p. 138-148.

- [6] A. Del Vecchio *et al.*, Late-stage isotopic carbon labeling of pharmaceutically relevant cyclic ureas directly from CO_2 , *Angew. Chem.*, **2018**, 130(31), p. 9892-96.
 [7] V. Babin *et al.*, A general procedure for carbon isotope labeling of linear urea derivatives with carbon dioxide, *Chem. Commun.*, **2021**, 57(54), p. 6680-83.
 [8] L. Breuil *et al.*, Comparison of the blood-brain barrier transport and vulnerability to P-glycoprotein-mediated drug-drug interaction of Domperidone versus metoclopramide assessed using *in vitro* assay and PET imaging, *Pharmaceutics*, **2022**, 14(8), 1658.
 [9] M.D. Delost, D.T. Smith, B.J. Anderson, J.T. Njardarson, From oxiranes to oligomers: architectures of U.S. FDA approved pharmaceuticals containing oxygen heterocycles, *J. Med. Chem.*, **2018**, 61(24), p. 10996-1020.
 [10] A. Del Vecchio *et al.*, Carbon isotope labeling of carbamates by late-stage $[^{11}\text{C}]$, $[^{13}\text{C}]$ and $[^{14}\text{C}]$ carbon dioxide incorporation, *Chem. Commun.*, **2020**, 56(78), p. 11677-680.
 [11] J.-B. Peng, H.-Q. Geng, X.-F. Wu, The chemistry of CO: carbonylation, *Chem*, **2019**, 5(3), p. 526-552.
 [12] J. Eriksson, G. Antoni, B. Långström, O. Itsenko, The development of ^{11}C -carbonylation chemistry: a systematic view, *Nucl. Med. Biol.*, **2021**, 92, p. 115-137.
 [13] S. Monticelli *et al.*, Unlocking full and fast conversion in photocatalytic carbon dioxide reduction: applications in radio-carbonylation, *Nat. Commun.*, **2023**, 14, art 4451.
 [14] W. Zhang *et al.*, Arylcarboxylation of unactivated alkenes with CO_2 via visible-light photoredox catalysis, *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1), art. 3529.
 [15] A. Malandain *et al.*, Carbon dioxide radical anion by photoinduced equilibration between formate salts and $[^{11}\text{C}]$, $[^{13}\text{C}]$, $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$: application to carbon isotope radiolabeling, *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(30), p. 16760-770.
 [16] V. Forgács *et al.*, Radiosynthesis and preclinical investigation of ^{11}C -labelled 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime ($[^{11}\text{C}]\text{SZV 1287}$), *ChemMedChem*, **2020**, 15(24), p. 2470-76.
 [17] X. Wu *et al.*, ^{11}C , ^{12}C , and ^{13}C -cyanation of electron-rich arenes via organic photoredox catalysis, *Chem*, **2023**, 9(2), p. 343-362.
 [18] M.B. Haskali, V.W. Pike, $[^{11}\text{C}]\text{fluoroform}$, a breakthrough for versatile labeling of PET radiotracer trifluoromethyl groups in high molar activity, *Chem. Eur. J.*, **2017**, 23(34), p. 8156-60.

Alexandre HAUWELLE^{1,2}, doctorant, Davide AUDISIO², ingénieur-chercheur, et Fabien CAILLÉ*¹, ingénieur-chercheur.

¹ Université Paris-Saclay, Inserm, CNRS, CEA, Laboratoire d'imagerie biomédicale multimodale Paris-Saclay (BioMaps), Orsay.

² Université Paris-Saclay, CEA, Service de chimie bio-organique et marquage (SCBM), DMTS, Gif-sur-Yvette.

* fabien.caille@cea.fr

L'immunoTEP, l'imagerie médicale du futur ?

Résumé L'immunoTEP vit actuellement un tournant technologique avec le développement de nouveaux outils issus de la chimie bioorthogonale. Les outils chimiques tels que des réactions de ligations rapides, efficaces et utilisables *in vivo* ont permis de développer des approches novatrices qui visent à améliorer l'imagerie TEP en termes de qualité du diagnostic mais aussi de dosimétrie pour le patient.

Mots-clés Imagerie médicale, immunoTEP, chimie bioorthogonale, agent de clairance, agent de masquage, pré-ciblage.

Abstract ImmunoPET, medical imaging of the future?

ImmunoPET is currently at a technological turning point with the development of new tools based on bioorthogonal chemistry. Chemical tools such as ligation reactions that are fast, efficient and that can be used *in vivo* have enabled the development of innovative approaches that will significantly improve PET imaging in terms of both diagnostic quality and patient dosimetry.

Keywords Medical imaging, immunoPET, bioorthogonal chemistry, clearing agent, masking agent, pre-targeting.

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale non invasive et dynamique. Elle permet de visualiser en trois dimensions un récepteur ou une activité métabolique d'un tissu grâce à l'utilisation d'un radiotracer. Le radiotracer se compose d'un vecteur moléculaire qui a un ciblage spécifique *in vivo* (petite molécule, peptide, protéine, anticorps...) et du radioisotope émetteur de positons (carbone-11, fluor-18, zirconium-89, gallium-68...). Au cours de la désintégration, les positons émis rencontrent un électron du milieu provoquant « l'annihilation » de ces particules et l'émission d'énergie sous forme de deux rayons gamma (photons d'énergie 511 keV) émis à 180° l'un de l'autre, détectés par la couronne des détecteurs des caméras placée autour du patient. C'est la combinaison des trajectoires parcourues par ces photons qui permet de localiser leur émission et de calculer la concentration en radiotracer en chaque point. On obtient par contraste une image faisant apparaître les variations de concentrations du radiotracer dans l'organisme permettant de faire un diagnostic du patient (figure 1).

L'un des radiotraceurs les plus couramment utilisés est le 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (¹⁸F-FDG). Le ¹⁸F-FDG est un analogue du glucose rendu radioactif par l'introduction d'un atome de fluor-18 ($T_{1/2} = 109,8$ min).

En oncologie, le ¹⁸F-FDG a révolutionné le diagnostic, la stratification et le suivi thérapeutique des patients. Ce radiotracer permet de visualiser l'activité cellulaire, et notamment le fonctionnement anormal du métabolisme énergétique (figure 1).

Ainsi les cellules cancéreuses, qui ont une consommation en glucose supérieure à celle des cellules saines, accumuleront davantage de ¹⁸F-FDG et pourront être visualisées sur les images. L'un des avantages d'utiliser le fluor-18 en imagerie TEP est lié à sa période radioactive (ou temps de demi-vie), c'est-à-dire le temps nécessaire pour que la moitié des atomes se désintègrent naturellement. La période du fluor étant de 109,8 minutes, cela permet au patient ayant réalisé une imagerie TEP avec du ¹⁸F-FDG de sortir de son examen avec un taux de radioactivité faible.

Bien que l'utilité du ¹⁸F-FDG en oncologie soit incontestée, ce radiotracer reste limité par le manque de spécificité de l'information obtenue. En effet, si l'image TEP permet de

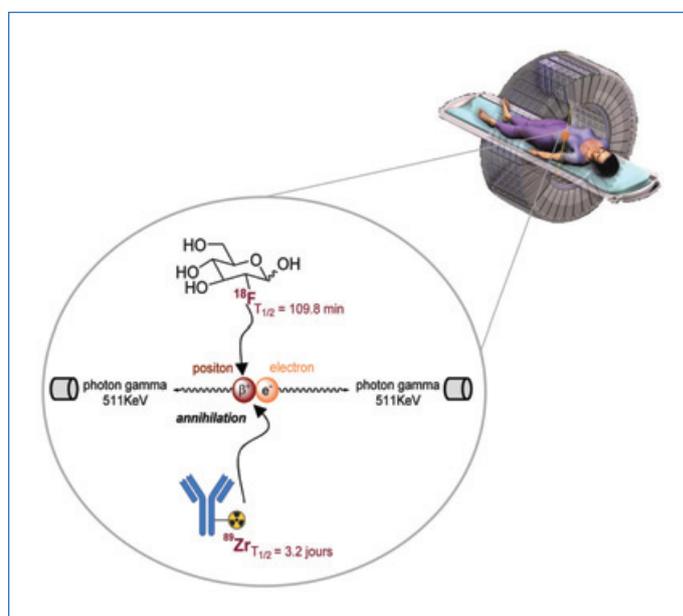


Figure 1 - Principe de la tomographie par émission de positons (TEP) illustré avec le ¹⁸F-FDG et un anticorps marqué au zirconium-89 (⁸⁹Zr).

visualiser un métabolisme anormal du glucose, elle ne permet pas de caractériser des biomarqueurs spécifiques. Dans un contexte émergent de médecine de précision, s'est alors développée l'immunoTEP.

L'immunoTEP, une nouvelle stratégie de radiomarquage

L'immunoTEP consiste à utiliser des anticorps radiomarqués comme vecteur moléculaire ciblant spécifiquement des récepteurs des cellules tumorales, afin d'identifier des signatures moléculaires spécifiques. Cette technique d'imagerie devient un outil pivot pour comprendre le contexte immunitaire d'une tumeur et pour sélectionner les options thérapeutiques les plus appropriées pour chaque patient. Cependant, en raison d'un ciblage imparfait et d'une pharmacocinétique non optimale des anticorps, son potentiel pour un diagnostic de précision du cancer n'a pas encore atteint son optimum.

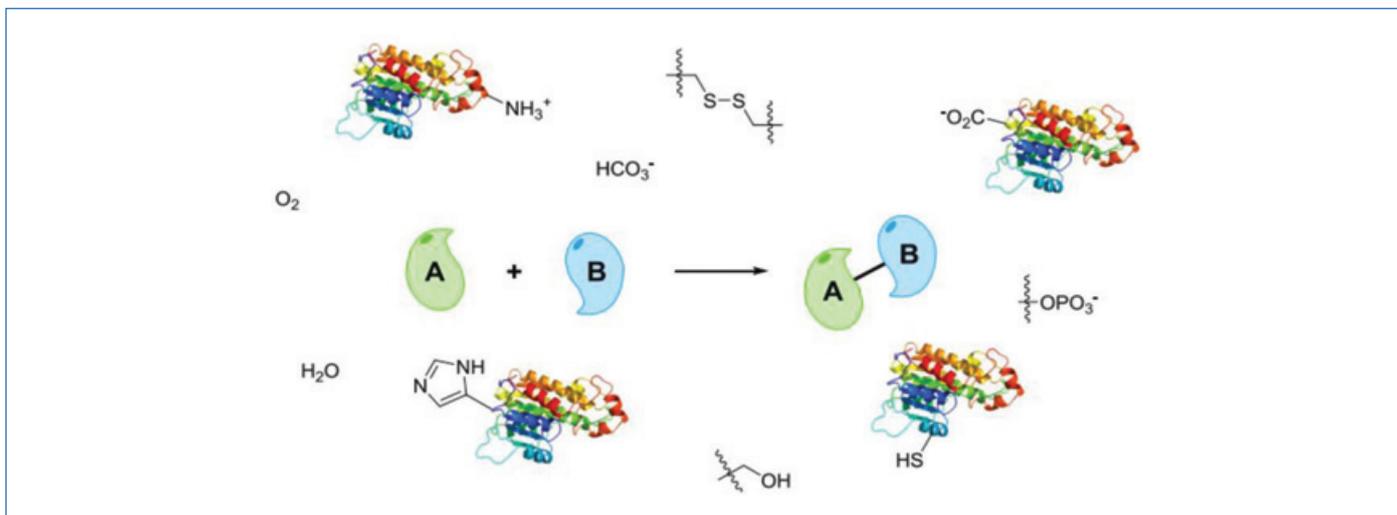


Figure 2 - Illustration d'une réaction bioorthogonale entre deux partenaires A et B.

En effet, seul un pourcentage limité de la dose injectée (généralement < 10 %) atteint sa cible après plusieurs jours du fait de la demi-vie biologique intrinsèquement longue des anticorps dans l'organisme. Ceci est à l'origine d'un bruit de fond persistant en imagerie TEP et rend l'utilisation des anticorps en imagerie incompatible avec la demi-vie du fluor-18.

Pour pallier le problème de la courte demi-vie du fluor-18, le marquage au zirconium-89 (^{89}Zr) est utilisé comme alternative, ce dernier ayant une demi-vie de 3,2 jours. Cependant, l'utilisation du zirconium pose des problèmes de dosimétrie pour le patient et rend l'organisation clinique des examens compliquée puisque les patients doivent réaliser deux visites dans le service de médecine nucléaire, la première pour l'injection de l'anticorps radiomarqué au ^{89}Zr et la seconde, trois à cinq jours plus tard pour l'imagerie.

Pour se diriger vers une médecine personnalisée, propre à chaque cancer et donc à chaque patient, plusieurs stratégies sont mises en œuvre afin d'améliorer l'immunoTEP. Parmi celles-ci, la chimie click et la chimie bioorthogonale, qui ont valu le prix Nobel 2022 à C. Bertozzi, M. Meldal et B. Sharpless, offrent de nombreux espoirs [1]. Ces réactions permettent en effet d'envisager de lier des molécules ou biomolécules *in vivo*, ce qui peut potentiellement trouver des applications importantes dans le domaine de l'immunoTEP.

Les principales réactions bioorthogonales utilisables en immunoTEP

Dans le cas de l'immunoTEP, seules quelques réactions bioorthogonales compatibles avec l'utilisation d'anticorps et applicables *in vivo* ont fait leurs preuves. Dans le cadre de cet article, nous allons nous concentrer sur les réactions de ligations (ou de « click »). La chimie click regroupe l'ensemble des réactions rapides et spécifiques permettant d'assembler des entités pour obtenir des structures plus ou moins complexes. Les prérequis définis par Sharpless [2] pour le développement d'une réaction de ligation sont les suivants : une réaction stéréospécifique, modulable permettant d'accéder à un large spectre de molécules avec des rendements élevés, ne produisant que des sous-produits inoffensifs pouvant être éliminés sans l'utilisation de colonne chromatographique. Le processus de chimie click, quant à lui, doit répondre aux critères suivants : des conditions de réaction simple utilisant des

matières premières et réactifs accessibles, ne nécessitant pas de solvant ou un solvant biocompatible tel que l'eau facile à éliminer. Sur les préceptes de la chimie click se sont greffés ceux de la chimie bioorthogonale.

La chimie bioorthogonale, introduite par C. Bertozzi en 2003 [1], fait référence à l'ensemble des réactions compatibles avec les milieux biologiques (pouvant être faites à pH et température physiologiques), ayant lieu de façon sélective entre deux partenaires réactionnels qui ont la particularité d'être inertes vis-à-vis des nombreuses fonctions chimiques présentes dans ces milieux (figure 2).

La vitesse de réaction est un critère important et une constante cinétique élevée est nécessaire pour permettre de travailler à de faibles concentrations, ce qui est généralement une des contraintes des études *in vivo*. D'autre part, une vitesse considérable permet de favoriser la réaction vis-à-vis d'autres phénomènes pouvant survenir en milieu complexe (métabolisation, élimination rapide, réactions parasites).

Les deux réactions bioorthogonales ayant montré des résultats intéressants dans le domaine de l'immunoTEP sont la réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons (iEDDA, « inverse-electron-demand Diels-Alder ») et la SPSAC (« strain-promoted sydnone-alkyne cycloaddition), découverte de façon concomitante par le groupe de Chin [3] et notre équipe [4] (figure 3).

Parmi les stratégies visant à améliorer le diagnostic en immunoTEP, un focus sur trois approches est présenté dans cet article : le pré-ciblage (« pre-targeting ») des cellules tumorales ; le masquage, destiné à rendre le vecteur moléculaire furtif avant l'étape de radiomarquage bioorthogonal *in vivo* ; et la clairance, visant à favoriser l'élimination du radio-traceur.

Focus 1 : pré-ciblage

La stratégie de pré-ciblage (figure 4), déjà étudiée depuis une trentaine d'années, a pris un nouveau tournant avec les récentes découvertes en chimie bioorthogonale. Le pré-ciblage en immunoTEP consiste à injecter des anticorps ciblant un biomarqueur tumoral (ou de l'environnement immunitaire) ayant été préalablement dérivatisé par une fonction chimique bioorthogonale. L'anticorps n'étant pas radiomarqué, il est possible d'attendre le temps nécessaire pour une bioaccumulation maximale de ce dernier sur le site tumoral. Puis dans un second temps, une molécule radiomarquée (aussi appelée

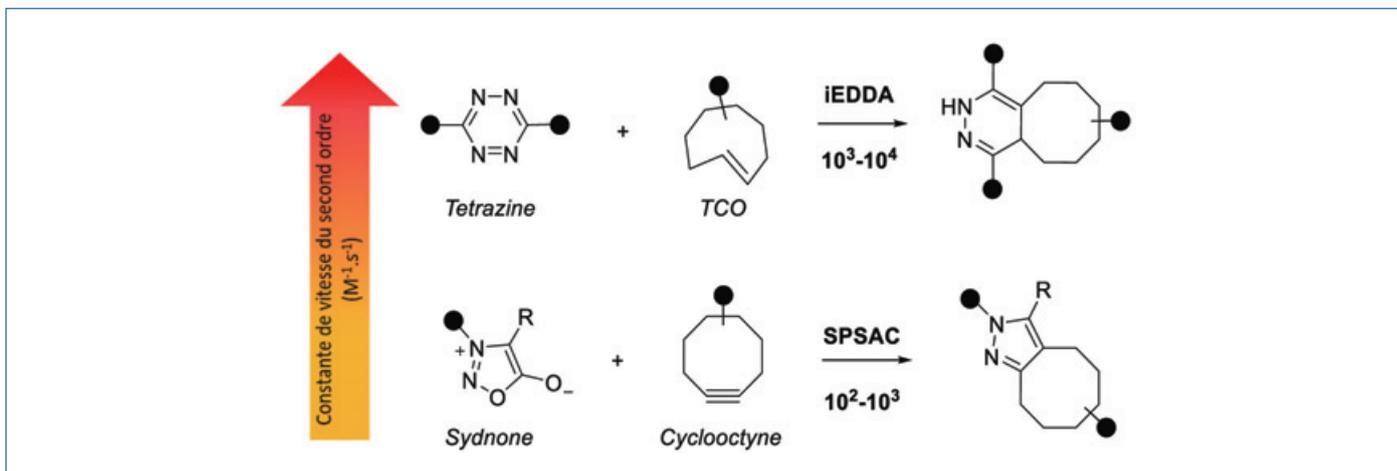


Figure 3 - Réactions de chimie click bioorthogonales utilisées dans le cadre de l'immunoTEP et leurs constantes de vitesse.

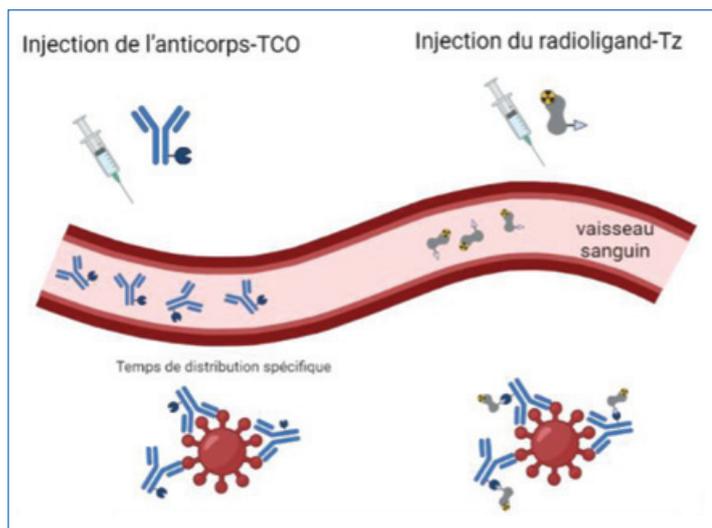


Figure 4 - Illustration de la stratégie de pré-ciblage par la réaction iEDDA. TCO : trans-cyclooctène ; Tz : tétrazine.

effecteur radioactif)⁽¹⁾ possédant la fonction bioorthogonale complémentaire sera injectée et se liera irréversiblement à l'anticorps de façon spécifique. Cette approche en deux séquences est compatible avec la demi-vie du fluor-18 et permet en outre de réduire l'irradiation interne du patient.

• Résultats avec l'iEDDA

La majorité des travaux de pré-ciblage s'articulent autour de l'utilisation de la chimie click. La réaction de ligation la plus efficace *in vivo* est sans aucun doute la réaction iEDDA entre un alcène contraint et une tétrazine déficiente en électron (figure 3), en raison de sa très grande vitesse. Cette réaction possède une cinétique extrêmement rapide, avec des constantes de vitesse de l'ordre de $10^3-10^4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, et une grande efficacité, ce qui explique pourquoi elle est devenue au fil des dix dernières années un outil essentiel pour les chercheurs en immunoTEP.

Les travaux du groupe de Jason Lewis illustrent bien la stratégie de pré-ciblage utilisant une tétrazine portant l'élément radioactif (figure 5, composé 3) et l'anticorps 5B1 sélectif de l'antigène CA19.9 [5-6]. Ils ont notamment comparé la biodistribution et la dosimétrie de l'anticorps 5B1 radiomarqué au ⁸⁹Zr (méthode classique, figure 5, composé 1) et une approche de pré-ciblage utilisant l'iEDDA (figure 5, anticorps 5B1-TCO (composé 2) et [⁶⁴Cu]-tétrazine (composé 3)) dans un modèle

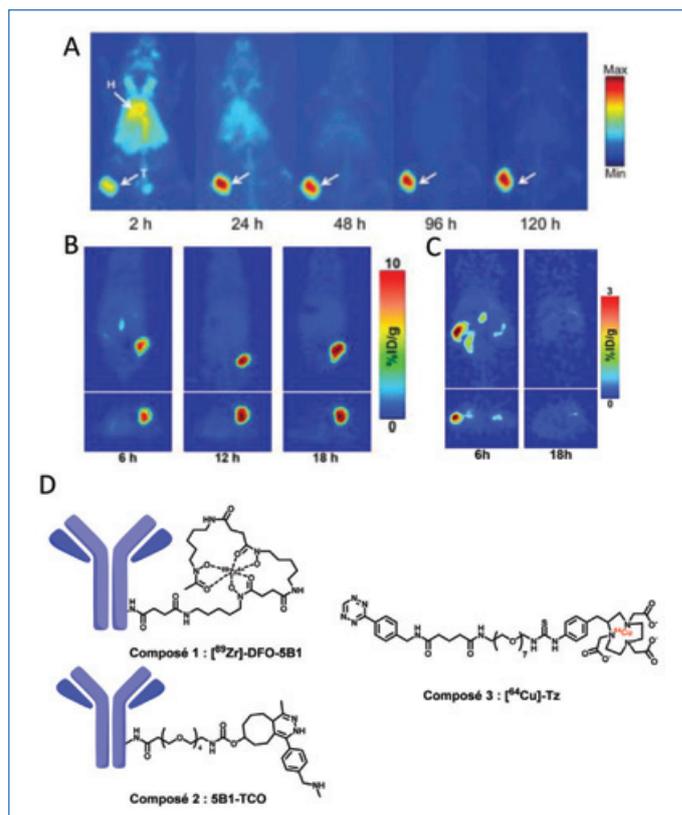


Figure 5 - Images TEP de l'anticorps 5b1 dans un modèle de xénogreffe de cellules BxPC3 chez la souris par approche directe et pré-ciblage. (A) : biodistribution de l'anticorps [89Zr]-DFO-5B1 radiomarqué au ⁸⁹Zr à 2, 24, 48, 96 et 120 h après injection. (B) : imagerie par pré-ciblage de l'anticorps 5B1-TCO à 6, 12 et 18 h après injection de la [⁶⁴Cu]-Tz, 72 h après administration de 5B1-TCO. (C) : contrôle, injection d'une IgG-TCO ne reconnaissant pas l'antigène CA19.9 puis injection 72 h après de la [⁶⁴Cu]-Tz. (D) : structures chimiques des composés étudiés.

de xénogreffes de cellules BxPC3 (adénocarcinome pancréatique).

Dans le cas de l'imagerie TEP par approche classique (figure 5A), la tumeur est visible dès 2 h après injection, mais avec un bruit de fond important au niveau du cœur (noté H, figure 5A) et de l'ensemble du système vasculaire. Ce bruit de fond persiste encore à 24 et 48 h (zones bleu ciel) et le contraste entre la tumeur et les organes non ciblés est optimal aux alentours de 96 h post-injection. Dans le cas des images réalisées par l'approche de pré-ciblage (figure 5B), la tumeur est visible avec un excellent contraste dès 6 h après injection de la tétrazine radiomarquée au ⁶⁴Cu (composé 3). Une image

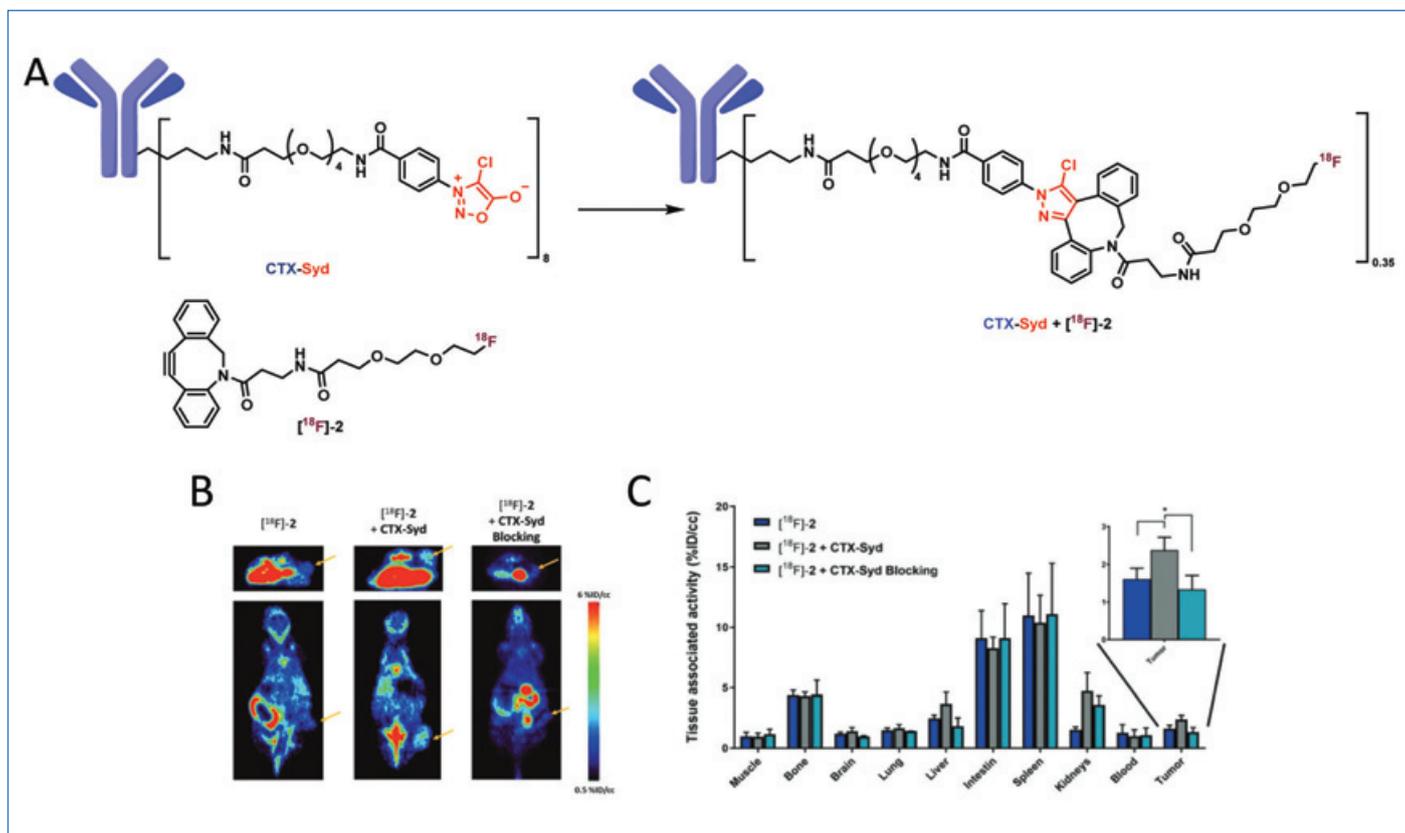


Figure 6 - A) Réaction entre l'anticorps-sydnone (CTX-Syd) et le DBCO-18F. B) Imagerie TEP obtenue avec $[^{18}\text{F}]\text{-2}$ seul, CTX-Syd + $[^{18}\text{F}]\text{-2}$, et $[^{18}\text{F}]\text{-2}$ bloqué par un excès de CTX- chez des souris. La flèche orange indique la localisation de la tumeur. C) Biodistribution en % de dose injectée par cm^3 (%ID/cc) 4 h après injection.

contrôle (figure 5C) utilisant un anticorps IgG-TCO ne ciblant pas l'antigène CA19.9 a été réalisée. L'absence de signal au niveau de la tumeur démontre le ciblage spécifique de l'anticorps 5B1. Ces images montrent clairement le gain en termes de contraste, mais l'analyse quantitative a permis de démontrer également un gain dosimétrique important dans l'approche de pré-ciblage. En effet, la dose reçue corps entier est réduite d'un facteur 25 et même localement d'un facteur 50 pour des organes tels que les poumons ou le foie [6].

Pour optimiser le contraste des images et la détection de la tumeur dans l'approche de pré-ciblage, les auteurs ont également comparé dans cette étude deux délais d'attente (48 et 72 h) entre l'injection de l'anticorps 5B1-TCO (composé 2) et l'injection de la tétrazine radiomarquée (composé 3). Il apparaît que la concentration de radioactivité (%DI/g) est supérieure dans la tumeur après une attente de 72 h (8,2 %DI/g) comparée à 48 h (3,2 %DI/g)⁽²⁾.

Au-delà de la réaction click utilisée et des temps d'injections adaptés, on peut noter que la nature chimique et la pharmacocinétique de la tétrazine utilisée ont une grande importance dans la réaction iEDDA. En effet, une étude exhaustive menée avec plus de 40 tétrazines différentes [7] a permis de déterminer quel paramètre influençait le plus l'efficacité de l'approche de pré-ciblage. À l'issue de ces travaux, les auteurs concluent que pour avoir une réaction click *in vivo* efficace, la constante de vitesse doit être supérieure à $50\,000\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$. Un autre paramètre mis en évidence dans ces mêmes travaux est l'hydrophobicité des réactifs, ici des tétrazines. Les auteurs notent en effet que la diminution de l'hydrophobicité de la tétrazine joue un rôle décisif dans l'efficacité du pré-ciblage, les tétrazines ayant des $\log D_{7,4}$ ⁽³⁾ inférieurs à 3 étant favorables à la réaction click *in vivo*. Ce dernier paramètre est

cohérent, car il est connu que pour avoir une bonne solubilité et perméabilité *in vivo*, le logD doit se situer entre 0 et 3.

• Résultats avec sydnones

Les travaux menés au sein de notre laboratoire ont permis d'évaluer l'utilisation de la réaction SPSAC dans le cadre des approches de pré-ciblage [8]. Cette réaction entre une sydnone et un cyclooctyne possède une constante de réaction de l'ordre de $10^2\text{-}10^3\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$. Bien que cette réaction possède des constantes de vitesse plus faibles que la réaction iEDDA, elle présente l'avantage d'utiliser des partenaires de réaction stables et faciles d'accès. Dans une démarche de preuve de concept, notre groupe a fonctionnalisé un anticorps thérapeutique, le cétuximab (CTX), spécifique des récepteurs EGFR, par des sydnones. De façon parallèle, le laboratoire a synthétisé un alcyne cyclique, le dibenzocyclooctyne (DBCO) radiomarqué au fluor-18.

L'expérience de pré-ciblage consiste alors à injecter l'anticorps-sydnone (CTX-Syd) à une souris porteuse d'une tumeur surexprimant les récepteurs EGFR puis trois jours plus tard, temps nécessaire pour que l'anticorps s'accumule sur le site tumoral, le DBCO marqué au fluor-18 est injecté par voie intraveineuse (figure 6A). Afin de comparer les résultats obtenus avec l'approche de pré-ciblage, différents contrôles sont réalisés. D'une part, le $[^{18}\text{F}]\text{DBCO-}^{18}\text{F}$ ($[^{18}\text{F}]\text{-2}$) est administré seul, et d'autre part une expérience de blocage par injection d'un excès de CTX non dérivatisé est réalisée. Le premier contrôle (figure 6C, $[^{18}\text{F}]\text{-2}$) a pour but de déterminer la biodistribution du cyclooctyne et l'absorption tumorale non spécifique, et permet ainsi de comparer cette dernière à l'absorption tumorale spécifique observée dans l'expérience de pré-ciblage (figure 6C, CTX-Syd + $[^{18}\text{F}]\text{-2}$). On observe dans les deux cas que la biodistribution du cyclooctyne se fait

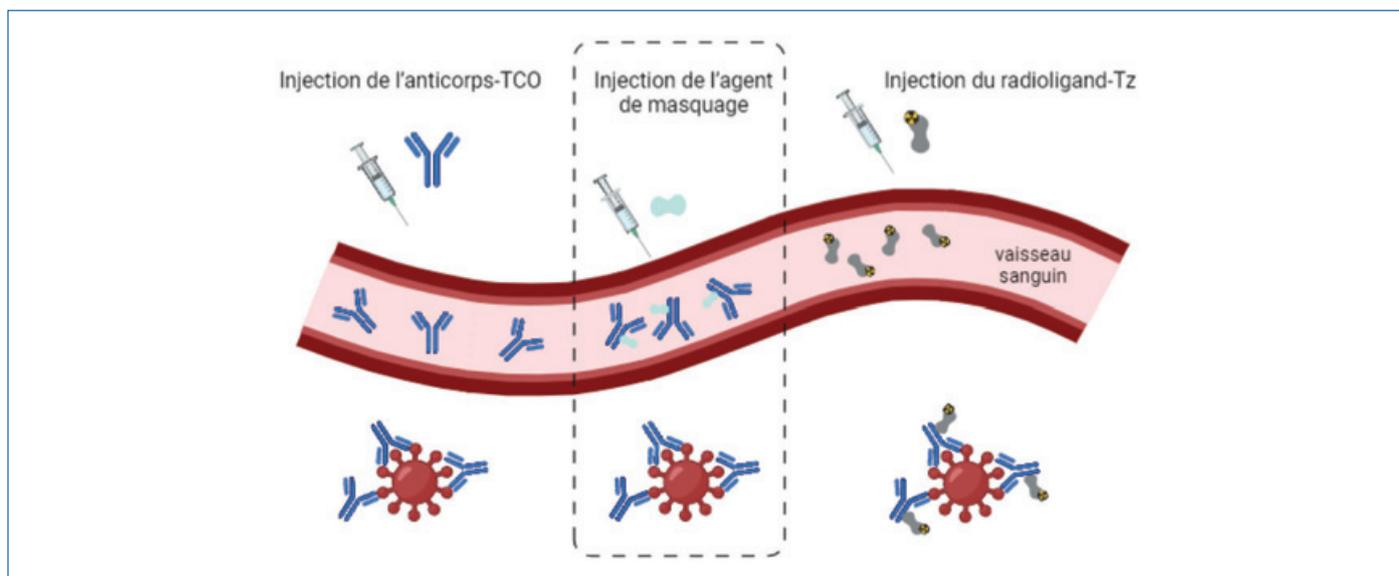


Figure 7 - Stratégie de l'agent de masquage en immunoTEP.

majoritairement au niveau de l'intestin et de la rate. Ces résultats suggèrent qu'indépendamment de la présence de l'anticorps, l'élimination est hépatobiliaire.

L'image obtenue à l'issue de l'expérience de pré-ciblage (CTX-Syd puis [^{18}F]-**2**) permet de mettre en évidence la tumeur (indiquée par la flèche, *figure 6B*) et d'augmenter de façon significative le signal radioactif du fluor-18 au niveau du site tumoral, même si celui-ci reste faible. Il est intéressant de comparer ce dernier résultat avec le deuxième contrôle, lorsque l'anticorps sans la sydnone est injecté en excès par rapport à l'anticorps-sydnone ($[\text{F}^{18}\text{F}]\text{-2} + \text{CTX blocking}$) ; on observe un signal radioactif du fluor-18 significativement plus faible que dans le test de pré-ciblage (*figure 6B*). (Ceci permet de mettre en évidence le marquage spécifique de l'anticorps au niveau du site tumoral et de démontrer que la réaction de ligation SPSAC a bien eu lieu sur le site tumoral. Ces travaux sont donc une preuve de concept pour l'utilisation de la réaction SPSAC dans le cadre d'une approche de pré-ciblage en imagerie TEP.

L'approche de pré-ciblage permet en effet de pallier certaines problématiques rencontrées, notamment en augmentant le contraste de marquage au niveau de la tumeur comparé aux autres tissus périphériques. Mais cette dernière ne permet pas de répondre efficacement aux problèmes de bruit de fond toujours présents en raison d'un ciblage imparfait des anticorps et de leur circulation dans les organes périphériques. Un autre paramètre à prendre en compte est le temps que le patient passe à faire son examen. En effet dans cette approche, il se retrouve être soumis à des temps d'attente de plusieurs jours entre l'injection d'anticorps et de l'agent de marquage. C'est pour cela qu'une nouvelle approche est envisagée permettant la diminution du bruit de fond et de la dosimétrie pour le patient. Il s'agit de développer un agent de clairance ou un agent de masquage.

Focus 2 : masquage

Une deuxième approche, regroupant les notions de pré-ciblage et d'agents de clairance est également au centre d'intenses recherches. Il s'agit de l'utilisation d'un agent de masquage, qui consiste à injecter en amont l'anticorps non marqué capable de se lier par réaction click avec l'effecteur radioactif, puis d'injecter l'agent de masquage supposé se

fixer aux anticorps circulants et ainsi rendre le site de réaction click indisponible, et enfin d'injecter l'effecteur radioactif porteur du motif complémentaire à l'anticorps afin de mettre en évidence uniquement le site tumoral (*figure 7*).

Les travaux de Brian M. Zeglis permettent d'illustrer cette approche [9]. Les auteurs de cette étude ont injecté d'abord un anticorps possédant plusieurs motifs TCO, puis après avoir attendu quelques heures pour favoriser la distribution de l'anticorps dans l'organisme, l'agent de masquage porteur du motif tétrazine (Tz-DP) est injecté. Celui-ci permet alors de neutraliser les motifs TCO des anticorps circulants grâce à la réaction click entre la tétrazine (Tz-DP) et l'anticorps-TCO. Enfin 30 minutes après l'injection de l'agent de masquage, les auteurs administrent l'effecteur radioactif lui aussi porteur du motif tétrazine, permettant la mise en évidence de la zone tumorale.

Le dextran est couramment utilisé dans ce type d'approche du fait de sa biocompatibilité et de sa pharmacocinétique avantageuse [10].

De plus, une redistribution vers les poumons est également observée. En définitive, ces données suggèrent que les agents de masquage pourraient être utilisés pour améliorer la dosimétrie en immunoTEP, mais qu'il reste de nombreux paramètres pharmacocinétiques à optimiser pour augmenter le signal radioactif au niveau du site tumoral.

Focus 3 : clairance

• Principe

L'objectif de cette méthode est d'être capable d'améliorer l'imagerie TEP en permettant l'élimination « sur commande chimique » du radioélément grâce à des agents de clairance bioorthogonaux. En effet, un anticorps, même s'il est très spécifique d'une cible, a une biodistribution imparfaite et sera donc également présent sur des tissus sains, de manière non spécifique, ce qui rendra l'imagerie des lésions cancéreuses plus difficiles. L'agent de clairance aura alors pour rôle de réagir *in vivo* sur l'anticorps radiomarqué circulant ou présent dans des tissus sains dans le but d'éliminer le signal radioactif non spécifique (*figure 8*). Pour rendre cette méthode performante, il faut que l'agent de clairance soit circulant afin d'aller réagir sur les anticorps non fixés au site tumoral, tout en étant

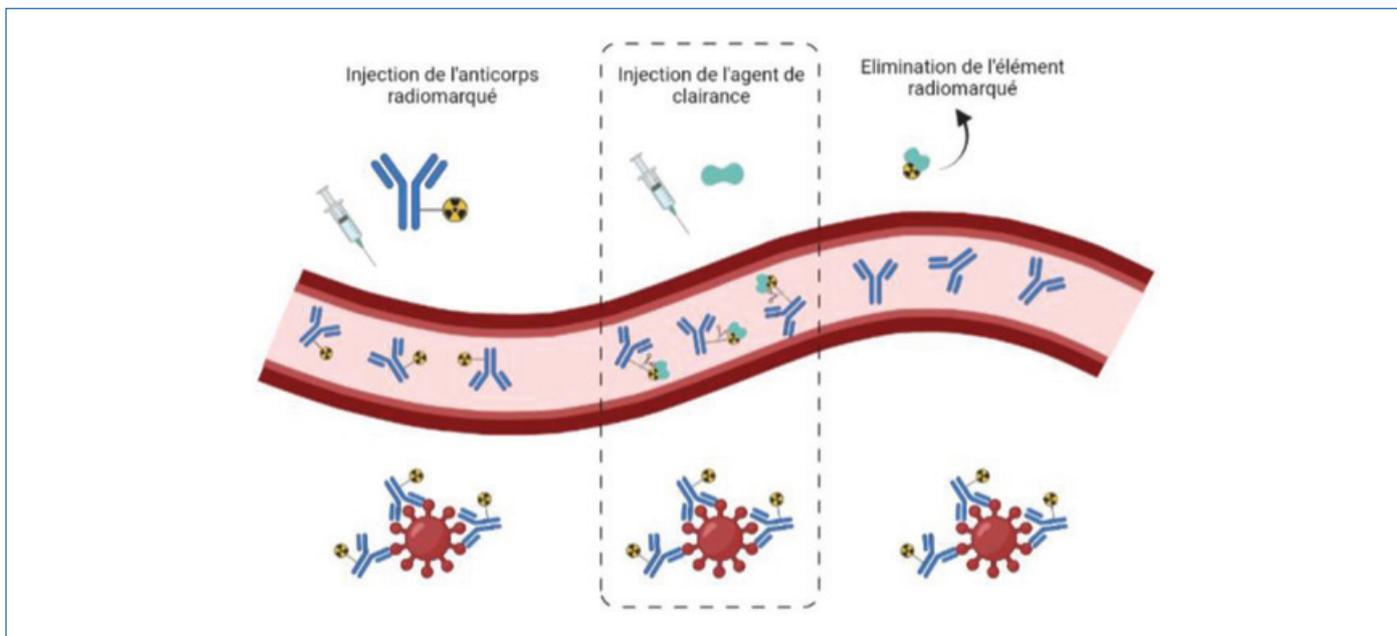


Figure 8 - Principe de la stratégie immunoTET avec un agent de clairance.

non-internalisant pour ne pas réagir avec les anticorps présents sur le site tumoral, et éliminable sur une période relativement courte afin de faire l'acquisition de l'image peu de temps après. C'est l'ensemble de ces critères qui permettront d'améliorer la qualité de l'imagerie immunoTET tout en diminuant la dosimétrie pour le patient.

• Principaux agents de clairance et résultats

Parmi les exemples de la littérature, nous pouvons citer une étude du groupe de D. Sehlin s'inscrivant dans le dépistage de la maladie d'Alzheimer, plus précisément dans l'imagerie des fibres de β -amyloïdes, dont l'agrégation est liée au développement de la maladie. Ces fibres ne sont pas détectées par le radiotracer $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ classiquement utilisé (méthode développée par l'Université de Pittsburgh [11]), lorsqu'elles sont sous formes solubles ou diffuses [12]. En revanche, l'anticorps RmAb158, un anticorps bispécifique capable de franchir la barrière hématoencéphalique et de se lier spécifiquement aux formes solubles de fibres β -amyloïdes, pourrait être une alternative très intéressante dans le cadre du diagnostic de cette maladie. Cependant, la biodistribution très lente de cet anticorps entraîne un bruit de fond et une dosimétrie interne défavorables. C'est pour cela qu'une stratégie utilisant un agent de clairance a été envisagée par le groupe de D. Sehlin afin de répondre à ces problématiques.

Les auteurs ont développé un agent de clairance macromoléculaire dérivé de l'albumine fonctionnalisée par de nombreux motifs galactose et par des tétrazines (Tz) utilisées comme groupement bioorthogonal (figure 9A). Le choix de l'albumine s'explique par le fait que c'est une protéine très soluble, abondante du plasma sanguin humain, sa fonctionnalisation par de nombreux résidus galactose favorisant de plus son excrétion [10]. Les travaux précédents du même groupe avaient démontré que la présence d'un sucre permettait une élimination plus rapide de la radioactivité dans le cadre d'une approche de pré-ciblage [13].

Les images TEMP⁽⁴⁾ (figure 9B) montrent que 2 h après l'injection de l'agent de clairance, l'anticorps radiomarqué se retrouve dans le foie (zone verte/rouge figure 9B-II), et 24 h après l'injection, on observe une disparition du signal dans le

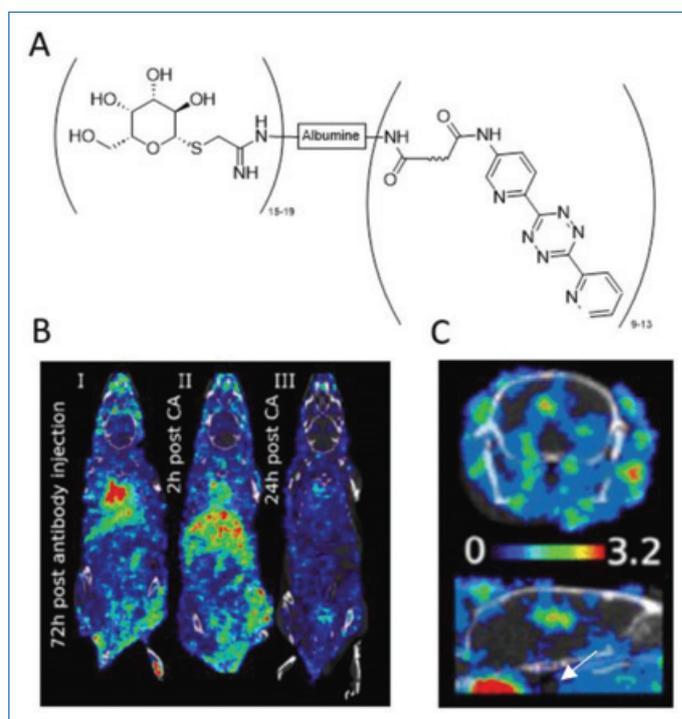


Figure 9 - A) Structure de l'agent de clairance. B) Imagerie TEMP chez la souris obtenue I) 72 h après l'injection de l'anticorps marqué à l'iode-125, II) 2 h après l'administration de l'agent de clairance (CA), III) 24 h après l'administration de l'agent de clairance (CA). C) Imagerie des anticorps dans le cerveau 24 h après l'injection de l'agent de clairance, ; la flèche blanche montre la rétention des anticorps fixés aux fibres β -amyloïdes.

corps de la souris (figure 9B-III). La réaction click entre l'agent de clairance et l'anticorps radiomarqué permet de former un produit de réaction qui se retrouve éliminé très largement dans le foie. Ceci s'explique par la présence du galactose, connu pour cibler les récepteurs d'Ashwell-Morell (AMR) des hépatocytes, principales cellules du foie.

Les auteurs ont répondu à la problématique mettant en évidence les fibres- β -amyloïdes dans le cerveau (indiqué par la flèche blanche, figure 9C). La visualisation des fibres est possible grâce à l'élimination du bruit de fond lié aux anticorps circulants par l'agent de clairance.

À l'issue de ces travaux, on note que l'utilisation de cet agent de clairance a permis d'éliminer en grande partie les anticorps radiomarqués circulants et de faciliter leur élimination par le foie.

Nous avons pu voir qu'indépendamment de la réaction click choisie, le choix de la nature chimique de l'agent de clairance est important. Le motif galactose a permis ici de diriger l'élimination de l'anticorps radiomarqué vers le foie, organe clé dans les processus d'élimination de notre organisme. D'autres structures faisant intervenir des motifs polyéthylène glycol, polymères de dextran ou des structures dendritiques permettant de répondre aux besoins d'un agent de clairance ont été répertoriées afin d'être spécifiques, éliminables rapidement tout en étant circulants dans l'organisme.

Mieux visualiser pour mieux traiter le cancer

Différentes approches basées sur la chimie bioorthogonale *in vivo* permettent d'envisager de répondre à certaines problématiques rencontrées en immunoTEP. Le pré-ciblage aujourd'hui largement étudié permet de pallier quelques limitations de l'immunoTEP, excepté la suppression totale du bruit de fond et les temps longs entre les injections. Il est probable que cette stratégie fasse l'objet de nombreux travaux dans les années à venir en raison de l'impact important qu'ils pourraient avoir en imagerie médicale. On notera que le premier essai clinique utilisant le pré-ciblage en imagerie est en cours aux États-Unis [14]. L'utilisation d'agents de masquage est une stratégie intéressante mais comportant de nombreux obstacles ; elle devra être grandement optimisée afin d'améliorer l'imagerie résultant de cette méthode.

Une autre approche, à ce jour la moins développée, concerne l'utilisation d'un agent de clairance. Nous avons vu que cette approche permet largement de diminuer le bruit de fond et de favoriser l'élimination de l'anticorps circulant et ainsi de réduire la dosimétrie pour le patient. Cette stratégie représente un réel enjeu mais nécessite elle aussi de nombreux travaux de recherche et d'optimisation. Cette approche est prometteuse car une fois mise au point, elle permettra d'améliorer grandement le diagnostic avec une imagerie plus précise et plus sûre pour le patient. Une suite possible en cas de succès de cette approche sera de l'appliquer en radioimmunothérapie avec un isotope adapté pour la radiothérapie, ce qui permettrait d'aller vers une technologie théranostique, c'est-à-dire le développement simultané des aspects diagnostiques et thérapeutiques en médecine nucléaire. L'objectif est de visualiser pour mieux traiter le cancer en associant un diagnostic, qui étudie l'activité tumorale d'un patient de manière très individualisée, et une thérapie ciblée la mieux adaptée au type de cancer.

(1) Effecteur radioactif : molécule radiomarquée portant la fonction chimique bioorthogonale complémentaire de celle portée par l'anticorps.

(2) %ID/g : rapport entre le pourcentage de dose de radioactivité injectée et le poids corporel, déterminant quantité d'éléments radioactifs présents dans un compartiment type et permettant ainsi de visualiser sa biodistribution. Il est parfois exprimé en pourcentage de dose injectée par millilitre de tissus (%ID/mL).

(3) $\log D_{7,4}$: mesure le coefficient de partage d'un composé en une phase aqueuse à pH 7,4 et une phase organique (classiquement du *n*-octanol). Ce coefficient permet d'apprécier le caractère hydrophile ($\log D_{7,4} < 0$) ou hydrophobe ($\log D_{7,4} > 0$) d'un composé.

(4) TEMP : tomographie d'émission monophotonique : technique d'imagerie nucléaire qui utilise un radiotracer radiomarqué avec un émetteur de simples photons.

[1] H.C. Hang, C. Yu, D.L. Kato, C. Bertozzi, A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type o-linked glycosylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*(25), p. 14846-851.

[2] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*(11), p. 2004-21.

