

Mensuel
numéro

11-12

Nov-Déc 2003

l'actualité chimique



Mme Gaudet - Nev 83



La chimie
dans
les sciences médicales
N° spécial en collaboration avec l'Inserm

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

sfc
société
française
de chimie

Édité par la Société Française de Chimie - ISSN 0151 9093

RÉDACTION

Rédacteur en chef : Bernard Sillion
Rédactrice en chef adjointe : Séverine Bléneau-Serdel
Secrétaire de rédaction, maquettiste, webmaster : Évelyne Girard
Secrétaire de rédaction, activités de la SFC, manifestations : Roselyne Messal
Chargés de rubrique : Marika Blondel-Mégrelis (Histoire de la chimie), Yves Dubosc (Livres et médias, Manifestations), Véronique Nardello-Rataj (Comment ça marche ?), Gilbert Schorsch (Industrie), Pierre Vermeulin (Chimie francophone)
Comité de rédaction : P. Aldebert (CNRS), P. Arpino (div. Chim. anal.), A. Audibert-Hayet (IFP), B. Badet (ICSN), X. Bataille (Histoire des sciences), M. Blanchard-Desce (div. Chim. org.), M. Blondel-Mégrelis (club Histoire), E. Bordes-Richard (div. Cat.), J. Buendia (SCI), M. Carrega (div. Matér. polym.), G. Chambaud (div. Éducation), N. Cheymol (CPGE), J.-C. Daniel (groupe Formulation, SFP), R.-E. Eastes (ENS), E. Florentin (ENS), J.-P. Foulon (UDP), J. Fournier (club Histoire), Y.-A. Gauduel (div. Chim. phys.), G. Gros (chimie des procédés), J.-F. Lambert (div. Cat.), V. Nardello-Rataj (groupe Formulation), P. Pichat (ADE), A. Picot (Prévention des risques chimiques), P. Rigby (exp. scient.), D. Rutledge (div. Chim. anal.), G. Schorsch (SFC), F. Secherresse (div. Chim. coord.), H. This (INRA-Collège de France), M. Verdaguer (IFPMC), P. Vermeulin (CNRS), C. Viel, D. Vivien (div. Chim. solide)

Publication analysée ou indexée par :
Chemical Abstracts, la base de données PASCAL

ÉDITION

Société Française de Chimie
250, rue Saint-Jacques, 75005 Paris
Tél. : 01 40 46 71 64 - Fax : 01 40 46 71 61
E-mail : ac@sfc.fr - http://www.sfc.fr
Directeur de la publication : Armand Lattes,
président de la Société Française de Chimie
Imprimerie : SPEI, BP 26, 54425 Pulnoy
Maquettage articles : e-Press, Casablanca
Technopark, Route de Nouaceur, Angle RS 114 et
CT 1029, Casablanca (Maroc)
ISSN 0151 9093

PUBLICITÉ

EDIF, Le Clemenceau, 102 avenue Georges
Clemenceau, 94700 Maisons-Alfort
Tél. : 01 43 53 64 00 - Fax : 01 43 53 48 00
edif@wanadoo.fr
Index des annonceurs : p. 2

© SFC 2003 - Tous droits réservés
Dépôt légal : novembre-décembre 2003

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 un but d'exemple et d'illustration.

TARIFS 2003 - L'ACTUALITÉ CHIMIQUE

(11 numéros par an)
Particuliers : France 85 € - Étranger 90 €
Institutions : France 183 € - Étranger 195 €
Membres de la SFC :
abonnement inclus dans la cotisation
Abonnement : SFC, Nadine Colliot
250, rue Saint-Jacques, 75005 Paris
Tél. : 01 40 46 71 66 - Fax : 01 40 46 71 61
adhesion@sfc.fr
Prix de vente au numéro : 18 € (port inclus)



Passage de relais

S'il existe un domaine pour lequel l'importance de la chimie est reconnue, même pour ses détracteurs les plus sévères, c'est bien celui des sciences médicales. Dès le début des débats sur les médicaments génériques, les médias nous parlaient des **molécules actives**, et si l'on entend quelques propos malveillants sur l'industrie qui les fabrique et sur les profits que cela génère, personne ne remet en cause la nécessité d'une recherche pour des molécules nouvelles et des vecteurs plus performants.

Moins connu des non spécialistes est l'apport de la chimie au diagnostic et son rôle dans les mécanismes biologiques.

La proposition de Y.-A. Gauduel qui, rappelons-le, avait coordonné un numéro sur la femtochimie en février 2001, après l'attribution du prix Nobel à Ahmed Zewail, a immédiatement séduit le Comité de rédaction. Ce numéro, réalisé dans un temps relativement court pour un ensemble de cette importance, sera je n'en doute pas un numéro de référence auquel on fera appel pendant longtemps.