[3] S. Wallace, J.W. Chin, Strain-promoted sydnone bicyclo-[6.1.0]-nonyne cycloaddition, *Chem. Sci.*, **2014**, *5*(5), p. 1742-44.

[4] L. Plougastel *et al.*, 4-halogeno-sydnone for fast strain promoted cycloaddition with bicyclo-[6.1.0]-nonyne, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*(66), p. 9376-78.

[5] N.T. Viola-Villegas *et al.*, Applying PET to broaden the diagnostic utility of the clinically validated CA19.9 serum biomarker for oncology, *J. Nucl. Med.*, **2013**, *54*(11), p. 1876-82.

[6] J.L. Houghton *et al.*, Pretargeted immuno-PET of pancreatic cancer: overcoming circulating antigen and internalized antibody to reduce radiation doses, *J. Nucl. Med.*, **2016**, *57*(3), p. 453-459.

[7] E.J.L. Stéen *et al.*, Lipophilicity and click reactivity determine the performance of bioorthogonal tetrazine tools in pretargeted *in vivo* chemistry, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **2021**, *4*(2), p. 824-833.

[8] M. Richard *et al.*, New fluorine-18 pretargeting PET imaging by bioorthogonal chlorosydnone-cycloalkyne click reaction, *Chem. Commun.*, **2019**, *55*(70), p. 10400-403.

[9] R. Membreno *et al.*, Toward the optimization of click-mediated pretargeted radioimmunotherapy, *Mol. Pharm.*, **2019**, *16*(5), p. 2259-63.

[10] M. Staudt, M.M. Herth, Clearing and masking agents in pretargeting strategies, *Pharmaceuticals*, **2023**, *16*, 497.

[11] W.E. Klunk *et al.*, Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B, *Ann. Neurol.*, **2004**, *55*(3), p. 306-319.

[12] E. Schlein *et al.*, Functionalization of radiolabeled antibodies to enhance peripheral clearance for high contrast brain imaging, *Mol. Pharm.*, **2022**, *19*(11), p. 4111-22.

[13] R. Rossin, T. Lappchen, S.M. van den Bosch, R. Laforest, M.S. Robillard, Diels-Alder reaction for tumor pretargeting: *in vivo* chemistry can boost tumor radiation dose compared with directly labeled antibody, *J. Nucl. Med.*, **2013**, *54*(11), p. 1989-95.

[14] Memorial Sloan Kettering Cancer Center, A phase I study of pretargeted PET imaging using ⁶⁴Cu-Tz-SarAr and a trans-cyclooctene-modified humanized 5B1 immunoconjugate (Hu5B1-TCO) in patients with CA19-9-positive pancreatic cancer, *Clinical trial registration NCT05737615*, **2023** (<https://clinicaltrials.gov/study/NCT05737615> - consulté le 21/07/2023).

Apolline DOMINIC¹, doctorante, **Bertrand KUHNAST***², ingénieur-chercheur, et **Frédéric TARAN**¹, directeur de recherche, CEA.

¹ Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et technologies pour la santé (DMTS), SCBM, Gif-sur-Yvette.

² UMR 1023 IMIV, Service hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), CEA, Inserm, Université Paris Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay.

* bertrand.kuhnast@cea.fr



Toute l'actualité de la
Société Chimique de France

et bien plus...

societechimiquedefrance.fr

Les peptides de venins pour l'imagerie du cancer pulmonaire

Résumé De nombreux cancers, et le cancer pulmonaire non à petites cellules en particulier, sont associés à une perturbation des mécanismes contrôlant l'homéostasie ionique. Ceci est dû notamment à un dysfonctionnement et/ou une surexpression de nombreux canaux ioniques tels que certains sous-types de canaux sodiques, calciques et potassiques, de canaux sensibles au pH (ASIC) ou encore de récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. L'activation de ces canaux ioniques joue un rôle important dans l'agressivité des cellules cancéreuses et l'invasion tumorale, leur surexpression semblant être corrélée avec l'apparition de métastases. Bien que des techniques d'imagerie médicale telles que la radiographie, la tomодensitométrie (TDM), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la tomographie par émission de positons (TEP) soient couramment utilisées dans la caractérisation anatomique et métabolique du cancer pulmonaire, certaines de leurs limitations nécessitent le développement de nouvelles sondes d'imagerie plus spécifiques des cibles moléculaires surexprimées au sein des adénocarcinomes pulmonaires. Certains de ces canaux ioniques sembleraient être d'excellents biomarqueurs du cancer du poumon, à condition de pouvoir les détecter et les quantifier le plus précocement possible. Présentes dans les venins d'animaux, les toxines peptidiques, qui ont des propriétés pharmacologiques uniques, sont bien connues pour cibler sélectivement et avec une forte affinité ces canaux ioniques. L'évaluation de ces biomarqueurs du cancer pulmonaire serait possible grâce à une synthèse chimique et un marquage maîtrisé par chimie « click » de ces peptides avec des sondes fluorescentes ou radioactives.

Mots-clés Biomarqueurs, cancer pulmonaire, diagnostic, toxines, canaux ioniques, synthèse peptidique, imagerie médicale.

Abstract **Venom peptides for lung cancer imaging**

Many cancers, and the non-small cell lung cancer in particular, are associated with a disturbance of the mechanisms controlling ion homeostasis due especially to dysfunction and/or overexpression of many ion channels such as certain subtypes of sodium, calcium and potassium channels, pH-sensitive channels (ASICs) or nicotinic acetylcholine receptors. The activation of these ion channels plays an important role in cancer cell aggressiveness and tumor invasion, their overexpression seeming to be correlated with the appearance of metastases. While imaging techniques such as chest X-ray, computed tomography (CT) scan, magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) scan are commonly employed for the anatomical characterization of lung cancer, certain limitations necessitate the development of new imaging probes that are more specific to overexpressed molecular targets in lung adenocarcinomas. Some of these ionic channels can be potent biomarker of interest for lung cancer if some specific ligand associated with medical imaging can be explored. Present in animal venoms, peptide toxins, which have unique pharmacological properties, are well known to act selectively and with high affinity on these ion channels. Therefore, a promising solution towards the development of new lung cancer biomarkers appears to be the chemical synthesis of these toxins allowing them to be labeled by "click" chemistry using various fluorescent or radioactive probes.

Keywords Biomarker, lung cancer, diagnosis, toxins, ion channels, peptide synthesis, imaging.

Le diagnostic précoce, un premier pas décisif vers un traitement efficace

Un cancer non diagnostiqué ou non détecté ne peut être un cancer soigné. D'après l'Organisation mondiale de la santé [1] et l'Institut national du cancer [2], le cancer est actuellement la deuxième cause de mortalité dans le monde (près de 10 millions de décès en 2020), après les maladies cardiaques. Le cancer du poumon, en particulier, touche plus de 2 millions de personnes et est responsable du décès de près de 1,8 million de personnes, ce qui en fait le cancer le plus mortel au niveau mondial. La cause principale est liée au tabagisme (80 à 90 % des cas). Il touche majoritairement les hommes (65 %), mais l'augmentation de la consommation de tabac chez les femmes, au cours des vingt dernières années, accroît leur nombre de cas de 5 % par an (*figure 1*). D'un point de vue général, l'incidence ne cesse d'augmenter pour atteindre 25,0 et 22,4 % de cas en plus à l'horizon 2040, respectivement en France et en Europe (*figure 1B*). Le cancer du poumon

se distingue selon deux types : le premier (85 % des cas) est le cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) et le second (15 % des cas) est le cancer pulmonaire à petites cellules (CPPC).

La forte mortalité des patients atteints d'un cancer du poumon est due à l'agressivité de ce type de cancer. Effectivement, plus de la moitié de ces personnes meurent dans l'année suivant le diagnostic car seulement 16 % des cancers pulmonaires sont diagnostiqués à un stade précoce. Cela représente un taux moyen de survie à cinq ans qui n'est que de 18,6 %. Actuellement, les principales méthodes de diagnostic sont non invasives et consistent en un examen clinique, suivi d'une radiographie du thorax complétée généralement par un scanner thoracique et d'une imagerie TEP (tomographie par émission de positons) (*figure 1C*). D'autres méthodes plus invasives, comme une fibroscopie bronchique ou une biopsie, existent également mais ne sont prescrites qu'en cas de forte suspicion, notamment pour déterminer le sous-type de tumeur et ainsi choisir le traitement le plus adapté. Même si le

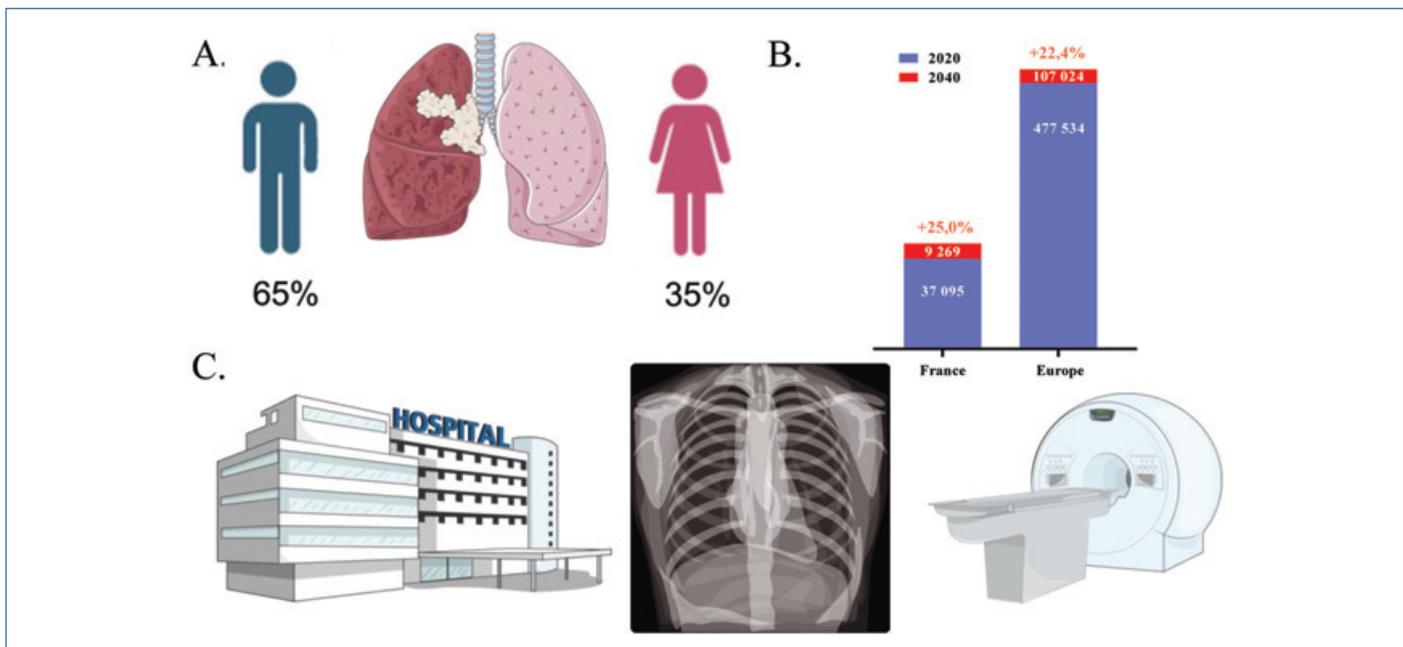


Figure 1 - Prévalence et techniques de diagnostic du cancer pulmonaire : A) pourcentage d'hommes et de femmes touchés par un cancer pulmonaire ; B) nombre estimé de nouveaux cas de cancer du poumon de 2020 à 2040 en Europe et en France ; C) techniques de diagnostic employées pour détecter un cancer pulmonaire. De gauche à droite : examen clinique, radiographie et TEP-scan. (D'après [1-2]).

TEP-scan permet de repérer la localisation et la taille de la tumeur, il n'indique néanmoins ni le type cellulaire touché, ni l'atteinte potentielle des ganglions par les cellules cancéreuses (métastases).

À l'heure actuelle, la technique de référence de diagnostic en oncologie clinique repose sur un couplage entre une tomodensitométrie (TDM) et une imagerie TEP [3]. Elle intervient à tous les stades du diagnostic, de la localisation pré-chirurgicale jusqu'aux bilans, qu'ils soient post-chirurgicaux ou au cours de la chimiothérapie pour identifier une récurrence éventuelle. Cette technique (TDM-TEP) consiste en l'administration du 18-fluoro-2-désoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), un dérivé du glucose marqué par un atome radioactif émetteur de positons, le fluor-18 (^{18}F). Le ^{18}F est l'élément radioactif le plus souvent employé car il possède plusieurs avantages dont une demi-vie de 109,8 minutes, une forte décroissance en positon (96,9 %), un parcours moyen dans l'eau de 2,3 mm, et surtout il peut être produit facilement en routine. Le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ est un radioligand métabolique reposant sur sa consommation en excès par les cellules cancéreuses due à l'augmentation de leur activité glycolytique (effet Warburg). À l'heure actuelle, la combinaison de la TDM avec une imagerie TEP, qui apporte l'information anatomique, possède la plus grande sensibilité et la plus haute spécificité de détection d'un cancer.

Cependant, la TEP-FDG présente certaines limitations, notamment en induisant des faux positifs ou des faux négatifs. Les faux positifs sont majoritairement liés à des lésions infectieuses ou à des processus inflammatoires, qui pour répondre aux besoins énergétiques de la phagocytose et de la sécrétion de cytokines conduisent à un métabolisme exacerbé fortement révélé par le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. Les faux négatifs peuvent être dus à certains types de CPNPC (broncho-alvéolaire), caractérisés par une faible capture de glucose, ou encore à la faible taille des lésions conduisant à une sous-estimation de la fixation de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ [3]. C'est dans ce cadre que la découverte de nouveaux outils plus spécifiques et plus performants est nécessaire afin de permettre une détection précoce et précise du cancer pulmonaire, en particulier du CPNPC.

Les canaux ioniques comme biomarqueurs tumoraux

De nouvelles données génétiques émergent depuis quelques années, notamment avec la caractérisation du profil génétique particulier des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses effectuent un remodelage génétique important pour permettre leur survie. Ce remodelage conduit entre autres à une résistance à la mort cellulaire, à une activation de l'angiogenèse, à l'invasion cellulaire, à des métastases et à la promotion de l'inflammation. Tous ces mécanismes évitent la dégradation des cellules cancéreuses par le système immunitaire [4]. Ils impliquent également la sous-expression et/ou la surexpression de certaines protéines, dont les canaux ioniques. Ce sont des protéines transmembranaires qui, en permettant l'échange d'ions au travers de la membrane cellulaire, sont essentielles à l'homéostasie ionique et, de ce fait, sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques.

Il existe une grande diversité de canaux ioniques ayant une conductance hautement sélective pour une, voire quelques espèce(s) ionique(s) donnée(s) (notamment Na^+ , Ca^{2+} , K^+ et Cl^-) et classés principalement selon leurs mécanismes d'activation (changement conformationnel de la protéine suite à l'action de différents types d'effecteurs) et leurs homologies structurales. En particulier, il est possible de distinguer les canaux activés par le potentiel de membrane (principalement Na_v , K_v et Ca_v), les canaux K activés par le calcium intracellulaire (K_{Ca}), les canaux activés par les protons (ASIC, « acid sensitive ion channels ») et les canaux activés par des ligands (LGIC, « ligand-gated ion channels »). Les canaux activés par le potentiel de membrane, tout comme les canaux K_{Ca} , sont composés de six segments hydrophobes transmembranaires regroupés en domaines et reliés entre eux par des boucles intra- et extracellulaires. Ils sont essentiels à la communication de la plupart des cellules excitables de vertébrés et d'invertébrés, de par leur rôle important dans la genèse et la propagation des potentiels d'action et dans le maintien du potentiel de

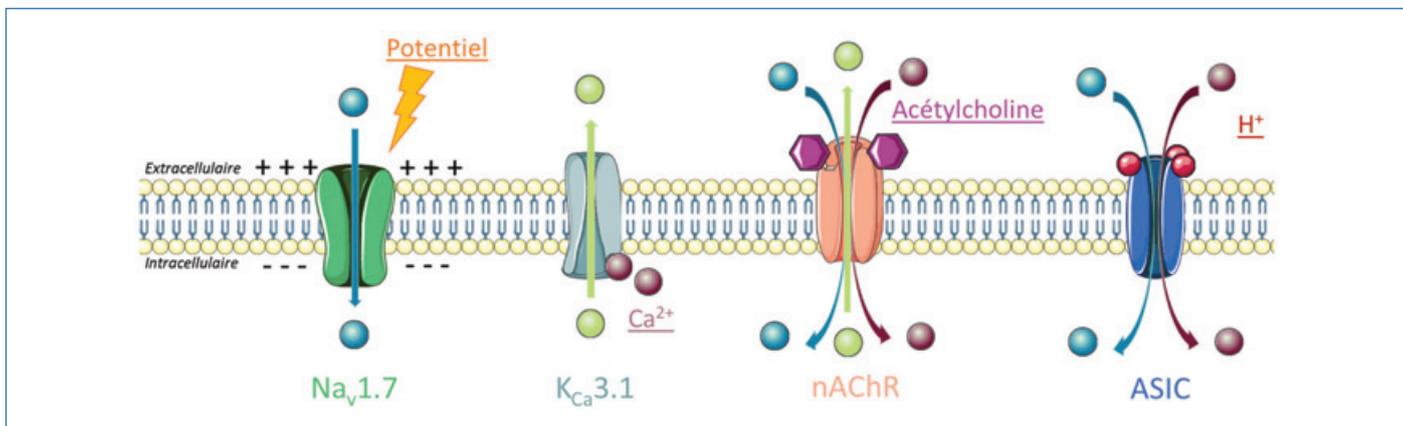


Figure 2 - Représentation schématique de certains canaux ioniques transmembranaires surexprimés dans les CPNPC. Les ronds de couleur bleue, verte, marron et rouge représentent respectivement les ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et H^+ . Les hexagones violets représentent l'acétylcholine. Les activateurs de ces canaux sont soulignés.

repos [5]. Les ASIC, sélectifs des ions Na^+ et Ca^{2+} , ont une structure trimérique (homomères ou hétéromères) incluant deux segments transmembranaires par sous-unité. Ils sont exprimés au niveau de tissus neuronaux et non neuronaux, dans de nombreuses conditions physiopathologiques où le pH est perturbé [6]. Les LGIC comprennent les récepteurs excitateurs, sélectifs des cations (principalement Na^+ et Ca^{2+} , mais également K^+), tels que ceux nicotiques de l'acétylcholine (nAChR, « nicotinic acetylcholine receptors »), de la sérotonine (5HT₃), ionotropique du glutamate (NMDA, AMPA, kaïnate) et ionotropique de l'ATP (P2X), et les récepteurs inhibiteurs, sélectifs des anions (Cl^-), tels que ceux de l'acide γ -aminobutyrique (GABA_A et GABA_C) et de la glycine. Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, de la sérotonine, du GABA et de la glycine ont des structures pentamériques constituées de quatre segments transmembranaires. Ils interviennent principalement dans la transmission synaptique au niveau du système nerveux et à la jonction neuromusculaire, mais l'expression de certains LGIC dans des cellules non excitables est évocatrice de fonctions supplémentaires [7]. Une surexpression importante de divers canaux ioniques a été mise en évidence dans de nombreux cancers [4]. Dans les CPNPC, il est possible de noter une surexpression du sous-type 1.7 de canaux sodium dépendant du potentiel ($\text{Na}_v1.7$), du sous-type 3.1 de canaux K_Ca ($\text{K}_{Ca3.1}$), des sous-types $\alpha 7$ et $\alpha 9/\alpha 10$ de nAChR et des ASIC (figure 2).

Le sous-type $\text{Na}_v1.7$ a été décrit comme étant spécifiquement exprimé dans les cellules H460, une lignée cancéreuse pulmonaire très agressive [8]. Ce sous-type serait associé à l'invasion tumorale, ce qui en fait une cible de choix pour une stratégie de diagnostic [9]. Une autre cible prometteuse dans le cadre de la détection du cancer pulmonaire est le sous-type $\text{K}_{Ca3.1}$ dont l'expression a été montrée comme étant augmentée dans les CPNPC et qui serait impliqué dans la perte de l'adhésion cellulaire, et donc dans le processus de métastase [10]. Il convient de souligner que ce sous-type a récemment été considéré comme un biomarqueur des cellules cancéreuses pulmonaires grâce à l'utilisation de petites molécules synthétiques fluorescentes ou radioactives [11]. L'acidité du micro-environnement tumoral explique la surexpression et l'activation des ASIC. Ainsi, ces canaux ont été montrés comme étant impliqués dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de divers types de cancers [12]. Finalement, une surexpression des sous-types $\alpha 7$ (homopentamères) et $\alpha 9/\alpha 10$ (hétéropentamères) de nAChR a été décrite dans les cellules cancéreuses. Ces récepteurs interviendraient

dans certains mécanismes comme la prolifération et la migration des cellules, l'inhibition de l'apoptose, ou encore l'angiogenèse, leur surexpression étant corrélée avec un changement d'activité cellulaire [13].

Il apparaît donc que la surexpression et l'activation de certains canaux ioniques jouent un rôle important dans l'agressivité des cellules cancéreuses, l'invasion tumorale et l'apparition de métastases [10]. Les propriétés biophysiques de ces canaux, associées à leur implication dans les mécanismes cancéreux et à leur accessibilité au niveau membranaire, en font de véritables candidats comme biomarqueurs tumoraux potentiels, en particulier dans les CPNPC. Ils représentent donc des cibles attractives pour de nouveaux agents sélectifs ayant une propension limitée aux effets hors cible.

Les toxines peptidiques, des outils de ciblage originaux

Les toxines peptidiques, présentes dans les venins d'animaux, constituent une librairie naturelle de millions de molécules, sélectionnées au cours de l'évolution pour leur capacité à se fixer, avec une forte affinité et une grande sélectivité, sur leurs cibles moléculaires et, en particulier, sur les différents sous-types de canaux ioniques. Plusieurs milliers de ces toxines ont été décrites dans la littérature depuis les quarante dernières années. Les toxines peptidiques présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, leur taille est relativement modeste (quelques dizaines de résidus d'acides aminés), ce qui permet de les synthétiser et de les modifier chimiquement de façon contrôlée. De plus, leurs propriétés pharmacocinétiques sont idéales pour des agents d'imagerie comme une clairance rapide, une forte affinité, et leur grande sélectivité exempte toute toxicité [14]. Ces particularités en font des candidats particulièrement prometteurs pour l'imagerie de biomarqueurs tumoraux. Les toxines peptidiques peuvent être catégorisées par leur structure, l'un des critères étant le repliement de la molécule par la création de ponts disulfure. En effet, la présence de cystéine dans les séquences des toxines permet leur repliement. Cette combinaison de ponts disulfure est spécifique de chaque structure peptidique avec un nombre de ponts disulfure pouvant aller de 1 à 5. Il est important de souligner que leur activité pharmacologique est corrélée à l'acquisition de leur structure tridimensionnelle.

De nombreuses toxines, hautement spécifiques et affines de certains canaux ioniques identifiés comme biomarqueurs tumoraux potentiels, ont été mises en évidence et étudiées

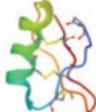
| Toxine | Organisme | Séquence | Structure 3D | Cible | IC ₅₀ (nM) |
|-----------------|---|---|--|------------------------|---|
| Huwentoxine-IV | <i>Cyriopagopus schmidti</i>  | C - C - CC - C - C 35 AA |  | hNa _v 1.7 | 9,9 ¹ |
| Charybdotoxine | <i>Leiurus quinquestriatus</i>  | C - C - C - C - C - C 37 AA |  | hK _{Ca} 3.1 | 5,0 ² |
| Mambalgine-1 | <i>Dendroaspis polylepis</i>  | C - C - C - C - C - CC - C 56 AA |  | hASIC1b hASIC1a+1b | 192,0 ³ 72,0 ³ |
| α-IMI | <i>Conus imperialis</i>  | CC - C - C 11 AA |  | hnAChR α7 | 191,0 ⁴ |
| α-Bungarotoxine | <i>Bungarus multicinctus</i>  | C - C - C - C - C - C - C - CC - C 74 AA |  | hnAChR α7 α9/α10 | 0,8 ⁵ 32,0 ⁶ |

Tableau - Caractéristiques des toxines peptidiques spécifiques de certains canaux ioniques identifiés comme biomarqueurs tumoraux potentiels. AA : acide aminé. IC₅₀ : concentration bloquant 50 % des canaux. H : humain. ¹[15], ²[16], ³[17], ⁴[20], ⁵[21], ⁶[22].

(voir tableau). Ces toxines ont été sélectionnées pour leurs profils pharmacologiques pertinents sur leur cible respective, mais aussi pour leur facilité de synthèse et de modification ; elles apparaissent comme les meilleurs candidats d'outil d'imagerie. Il est possible de citer plusieurs d'entre elles présentant un fort potentiel translationnel au niveau clinique :

- La première toxine, l'huwentoxine-IV (HwtX-IV), est issue du venin de *Cyriopagopus schmidti*, une araignée du sud de la Chine. Cette toxine ICK (« inhibitor cystine knot ») possède trois ponts disulfure et est décrite comme un bloqueur spécifique du sous-type Na_v1.7 humain avec une concentration bloquant 50 % des canaux (IC₅₀) de l'ordre de 10 nM. Elle se fixe au niveau de la boucle extracellulaire qui relie les segments transmembranaires 3 et 4 du domaine II du canal sodium [15].

- La charybdotoxine est une toxine provenant du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus*. Cet animal se rencontre principalement en Égypte et au Soudan et possède le venin le plus toxique qui soit pour un scorpion. Ce venin est composé principalement de neurotoxines dont la charybdotoxine. Cette toxine contient trois ponts disulfure, formant une structure alpha/beta, et possède une affinité de l'ordre du nanomolaire vis-à-vis du canal K_{Ca} [16]. Elle se fixe au niveau du pore du canal, empêchant les ions K⁺ de sortir de la cellule.

- La mambalgine est une toxine à trois doigts comportant quatre ponts disulfure et qui est présente dans le venin de *Dendroaspis polylepis*, un serpent habitant dans les pays d'Afrique subsaharienne. Son venin contient des neurotoxines puissantes, ce qui en fait un venin léthal pour un adulte humain environ 6 heures après la morsure. La mambalgine est spécifique des ASIC avec une IC₅₀ de 70 à 200 nM pour les différents sous-types [17]. La structure 3D de cette toxine a été résolue par cristallographie et ses propriétés ont été caractérisées [18]. Cependant, c'est grâce à la psalmotoxin-1, une toxine de scorpion, que les ASIC ont été montrés comme étant impliqués dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein [12]. Plus récemment, il a été montré que le ciblage par la mambalgine-2 d'hétérotrimères incluant

ASIC-1a, marqueur d'oncogénicité cellulaire, est prometteur pour la conception de nouvelles oncothérapies [19]. La mambalgine bloque la charnière entre les hélices α4 et α5 du canal afin d'inhiber son fonctionnement [19].

- L'α-conotoxine IMI est produite par le cône marin *Conus imperialis* localisé dans les récifs de coraux au niveau du sud et de l'est de l'Afrique et de la Polynésie. C'est un peptide de onze acides aminés incluant deux ponts disulfure, ce qui lui confère une forme globulaire. Il possède une grande spécificité et une IC₅₀ de l'ordre d'une centaine de nanomolaires pour le sous-type α7 nAChR [20]. L'α-conotoxine IMI est un antagoniste compétitif qui se fixe sur le site de fixation de l'acétylcholine, inhibant le fonctionnement du nAChR α7.

- L'α-bungarotoxine fait partie d'un des nombreux peptides contenus dans le venin du serpent *Bungarus multicinctus*. Ce serpent rayé se retrouve dans une grande partie de la Chine centrale mais aussi en Asie du Sud-Est. L'α-bungarotoxine est composé de 74 acides aminés, avec cinq ponts disulfure, et son repliement s'organise sous la forme d'une structure en trois doigts. Elle possède une très forte affinité pour les nAChR musculaires et neuronaux (α7 et α9/α10) avec une IC₅₀ de 0,8 nM pour α7 [21] et 32,0 nM pour α9/α10 [22]. L'α-bungarotoxine se fixe elle aussi au niveau du site de liaison de l'acétylcholine.

Depuis quelques années, de plus en plus d'études décrivent l'utilisation de toxines peptidiques comme agents originaux de ciblage de biomarqueurs tumoraux, que ce soit dans le développement de systèmes de détection, d'outils de diagnostic ou encore la découverte de nouveaux médicaments. En particulier, les applications potentielles des toxines de scorpion dans le traitement du cancer ont été rapportées [23]. Un exemple remarquable est celui de la chlorotoxine (ClTx). Ce peptide, issu du venin du scorpion jaune israélien *Leiurus quinquestriatus*, est actuellement en phase II d'essais cliniques pour des applications d'imagerie du glioblastome [24-25]. La ClTx est un peptide de 36 acides aminés comportant huit cystéines qui forment quatre ponts disulfure. La ClTx exerce une double action : la première est sa fixation sur les

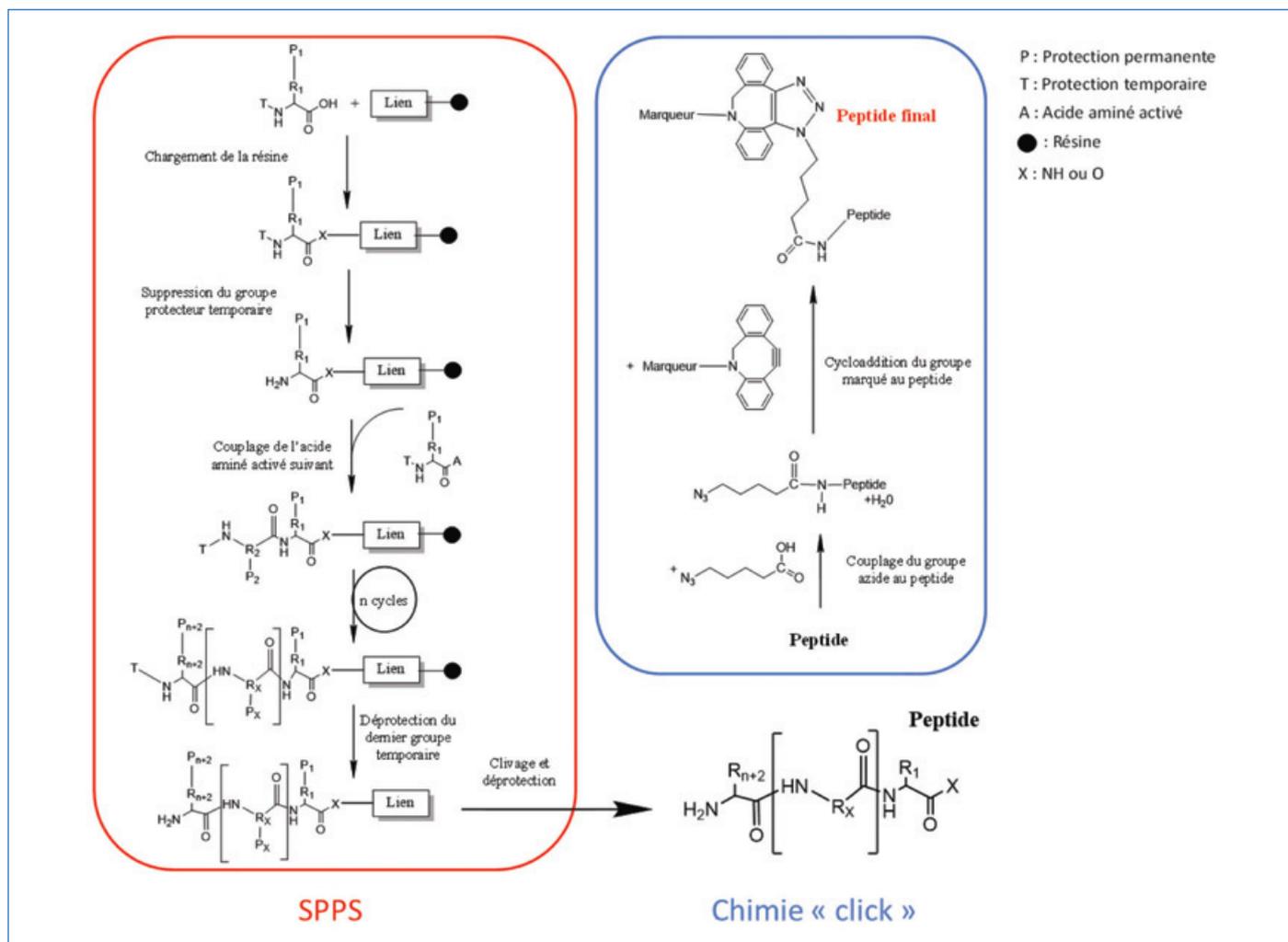


Figure 3 - Étapes de la SPPS couplée à la chimie « click » pour l'obtention d'une toxine peptidique marquée.

tumeurs en interagissant avec, et en bloquant, les canaux chlore présents sur les cellules cancéreuses, et la seconde est une activité anti-angiogénique en fixant une métalloprotéase (MMP2) et/ou la protéine annexine A2, facteurs impliqués dans la migration cellulaire. La CITx, sous une forme fluorescente ou radioactive, a déjà été utilisée avec succès comme outil d'imagerie des glioblastomes, permettant une résection chirurgicale contrôlée [26].

La synthèse peptidique de toxines marquées

Une des étapes primordiales pour l'utilisation de toxines peptidiques comme agents d'imagerie de biomarqueurs tumoraux est leur synthèse chimique. Pour obtenir des quantités relativement importantes, la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) est classiquement utilisée. Cette technique a été découverte en 1963 par Merrifield qui a été récompensé en 1984 par un prix Nobel [27]. Elle présente de nombreux avantages dont celui de pouvoir utiliser de larges excès de réactifs dans chaque réaction, puis de les éliminer par simple filtration.

Les différentes étapes de la SPPS sont la protection des fonctions non engagées dans la liaison peptidique, l'activation de la fonction acide pour former la liaison peptidique, et le contrôle de l'épimérisation. L'élongation de la synthèse s'effectue ici « pas à pas », de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale, et non pas par l'assemblage de plusieurs fragments au cours duquel le risque d'épimérisation

est plus important. L'accroissement de la chaîne peptidique se fait donc par la création d'une liaison amide entre l'acide carboxylique d'un acide aminé (AA) et la fonction amine de l'AA précédent fixé sur la résine. Afin d'éviter une simple réaction acido-basique, la fonction acide est activée pour qu'elle puisse réagir avec la fonction amine. La figure 3 illustre les différentes étapes d'un cycle de synthèse.

Le choix de la résine pour l'étape de fixation du premier AA est important car celle-ci doit avoir une bonne solvatisation dans les milieux organiques utilisés [N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP)/pipéridine]. L'extrémité C-terminale du premier AA va former une liaison qui ne subira une solvolysse qu'à la fin de la synthèse. Cette liaison est soit acide, soit amide, en fonction de la résine employée.

Pour l'étape de protection, il existe deux stratégies de SPPS qui se différencient par le groupement protecteur de la fonction amine terminale : l'utilisation de tertibutyloxycarbonyle (Boc) comme protection acido-labile, éliminé par de l'acide trifluoroacétique (TFA), ou l'utilisation de fluorèneméthoxycarbonyle (Fmoc), déprotégé en conditions basiques en présence de pipéridine. C'est la seconde stratégie qui est la plus couramment employée. La fonction NH_2 de l'AA à greffer est protégée, n'autorisant ainsi que la réaction entre l'amine terminal de l'AA « i » et l'acide carboxylique terminal actif de l'AA « i+1 ». Les fonctions réactives des chaînes latérales sont aussi protégées et ce, pendant toute la synthèse, avec des groupements dits « orthogonaux ». Ces protections doivent répondre à plusieurs critères dont la stabilité, leur ajout et une

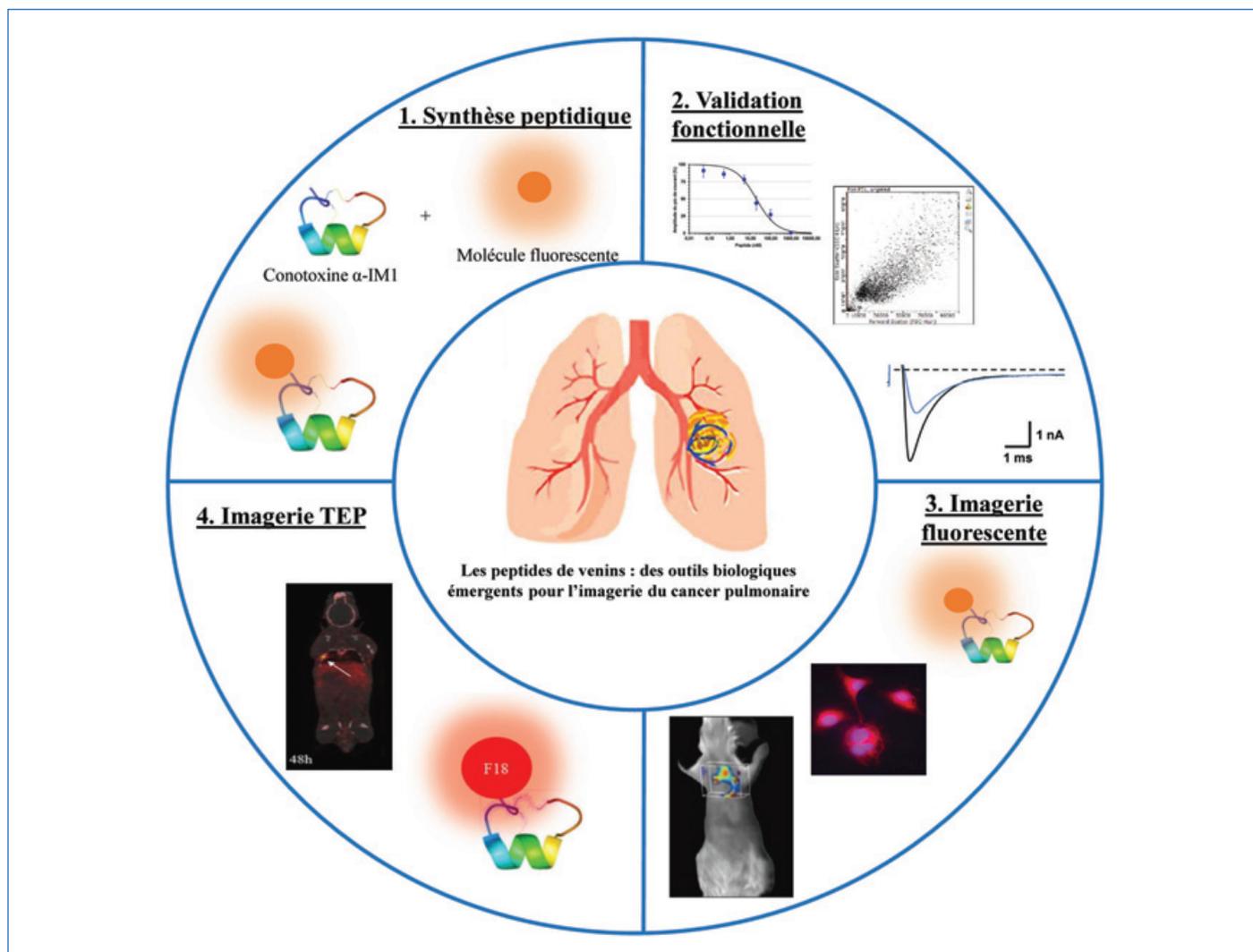


Figure 4 - Démarche expérimentale du projet développé pour concevoir de nouveaux outils d'imagerie de biomarqueurs tumoraux.

élimination facile qui ne doit pas entraîner de réaction secondaire. Il existe plusieurs groupements orthogonaux spécifiques de certains AA dont les plus utilisés sont le tertibutyle (tBu), le triphénylméthyle (Trt), le 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf) ou encore le tertibutyloxy-carbonyl (tBoc). Certains AA ne nécessitent pas de protection grâce à leurs chaînes latérales carbonées.

Pour l'étape d'activation de l'acide carboxylique pour le couplage peptidique, la fonction carboxyle de l'AA à coupler doit être transformée en une espèce plus réactive et plus électrophile. De nombreux réactifs de couplage existent dont le N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) qui a souvent été utilisé, mais le tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HCTU), qui piège la O-acylurée, est plus souvent employé. Dans un premier temps, une base déprotège l'acide carboxylique, permettant au carboxylate d'attaquer le carbone de l'HCTU. La fonction amine de l'AA à coupler réagit avec cet ester activé pour former la liaison amide.

L'étape suivante consiste à déprotéger le groupement Fmoc en milieu basique (pipéridine à 20 % dans du NMP) par β -élimination. L'orthogonalité est le principal avantage de la stratégie Fmoc/tBu, concept permettant une plus grande flexibilité pour les stratégies complexes de synthèse.

Finalement, la dernière étape consiste à décrocher le peptide synthétisé de la résine. En effet, les résines sont sensibles aux conditions acides. Cette dernière étape de clivage du peptide au niveau de la résine se fait donc par l'intermédiaire de TFA

qui contient des composés capables de piéger les carbocations très réactifs générés lors de la déprotection des chaînes latérales (groupements orthogonaux). Une fois le peptide linéaire obtenu, il est purifié par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance). Cette méthode consiste à séparer les produits sur une colonne en fonction d'un gradient d'un mélange d'éluant. Les molécules sont séparées selon leur affinité pour le ligand greffé à la silice de la colonne.

Le produit purifié est ensuite replié. En effet, comme mentionné précédemment, le repliement des toxines peptidiques est indispensable à l'acquisition de leur structure tridimensionnelle et de leur fonction biologique. La formation des ponts disulfure résulte d'une oxydation contrôlée entre les résidus cystéine. Elle peut être générée par différents facteurs comme l'oxygène, le diméthylsulfoxyde (DMSO), ou encore des couples oxydo-réducteurs tels que le glutathion réduit et oxydé. Le peptide est purifié une seconde fois pour ne garder que le peptide replié.

Le marqueur peut être alors « cliqué » par la dibenzylcyclooctyne amine (DBCO). Pour cela, il est nécessaire de coupler le peptide portant un groupement azoture pour ensuite ajouter le marqueur par une cyclo-addition. Ces réactions sont rapides et possèdent un haut taux de succès, ce qui facilite le marquage des peptides. Le brut de synthèse est ensuite obtenu après une précipitation dans l'éther, une solubilisation puis une lyophilisation. La toxine finale synthétique, obtenue sous forme de poudre, est ensuite analysée par spectrométrie

de masse, mais aussi fonctionnellement par des expériences d'électrophysiologie, de pharmacologie par tri cellulaire et d'imagerie.

Vers la conception de nouveaux biomarqueurs tumoraux

L'originalité du projet développé au sein de notre équipe consiste à exploiter les propriétés pharmacologiques uniques de toxines peptidiques vis-à-vis de canaux ioniques exprimés au niveau des CPNPC et de développer des agents d'imagerie utiles dans le suivi de ces pathologies (figure 4). Il est à noter que ces peptides seront utilisés à de très faibles concentrations, compte tenu de la forte sensibilité de l'imagerie TEP-scan, et n'exerceront donc pas de toxicité *in vivo*. Ce projet pluridisciplinaire permettra d'avoir un contrôle sur toutes les étapes, en commençant par la synthèse peptidique et l'avantage de la chimie « click » qui facilite l'utilisation d'un large panel de marqueurs fluorescents ou radioactifs. Différents marqueurs fluorescents seront étudiés dans un premier temps, avant d'explorer ensuite les marqueurs radioactifs comme le ^{18}F et valider le marquage des toxines étudiées en TEP-scan.

Après avoir évalué l'expression des cibles dans des lignées tumorales et des biopsies par la quantification des gènes exprimés par RT-qPCR (« quantitative reverse transcription polymerase chain reaction »), leur validation fonctionnelle sera effectuée. Cette validation fonctionnelle des cibles, qui sont des canaux ioniques, se fera par la technique d'électrophysiologie qui permet d'accéder spécifiquement aux courants ioniques transitant par ces canaux. Les effets des toxines peptidiques synthétisées avec et sans marqueurs seront étudiés sur ces courants pour estimer leur affinité (IC_{50}) vis-à-vis des canaux ioniques et s'assurer que les propriétés biologiques de ces toxines ne sont pas notablement affectées par les marquages fluorescents ou radioactifs. L'affinité des toxines peptidiques vis-à-vis des canaux ioniques sera également estimée par tri cellulaire, une technique permettant de distinguer les populations de cellules en fonction de l'intensité de leur fluorescence due à la fixation des toxines fluorescentes sur leurs cibles membranaires. Des expériences de compétition entre les toxines fluorescentes et celles non marquées permettront de déterminer les pourcentages de population cellulaire fixant spécifiquement les toxines et les taux de fixation. Cette fluorescence sera également mise en évidence par des techniques d'imagerie, comme en particulier la microscopie confocale qui permettra en outre de valider la localisation des toxines peptidiques au niveau membranaire. Finalement, la preuve de concept de ce projet sera validée par de l'imagerie *in vivo* de souris immunocompétentes ou immunodéficientes xénotreffées avec, dans un premier temps, des lignées cellulaires, et dans un second temps des modèles PDX (xénotrefe dérivée de patient). La finalité du projet est d'élaborer les meilleurs outils possibles d'imagerie pour détecter de façon précoce et sélective les cellules cancéreuses.

[1] <https://gco.iarc.fr>

[2] www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-poumon

[3] F. Soumia, A. Leila, R. Mohamed, H. Laila, E., Mustapha, Intérêt de la TEP-TDM dans le cancer broncho-pulmonaire primitif non à petite cellule, *Pan. Afr. Med. J.*, **2017**, 28, 289.

[4] N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies?, *Physiol. Rev.*, **2018**, 982, p. 559-621.

[5] F.H. Yu, W.A. Catterall, The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis, *Sci. STKE*, **2004**, 253, re15.

[6] B. Cristofori-Armstrong, L.D. Rash, Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: insights from spider, snake and sea anemone venoms, *Neuropharmacology*, **2017**, 127, p. 173-184.

[7] S.P. Alexander *et al.*, The concise guide to pharmacology 2017/18: ligand-gated ion channels, *Br. J. Pharmacol.*, **2017**, 174, p. S130-159.

[8] S. Roger *et al.*, Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, 394, p. 774-786.

[9] S.P. Fraser *et al.*, Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **2014**, 369, 20130105.

[10] E. Bulk, L.M. Todesca, A. Schwab, Ion channels in lung cancer, In *Transportome Malfunction in the Cancer Spectrum*, vol. 181, C. Stock, L.A. Pardo (eds), Springer, **2020**, p. 57-79.

[11] I. Thale *et al.*, Imaging of KCa3.1 channels in tumor cells with PET and small-molecule fluorescent probes, *ChemMedChem.*, **2023**, 18(2), e202200551.

[12] C. Yang *et al.*, Overexpression of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) promotes breast cancer cell proliferation, migration and invasion, *Transl. Cancer Res.*, **2020**, 9(12), p. 7519-30.

[13] S. Wang, Y. Hu, $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in lung cancer (review), *Oncol. Lett.*, **2018**, 16(2), p. 1375-82.

[14] L. Droctová *et al.*, A snake toxin as a theranostic agent for the type 2 vasopressin receptor, *Theranostics*, **2020**, 1025, p. 11580-594.

[15] L. Lopez *et al.*, Synthetic analogues of huwentoxin-IV spider peptide with altered human NaV1.7/NaV1.6 selectivity ratios, *Front. Cell Dev. Biol.*, **2021**, 9, 798588.

[16] R. Chen, S.-H. Chung, Molecular dynamics simulations of scorpion toxin recognition by the Ca^{2+} -activated potassium channel KCa3.1, *Biophys. J.*, **2013**, 1058, p. 1829-37.

[17] S. Diochot *et al.*, Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain, *Nature*, **2012**, 490, p. 552-555.

[18] G. Mourier *et al.*, Mambalgin-1 pain-relieving peptide, stepwise solid-phase synthesis, crystal structure, and functional domain for acid-sensing ion channel 1a inhibition, *J. Biol. Chem.*, **2016**, 2916, p. 2616-29.

[19] A.V. Sudarikova *et al.*, Mambalgin-2 inhibits lung adenocarcinoma growth and migration by selective interaction with ASIC1 α -ENaC/ γ -ENaC heterotrimer, *Front. Oncol.*, **2022**, 12, 904742.

[20] M. Ellison, J.M. McIntosh, B.M. Olivera, α -conotoxins Iml and Iml1, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 2782, p. 757-764.

[21] X. Peng, M. Katz, V. Gerzanich, R. Anand, J. Lindstrom, Human alpha 7 acetylcholine receptor: cloning of the alpha 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional alpha 7 homomers expressed in xenopus oocytes, *Mol. Pharmacol.*, **1994**, 453, p. 546-554.

[22] V. Tsetlin *et al.*, Interaction of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic receptors with peptides and proteins from animal venoms, *Front. Cell. Neurosci.*, **2021**, 15, 765541.

[23] R.A. Dueñas-Cuellar *et al.*, Scorpion toxins and ion channels: potential applications in cancer therapy, *Toxins*, **2020**, 12, 326.

[24] L. Dardevet *et al.*, Chlorotoxin: a helpful natural scorpion peptide to diagnose glioma and fight tumor invasion, *Toxins*, **2015**, 74, p. 1079-101.

[25] R. Patil *et al.*, Polymalic acid chlorotoxin nanoconjugate for near-infrared fluorescence guided resection of glioblastoma multiforme, *Biomaterials*, **2019**, 206, p. 146-159.

[26] O. Cohen-Inbar, M. Zaaroor, Glioblastoma multiforme targeted therapy: the chlorotoxin story, *J. Clin. Neurosci.*, **2016**, 33, p. 52-58.

[27] R.B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 8514, p. 2149-54.

Romain BAUDAT^{*1}, doctorant, **Evelyne BENOIT**¹, chercheur CNRS, **Mathilde KECK**¹, chercheur CEA, **Pascal KESSLER**¹, chercheur CEA, **Charles TRUILLET**², chercheur CEA, et **Denis SERVENT**¹, chercheur CEA.

¹Université Paris-Saclay, CEA, Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot, Département Médicaments et technologies pour la santé (DMTS), Service d'Ingénierie moléculaire pour la santé (SIMoS), EMR CNRS/CEA 9004, Gif-sur-Yvette.

²Université Paris-Saclay, CEA, Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot, Service hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), Laboratoire d'imagerie biomédicale multimodale Paris Saclay (BioMaps), Orsay.

* romain.baudat@cea.fr

La PCR isotherme multiplexée en microfluidique pour la détection d'agents pathogènes

Résumé L'ADN bactérien est un biomarqueur exogène qui, après amplification par PCR (« polymerase chain reaction ») peut être détecté à partir d'un échantillon biologique comme le sang ou l'urine. La détection de cet ADN amplifié permet d'identifier l'agent pathogène responsable de l'infection, ainsi que ses éventuelles résistances aux antibiotiques lorsqu'il s'agit d'une infection bactérienne. Bien que très sensible, la PCR nécessite un équipement sophistiqué, des infrastructures et du personnel qualifié pour sa mise en œuvre. Une méthode d'amplification de l'ADN, dans des conditions isothermes, appelée LAMP (« loop-mediated isothermal amplification ») permettrait de simplifier le schéma de détection. Mais la LAMP nécessite l'utilisation d'amorces pour la détection d'une cible unique, ce qui rend ses possibilités de multiplexage très limitées et empêche la recherche simultanée de plusieurs biomarqueurs bactériens dans un même mélange réactionnel. L'utilisation de la microfluidique offre de nouvelles stratégies pour multiplexer des réactions de LAMP tout en restant simple d'utilisation.

Mots-clés Biomarqueurs, maladies infectieuses, diagnostic, microfluidique, LAMP, amplification isotherme.

Abstract Multiplexed isothermal PCR in microfluidics for the detection of pathogens

Bacterial DNA is an exogenous biomarker that after amplification by PCR (polymerase chain reaction) can be detected in biological samples such as blood or urine. Detection of this amplified DNA makes it possible to identify pathogens responsible for infections and their potential resistance to antibiotics in the case of a bacterial infection. Although PCR is highly sensitive, it requires a sophisticated system that calls for infrastructure and qualified staff. A method for DNA amplification under isothermal conditions, called LAMP ("loop-mediated isothermal amplification") would simplify the detection workflow. However, LAMP requires primers to detect a single target which limits its multiplexing capabilities, and therefore prevents the simultaneous search for several bacterial biomarkers in the same reaction mix. Microfluidics allow the implementation of novel strategies for multiplexing LAMP while remaining simple to use.

Keywords Biomarkers, infectious diseases, diagnostic, microfluidic, LAMP, isothermal amplification.

Le diagnostic des maladies infectieuses : un enjeu sanitaire mondial

Les maladies infectieuses représentent le problème sanitaire le plus important dans le monde [1]. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques complique la prise en charge des infections bactériennes et est responsable d'une forte mortalité [2]. La détection et l'identification rapide de l'agent pathogène responsable d'une infection sont primordiales afin d'adapter le traitement selon l'agent pathogène concerné et ses résistances associées, et de prendre les mesures de prévention nécessaires pour éviter sa propagation. Les méthodes de référence se basent la plupart du temps sur l'observation phénotypique (culture, observation microscopique, tests biochimiques, etc.). Ces méthodes sont fastidieuses et chronophages, le délai de réponse pouvant aller jusqu'à plusieurs jours, entraînant l'administration d'un traitement sans *a priori* parfois inadapté ou l'administration tardive d'un traitement approprié, et donc des risques de complications pour les patients et une pression accrue sur les systèmes de santé (coûts, personnel, places disponibles...).

Des tests à l'échelle moléculaire basés sur la détection de l'ADN (acide désoxyribonucléique), tels que la PCR (« polymerase chain reaction »), permettent de réaliser l'amplification de séquences cibles d'ADN et de gagner ainsi en rapidité, spécificité et sensibilité. Cependant, les technologies telles que la PCR requièrent des infrastructures adaptées, du matériel coûteux et du personnel qualifié pour la préparation des échantillons, et peuvent être difficiles d'accès dans les environnements aux ressources limitées ou dans les territoires

isolés. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a défini les critères ASSURED (abordable, sensible, spécifique, simple d'utilisation, rapide, sans équipement, facilement transportable), qui définissent les caractéristiques idéales d'un test diagnostique [1]. Une méthode d'amplification isotherme d'une partie de l'ADN de l'agent pathogène, telle que la LAMP (« loop-mediated isothermal amplification »), couplée à la microfluidique, permettrait de conserver, voire d'améliorer la spécificité, la sensibilité et la rapidité, caractéristiques de la PCR, tout en restant simple d'utilisation afin de se rapprocher au mieux des critères ASSURED.

Une histoire d'amplification

Les premières publications rapportant l'amplification de brins d'ADN datent des années 1970, mais il faut attendre le dépôt d'un brevet par l'entreprise Cetus en 1986 pour la première description de la PCR [3]. Cette véritable photocopieuse à ADN a ouvert la voie à de multiples applications, de la détection d'une mutation pour le diagnostic d'une maladie génétique ou dans le cadre d'un cancer, à l'amplification d'une cible d'intérêt (ADN viral ou bactérien...) jusqu'au diagnostic de maladies infectieuses.

Après une étape d'extraction de l'ADN d'intérêt à partir de l'échantillon, l'amplification d'une séquence donnée sur un brin d'ADN est réalisée grâce à un thermocycleur, dispositif de chauffage complexe, coûteux et énergivore. Il permet de réaliser la succession de cycles de chauffage et de refroidissement du mélange réactionnel, chaque cycle comportant trois étapes à des températures différentes, aboutissant à la

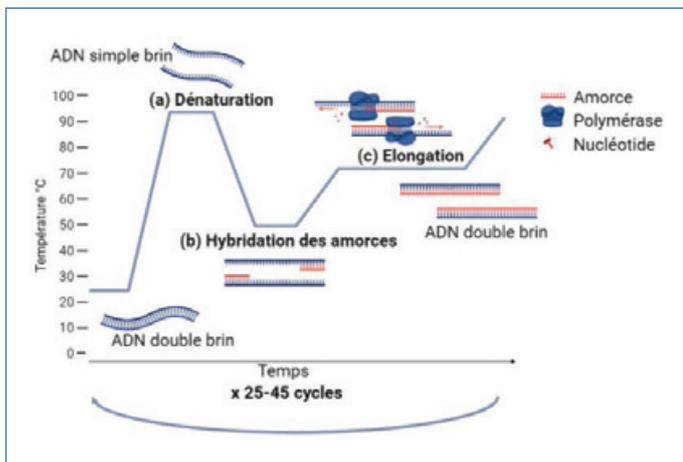


Figure 1 - Cycles de températures aboutissant à l'amplification d'un brin mère en deux brins d'ADN fils par PCR : (a) dénaturation du double brin d'ADN mère par la chaleur, qui rompt les liaisons hydrogène liant les deux brins (10-60 sec) ; (b) hybridation des amorces (séquences complémentaires au brin cible) (30-60 sec) ; (c) élongation par l'intermédiaire d'une polymérase thermostable (enzyme qui catalyse l'élongation d'un brin d'ADN par enchaînement de nucléotides complémentaires) (30 sec-quelques minutes).

formation de deux molécules d'ADN double brin identiques, appelées amplicons, à partir d'une molécule d'ADN double brin mère [4] (figures 1 et 2). Les séquences amplifiées ont généralement une taille de 50 à 200 paires de bases, la durée des étapes de dénaturation, d'hybridation des amorces et d'élongation dépendent de la taille de la séquence cible. Pour

visualiser les amplicons en point final, une migration par électrophorèse dans un gel d'agarose contenant un intercalant de l'ADN (historiquement le bromure d'éthidium (BET)) visible sous exposition aux UV est largement utilisée. Les molécules d'ADN migrent dans le gel en fonction de leur taille (nombre de paires de bases) et des marqueurs de taille permettent d'identifier si les amplicons ont la taille attendue. Une autre méthode permettant de mettre en évidence l'apparition d'amplicons est la PCR en temps réel. Elle permet le suivi de l'amplification au cours du temps par fluorescence, et donc d'introduire une notion de quantification. En effet, plus la cible est en quantité importante dans l'échantillon initial, plus l'amplification est détectée tôt. L'augmentation de la fluorescence au cours du temps est permise par l'ajout dans le mélange réactionnel d'une molécule intercalant l'ADN et possédant la propriété de fluorescer mille fois plus lorsqu'elle est intercalée entre deux brins d'ADN. Cette technique présente l'avantage de pouvoir être employée quelle que soit la cible. La PCR en temps réel est la technologie de PCR la plus utilisée dans les laboratoires d'analyses médicales.

Enfin la PCR digitale (dPCR), développée initialement en plaque à puits et disponible aujourd'hui sous format microfluidique, fait intervenir un fractionnement de l'échantillon en condition de dilution limite, afin d'aboutir en moyenne à une séquence cible par compartiment. Chaque molécule d'ADN peut ainsi être amplifiée indépendamment des autres de manière parallélisée, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de la détection. La dPCR permet également un multiplexage

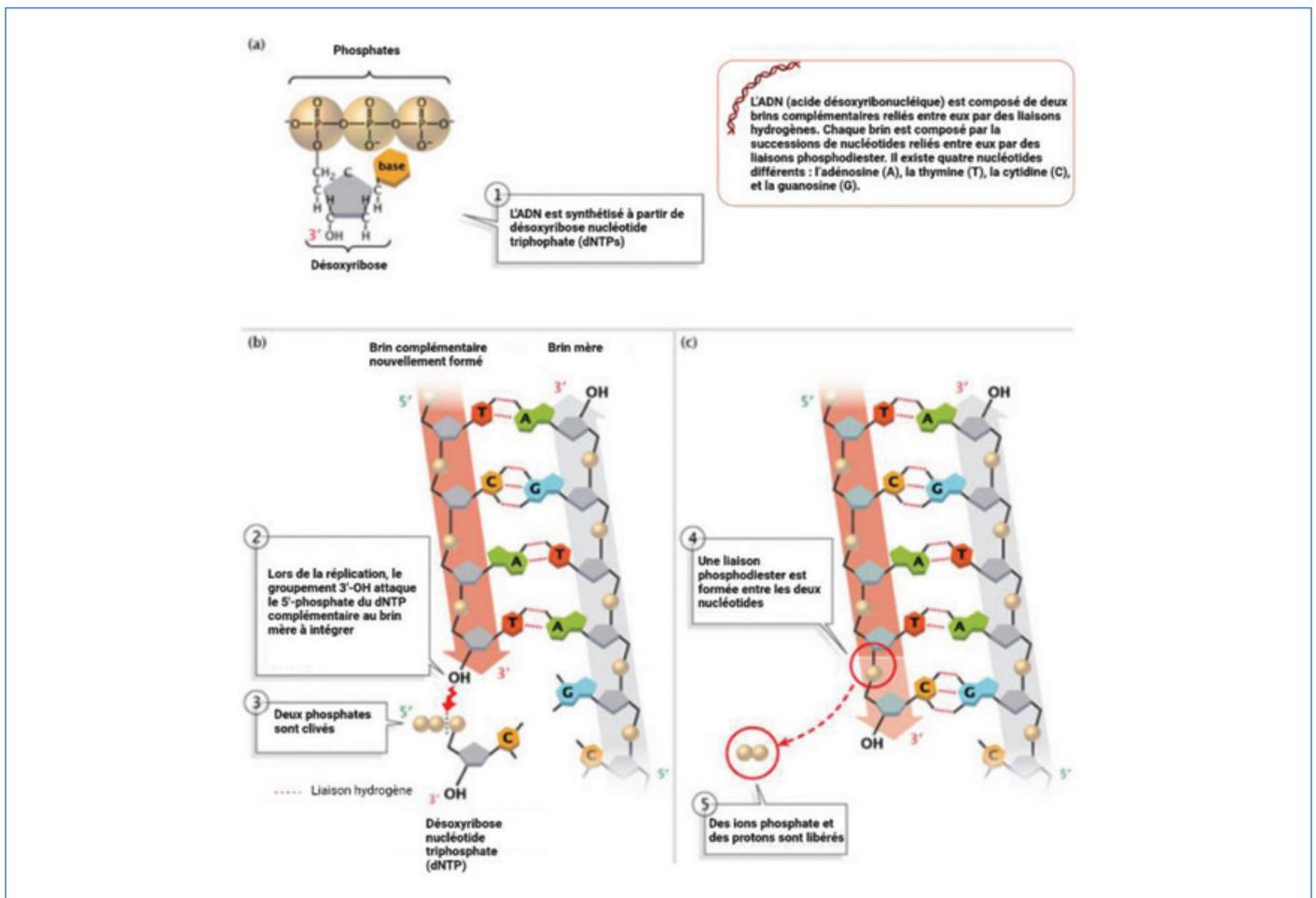


Figure 2 - Formation d'un brin d'ADN complémentaire par élongation grâce à une polymérase à partir d'un brin mère : (a) structure d'un désoxyribose nucléotide triphosphate (dNTP) ; (b) intégration d'un dNTP au sein d'un brin en cours d'élongation ; (c) formation d'une liaison phosphodiester liant les nucléotides d'un même brin et d'une liaison hydrogène liant les deux brins complémentaires. (Adapté de [3]).

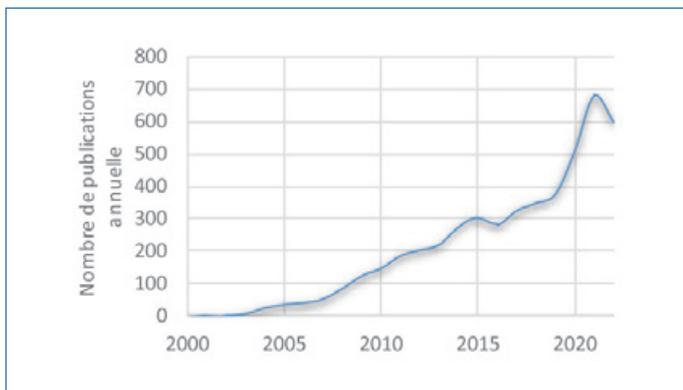


Figure 3 - Nombre de publications référencées sur PubMed concernant la LAMP entre 2000 et 2022, avec la requête « LAMP assay [Supplementary Concept] OR loop mediated isothermal amplification ».

qui est la détection simultanée de plusieurs cibles, ainsi que la quantification absolue [5]. Cette technique est notamment utilisée dans le cadre de la recherche de mutations dans le domaine de la cancérologie, grâce à l'emploi de sondes spécifiques permettant une discrimination allélique [5]. Des évolutions technologiques [6] dérivées de la PCR digitale ont été développées pour miniaturiser cette technologie et faciliter la préparation de l'échantillon, étape chronophage et nécessitant du personnel de laboratoire qualifié ; cependant elles nécessitent toujours l'utilisation d'un thermocycleur.

La LAMP : une technique au cœur de l'innovation

La LAMP a été développée au début des années 2000 dans le but d'éviter l'utilisation du thermocycleur, grâce à une amplification à température constante, et de pallier le manque de spécificité des méthodes d'amplification isothermes déjà décrites [7], telles que la NASBA (« nucleic acid sequence-

based amplification ») (1991) [8] et la SDA (« strand displacement amplification ») (1992) [9]. Le nombre d'articles référencés sur PubMed concernant la LAMP depuis la première publication en 2000 est en constante augmentation, avec un pic en 2020 et 2021 dû à la pandémie mondiale de Covid-19, pendant laquelle la nécessité de diagnostic rapide, fiable et peu coûteux est passée en priorité des problématiques de santé publique, et donc de recherche (figure 3).

La LAMP est facilement réalisable sans équipement spécifique. En effet, il est possible de faire l'amplification dans un bain-marie ou dans une étuve étant donné qu'elle se déroule à température constante, tout en conservant une bonne spécificité et une très bonne sensibilité (quelques copies de l'ADN cible) [7]. Cependant, c'est une technique qui est sensible aux contaminations croisées avec l'ADN présent sur les surfaces où sont préparés les échantillons [10]. L'amplification isotherme est réalisée avec l'enzyme *Bst* qui possède une activité lui permettant de déplacer les brins en plus de l'activité polymérase à 60-65 °C, ce qui permet de s'affranchir de l'étape de dénaturation de l'ADN double brin par chauffage à 90-95 °C [7, 10]. Une première étape d'initiation faisant intervenir les amorces FIP (« forward inner primer »), BIP (« backward inner primer »), B3 (« backward primer »), F3 (« forward primer ») permet d'obtenir un brin d'ADN avec une boucle à chaque extrémité. Ensuite une cascade d'amplifications grâce aux amorces facultatives LF (« loop primer forward ») et LB (« loop primer backward »), permet d'obtenir des amplicons de formes et de tailles différentes (de 150 à plus de 1 000 paires de bases) [7, 10] (figure 4).

Les amplicons ainsi obtenus sont également détectables par électrophorèse sur gel d'agarose, mais ce n'est pas la méthode de choix car leur taille est très variable et c'est une méthode fastidieuse. Il est également possible de faire un suivi en temps réel grâce à un intercalant de l'ADN fluorescent, de la même

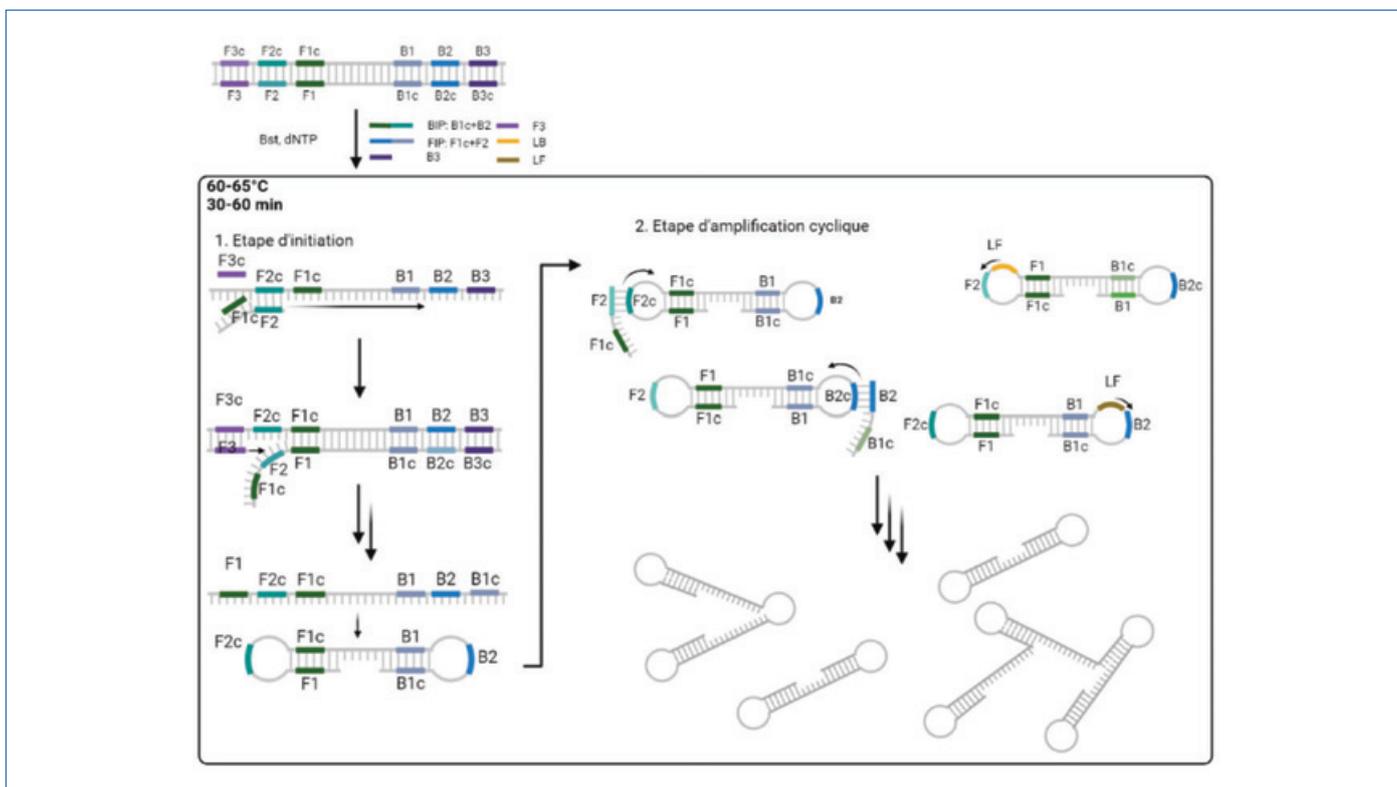


Figure 4 - Réaction d'amplification d'une séquence d'ADN double brin par LAMP.

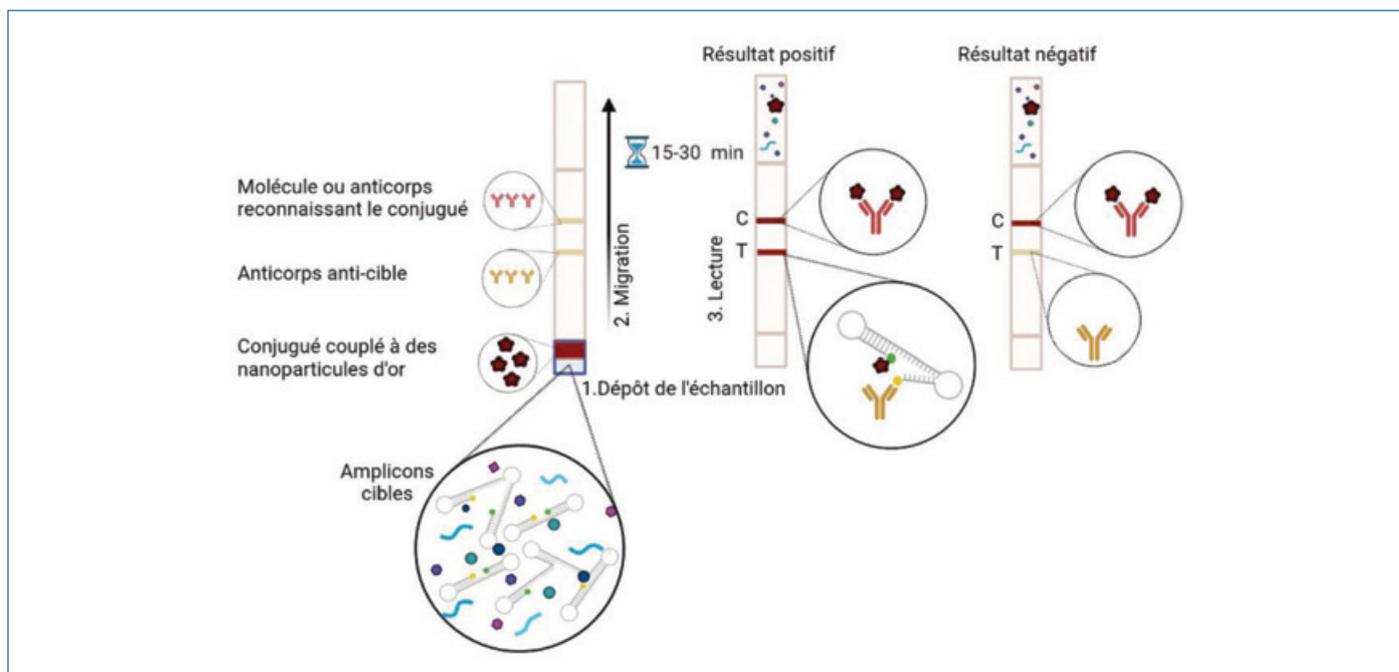


Figure 5 - Détection sur bandelette des brins d'ADN néosynthétisés par LAMP (amplicons cible).

façon que pour la PCR en temps réel. La turbidité peut aussi être mesurée au cours du temps, grâce à l'augmentation lors de l'amplification d'ions pyrophosphates libres qui se lient au magnésium contenu dans le milieu réactionnel, formant un précipité de pyrophosphate de magnésium [11]. Ces ions pyrophosphates libres sont libérés lorsqu'un désoxyribose nucléotide triphosphate (dNTP), composant élémentaire de l'ADN, est intégré dans la chaîne d'ADN nouvellement formée sous forme monophosphate (voir figure 2).

Ces méthodes fournissent des informations intéressantes mais nécessitent l'utilisation d'appareils sophistiqués pour la détection. De nombreux tests en point final ont été mis au point, qui présentent l'avantage d'être adaptés au format terrain. Les tests colorimétriques utilisent des indicateurs colorés pour mettre en évidence les changements de l'environnement chimique du milieu réactionnel :

- les indicateurs métalliques tels que le bleu d'hydroxynaphtol (HNB) ou la calcéine sont sensibles à la diminution de la concentration en magnésium libre par formation de magnésium pyrophosphate [12] ;

- les indicateurs de pH tels que le rouge de phénol, le rouge neutre et le rouge de crésol changent de couleur avec la diminution du pH (d'environ 8,8 à 6) au cours de la réaction du fait de la libération de protons lors de la liaison du pyrophosphate d'un dNTP avec la chaîne d'ADN en cours de formation [13].

Il est possible de coupler des amorces de LAMP avec une molécule se liant avec une autre molécule couplée aux nanoparticules d'or (par exemple biotine et streptavidine) et ainsi utiliser ce système comme détection colorimétrique. En effet, grâce à la propriété de résonance plasmonique des nanoparticules d'or, on observe un changement du rouge lorsqu'elles sont libres en solution au violet-bleu lorsqu'elles sont rapprochées les unes des autres. La turbidité peut également être observée à l'œil nu [14], ainsi que la fluorescence à l'aide d'une lampe UV [15]. Ces techniques de détection qualitatives peuvent manquer de précision, puisque soumises à la subjectivité d'interprétation de l'observateur, et conduire à des résultats qualifiés de faux positifs ou de faux négatifs.

Certains tests commerciaux sont accompagnés d'un petit lecteur pour la colorimétrie, la turbidité ou la fluorescence afin de pallier ce biais et de rendre le test plus fiable, comme par exemple Alethia®, intégrant l'incubation et la lecture, commercialisés par Meridian Bioscience®.

Il est également possible de coupler la LAMP à une détection sur bandelette [16]. Il faut pour cela marquer avec une étiquette deux des six amorces, une des étiquettes sera reconnue par l'anticorps fixé sur la membrane et l'autre formera une liaison avec le conjugué couplé à une nanoparticule d'or (par exemple l'étiquette biotine reconnue par la streptavidine couplée à l'or colloïdal), formant ainsi une ligne rouge en cas d'échantillon positif par accumulation des nanoparticules d'or à l'endroit où sont fixés les anticorps de la ligne test. La ligne contrôle sera constituée de molécules ou d'anticorps fixés reconnaissant le conjugué (figure 5).

Concernant la LAMP digitale [17], tout comme pour la PCR digitale, différents développements sont en cours afin de permettre d'être plus rapide et moins sensible que la PCR aux inhibiteurs. Ces techniques ne sont pas encore disponibles pour des applications sur le terrain car des appareils de lecture perfectionnés, comme par exemple un microscope confocal, sont nécessaires pour la lecture des résultats.

Détection et diagnostic par des systèmes commerciaux de LAMP

Il existe des tests déjà commercialisés qui se basent sur la technique de LAMP pour la détection d'agents pathogènes. De nombreux tests trouvent leur application en contrôle qualité dans l'industrie agro-alimentaire pour le contrôle des matières premières, des produits finis et de l'environnement de production. Il existe par exemple de nombreux kits et appareils pour la détection de *Salmonella*, des bactéries retrouvées dans les produits d'origine animale et pouvant être responsables d'infections gastro-intestinales graves. Ces tests étant destinés aux industriels, on retrouve majoritairement des tests de détection en temps réel, nécessitant une préparation de l'échantillon par du personnel formé et l'utilisation

d'un appareil pour la détection, mais présentant l'avantage d'un gain de temps par rapport aux méthodes de référence. D'autres tests trouvent leur application en diagnostic clinique, au « chevet du patient », avec un minimum de manipulation des échantillons et d'instrumentation. La LAMP est adaptable en dispositif terrain grâce à la possibilité de lyophilisation des réactifs et de détection en point final [7, 10]. Comme évoqué précédemment, la pandémie de Covid-19 a accéléré la recherche et le développement de dispositifs de diagnostic. Il existe donc plusieurs applications commerciales pour la détection du Covid-19 [10] mettant en œuvre la détection, d'un changement de couleur du milieu réactionnel, de la fluorescence ou de la turbidité, avec lecture et interprétation grâce à un lecteur [18], comme ID NOW™ commercialisé par Abbott. Le test Lucira™ a même été développé pour une utilisation à la maison, grâce à une préparation très simple ressemblant à celle effectuée pour les tests bandelette, et un appareil très compact pour l'incubation et la détection. Il existe également des applications en parasitologie, notamment pour le diagnostic du paludisme, une pathologie endémique causée par des parasites du genre *Plasmodium* et responsable d'une importante mortalité dans certaines régions d'Afrique. Deux dispositifs sont commercialisés pour diagnostiquer le paludisme par LAMP, avec détection des amplicons en point final (turbidité) : Loopamp™ (Eiken Chemical), et Alethia® (Meridian Bioscience Inc.), commercialisé avec un lecteur pour rendre l'interprétation plus objective [19]. Pour le diagnostic d'infections bactériennes, la détection de cibles multiples est indispensable pour l'identification de la bactérie et de ses résistances aux antibiotiques. En effet, ces informations sont codées par des gènes différents. Il existe des kits permettant la détection simultanée de plusieurs cibles avec détection par fluorescence en temps réel, comme eazplex® commercialisé par AmplexDiagnostics. Bien que ces solutions permettent de gagner en rapidité par rapport aux

méthodes de référence, la nécessité de manipulation par du personnel qualifié n'est pas adaptée au format terrain ou au chevet du patient. Un des leviers pour contourner ce problème est le multiplexage en puce microfluidique.

La microfluidique : une stratégie pour le multiplexage sur le terrain

La microfluidique est une technologie permettant la manipulation de fluides dans des canaux à l'échelle micrométrique. Son utilisation dans le cadre d'une application à un test analytique permet la réduction des volumes réactionnels afin d'obtenir un dispositif compact et adapté à l'utilisation sur le terrain, et également de réduire les coûts en réactifs. Cela peut également contribuer à la simplification des manipulations en permettant l'intégration de toutes les étapes (préparation de l'échantillon, amplification, détection) au sein d'un unique dispositif. Les possibilités de design sont infinies et permettent de répondre à la spécificité de chaque projet.

Différents articles publiés ces dernières années décrivent des dispositifs microfluidiques permettant de réaliser des réactions de LAMP multiplexes pour la détection d'agents pathogènes. Ces puces microfluidiques sont pour la plupart fabriquées en matériau plastique sous le format de canaux et de chambres en parallèle [20] (figure 6a). Certaines publications présentent des puces sous le format de disques à centrifuger (figure 6b), permettant l'avancée des réactifs dans les différents compartiments de la puce grâce à la force centrifuge [21]. Une publication rapporte un format original avec une centrifugation à la main, permettant de s'affranchir totalement d'équipement autre que le dispositif de chauffage [22]. Dans cette optique d'utilisation réduite d'équipement, des puces ont été réalisées intégralement en papier tout en intégrant les étapes de préparation de l'échantillon, d'amplification et de détection [23] (figure 6c). Ces différents matériaux

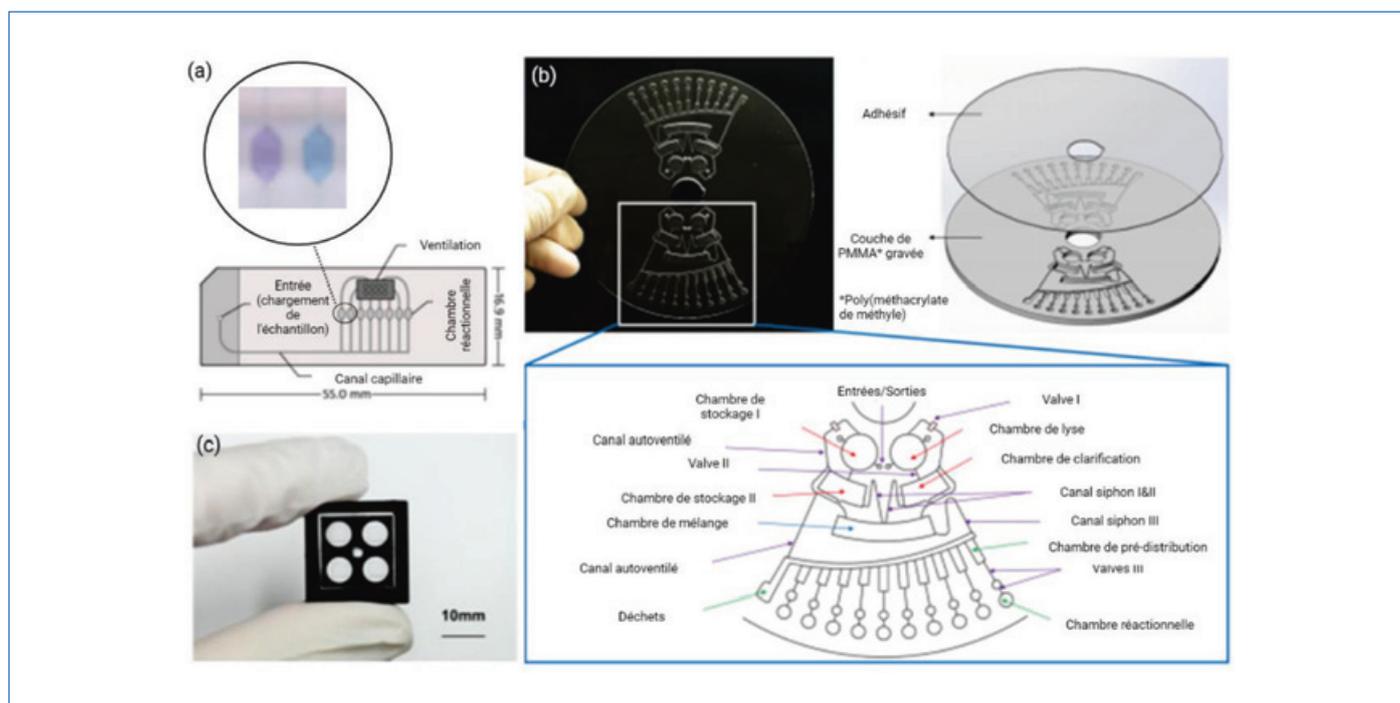


Figure 6 - Systèmes microfluidiques pour la réalisation de réactions d'amplification LAMP pour la détection de cibles multiples à partir d'un échantillon. (a) Canaux et huit chambres de réaction en parallèle, exemple de résultat positif (bleu ciel, à droite) et négatif (violet, à gauche) avec un test colorimétrique en puce avec du HNB. (b) Puce sous le format de disque à centrifuger avec vingt chambres réactionnelles. (c) Puce en papier avec quatre compartiments réactionnels (assemblage de papier de verre, membrane de polysulfone et membrane de polyéthylène sulfoné imprimée à la cire pour la rendre hydrophobe). (Adapté de [20], [21] et [22]).

sont adaptés à un usage unique, car ils sont faciles et peu coûteux à produire en grande quantité. Le chauffage est réalisé en bain-marie ou sur un bloc chauffant, et la détection est faite par colorimétrie, fluorescence ou sur bandelette. Le dispositif RTisochip-A™ microfluidique de LAMP pour la détection de bactéries a été commercialisé en Chine par Capitalbio [24]. Il permet la détection de 24 cibles simultanément en utilisant seulement 34,5 µL d'échantillon. Les réactifs sont répartis vers les chambres réactionnelles par centrifugation et la détection des amplicons est réalisée en temps réel par fluorescence. C'est un dispositif prometteur mais qui nécessite l'utilisation d'un appareil encombrant pour la centrifugation et la détection.

Vers une commercialisation des dispositifs microfluidiques de LAMP ?

La LAMP peut présenter une alternative aux méthodes de référence et à la PCR pour le diagnostic des maladies infectieuses dans les territoires isolés ou ne bénéficiant pas d'infrastructures sophistiquées. Tout en permettant de gagner en rapidité, sensibilité et spécificité, cette technique est facilement implémentable en dispositif au chevet du patient grâce à la miniaturisation en microfluidique. Pour remplacer les méthodes de référence, les dispositifs développés doivent être faciles d'utilisation et ne pas nécessiter d'instrumentation. La limite de détection doit être semblable, voire plus performante que celle des dispositifs déjà commercialisés. De plus, les résultats obtenus doivent être robustes et reproductibles pour être validés par les autorités sanitaires. Pour passer de la preuve de concept à un produit commercial, tous les aspects de production, conservation des réactifs et d'acheminement ainsi que les aspects réglementaires doivent être pris en compte. Les différentes preuves de concepts récemment publiées permettent d'envisager une commercialisation de dispositifs microfluidiques de LAMP simples, robustes et efficaces pour lutter contre la propagation de maladies infectieuses.

[1] K.J. Land, D.I. Boeras, X.S. Chen, A.R. Ramsay, R.W. Peeling, REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes, *Nat. Microbiol.*, **2019**, 4(1), p. 46-54.
 [2] C.J. Murray *et al.*, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *The Lancet*, **2022** ([www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext)).
 [3] K.B. Mullis, Process for amplifying nucleic acid sequences, EP 0 201 184 B1, **1986**.
 [4] L. Pray, Major molecular events of DNA replication, *Nature Educ.*, **2008**, 1(1), 99.
 [5] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Digital PCR, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1999**, 96(16), p. 9236-41.
 [6] T.K.F. Yung *et al.*, Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients, *Clin. Cancer Res.*, **2009**, 15(6), p. 2076-84.

[7] T. Notomi *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28(12), e63.
 [8] J. Compton, Nucleic acid sequence-based amplification, *Nature*, **1991**, 350(6313), p. 91-92.
 [9] G.T. Walker *et al.*, Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique, *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20(7), p. 1691-96.
 [10] M. Soroka, B. Wasowicz, A. Rymaszewska, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?, *Cells*, **2021**, 10(8), 1931.
 [11] Y. Mori, M. Kitao, N. Tomita, T. Notomi, Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2004**, 59(2), p. 145-157.
 [12] M. Goto, E. Honda, A. Ogura, A. Nomoto, K.I. Hanaki, Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue, *BioTechniques*, **2009**, 46(3), p. 167-172.
 [13] Y. Wang *et al.*, Development of a potential penside colorimetric LAMP assay using neutral red for detection of African swine fever virus, *Front. Microbiol.*, **2021** (www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.609821).
 [14] S. Tamura *et al.*, Development of a highly resolved loop-mediated isothermal amplification method to detect the N526K ftsI mutation of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*, *J. Microbiol. Methods*, **2017**, 141, p. 108-114.
 [15] Q. Li *et al.*, Visual detection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) simultaneously by duplex loop-mediated isothermal amplification, *Food Chem. Mol. Sci.*, **2022**, 4, 100107.
 [16] Y. Wang *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, *Front. Microbiol.*, **2017**, 8, 192.
 [17] C. Wu *et al.*, TriD-LAMP: a pump-free microfluidic chip for duplex droplet digital loop-mediated isothermal amplification analysis, *Anal. Chim. Acta*, **2022**, 1233, 340513.
 [18] O.I. Wilner, D. Yesodi, Y. Weizmann, Point-of-care nucleic acid tests: assays and devices, *Nanoscale*, **2023**, 15(3), p. 942-952.
 [19] U. Morris, B. Aydin-Schmidt, Performance and application of commercially available loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kits in malaria endemic and non-endemic settings, *Diagnostics*, **2021**, 11(2), 336.
 [20] Y. Wang *et al.*, Genotyping of 30 kinds of cutaneous human papillomaviruses by a multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification and visual detection method, *Viol. J.*, **2020**, 17(1), 99.
 [21] H. Yan *et al.*, Multiplex detection of bacteria on an integrated centrifugal disk using bead-beating lysis and loop-mediated amplification, *Sci. Rep.*, **2017**, 7(1), 1460.
 [22] M. Li, A. Ge, M. Liu, B. Ma, C. Ma, C. Shi, A fully integrated hand-powered centrifugal microfluidic platform for ultra-simple and non-instrumental nucleic acid detection, *Talanta*, **2020**, 219, 121221.
 [23] Y. Seok *et al.*, A paper-based device for performing loop-mediated isothermal amplification with real-time simultaneous detection of multiple DNA targets, *Theranostics*, **2017**, 7(8), p. 2220-30.
 [24] Z. Li *et al.*, Fully integrated microfluidic devices for qualitative, quantitative and digital nucleic acids testing at point of care, *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, 177, 112952.

Capucine TREILLE*, doctorante, **Karla PEREZ-TORALLA**, ingénieure-chercheuse, **Hervé VOLLAND**, ingénieur-chercheur, **Stéphanie SIMON**, ingénieure-chercheuse, et **Hervé BOUTAL**, ingénieur-chercheur, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et technologies pour la santé (DMTS), SPI, Gif-sur-Yvette.

* capucine.treille@cea.fr



Spectrométrie de masse et intelligence artificielle pour cartographier le vivant

Résumé La spectrométrie de masse (SM) est une technique d'analyse très sensible permettant d'analyser des composés organiques avec une limite de détection pouvant atteindre la femtomole. Les récents progrès d'analyse des peptides par SM en tandem (SM/SM) permettent d'établir l'identité de milliers de protéines contenues dans des échantillons aussi complexes que les microbiotes. Toutefois, gérer d'énormes quantités de données est un vrai défi et une chance à saisir. L'intelligence artificielle (IA) joue un rôle clé pour l'interprétation des spectres et leur attribution à des séquences de peptides. L'IA révolutionne également l'analyse des données sur ces millions de composés chimiques qui aboutit à l'identification des protéines, des organismes qui les ont produites et bien d'autres informations. Cet article décrit comment une cartographie détaillée des microbiotes humains peut être obtenue à l'aide de la SM, cette technique permettant d'identifier un nombre important de protéines présentes dans les échantillons contenant ces microbiotes (fèces, salive...). Ces informations peuvent être exploitées en associant l'analyse métabolomique à l'IA pour identifier les organismes présents ainsi que leurs profils fonctionnels. Des biomarqueurs peuvent ainsi être identifiés en exploitant les données obtenues, permettant la sélection des cibles les plus pertinentes pour des traitements thérapeutiques.

Mots-clés Spectrométrie de masse, intelligence artificielle, métabolomique, biomarqueurs.

Abstract Mass spectrometry and artificial intelligence to map living

Mass spectrometry (MS) is a highly sensitive technique for analysing organic compounds with a detection limit of up to femtomole. Recent advances in peptide analysis using tandem mass spectrometry (MS/MS) have made it possible to establish the identity of tens of thousands of proteins contained in samples as complex as microbiota. However, managing huge quantities of data is a real challenge and an opportunity to be seized. Artificial intelligence (AI) is playing a key role in interpreting spectra and assigning them to peptide sequences. AI is also revolutionising the analysis of data on these millions of chemical compounds, leading to the identification of proteins, the organisms that produced them, and much other functional information. This article describes how a very detailed mapping of the different human microbiota can be obtained, making it possible to identify a very large number of proteins contained in samples taken from these microbiota (faeces, saliva, etc.), thus making it possible to identify the organisms present and their functional profiles using metaproteomics coupled with AI. Biomarkers can thus be identified by exploiting the data, enabling the selection of the most relevant targets for therapeutic treatments.

Keywords Mass spectrometry, artificial intelligence, metaproteomics, biomarkers.

L'étude des différents microbiotes humains a connu un développement fulgurant au cours des dernières années, mettant en avant leurs rôles prépondérants dans le fonctionnement du corps humain [1]. Un microbiote humain correspond à l'ensemble des bactéries, champignons, virus et archées présents dans une partie spécifique du corps humain telle que l'intestin ou la peau par exemple, il a été démontré que les micro-organismes présents y accomplissent des tâches utiles, voire essentielles à la survie de l'individu hôte. Par conséquent, l'étude du microbiote et de ses altérations qualitatives et/ou fonctionnelles (dysbiose) est devenue essentielle pour la recherche médicale, en particulier pour le microbiote intestinal, étroitement associé à l'apparition et au développement de plusieurs maladies [2]. Pour mieux comprendre et prédire ces maladies, de nombreuses analyses visant à détecter de potentiels biomarqueurs ont été conduites. En effet, les biomarqueurs sont des indicateurs biologiques mesurables dont la présence ou l'absence peut être utilisée pour diagnostiquer une maladie, prédire et/ou suivre son évolution, identifier différentes sous-populations de patients, ainsi que prévoir et surveiller leur réponse à des traitements. L'ensemble des travaux réalisés en cancérologie est un important corpus illustrant ce domaine [3]. Dès lors, l'alliance entre biomarqueurs et microbiotes humains apparaît comme un élément-clé pour la

médecine du futur, pouvant favoriser et améliorer le diagnostic clinique et les prédictions pronostiques.

Bien que plusieurs biomarqueurs candidats ont été mis en évidence dans différentes études, peu ou aucun basé sur le microbiote n'a été mis en œuvre dans la pratique clinique. En effet, des facteurs de confusion entre les études masquent souvent les véritables caractéristiques des communautés microbiennes et peuvent donc conduire à des conclusions peu fiables en raison du caractère très éparpillé des ensembles de données microbiennes. Par conséquent, des méthodes informatiques pour l'intégration des données d'analyse du microbiote provenant de différentes cohortes sont urgentes. Pour y parvenir, deux défis majeurs se posent : l'acquisition des données biologiques à un niveau de précision très fin, et le traitement de ces énormes quantités de données. Pour y répondre, la spectrométrie de masse à haute résolution se révèle de plus en plus une technique d'analyse pertinente. En effet, grâce aux développements récents, les spectromètres de masse de dernière génération de type LC-MS/MS permettent d'établir l'identité de plusieurs dizaines de milliers de protéines dans des échantillons aussi complexes que les microbiotes [4]. D'autre part, l'émergence de l'intelligence artificielle (IA) représente une véritable opportunité dans ce domaine. Permettant de gérer les énormes quantités de données

produites par spectrométrie de masse, mais aussi les problèmes liés aux données de microbiotes (caractère éparés, composite et à haute dimension), l'IA joue déjà un rôle clé pour l'interprétation et l'analyse des données, permettant d'obtenir une cartographie des différents microbiotes humains [5]. Ainsi, nous décrivons ici comment une cartographie très détaillée des différents microbiotes humains peut être obtenue, comment des biomarqueurs peuvent être identifiés, et comment les cibles les plus pertinentes pour des traitements thérapeutiques peuvent être sélectionnées.

La spectrométrie de masse

Fonctionnement

La spectrométrie de masse (SM) est une technique d'analyse physico-chimique permettant la détection, l'identification et la quantification de molécules par mesure de leurs masses [6], avec une limite de détection pouvant atteindre la femtomole (10^{-15} mole). Le principe de l'analyse par SM consiste en la conversion de molécules en ions qui sont ainsi manipulés par des champs électriques et magnétiques et séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Pour ce faire, trois composants du spectromètre de masse sont nécessaires : la source d'ionisation qui ionise les molécules à caractériser, l'analyseur de masse qui trie les ions en fonction de leur ratio masse/charge (m/z), et le détecteur qui mesure l'intensité des ions pour chaque valeur m/z . Ces ions sont produits par méthodes d'ionisation (dites « douces ») de la molécule, consistant à l'ajout d'un ion (H^+ par exemple) ou à la soustraction d'un électron à la molécule d'intérêt (ionisation électrospray par exemple). Il est ensuite possible de fragmenter ces ions (dits précurseurs) en ions fils, dans le cadre d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS, ou MS^2), permettant d'augmenter la capacité d'analyse des molécules. Des informations structurales sur la molécule introduite peuvent ainsi être obtenues, représentées sous la forme d'un spectre de masse, un graphique représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport m/z . La spectrométrie de masse est très souvent couplée aux méthodes séparatives telles que les chromatographies en phase gazeuse ou liquide, qui permettent une séparation optimale des composés d'un échantillon afin de le décomplexifier.

Les récents progrès dans ce domaine, tels que les innovations technologiques introduites avec le spectromètre de masse à temps de vol (« time of flight », TOF) ou l'analyseur Orbitrap, permettant de détecter précisément plusieurs dizaines de molécules contenues dans des échantillons très complexes, rendent possible l'application de la SM à des échantillons humains extrêmement complexes.

Application au vivant : la métaprotéomique

L'analyse des protéines d'un organisme, ou protéomique, a toujours été considérée comme pertinente pour cartographier les acteurs moléculaires du vivant [7]. En effet, les protéines constituent les briques élémentaires des organismes vivants et rendent compte du fonctionnement d'un organisme par les différentes fonctions accomplies. Jusqu'à récemment, la protéomique n'était néanmoins pas aussi largement utilisée que l'analyse des gènes d'un organisme (génomique), principalement en raison d'un coût plus élevé et de son accessibilité limitée pour les non-spécialistes. Ces limites ayant été résolues par les récents progrès technologiques, la protéomique a connu des progrès fulgurants en parallèle au développement

de la SM. Désormais, ces progrès permettent l'émergence d'une nouvelle approche qui révolutionne l'analyse des microbiotes humains : la métaprotéomique.

La métaprotéomique étudie le contenu protéique d'échantillons complexes, tels que ceux de microbiotes humains. Les différentes étapes d'une analyse métaprotéomique sont détaillées en *figure 1*. L'étape initiale consiste à extraire efficacement les protéines de l'échantillon complexe, puis à les digérer en peptides. En raison de leurs propriétés chimiques similaires, en comparaison aux protéines, les peptides se prêtent mieux à la séparation par chromatographie liquide et à l'analyse ultérieure par spectrométrie de masse. Chaque analyse métaprotéomique produit des dizaines, voire des centaines de milliers de spectres de masse qui sont ensuite utilisés pour l'identification des peptides et des protéines. Les données obtenues sont donc ceux de peptides qui seront assemblés pour retrouver la cartographie protéique, taxonomique et fonctionnelle de l'échantillon initial. En fournissant une cartographie complète de l'état fonctionnel d'un microbiote, tout en permettant de rendre compte de sa composition taxonomique avec la même précision que la métagénomique, la métaprotéomique permet de pallier les faiblesses de cette dernière, notamment en termes de rapidité d'analyse et de l'observation réelle des fonctions assurées.

Bien que nous ne sommes encore qu'aux prémices de l'application de la métaprotéomique, les dernières études démontrent son rôle plus que prometteur quant à la découverte de biomarqueurs pour le diagnostic, le suivi et l'évaluation de traitements de nombreuses maladies. On peut notamment citer son potentiel dans le diagnostic des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Grâce à la métaprotéomique, le paysage taxonomique et fonctionnel des microorganismes du microbiote intestinal de divers phénotypes de patients atteints de MICI a pu être caractérisé et comparé à celui de patients sains, permettant d'identifier les différences taxonomiques et fonctionnelles, ainsi que les différences de profils d'abondance protéiques, signatures de ces maladies [8]. Néanmoins, le potentiel de la métaprotéomique et son application en clinique restent encore restreints [9].

De fait, deux principaux défis se posent : d'une part, analyser le plus de protéines dans un temps le plus court possible, et d'autre part, interpréter les données en attribuant les signaux enregistrés aux bonnes protéines, et les protéines aux bons taxa. Le premier défi est en passe d'être résolu avec la dernière génération de spectromètres de masse qui permettent d'identifier un protéome global en moins de dix minutes. Quant au deuxième défi, l'application à la métaprotéomique de l'intelligence artificielle, qui bénéficie d'un ensemble de théories et techniques qui ne cessent de s'améliorer au fil du temps, est prometteuse.