Je remercie Y.-A. Gauduel, et c'est avec plaisir et une absolue confiance que je lui transmets à partir de décembre le poste de rédacteur en chef de la revue.

Bernard Sillion
Rédacteur en chef

Couverture : illustrations de Marine Couderc ©



LE PARTENAIRE DE VOTRE PROJET

PLANTES & INDUSTRIE offre ses compétences dans le cadre de projets de co-développement ou de production, menés en partenariat.

UN SERVICE SUR MESURE

Plantes & Industrie élabore des projets en étroite collaboration avec ses partenaires, des 1^{ères} étapes de développement (lots cliniques Phase I à III) jusqu'à la fabrication de lots commerciaux.



LA GARANTIE DE VOTRE RÉUSSITE

Approuvée FDA, certifiée ISO 14001, Plantes & Industrie met à votre disposition un équipement industriel performant et son savoir-faire en développement pharmaceutique (qualité, dossiers réglementaires...) :



Réacteurs de 250 à 12 000L, extracteurs continus et discontinus, sécheurs micro-ondes, colonnes HPLC industrielles...

NOS SPÉCIALITÉS

- SYNTHÈSE DE PRINCIPES ACTIFS CYTOTOXIQUES ou difficiles à manipuler.
- HEMISYNTHESE à partir de matières premières complexes extraites du milieu naturel (plantes, organismes marins...)
- FLUORATION en milieu superacide avec HF (gaz).
- PURIFICATION sur colonne HPLC industrielle.



Un projet, Contactez-nous



Plantes & Industrie

16, rue Jean Rostand – 81600 GAILLAC
Tel: +33(0)563.81.24.00 Fax: +33(0)563.57.32.07
Fabrice LE BORGNE - Directeur Commercial
fabrice.leborgne@pierre-fabre.com

www.pierre-fabre-medicament.com



Pierre Fabre
Médicament

Sommaire

| | |
|-----------------------------------|---|
| Éditorial | 1 |
| Passage de relais, par B. Sillion | 1 |

La chimie dans les sciences médicales en collaboration avec l'Inserm

p. 5-156



Dans le numéro de janvier :

Un complément à ce numéro spécial paraîtra le mois prochain sous forme d'un article de J. Fournier intitulé « Quelques rencontres historiques entre la chimie et les sciences de la santé ».

D'autre part, pour des raisons techniques, la parution de l'index 2003 est reportée à janvier 2004.

Index des annonceurs

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| Aventis Pharma | p. 78, III ^e de couv. |
| BioMérieux | p. 8-9 |
| CNAM-IHIE | p. 155 |
| DSM Research | p. 4 |
| EDIF | p. 63 |
| Essilor | p. 48, IV ^e de couv. |
| Flamel Technologies | p. 47 |
| Glindemann | p. 77, 116-117 |
| ISOICHEM Groupe SNPE | p. 4 |
| Laboratoires Fournier | p. 84 |
| Maison de la Chimie | II ^e de couv. |
| Pierre Fabre Médicament | p. 2 |
| Polymer Laboratories | p. 38 |