L'intelligence artificielle

Principes généraux

L'intelligence artificielle (IA) rassemble l'ensemble des sciences, techniques, théories et technologies qui permettent de mimer, d'augmenter ou d'étendre l'intelligence humaine à l'aide de machines [10]. Ce terme est souvent confondu avec celui d'apprentissage automatique (« machine learning »), qui est un champ d'étude de l'IA ayant pour but de permettre à des machines d'apprendre à partir d'un jeu de données spécifiques en utilisant des modèles mathématiques. Cette forme d'apprentissage vise à résoudre diverses tâches, comme

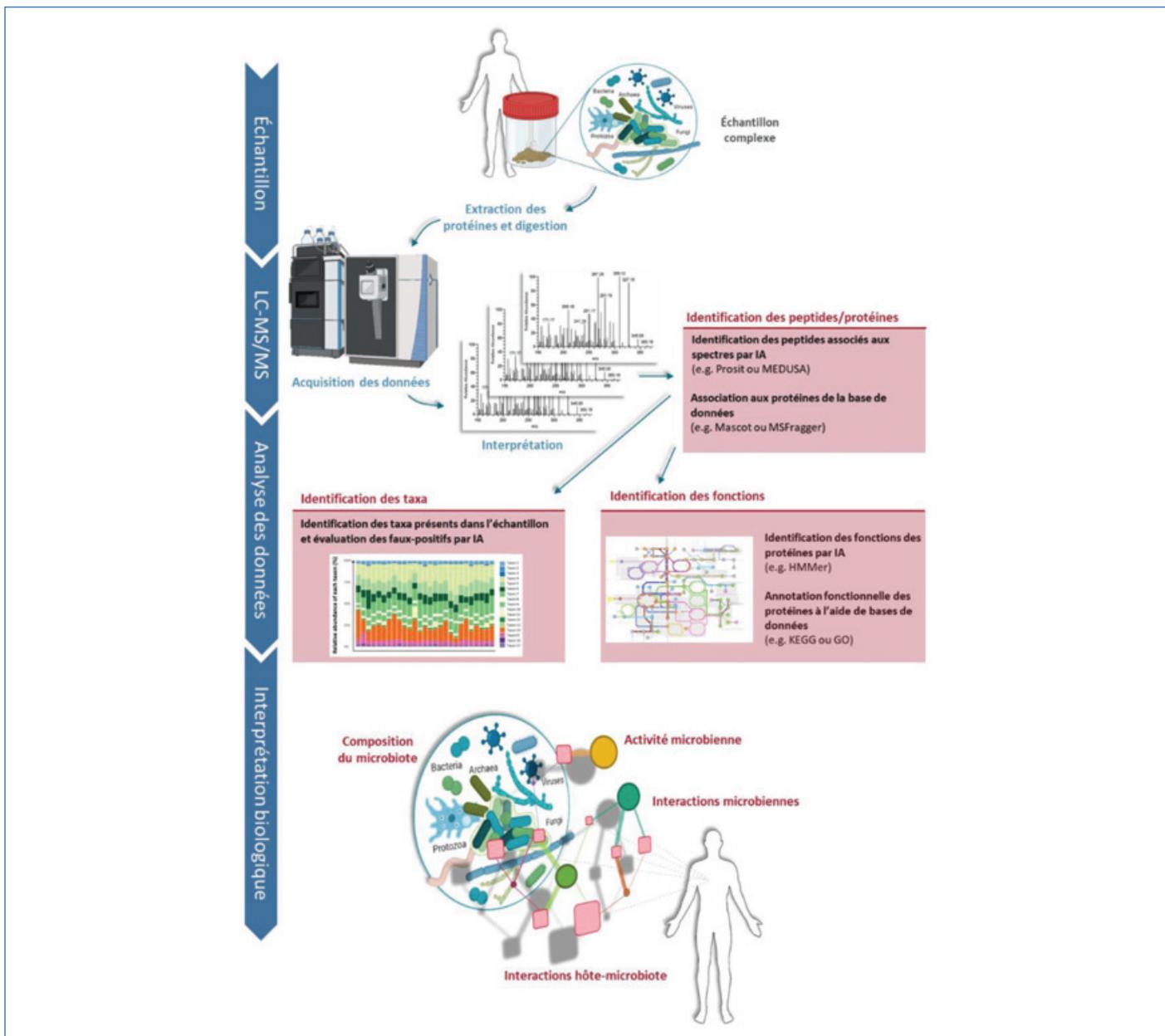


Figure 1 - Différentes étapes d'une analyse métaprotéomique et apports de l'intelligence artificielle.

| Données d'entraînement | | | |
|------------------------|-----------------|--------------|-----------------------|
| Caractéristiques | | | Sortie |
| Spore | Flagelle | Forme | Type Bactérie |
| Non | Non | coques | <i>Streptococcus</i> |
| Oui | Oui | bacilles | <i>Bacillus</i> |
| Non | Oui | bacilles | <i>Pseudomonas</i> |
| Non | Non | coques | <i>Streptococcus</i> |
| Non | Non | spirochètes | <i>Treponema</i> |
| Oui | Oui | bacilles | <i>Bacillus</i> |
| Non | Non | coques | <i>Staphylococcus</i> |
| Non | Non | spirochètes | <i>Leptospira</i> |
| Non | Oui | bacilles | <i>Salmonella</i> |
| Oui | Oui | bacilles | <i>Clostridium</i> |
| Oui | Oui | bacilles | <i>Bacillus</i> |
| Données de test | | | |
| Oui | Oui | bacilles | ? |

Tableau 1 - Composition des données d'entraînement et de test de l'arbre de décision.

l'identification d'une bactérie en fonction d'un ensemble de caractéristiques définies. Il existe différents modèles mathématiques, allant de simples à complexes, qui démontrent des performances variables selon le jeu de données d'entraînement et de l'objectif recherché.

Parmi les modèles les plus simples et intuitifs pour comprendre le principe de l'apprentissage automatique se trouve l'arbre de décision. Les données d'entraînement et de test du modèle correspondent à la liste des différentes caractéristiques (« features ») connues sur les données ainsi que sur la tâche à réaliser ou sortie (« output »). Pour illustrer le propos, les données peuvent être représentées comme indiqué dans le *tableau 1*.

Le modèle d'arbre de décision est entraîné sur les données d'entraînement, ce qui lui permet de créer un ensemble de choix de valeurs de caractéristiques (automatiquement calculés comme ceux maximisant la performance du modèle) afin de classer les données (prédiction de l'« output »). Une manière plus simple d'appréhender cette tâche est de la représenter sous la forme d'un graphique (*figure 2*). Les chiffres à la fin des branches de l'arbre représentent les

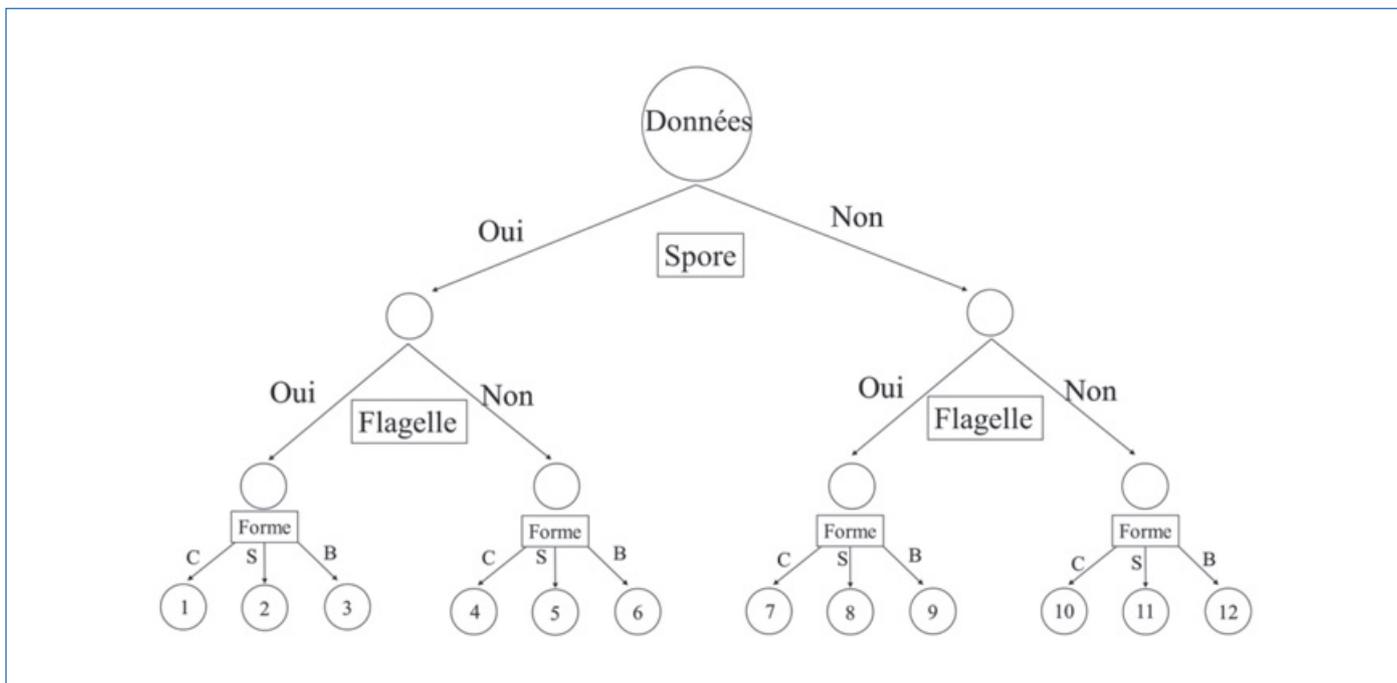


Figure 2 - Arbre de décision obtenu après entraînement sur les données d'entraînement. Chaque nœud représente les données qui seront divisées en d'autres nœuds en fonction des valeurs des « features ». C : coques ; S : spirochètes ; B : bacilles.

| Chemin | Prediction |
|--------|---|
| 1 | Hors modèle |
| 2 | Hors modèle |
| 3 | 75 % <i>Bacillus</i> 25 % <i>Clostridium</i> |
| 4 | Hors modèle |
| 5 | Hors modèle |
| 6 | Hors modèle |
| 7 | Hors modèle |
| 8 | Hors modèle |
| 9 | 50 % <i>Pseudomonas</i> 50 % <i>Salmonella</i> |
| 10 | 66,66 % <i>Streptococcus</i> 33,33 % <i>Staphylococcus</i> |
| 11 | 50 % <i>Treponema</i> 50 % <i>Leptospira</i> |
| 12 | Hors modèle |

Tableau II - Chemins de l'arbre de décision et prédictions associées.

différentes prédictions possibles, résumées dans le *tableau II*. Chaque prédiction est accompagnée de probabilités d'appartenance à chaque classe (type de bactérie dans notre exemple), calculées à partir des données d'entraînement. Les prédictions n'ayant pas été observées dans les données d'entraînement sont qualifiées d'hors modèle, et par conséquent ne sont pas assorties de probabilités.

Ainsi à l'aide de ce modèle, les données de test auront pour prédiction le chemin 5, correspondant à une probabilité de 25 % que ces caractéristiques appartiennent à la bactérie *Clostridium*, et une probabilité de 75 % qu'elles appartiennent à la bactérie *Bacillus*.

Ce cas d'application de l'apprentissage automatique répond à un problème de classification de données. Néanmoins, il

existe bien d'autres problèmes pouvant être résolus par les différents modèles développés depuis plusieurs décennies. On peut notamment citer les modèles visant à réduire le bruit dans les données enregistrées, ou encore ceux ayant pour but de détecter des erreurs dans les données pouvant résulter d'une mauvaise qualité des données ou à un excès de bruit, par exemple. L'apprentissage automatique se révèle ainsi être un outil idéal pour gérer les immenses quantités de données générées dans différents contextes, notamment les énormes jeux de données biologiques produits par l'analyse en spectrométrie de masse.

Application à la métaprotéomique

Le premier défi en protéomique, et par conséquent en métaprotéomique, est l'interprétation des spectres obtenus en sortie du spectromètre de masse, de sorte à pouvoir obtenir la liste des peptides présents dans l'échantillon analysé [11].

Jusqu'à très récemment, les méthodes d'interprétation implémentées dans les moteurs de recherche des bases de données, tels que MSFragger ou Mascot, étaient exclusivement basées sur des approches statistiques [12]. La validation des interprétations ainsi obtenues est essentielle de par le fait que la comparaison des spectres expérimentaux et théoriques (générés par ces moteurs de recherche) peut engendrer des faux positifs, c'est-à-dire une mauvaise attribution d'un spectre SM/SM à un peptide. La stratégie utilisée pour évaluer ces faux positifs est appelée « target-decoy » (TDA, « target decoy approach »). Cette stratégie consiste en la quantification des interprétations obtenues dans une base de données protéique cible (target) d'une part, et dans une base de données protéique leurre (decoy) d'autre part. Les séquences leures représentent les mauvaises attributions ou faux positifs et peuvent être générées de différentes manières, soit de manière aléatoire ou en inversant les séquences. Ainsi, le nombre de séquences leures attribuées fournit une estimation de faux positifs, ce qui permet de calculer le taux de

fausses découvertes (FDR, « false discovery rate »). L'objectif est de limiter les faux positifs lors de l'attribution des spectres aux peptides ; dans cette optique, la valeur de FDR souvent retenue est de 1 %. Cependant, bien que cette approche soit souvent très performante, elle présente des limites, notamment lorsque le taux observé de faux positifs dans des échantillons à composition connue est anormalement élevé du fait de la forte densité de l'information enregistrée et de la taille atypique de la base de données.

Pour résoudre ce défi, des approches basées sur l'apprentissage automatique ont été développées récemment. Un exemple est le moteur de recherche MEDUSA, proposé en 2022, qui utilise des modèles de classification tels que le « random forest » et le « gradient boosting », pour enlever les pics isotopiques et simplifier le spectre, i.e. le « deisotoping » [13]. Le déisotopage consiste à supprimer les pics correspondant aux isotopes lourds naturels dans les spectres de masse, afin de réduire la complexité des données et améliorer l'annotation des spectres.

De nombreuses autres méthodes pourraient également être appliquées à ces données pour en réduire le bruit et ainsi améliorer l'annotation. On peut notamment citer les méthodes de réduction de bruit, ainsi que les méthodes dites de classification non supervisée, permettant d'annoter des données en fonction de leurs caractéristiques, sans connaître leurs véritables annotations, notamment la séquence peptidique.

Suite à l'identification des peptides dans l'échantillon, se pose le problème d'attribuer ces peptides aux protéines d'origine. En métaprotéomique, ce problème est particulièrement complexe car un peptide peut être commun à plusieurs protéines d'un même organisme, isoformes ou pas, et de plus, une protéine identifiée peut être partagée par plusieurs taxa, ce qui rend difficile l'attribution des peptides aux différents organismes.

Actuellement, différentes méthodes sont utilisées en métaprotéomique, regroupées en deux groupes principaux :

- les méthodes redondantes, ou non parcimonieuses, consistent à attribuer les peptides à toutes les protéines possibles, et donc ont tendance à sur-interpréter les résultats ;
- les méthodes parcimonieuses attribuent chaque peptide à une protéine unique selon des critères définis et sont donc plus justes en principe. L'approche de parcimonie la plus connue est celle du « rasoir d'Ockam », basée sur « l'hypothèse suffisante la plus simple est la plus vraisemblable ». Ce principe attribue chaque peptide à la protéine la plus abondante parmi toutes celles auxquelles il peut être théoriquement attribué ; l'abondance d'une protéine étant la somme des signaux des peptides identifiés comme lui appartenant.

Le développement des méthodes avancées de quantification est donc crucial pour une interprétation précise. Afin de quantifier la présence de chaque espèce dans l'échantillon et d'identifier leur activité fonctionnelle, il est donc essentiel de développer des méthodes robustes et efficaces de quantification et de parcimonie. Il est évident que l'apprentissage automatique permettra dans les années à venir d'améliorer ces procédés. Notamment, l'utilisation de modèles probabilistes, en particulier les méthodes dites bayésiennes [14], sont à envisager car elles permettent, entre autres choses, d'extraire des informations cruciales à partir de petits ensembles de données et de traiter les données manquantes. Considérant la probabilité comme une mesure de la confiance ou de la vraisemblance de l'occurrence d'un événement, il est alors

possible de choisir un scénario probabiliste maximisant cette confiance ; le scénario étant en l'occurrence l'attribution des peptides aux différentes protéines.

Un dernier problème que l'on pourrait citer concerne les données manquantes, un défi bien connu en apprentissage automatique. En effet, certaines protéines ne sont pas présentes dans les bases de données (protéines inconnues ou mal annotées), rendant leur identification impossible. Pour résoudre cette problématique, des méthodes d'apprentissage automatique utilisant les réseaux de neurones, telles que DeepNovo [15], ont commencé à être utilisées pour le séquençage *de novo* des peptides, permettant de s'affranchir de la nécessité d'une base de données parfaite.

Un autre défi majeur à relever concerne l'annotation fonctionnelle. En effet, les bases de données sont loin de contenir une annotation fonctionnelle suffisamment précise pour chaque protéine, ce qui rend difficile l'interprétation des données. L'approche la plus connue pour annoter fonctionnellement une protéine dont la fonction n'a pas été confirmée expérimentalement est basée sur la recherche par similarité de séquence [16]. En général, les protéines homologues, i.e. ayant les mêmes fonctions, présentent un fort degré de similarité de séquence. L'une des méthodes d'apprentissage automatique les plus connues dans ce domaine utilise un modèle de Markov caché, qui est un modèle statistique représentant les probabilités de transition d'un état à l'autre. Dans ce cas, le modèle est entraîné sur un alignement de plusieurs séquences ayant la même fonction, afin d'identifier les motifs signatures de la fonction de ces séquences. En appliquant ce modèle à des séquences à fonctions inconnues, il est possible d'identifier, avec un certain degré de confiance, la fonction que pourrait avoir une protéine.

Néanmoins, il reste encore beaucoup à faire dans ce domaine, et les récents développements en apprentissage automatique permettront sans aucun doute une bien meilleure annotation fonctionnelle des protéines. On peut notamment citer la révolution AlphaFold [17], dont la première version date de 2018, permettant de prédire la structure en trois dimensions d'une protéine uniquement à l'aide de sa séquence. L'utilisation de cet outil pour l'annotation fonctionnelle semble prometteuse, en permettant une analyse par similarité de structure. En effet, sachant que les protéines adoptent une structure tridimensionnelle qui leur permet d'assurer leur fonction biologique, utiliser les prédictions d'AlphaFold pour prédire la fonction d'une protéine à travers sa structure, ou plus particulièrement la structure de son site actif, semble être la clé pour résoudre ce problème.

Il y a donc de nombreux défis à relever pour permettre à la métaprotéomique de jouer un rôle clé dans la médecine de demain, notamment à travers l'identification de biomarqueurs, ces biomarqueurs étant basés sur le microbiote et identifiés par analyse métaprotéomique. Néanmoins, l'ensemble de ces défis apparaît comme des opportunités à saisir. De plus, en observant la vitesse fulgurante à laquelle l'IA se développe, ces défis sont voués à être résolus dans un futur proche. Une fois ces défis relevés, l'analyse métaprotéomique, couplant l'analyse par SM et l'interprétation de ces données par IA, permettra d'obtenir une véritable cartographie du vivant, et par extension permettra une utilisation massive en tant qu'outil de diagnostic. Cela modifiera les approches cliniques classiquement utilisées et ouvrira la porte à une médecine de précision offrant des traitements plus personnalisés.

Vers une cartographie du vivant

L'utilisation combinée de la spectrométrie de masse et de l'intelligence artificielle (SM-IA) permet dès aujourd'hui d'obtenir une cartographie détaillée de différents microbiotes. Cette cartographie détaille les micro-organismes présents ainsi que leurs activités fonctionnelles, en étudiant les activités et fonctions des protéines qui composent ces micro-organismes. Elle permet également de comprendre l'activité fonctionnelle de l'hôte. Les informations obtenues sont cruciales pour comprendre l'activité du microbiote et la réponse de l'hôte en vue d'identifier de potentiels biomarqueurs. Exploiter les signatures de microbiotes ainsi obtenues représente un potentiel conséquent pour l'identification de biomarqueurs de diagnostic de maladies. Ces biomarqueurs pourraient ainsi être utilisés, combinés aux données cliniques et à d'autres biomarqueurs pour mieux comprendre et caractériser les pathologies. Il est cependant important de noter qu'un autre défi qui se posera dans ce cas sera celui d'évaluer l'impact de la variabilité interindividuelle observée dans la composition taxonomique et fonctionnelle des microbiotes sur les biomarqueurs mis en évidence par ces approches métaprotéomiques. Cela constituera également un défi pouvant être relevé à l'aide de l'intelligence artificielle, en vue de faciliter le transfert de ces biomarqueurs des laboratoires de recherche vers les équipes cliniques [18]. En conséquence, l'approche SM-IA pour l'identification de biomarqueurs aura des implications significatives pour le diagnostic et la médecine personnalisée.

- [1] A. El-Sayed, L. Aleya, M. Kamel, Microbiota's role in health and diseases, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **2021**, *28*, p. 36967-983.
- [2] L. Grenga et al., Taxonomical and functional changes in Covid-19 faecal microbiome could be related to SARS-CoV-2 faecal load, *Environ. Microbiol.*, **2022**, *24*, p. 4299-316.
- [3] E. Pons-Tostivint, A. Lugat, J.-F. Fontenau, M.G. Denis, J. Bennouna, STK11/LKB1 modulation of the immune response in lung cancer: from biology to therapeutic impact, *Cells*, **2021**, *10*, 3129.
- [4] B.A. Rappold, Review of the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical laboratories: part I, Development, *Ann. Lab. Med.*, **2022**, *42*, p. 121-140.

- [5] O. Pible et al., Estimating relative biomasses of organisms in microbiota using "phylopeptidomics", *Microbiome*, **2020**, *8*, 30.
- [6] B. Domon, R. Aebersold, Mass spectrometry and protein analysis, *Science*, **2006**, *312*, p. 212-217.
- [7] J.L. Harry et al., Proteomics: capacity versus utility, *Electrophoresis*, **2000**, *21*, p. 1071-81.
- [8] C. Henry et al., Modern metaproteomics: a unique tool to characterize the active microbiome in health and diseases, and pave the road towards new biomarkers - Example of Crohn's disease and ulcerative colitis flare-ups, *Cells*, **2022**, *11*, 1340.
- [9] J. Armengaud, Metaproteomics to understand how microbiota function: the crystal ball predicts a promising future, *Environ. Microbiol.*, **2023**, *25*, p. 115-125.
- [10] O. Pallanca, J. Read, Principes généraux et définitions en intelligence artificielle, *Arch. Mal. Coeur Vaiss - Prat.*, **2021**, *2021*, p. 3-10.
- [11] S. Kim, N. Gupta, P.A. Pevzner, Spectral probabilities and generating functions of tandem mass spectra: a strike against decoy databases, *J. Proteome Res.*, **2008**, *7*, p. 3354-63.
- [12] A.T. Kong, F.V. Leprevost, D.M. Avtonomov, D. Mellacheruvu, A.I. Nesvizhskii, MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry-based proteomics, *Nat. Methods*, **2017**, *14*, p. 513-520.
- [13] D.A. Boiko et al., Fully automated unconstrained analysis of high-resolution mass spectrometry data with machine learning, *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(32), p. 14590-606.
- [14] B.K. Hackenberger, Bayes or not Bayes, is this the question?, *Croat. Med. J.*, **2019**, *60*, p. 50-52.
- [15] N.H. Tran, X. Zhang, L. Xin, B. Shan, M. Li, De novo peptide sequencing by deep learning, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, *114*, p. 8247-52.
- [16] R.D. Finn, J. Clements, S.R. Eddy, HMMER web server: interactive sequence similarity searching, *Nucleic Acids Res.*, **2011**, *39*, p. W29-37.
- [17] J. Jumper et al., Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **2021**, *596*, p. 583-589.
- [18] J. Mehrer, C.J. Spoerer, N. Kriegeskorte, T.C. Kietzmann, Individual differences among deep neural network models, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 5725.

Hamid HACHEMI*^{1,2}, doctorant, **Lucia GRENGA**^{1,2}, chercheuse, et **Jean ARMENGAUD**^{1,2}, directeur de recherche au CEA.

¹ Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et technologies pour la santé (DMTS), SPI, Bagnols-sur-Cèze.

² Laboratoire Innovations technologiques pour la détection et le diagnostic (Li2D), Université de Montpellier, Bagnols-sur-Cèze.

* Hamid.Hachemi@cea.fr

31th SCT- Young Research Fellows Meeting

31^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs SCT

SCT **YRFM**
Société de Chimie Thérapeutique

22st-23rd Feb. 2024 **Grenoble, FR**

YRFM 2024

<https://sct-asso.fr/yrfm-young-research-fellow-meeting>

La transcriptomique en cellule unique pour étudier des maladies neurodégénératives

Résumé Les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer sont un groupe de troubles caractérisés par la dégénérescence progressive des cellules nerveuses (neurones) du système nerveux central (cerveau et moelle épinière) et, dans certains cas, du système nerveux périphérique (nerfs). Cette dégénérescence entraîne une détérioration graduelle des capacités cognitives, motrices et/ou sensorielles. Plusieurs millions de personnes sont affectées dans le monde et il n'existe pas de traitement curatif. Une nouvelle technologie développée depuis une dizaine d'années permet de mesurer l'expression des gènes à l'échelle d'une seule cellule. Cet article décrit les principes et les apports de la transcriptomique en cellule unique appliquée au domaine des maladies neurodégénératives au travers de quelques exemples récents.

Mots-clés **Maladies neurodégénératives, Alzheimer, Parkinson, Huntington, transcriptomique en cellule unique, biomarqueurs, types cellulaires, neurones, cellules gliales.**

Abstract **Single-cell transcriptomics to study neurodegenerative diseases**

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's are a group of disorders characterised by the progressive degeneration of nerve cells (neurons) in the central nervous system (brain and spinal cord) and, in some cases, in the peripheral nervous system (nerves). This degeneration leads to a gradual decline in cognitive, motor and/or sensory abilities. Several million people worldwide are affected and there is no cure. A new technology developed over the last decade makes it possible to measure gene expression at the level of a single cell. This article describes the principles and advantages of single-cell transcriptomics as applied to neurodegenerative diseases, with some recent examples.

Keywords **Neurodegenerative diseases, Alzheimer, Parkinson, Huntington, single-cell transcriptomics, biomarkers, cellular types, neurons, glial cells.**

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une dégénération progressive mais chronique des cellules dans le système nerveux central ou périphérique, conduisant à une perte massive de neurones. Dans la plupart des cas, il n'existe pas de traitement efficace pour ces maladies à l'heure actuelle et pas ou très peu de biomarqueurs efficaces pour leur détection précoce. La maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson sont les principales maladies neurodégénératives en termes de nombres de personnes affectées au niveau mondial, principalement pour les personnes âgées de 75 ans ou plus [1]. De très nombreuses études d'association génomique (« genome wide association studies », GWAS) ont clairement montré l'existence de nombreux variants génétiques qui sont statistiquement associés à ces maladies. D'autre part, de très nombreuses études de recherche ont tenté de préciser quels étaient les mécanismes fondamentaux mis en jeu dans ces maladies aux niveaux cellulaire et moléculaire, ce qui a contribué à transformer notre compréhension des maladies neurodégénératives. Cependant, il reste encore beaucoup de choses à préciser sur le rôle et les mécanismes moléculaires précisément impliqués dans les différents types cellulaires concernés dans ce type de maladies.

La révolution du séquençage en cellule unique

La transcriptomique est une technique de laboratoire courante qui permet de détecter et de quantifier globalement les molécules d'ARN messager correspondant aux gènes exprimés dans un échantillon. Cette technique est basée sur le séquençage de millions de fragments très courts d'ARN (de l'ordre de 100 à 150 paires de bases) dans des machines à très haut débit. Il est alors possible de compter puis de

comparer les niveaux d'expression de tous les gènes dans différents tissus sains ou pathologiques [2]. Malheureusement, cette technique réclame une grande quantité d'ARN au départ, correspondant à des centaines de milliers de cellules différentes. De ce fait, on va donc mesurer l'expression moyenne des gènes sur des populations ou types cellulaires très différents. Par exemple, une biopsie de tumeur humaine va contenir des cellules tumorales, mais aussi des cellules saines, des cellules sanguines, des cellules correspondant aux vaisseaux sanguins, etc. Or il est bien établi que différents types cellulaires ont la plupart du temps des profils transcriptomiques très différents, qui reflètent des fonctions cellulaires différentes. Et donc la transcriptomique mesurée de façon globale dans un mélange de types cellulaires conduit fatalement à rater ou sous-estimer des données essentielles sur la variabilité d'expression de certains gènes qui peuvent jouer un rôle fondamental dans un état pathologique.

Tang et collaborateurs ont introduit une approche de séquençage haut débit de l'ARN en cellules uniques pour la première fois en 2009 pour étudier l'ensemble des cellules d'un blastomère de souris [3]. À partir de cette preuve de concept, de nombreuses techniques de séquençage ARN en cellule unique ont été développées au cours des années suivantes. Le principe de base est de marquer les molécules d'ARN présentes dans une cellule avec un code-barres moléculaire (courte séquence d'une dizaine de nucléotides ajoutée au fragment d'ARN) afin de pouvoir identifier par la suite l'origine cellulaire de chaque fragment séquencé, après la lyse des cellules et le séquençage de tous les fragments. Après alignement sur un génome de référence, il sera alors possible d'établir des tables de comptage des fragments séquencés par gène et par cellule et de faire des analyses avancées (figure 1).

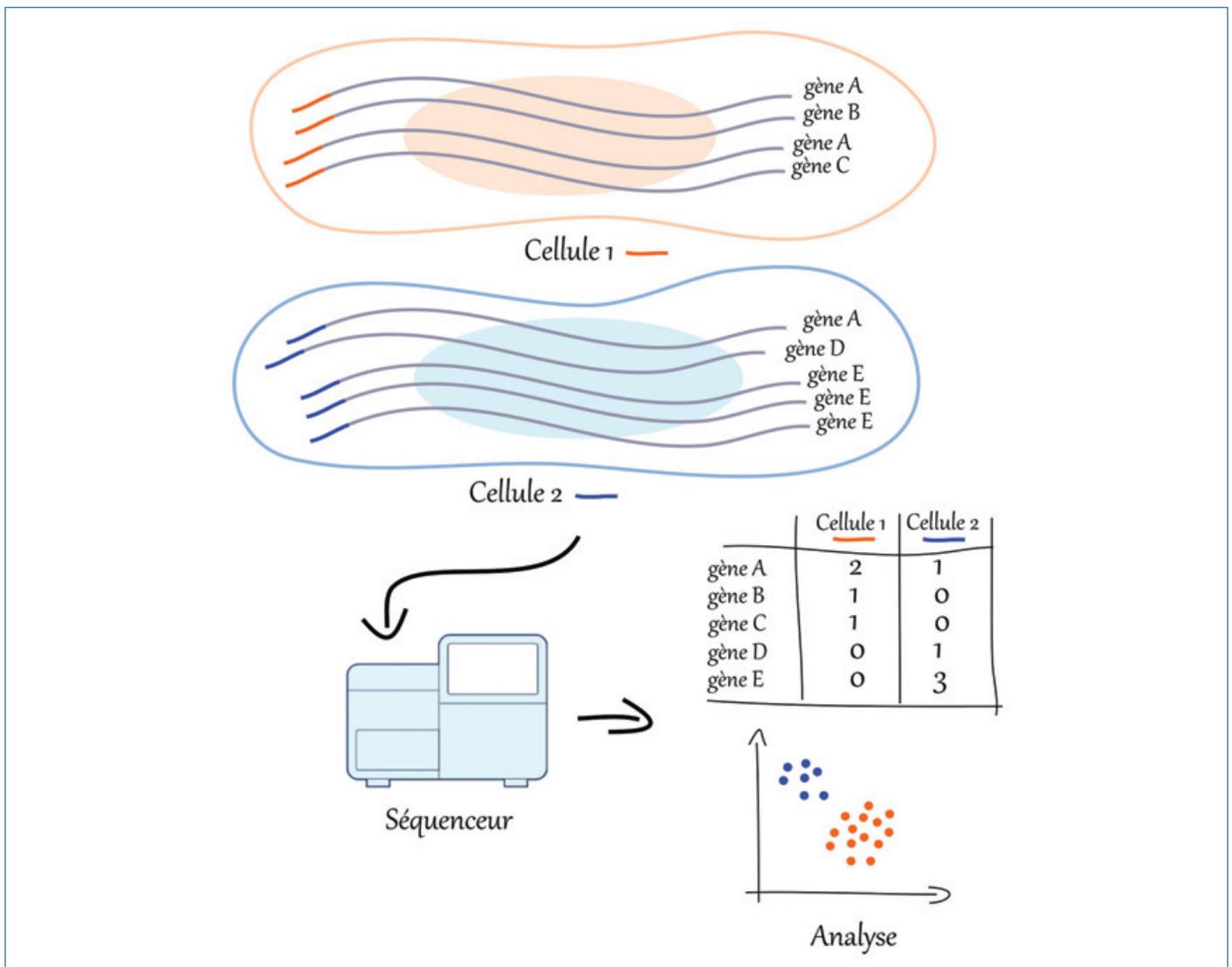


Figure 1 - Principe de base du transcriptome en cellule unique. Chaque molécule d'ARN messenger est marquée par un code-barres moléculaire unique à la cellule (courte séquence nucléotidique unique). Après lyse des cellules, toutes les molécules d'ARN messenger sont isolées et l'ensemble ARN messenger + code-barres est séquençé. On peut ensuite identifier les gènes et compter le nombre de molécules par gène et par cellule grâce au code-barres (table de comptage), ce qui permet ensuite de faire des analyses plus poussées et d'identifier les différents types cellulaires présents dans les échantillons.

La technologie de séquençage en cellule unique a été adoptée très rapidement par la plupart des laboratoires de biologie moléculaire dans le monde qui ont très vite identifié son potentiel à faire avancer les connaissances en biologie fondamentale et dans les situations pathologiques [4].

Plateformes et protocoles de séquençage en cellule unique

Suite à l'étude pilote de Tang et coll. [3], de nombreux protocoles et plateformes ont été développés pour le séquençage ARN en cellule unique. On peut distinguer quatre étapes principales pour la préparation des bibliothèques avant le séquençage proprement dit : isolation des cellules ou des noyaux cellulaires, transcription inverse, élongation des molécules de cDNA, et enfin séquençage. Selon la technologie de base qui sert à isoler les cellules avant de marquer les molécules d'ARN avec un code-barres unique, on peut classer les protocoles en deux grandes catégories (figure 2). La première et la plus populaire à l'heure actuelle utilise des systèmes de microfluidique pour isoler les cellules dans des gouttelettes lipidiques qui contiennent tous les réactifs nécessaires pour le marquage moléculaire et la création des cDNA (e.g. Drop-Seq, inDrop,

Seq-Well, 10X Genomics Chromium) (voir figure 2A). La deuxième utilise des systèmes de plaques pour isoler les cellules dans un puits unique où vont avoir lieu toutes les réactions pour créer les cDNA (e.g. MARS-Seq, Smart-Seq, Smart-Seq2, STRT-Seq, Parse Biosciences, Scale Biosciences) (figure 2B). Les avantages et inconvénients de ces méthodes ont été analysés dans plusieurs travaux de comparaison (voir par exemple [5]).

Un des défis les plus importants pour comprendre la pathogenèse des maladies neurodégénératives et le vieillissement normal du cerveau est de déterminer les principaux mécanismes qui peuvent être déclencheurs ou protecteurs de la neurodégénérescence. Les techniques d'analyse du transcriptome en cellule unique sont ainsi de plus en plus utilisées pour identifier, caractériser et classer les différents types cellulaires ainsi que leurs différents états (ou sous-types) dans les tissus cérébraux sains ou pathologiques.

Nous allons décrire ici de façon non exhaustive un certain nombre de travaux récents qui impliquent la transcriptomique en cellule unique sur trois types de maladies neurodégénératives : la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington.

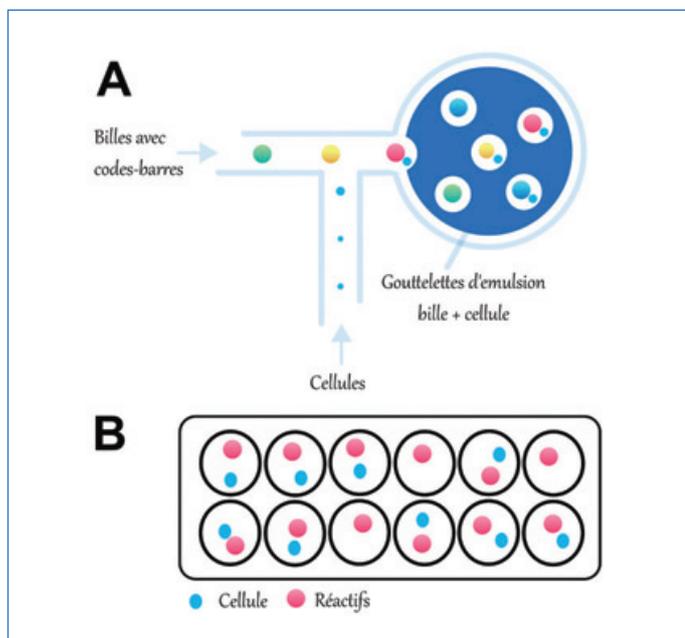


Figure 2 - Les deux grandes familles de technologies qui permettent d'ajouter un code-barres unique pour chaque cellule. A : un dispositif de microfluidique encapsule chaque cellule avec une bille recouverte de codes-barres uniques et de réactifs dans les microgouttelettes lipidiques. Après la réaction chimique, chaque molécule d'ARN messager sera marquée par un code-barres unique à la cellule, permettant de lyser, de mélanger toutes les molécules et de les séquencer en masse. B : chaque cellule est isolée avec les réactifs (dont le code-barres unique) dans un seul puits d'une plaque multipuits. Après la réaction chimique, les molécules peuvent être mélangées et séquencées en masse.

Préciser le rôle des cellules gliales dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause principale de démence dans le monde, avec un nombre de cas estimé à plus de 48 millions en 2015. En France, le nombre de patients atteints est de l'ordre d'un million actuellement, et ce nombre pourrait passer à plus de 2,4 millions en 2040 d'après certaines projections. La MA cause une dégénérescence neuronale importante qui entraîne une perte progressive et irréversible de fonctions cognitives importantes et notamment de la mémoire, mais elle induit aussi des changements comportementaux et neuropsychiatriques. Compte tenu de la nécessaire prise en charge des patients et de l'impact sur leur entourage, c'est l'une des maladies les plus coûteuses pour la société dans les pays développés. Elle a été décrite pour la première fois par Alois Alzheimer il y a plus d'un siècle en 1907 [6]. Elle apparaît le plus souvent chez les personnes ayant plus de 65 ans. Certaines formes dites familiales sont héréditaires mais elles représentent moins de 5 % des cas, la plupart étant sporadiques.

Malgré des progrès spectaculaires dans la compréhension des aspects cellulaires et moléculaires de la maladie au cours de ces vingt-cinq dernières années [7], elle reste à l'heure actuelle incurable et sans aucun traitement qui permettrait de ralentir efficacement son évolution. Au niveau moléculaire, la MA est caractérisée par des plaques amyloïdes extracellulaires (peptide A β) et des agrégats de protéines tau formant des neurofibrilles intracellulaires. Les plaques amyloïdes correspondent à l'accumulation du peptide A β résultant du clivage anormal de la glycoprotéine membranaire APP (« amyloïd protein precursor ») et entraînent un dysfonctionnement des neurones environnants, puis une mort neuronale par apoptose ou nécrose. Les premières régions cérébrales

touchées sont l'hippocampe, le cortex entorhinal et le lobe temporal médian, puis plus tardivement le cortex frontal, siège des fonctions cognitives complexes. Les régions corticales sensorielles et motrices ne sont en général pas affectées. De nombreuses études transcriptomiques classiques (globales, ou « bulk », qui ne peuvent distinguer les types cellulaires) ont été menées dans les deux dernières décades afin de mieux comprendre les gènes et voies de signalisation impliqués dans la maladie (voir par exemple [8]). De nombreux types cellulaires sont affectés comme les cellules gliales, les neurones, les cellules vasculaires. Il est donc difficile pour ces études de transcriptomiques globales de pouvoir distinguer précisément les changements significatifs en fonction des types et sous-types cellulaires. Un certain nombre d'études ont appliqué la transcriptomique en cellule unique pour contourner cette difficulté. Ainsi Mathys et collaborateurs ont utilisé une approche de séquençage de noyaux uniques (snRNA-seq, plus adaptée aux échantillons de cerveaux congelés) pour analyser le cortex préfrontal de patients avec des degrés divers de MA [9]. Quarante-huit individus ont été analysés, avec plus de 80 000 noyaux séquencés. Les résultats montrent que les principaux types cellulaires de cette région cérébrale sont tous affectés par la pathologie au niveau transcriptionnel : les neurones bien sûr (excitateurs et inhibiteurs), mais aussi l'ensemble des cellules gliales (astrocytes, microglie, oligodendrocytes et précurseurs des oligodendrocytes). Il est aussi assez clair que différents groupes de gènes répondent à la pathologie pour chaque type cellulaire, avec des différences entre les stades précoces et tardifs de la pathologie. Les études d'associations à large échelle (GWAS) ont révélé des dizaines de facteurs de risques génétiques associés à la MA (e.g. les gènes *APOE*, *TREM2*, *MEF2C*, *PICALM*) [10]. Mathys et coll. ont trouvé des enrichissements significatifs pour des facteurs de risques génétiques dans certains types cellulaires, notamment des groupes de neurones mais aussi la microglie. Ce lien entre les cellules gliales (astrocytes, microglie) et la MA est très étudié depuis quelques années car ces cellules semblent jouer un rôle majeur dans la progression de la maladie, même si les mécanismes moléculaires précis ne sont pas encore bien élucidés [11]. Les cellules gliales pourraient ainsi être la source de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux biomarqueurs.

Un certain nombre d'études portent aussi sur des modèles animaux de la MA. Ainsi Keren-Shaul et coll. ont pu identifier grâce à une étude de transcriptomique en cellule unique une sous-population de cellules microgliales qui semblent avoir un effet protecteur chez un modèle murin de la MA [12]. Ce groupe de cellules, dénommé DAM (« disease associated microglia ») par les auteurs, exprime les gènes marqueurs de la microglie *Iba1*, *Cst3* et *Hexb*, mais présente aussi une sous-expression des gènes de l'homéostasie tels que *CD33*, *Tmem119* et *Cx3cr1*. Il est intéressant de noter aussi qu'un enrichissement en facteurs de risques génétiques pour la MA a été retrouvé dans les DAM, avec des gènes bien connus tels que *ApoE*, *Ctsd*, *Lpl*, *Tyrbp* et *Trem2*. Les auteurs ont aussi constaté une surexpression de gènes dans les DAM impliqués dans les voies métaboliques de la phagocytose, des lysosomes et le métabolisme des lipides, dont les gènes correspondant aux facteurs de risques identifiés pour la MA comme *ApoE*, *Ctsd*, *Lpl*, *Tyrbp* et *Trem2*.

Grubman et coll. ont effectué du séquençage en noyaux uniques pour un total de 13 214 noyaux issus de cortex entorhinal de patients Alzheimer et contrôles. Dans cette

étude, les auteurs retrouvent la plupart des gènes différentiellement exprimés entre patients MA et contrôles trouvés par Mathys et coll. dans leur étude (avec plus de 90 % de gènes en commun). Ils ont aussi constaté un enrichissement de gènes impliqués dans la pathologie dans différents types cellulaires, tels que les neurones, les cellules endothéliales, les astrocytes et la microglie. Ici aussi l'analyse de l'expression de 1 000 gènes catégorisés comme facteurs de risques potentiels (d'après les études GWAS) montre des enrichissements sur certains types cellulaires. Par exemple, le gène bien connu APOE est sous-exprimé dans une sous-population de cellules précurseurs des oligodendrocytes, dans les oligodendrocytes, et certaines sous-populations d'astrocytes et de microglie. Il est intéressant de noter que tous ces types cellulaires font partie des cellules gliales, renforçant l'idée d'un lien entre cellules gliales et la pathologie de la MA.

Leng et coll. ont effectué des analyses de transcriptomique en noyaux uniques sur des cerveaux de patients atteints de MA sur deux régions cérébrales différentes [13]. Au total, les auteurs ont séquencé plus de 100 000 noyaux des régions du cortex entorhinal (CE) et du gyrus frontal supérieur (GFS). Le CE est l'une des premières régions cérébrales qui montre des signes de pertes neuronales dans la MA, tandis que le GFS est affecté plus tardivement. En comparant ces deux régions, les auteurs ont pu montrer l'existence de sous-populations de neurones excitateurs particulièrement sensibles à la pathologie de la MA (avec de nombreux gènes sous-exprimés). Ils ont aussi montré l'existence de trois sous-populations d'astrocytes qui avaient des niveaux d'expression très élevés de GFAP, un marqueur bien connu de l'état réactif de ces cellules associé à la MA.

En conclusion, on peut voir que les approches en cellules ou noyaux uniques ont permis de mieux définir et comprendre les changements transcriptionnels associés à la maladie d'Alzheimer selon les différents types cellulaires impactés par la pathologie, avec un rôle particulièrement important des cellules gliales.

Neurones et cellules gliales dans la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neuro-dégénérative la plus commune dans le monde. Elle affecte 2 à 3 % de la population âgée de 65 ans et plus, et elle est irréversible et d'évolution lente [14]. Plus de 160 000 patients souffrent de la MP en France. Elle se caractérise par une perte des neurones dopaminergiques dans la zone de la substance noire cérébrale (petite région située à la base du cerveau) associée à une agrégation intracellulaire de la protéine α -synucléine. Les patients ont typiquement des difficultés à initier les mouvements (akinésie), une rigidité plastique et des tremblements au repos. Elle peut évoluer vers une situation de démence dans les stades avancés de la maladie. Il n'existe aucun traitement curatif, mais plusieurs approches symptomatologiques existent (médicaments et stimulations intra-cérébrales). Les causes peuvent être une combinaison de facteurs de risques génétiques et environnementaux. Environ 15 % des cas sont d'origine génétique, avec notamment une mutation bien décrite du gène *LRRK2* (« leucine rich repeat kinase 2 ») qui explique à elle seule une bonne partie des cas familiaux, même si d'autres gènes ont aussi été identifiés (e.g. *PINK1*, *PRKN*, *SNCA*).

Fernandes et coll. ont effectué une analyse transcriptomique en cellules uniques sur des neurones dopaminergiques dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) afin d'étudier la dynamique de l'expression des gènes en réponse à des facteurs de stress génétiques et cytotoxiques. Huit clusters de cellules ont pu être identifiés, dont deux populations de progéniteurs de neurones et quatre populations de neurones dopaminergiques. De plus, les auteurs montrent des différences au niveau transcriptionnel et des sensibilités différentes au stress selon les différentes sous-populations dopaminergiques, illustrant l'existence d'une hétérogénéité dans les modèles *in vitro*. Les auteurs ont aussi étudié l'impact d'une mutation *SNCA*-A53T hétérozygote, générée en utilisant la technologie CRISPR-Cas9. Les mutants montraient alors une activation du stress et de la mort cellulaire dans une sous-population de neurones dopaminergiques.

Huarte et coll. ont combiné immunofluorescence et transcriptomique en cellules uniques pour étudier la région de la substance noire chez la souris [15]. Une population de cellules de microglie (cellules gliales) a montré une signature transcriptionnelle associée à une réponse immunologique liée à l'inflammation. De plus, l'examen histologique a montré une réduction de la complexité des cellules microgliales comparée au striatum, une autre région cérébrale. Ces observations suggèrent l'implication de la microglie avec un phénotype particulier pour cette maladie.

En complément des analyses sur des modèles cellulaires ou animaux, Smajic et coll. ont analysé des tissus post-mortem de patients atteints de la MP [16]. Ils ont utilisé une approche de transcriptomique en noyaux uniques afin d'étudier tous les types cellulaires des échantillons. Ils ont ainsi analysé plus de 41 000 noyaux provenant de six patients et les ont comparés à cinq échantillons contrôles. Ils ont pu caractériser un cluster de cellules ayant une surexpression du gène *CADPS2*, et aussi des niveaux bas de TH, ce cluster étant présent uniquement chez les patients MP et représentant des neurones dopaminergiques dysfonctionnels. Les cellules de microglie de la substance noire présentaient un aspect amiboïde, caractéristique d'un état réactif des cellules. La population d'oligodendrocytes était aussi réduite chez les patients, avec une surexpression du gène *STOOP*, caractéristique d'un état de stress. Une analyse de l'enrichissement en gènes provenant d'études GWAS pour la MP a été trouvée pour les neurones et les cellules gliales. Les astrocytes et la microglie avaient une dérégulation et une prolifération cellulaire typique de la maladie et reliées à la voie de signalisation des cytokines, avec aussi une surexpression de *CD44* pour les astrocytes et une élévation de l'expression des gènes *IL1B*, *GPNMB* et *HSP90AA1* pour la microglie. Beaucoup d'autres travaux sont à venir pour préciser les voies moléculaires impliquées dans la MP, mais on peut cependant voir que les approches en cellule unique ont permis de préciser les mécanismes spécifiques par type cellulaire aussi bien pour les neurones que pour les cellules gliales.

Maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) est une maladie héréditaire autosomique dominante et rare qui se traduit par une neuro-dégénérescence conduisant à d'importants troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques, avec une évolution vers la perte d'autonomie et la mort. La MH se développe chez des personnes âgées de 40 à 50 ans. La prévalence est de cinq à sept malades pour 100 000 pour la population caucasienne.

Le gène responsable de la maladie a été isolé au début des années 1990, au terme d'une fascinante épopée scientifique [17]. La MH est causée par une expansion du trinucéotide CAG dans le gène codant pour la huntingtine (HTT). Le principal site cérébral touché est le ganglion basal, avec les neurones de projection principalement affectés dans le striatum et le globus pallidus. Des pertes cellulaires ont aussi été détectées dans le cortex cérébral, l'amygdale, le thalamus et l'hypothalamus, la substance noire et le cervelet. Des analyses en transcriptomique classique (bulk) ont révélé des dérégulations de l'expression pour le système immunitaire, l'épissage des transcrits et la neuroinflammation. Par exemple, Diaz-Castro et coll. ont analysé les signatures transcriptionnelles des astrocytes sur deux modèles murins de la HD, à différents stades de développement pathologique [18]. Ils ont pu mettre en évidence des différences liées à la fois au stade et au modèle murin de la maladie, et aussi une signature de 62 gènes conservée entre les modèles murins et l'homme. Il est intéressant de noter qu'une répression de la huntingtine (en utilisant un répresseur dit à doigt de zinc) chez le modèle murin entraîne aussi une inversion de l'expression pour 61 des 62 gènes de la signature transcriptionnelle. De plus, les auteurs ont mis en évidence que les gènes astrocytaires *Adora2a*, *Mapt*, *Hdac-4* et *App* pourraient être des biomarqueurs ou des cibles thérapeutiques potentielles. D'une manière générale, cet article montre que les astrocytes perdent progressivement un certain nombre de fonctions critique lors du développement de la MD, et que cette perte peut être atténuée en ciblant la huntingtine mutante (mHTT). Ce résultat est important et pourrait déboucher sur une approche thérapeutique ciblée.

Afin de préciser encore mieux les types cellulaires impactés par le développement de la MH, Al-Dalahmah et coll. ont récemment effectué une analyse de transcriptomique en noyaux uniques sur des échantillons de cortex de patients décédés de la maladie, avec une comparaison avec des cortex de patients décédés mais non atteints de cette pathologie [19]. Les auteurs ont analysé deux échantillons de patients MH de grade III avec deux échantillons contrôles, tous issus de la région corticale du gyrus cingulaire. Un total de 4 786 noyaux a été obtenu après contrôle qualité, représentant la plupart des types cellulaires de cette région (neurones, astrocytes, oligodendrocytes, cellules précurseurs des oligodendrocytes, microglie et cellules endothéliales). Tous les types cellulaires montrent un enrichissement en groupe de gènes spécifiques, mais les auteurs se sont focalisés plus spécifiquement sur les astrocytes, qui sont connus pour être dans un état réactif dans la MH, en réponse au développement de la pathologie. Plusieurs clusters ont été ainsi détectés au sein des astrocytes (six au total), avec des gènes significativement sur ou sous-exprimés pour chaque cluster, correspondant à différentes fonctions cellulaires telles que la synthèse lipidique ou encore les fonctions protoplasmiques. Ces résultats montrent une hétérogénéité au niveau astrocytaire clairement liée à la MH et il serait très intéressant de les compléter par des études de transcriptomique en noyau ou cellules uniques sur des modèles animaux ou échantillons humains plus importants en nombre afin de confirmer et préciser les conclusions.