La chimie dans les sciences médicales

| | |
|---|------------|
| Présentation | 5 |
| De la molécule au lit du malade..., par Y.-A. Gauduel | 5 |
| Introduction | 7 |
| La chimie est partout !, par P. Potier | 7 |
| Molécules et matériaux d'intérêt médical | 10 |
| La synthèse asymétrique de composés biologiquement actifs, par H. Kagan | 10 |
| Des enzymes aux nouveaux biocatalyseurs : vers le développement de nouvelles approches thérapeutiques, par A. Friboulet | 15 |
| La chimie pour adapter les dispositifs thérapeutiques polymères à l'organisme humain, par M. Vert | 20 |
| La vectorisation de pièges à radicaux libres : nouvelle stratégie thérapeutique, par G. Durand, A. Polidori et B. Pucci | 26 |
| Multicouches de polyélectrolytes dans le domaine des biotechnologies, par J.-C. Voegel, G. Decher et P. Schaaf | 30 |
| Ingénierie et électrochimie moléculaires pour la conception de puces à ADN, par G. Bidan, M. Billion, T. Livache, P. Mailley et A. Roget | 39 |
| Imagerie, analyse et diagnostic | 49 |
| La chimie au service de l'imagerie médicale, par J.-P. Meunier, G. Schorsch et R. Zimmermann | 49 |
| Application de la chimie de coordination du technétium 99 dans le domaine de la biologie et de la médecine, par H. Belhadj-Tahar et M.-H. Darbieu | 57 |
| Chimie physique des solutions : solutions moléculaires pour des problèmes biomédicaux, par M.F. Costa Gomes et A.A.H. Pádua | 64 |
| La photonique pour l'étude du milieu biologique : de la réactivité au diagnostic, par S. Lévêque-Fort, K. Steenkeste, P. Lacroix, F. Tfibel et M.-P. Fontaine-Aupart | 70 |
| Les polymères de synthèse, supports du diagnostic médical, par T. Delair, A. Elaissari, A. Perrin et B. Mandrand | 79 |
| Mécanismes biochimiques | 85 |
| Le rôle de la chimie dans l'élucidation de mécanismes biologiques et le développement des médicaments : l'exemple des métallopeptidases à zinc, par B.P. Roques | 85 |
| Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?, par M. Gardès-Albert, D. Bonnefont-Rousselot, Z. Abedinzadeh et D. Jore | 91 |
| Dégradation de l'ADN par les rayonnements ionisants. Influence de la structure et de l'environnement, par M. Spothem-Maurizot, M. Begusova et M. Charlier | 97 |
| Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux, par B. Friguet | 103 |
| Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, par A. Favier | 108 |
| Cibles thérapeutiques et médicaments | 118 |
| Lutte contre le cancer : un arsenal thérapeutique progressivement renouvelé, par C. Bailly | 118 |
| Une santé de fer. Pathologies humaines et thérapeutiques chélatrices : quel rôle pour les chimistes ?, par J.-L. Pierre et G. Lescoat | 123 |
| Récents développements de la pharmacologie anti-VIH, par J.-F. Mouscadet et E. Deprez | 128 |
| Nanotechnologies et nouveaux médicaments, par K. Andrieux, D. Desmaële, J. D'Angéolo et P. Couvreur | 135 |
| Les associations chimio-radiothérapeutiques, par V. Favaudon et C. Hennequin | 140 |
| Chimie et santé publique | 145 |
| Les éthers de glycol : une toxicité variable selon les composés, par J. Etienne | 145 |
| Nouvelles cibles moléculaires dans les traitements des cancers, par F. Calvo et H. Bruzzoni-Giovanelli | 150 |
| Conclusion | 156 |
| La chimie au service du patient, par C. Bréchet | 156 |

De la molécule au lit du malade...

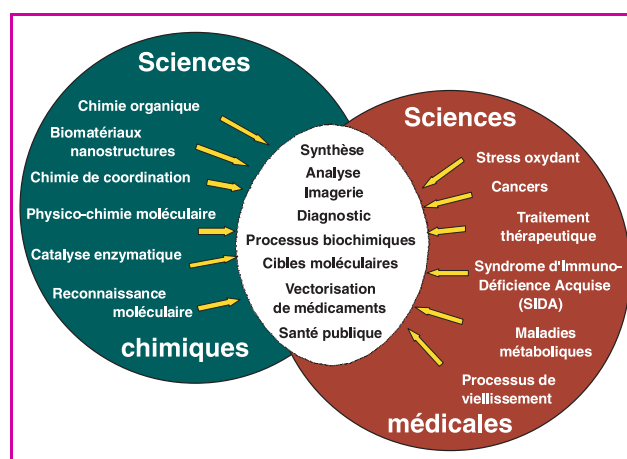
De la molécule au lit du malade, la chimie est omniprésente. Est-il besoin de rappeler que, depuis des temps très reculés, l'utilisation des plantes médicinales témoigne de la place essentielle prise par des substances chimiques d'origine naturelle pour le traitement de certains maux ou pathologies ? Les avancées, souvent spectaculaires, des recherches en chimie ne sont pas sans incidence sur les progrès observés dans le diagnostic ou le traitement médical de nombreuses maladies. Cela peut paraître une évidence, mais en dehors de la pharmacologie, les retombées des sciences chimiques dans le monde médical ne sont pas toujours clairement perçues. Pourtant, depuis la découverte de l'acide lactique, de la chiralité ou du virus de la rage, en passant par les travaux de Claude Bernard sur les mécanismes chimiques de la digestion, les frontières entre la chimie et les sciences biomédicales se sont progressivement estompées. De nombreuses aventures communes sont partagées. L'histoire des sciences au XVIII^e siècle nous rappelle que la chimie et la médecine s'interrogeaient déjà sur l'importance de la qualité des eaux pour la santé ou sur l'intérêt de contrôler la propreté dans les hôpitaux. Au XXI^e siècle, les maladies nosocomiales font encore partie de l'actualité !

Parler à des chimistes de problématiques médicales passionnantes et complexes n'est pas chose facile. C'est pourtant le défi que nous avons tenté de relever. A l'aube du troisième millénaire, ce numéro thématique de *L'Actualité Chimique*, **La chimie dans les sciences médicales**, a pour ambition d'être le témoin de nouvelles aventures. Sa publication, en 2003, est un hommage à certaines dates anniversaires qui appartiennent au patrimoine commun des sciences chimiques et biomédicales : le cinquantenaire de la découverte de la structure de la double hélice de l'ADN par Crick, Watson et Wilkins, la fabrication en laboratoire, toujours en 1953, de la première « soupe » de la vie par le jeune chimiste S. Miller ou plus récemment, en 1983, l'identification du virus du sida par l'équipe du professeur Luc Montagnier à l'Institut Pasteur.

En tant que coordonnateur, mettre en lumière la place de la chimie dans la résolution de problématiques relevant des sciences médicales est sans nul doute la motivation principale qui m'a guidé pour la conception de ce numéro. Donner un éclairage sur la chimie qui guérit, pour oublier un instant la chimie qui pollue ou qui fait perdre des vies humaines, voilà un moyen de montrer l'impact de cette discipline sous l'un de ses meilleurs angles.

L'un des objectifs est de faire ressortir les synergies entre diverses spécialités de la chimie (synthèse organique, chimie de coordination, catalyse et enzymologie, réactivité, chimie des polymères, modélisations numériques, chimie thérapeutique...) et les sciences médicales (immunologie, cardiologie, cancérologie, vieillissement, imagerie médicale, radiothérapie, santé publique). Ce numéro n'est pas exhaustif car des choix ont été nécessaires. Ils ont été guidés par l'existence

de programmes interdisciplinaires qui permettent des développements innovants aux interfaces des sciences chimiques et médicales, notamment pour dégager de nouvelles voies de traitements efficaces et sélectifs. L'une des principales caractéristiques du numéro réside dans une approche transdisciplinaire des sujets abordés (voir figure).



Transdisciplinarité des thèmes développés.

Les cinq grands thèmes (*Molécules et matériaux d'intérêt médical ; Imagerie, analyse et diagnostic ; Mécanismes biochimiques ; Cibles thérapeutiques et médicaments ; Chimie et santé publique*) ont été organisés de manière à assurer une compréhension cohérente de toutes les contributions. Les articles ont pour fil conducteur l'analyse des mécanismes et processus d'interaction impliqués dans la synthèse de nouvelles molécules ou biomatériaux à propriétés thérapeutiques, l'identification de structures pour l'imagerie ou l'analyse, la caractérisation de processus biochimiques anormaux ou bénéfiques pour la santé. Toutes ces connaissances apportées par les sciences chimiques ouvrent de nouvelles perspectives pour agir de manière sélective sur des cibles moléculaires ou cellulaires et faire émerger des méthodes thérapeutiques innovantes. Le jargon des sciences biomédicales n'est pas obligatoirement celui des chimistes, et réciproquement. C'est pourquoi chaque contribution est enrichie d'un glossaire.

Les aspects biomédicaux traités dans ce numéro peuvent nous interpeller à un moment donné de notre existence. Comment ne pas s'interroger sur le rôle de la chimie dans le traitement des cancers lorsqu'en France, 150 000 décès sont encore annuellement causés par cette maladie et que 11 millions de nouveaux cas sont dépistés à travers le monde ? Une interrogation sur la place de la chimie dans les protocoles de traitement du sida n'est-elle pas intéressante lorsque 34 millions d'individus sont porteurs du virus VIH au niveau planétaire ? De manière plus individuelle, nous sommes tous confrontés aux désagréments engendrés par

le vieillissement de nos cellules et de notre corps. Alors que le nombre de personnes dépassant 80 ans est sans cesse croissant, les pathologies associées au grand âge, la maladie d'Alzheimer en est un exemple frappant avec 800 000 cas en France, représentent autant de défis pour les chimistes du cerveau ou les spécialistes des neurosciences que pour la société toute entière. Retarder les effets du vieillissement fait souvent partie d'un rêve collectif. Nos connaissances actuelles en chimie et en sciences du vivant sont-elles suffisantes pour le réaliser ? Enfin, comment ne pas s'interroger sur l'utilisation journalière de produits ménagers dont certains, par les solvants toxiques qu'ils contiennent, posent un réel problème de santé publique ?