Une technologie porteuse d'espoir

La transcriptomique en cellule ou noyaux uniques est une technologie récente qui peut être utilisée pour mieux

comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les maladies neurodégénératives. Son principal avantage est de permettre de définir et d'analyser les types/états cellulaires de manière non biaisée. Elle est particulièrement adaptée aux maladies neurodégénératives car le système nerveux central est composé de nombreux types cellulaires et certains jouent un rôle majeur dans le déclenchement et la progression de la pathologie. Elle pourra permettre de préciser quel sont les gènes impliqués, les mécanismes moléculaires mis en œuvre, quelles sont les voies de communication cruciales entre les différents types cellulaires, et enfin quelles sont les vulnérabilités spécifiques à chaque type cellulaire impliqué. En conséquence, cela pourra permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic précoce ou le pronostic précis de l'évolution de la maladie. Cela pourrait aussi déboucher sur de nouvelles pistes pour des cibles thérapeutiques à développer en essais cliniques pour cette famille de maladies qui en manque cruellement à l'heure actuelle.

L'auteur remercie ses collègues Carole Escartin (CEA MIRcen), Marc Dhenain (CEA MIRcen) et Hélène Hirbec (CNRS IGF Montpellier) pour les nombreuses et fructueuses discussions sur la recherche sur les maladies neurodégénératives et sur les applications de la technologie de la transcriptomique en cellule unique.

- [1] T. Vos et al., Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *The Lancet*, **2020**, *396*, p. 1204-22.
- [2] Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder, RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nat. Rev. Genet.*, **2009**, *10*, p. 57-63.
- [3] F. Tang et al., mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell, *Nat. Methods*, **2009**, *6*, p. 377-382.
- [4] S. Aldridge, S.A. Teichmann, Single cell transcriptomics comes of age, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 4307.
- [5] J. Ding et al., Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods, *Nat. Biotechnol.*, **2020**, *38*, p. 737-746.
- [6] M. Goedert, M.G. Spillantini, A century of Alzheimer's disease, *Science*, **2006**, *314*, p. 777-781.
- [7] B. Strooper, E. Karran, The cellular phase of Alzheimer's disease, *Cell*, **2016**, *164*, p. 603-615.
- [8] M. Wang et al., Integrative network analysis of nineteen brain regions identifies molecular signatures and networks underlying selective regional vulnerability to Alzheimer's disease, *Genome Medicine*, **2016**, *8*, 104.
- [9] H. Mathys et al., Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease, *Nature*, **2019**, *570*, p. 332-337.
- [10] C. Bellenguez et al., New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias, *Nat. Genet.*, **2022**, *54*, p. 412-436.
- [11] L. Ben Haim, M.-A. Carrillo-de Sauvage, K. Ceyzeriat, C. Escartin, Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases, *Front. Cellular Neurosci.*, **2015**, *9*, 278.
- [12] H. Keren-Shaul et al., A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease, *Cell*, **2017**, *169*, p. 1276-1290.e17.
- [13] K. Leng et al., Molecular characterization of selectively vulnerable neurons in Alzheimer's disease, *Nat. Neurosci.*, **2021**, *24*, p. 276-287.
- [14] W. Poewe et al., Parkinson disease, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2017**, *3*, p. 1-2.
- [15] O. Uriarte Huarte et al., Single-cell transcriptomics and in situ morphological analyses reveal microglia heterogeneity across the nigrostriatal pathway, *Front. Immunol.*, **2021**, *12*, 639613.
- [16] S. Smajić et al., Single-cell sequencing of human midbrain reveals glial activation and a Parkinson-specific neuronal state, *Brain*, **2022**, *145*, p. 964-978.
- [17] N.S. Wexler, Huntington's disease: advocacy driving science, *Annu. Rev. Med.*, **2012**, *63*, p. 1-22.
- [18] B. Diaz-Castro, M.R. Gangwani, X. Yu, G. Coppola, B.S. Khakh, Astrocyte molecular signatures in Huntington's disease, *Sci. Transl. Med.*, **2019**, *11*, eaaw8546.
- [19] O. Al-Dalahmah et al., Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states, *Acta Neuropathol. Comm.*, **2020**, *8*, 19.

Eric BONNET,

Chef de laboratoire, Laboratoire de Bio-Analyse, Centre National de Recherche en Génétique Humaine (CNRGH), Institut de Biologie François Jacob, CEA, Université Paris-Saclay, Evry.

* eric.bonnet@cnrgh.fr

Utiliser le xénon pour l'étude de la barrière hémato-encéphalique ?

Résumé La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une interface hautement sélective entre le sang et le système nerveux central. L'étude de sa perméabilité représente un enjeu majeur en santé car elle est un frein à l'entrée de médicaments ayant pour cible le cerveau. Le xénon, gaz rare soluble dans les milieux biologiques et traversant la BHE, possède des propriétés intéressantes permettant de l'utiliser comme sonde en résonance magnétique nucléaire. Non seulement sa polarisation nucléaire, donc sa sensibilité de détection, peut être multipliée par plusieurs ordres de grandeur, mais il possède une large gamme de déplacements chimiques. Cet article propose d'évaluer l'utilisation du xénon comme marqueur de la perméabilité de la BHE grâce à une étude en trois temps : sur une suspension cellulaire exprimant un des transporteurs impliqués dans le blocage de l'entrée des médicaments, sur des barrières modèles obtenues via des cultures cellulaires, et enfin par des expériences sur rongeurs.

Mots-clés **Biomarqueur, barrière hémato-encéphalique, xénon, RMN, hyperpolarisation, méthodologie.**

Abstract **Using xenon for the study of the blood brain barrier?**

The blood-brain barrier (BBB) is a highly selective interface between the blood and the central nervous system. Studying its permeability is a major healthcare challenge, as it hinders the entry of drugs targeting the brain. Xenon, a noble gas that is soluble in biological media and crosses the BBB, possesses interesting properties that enable it to be used as a nuclear magnetic resonance spy. Not only can its nuclear polarization, and hence its detection sensitivity, be multiplied by several orders of magnitude, but it also has a wide chemical shift range. This article aims to evaluate the use of xenon as a marker of BBB permeability through a three-stage study: on a cell suspension expressing one of the transporters involved in blocking drug entry, on model barriers obtained via cell cultures, and finally experiments on rodents.

Keywords **Biomarker, blood-brain barrier, xenon, NMR, hyperpolarization, methodology.**

Le xénon pour les études biologiques

C'est à la toute fin du XIX^e siècle, en 1898, que deux chimistes britanniques, William Ramsay et Morris Travers, découvrent un élément chimique inconnu jusqu'alors : le xénon. L'étymologie de ce mot vient du grec « xenos », signifiant « étranger », puisque cet élément, appartenant à la famille des gaz rares, est l'un des éléments les plus rares sur Terre même s'il y est présent naturellement.

De nombreuses caractéristiques de ce gaz le rendent attractif, que ce soit en médecine, en biologie médicale ou pour des études physico-chimiques. Par exemple, son utilisation en tant qu'anesthésiant chez l'homme est autorisée depuis 2007 dans la Communauté européenne. Depuis 2008, la société Air Liquide commercialise non seulement un mélange xénon-oxygène dans ce but (LENOXe™), mais aussi le respirateur spécifique. Seul le coût de revient de cette approche, dix fois plus élevé que celui de l'anesthésie au protoxyde d'azote, limite son expansion. Il connaît néanmoins des avantages certains, notamment au niveau de la vitesse d'endormissement ainsi que du confort de réveil des patients.

En tout état de cause, cela signifie que ce gaz rare, non nocif pour l'environnement, n'est pas si inerte que cela. Si on s'intéresse à sa chimie, on lui connaît même des composés covalents : XeF₆ (agent fluorant puissant), XeO₄, XeO₆ parmi d'autres. Mais même l'espèce monoatomique est intéressante. Depuis le début du XXI^e siècle, des laboratoires de recherche en font une application précieuse en imagerie anatomique, pour visualiser les régions pauvres en hydrogène, tels les poumons [1]. Cette imagerie de résonance magnétique (IRM) particulière, qui nécessite une augmentation drastique préalable du signal par des techniques d'hyperpolarisation de spin

(voir plus loin), a l'avantage d'être totalement inoffensive. Le patient inhale une bouffée de xénon avant que l'image soit acquise en quelques secondes. Ce type d'image possède la signature de la pathologie pulmonaire du patient ; il est possible de reconnaître des personnes atteintes de mucoviscidose parmi celles souffrant d'asthme, d'emphysème, etc. [2]. Évidemment, cette approche a récemment été employée pour étudier les effets pulmonaires du Covid sur des patients [3].

La tomographie au xénon, dans laquelle là aussi le sujet inhale du gaz xénon pendant la réalisation d'images par rayons X, est quant à elle précieuse en neuroimagerie où elle délivre une mesure quantitative du débit sanguin cérébral [4]. Dans le domaine de la biologie, le xénon a été utilisé pour mettre en évidence et cartographier les cavités hydrophobes de protéines, qui ont été démontrées comme ayant un rôle fondamental dans la thermodynamique de l'activité enzymatique. L'outil tout d'abord employé a été la diffraction de rayons X sous pression de gaz rare [5]. Ensuite, c'est la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), utilisant là encore du xénon hyperpolarisé, qui a été employée [6].

Avec cette approche, il a pu aussi être montré que le gaz rare présentait des signaux différents entre l'intérieur et l'extérieur des cellules biologiques [7]. La distinction spectrale entre ces deux environnements permet d'évaluer la vitesse de passage du xénon à travers la membrane plasmique, et donc donne accès à des informations de fluidité et de perméabilité de celle-ci.

Ce ne sont là que quelques applications. D'une manière générale, le xénon est un traceur diffusif qui peut être rendu très « lumineux » pour la RMN et susceptible de fournir des informations riches sur les milieux qu'il rencontre. Au sein d'un projet regroupant des chercheurs du CEA, en nous basant sur

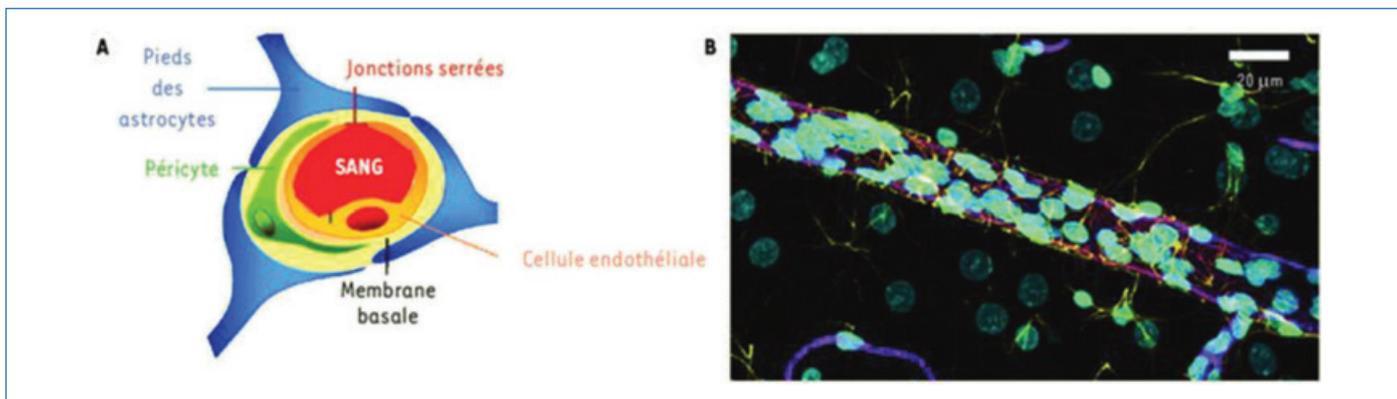


Figure 1 - A) Schéma d'un capillaire cérébral en coupe transversale montrant les différentes structures cellulaires composant la BHE. B) Visualisation par microscopie confocale d'un vaisseau cérébral dans le cortex chez le rat. Les astrocytes sont révélés par un immunomarquage de la GFAP (« glial fibrillary acidic protein ») (en jaune) et la membrane luminaire des cellules endothéliales par un immunomarquage de la P-glycoprotéine (en magenta). Les noyaux cellulaires (cellules endothéliales, cellules murales, neurones, cellules gliales) sont marqués par un intercalant de l'ADN (en cyan) [8].

ses propriétés, nous étudions la possibilité d'utiliser le xénon comme sonde de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

La barrière hémato-encéphalique

Rôle et structure

La barrière hémato-encéphalique (BHE) séparant le sang du système nerveux central est connue depuis peu de temps. La preuve définitive de son existence n'a été apportée qu'en 1967 suite à des expériences en microscopie électronique en transmission, bien que Paul Ehrlich ait mené des expériences ayant indiqué l'existence de cette barrière en 1885 (les résultats avaient alors été mal interprétés).

Cette barrière est composée de cellules endothéliales reliées les unes aux autres par des jonctions serrées, des péricytes et des astrocytes ayant pour but de fournir les nutriments nécessaires et de réguler l'environnement chimique du système nerveux central (figure 1). La BHE va ainsi bloquer le passage des agents pathogènes et autres molécules indésirables pour le cerveau, tout en laissant entrer les éléments indispensables à son fonctionnement.

Sa principale fonction est de garantir l'intégrité et le bon fonctionnement du cerveau grâce à sa haute sélectivité. Mais cette barrière s'avère être un frein majeur à l'entrée de médicaments ayant pour cible le cerveau.

Transport au travers de la barrière hémato-encéphalique

Le passage des molécules de part et d'autre de la BHE se fait de deux manières différentes en fonction de leur nature chimique ainsi que de leur taille. La diffusion peut être passive ou active. Les petites molécules hydrophobes peuvent ainsi traverser la BHE de manière passive en traversant la bicouche phospholipidique constitutive de la membrane plasmique. Les molécules hydrophiles ou de plus grande taille doivent, elles, être prises en charge par des protéines membranaires spécifiques ; on dit que la diffusion est active.

Parmi les différentes protéines membranaires, existent deux grands types de transporteurs : les transporteurs SLC qui permettent de faire passer les molécules du système sanguin vers le système nerveux, et les transporteurs ABC, aussi appelés pompes d'efflux, qui vont quant à eux intercepter les molécules qui seraient rentrées par diffusion passive pour les rejeter dans le système sanguin et les empêcher de passer dans le cerveau.

C'est parmi les transporteurs ABC que l'on trouve la principale raison du rejet des médicaments ayant pour cible le cerveau, comme c'est le cas de ceux traitant les maladies neurodégénératives ou les tumeurs cérébrales. Étant donné que de nombreux candidats médicaments potentiels sont disponibles, la problématique actuelle n'est pas tant de trouver des médicaments pour guérir ces maladies mais de leur permettre d'atteindre leur cible. En effet, de nombreux candidats donnent des résultats prometteurs lorsqu'ils sont utilisés directement sur les neurones dans des modèles *in vitro*, mais sont inefficaces sur les modèles *in vivo* car ils ne sont pas en mesure d'atteindre les protéines ciblées puisque rejetés par les pompes d'efflux.

Pourquoi l'étudier au moyen de la RMN du xénon ?

Il existe différentes manières d'étudier cette barrière ou d'essayer d'influer sur sa perméabilité.

Certaines méthodes visent à étudier la barrière à l'aide d'éléments radiomarqués en utilisant la tomographie à émission de positons (TEP) [9] ou des modalités d'imagerie complémentaires telles que la TEP/IRM (figure 2). Cette modalité permet de situer plus facilement les zones de fixation des éléments radiomarqués comme le carbone 11 ou le gadolinium. Ces études sont souvent basées sur une encapsulation du radiomarqueur, permettant de le lier à un substrat des pompes d'efflux, mais aussi de protéger le plus possible l'organisme de la toxicité de ces éléments. Cela permet d'observer si le substrat passe en plus grande quantité et s'il reste plus longtemps dans le tissu nerveux [10]. Ces méthodes visent à être ou sont utilisées en clinique.

D'autres études sont menées en préclinique à l'aide d'ultrasons. Dans ces expériences, l'idée est de réussir à ouvrir un passage pour les médicaments potentiels directement dans la barrière en utilisant des ondes localisées de manière extrêmement précise [12-13].

Enfin, en préclinique, d'autres méthodes visent à étudier la barrière pour obtenir des informations plus théoriques sans utiliser de modalité d'imagerie, en se concentrant directement sur l'étude du passage au travers de cette dernière via des études anatomiques du cerveau. Par exemple, une perfusion cérébrale permet d'observer la vitesse de pénétration de diverses molécules dans le système nerveux central ou l'injection de colorants permet d'étudier des lésions naturelles ou provoquées au niveau de la BHE [14].

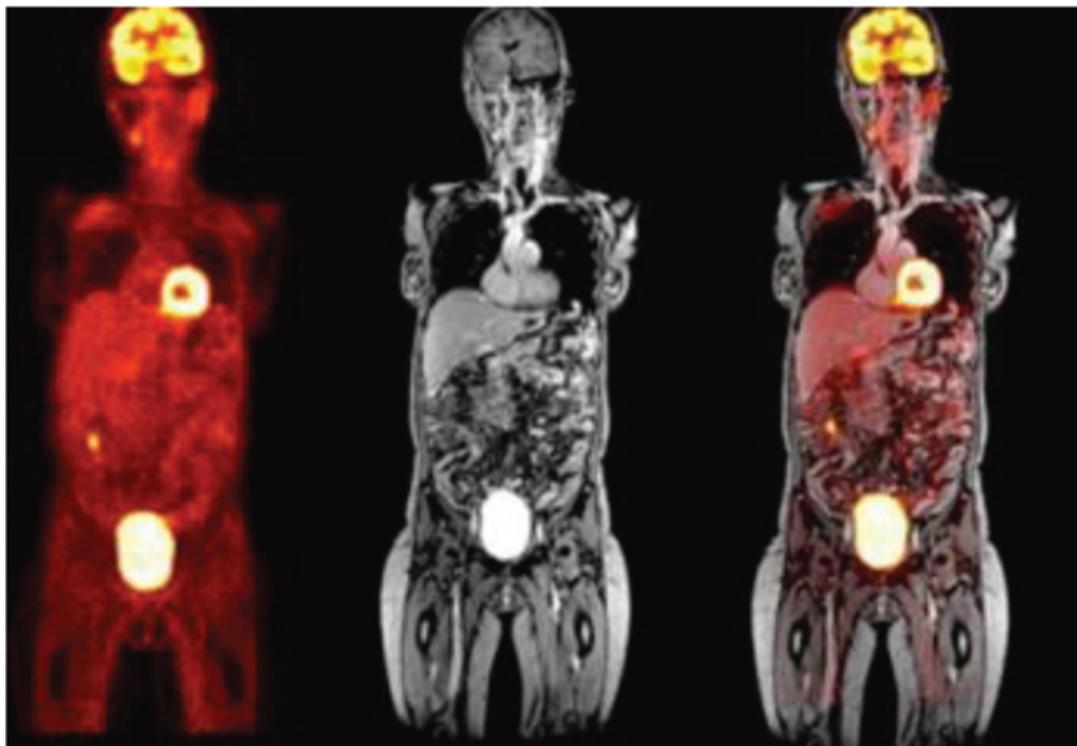


Figure 2 - Exemple de combinaison des modalités TEP/IRM : TEP à gauche, IRM ^1H au milieu, fusion des deux modalités à droite [11].

Dans notre étude, il s'agit à la fois de comprendre les effets éventuels du xénon sur la BHE et d'utiliser la RMN du xénon-129 hyperpolarisé pour observer l'effet de certains médicaments sur le comportement de cette barrière.

Résonance magnétique nucléaire du xénon-129

La résonance magnétique nucléaire (RMN), qui a fait l'objet d'un numéro spécial de *L'Actualité Chimique* il y a une dizaine d'années [15], permet l'analyse fine de la matière par l'observation de transitions de moments magnétiques nucléaires (spins nucléaires). L'énergie d'interaction entre ces moments magnétiques et un champ magnétique externe (communément noté B_0) étant très faible – les longueurs d'onde mises en œuvre sont de l'ordre du mètre, les fréquences sont dans le domaine radio (MHz) –, on a affaire à une technique peu invasive et qui permet une analyse en profondeur de la matière. Mais surtout, en fonction des densités électroniques autour du noyau observé, une réponse en énergie au champ B_0 différente apparaît. C'est la notion de déplacement chimique qui est ainsi la plus utile au chimiste, bien que le retour à l'équilibre de l'aimantation après perturbation par un champ B_1 oscillant à la fréquence de Larmor $\nu_0 = \gamma B_0$ (γ étant le rapport gyromagnétique), c'est-à-dire la relaxation, soit aussi très informative.

Si l'on considère le xénon, celui-ci possède un large nuage électronique, facilement polarisable, et donc la moindre déformation de celui-ci se traduit par une variation significative de ses paramètres RMN : déplacement chimique, temps de relaxation. Par exemple, une gamme de déplacements chimiques de plus de 350 ppm a été répertoriée dans la littérature !

De plus, l'isotope 129 est de spin nucléaire 1/2 (deux niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique) ; il possède un rapport gyromagnétique proche de celui du carbone 13

et son abondance naturelle est de 26 %⁽¹⁾. Ainsi il n'est pas trop difficile à étudier par RMN et est susceptible de représenter une sonde précieuse des milieux avec lesquels il interagit. Il possède aussi des avantages autres que ceux énumérés auparavant :

- il est très soluble dans les lipides, relativement soluble dans l'eau (4,5 mM par bar), et donc s'accommode bien des milieux biologiques ;
- il se manipule facilement, puisqu'il peut être condensé dans l'azote liquide à 77 K, et qu'il peut être évaporé très facilement. Cependant, les faibles énergies rencontrées en RMN sont un avantage, mais aussi un inconvénient. En effet, les spins nucléaires sont des fermions, et en tant que tels ils obéissent à la distribution de Boltzmann. Le rapport de population des niveaux d'énergie spins 1/2 s'écrit donc :

$$\frac{n_{\uparrow}}{n_{\downarrow}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (1)$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température absolue en Kelvin.

En combinant cette équation, l'équation de Larmor et l'équation de Planck-Einstein propre à chaque spectroscopie $\Delta E = h\nu$, on parvient à la formule de la polarisation nucléaire :

$$P = \frac{n_{\downarrow} - n_{\uparrow}}{n_{\downarrow} + n_{\uparrow}} = \tanh\left(\frac{\gamma \hbar B_0}{2kT}\right) \quad (2)$$

où \hbar est la constante de Planck divisée par 2π ⁽²⁾.

Le signal RMN étant lié à l'aimantation nucléaire M :

$$M = \frac{\gamma \hbar}{2} (n_{\downarrow} + n_{\uparrow}) P = (n_{\downarrow} - n_{\uparrow}) \frac{\gamma^2 \hbar^2 B_0}{4kT} \quad (3)$$

On comprend donc qu'à concentration fixe, il est d'autant plus grand que le champ magnétique B_0 est élevé et que la température T est basse. Mais si on met des nombres derrière ces formules, on s'aperçoit que la polarisation du xénon-129

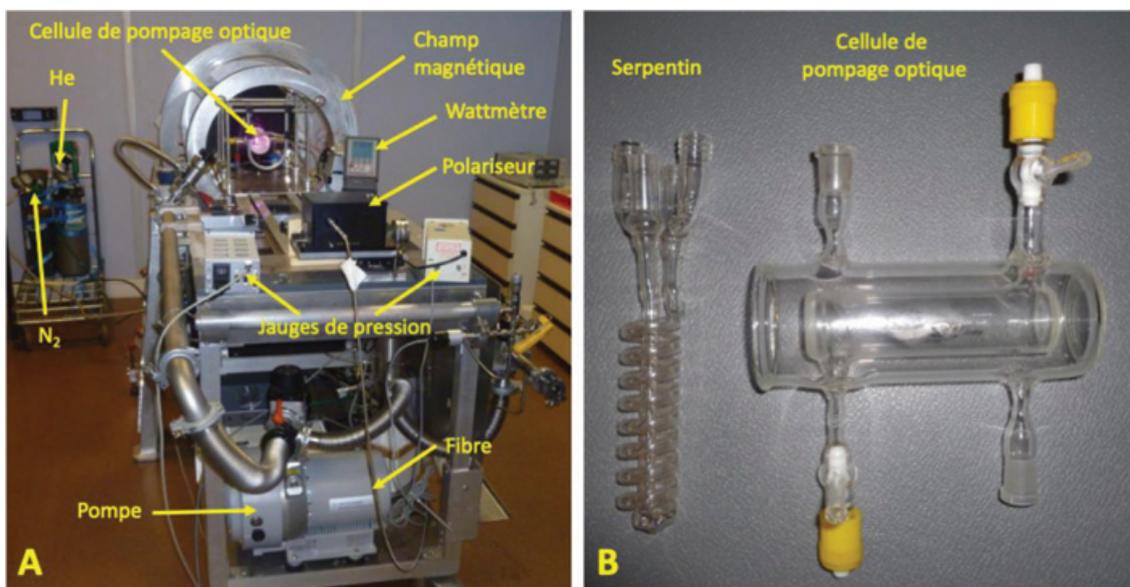


Figure 3 - Pompage optique du xénon au CEA Saclay : A) montage expérimental avec indication des principaux éléments ; B) détail de la cellule de pompage optique à double enveloppe (permettant son chauffage par utilisation d'un courant d'azote) et du serpentin de stockage du xénon.

est de 10^{-5} même dans un champ magnétique de 11,7 Tesla. Autrement dit, un excès de 1 sur 100 000 pour la population des spins dans l'état de basse énergie !

Hyperpolarisation du xénon

Une solution pour pallier le manque de sensibilité de la RMN consiste à transférer vers les noyaux la polarisation de systèmes plus ordonnés que les spins nucléaires, tels les spins électroniques ou les photons. En particulier deux méthodes se sont révélées efficaces pour hyperpolariser le xénon : la polarisation dynamique nucléaire (DNP en anglais) et le pompage optique par échange de spin (SEOP en anglais).

Polarisation dynamique nucléaire

La DNP de dissolution est basée sur le transfert de polarisation à une température voisine de 1 K des spins électroniques de centres paramagnétiques incorporés dans une matrice vitreuse vers les spins nucléaires voisins. Pour que la technique soit efficace, ces paramagnétiques, généralement des radicaux stables, doivent être répartis de manière homogène dans la solution gelée contenant les molécules d'intérêt, et l'étape de réchauffement pour obtenir une solution hyperpolarisée doit être rapide. A. Comment et ses collaborateurs ont proposé d'utiliser une sublimation du xénon hyperpolarisé par une telle méthode, de manière à le séparer rapidement de la solution contenant les radicaux [17].

Pompage optique par échange de spin

Le pompage optique, basé sur le transfert du moment angulaire d'un faisceau de photons vers les moments magnétiques électroniques, a valu à Alfred Kastler son prix Nobel en 1950 [18]. C'est à partir des années 1960 qu'il permit d'augmenter drastiquement la polarisation nucléaire [19].

Dans la méthode d'échange de spin, une cellule de verre contenant des vapeurs de métal alcalin et un gaz rare en plus grande quantité est illuminée par un faisceau de photons polarisés circulairement et de longueur d'onde correspondant à la transition entre l'état fondamental et le premier état excité

de l'alcalin (transition D1), en présence d'un champ magnétique colinéaire au faisceau. Près de la moitié du moment angulaire de spin des photons absorbés est transférée aux atomes de l'alcalin, ce qui polarise le spin des électrons de valence de celui-ci. Ce transfert de polarisation photon-électron est très efficace et très rapide. Ensuite, par des collisions inter-atomiques, une partie de la polarisation électronique de l'alcalin est transférée sur les spins nucléaires du xénon. Ce phénomène, moins efficace, prend quelques minutes.

Pour réaliser un montage de pompage optique par échange de spin, il faut donc une source laser de puissance à la longueur d'onde de la transition D1 de l'alcalin, polariser la lumière circulairement au moyen de lames quart d'onde, remplir une cellule avec quelques gouttes de l'alcalin, le gaz rare à polariser, et un ou des gaz tampons (afin d'augmenter la pression dans la cellule et d'éviter la désexcitation radiative), puis la chauffer afin de vaporiser l'alcalin. Enfin, il est important d'avoir un champ magnétique colinéaire au faisceau lumineux, afin de lever la dégénérescence des niveaux de spin électronique. Un tel montage a été réalisé au CEA Saclay (voir figure 3).

Après quelques minutes de pompage optique, on collecte le xénon hyperpolarisé en le séparant des autres éléments chimiques gazeux (azote, hélium), par condensation dans l'azote liquide, et son hyperpolarisation est maintenue pendant des temps assez longs. Dans l'azote liquide, le temps de maintien de l'hyperpolarisation peut être de plusieurs heures, à condition qu'il y ait un champ magnétique. Le résultat après réchauffement, pour la phase gaz en champ magnétique homogène, est donné en figure 4.

Spécificité de la RMN des noyaux hyperpolarisés

Quelle que soit la méthode de production utilisée, l'hyperpolarisation est un état transitoire : l'aimantation revient plus ou moins rapidement à son état d'équilibre, donné par la distribution de Boltzmann, sous l'effet de la relaxation ou des impulsions radiofréquence de la séquence RMN. Par exemple, après une impulsion d'angle 90° destinée à basculer l'aimantation de l'axe z dans le plan transversal xy afin de la détecter, les

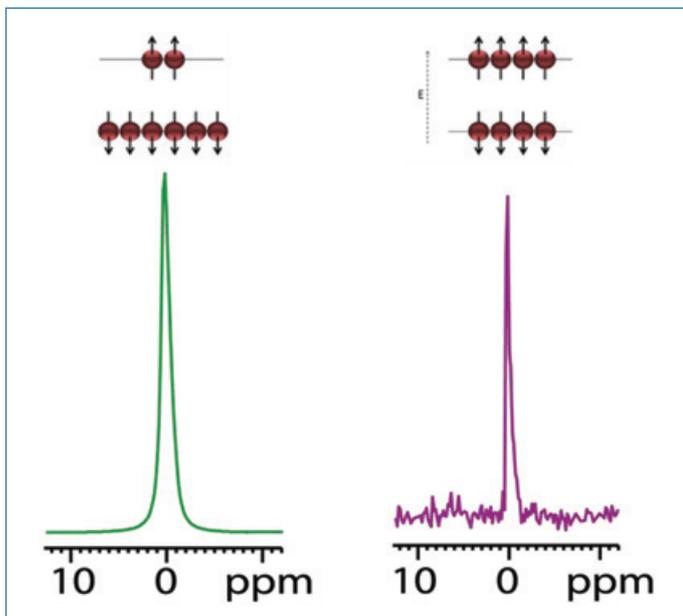


Figure 4 - Résultat en phase gaz à 11,7 Tesla (environ 1 bar de xénon dans le tube RMN). À gauche : spectre RMN ^{129}Xe obtenu après pompage optique, en un passage. À droite : spectre RMN ^{129}Xe sur le même échantillon après dépolarisation. Ce spectre a nécessité 16 heures d'acquisition et 32 scans. Un gain en signal d'un facteur 45 000 est obtenu.

populations des deux niveaux d'énergie de spin nucléaire sont égalisées. Ainsi, bien que le signal RMN soit maximal, toute l'hyperpolarisation est perdue en un coup.

C'est pourquoi toutes les séquences RMN utilisées classiquement ne sont pas souhaitables pour les espèces hyperpolarisées. Une stratégie basée d'une part sur des séquences rapides utilisant de manière optimisée l'hyperpolarisation, d'autre part sur une synchronisation avec le renouvellement en xénon hyperpolarisé frais, est préconisée.

Méthodologie autour de l'évaluation du ^{129}Xe comme marqueur de la perméabilité de la BHE

Soluble dans les milieux biologiques, de petite taille, le xénon diffuse rapidement à travers les différentes barrières biologiques pour se répartir dans l'organisme. Les concentrations de répartition dépendent du système biologique étudié.

D'un point de vue RMN, une fois dans le milieu biologique, le xénon-129 conserve son hyperpolarisation suffisamment longtemps pour être observé. Dans le sang, le T1 est de 5 à 7 secondes. Plusieurs stratégies d'étude s'offrent alors pour caractériser le passage du xénon d'un compartiment A vers un compartiment B à travers les barrières biologiques (parmi lesquelles la BHE) (figure 5) :

- Soit les signaux du xénon dans les deux compartiments sont différenciables sur un spectre RMN unique par un déplacement chimique différent et l'étude de chaque compartiment se fait par une sélection spectrale [20]. Pour cela, des impulsions sélectives en fréquence peuvent permettre de n'exciter qu'un seul des deux signaux. Pour que deux compartiments soient différenciables grâce au déplacement chimique, il faut que les milieux A et B aient des compositions chimiques différentes et que la résolution spectrale, donnée par l'intensité du champ magnétique délivré par le spectromètre ainsi que par la structure de l'échantillon étudié, soit suffisante.

- Soit le xénon dans les compartiments A et B présente un déplacement chimique unique et on le localise en utilisant une sélection spatiale. Les cinétiques d'évolution du xénon dans les deux compartiments sont alors étudiées séparément. Pour réaliser cette sélection spatiale, des techniques d'imagerie basées sur l'emploi de gradients de champ magnétique combinées à des impulsions sélectives en fréquence sont développées.

Étude de cellules en suspensions : cas de la sélection spectrale

Le premier cas d'étude a été des suspensions cellulaires. En effet, ce type d'échantillon permet de garantir une bonne résolution spectrale ainsi qu'une bonne sensibilité de détection. Des cellules LR73 ont été transfectées avec le gène *mdr1* codant pour la P-glycoprotéine, une pompe à efflux présente dans la BHE. Il en résulte une surexpression de la P-glycoprotéine qui se trouve au niveau de la membrane plasmique des cellules.

En présence de la suspension cellulaire, le spectre RMN du xénon-129 présente deux signaux : le premier à 198 ppm correspondant au xénon dans le milieu extracellulaire, et un deuxième vers les 200 ppm correspondant au xénon dans les cellules. Il est donc possible d'inverser sélectivement un des

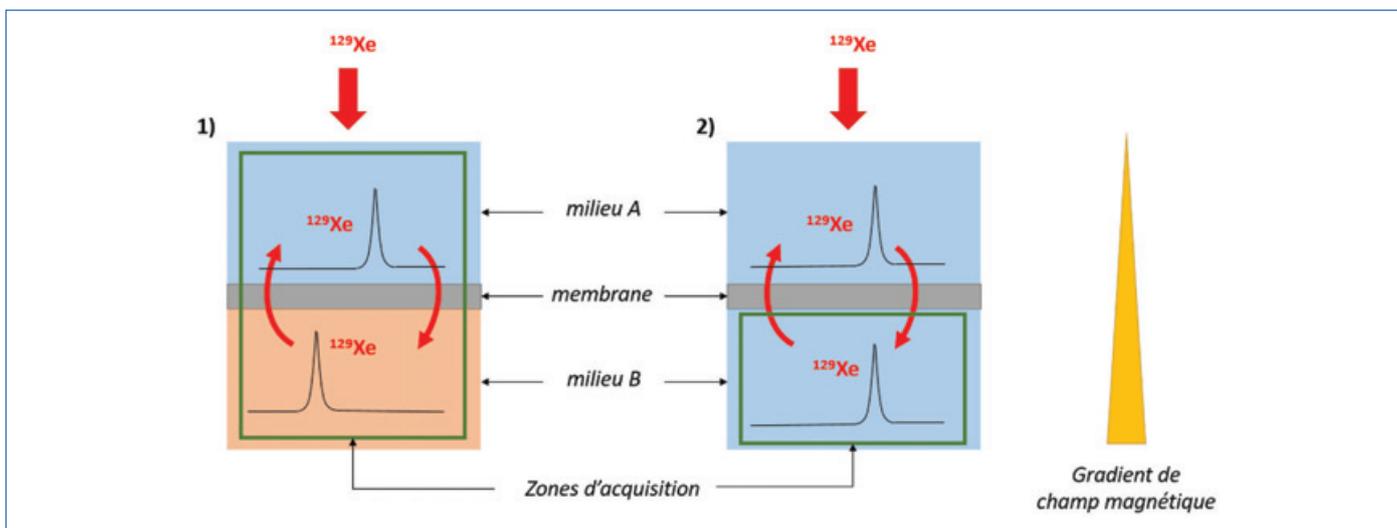


Figure 5 - Schéma explicatif des deux stratégies d'étude : 1) cas de la sélection spectrale : les spectres RMN en ^{129}Xe dans les compartiments A et B ont des déplacements chimiques différents ; 2) cas de la sélection spatiale : les déplacements chimiques sont identiques, les deux compartiments sont différenciés grâce à l'utilisation d'un gradient de champ magnétique permettant de définir une zone d'acquisition.

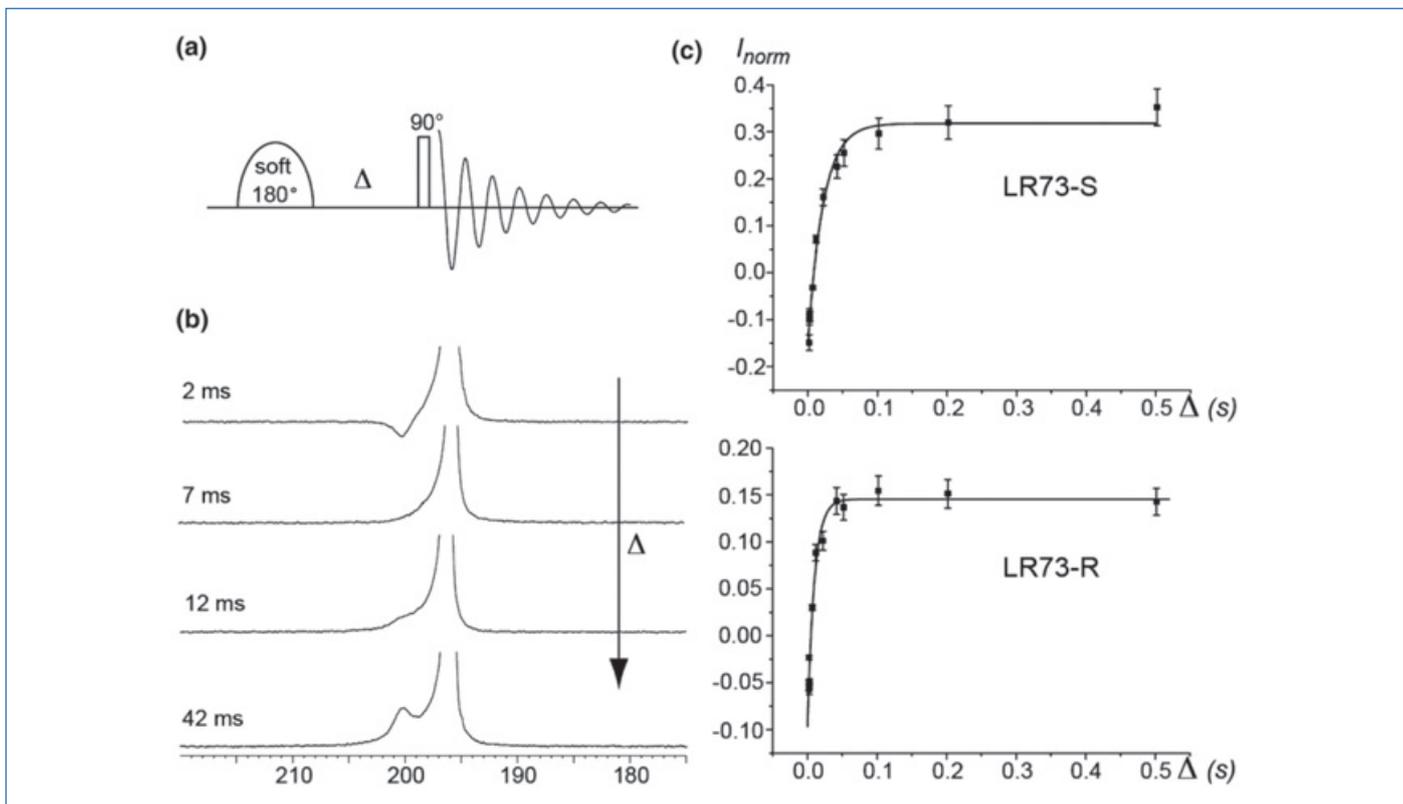


Figure 6 - Expérience de RMN ^{129}Xe réalisée sur des suspensions cellulaires, permettant la mesure de la vitesse de passage du xénon à travers la membrane plasmique. a) La séquence RMN consiste en une inversion sélective du signal de xénon intracellulaire suivie par un délai Δ et une impulsion 90° non sélective précédant l'acquisition ; b) des spectres à différents délais Δ pendant lequel le xénon diffuse sont enregistrés ; c) en traçant l'intégrale du signal inversé en fonction de Δ , on obtient l'information sur la vitesse d'échange. Ceci, appliqué sur des cellules natives (LR73-S) et surexprimant la P-glycoprotéine (LR73-R), montre une vitesse de sortie du xénon beaucoup plus grande avec ces dernières. (D'après [21]).

deux signaux (qui correspond donc à un des deux compartiments) et de regarder la vitesse de retour à l'équilibre qui dépend, elle, de la vitesse d'échange entre les compartiments intra- et extracellulaires (figure 6).

La vitesse d'entrée du xénon dans les cellules est indépendante de la présence de la P-glycoprotéine. Par contre, la vitesse de sortie du xénon est multipliée par trois dans le cas des cellules surexprimant la pompe à efflux. L'incubation des cellules avec la cyclosporine-A, un révertant de la P-glycoprotéine, inhibe cette différence et les vitesses de sorties deviennent identiques [21].

Ces premières expériences ont donc permis de montrer que l'utilisation de la RMN du xénon hyperpolarisé s'avère prometteuse pour l'analyse de systèmes biologiques à perméabilité variable impliquant des pompes à efflux comme la P-glycoprotéine.

Étude de BHE modèles sur membrane : cas de la sélection spatiale

Les études *in vivo* sont régies par la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) [22]. Cette règle vise à améliorer les conditions d'expérimentation animale. L'idée est de remplacer au maximum les études *in vivo* par des études *in vitro*, de réduire le nombre d'expériences devant être menées *in vivo* quand les modèles *in vitro* ne sont pas suffisants, et enfin de s'assurer le mieux possible d'une reproductibilité des résultats. Comme dit précédemment, cette règle impose un remplacement des expériences sur les animaux par des modèles *in vitro* lorsque cela est possible. Il est donc obligatoire d'effectuer de premières études sur des modèles de BHE avant de passer aux expériences sur rongeur. Le modèle de BHE est obtenu en faisant pousser des cellules endothéliales sur une membrane

poreuse et ensemencant le compartiment basal avec des astrocytes afin de recréer l'environnement chimique du système nerveux central. On retrouve ainsi une structure 3D similaire à celle *in vivo*.

Afin de réaliser la cinétique en RMN ^{129}Xe , le dispositif décrit en figure 7 est placé dans le spectromètre RMN entre les bobines radiofréquences. Le xénon hyperpolarisé est dissous dans le milieu apical via une membrane d'échange. Il diffuse ensuite à travers la BHE pour se retrouver dans le milieu basal. La composition chimique des deux milieux n'étant pas très différente, la signature spectrale des deux compartiments devrait être identique (figure 5, cas 2). Les informations concernant la fluidité de la barrière seront donc contenues dans la cinétique de passage du xénon du compartiment apical vers le compartiment basal. Plus la barrière sera perméable, plus le xénon passera rapidement.

Ce type d'expérience nécessite le développement de séquences RMN permettant une utilisation optimale de l'hyperpolarisation du xénon, ainsi qu'une sélection spatiale de la zone d'acquisition afin de ne considérer que celle d'intérêt. L'objectif est de tester différents modulateurs de la perméabilité de la BHE et de corréler les modifications ainsi induites avec les résultats en RMN du xénon. Il sera ainsi possible d'évaluer la capacité du xénon à être un bon marqueur de la perméabilité de la BHE sur un modèle *in vitro*.

Étude par RMN du ^{129}Xe de la BHE *in vivo*

Les études *in vivo* sur rongeurs seront ensuite réalisées. Pour ce faire, après anesthésie, l'animal sera placé dans un berceau chauffé et sa tête sera placée au niveau des bobines radiofréquences. Le xénon hyperpolarisé sera délivré à l'animal à l'aide d'un masque. L'animal respirera ainsi spontanément le gaz.

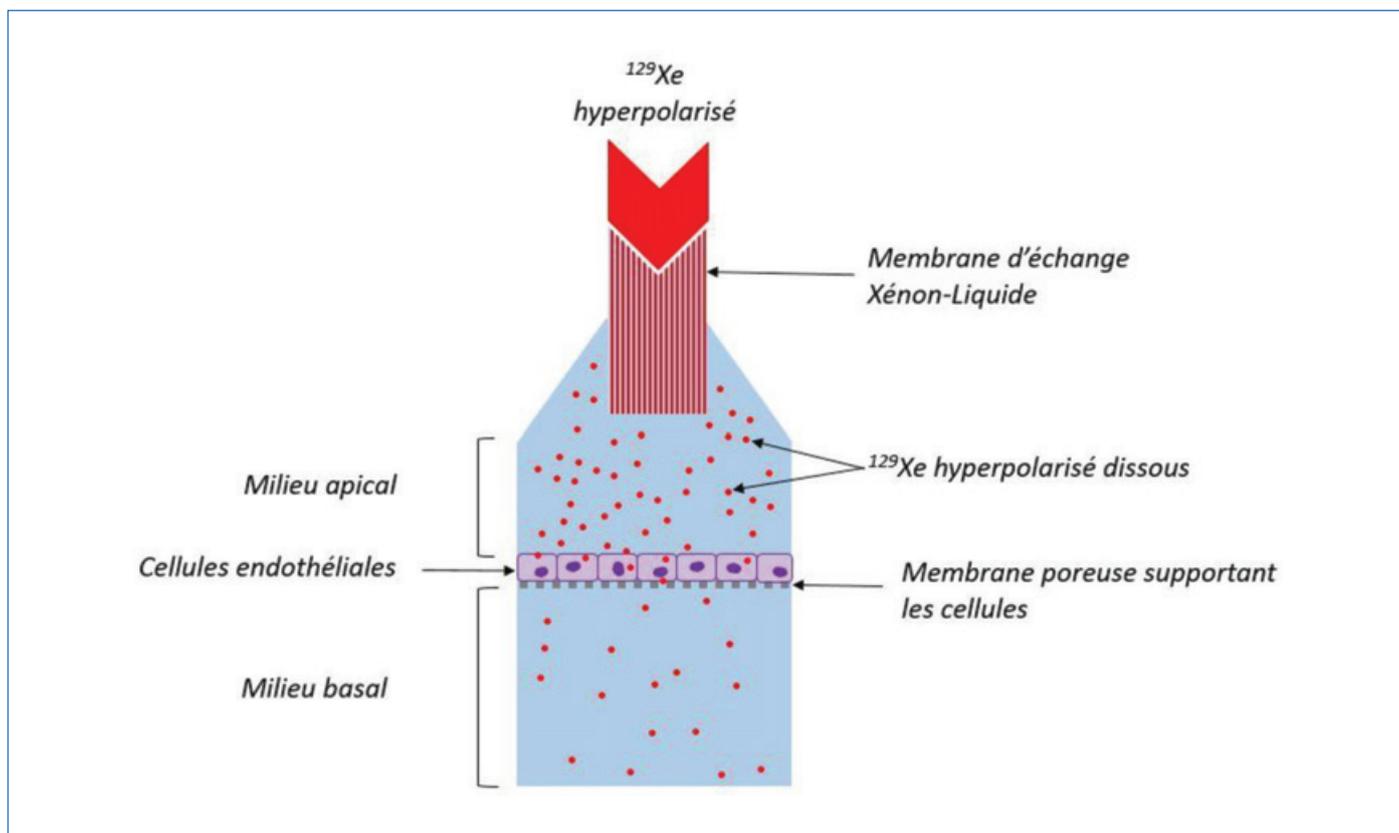


Figure 7 - Principe du dispositif permettant l'étude par RMN/IRM du xénon-129 hyperpolarisé de modèles de BHE. Le xénon hyperpolarisé est dissous dans le milieu apical en passant à travers une membrane d'échange. Puis il diffuse à travers la couche de cellules endothéliales constituant la BHE pour se retrouver dans le milieu basal où le signal RMN du ^{129}Xe est enregistré grâce à une sélection spatiale.

Le xénon traversera la barrière alvéo-capillaire, diffusera dans l'organisme via la circulation sanguine pour finalement traverser la BHE et être détectable dans le cerveau de l'animal.

La différence de composition chimique entre le sang et la zone cérébrale est suffisamment importante pour induire deux déplacements chimiques différents (figure 5, cas 1). Mais il sera indispensable d'évaluer si l'hétérogénéité de champ magnétique induite par l'animal permettra de séparer spectralement les deux zones ou si celles-ci seront confondues sur le spectre RMN.

Il est certain que la respiration de l'animal sera un avantage certain par rapport aux expériences *in vitro*. Celle-ci permettra à chaque inspiration du rongeur de renouveler le xénon hyperpolarisé dans l'organisme, et donc d'augmenter la sensibilité ainsi que de poursuivre les études dans le temps.

Afin de déterminer si la RMN du xénon hyperpolarisé est un bon candidat pour évaluer *in vivo* la perméabilité de la BHE, de nombreux paramètres expérimentaux devront être étudiés et optimisés : l'administration du xénon, les séquences d'impulsions jusqu'au traitement des résultats.

Le xénon : observateur ou acteur ?

Le xénon est donc une sonde très intéressante pour l'étude de la barrière hémato-encéphalique. Sa propension à interagir avec les différents milieux biologiques qui l'entourent et la possibilité d'augmenter son signal RMN de plusieurs ordres de grandeur combinées à sa grande gamme de déplacements chimiques permettent une approche différente de la RMN habituelle. La possibilité d'obtenir des cinétiques de passage du xénon au travers des membranes plasmiques et de le localiser quantitativement pourrait ouvrir la voie à une

meilleure étude de la BHE et de son intégrité, que ce soit en palliatif ou pour déterminer des facteurs précurseurs du déclenchement de certaines maladies telles que les maladies neurodégénératives.

Si le xénon est utile dans cette idée d'amélioration des diagnostics cliniques, il est aussi intéressant pour une étude biologique. Il semblerait que ce gaz ait un effet sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Cet effet, sans doute lié à une action sur les pompes d'efflux, pourrait nous permettre d'agir et peut-être même de moduler la fluidité de cette barrière, ce qui serait un atout majeur pour permettre aux candidats médicamenteux, jusqu'ici repoussés par ces pompes, d'atteindre leur cible dans le système nerveux.

(1) Notons qu'il existe un autre isotope stable, le xénon-131 d'abondance naturelle 21 %. Celui-ci est quadripolaire, c'est-à-dire de spin $> 1/2$. Étant très sensible aux gradients de champ électrique, il est surtout utilisé pour l'étude des surfaces [16].

(2) Le terme \tanh est négligé dans l'approximation des hautes températures, c'est-à-dire dans les conditions habituelles de la RMN, donnant $P \approx \frac{\gamma h B_0}{2kT}$.

[1] J.P. Mugler *et al.*, Simultaneous magnetic resonance imaging of ventilation distribution and gas uptake in the human lung using hyperpolarized xenon-129, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2010**, 107(50), p. 21707-712.

[2] M. Salerno *et al.*, Hyperpolarized noble gas MR imaging of the lung: potential clinical applications, *Eur. J. Radiol.*, **2001**, 40(1), p. 33-44.

[3] S. Chen *et al.*, Relationship between lung and brain injury in Covid-19 patients: a hyperpolarized ^{129}Xe -MRI-based 8-month follow-up, *Biomedicines*, **2022**, 10(4), 781.

[4] H. Yonas, R.R. Pindzola, D.W. Johnson, Xenon/computed tomography cerebral blood flow and its use in clinical management, *Neurosurg. Clin. N. Am.*, **1996**, 7(4), p. 605-616.

[5] A. Lewit-Bentley *et al.*, Structure of tumour necrosis factor by X-ray solution scattering and preliminary studies by single crystal X-ray diffraction, *J. Mol. Biol.*, **1988**, 199(2), p. 389-392.

[6] H. Desvaux, J.G. Huber, T. Brotin, J.-P. Dutasta, P. Berthault, Magnetization transfer from laser-polarized xenon to protons with spin-diffusion quenching, *ChemPhysChem*, **2003**, 4(4), p. 384-387.

[7] C. Boutin *et al.*, Hyperpolarized ^{129}Xe NMR signature of living biological cells, *NMR Biomed.*, **2011**, *24*(10), p. 1264-69.

[8] P. Lafaye, D. Lesuisse, X. Declèves, Améliorer le ciblage tissulaire des anticorps thérapeutiques par de nouveaux formats : l'exemple de la barrière hémato-encéphalique, *Médecine/Sciences*, **2019**, *35*, p. 1106-12.

[9] S. Auvity *et al.*, P-Glycoprotein (ABCB1) inhibits the influx and increases the efflux of ^{11}C -metoclopramide across the blood-brain barrier: a PET study on nonhuman primates, *J. Nucl. Med.*, **2018**, *59*(10), p. 1609-15.

[10] I. Idy-Peretti, M.-O. Habert, A. Kas, Qu'apporte l'imagerie hybride TEP-IRM dans l'étude des pathologies neuro-dégénératives ?, *Bull. Acad. Natl. Méd.*, **2022**, *206*(1), p. 28-37.

[11] O. Humbert *et al.*, Imagerie TEP au ^{18}F -FDG du cancer du sein : étude du comportement métabolique des différents phénotypes tumoraux et prédiction de la réponse tumorale à la chimiothérapie néoadjuvante, Thèse, Université de Bourgogne, **2015**.

[12] J. Wang *et al.*, Ultrasound-mediated blood-brain barrier opening: an effective drug delivery system for theranostics of brain diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2022**, *190*, 114539.

[13] S.B. Raymond *et al.*, Ultrasound enhanced delivery of molecular imaging and therapeutic agents in Alzheimer's disease mouse models, *PLoS One*, **2008**, *3*(5), e2175.

[14] A. Fabulas-Da Costa, Utilisation de modèles in vitro de la barrière hémato-encéphalique dans les phases précoces du développement de médicaments, *Thèse de doctorat*, Artois, **2013** (www.theses.fr/2013ART00410).

[15] La résonance magnétique nucléaire en chimie, *L'Act. Chim.*, **2012**, 364-365.

[16] S.K. Ahola, P. Ingman, R. Laatikainen, J. Sinkkonen, J. Jokisaari, ^{21}Ne and ^{131}Xe NMR study of electric field gradients and multinuclear NMR study of the composition of a ferroelectric liquid crystal, *J. Chem. Phys.*, **2018**, *149*(23), 234901.

[17] A. Comment *et al.*, Hyperpolarizing gases via dynamic nuclear polarization and sublimation, *Phys. Rev. Lett.*, **2010**, *105*(1), 018104.

[18] A. Kastler, Quelques réflexions à propos des phénomènes de résonance magnétique dans le domaine des radiofréquences, *Experientia*, **1952**, *8*(1), p. 1-9.

[19] M.A. Bouchiat, T.R. Carver, C.M. Varnum, Nuclear polarization in He 3 gas induced by optical pumping and dipolar exchange, *Phys. Rev. Lett.*, **1960**, *5*(8), p. 373-375.

[20] P.W. Kuchel, K. Kirk, D. Shishmarev, The NMR 'split peak effect' in cell suspensions: historical perspective, explanation and applications, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2018**, *104*, p. 1-11.

[21] P. Berthault, C. Boutin, Chapter 14: Biosensing and study of biological cells using hyperpolarized ^{129}Xe , in *Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance*, **2015**, p. 261-271.

[22] W.M.S. Russell, R.L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, **1959**.

François NGHIEM*^{1,2}, doctorant, Céline BOUTIN³, chercheuse, Aloïse MABONDZO², directeur de recherche, et Patrick BERTHAULT³, directeur de recherche.

¹Nanosciences et innovation pour les matériaux, la biomédecine et l'énergie - DRF/IRAMIS (NIMBE), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.

²Laboratoire d'étude de l'unité neurovasculaire et innovation thérapeutique (LENIT), CEA, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.

³Laboratoire de structure et dynamique par résonance magnétique (LSDRM - NIMBE), CEA, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.

* francois.nghiem@cea.fr



L'Union des professeurs de physique et de chimie

Vous présente

son nouveau site : <http://www.udppc.asso.fr>



| L'association | Actualités et Ressources |
|---|--------------------------------------|
| L'UdPPC ?, Nos positions, Tarifs, | De la maternelle au supérieur, |
| Charte graphique, Olympiades, | Au collège, Au lycée, Au labo |
| Partenaires, Nous soutenons, Enquêtes | Annales |
| Publications | Baccalauréats, Concours général, DNB |
| Le Bup, Nous avons lu, | Divers |
| L'arpenteur du web, Appel aux auteurs, | Agenda, BupDoc, Concours, Congrès, |
| Parus au BO, Autres publications, Publicitaires | Réseaux sociaux, Sites académiques |

mais l'UdPPC, c'est aussi...

...la publication numérique mensuelle avec impression papier trimestrielle



...la consultation du Bup en ligne par articles et par numéro avec BupDoc

Du 1^{er} janvier au 31 décembre 2024 :
♦ Pour tous : 1907 → 2019
♦ Pour les abonnés : 2020 → 2024



...un congrès organisé chaque année par une académie différente



Siège social et courrier : 42 rue Saint-Jacques - 75005 PARIS
Tél. : 01 40 46 83 80 - secretariat.national@udppc.asso.fr



PROK1, une nouvelle cible théranostique de la prématurité spontanée ?

Résumé La prématurité constitue un problème majeur de santé publique et ne dispose d'aucun biomarqueur permettant de prédire avec certitude sa survenue. De façon intéressante, la protéine circulante PROK1 a récemment été identifiée comme biomarqueur potentiel dont les niveaux circulants sont augmentés depuis la 24^e semaine de gestation chez les femmes qui présenteront un accouchement prématuré spontané. L'idée de ce projet est de développer et de caractériser des outils moléculaires qui cibleraient et/ou bloqueraient les voies de signalisation de cette protéine afin de proposer de nouvelles stratégies, plus spécifiques et moins onéreuses.

Mots-clés Prématurité, prokinétiques, biomarqueur, inflammation, molécules chimiques, anticorps bloquants.

Abstract PROK1: New theranostic target for preterm birth?

Preterm birth (PTB) is a major public health problem, for which no reliable biomarker to predict its occurrence is available. Interestingly, the circulating protein PROK1 has recently been identified as a new circulating biomarker of PTB, from the 24th week of gestation. The aim of this study is to develop and characterize molecular tools that can target and/or block the signaling pathways of PROK1 in order to propose new, more specific, and less costly strategies.

Keywords Preterm birth, prokinetics, biomarker, inflammation, chemical molecules, blocking antibodies.

La prématurité, un enjeu menaçant de la santé publique

Les accouchements prématurés (AP) représentent un des problèmes obstétricaux les plus importants, concernant près de 15 millions de naissances et un million de décès dans le monde chaque année [1-2]. Ces naissances surviennent avant huit mois et demi de grossesse, soit trente-sept semaines d'aménorrhées (SA). Les conséquences pour le nouveau-né sont importantes puisque le développement de ses organes vitaux n'est pas terminé. La prématurité est associée à des conséquences néonatales à court, moyen et long terme, notamment l'augmentation du risque de maladies chroniques pulmonaires et gastro-intestinales, le développement de

troubles neurologiques (retards mentaux, troubles de l'apprentissage, de la vision ou de l'audition), ainsi qu'une augmentation du taux de mortalité après la naissance [1-3] (figure 1). Ces conséquences nécessitent une prise en charge lourde (couveuse, assistance respiratoire, alimentation par sonde gastrique, etc.) et impliquent l'engagement d'importants moyens financiers. En France, on estime en 2010 le coût moyen par nouveau-né prématuré à 105 000 € contre 1 728 € pour les enfants nés à terme [4].

Deux types de prématurités se distinguent : la prématurité induite (PI) et la prématurité spontanée (PS). La PI résulte d'une décision médicale qui fait suite à l'identification de problèmes de santé affectant la mère et/ou le fœtus et pour lesquels il est nécessaire d'arrêter la grossesse [1]. La PS

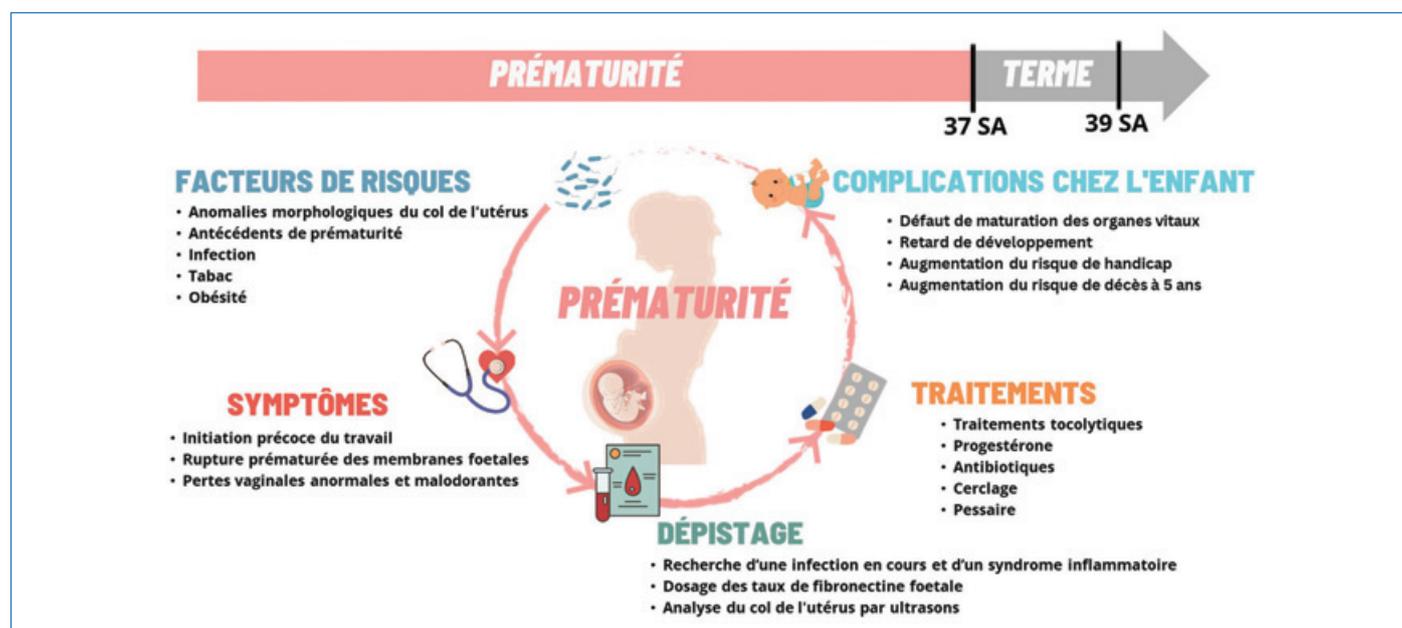


Figure 1 - Illustration des étapes de la survenue de la prématurité incluant les causes, les symptômes révélateurs, les techniques de dépistage disponibles, les traitements proposés à ce jour, ainsi que les conséquences retrouvées chez les enfants.

|  Techniques de dépistage | Forces | Faiblesses |
|---|---|--|
| Recherche d'infection | Recherche d'agents pathogènes (PCR, culture) [2] Les agents pathogènes sont retrouvés dans différents fluides biologiques | Certaines souches sont difficiles à identifier avec précision dans le temps imparti [2] Faible sensibilité de détection [2] |
| Fibronectine fœtale | Dosage des taux de fibronectine fœtale dans les sécrétions vaginales [5] Bon indicateur de la rupture des membranes fœtales [5] Haute sensibilité [6] | Faux positifs [5] |
| Contractions | Suivi de la fréquence des contractions et du déclenchement du travail Bonne corrélation à la prématurité | Grande variabilité du profil des contractions chez les femmes |
| Ultrasons | Longueur et consistance du col de l'utérus [5] Risque de prématurité plus élevé si le col de l'utérus est court et/ou dilaté [5] | Faible prédiction (notamment si grossesses multiples) [5] |

Tableau I - Outils prédictifs utilisés à ce jour en clinique pour le diagnostic de la prématurité.

représente, en France, la moitié des cas de prématurité. Elle survient suite à l'activation précoce du mécanisme de travail qui précède l'accouchement, ou fait suite à la rupture prématurée des membranes fœtales [1, 5]. Les principaux facteurs de risques de la prématurité sont des antécédents de prématurité, des anomalies morphologiques du système génital, des membranes fœtales altérées, ou la présence d'agents infectieux [1] (*figure 1*). Les infections représenteraient d'ailleurs une des causes principales de la PS car la présence d'agents infectieux est retrouvée dans près de 25 à 40 % des cas de prématurité [1].

La prise en charge de ces femmes est donc primordiale mais reste très complexe, car peu de moyens de prédiction et de prévention efficaces sont disponibles à ce jour.

Le besoin d'outils prédictifs et préventifs pour les menaces d'accouchements prématurés

La prédiction de la prématurité spontanée est difficile car elle est étroitement dépendante de la cause de la prématurité et des outils à la disposition des soignants. À ce jour, aucune méthode de prédiction ne montre une sensibilité suffisante pour identifier, à temps, les femmes à risque tout en étant assez spécifique pour éviter les interventions inutiles et les soins très onéreux [5].

Les techniques les plus utilisées actuellement en clinique se basent sur la mesure des taux de fibronectine dans les sécrétions vaginales, sur la recherche d'un syndrome inflammatoire ou d'une infection en cours dans le sang et/ou les urines et/ou les sécrétions vaginales, sur le suivi des contractions, ou encore sur l'analyse morphologique du col de l'utérus par ultrasons [5] (*figure 1* et *tableau I*). Cependant, la diversité des tableaux cliniques complique l'identification d'un biomarqueur unique pour la prédiction de la prématurité.

La forte association entre la prématurité et les infections bactériennes rend l'utilisation des antibiotiques pertinente dans la prévention de la prématurité (*tableau II*). Néanmoins, aucune étude n'a démontré que leur administration confère un bénéfice direct dans la réduction du risque de prématurité. Les antibiotiques sont souvent donnés trop tardivement pour empêcher l'infection et restent peu spécifiques car la souche bactérienne en cause de la menace est rarement identifiable

dans le temps imparti de la prise de décision [2]. Par ailleurs, de récentes études ont démontré que le traitement par les antibiotiques pendant la grossesse pouvait impacter la santé du fœtus [2]. L'utilisation d'outils mécaniques tels que le cerclage ou le pessaire sont utilisés en routine pour retarder l'accouchement [7]. La progestérone est également largement utilisée avec une efficacité importante pour certaines grossesses. Cependant, cette efficacité reste controversée en fonction des stades de la grossesse et des études réalisées [8]. Enfin, les tocolytiques basés sur l'inhibition des contractions utérines sont largement utilisés (*tableau II*). Les contractions ciblées par ce traitement sont la conséquence d'une réponse inflammatoire importante qui va déclencher le processus de travail et causer un accouchement prématuré [9]. Aucun de ces traitements ne présente une efficacité totale car la majorité des molécules utilisées n'agit que sur les conséquences de l'inflammation et non sur les causes sous-jacentes. Actuellement, les groupes de recherches s'intéressent de plus en plus aux stratégies qui permettraient de réduire l'inflammation associée à cette condition [9]. Dans ce cadre, notre équipe s'oriente vers la caractérisation du rôle d'une nouvelle protéine dénommée la prokinétine-1 (PROK1) dans la prématurité et dans son contrôle des mécanismes inflammatoires associés. Cette protéine serait impliquée dans le processus inflammatoire du déclenchement des accouchements et constituerait une cible prometteuse dans la prévention de la prématurité et/ou le traitement des menaces d'accouchements prématurés (MAP).

Intérêt des prokinétines dans la prise en charge des MAP

Qu'est-ce que les prokinétines ?

Depuis plusieurs années, notre équipe de recherche travaille activement sur une nouvelle famille de protéines, découverte en 2001 chez l'humain : les prokinétines. Cette famille est composée de deux ligands, dénommés PROK1 et PROK2. Ces deux ligands sont capables de se lier avec des affinités quasiment similaires à leurs deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 (*figure 2*). Ces récepteurs sont couplés aux protéines G (RCPG) et sont constitués d'une extrémité N-terminale extracellulaire, de sept hélices transmembranaires, de trois boucles

| Traitements | Forces | Faiblesses |
|----------------------|--|---|
| Antibiotiques | Bonne disponibilité des antibiotiques | Faible efficacité [2] Administration souvent trop tardive [2] Risque d'impact négatif sur la santé du fœtus [2] |
| Tocolytiques | Inhibiteurs des contractions [10] Prolongation de la grossesse [10] | Traitement des conséquences et non des causes des MAP [9] Effet tardif après 48 h de traitement [10] |
| Cerclage | Prolongation de la grossesse | Risque d'effets délétères sur le fœtus |
| Progestérone | Rôle sur la contractilité utérine, la dilatation cervicale et l'initiation du travail [8] Réduction du risque d'accouchement et de la morbidité néonatale pour certaines grossesses | Efficacité très controversée en fonction des grossesses et des études [8] |
| Pessaire | Diminution de la pression exercée par le fœtus sur le col de l'utérus et le bouchon muqueux [7] | Efficacité controversée en fonction des études [7] |

Tableau II - Forces et faiblesses des traitements proposés actuellement pour la prévention de la prématurité.

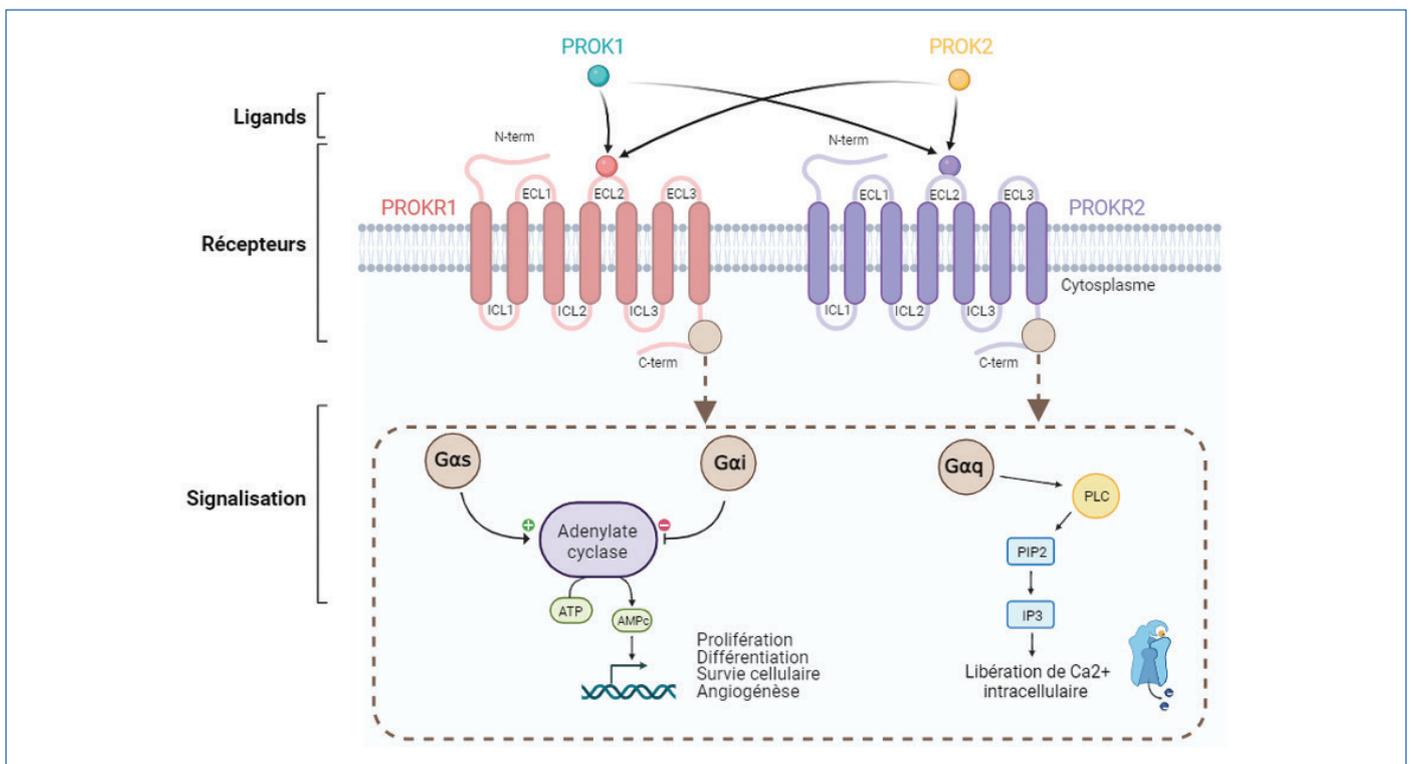


Figure 2 - Structures et voies de signalisations de la famille des prokinétines.

intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3), de trois boucles extracellulaires (ECL1, ECL2, ECL3) et d'une queue C-terminale cytoplasmique qui est impliquée dans la liaison aux protéines G (figure 2). La reconnaissance des ligands a lieu au niveau de la boucle extracellulaire ECL2 des récepteurs exprimés à la membrane et induit la transduction du signal intracellulaire. Les boucles intracellulaires 2 et 3 interagissent avec les protéines G décrites en figure 2 [11].

Rôle clé de PROK1 durant la grossesse

De nombreuses études ont rapporté le rôle majeur de PROK1 dans le contrôle des processus clés du développement placentaire [12]. Ses niveaux circulants sont augmentés

d'un facteur cinq au premier trimestre de la grossesse en comparaison à ceux observés chez les femmes non enceintes [12]. PROK1 et ses récepteurs sont également fortement exprimés par les cellules composant le placenta et les membranes fœtales qui entourent le fœtus. Plus précisément, le ligand PROK1 est exprimé par les syncytiotrophoblastes (unité endocrine du placenta), par les macrophages fœtaux, ainsi que par les trophoblastes du chorion (composant des membranes fœtales) [13]. Les récepteurs des prokinétines sont exprimés, quant à eux, par les cellules endothéliales, les cellules trophoblastiques et par les cellules épithéliales de l'amnios (autre composant des membranes fœtales) [13].

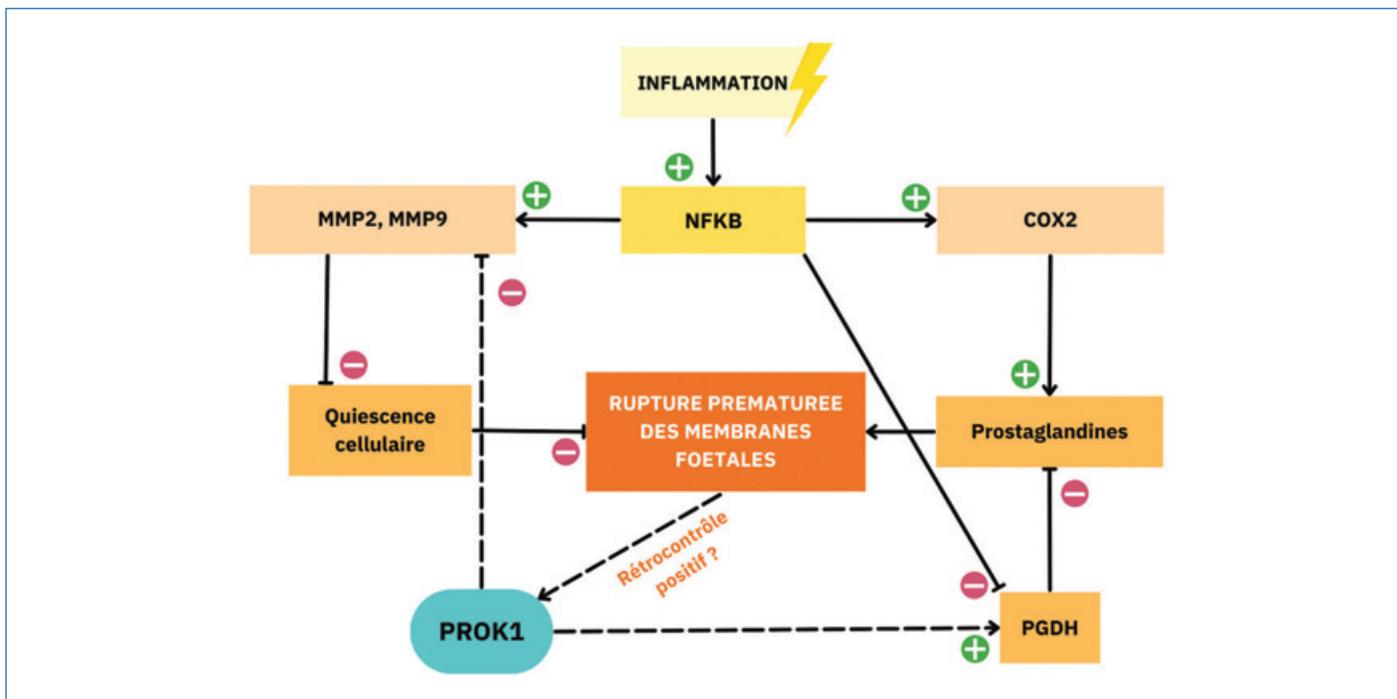


Figure 3 - Illustration résumant nos hypothèses sur le rôle de PROK1 dans la régulation de l'initiation du travail dans un contexte de prématurité [13-15].

PROK1 : un candidat potentiel pour prédire des accouchements prématurés

Rôle de PROK1 dans les mécanismes de l'accouchement

Le processus de travail qui précède l'accouchement joue un rôle déterminant dans la programmation du terme d'une grossesse. L'initiation trop précoce de ce mécanisme est généralement associée à un accouchement prématuré.

Dans ce contexte, notre équipe a démontré que les taux circulants de PROK1 augmentaient progressivement pendant le dernier trimestre de la grossesse et qu'ils chutaient brutalement au moment de l'initiation de la phase de travail [13] (figure 3). L'expression de PROK1 a été retrouvée dans le placenta et les membranes fœtales, mais du fait de sa sécrétion plus élevée par le chorion, il a été proposé que la régulation de l'expression de PROK1 soit contrôlée davantage par ce tissu. En effet, l'ajout du ligand PROK1 sur des modèles de culture *in vitro* de membranes fœtales a montré une implication de ce facteur dans le phénomène de quiescence qui précède le déclenchement du travail. Cela se manifeste notamment par une diminution de l'expression des métalloprotéases 2 et 9 impliquées dans le mécanisme menant à la rupture des membranes [13] (figure 3). En outre, une activation de l'enzyme PGDH (15-hydroxyprostaglandin déshydrogénase) par PROK1 suggère son implication dans la quiescence avant le début du travail [13] (figure 3). Ces résultats suggèrent que dans les conditions physiologiques, PROK1 serait un facteur de quiescence de la cavité intra-utérine et que ses baisses de niveaux circulants ou *in situ* seraient associées à un déclenchement de l'accouchement.

Dérégulation de PROK1 dans la prématurité

Concernant la prématurité, notre équipe de recherche a récemment démontré que les taux circulants du ligand PROK1 étaient significativement plus élevés dans le plasma de patientes allant accoucher prématurément en comparaison à des femmes contrôles enceintes et sans complication de la grossesse. Cette augmentation a été observée dès la

24^e semaine d'aménorrhée (SA), avec un écart entre les cas de prématurité et les cas contrôles d'autant plus important que la grossesse progresse (28, 32, 36 SA). Ces résultats sont en cours de validation sur des cohortes plus larges obtenues dans le cadre de collaborations avec des départements d'obstétrique et de gynécologie, à l'échelle nationale et internationale.

Inflammation et rôle hypothétique de PROK1 dans la prématurité

Au regard de la diminution physiologique de PROK1 précédemment identifiée au moment de la phase de travail, l'augmentation de PROK1 observée chez les femmes accouchant prématurément laisse suggérer que cette cytokine est directement impliquée dans la mise en place de mécanismes compensatoires qui visent à retarder au maximum l'initiation de la phase de travail. En effet, la prématurité spontanée est souvent associée à une infection/inflammation qui déclenche une réponse inflammatoire avec la production du facteur NFκB, activateur de l'expression des MMP2 et 9 et inhibiteur de l'expression de PGDH [14-15] (figure 3). Ces dérégulations vont contribuer à l'initiation du travail prématuré et/ou causer la rupture prématurée des membranes fœtales [10, 12].

L'hypothèse que PROK1 soit produite en grande quantité par les membranes fœtales en cas d'infection et d'initiation prématurée du processus de travail est donc très intéressante. Cette augmentation au niveau du site de rupture des membranes fœtales serait un moyen de protection de la grossesse qui serait mis en place pour ralentir le déclenchement du travail. Si cette hypothèse se confirme, PROK1 serait un biomarqueur d'autant plus pertinent de la prématurité.

Démonstration de la valeur théranostique de PROK1

Mimer la prématurité en laboratoire

Comme évoqué précédemment, la prématurité spontanée est souvent secondaire à des agents infectieux, en particulier les bactéries [2]. Classées comme étant à Gram- ou à Gram+

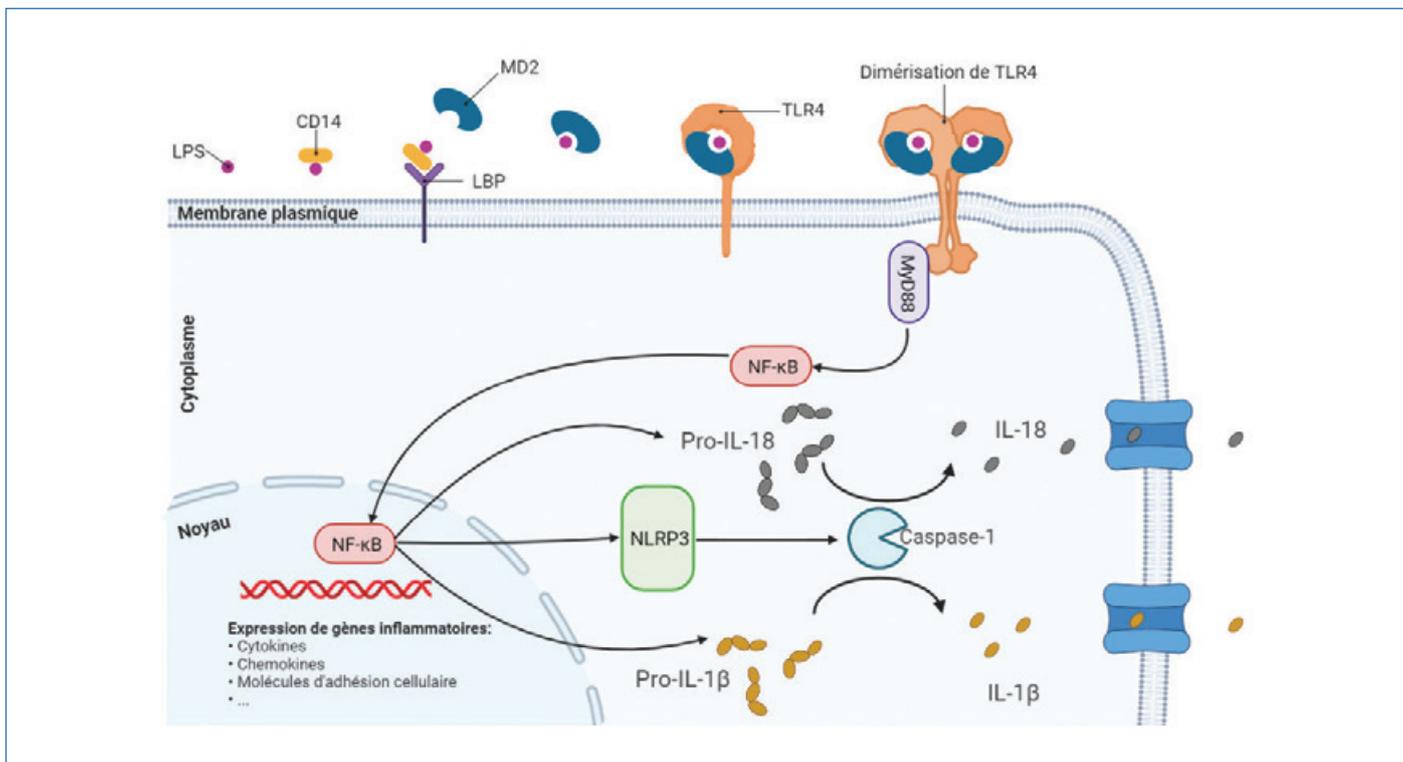


Figure 4 - Voie de signalisation du LPS.

en fonction de la composition de leur membrane externe, les bactéries infectent la femme enceinte, en particulier les membranes fœtales en remontant par son tractus génital [16]. Un environnement prématuré peut donc être mimé en laboratoire par le traitement de modèles avec du LPS (lipopolysaccharides), composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram-. Ce dernier se fixe aux récepteurs TLR4 des cellules infectées et active les voies de signalisation de l'inflammation [2] (figure 4). En particulier, le LPS active la translocation du facteur NFκB qui induit à son tour la transcription de facteurs inflammatoires comme le NLRP3, la pro-IL1β et la pro-IL18 (figure 4). L'inflammasome NLRP3 serait responsable de l'activation de la caspase1 qui catalyse la transformation des pro-IL1β et pro-IL18 en cytokines matures sécrétées par les cellules [17] (figure 4). Dans le cas de la prématurité, l'inflammation déclenchée nuit au bon déroulement de la grossesse et favorise la rupture des membranes fœtales qui induira l'accouchement [1].

Les expériences menées *in vitro* et *ex vivo* permettent l'étude des mécanismes à l'origine de la prématurité avant de passer, par la suite, aux modèles animaux et aux essais cliniques impliquant les humains.

Lien entre l'exposition au LPS et l'expression des prokinétines

Les prokinétines étant fortement dérégulées dans les pathologies de la grossesse, en particulier dans la prématurité, les expériences menées actuellement visent à déterminer les effets du LPS sur l'expression des deux ligands PROK1 et PROK2, ainsi que leurs récepteurs PROKR1 et PROKR2, dans différents systèmes de cultures 2D et 3D. Ces expériences permettront de démontrer le rôle de PROK1 dans la prématurité, en particulier celle associée à la prématurité infectieuse, et de mieux comprendre le mode de fonctionnement d'une protéine circulante qui présente un fort potentiel de biomarqueur de prématurité.

Modèles pour caractériser la pertinence de PROK1 comme biomarqueur ou cible de la PS

L'utilisation de lignées cellulaires immortalisées issues du placenta ou de ses membranes fœtales constitue un modèle pertinent d'étude *in vitro*. En effet, les cellules immortalisées sont capables de se multiplier rapidement et à l'infini, permettant la reproductibilité des expériences. Les cellules humaines HTR (isolées de placentas du premier trimestre et immortalisées), ainsi que les cellules BeWo (isolées d'un cancer du placenta : le choriocarcinome) constituent deux modèles très pertinents pour l'étude des effets de facteurs et/ou de molécules chimiques sur les processus de la parturition. L'étude de la différenciation – processus majeur du développement placentaire – est également possible avec la lignée BeWo. Des cellules de l'amnios et du chorion – composants majeurs des membranes fœtales – sont également couramment utilisées pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la rupture des membranes.

Les études cliniques impliquant la collecte de placentas et/ou de membranes fœtales après l'accouchement sont un deuxième modèle d'études *ex vivo* très importantes car elles permettent de travailler directement sur du tissu humain de patientes. L'étude clinique « Placenta EPG » (NCT05188066) permet actuellement à l'équipe de collecter des placentas au CHU Grenoble Alpes et de réaliser des cultures 3D d'explant de placentas et de membranes fœtales, *ex vivo* [18]. Ces tissus peuvent être collectés à terme ou à la suite d'accouchements prématurés.

Enfin, l'utilisation de modèles animaux constitue une étape préclinique majeure qui permet la démonstration, dans un modèle intégré, des effets de molécules validées *in vitro*, *ex vivo* et sur cohortes cliniques. Du fait des similitudes importantes dans les mécanismes de l'accouchement entre les rongeurs et les humains, la souris constitue le modèle de prédilection pour l'étude des processus de la prématurité *in vivo*. Mimer l'infection bactérienne chez la souris permet la

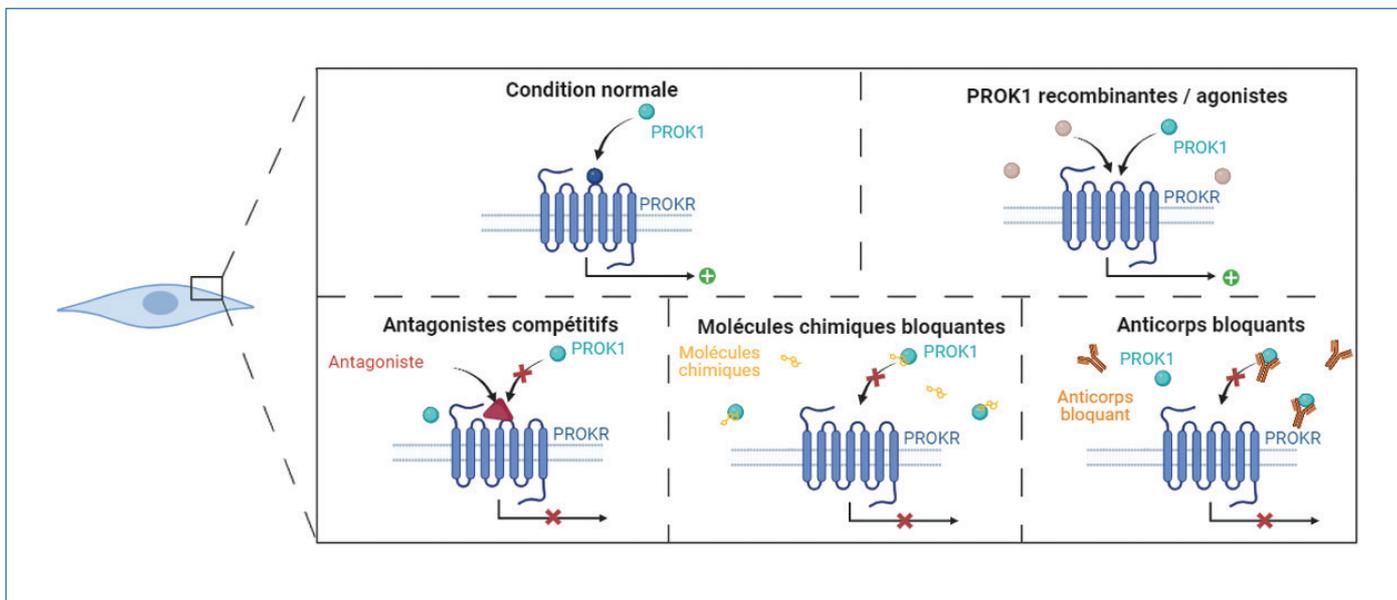


Figure 5 - Stratégies en cours de développement pour empêcher l'interaction ligand-récepteur de PROK1.

caractérisation des effets de molécules et/ou facteurs directement impliqués. Le modèle rat est aussi souvent utilisé pour étudier les effets néfastes des infections par la bactérie *Streptococcus B*, souvent associées à la prématurité, sur le développement cérébral du fœtus [19].

Vers le développement d'un nouveau test de prédiction *in vitro* du risque de PS, basé sur le dosage de PROK1

Les observations cliniques réalisées à la suite du dosage de PROK1 dans la cohorte ANGIOPREL suggèrent fortement que PROK1 constitue un biomarqueur puissant de l'identification de femmes dont la grossesse aboutira à un accouchement prématuré. Même si le dosage de cette cytokine est actuellement réalisable par ELISA en laboratoire, le développement d'un test rapide à utiliser en routine clinique serait plus pertinent. Un nouveau test rapide s'appuiera sur l'utilisation de bandelettes et d'anticorps monoclonaux spécifiques du ligand PROK1. Le développement de ces anticorps a été soutenu par Inserm Transfert au sein de notre laboratoire et la validation de leurs propriétés pronostiques et/ou thérapeutiques est en cours.

PROK1 : amie ou ennemie des accouchements prématurés ?

Les niveaux circulants très augmentés de PROK1 chez les femmes avec accouchement prématuré spontané ne signifient pas nécessairement que cette cytokine contribue au développement de la prématurité, car son augmentation pourrait également s'expliquer par des processus mis en place par certaines cellules et/ou tissus pour répondre à l'inflammation causée par des agents infectieux. La réponse à ces questions permettrait de démontrer si PROK1 est une cytokine amie et/ou ennemie et de la classer en tant que facteur anti- ou pro-inflammatoire en cas de prématurité.

PROK1, amie en cas de risque de prématurité

Dans plusieurs conditions pathologiques, liées ou non à la grossesse, il a été reporté que PROK1 peut être associée aux

processus compensatoires mis en place par l'organisme pour permettre à des situations comme la grossesse de se poursuivre [12, 20]. Les expériences menées au sein de notre laboratoire devraient permettre de conclure sur cette éventualité. Si PROK1 s'avère une cytokine amie et que les augmentations de son expression dans les tissus de la cavité intra-utérine et dans la circulation se produisent pour limiter les conséquences de l'inflammation sous-jacente, il serait important d'envisager le traitement des femmes avec un risque d'accouchement prématuré par cette cytokine et/ou par des agonistes de ses récepteurs avant le déclenchement du travail.

Ainsi, la première stratégie envisagée consisterait à traiter les patientes à risque d'AP par la PROK1 recombinante (figure 5). Des expériences *in vitro* et *in vivo* sont en cours pour établir les modalités des traitements et caractériser la pertinence d'un traitement par PROK1 à mettre en place avant ou après le déclenchement de l'inflammation médiée par le LPS. Par ailleurs, notre laboratoire a récemment développé la technique de production de PROK1 via un système eucaryote. Si PROK1 montre un intérêt thérapeutique, cette production passera à l'étape de production à grande échelle.

D'autre part, il est possible d'activer la signalisation de PROK1 médiée par le récepteur PROKR1 via l'utilisation d'agoniste spécifique comme l'IS20, récemment identifié par une équipe française [21] (figures 5 et 6). Le ciblage spécifique de PROKR1 est motivé par le fait que PROK1 présente sensiblement plus d'affinité pour ce dernier qui est plus exprimé à la membrane dans des conditions physiologiques et pathologiques.

Une atténuation des processus inflammatoires à la suite de l'activation de la signalisation médiée par PROK1 laissera supposer que cette cytokine est augmentée dans l'AP pour compenser les effets néfastes de l'inflammation et/ou de l'infection. Cela motiverait les recherches dans le sens du développement d'agonistes du ligand et/ou des récepteurs des prokinétines.

PROK1, ennemie de l'accouchement prématuré

Si la PROK1 s'avère causative des accouchements prématurés, elle constituerait une cible thérapeutique intéressante pour prévenir la prématurité spontanée. Plusieurs stratégies peuvent être considérées dans ce cas de figure.

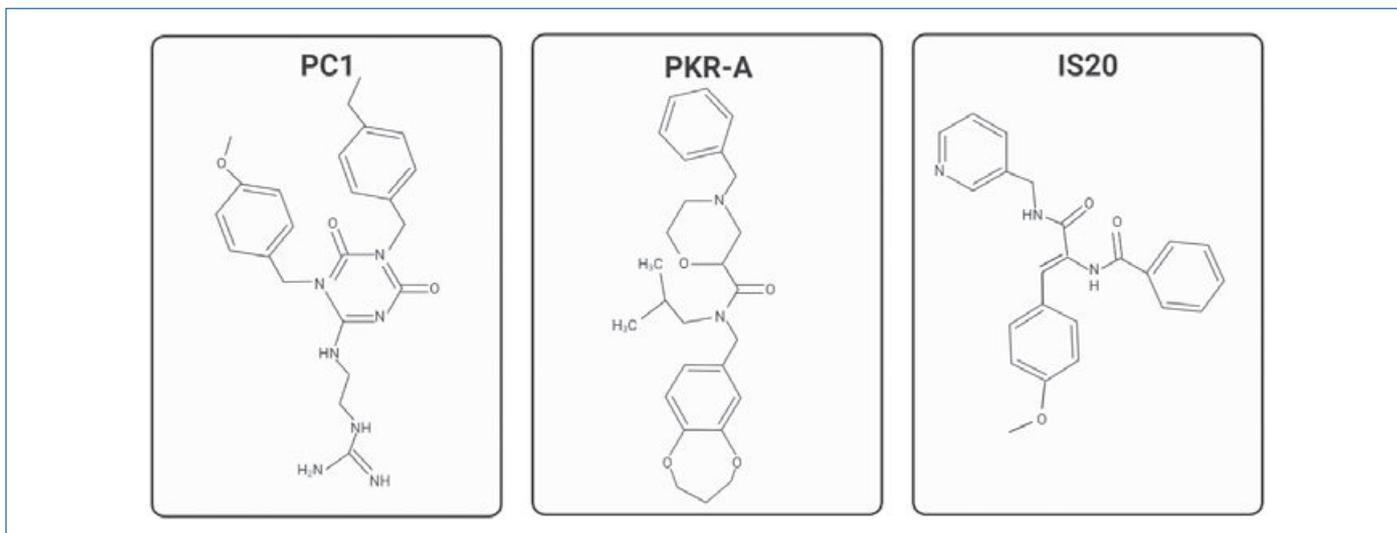


Figure 6 - Structures chimiques des antagonistes PC1 et PKR-A, ainsi que de l'agoniste IS20.

L'utilisation d'antagonistes des récepteurs serait ainsi envisagée (figure 6). En effet, plusieurs études de la littérature ont démontré que PROK1 agissait via les deux récepteurs PROKR1 et PROKR2, avec la notion que PROKR2 serait plus médiateur des effets pro-inflammatoires de PROK1 [22]. Plusieurs antagonistes de PROKR1 et PROKR2 ont ainsi été identifiés et testés dans plusieurs conditions pathologiques [23]. Il s'agit majoritairement de dérivés non peptidiques de triazines-guanidines qui miment la structure naturelle des ligands. Les principaux membres sont PC1, PC7, PC18, PC25 et PC35 [24] (figures 5 et 6). Ces antagonistes cibleraient plus PROKR1 que PROKR2. Une seconde famille d'antagonistes non peptidiques existe et est composée principalement des membres PKRA7 et PKRA505 [23]. Ces derniers seraient plus spécifiques de PROKR2 [25].

Une alternative au blocage des récepteurs PROKR1 et PROKR2 serait le blocage spécifique du ligand PROK1 car le deuxième ligand PROK2 se lie également aux deux récepteurs. Une stratégie plus spécifique du ligand PROK1 permettrait ainsi de ne pas affecter les effets médiés par PROK2.

Le blocage du ligand est envisageable par deux stratégies. La première vise l'identification d'une molécule chimique capable de se fixer au ligand et de bloquer son site d'interaction avec ses récepteurs. Ce blocage permettra de bloquer les effets de PROK1 sur la mobilisation du calcium, voie de signalisation majeure (figure 5). Pour cela, la structure tridimensionnelle de PROK1 a été déterminée *in silico* et le criblage de plusieurs chimiothèques est actuellement en cours de réalisation au sein de notre laboratoire. La seconde stratégie vise, quant à elle, à développer un anticorps monoclonal spécifique du ligand PROK1 capable d'empêcher sa liaison à ses récepteurs (figure 6). Cet anticorps, en cours de caractérisation au sein de l'équipe, servira à la fois à la détection de PROK1 dans un test miniaturisé en remplacement du test ELISA « visée diagnostique » et au blocage du ligand PROK1 « visée thérapeutique » (figure 5).

L'ensemble des données cumulées à ce jour sur la pertinence de PROK1 dans la prédiction et/ou le traitement des accouchements prématurés nous incite à poursuivre les stratégies moléculaires visant le ligand et/ou ses récepteurs pour identifier une nouvelle méthode d'atténuation des conséquences néfastes de la prématurité sur le fœtus en développement.

PROK1 pourra constituer un candidat pertinent à cibler dans les pathologies de la grossesse, en particulier celles associées à la prématurité. Une thérapie plus efficace permettra de retarder les accouchements prématurés lorsqu'un risque ou une menace sont identifiés. Par ailleurs, les thérapies visant PROK1 et/ou ses récepteurs pourront également être étendues à d'autres pathologies PROK-dépendantes.

- [1] R.L. Goldenberg, J.F. Culhane, J.D. Iams, R. Romero, Preterm birth 1, epidemiology and causes of preterm birth, *Lancet*, **2008**, 371, p. 75-84.
- [2] M. Cappelletti, S. Della Bella, E. Ferrazzi, D. Mavilio, S. Divanovic, Inflammation and preterm birth, *J. Leukoc Biol.*, **2016**, 99(1), p. 67-78.
- [3] A. Giraud *et al.*, Perinatal inflammation exposure and developmental outcomes 7 years after neonatal arterial ischaemic stroke, *Developmental Medicine & Child Neurology*, **2023**, 65(8), p. 1073-80.
- [4] A.-L. Soilly *et al.*, Cost-of-illness analysis of preterm births in France, *J. Gest. Econ. Méd.*, **2017**, 35(6), p. 305-320.
- [5] Z.A. Oskovi Kaplan, A.S. Ozgu-Erdinc, Prediction of preterm birth: maternal characteristics, ultrasound markers, and biomarkers: an updated overview, *J. Pregnancy*, **2018**, 2018, p. 1-8.
- [6] A.M. Peaceman *et al.*, Fetal fibronectin as a predictor of preterm birth in patients with symptoms: a multicenter trial, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **1997**, 177(1), p. 13-18.
- [7] A. Leclerc, Pessaire et menace d'accouchement prématuré : étude rétrospective réalisée au CHU de Caen entre 2013 et 2015, portant sur 45 patientes ayant bénéficié d'un pessaire en association ou non avec un cerclage du col utérin présentant un col court entre 18 et 28 semaines d'aménorrhée, *Gynécologie et Obstétrique*, **2016**, p. 42.
- [8] B. Akinwunmi, W.-K. Ming, Evaluating vaginal progesterone in preventing recurrent preterm birth: a call to action, *JAMA Network Open*, **2022**, 5(10), e2242247.
- [9] A.L. Areia, A. Mota-Pinto, Inflammation and preterm birth: a systematic review, *Reprod. Med.*, **2022**, 3(2), art. 2.
- [10] Practice Bulletin No. 171: Management of preterm labor, *Obstet. Gynecol.*, **2016**, 128(4), p. e155-164.
- [11] R. Lattanzi, R. Miele, Prokineticin-receptor network: mechanisms of regulation, *Life*, **2022**, 12(2), p. 172.
- [12] P. Hoffmann *et al.*, Role of EG-VEGF in human placentation: physiological and pathological implications, *J. Cell Mol. Med.*, **2009**, 13(8B), p. 2224-35 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19602057>).
- [13] C. Dunand *et al.*, Endocrine gland-derived endothelial growth factor (EG-VEGF) is a potential novel regulator of human parturition, *Biol. Reprod.*, **2014**, 91(3), 73.
- [14] Q. Dong, Y. Li, J. Chen, N. Wang, Azilsartan suppressed LPS-induced inflammation in U937 macrophages through suppressing oxidative stress and inhibiting the TLR2/MyD88 signal pathway, *ACS Omega*, **2021**, 6(1), p. 113-118.
- [15] R.M. Rizek *et al.*, 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase protein expression in human fetal membranes with and without subclinical inflammation, *Reprod. Sci.*, **2007**, 14(3), p. 260-269.
- [16] R.D. Catalano *et al.*, Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition?, *Mol. Hum. Reprod.*, **2010**, 16(5), p. 311-319.

- [17] Y. Huang, W. Xu, R. Zhou, NLRP3 inflammasome activation and cell death, *Cell Mol. Immunol.*, **2021**, *18*(9), art. 9.
- [18] L. Fliedel, K. Alhareth, N. Mignet, T. Fournier, K. Andrieux, Placental models for evaluation of nanocarriers as drug delivery systems for pregnancy associated disorders, *Biomedicines*, **2022**, *10*, p. 936.
- [19] M.-J. Allard, A. Giraud, M. Segura, G. Sebire, Sex-specific maternofetal innate immune responses triggered by group B Streptococci, *Sci Rep.*, **2019**, *9*(1), art. 1.
- [20] S. Brouillet, P. Hoffmann, J.-J. Feige, N. Alfaidy, EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development, *Trends Endocrinol. Metab.*, **2012**, *23*(10), p. 501-508.
- [21] A. Gasser *et al.*, Discovery and cardioprotective effects of the first non-peptide agonists of the G protein-coupled prokineticin receptor-1, *PLoS One*, **2015**, *10*(4), e0121027.
- [22] W. Traboulsi *et al.*, Antagonism of EG-VEGF receptors as targeted therapy for choriocarcinoma progression in vitro and in vivo, *Clin. Cancer Res.*, **2017**, *23*(22), p. 7130-40.
- [23] R. Lattanzi, R. Miele, Non-peptide agonists and antagonists of the prokineticin receptors, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **2022**, *44*(12), p. 6323-32.
- [24] R. Lattanzi *et al.*, Halogenated triazinediones behave as antagonists of PKR1: in-vitro and in-vivo pharmacological characterization, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2015**, *6*(3), p. 1033-42.
- [25] H. Ito *et al.*, Prokineticin 2 antagonist, PKRA7 suppresses arthritis in mice with collagen-induced arthritis, *BMC Musculoskelet Disord.*, **2016**, *17*(1), 387.

Morgane DESSEUX¹, doctorante, **Mohamed BENHAROUGA**¹, enseignant-chercheur, **Guillaume SÉBIRE**², professeur, **Nicolas LEMAITRE**¹, technicien, **Margaux DIGONNET**¹, doctorante, **Tiphaine BARJAT**^{1,3}, professeure, et **Nadia ALFAIDY***^{1,4}, directrice de recherche.

¹Laboratoire BIOSANTE (Biologie et biotechnologies pour la santé), UMR 1292 Inserm/CEA/UGA.

²Département de pédiatrie et département de neurologie, Université McGill, Canada.

³Département de gynécologie et d'obstétrique, Centre hospitalier universitaire de Saint-Étienne.

⁴Service Obstétrique, Centre hospitalo-universitaire Grenoble Alpes, Université Grenoble Alpes.

* nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

SAVE THE DATE
MAY 15th > 17th 2024
MAISON DE LA CHIMIE
28, rue Saint-Dominique - 75007 Paris - France

THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF INSTITUT CURIE

FROM BASIC SCIENCE TO CANCER RESEARCH

institut Curie | THE SCIENTIFIC EVENT

MORE INFORMATION
www.curiesymposium.fr

© Institut Curie / David Roaema

L'intégration cérébrale des réflexes auditifs : un biomarqueur de l'hypnose ?

Résumé L'utilisation de l'hypnose se répand dans le domaine médical, en raison de son effet prouvé sur la prise en charge de la douleur. Bien que l'hypnose soit utilisée en psychologie depuis longtemps, les hypnotérapeutes ne basent leur reconnaissance de l'état de transe hypnotique que sur des éléments subjectifs : mouvements plus lents, respiration plus profonde, tremblement involontaire des paupières... Avec l'utilisation médicale accrue de l'hypnose, il devient nécessaire de caractériser l'état de transe hypnotique au moyen de mesures physiologiques. Une piste pertinente consiste à mesurer de manière non invasive l'activité cérébrale grâce à des capteurs qui mesurent les champs électriques ou magnétiques issus de l'activité neuronale. Une fois ces mesures acquises, les chercheurs essaient d'extraire des caractéristiques qui indiquent si le patient est effectivement en état de transe hypnotique ou non, ce que l'on appelle des biomarqueurs. Cet article présente l'identification d'un candidat biomarqueur cérébral permettant le diagnostic et le suivi de la transe hypnotique. Ce biomarqueur est basé sur les réponses évoquées de notre cerveau : le cerveau ne traite pas les sons de la même manière lorsque l'on est en état de transe hypnotique et lorsque l'on est dans notre état normal.

Mots-clés Hypnose, magnétoencéphalographie, électroencéphalographie, paradigme oddball, biomarqueurs électrophysiologiques.

Abstract Cerebral integration of auditory reflexes: a biomarker of hypnosis?

Hypnosis is increasingly used in the medical field due to its proven effect on pain management. Although the technique has been used in psychology for a long time, hypnotherapists rely on purely subjective elements to recognize the hypnotic trance state: slowed movements, deeper breathing, and involuntary trembling of the eyelids. The increased medical use of hypnosis makes it necessary to identify physiological indicators characterizing the hypnotic trance state. An interesting non-invasive approach is to measure brain activity using sensors that record the electrical or magnetic fields resulting from neuronal activity. From these measurements, researchers can then extract features – known as biomarkers – indicating whether the patient is actually in a hypnotic trance state or not. By analyzing brain activity in response to sounds, we observed that the brain does not process sounds the same way when in a hypnotic trance state as it does in a normally alert state. From this analysis, a candidate cerebral biomarker has been identified that can be used to diagnose and monitor the hypnotic trance.

Keywords Hypnosis, magnetoencephalography, electroencephalography, oddball paradigm, electrophysiological biomarker.

Considérée par certains comme de la magie, par d'autres comme du théâtre, l'hypnose est une technique de plus en plus utilisée en médecine, notamment pour la gestion de la douleur. On peut la définir comme une technique non invasive permettant de manipuler l'expérience subjective du patient [1] : l'hypnotérapeute suggère des idées ou des actions au patient afin d'améliorer son ressenti. Des informations complexes traitées par le cerveau du patient comme des idées ou représentations d'objets influent sur le traitement des informations plus simples comme la perception des couleurs, de la douleur ou des sons.

L'utilisation de différents types de suggestions permet à l'hypnotérapeute de faire entrer son interlocuteur dans un état appelé transe hypnotique. Cet état diffère de notre état « normal » car la perception de nos sens ou de nos idées est altérée. Un exemple d'utilisation dans le cadre des interventions chirurgicales est la remémoration d'un souvenir agréable : l'hypnotérapeute suggère au patient de revivre un événement qu'il aime, dans lequel il se sent bien et en sécurité. En répondant positivement à cette suggestion, le patient se détache de la salle d'opération, ce qui lui permet de ressentir la douleur comme un événement plus neutre que désagréable. L'efficacité de l'hypnose repose sur la suggestibilité des sujets : certaines personnes sont plus sensibles à l'hypnose que d'autres. Cette sensibilité peut être caractérisée avec des

tests et des échelles, telles que l'échelle de Stanford [2]. On peut ainsi améliorer l'expérience d'un patient assez suggestible lors d'une opération chirurgicale en lui injectant moins d'anesthésiant, et par conséquent, réduire la probabilité d'effets secondaires associés.

La gestion de la transe au cours du temps présente cependant une difficulté : la transe hypnotique est un état fluctuant. Il est donc impératif de surveiller en permanence l'état du patient pour s'assurer que celui-ci reste stable et adapté à la situation. Aujourd'hui, ce contrôle se fait de manière assez subjective en évaluant divers signes cliniques de transe hypnotique : respiration plus lente et profonde, saccades oculaires plus fréquentes, apparition ou persistance de mouvements involontaires... Une piste de résolution de ce problème est d'utiliser une mesure de l'activité du cerveau afin de diagnostiquer et de suivre la transe hypnotique de manière plus objective et plus fiable.

Mesurer l'activité cérébrale

Parmi les techniques de mesure non invasive de l'activité cérébrale, les plus couramment utilisées sont l'EEG (électroencéphalographie), la MEG (magnétoencéphalographie) et l'IRMf (imagerie par résonance magnétique fonctionnelle). L'EEG mesure les fluctuations de signaux électriques mesurés

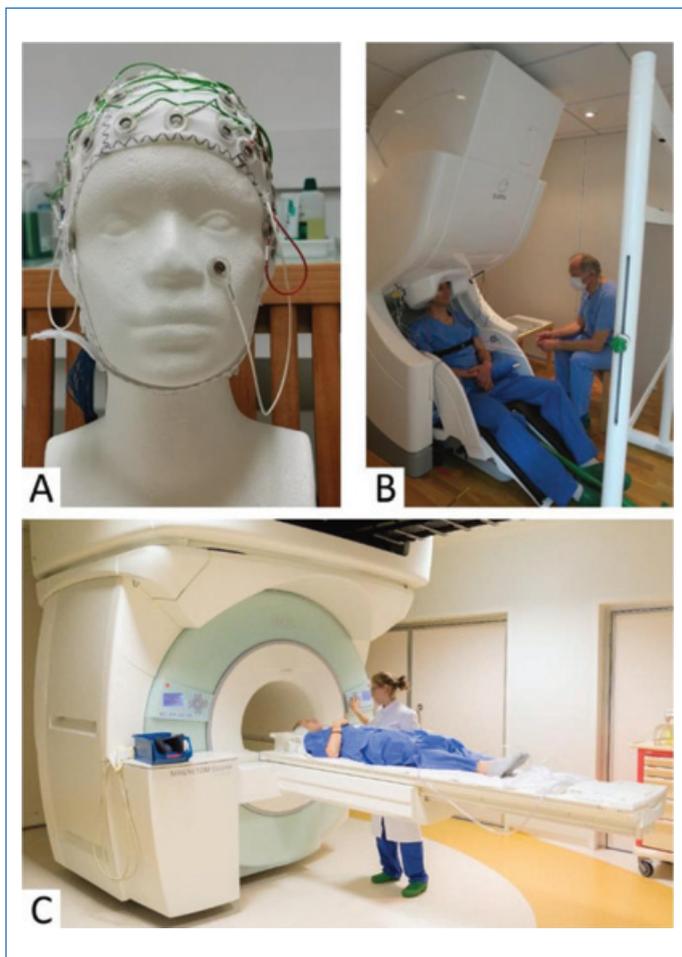


Figure 1 - Illustration de trois techniques de mesure de l'activité cérébrale : l'électroencéphalographie (A), la magnétoencéphalographie (B) et l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (C).

à la surface du crâne via un réseau de capteurs disposés sur le scalp, associés aux courants bioélectriques générés par l'activité neuronale du cerveau. La MEG enregistre les champs magnétiques produits par cette même activité bioélectrique neuronale grâce à des capteurs disposés autour de la tête. L'EEG et la MEG nécessitent que plusieurs centaines de milliers de neurones s'activent de manière simultanée afin de pouvoir enregistrer une activité. Enfin, l'IRMf détecte les changements locaux d'oxygénation sanguine dans le cerveau, associés à l'activité neuronale, en utilisant l'imagerie par résonance magnétique et notamment sa sensibilité au rapport entre les taux d'oxyhémoglobine et de désoxyhémoglobine [3]. Ces variations sont mesurables car l'oxygénation sanguine diminue dans les régions actives du cerveau.

Ces techniques permettent d'enregistrer et d'analyser les signaux cérébraux, et donc de rechercher d'éventuelles différences de signaux entre l'état normal et l'état de transe hypnotique. De telles différences sont appelées biomarqueurs et peuvent être de diverses natures : changement d'activité d'une ou plusieurs aires cérébrales, changement du contenu fréquentiel du signal cérébral lorsque le patient passe en transe hypnotique, différences de connectivité entre deux aires cérébrales...

Chacune de ces trois techniques présente des avantages et inconvénients, notamment sur leur prix d'achat et de fonctionnement, leur encombrement et sur la fréquence d'échantillonnage des signaux mesurés. La figure 1 illustre les trois techniques présentées dans cet article. Ces techniques

ont été mises à profit pour objectiver des changements de l'activité cérébrale au cours de la transe hypnotique [1, 4-5]. Si la MEG et l'IRMf offrent généralement une meilleure qualité de signal et sont préférentiellement utilisées dans un contexte de recherche, la mesure de l'activité cérébrale par EEG présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre au lit du patient. Par conséquent, nous utilisons la MEG pour notre recherche de biomarqueurs dans un premier temps, le but étant à terme d'utiliser l'EEG en remplacement de la MEG.

L'objectif de notre équipe est de découvrir des biomarqueurs permettant le diagnostic et le suivi de la transe hypnotique grâce à la mesure et à l'analyse de l'activité cérébrale. Comme nos résultats ont vocation à être utilisés lors d'anesthésies et d'opérations chirurgicales, nos recherches doivent intégrer, entre autres, deux contraintes : le diagnostic doit être robuste, et le suivi doit se faire rapidement. Pour cela, une technique intéressante a été investiguée : l'analyse de réponses évoquées auditives.

Perception et traitement des sons pour caractériser la transe hypnotique

Une réponse évoquée est une réponse stéréotypée du cerveau à un stimulus. Ce stimulus peut être visuel, kinesthésique, auditif... et la localisation cérébrale de la réponse évoquée dépend du type de stimulus perçu. Dans le cas d'un stimulus auditif, la localisation de la réponse évoquée se situe dans l'aire auditive [6], mais elle peut aussi être présente dans d'autres aires traitant les informations de haut niveau (lobe pariétal, frontal) [5, 7].

Cependant, les réponses évoquées ont généralement une amplitude très faible par rapport aux différents signaux présents dans les enregistrements (bruits du capteur, activité cérébrale provenant d'aires et de fonctions cérébrales non liées aux réponses évoquées, artefacts...). Par conséquent, on utilise plusieurs répétitions d'un même stimulus afin de moyenniser les réponses cérébrales et d'augmenter le rapport signal sur bruit de la réponse évoquée [6]. Le nombre de répétitions nécessaires pour obtenir un rapport signal sur bruit intéressant varie d'un sujet à un autre : elle peut être d'une cinquantaine chez l'un contre des milliers chez d'autres. La réponse évoquée auditive se compose généralement de plusieurs composants distincts, qui sont identifiés par leur latence (le temps nécessaire pour que le composant se produise après la présentation du stimulus) et leur amplitude (l'intensité du signal). Les composants les plus couramment observés sont les pics appelés N100, P200 et le P300, illustrés sur la figure 2. Le N100 est un pic généralement négatif (N) qui se produit généralement autour de 100 ms après la présentation du stimulus. Il est associé au traitement initial de l'information auditive dans le cortex auditif primaire. Les composants P200 et P300 sont deux pics généralement positifs (P) qui s'expriment respectivement entre 150 et 250 ms puis vers 300 ms après le stimulus. Ils sont liés à des processus d'intégration et de traitement de l'information sensorielle plus complexes dans les régions auditives corticales secondaires. Le P3b est un sous composant tardif du P300 qui semble caractériser la reconnaissance d'un stimulus cible. Pour les études qui s'intéressent à la réponse corticale aux stimuli auditifs [5, 7-8], la présence de composants tardifs est le reflet d'un traitement plus complexe de l'information. Une différence d'un de ces composants peut signifier une différence d'intégration d'une information auditive.

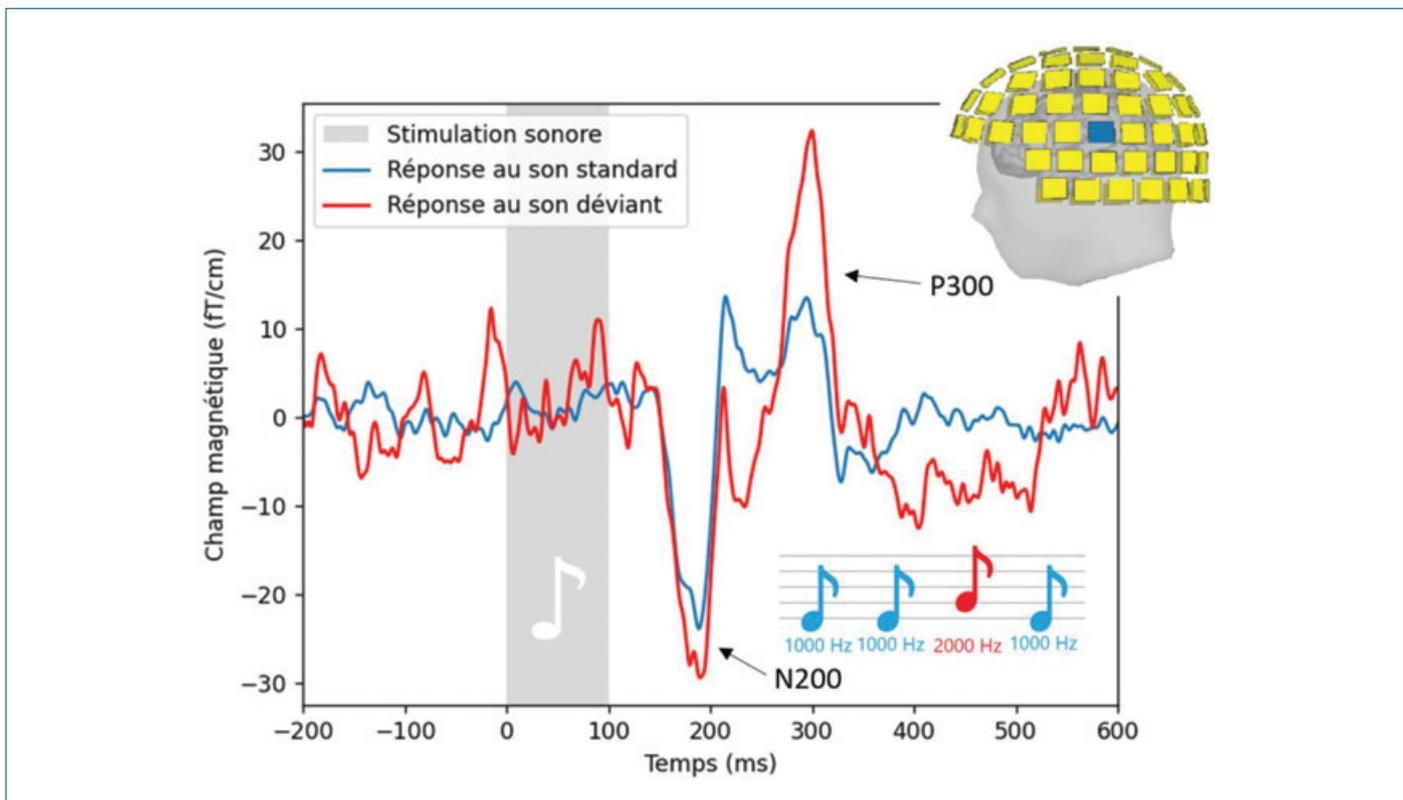


Figure 2 - Réponses évoquées typiques à des stimuli auditifs standards et déviants enregistrées en MEG au niveau du capteur MEG023, mesurées chez l'un des sujets. Lors de cette expérience, la durée d'une stimulation sonore était de 100 ms.

Un paradigme « oddball » est une méthode couramment utilisée pour étudier et exploiter les réponses évoquées cérébrales à des stimuli spécifiques. Un paradigme oddball auditif est basé sur la présentation d'une séquence de stimuli sonores, où la majorité des stimuli, dits standards, sont répétitifs et prévisibles, tandis qu'un petit nombre de stimuli, dits rares, sont présentés de manière inattendue ou différente. Par exemple, une séquence de tons réguliers graves peut être interrompue par un ton plus aigu. Le but du paradigme oddball est de capturer des réponses cérébrales spécifiques associées à la détection des stimuli rares et à la discrimination entre les stimuli standards et rares. Le cerveau réagit généralement à ces stimuli inattendus en générant une réponse évoquée différente : l'amplitude P300 de la réponse à un stimulus déviant est plus élevée que celle à un stimulus standard, comme le montre la figure 2. L'enregistrement des réponses évoquées auditives lors d'un paradigme oddball permet de détecter de telles variations et de les utiliser pour étudier l'attention, la perception et les processus de prise de décision du sujet. Lorsque ces données sont traitées en temps réel, un tel paradigme peut être utilisé pour le diagnostic de problèmes sémantiques [9] ou pour réaliser un clavier contrôlé par le regard, permettant à des sujets de communiquer sans utiliser leur voix ou leurs membres [10].

Modification par hypnose du traitement des stimuli sonores

Jusqu'à présent, le traitement cérébral des sons au cours de l'état d'hypnose a été peu étudié. Une piste d'étude de l'influence de la transe hypnotique sur le traitement des sons par notre cerveau consiste à utiliser un paradigme oddball chez des volontaires sains [5]. Ceux-ci ont pour consigne de cliquer sur un bouton lorsqu'ils reconnaissent un son déviant

tandis que leur activité cérébrale pendant cette tâche est enregistrée par EEG. Lorsque les sujets sont dans leur état normal, ils sont capables de détecter 95 % des stimuli déviants et la réponse évoquée mesurée au niveau de plusieurs électrodes a une allure semblable à celle montrée sur la figure 2. Les sujets sont ensuite accompagnés pour entrer en transe hypnotique, pendant laquelle l'hypnothérapeute suggère d'être sourd aux sons déviants. Sous hypnose, les sujets ratent plus de sons déviants, et ce taux d'échec augmente lorsque le sujet est très suggestible à l'hypnose. Ceci est confirmé par l'analyse de l'activité cérébrale qui montre une réponse évoquée aux sons déviants plus faible au niveau du P3b, composant du P300 localisé entre 350 et 450 ms après l'émission du son. Cette différence d'amplitude se situe en particulier vers le cortex préfrontal. Cette différence est interprétée comme la résolution d'un conflit : le cerveau perçoit un son qui n'existe pas selon lui et il l'inhibe. On peut alors supposer que plus le sujet est suggestible à l'hypnose, plus son cerveau fait confiance à lui-même plutôt qu'aux stimuli extérieurs, et plus cette inhibition fonctionne. La manifestation de l'état de transe hypnotique au niveau du cortex préfrontal a aussi été détectée en IRMf, notamment à travers une diminution d'activité du cortex cingulaire antérieur dorsal [4].

Pour aller plus loin, on peut tenter de comparer l'état d'hypnose avec un état de distraction et un état de simulation : est-ce que le phénomène d'hypnose se rapproche plus d'une distraction auditive ou est-ce qu'il se rapproche plus d'un jeu de rôle ?

Pour cela, les expériences précédentes sont reproduites sans hypnose [5]. Dans un cas, le sujet regarde un film muet, et dans l'autre, on lui demande de faire semblant d'être sourd aux sons déviants en lui promettant une récompense s'il arrive à tromper l'hypnothérapeute mieux que les autres sujets.

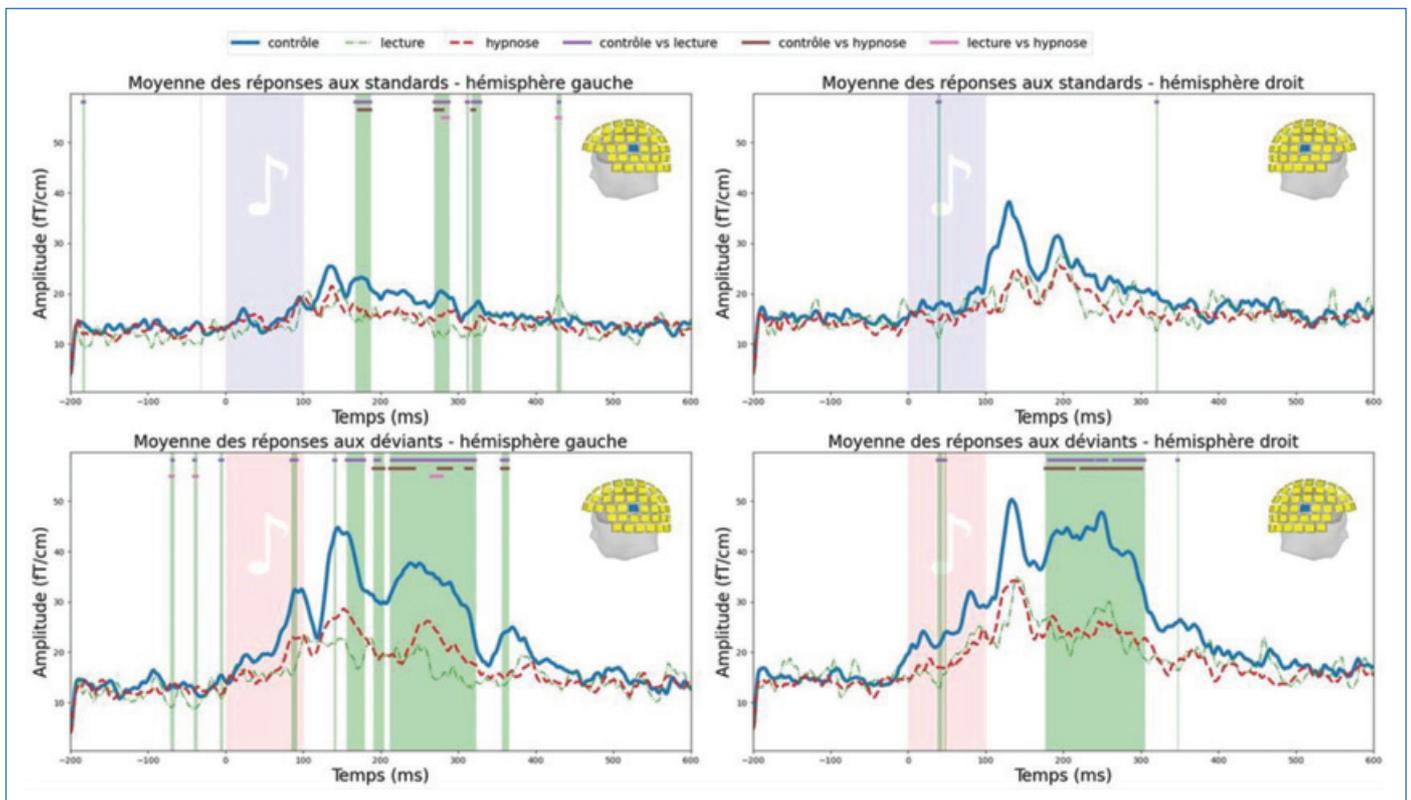


Figure 3 - Moyenne des amplitudes des champs évoqués obtenus au niveau des capteurs MEG0232/3 (gauche) et MEG1342/3 (droite) sur vingt sujets. La position des capteurs utilisés est représentée en bleu sur les schémas de tête en haut à droite de chaque graphique. L'axe temporel correspond à la durée après l'émission d'une stimulation, les bandes bleues et rouges correspondent respectivement à la période de l'émission d'un stimulus standard et déviant. Les bandes vertes indiquent les régions où un test ANOVA révèle des variabilités significatives entre les trois distributions (contrôle, hypnose et distraction auditive). Pour chaque pas temporel se situant dans les zones vertes, les bandes au-dessus des courbes indiquent quelles distributions sont différentes des autres d'après un test post-hoc corrigé avec la correction de Bonferroni. Les tests statistiques sont réalisés avec un intervalle de confiance $\alpha = 0,05$.

Lorsque les sujets sont distraits par le film, ils réalisent à peu près les mêmes performances à la détection de stimuli déviants que dans leur état normal, mais leur performance diminue significativement lorsqu'ils simulent leur propre transe, autant pour les sujets très suggestibles que pour les sujets peu suggestibles. D'un point de vue cérébral, leur P3b est aussi significativement différente entre les quatre états, mais la différence entre simulation et hypnose est peu importante. Le P3b estimé au niveau du lobe temporal dans l'état de transe hypnotique présente une amplitude plus grande que dans l'état simulation.

Enfin, une expérimentation récente sur un sujet unique très suggestible rapporte des éléments similaires : la suggestion d'une surdité aux sons déviants induit chez ce sujet une modification des réponses évoquées auditives lorsqu'il est sous hypnose [7].

Altération du traitement des sons lors d'une hypnose chirurgicale

Dans ces différentes expérimentations, l'altération des réponses évoquées liées aux sons déviants est concomitante des suggestions hypnotiques altérant l'audition. La question se pose donc de savoir si ces altérations peuvent survenir au cours d'une transe hypnotique ne suggérant pas de diminution de l'audition. Ce type d'hypnose est majoritaire lorsque des techniques d'hypno-analgésie sont utilisées au cours d'interventions chirurgicales. L'hypnothérapeute utilise des directives plus souples, ce qui laisse plus de liberté d'interprétation au patient. Plus spécifiquement, la re-mémorisation d'un souvenir agréable est utilisée, et permet au patient de

se trouver dans un endroit agréable et sécurisant. Deux personnes n'ont ainsi pas la même expérience de la transe hypnotique : l'un peut s'immerger dans une forêt et entendre le vent et les feuilles, tandis que l'autre peut s'imaginer sur une plage et sentir la chaleur du sable. On fait cependant l'hypothèse que ces deux expériences différentes ont au moins un point commun mesurable en EEG ou MEG.

Pour tester cette hypothèse, nous réalisons un paradigme oddball analogue à celui présenté précédemment : des sujets entendent des sons standards et déviants, mais leur activité cérébrale est enregistrée par magnétoencéphalographie.

Lorsque les sujets sont dans leur état normal, ils présentent des réponses évoquées semblables à celles trouvées en EEG, avec les différences attendues entre les réponses aux sons standards et déviants, notamment au niveau de la P300 (figure 2). Après une induction hypnotique, les réponses évoquées après un son standard ne changent pas significativement, mais celles après une stimulation déviante ont une amplitude significativement plus faible que celles obtenues lorsque le sujet est dans son état normal (figure 3). On en déduit ainsi que le traitement du son diffère lorsque les sujets sont en état de transe hypnotique. L'analyse de la P300 dans le cadre d'un paradigme oddball est un bon candidat biomarqueur pour le diagnostic et le suivi de la transe hypnotique chirurgicale.

Pour pousser l'analyse un peu plus loin, le même paradigme est réalisé en ajoutant un état de distraction auditive : l'hypnothérapeute lit une histoire au sujet pendant dix minutes. La comparaison des champs évoqués déviants, mesurés dans un état de transe hypnotique ou pendant une distraction, ne montre pas de différences significatives, mais ces deux

champs évoqués sont significativement différents de ceux obtenus lorsque les sujets sont dans leur état normal, notamment au niveau du P200 et P300 : l'amplitude des champs évoqués au niveau de ces composants est plus élevée lorsque les sujets sont dans leur état normal que dans un état de transe hypnotique ou distraits.

Ces différences de champs évoqués peuvent être interprétées comme étant une différence de traitement des stimuli audio de non-intérêt : leur amplitude diminue lorsque le sujet est attentif à autre chose qu'aux stimuli, et son cerveau délaisse donc l'information. À l'inverse, le fait que les sujets n'entendent pas bien les stimuli déviants dans le cadre d'une hypnose « surdité induite » peut être interprété par un traitement actif du cortex préfrontal : ce dernier supprime activement l'information des stimuli auditifs.

La P300 oddball pour le diagnostic et le suivi de la transe hypnotique : des contraintes assez fortes

Deux critères nous importent dans le cadre d'une opération chirurgicale sous hypnosédation : le diagnostic doit indiquer de manière fiable l'état d'un sujet, et le suivi doit se faire en un temps très court. Or le P300 oddball se base sur des signaux faibles par rapport aux signaux de non-intérêt, ce qui nécessite de moyenniser les réponses cérébrales un assez grand nombre de fois afin d'obtenir un résultat fiable.

Pour remédier à cela, d'autres pistes de biomarqueurs de l'état de transe hypnotique sont envisagées : parmi elles, l'analyse fréquentielle des ondes cérébrales peut révéler une hausse ou une baisse de l'activité d'une aire cérébrale lors d'une transe hypnotique.

Cette analyse fréquentielle peut être combinée avec un paradigme de type « steady state » où les stimulations ne sont plus discrètes mais continues et modulées en phase ou en fréquence. Ces modulations peuvent alors être retrouvées en continu au niveau des aires traitant les informations sensorielles avec une simple analyse fréquentielle [11], ce qui peut permettre d'obtenir des résultats plus rapides et précis qu'en utilisant un paradigme oddball. Un exemple d'utilisation d'un tel paradigme est le SSVEP-mindspeller [12], qui permet de prédire correctement des phrases à une vitesse d'environ 51 lettres par minutes, soit neuf fois plus qu'en utilisant un P300 mindspeller [13].

Vers d'autres pistes de biomarqueurs

La bibliographie et nos expériences révèlent que des stimulations auditives peuvent être traitées de manière différente par le cerveau selon l'état d'un sujet. Cette différence de traitement des stimuli est mise en évidence par l'analyse des réponses évoquées lors de paradigmes de type oddball. Ainsi, l'analyse de ces réponses devrait permettre de déterminer si un sujet est dans son état normal ou dans un état de transe hypnotique. Cela fait des réponses évoquées un potentiel biomarqueur de l'état de transe hypnotique, mais dont la mesure fiable et rapide représente un défi compte tenu du faible rapport signal sur bruit des réponses cérébrales évoquées. À cette fin, d'autres pistes de biomarqueurs ne

présentant pas le problème de la lenteur de la mesure sont envisagées, telles que l'analyse fréquentielle des signaux cérébraux en MEG ou en EEG.

Ce travail a été soutenu par le fonds de dotation de Clinatex (appels d'offre « Nouvelle équipe 2018 » et « Edmond J. Safra 2019 »), lequel a permis le financement du postdoctorat de Julie Alayrangues et la réalisation du protocole de recherche clinique « Hypnote » (réf. 38RC19.060). Il a également bénéficié du soutien du programme CEA Focus Biomarqueurs via le financement de la thèse d'Hafid Sid-Ahmed.

- [1] M. Zeev-Wolf, Y. Dor-Ziderman, A. Goldstein, O. Bonne, E.G. Abramowitz, Oscillatory brain mechanisms of the hypnotically-induced out-of-body experience, *Cortex*, **2017**, 96, p. 19-30.
- [2] A.M. Weitzenhoffer, E.R. Hilgard, *Stanford hypnotic susceptibility scale, form C*, Consulting Psychology Press, Palo Alto (CA), **1962**.
- [3] S. Ogawa, T.-M. Lee, A.S. Nayak, P. Glynn, Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields, *Magn. Reson. Med.*, **1990**, 14(1), p. 68-78.
- [4] H. Jiang, M.P. White, M.D. Greicius, L.C. Waelde, D. Spiegel, Brain activity and functional connectivity associated with hypnosis, *Cereb Cortex*, **2017**, 27(8), p. 4083-93.
- [5] M. Franz, B. Schmidt, H. Hecht, E. Naumann, W.H.R. Miltner, Suggested deafness during hypnosis and simulation of hypnosis compared to a distraction and control condition: a study on subjective experience and cortical brain responses, *PLoS One*, **2020**, 15(10), e0240832.
- [6] R.C. Burgess, M.E. Funke, S.M. Bowyer, J.D. Lewine, H.E. Kirsch, A.I. Bagiç, American Clinical Magnetoencephalography Society clinical practice guideline 2: presurgical functional brain mapping using magnetic evoked fields, *J. Clin. Neurophysiol.*, **2011**, 28(4), p. 355-361.
- [7] E. Munoz Musat, B. Rohaut, A. Sangare, J.-M. Benhaiem, L. Naccache, Hypnotic induction of deafness to elementary sounds: an electroencephalography case-study and a proposed cognitive and neural scenario, *Front. Neurosci.*, **2022**, 16, 756651.
- [8] J. Polich, Updating P300: an integrative theory of P3a and P3b, *Clin. Neurophysiol.*, **2007**, 118(10), p. 2128-48.
- [9] C.C. Duncan *et al.*, Event-related potentials in clinical research: guidelines for eliciting, recording, and quantifying mismatch negativity, P300, and N400, *Clin. Neurophysiol.*, **2009**, 120(11), p. 1883-908.
- [10] L.A. Farwell, E. Donchin, Talking off the top of your head: toward a mental prosthesis utilizing event-related brain potentials, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **1988**, 70(6), p. 510-523.
- [11] T.W. Picton, M.S. John, A. Dimitrijevic, D. Purcell, Human auditory steady-state responses: respuestas auditivas de estado estable en humanos, *Int. J. Audiol.*, **2003**, 42(4), p. 177-219.
- [12] H. Segers *et al.*, Steady state visual evoked potential (SSVEP) - based brain spelling system with synchronous and asynchronous typing modes, in *15th Nordic-Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics (NBC 2011)*, K. Dremstrup, S. Rees, M.Ø. Jensen (eds), *IFMBE Proceedings*, vol. 34, Springer, **2011**, p. 164-167.
- [13] X. Chen, Y. Wang, M. Nakanishi, X. Gao, T.-P. Jung, S. Gao, High-speed spelling with a noninvasive brain-computer interface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2015**, 112(44), e6058-67.

Hafid SID-AHMED¹, doctorant, **Julie ALAYRANGUES**¹, postdoctorante, **Lilia LANGAR**¹, manipulatrice en électroradiologie, **Nelly RICHARD**², infirmière anesthésiste, **Véronique ALBALADEJO**², infirmière anesthésiste, **Marion COQUAND-GANDIT**², cadre de santé, **Stéphane PEZZANI**², cadre de santé, **Virginie BRUN**¹, directrice de recherche, **Daniel ANGLADE**², médecin anesthésiste, et **Vincent AUBOIROUX**¹, ingénieur.

¹Université Grenoble Alpes, CEA, Leti, Clinatex, Grenoble.

²Université Grenoble Alpes, Grenoble University Hospital, Grenoble.

* Hafid.SID-AHMED@cea.fr

Nouveaux principes actifs pharmaceutiques

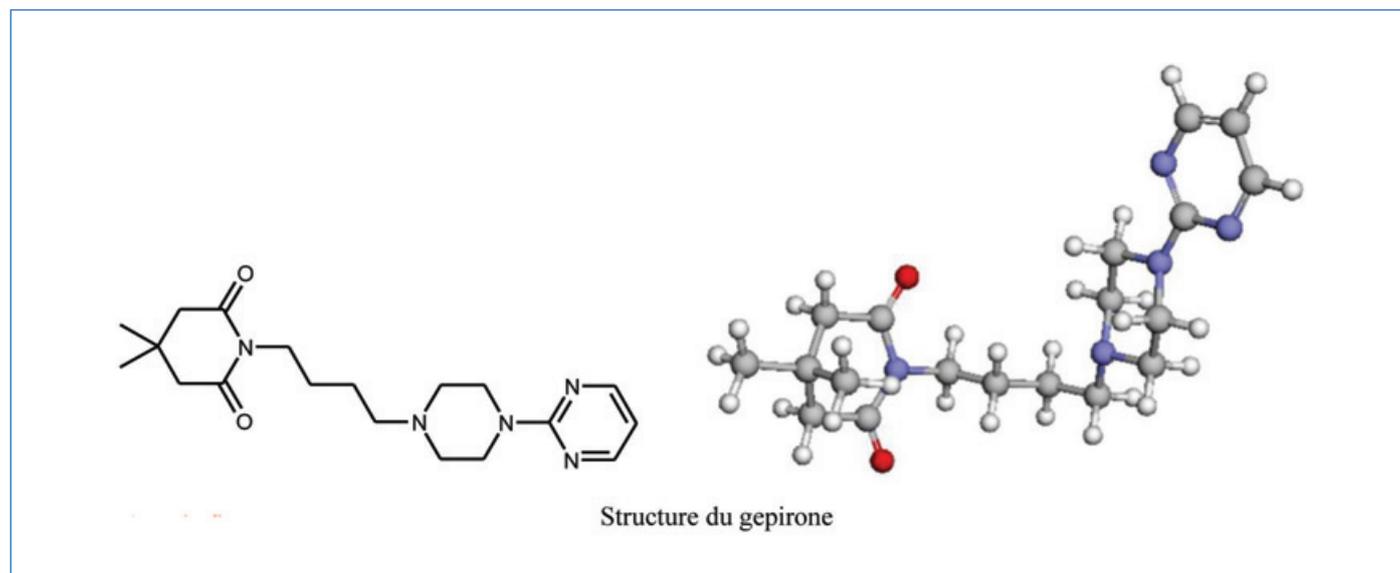
Bilan des approbations FDA en septembre 2023

Au cours de cette période, quatre nouvelles molécules de synthèse et deux molécules d'origine biologique ont été approuvées ; une de ces molécules biologiques n'est pas nouvelle mais bénéficie d'une amélioration notable de son administration.

Molécules de synthèse

| Principe actif | Compagnie | Indication |
|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Motixafortide | Biolinerx Ltd | Myélome multiple |
| Momelotinib dihydrochloride | Glaxosmithkline | Splénomégalie myéloïde |
| Gepirone hydrochloride | Fabre-Kramer Pharmaceutical Inc. | Dépression |
| Nedosiran | Novo Nordisk Inc. | Hyperoxalurie de type 1 |

Le mécanisme d'action du **gepirone**, un agoniste unique du récepteur de la sérotonine 5HT_{1A}, n'est pas encore entièrement élucidé, mais il est théorisé qu'il est lié à la modulation de l'activité de la sérotonine du système nerveux central par le ciblage sélectif des récepteurs. C'est le premier antidépresseur approuvé avec ce mécanisme d'action.



Nomenclature : 4,4-diméthyl-1-[4-[4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl]butyl]piperidine-2,6-dione ; n° CAS : 104699-09-4 (base), 83928-69-9 (hydrochloride).

*La représentation 3D provient du site Drugbank : https://go.drugbank.com/structures/small_molecule_drugs/DB12184

Le **motixafortide** est un peptidomimétique ; c'est un mobilisateur de cellules souches hématopoïétiques et un antagoniste du CXCR4. Les antagonistes du CXCR4 sont particulièrement importants pour freiner la progression du cancer, car l'un des effets initiés par l'activation du récepteur CXCR4 est le mouvement cellulaire qui favorise la propagation du cancer (métastase). Il est administré par injection sous-cutanée.

La splénomégalie myéloïde est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par un envahissement de la moelle osseuse par du tissu fibreux collagène. L'envahissement de la moelle osseuse par une fibrose mutilante empêche la formation normale des éléments sanguins (hématopoïèse). Il y a alors une transformation myéloïde (transformation du tissu normal lymphoïde en tissu myéloïde) de la rate. Il en résulte une aplasie médullaire qui peut être fatale. Le **momelotinib** est un inhibiteur des Janus kinases JAK1 and JAK2, par compétition avec l'ATP.

Le **nedosiran** est utilisé pour le traitement de l'hyperoxalurie primaire. Il s'agit d'un petit ARN interférent double brin (brin antisens de 22 bases et brin sens de 36 bases) dirigé contre la production de la lactate déshydrogénase A (LDHA) au niveau du foie. L'hyperoxalurie est un trouble du métabolisme du glyoxylate caractérisé par un excès d'oxalate entraînant des calculs rénaux, une néphrocalcinose, et finalement une insuffisance rénale.

Molécules d'origine biologique

| Principe actif | Type de molécule | Compagnie | Indication |
|---------------------------|----------------------|-------------------|--|
| Vedolizumab | Anticorps monoclonal | Takeda Pharms USA | Inflammations chroniques de l'intestin |
| Cipaglusosidase alfa-atga | Enzyme | Amicus Therap. US | Maladie de Pompe |

Le **vedolizumab** est dirigé contre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, un récepteur d'adhésion cellulaire. Il avait été approuvé en 2014 pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique par exemple) par administration intraveineuse. Il vient d'être approuvé pour ces indications en administration sous-cutanée.

La maladie de Pompe est une maladie génétique héréditaire due à un déficit en alpha glucosidase acide qui touche principalement les muscles. La maladie de Pompe se caractérise par une détérioration des muscles, entraînant une diminution de la fonction respiratoire et de la mobilité. Le **cipaglusosidase** est un traitement enzymatique substitutif (voie intraveineuse) qui doit être administré conjointement avec le miglustat (molécule de synthèse active sur cette maladie, par voie orale).

⁽¹⁾Drugbank est une banque de données sur les principes actifs accessible sur Internet : D.S. Wishart *et al.*, DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46, p. D1074-D1082, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>

Actualités des substances actives phytopharmaceutiques

Novembre 2023

Retraits et modifications d'autorisation

Sont retirés du marché un herbicide à base de triallate, deux nématocides à base de la même souche de *Bacillus firmus*, et un insecticide à base de spiromésifène.

Délivrance d'AMM

Des AMM sont accordées à un stimulateur de défenses naturelles à base de cérévisane en suspension concentrée pour grandes cultures ; à quatre herbicides, l'un à base d'aclonifène associé au diflufénican en suspension concentrée pour cultures légumières, deux sont à base d'aclonifène seul en suspension concentrée pour grandes cultures, cultures légumières et cultures porte-graines, tropicales, plantes à parfum, aromatiques, médicinales et condimentaires, le dernier est à base de propaquizafop en concentré émulsionnable pour toutes cultures agricoles hormis les cultures ornementales ; à deux fongicides, l'un à base de pyraclostrobine en concentré émulsionnable pour grandes cultures, l'autre à base de propamocarbe-HCl en concentré soluble pour cultures légumières et cultures porte-graines, tropicales, plantes à parfum, aromatiques, médicinales et condimentaires.

Modifications d'AMM (renouvellements, modifications d'usages)

Elles concernent un herbicide à base de mésotrione après réexamen suite à réapprobation de la substance active ; un fongicide à base de méfentrifluconazole avec extension d'usage mineur ; un fongicide à base de bixafène associé au fluopyrame avec modification des conditions d'emploi ; enfin à un fongicide à base de *Trichoderma atroviride* SC1 avec modification des conditions d'emploi.

L'**aclonifène** appartient à la famille des herbicides diphényl-éthers ; il est utilisé en France depuis 1983. Ces molécules sont apparues à la fin des années 1950 aux États-Unis puis en Suisse et au Japon où elles ont eu un succès croissant après 1963 pour la culture du riz à cause de leur faible toxicité pour les poissons. Il est vite apparu qu'un groupe de diphényl-éthers ayant un substituant en position ortho sur l'un des cycles benzéniques requiert l'exposition à la lumière pour développer une activité phytotoxique, les autres montrant cette activité même en l'absence de lumière. C'est l'illustration d'un concept et d'une recherche présentés parfois comme nouveaux (voir n° 486, p. 13).

L'aclonifène est la 2-chloro-6-nitro-3-phénoxyaniline (n° CAS : 74070-46-5).

C'est un herbicide systémique et sélectif qui inhibe à la fois la biosynthèse des caroténoïdes et des chlorophylles ; ce double mode d'action biochimique diminue le risque d'apparition d'espèces résistantes. Son mode d'action est développé dans *Les herbicides* (sous la direction de René Scalla, INRA, 1991). Il est utilisé en préémergence contre les adventices de cultures légumières et en grandes cultures, seul ou associé à la clomazone, au diflufénicanil, flufénacet ou isaxaflutole.

C'est un solide jaune inodore fusible à 81 °C, dont la solubilité dans l'eau (1,4 mg/L à 20 °C) est réduite.

Cette rubrique est coordonnée et alimentée par **Josette FOURNIER**, qui a présidé de 2007 à 2010 le comité d'orientation et de prospective scientifique de l'Observatoire des résidus de pesticides (ORP) (josette.fournier4@orange.fr), et **Jean-Marc PARIS**, ancien directeur de recherche pharmaceutique dans le groupe Rhône-Poulenc et ancien directeur scientifique de la chimie organique et biotechnologies de Rhodia (jeanmarc.paris@free.fr).

Prix et distinctions

Prix 2023 de l'Académie des sciences

Les prix de l'Académie des sciences honorent des personnalités scientifiques d'expérience ou de jeunes chercheurs en début de carrière. Parmi les lauréats 2023 sont distingués :

- **Bruno Antony, grand prix Émile Jungfleisch.** Directeur de recherche CNRS à l'Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire (CNRS/Université Côte d'Azur), il a montré avec son équipe que la courbure des membranes est une information cellulaire, que le lipide PI(4)P est une monnaie d'échange pour transporter le cholestérol et que les lipides polyinsaturés favorisent la déformation membranaire. Ces découvertes démontrent l'importance de la forme et de la composition des membranes pour la dynamique de la cellule.

- **François-Clément Bidard, prix de cancérologie de la Fondation Simone et Cino Del Duca/Fondation de l'Institut de France.** Cancérologue et responsable du groupe de recherche translationnelle Biomarqueurs tumoraux circulants à l'Institut Curie, spécialiste du cancer du sein et professeur d'oncologie médicale à l'Université de Versailles-Saint-Quentin, ses travaux de recherche portent sur l'utilisation des biomarqueurs tumoraux pour prédire l'évolution tumorale sous traitement. Il a notamment établi dans l'essai PADA-1 (« padawan ») la première preuve de concept de l'intérêt du ciblage précoce des clones tumoraux résistants dès leur détection dans le sang. Ce nouveau concept fait maintenant l'objet d'investigations académiques mais aussi industrielles, devant mener au développement de nouveaux médicaments.

- **François-Didier Boyer, prix du Docteur Henri Labbé et de Mme Henri Labbé/Fondation Labbé de l'Académie des sciences.** Directeur de recherche CNRS à l'Institut de chimie des substances naturelles, François-Didier Boyer s'intéresse aux stimulants de la croissance végétale et notamment aux strigolactones, et a obtenu des résultats originaux sur leur chimie et mécanisme de perception. Il est responsable de plusieurs projets de recherche au niveau national sur l'étude de ces composés, ce qui en fait un acteur majeur dans cette communauté.

- **Julien Bras, prix Arkema/Académie des sciences pour l'innovation en chimie des matériaux durables.** Professeur à Grenoble INP-Pagora et chercheur au Laboratoire de génie des procédés pour la bioraffinerie, les matériaux biosourcés et l'impression fonctionnelle (LGP2, CNRS/Université Grenoble Alpes), Julien Bras développe des procédés innovants en chimie des matériaux pour valoriser la cellulose issue de la nature afin de remplacer le pétrole. Il a notamment optimisé via des traitements chimiques la production des nanocelluloses et leur a conféré de nouvelles fonctions pour des domaines très variés. Ses travaux lui ont permis de faire partie de l'Institut universitaire de France et ont toujours été en lien avec des projets industriels ou de transferts technologiques se concrétisant par la chaire d'excellence « Cellulose Valley ».

- **François Jérôme, prix Reine-Elizabeth général veuve Leconte/Fondation Pierre Leconte de l'Académie des sciences et médaille Berthelot/Fondation de l'Académie des sciences.** Directeur de recherche CNRS à l'Institut de chimie des milieux et matériaux de Poitiers (CNRS/Université

de Poitiers), François Jérôme s'intéresse à la catalyse et au concept de catalyse assistée pour la conversion du carbone renouvelable. Il a développé des technologies en rupture pour la synthèse de produits chimiques de spécialités à partir de déchets végétaux (tensioactifs, monomères, solvants). Dans ce domaine, il coordonne un réseau public-privé (FR CNRS INCREASE) et l'International symposium on green chemistry.

- **Alexander Kuhn, prix Tremplin de coopération bilatérale en recherche – ASEAN.** Professeur à Bordeaux INP, Institut des sciences moléculaires (CNRS/Université de Bordeaux/Bordeaux INP) au sein du groupe Nanosystèmes analytiques, il s'intéresse aux processus électrochimiques avec des applications allant de la chimie analytique jusqu'à la conversion d'énergie et a coordonné dans ce contexte plusieurs projets de recherche aux niveaux national et international, notamment le projet ERC Advanced ELECTRA, dédié à la brisure de symétrie par voie électrochimique.

- **Lise-Marie Lacroix, prix Fédération Gay Lussac/Académie des sciences pour la chimie au cœur des enjeux de la société.** Maîtresse de conférences à l'Université Toulouse III Paul Sabatier au Laboratoire de physique et chimie des nano-objets (CNRS/INSA Toulouse/Univ. Toulouse III Paul Sabatier), membre junior de l'Institut universitaire de France, Lise-Marie Lacroix travaille à l'interface physique-chimie à l'élaboration de nouveaux matériaux par assemblage dirigé de nanoparticules présentant des propriétés optimisées. En couplant l'étude des mécanismes réactionnels de synthèse et des propriétés physiques multi-échelles, elle a notamment pu élaborer des aimants permanents performants, sans terre rare.

- **Alain Manceau, prix Léon Lutaud et médaille Millot.** Directeur de recherche émérite au CNRS et chercheur à l'École Normale Supérieure de Lyon et à l'European Synchrotron Radiation Facility de Grenoble, Alain Manceau est un minéralogiste environnemental et biogéochimiste spécialiste de la structure et de la réactivité de surface des minéraux nanodivisés et de la matière organique ainsi que de la forme chimique et moléculaire des métaux lourds, tels que le mercure. Ses travaux pionniers dans le développement et l'application du rayonnement synchrotron en science de l'environnement ont eu un impact majeur au sein de la communauté internationale.

- **Véronique Michelet, prix Grammaticakis-Neuman/Fondation Grammaticakis de l'Académie des sciences.** Professeure des universités à l'Université Côte d'Azur à l'Institut de chimie de Nice (CNRS/UCA), elle s'intéresse aux aspects fondamentaux et appliqués de la catalyse pour le développement de nouvelles méthodologies de synthèse pour la formation de liaisons carbone-carbone et carbone-hétéroatome. La synthèse de nouvelles molécules odorantes ou bioactives selon un concept de chimie durable fait partie de ses activités en collaboration avec des partenaires socio-économiques. La catalyse à l'or est l'un de ses thèmes de recherche favoris.

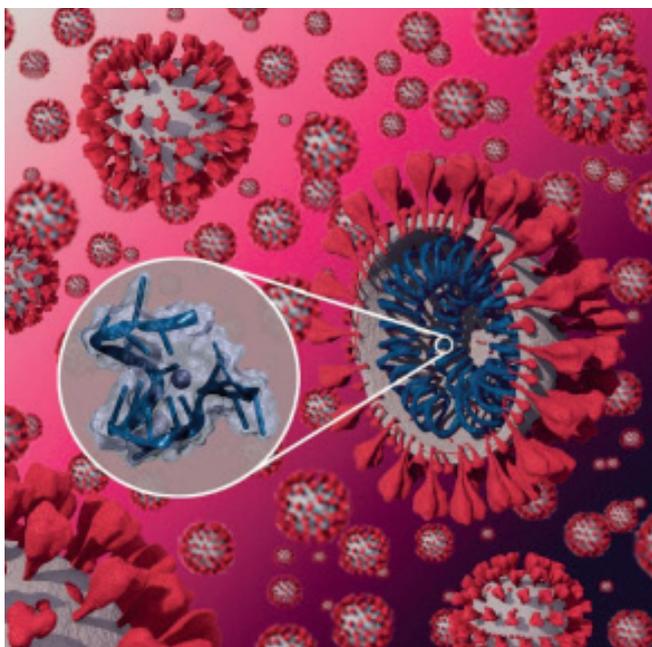
- **Erwan Poupon, prix Minafin.** Professeur des universités, équipe « Chimie des substances naturelles » (unité mixte du CNRS « BioCIS », Faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay), Erwan Poupon travaille dans le domaine de la chimie des substances naturelles (une source inépuisable de nouveaux médicaments). L'étude de ces molécules fascinantes contribue à une meilleure compréhension de la biodiversité et c'est dans une démarche globale « des organismes vivants

à la molécule » que ses réflexions sont menées, en particulier l'émergence de la complexité moléculaire et les aspects évolutifs. La transmission du savoir est aussi une de ses passions à travers ses activités d'enseignement et de diffusion des connaissances.

- **Claire Wilhelm, médaille de chimie.** Directrice de recherche CNRS au Laboratoire physico-chimie Curie (CNRS/Institut Curie/Sorbonne Université), Claire Wilhelm est experte en nanotechnologies. Elle utilise les nanomatériaux magnétiques pour l'ingénierie tissulaire et son équipe a démontré qu'une stimulation magnétique pouvait déclencher la différenciation cellulaire. En parallèle, elle explore le potentiel thérapeutique de nanoparticules et leur réactivité en environnement biologique, qui a conduit à la découverte récente d'un bio-magnétisme intracellulaire.

Recherche et développement

Figier l'ARN des virus pour empêcher leur réplication



Structure de RG2 repliée à quadruplexes de guanine, superposée à une vue d'artiste des virus SARS-CoV-2. © Antonio Monari.

Tous les virus dits à ARN, comme SARS-CoV-2, stockent leur information génétique dans un simple brin d'acide ribonucléique (ARN), enchaînement des quatre bases adénosine (A), cytosine (C), guanine (G) et uracyle (U). Le virus détourne la machinerie de la cellule infectée pour copier cet ARN, se dupliquer et infecter d'autres cellules ainsi que produire les protéines nécessaires à son fonctionnement. Bien que plus simple que celui des cellules eucaryotes, ou même des bactéries, le génome des virus à ARN se replie sur lui-même et s'organise dans l'espace pour présenter une grande diversité de motifs structuraux. Parmi ces arrangements, les structures dites à quadruplexes de guanine, caractérisées par l'empilement successif de feuillets composés de quatre guanines, ont récemment fait l'objet de plusieurs études car ils semblent jouer un rôle très important dans la régulation de la réplication virale. Des scientifiques du Laboratoire ITODYS (CNRS/Université Paris Cité) et du Laboratoire physique et chimie théoriques (CNRS/Université de Lorraine), en collaboration avec une équipe italienne, ont récemment révélé la structure particulière du quadruplexe de guanine présent dans la région dite

RG2 du génome de SARS-CoV-2. Ils ont pour cela combiné des techniques spectroscopiques comme le dichroïsme circulaire à des simulations moléculaires, et ont ainsi pu montrer que cette région est composée d'un cœur rigide, qui correspond aux empilements de guanines, flanqué de boucles très flexibles. Mais ils ont surtout mis en évidence qu'il est possible de figer cette structure complexe en la faisant interagir avec des ligands opportuns. Cette stratégie permettrait d'empêcher le dépliement de cette zone de l'ARN, nécessaire à sa réplication. Ce dernier aspect est crucial car la zone RG2 détient l'information nécessaire à la production d'une protéine virale fondamentale (Nsp10) impliquée dans la maturation du virus et la propagation de l'infection. Bloquer la zone RG2 dans cette structure de quadruplexe de guanine empêcherait la synthèse de cette protéine et pourrait donc être utilisée comme une stratégie antivirale.

Ces travaux, qui font la couverture de *Chemical Science*, permettent d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant les virus à ARN, qui sont parmi les agents infectieux les plus dangereux pour la santé publique. Ils s'inscrivent dans le cadre du projet d'envergure nationale GAVO qui vise à développer des antiviraux innovants et ont bénéficié d'une utilisation massive des ressources de calculs nationales et locales, notamment via l'accès aux ressources du Grand équipement national de calcul intensif GENCI.

• Source : INC/CNRS, 07/11/2023.

Réf. : L. D'Anna, T. Miclot, E. Bignon, U. Perricone, G. Barone, A. Monari, A. Terenzi, Resolving a guanine-quadruplex structure in the SARS-CoV-2 genome through circular dichroism and multiscale molecular modeling, *Chemical Science*, 2023, <https://doi.org/10.1039/D3SC04004F>.

Antibiorésistance : un nouveau mécanisme observé

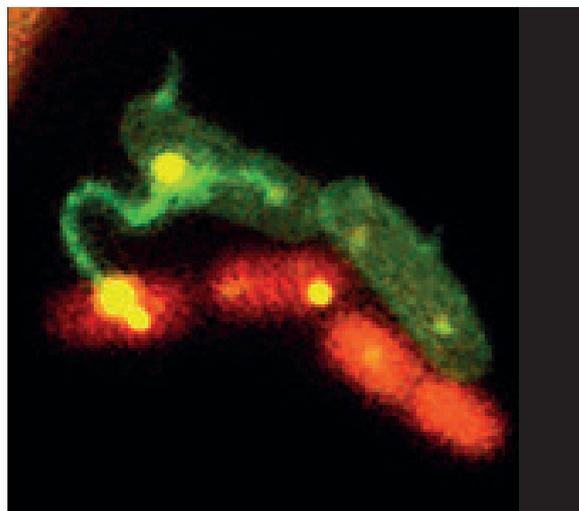


Image de microscope à fluorescence montrant le transfert de l'ADN (en jaune) à travers le pilus de conjugaison de la bactérie donneuse (vert) à une bactérie receveuse (rouge).

© Kelly Goldlust – Lesterlin LAB (MMSB, Lyon).

Mieux comprendre la manière dont les bactéries acquièrent des résistances aux antibiotiques est un enjeu de recherche majeur (on comptabilise en France environ 5 500 décès liés à ce phénomène chaque année). Le principal mécanisme de dissémination de ces résistances est appelé « transfert d'ADN par conjugaison bactérienne ». Jusqu'ici, on pensait qu'il ne pouvait se faire qu'entre bactéries en contact direct l'une avec l'autre.

Dans une nouvelle étude, des chercheurs de l'Inserm, du CNRS et de l'Université Claude-Bernard - Lyon 1, au sein du Laboratoire Microbiologie moléculaire et biochimie structurale, ont mis en lumière un nouveau mode de transfert de résistances entre bactéries, en démontrant pour la première fois, grâce

à des techniques innovantes de microscopie, qu'un transfert d'ADN entre des cellules physiquement distantes est en fait possible. Ces résultats, ainsi que leurs nombreuses implications théoriques et cliniques, sont publiés dans *PNAS*.

En mettant en lumière un mode de transfert de l'ADN jusqu'alors mal caractérisé, ce travail pourrait aussi à plus long terme ouvrir la voie au développement d'outils thérapeutiques visant à cibler et à inhiber ces mécanismes de transmission de la résistance aux antibiotiques entre bactéries.

• Source : Inserm/CNRS, 15/11/2023.

Ref. : K. Goldlust, A. Ducret, M. Halte, A. Dedieu-Berne, M. Erhardt, C. Lesterlin, *The F pilus serves as a conduit for the DNA during conjugation between physically distant bacteria*, *PNAS*, 2023, <https://doi.org/10.1073/pnas.2310842120>.

Un traitement prometteur pour lutter contre la maladie de Parkinson

Avec près de 10 millions de personnes touchées dans le monde et plus de 270 000 en France, la maladie de Parkinson est un véritable enjeu de santé publique, particulièrement au sein des populations âgées. Elle est causée par la mort d'un type bien précis de neurones du tronc cérébral, ce qui perturbe fortement les mouvements chez les patients. Actuellement, seuls les symptômes de la maladie sont pris en charge, car il n'existe aucun traitement pour empêcher la mort des neurones affectés. Bruno Figadère, directeur de recherche CNRS, et son équipe au Laboratoire Biomolécules : conception, isolement, synthèse (BioCIS – CNRS/Université Paris-Saclay/CY Cergy Paris Université), en interaction étroite avec des collègues de l'Institut du cerveau, développent de nouvelles molécules qui pourraient enfin répondre au besoin de traiter la maladie de Parkinson de manière curative, et empêcher la neurodégénérescence qui la caractérise.

Dans certains neurones responsables du contrôle du mouvement, on sait que la double accumulation de fer et de dépôts d'une protéine spécifique, appelée alpha-synucléine, est très vraisemblablement à l'origine de la maladie de Parkinson. En effet, ces deux accumulations sont progressivement toxiques pour ces neurones et causent leur mort, ce qui perturbe ensuite fortement les capacités motrices des personnes atteintes.

L'un des composés ayant un potentiel thérapeutique prometteur pour lutter contre cette maladie est la doxycycline. Il s'agit d'un médicament antibiotique utilisé dans le traitement de certaines pathologies de la peau. Ses effets contre la mort des neurones vulnérables sont très bien décrits dans la littérature scientifique, mais comme il s'agit d'un antibiotique, un traitement à long terme est difficilement envisageable, car il sélectionnerait des bactéries résistantes et perturberait la flore microbienne des patients, entraînant une cascade d'effets secondaires. C'est là qu'intervient l'expertise chimique de l'équipe de scientifiques dont la modification des substances est la spécialité, en créant des dérivés de la doxycycline qui n'ont plus d'activité antibiotique. Ceux qui sont les plus efficaces pour neutraliser les mécanismes dégénératifs précités, à savoir l'accumulation de fer et de dépôts protéiques dans les cellules neuronales vulnérables, sont actuellement testés. Ces travaux, lauréats du programme d'accélération NeurAL (Neuroscience Acceleration Launchpad) de l'Institut du cerveau, sont le fruit de la rencontre entre ces deux équipes et de leurs synergies interdisciplinaires. L'équipe du BioCIS cherche actuellement de nouveaux soutiens financiers pour monter une startup afin d'accélérer et intensifier le développement de leur candidat médicament. À terme, ces travaux



pourraient ouvrir la voie à un traitement sur le long terme des causes de la maladie de Parkinson, permettant de neutraliser ses symptômes et ainsi restaurer une meilleure qualité de vie chez les personnes atteintes.

• Source : INC/CNRS, 06/11/2023.

Enseignement et Formation

Greenano : un nouveau master autour des nanomatériaux

Mines Nancy et la Faculté des Sciences et Technologies, membres de l'Université de Lorraine, s'associent à l'Université Tor Vergata de Rome, à l'Institut CNR de la structure de la matière en Italie et à la Jozef Stefan International Postgraduate School en Slovénie, pour proposer à la rentrée 2024 ce nouveau master conjoint Erasmus Mundus dédié aux nanomatériaux pour les transitions verte et numérique.

Soutenu par l'Union européenne, ce programme s'adresse à des étudiants venus du monde entier pour les former aux nanotechnologies et aux écotechnologies et leur apprendre à réduire les risques environnementaux et à surmonter la diminution de la disponibilité des ressources naturelles, à travers une expérience éducative interdisciplinaire et internationale unique.

Inscriptions ouvertes jusqu'au 1^{er} février 2024.

• greenanomaster.eu

Agenda

18-20 décembre 2023

ISBOC-13

13th International symposium
on bioorganic chemistry

Singapour

<https://iupac-isboc13.sg>

14-18 janvier 2024

PCSI 49

49th Conference on the physics and
chemistry of surfaces and interfaces

Santa Fe (États-Unis)

<https://pcsi2024.avs.org>

15 janvier 2024

ICBCM 2024

International conference
on biomarkers in cancer medicine

Rome (Italie)

https://waset.org/biomarkers-in-cancer-medicine-conference-in-january-2024-in-rome?utm_source=conferenceindex&utm_medium=referral&utm_campaign=listing

23-26 janvier 2024

JIREC 2024

Journées de l'innovation
et de la recherche pour l'enseignement
de la chimie

Dourdan

Thème : Enseigner et innover en chimie
à l'heure du numérique.

Voir n° 488, p. 57.

<https://jirec.org/dl/accueil>

24-26 janvier 2024

SCF Chemical biology symposium 2024

Paris-Saclay

Voir n° 488, p. 58.

<https://scf-chembio2024.com>

24-26 janvier 2024

1^{ères} Journées franco-italiennes de chimie de coordination

Strasbourg

Voir n° 488, p. 58.

<https://jcc2024.sciencesconf.org>

1^{er} février 2024

La pyrolyse

Atelier de veille et prospective du GFP

Paris & online

Quelle contribution à l'économie
circulaire des plastiques en fin de vie ?

alain.guinault@lecnam.net



1-2 février 2024

GSO 2024

Journées Grand Sud-Ouest
Bordeaux

Voir n° 489, p. 51.

<https://scf-gso2024.sciencesconf.org>

6-8 février 2024

École et journées annuelles de l'Association Française de l'Adsorption

Caen

www.adsorption.fr

19-20 février 2024

ICCSB 2024

International conference on cancer
screening and biomarker

Paris

https://waset.org/cancer-screening-and-biomarker-conference-in-february-2024-in-paris?utm_source=conferenceindex&utm_medium=referral&utm_campaign=listing

22-23 février 2024

YRFM 2024

Young research fellows meeting

Grenoble

<https://sct-asso.fr/yrfm-young-research-fellow-meeting>

27 février 2024

GWB2024

Global women's breakfast:
catalyzing diversity in science

Online

<https://iupac.org/event/gwb2024-catalyzing-diversity-in-science>

1-2 mars 2024

Village de la chimie

Paris Montreuil

www.villagedelachimie.org

4-5 mars 2024

ICBCM 2024

International conference
on biomarkers and clinical medicine

Rome (Italie)

https://waset.org/biomarkers-and-clinical-medicine-conference-in-march-2024-in-rome?utm_source=conferenceindex&utm_medium=referral&utm_campaign=listing

12-15 mars 2024

1st European meeting on infrared nanospectro-imaging & EFNS Bruker's tech day

Orsay

<https://eu-nanospec-2024.sciencesconf.org>



21-22 mars 2024

4th International conference on mass spectrometry and analytical techniques

Rome (Italie)

<https://crgconferences.com/mass-spectrometry>

27-28 mars 2024

Forum Labo Lyon 2024

Lyon

www.forumlabo.com/lyon/fr-fr.html

27-28 mars 2024

M2M 2024

Les matinales de la métrologie

Lyon

www.cfmetrologie.com/fr/evenements/les-matinales-de-la-metrologie

7-11 avril 2024

Photonics Europe 2024

Strasbourg

<https://spie.org/conferences-and-exhibitions/photonics-europe?SSO=1>

11-12 avril 2024

ICCIB 2024

International conference on cancer
immunotherapy and biomarkers

Paris

https://waset.org/cancer-immunotherapy-and-biomarkers-conference-in-april-2024-in-paris?utm_source=conferenceindex&utm_medium=referral&utm_campaign=listing

28 avril-2 mai 2024

57th Bürgenstock conference

SCS conference on stereochemistry

Brunnen (Suisse)

<https://bc24.scg.ch>

15-17 mai 2024

Supr@Paris 2024

3rd French supramolecular chemistry
congress

Paris

<https://supraparis2024.sciencesconf.org>

19-24 mai 2024

GECOM-CONCOORD

Ax-les-Thermes

<https://gecom2024.sciencesconf.org>

Prix des divisions

GFP/division Polymères et matériaux

Prix d'Honneur 2023



• Jean-Marc Pujol

La carrière de Jean-Marc Pujol s'est déroulée dans le domaine du développement industriel des polymères et la promotion de l'innovation collaborative.

Ingénieur de l'École de chimie de Strasbourg, il s'est orienté vers la recherche sur les macromolécules à l'Institut Charles Sadron et a obtenu un doctorat en synthèse des polymères en 1985. Il a rejoint alors Rhône-Poulenc à Lyon pour le développement de polymères pour l'électronique et de précurseurs de fibres céramiques, puis 3M aux États-Unis pour les adhésifs des applications électroniques. De retour en France en 1990, il a retrouvé Rhône-Poulenc pour la formulation d'élastomères silicones, avant de repartir aux États-Unis pour promouvoir l'innovation des silicones dans de nouveaux marchés.

Sa carrière s'est poursuivie à Lyon en tant que responsable des laboratoires d'application, puis des laboratoires de synthèse et formulation silicones. Avec ses équipes de chercheurs, il a contribué à la mise au point de nombreux nouveaux produits silicones : élastomères et fluides pour la construction, le textile, l'électronique, l'industrie, l'automobile, le papier...

En 2003, dans le même groupe devenu Rhodia, il a continué au Centre de recherches, en tant que manager du groupe synthèse et procédés polyamides, et polyisocyanates bases de vernis polyuréthanes. Parallèlement, la première présidence de Polyray pour la polymérisation sous rayonnement lui est confiée.

Au Centre de recherches de Paris, il a dirigé de 2008 à 2013 le Pôle R&D Europe des polymères (polyacrylates et polysaccharides), tensio-actifs et solvants, puis les équipes mondiales des laboratoires d'applications industrielles. Il a également assuré la vice-présidence de l'ACDV pour la chimie du végétal.

Plus récemment, il a coordonné les relations avec les partenaires externes d'innovation collaborative en tant que directeur adjoint, vice-président R&D des affaires externes pour Solvay. En synergie, il a assuré la vice-présidence du pôle de compétitivité Polymeris, le rôle d'administrateur de la plateforme collaborative Axel'One et la présidence du groupe français des polymères, avec une forte contribution à la croissance du pôle LPSE Lyon Polymer Science and Engineering.

Prix Champetier 2022



• Costantino Creton

Après un diplôme d'ingénieur en science des matériaux de l'EPFL centré sur la métallurgie et les matériaux, Costantino Creton a effectué son doctorat sur l'effet renforçant des copolymères à blocs aux interfaces sous la direction

de E.J. Kramer à l'Université de Cornell aux États-Unis. De retour en France en 1993 après un postdoctorat à IBM Almaden, il rejoint l'ESPCI qu'il ne quittera plus. Il est recruté au CNRS dans le laboratoire de Lucien Monnerie en 1994 et sera promu directeur de recherche en 2001. À partir de 1995, il démarre un travail précurseur sur les mécanismes d'adhésion des adhésifs souples. Ce travail a dans un premier temps apporté des avancées méthodologiques significatives sur l'aspect physique et mécanique du décollement de ces adhésifs à l'interface entre le solide et le liquide. Puis son équipe développe une approche multi-échelle à l'interface entre chimie, physique et mécanique pour relier la structure et l'architecture moléculaire aux propriétés mécaniques et adhésives macroscopiques. Ces activités de recherche sur l'adhésion ont été récompensées par plusieurs prix de haut niveau, en France (prix Dédale de la Société Française d'Adhésion en 2007), au Royaume-Uni (Wake Medal of the Society of Adhesion and Adhesives en 2011) et aux États-Unis (Award for Excellence in Adhesion Science de l'Adhesion Society en 2013).

À partir de 2007, en collaboration avec Matteo Ciccotti, Dominique Hourdet, Yvette Tran et Tetsuharu Narita au sein du Laboratoire SIMM, son équipe démarre une nouvelle thématique de recherche sur les grandes déformations et la rupture des hydrogels et des élastomères. Avec ses collaborateurs dans le laboratoire et à l'extérieur, il développe de nombreuses approches expérimentales originales axées sur la compréhension des mécanismes de rupture avec une approche multi-échelle. À partir de 2014 sa recherche se focalise sur l'utilisation de molécules mécano-sensibles pour détecter les contraintes et l'endommagement moléculaire dans les matériaux souples. Il obtient en 2015 une ERC Advanced Grant sur cette thématique et en 2021 ses travaux sont récompensés par le Grand Prix de la Fondation Michelin.

Les recherches de son équipe ont donné lieu à plus de 230 publications et ont été présentées dans 139 conférences invitées en congrès international. Il a encadré ou co-encadré plus de 40 doctorants et doctorantes et plus de 35 postdoctorats qui sont maintenant en poste dans la recherche académique ou dans l'industrie en France et dans le monde.

Il a été également président de la section française d'adhésion de 2013 à 2017, a participé aux comités de sélection de l'ANR et aux panels d'évaluation de l'ERC Synergy Grant en 2018, 2020 et 2022 (panel chair). Il est depuis 2011 « scientific chair » au Dutch Polymer Institute et depuis 2019 VP Recherche de l'ESPCI Paris – PSL.

Prix Champetier 2023



• Henri Cramail

Henri Cramail est professeur à l'Université de Bordeaux au sein du Laboratoire de chimie des polymères organiques (LCPO, UMR CNRS 5629) dont il a été le directeur de 2007 à 2016.

Après un diplôme d'ingénieur de l'ENSCP, il a effectué son doctorat à l'Université Bordeaux 1 sous la direction de Michel

Fontanille et Alain Soum, sur l'oligomérisation fonctionnelle du norbornène par réaction de métathèse croisée avec des alcènes symétriques difonctionnels, pour l'élaboration de pré-polymères hydroxy-téléchéliques précurseurs de réseaux polyuréthane denses (1990). Puis il a effectué un stage post-doctoral dans le groupe de W.J. Feast (Université de Durham, R.-U.), en collaboration avec Richard Friend (Université de Cambridge, R.-U.), sur la synthèse de précurseurs de polyacétyleène par polymérisation « vivante » par métathèse, amorcée par des complexes métalla-carbéniques (catalyseurs de type Schrock), abordant ainsi la thématique des polymères conducteurs.

De retour en France, il est nommé maître de conférences à l'Université Bordeaux 1 et rejoint l'équipe d'Alain Deffieux au LCPO pour s'engager dans de nouveaux thèmes de recherche tels que la polymérisation cationique « vivante » de monomères vinyliques et la polymérisation d' α -oléfinés et de cyclooléfinés, amorcée par les métallocènes et post-métallocènes. Nommé professeur des universités en 1999, ses activités de recherche sur le contrôle des mécanismes de polymérisation appliqué à l'ingénierie macromoléculaire sont récompensées en 2002 par le prix de la division Polymères de la SFC et du GFP et, en 2004, il est nommé membre junior de l'Institut universitaire de France (IUF).

À partir de 2006, il est l'un des premiers en France à aborder la thématique de recherche autour des polymères biosourcés. Il anime aujourd'hui une équipe de recherche au LCPO, intitulée « Polymères biosourcés et biopolymères ». L'essentiel de ses travaux de recherche porte sur la synthèse par polycondensation et polyaddition de matériaux polymères biosourcés (polyesters, polyuréthanes, poly(hydroxyuréthanes), réseaux époxy) issus de ressources renouvelables (huiles végétales, terpènes, dérivés lignocellulosiques) et sur le développement de méthodologies de synthèse de polymérisation (catalyses, procédés) plus respectueuses de l'homme et de l'environnement. Dans cette thématique, il met en place dès 2007 une unité mixte technologique (UMT) avec l'ITERG et développe un grand nombre de partenariats avec le monde socio-économique. Ces activités sont récompensées en 2016 par sa nomination comme membre distingué sénior de la SCF.

Ses recherches ont donné lieu à plus de 220 publications, 40 brevets et ont été présentées dans plus de 120 conférences invitées. Il a encadré ou co-encadré 67 doctorants et 28 post-doctorants qui exercent aujourd'hui dans l'industrie ou la recherche publique française et étrangère.

Particulièrement investi dans l'animation et le management de la recherche, il a été membre de la section 11 du Comité national de la recherche (2008-2012), président lors d'une seconde mandature (2012-2016) et membre d'un comité de sélection de projets de l'ANR (2018-2019). Depuis 2020, il est conseiller scientifique pour la chimie au Haut Conseil de l'évaluation de la recherche et de l'enseignement supérieur (Hcéres).

Prix de thèse

Ce prix est décerné par la commission Enseignement du GFP (Groupe français d'études et d'applications des polymères).



• Mathilde Grosjean

Mathilde Grosjean a réalisé son doctorat intitulé « Développement de réseaux dégradables avec des propriétés d'actuation, de bioadhésion ou d'auto-réparation pour des applications biomédicales » au sein du département

Polymères pour la santé et les biomatériaux de l'Institut des biomolécules Max Mousseron à Montpellier. Ses travaux de thèse ont été dirigés par Benjamin Nottelet et financés par l'ANR dans le cadre du projet OPENN.

À ce jour, les cancers de la zone abdomino-pelvienne sont parmi les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde et la complication principale sur le long terme est l'inflammation de la muqueuse du côlon, causée par les rayonnements de radiothérapie envers les tissus sains. Puisqu'il n'existe actuellement pas de traitement curatif, les objectifs du projet OPENN consistent à développer un patch biodégradable capable de s'auto-enrouler et de se dérouler, qui pourrait être appliqué localement par coloscopie sans intervention chirurgicale afin de traiter les altérations du tissu. Afin de répondre à la problématique, l'objectif principal de ses travaux a donc été le développement d'une plateforme macromoléculaire pour obtenir des réseaux dégradables et fonctionnels avec des propriétés d'actuation, d'auto-réparation et de bioadhésion.

Une famille de copolymères à blocs en étoile biodégradables basés sur le poly(acide lactique) et le poly(éthylène glycol) et fonctionnalisés avec différents groupements chimiques a été synthétisée. Ces polymères ont ensuite servi à la préparation de divers matériaux. Dans un premier temps, des tubes capables de s'auto-enrouler rapidement par immersion dans l'eau ont été préparés en combinant un polymère hydrophobe et un polymère hydrophile. Pour aller plus loin dans le design d'actuateurs, des biomatériaux de formes plus complexes et capables de changer de forme par gonflement dans l'eau ont ensuite été imprimés en 3D. Différents systèmes bioadhésifs obtenus à partir d'hydrogels ont également été étudiés. Enfin, des élastomères avec des propriétés d'auto-réparation à 37 °C ont été obtenus grâce à la présence de liaisons physiques réversibles ou de liaisons chimiques dynamiques au sein du réseau.

Ces différents matériaux ont été exploités pour développer un prototype de patch pour le traitement curatif des inflammations du côlon induites par la radiothérapie. À ce jour, les études *in vivo* sont en cours afin de démontrer son efficacité thérapeutique. Le patch est composé de trois couches : une couche bioadhésive, une couche hydrogel chargée avec un anti-inflammatoire, et une couche hydrophobe élastomère qui agit comme une barrière afin de protéger le tissu lésé des pathogènes luminaux coliques et permettre un relargage unidirectionnel des molécules actives vers la zone ciblée. L'épaisseur des différentes couches a été optimisée afin que le patch soit capable de s'auto-enrouler de manière quasi instantanée lors de son immersion dans l'eau afin de faciliter son placement par coloscopie.

Mathilde Grosjean occupe depuis octobre 2023 un poste d'ingénieur de recherche en chimie des polymères chez Saint-Gobain Research Paris.

save the date

<https://euchems2024.org>

Mécanosynthèse de médicaments par extrusion réactive

Selon la définition donnée par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC), une réaction mécano-chimique est une réaction chimique induite par l'absorption directe d'énergie mécanique [1]. Le cisaillement, l'étirement et le broyage sont des méthodes typiques pour la génération mécano-chimique de sites réactifs. Très utilisée en chimie industrielle des minerais, en synthèse inorganique et en préparation de co-cristaux dans l'industrie pharmaceutique, la mécano-chimie ne s'est développée que récemment en synthèse organique avec les travaux pionniers de Toda et Kaupp [2]. Depuis, de nombreuses applications ont été rapportées dans les domaines de la chimie hétérocyclique, organométallique, des peptides, des nucléotides... [3].

Appareillages

Les appareillages couramment utilisés sont les broyeurs à billes, de type vibrant ou planétaire (*figure 1*) et, pour la montée en échelle, les extrudeuses. Les broyeurs à billes sont des réacteurs dans lesquels sont agités des réactifs, très souvent solides, avec des billes de matériaux divers, conduisant en fin de réaction aux produits désirés, le tout sans solvant.

Couramment utilisée dans le domaine des polymères [4] et dans l'industrie alimentaire, l'extrudeuse permet à partir d'un système à une ou deux vis de transporter un mélange réactionnel, tout en le transformant par application concomitante de forces de malaxage et de cisaillement (*figure 2*). C'est un système de synthèse en continu qui facilite la montée en échelle, tout en conservant une grande efficacité.

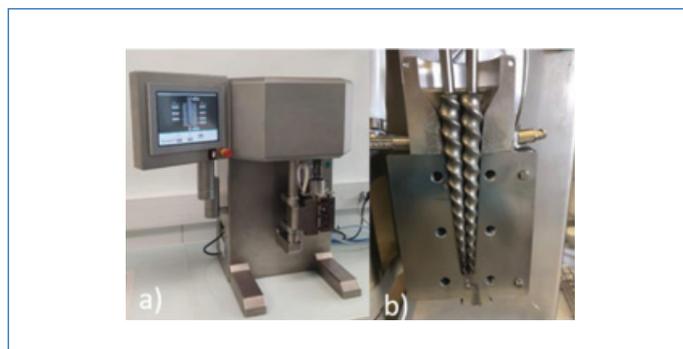


Figure 2 - Équipement de mécano-chimie en continu : a) extrudeuse verticale ; b) vue du fourreau et des vis. L'extrudeuse est de taille plus conséquente qu'un broyeur à billes (2 m toutes mesures confondues).

concentration en composés de départ. Dans le cas présent, même si on ne peut pas, à proprement parler, définir des « concentrations » en l'absence de solvant, on est en présence de mélanges contenant uniquement les espèces réactives, sans dilution, ce qui a pour conséquence l'obtention de vitesses de réaction très élevées. Des réactions plus rapides et souvent plus efficaces permettent de s'affranchir de l'utilisation d'excès de réactifs, ce qui entraîne des économies de matière première mais aussi permet de faciliter les étapes de purification, souvent génératrices de solvants organiques usés. D'autre part, la mécano-chimie permet de faire entrer en réaction des entités moléculaires pour lesquelles il est difficile de trouver des solvants dans lesquels elles sont solubles, résolvant ainsi de potentiels problèmes de solubilités. Pour finir, l'environnement réactionnel étant différent par rapport à la solution, des réactivités et sélectivités différentes peuvent être observées et certains composés ne peuvent être obtenus que par mécano-chimie. Toutefois, si l'utilisation de la mécano-chimie présente de nombreux avantages, il faut prendre des précautions de sécurité, notamment dans le cas des broyeurs à billes, en évitant l'utilisation de composés chimiques à l'explosivité reconnue.

Extrusion réactive

Un des inconvénients de l'utilisation des broyeurs à billes est de travailler en réacteur fermé, ce qui complique la montée en échelle. Même s'il existe des bols de broyages de grande capacité, l'idéal est de pouvoir mettre en place une synthèse mécano-chimique en continu. C'est ce que permettent des appareillages d'extrusion qui vont servir de réacteur chimique, sans solvant, et permettre le transport de matière solide ou visqueuse avec des vis. Les premiers travaux rapportés étaient dans le domaine des réseaux métallo-organiques [6], puis des réactions de synthèse organique ont été développées [7].

Trois exemples de synthèse de médicaments

Synthèse de la molécule PZ-1361

Un exemple de synthèse multi-étapes a permis d'évaluer le gain obtenu dans le cas de l'utilisation de la mécano-chimie. Ainsi quand la molécule PZ-1361, active sur les récepteurs sérotoninergiques, est préparée via des étapes en solution, un total de 60 h de réaction et trois étapes de purification par chromatographie sur gel de silice sont nécessaires, pour donner un rendement assez faible (34 %). En comparaison, la synthèse au broyeur à billes prend moins de temps (total de 5 h 30), s'affranchit de purification par chromatographie,

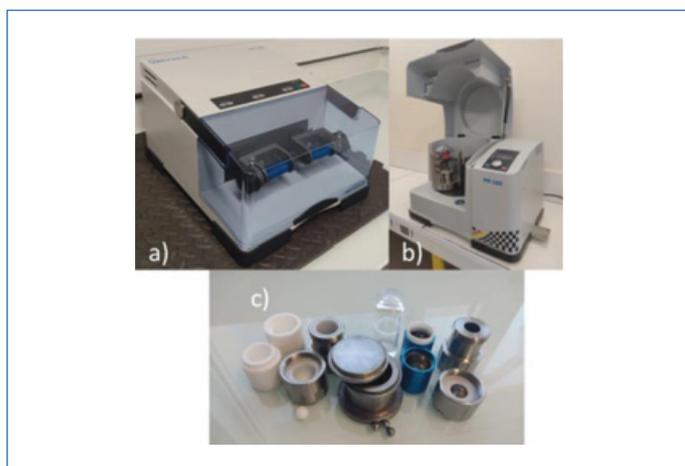


Figure 1 - Équipement de mécano-chimie : a) broyeur à billes vibrant ; b) broyeur à billes planétaire ; c) bols et billes de broyage. Les broyeurs à billes sont des appareils de taille modeste (moins d'1 m toutes mesures confondues) et sont facilement installés sous une sorbonne.

Avantages

L'avantage premier est écologique [5] car utiliser la mécano-chimie en synthèse permet de s'affranchir de solvants, très souvent organiques, qui permettent de solubiliser composés de départ et réactifs : les forces mécaniques exercées permettent d'obtenir un mélange efficace qui facilite rencontre et réaction des molécules, en l'absence de solvant. Le corollaire de cet avantage est une augmentation des vitesses de réaction en comparaison avec la même transformation en solution. En l'absence de solvant, on travaille à des concentrations en matériel de départ extrêmement importantes. Dans la plupart des cas, la cinétique d'une réaction en solution est proportionnelle à la

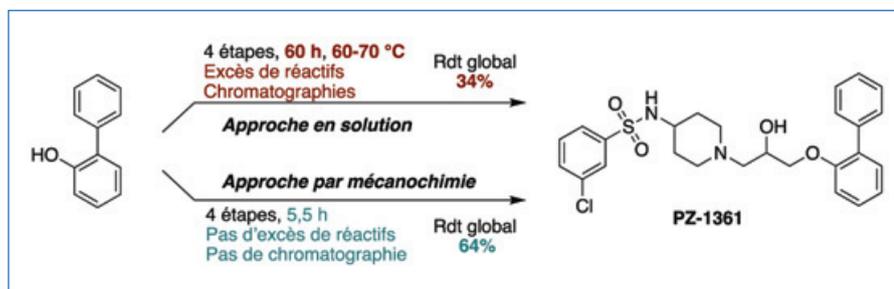


Figure 3 - Synthèse par broyage à billes de PZ-1361. Réactifs utilisés en stratégie mécanochemie : 1) épichlorhydrine/ K_2CO_3 ; 2) 4-(boc-amino)pipéridine; 3) HCl gazeux; 4) chlorure de 3-chlorobenzènesulfonyle/ K_2CO_3 .

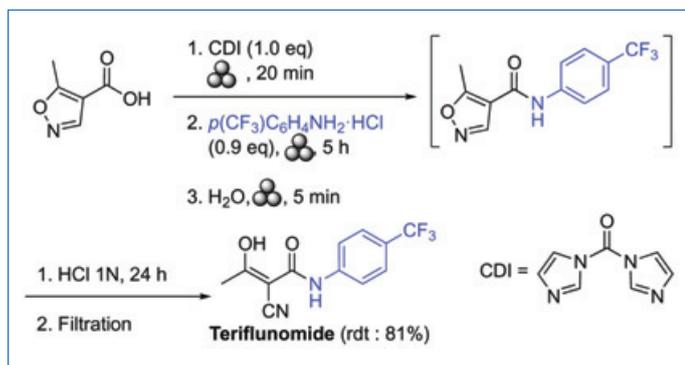


Figure 4 - Synthèse du tériflunomide par broyage à billes. Le carbonyldiimidazole (CDI) permet d'activer la fonction acide carboxylique pour permettre le couplage avec l'amine.

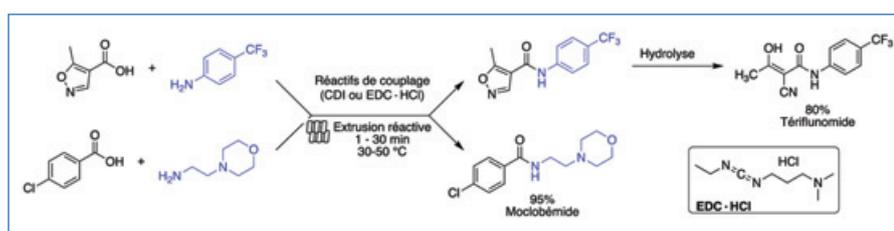


Figure 5 - Synthèse du tériflunomide et du moclobémide par extrusion réactive. Le carbodiimide EDC active aussi l'acide carboxylique, mais en une seule étape contrairement au CDI.

permet de presque doubler le rendement et réduit considérablement la quantité de déchets [8] (figure 3). Cette preuve de concept a permis d'étendre ce travail à la préparation de chimiothèques de molécules et de mettre en place une mécanochemie médicinale [9].

Synthèse du tériflunomide

Environ 25 % des principes actifs de médicaments mis sur le marché possèdent un ou plusieurs amides. La mise au point de conditions plus écologiques pour préparer cette fonction par couplage entre un acide carboxylique et une amine apparaît donc comme une nécessité. La synthèse du tériflunomide [10], principe actif d'un médicament indiqué pour le traitement de la sclérose en plaques, a été effectuée dans un broyeur à billes en l'absence totale de solvant organique. Dans un bol de broyage d'un volume de 12 mL, l'acide 5-méthyl-4-isoxazolecarboxylique est successivement activé par le carbonyldiimidazole (CDI) [10c], mis en réaction avec la paratrifluorométhylaniline sous forme de chlorhydrate et le mélange réactionnel est récupéré du bol par mise en suspension dans de l'eau. Hydrolyse

acide en solution aqueuse et filtration permet d'obtenir le tériflunomide pur avec un excellent rendement global de 81 % (figure 4).

Synthèse du moclobémide

Le tériflunomide a été préparé, avec un très bon rendement, en mode continu par extrusion réactive. Le moclobémide, un autre composé d'intérêt – utilisé pour traiter la dépression et l'anxiété – a été synthétisé en continu. Comme preuve de concept, 11 g de moclobémide ont été obtenus en 2 minutes. De même qu'en chimie en flux classique, tant que l'extrudeuse est alimentée en réactifs de départ, le produit est obtenu en sortie de fourreau [11] (figure 5).

La mécanochemie de synthèse, impliquant une réduction drastique de l'usage de solvants toxiques et dangereux, s'inscrit de façon adéquate dans une démarche de développement durable. L'extrusion réactive permet d'avoir accès à un système de synthèse en continu et ouvre la voie pour une utilisation de cette technologie dans l'industrie pharmaceutique.

[1] K. Horie *et al.*, Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials (IUPAC Recommendations 2003), *Pure Appl. Chem.*, **2004**, *76*, p. 889-906.

[2] F. Toda, H. Akai, Enantioselective Wittig-Horner reaction in the solid state, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, p. 3446-47; G. Kaupp, J. Schmeyers, A. Kuse, A. Atef, Cascade reactions in quantitative solid-state syntheses, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, p. 2896-99.

[3] L. Takacs, The historical development of mechanochemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, p. 7649-59; J.-L. Do, T. Friščić, Mechanochemistry: a force of synthesis, *ACS Central Science*, **2017**, *3*, p. 13-19; J. Howard, Q. Cao, D.L. Browne, Mechanochemistry as an emerging tool for molecular

synthesis: what can it offer?, *Chem. Sci.*, **2018**, *9*, p. 3080-94; O. Bento, F. Luttringer, T. Mohy El Dine, N. Pétry, X. Bantreil, F. Lamaty, Sustainable mechanochemistry of biologically active molecules, *Eur. J. Org. Chem.*, **2022**, e202101516.

[4] V. Bounor-Legaré, F. Becquart, F. Fenouillot, L'extrusion réactive, *L'Act. Chim.*, **2017**, 422-423, p. 47-58.

[5] K.J. Ardila-Fierro, J.G. Hernández, Sustainability assessment of mechanochemistry by using the twelve principles of green chemistry, *ChemSusChem*, **2021**, *14*, p. 2145-62.

[6] D. Crawford *et al.*, Synthesis by extrusion: continuous, large-scale preparation of MOFs using little or no solvent, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, p. 1645-49.

[7] D.E. Crawford, C.K.G. Miskimmin, A.B. Albadarin, G. Walker, S.L. James, Organic synthesis by twin screw extrusion (TSE): continuous, scalable and solvent-free, *Green Chem.*, **2017**, *19*, p. 1507-18.

[8] V. Canale, V. Frisi, X. Bantreil, F. Lamaty, P. Zajdel, Sustainable synthesis of a potent and selective 5-HT7 receptor antagonist using a mechanochemical approach, *J. Org. Chem.*, **2020**, *85*, p. 10958-965.

[9] V. Canale *et al.*, Design, sustainable synthesis and biological evaluation of a novel dual $\alpha_2A/5-HT_7$ receptor antagonist with antidepressant-like properties, *Molecules*, **2021**, *26*, 3828; V. Canale *et al.*, 1-(arylsulfonyl-isoindol-2-yl)piperazines as 5-HT6R antagonists: mechanochemical synthesis, in vitro pharmacological properties and glioprotective activity, *Biomolecules*, **2023**, *13*, 12.

[10] a) T.-X. Métro, J. Bonnamour, T. Reidon, J. Sarpoulet, J. Martinez, F. Lamaty, Mechanochemistry of amides in the total absence of organic solvent from reaction to product recovery, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, p. 11781-783; b) T.-X. Métro *et al.*, Comprehensive study of the organic-solvent-free CDI-mediated acylation of various nucleophiles by mechanochemistry, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, p. 12787-796; c) T.-X. Métro, J. Martinez, F. Lamaty, 1,1'-carbonyldiimidazole and mechanochemistry: a shining green combination, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2017**, *5*, p. 9599-602.

[11] M. Lavassyère, F. Lamaty, Amidation by reactive extrusion for the synthesis of active pharmaceutical ingredients teriflunomide and moclobémide, *Chem. Commun.*, **2023**, *59*, p. 3439-42.

Cette fiche a été préparée par **Frédéric LAMATY**, directeur de recherche au CNRS (frederic.lamaty@umontpellier.fr), et **Xavier BANTREIL**, maître de conférences à l'Université de Montpellier, membre junior de l'Institut Universitaire de France (xavier.bantreil@umontpellier.fr), Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM-CNRS/Université de Montpellier/École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier). Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par Jean-Pierre FOULON (jpfoulon@wanadoo.fr). Elles sont regroupées et en téléchargement libre sur www.lactualitechimique.org.

Complétez votre collection

Les sommaires de tous les numéros peuvent être consultés sur notre site (www.lactualitechimique.org)

Tous les articles et numéros de plus de cinq ans sont téléchargeables gratuitement

Numéros spéciaux également disponibles en **version électronique** sur le site à un tarif préférentiel

Dernières parutions :

- Biomarqueurs pour la médecine du futur (décembre 2023) : 20 €
- Chimie et bois (mai-juin 2023) : 32 €
- De la vigne aux vins (décembre 2022) : 20 €
- La diffusion de neutrons (octobre 2022) : 20 €
- Le fer en catalyse : un élément d'avenir (mai-juin 2022) : 32 €
- Répondre aux menaces : explosifs, déminage et management de crises (avril 2022) : 20 €
- La chémiobiologie explore le vivant (décembre 2021) : 20 €
- Hydrogène décarboné (octobre 2021) : 20 €
- De la chimie du solide aux batteries de demain (juillet-août 2021) : 20 €
- Substances naturelles et chimie durable (mai 2021) : 20 €
- Radiochimie et chimie sous rayonnement (mars-avril 2021) : 32 €
- Le jubilé du Groupe Français d'Études & d'Applications des Polymères (nov.-déc.-janv. 2020-2021) : 32 €
- Pigments et colorants (oct.-nov. 2019) : 32 €
- La montée en puissance de la RPE (sept. 2019) : 20 €
- Les applications actuelles de la calorimétrie (juin 2019) : 20 €
- Quelles réponses aux menaces chimiques, biologiques et radiobiologiques ? (mai 2019) : 20 €
- Les startups de la chimie (mars-avril 2019) : 32 €
- La chimie supramoléculaire (juin-juil.-août 2018) : 32 €
- Chimie et développement durable (mars-avril 2018) : 32 €
- Polymères de demain, boosters d'innovations (oct.-nov. 2017) : 32 €



Collection « Chimie et... », co-éditée et diffusée par EDP Sciences

Dernières parutions :

- Chimie et Notre-Dame de Paris (août 2023) : 25 €
- Chimie et agriculture durable (nov. 2022) : 25 €
- Chimie et énergies nouvelles (mars 2022) : 25 €
- Chimie et lumière (janv. 2021) : 25 €
- Chimie et nouvelles thérapies (sept. 2020) : 25 €
- Chimie et Alexandrie dans l'Antiquité (janv. 2020) : 25 €
- Chimie, nanomatériaux, nanotechnologies (sept. 2019) : 25 €
- Chimie et biologie de synthèse - Les applications (janv. 2019) : 25 €
- Chimie, aéronautique et espace (sept. 2018) : 25 €
- La chimie et les sens (janv. 2018) : 25 €
- La chimie et les grandes villes (sept. 2017) : 25 €
- Chimie, dermo-cosmétique et beauté (janv. 2017) : 25 €
- Chimie et changement climatique (sept. 2016) : 25 €



À commander
chez votre libraire
ou directement sur
laboutique.edpsciences.fr



Bon de commande

Nom Prénom

Adresse (pour les particuliers, préciser l'adresse personnelle)

Code postal Ville Pays

Tél Courriel

Adresse IP (pour l'abonnement multiple).....

Montant total de la commande (frais de port inclus) :

Mode de règlement

- sur facturation (joindre obligatoirement le bon de commande)
- par chèque bancaire ou postal libellé à l'ordre de la SCF souhaite recevoir une facture acquittée
- par virement bancaire ou postal
France Société Générale Paris Seine Amont, 03081/00037265820/87 CCP Paris 30041 Compte 070786U020/90
Étranger IBAN FR7630003030810003726582087 Swift.Sogefrpp
- par carte bancaire (Visa, Eurocard Mastercard) Validité /
Cryptogramme visuel (les trois derniers chiffres du numéro imprimé au dos)

L'Actualité Chimique

SCF, Service Abonnement, 250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris - Tél. : 01 40 46 71 66/60.

abonnement@lactualitechimique.org - www.lactualitechimique.org

JIREC 2024

Journées de l'innovation et de la recherche pour l'enseignement de la chimie

Enseigner et innover en Chimie à l'heure du numérique

23-26
janvier
2024

Dourdan, Essonne

- // Ateliers
- // Conférences
- // Table ronde



Informations
et inscriptions
jirec.org