La chimie dans les sciences médicales complète une série de numéros thématiques déjà publiés par *L'Actualité Chimique* et dont certains articles auraient pu trouver leur place dans celui-ci [1-4]. Pour la première fois, un numéro spécial fait appel à un large spectre d'auteurs exerçant leur activité professionnelle dans des laboratoires de recherche du CNRS, du CEA, de l'Inserm, au sein de l'industrie pharmaceutique, dans le milieu hospitalo-universitaire ou au lit du malade ! La synergie des compétences entre scientifiques et médecins s'est avérée très fructueuse pour mener à bien cet ouvrage collectif. Elle est également l'expression d'un désir de rapprochement de communautés qui partagent souvent des objectifs communs et nobles, notamment celui d'améliorer la santé.

Afin d'assurer l'attrait de la publication auprès d'un lectorat élargi, la dimension didactique des contributions a été un critère essentiel pendant la phase de relecture et de mise en forme finale des manuscrits. Chaque auteur doit donc être remercié pour avoir accepté notre invitation et s'être mobilisé avec énergie, efficacité et talent.

Monsieur Christian Bréchet, directeur général de l'Inserm, nous a fait l'honneur de conclure ce numéro. Au nom des membres du Comité de rédaction de *L'Actualité Chimique*, je lui témoigne ma gratitude.

Que la Société Française de Chimie et tous les membres de la rédaction de *L'Actualité Chimique*, et plus particulièrement son rédacteur en chef, trouvent ici l'expression de mes remerciements cordiaux. Dès le début, Bernard Sillion a cru au bien fondé de ce projet auquel il a apporté un appui sans faille. Souhaitons que cette publication donne aux lecteurs confirmés comme aux étudiants le goût de la communication scientifique à travers le prisme de la transdisciplinarité.

Certains aspects des thèmes abordés dans ce numéro spécial sont de très haute actualité puisque les prix Nobel

2003 de chimie et de médecine récompensent des travaux fondamentaux dont les applications médicales sont essentielles. Le prix Nobel de chimie honore le biochimiste Peter Agre et le neurobiologiste moléculaire Roderick MacKinnon pour leurs découvertes sur le transport de l'eau par des protéines spécifiques appelées aquaporines et les déplacements sélectifs d'ions à travers des canaux de membranes cellulaires. Les anomalies de ces transports sont à l'origine de nombreux dysfonctionnements du cerveau (épilepsie), des reins, des muscles, du cœur et interviennent dans la douleur. Le prix Nobel de médecine 2003 est attribué à Sir Peter Mansfield et Paul C. Lauterbur pour leur travaux sur le diagnostic de maladies ou l'analyse de tumeurs à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Avant de vous souhaiter une agréable lecture, je conclus cette présentation par une phrase empruntée à un très grand chimiste, qui a également tant fait pour la médecine moderne, Louis Pasteur : « *Prenez intérêt, je vous en conjure, à ces demeures sacrées que l'on désigne du nom expressif de laboratoire. Demandez qu'on les multiplie, qu'on les orne. Ce sont les temples de l'avenir, de la richesse et du bien être. C'est là que l'humanité grandit, se fortifie et devient meilleure* ».

Yann-Antoine Gauduel
Coordonnateur

Références

- [1] Quoi de neuf en catalyse ?, *L'Act. Chim.*, **2002**, 5-6.
- [2] La catalyse enzymatique, *L'Act. Chim.*, **2002**, 8-9.
- [3] Quoi de neuf en synthèse organique ?, *L'Act. Chim.*, **2003**, 4-5.
- [4] Biomimétisme et biomatériaux, *L'Act. Chim.*, **2003**, 7 et 10.



Yann-Antoine Gauduel

est directeur de recherche à l'Inserm, responsable du Groupe de femtochimie bioradicalaire au Laboratoire d'optique appliquée*.

* Laboratoire d'optique appliquée, CNRS UMR 7639, École Polytechnique-ENS Techniques Avancées, 91761 Palaiseau Cedex.

Tél. : 01 69 31 97 26. Fax : 01 69 31 99 96.
Courriel : gauduel@ensta.ensta.fr

La chimie est partout !

Pierre Potier

Le grand chimiste allemand, Justus Liebig, dont on célèbre cette année le bicentenaire de la naissance, disait « *Alles ist Chemie* ». Oui, tout est chimie. On oppose souvent chimie et biologie : c'est une faute profonde de compréhension. Le Créateur dont on fait souvent un « grand horloger » pourrait plutôt être comparé à un « grand chimiste » ! En effet, pour avoir une horloge, il faut d'abord faire un peu de métallurgie, préparer de l'huile, etc. J'ai l'habitude de dire que « *La chimie est à la biologie ce que le solfège est à la musique* ». Il n'y a, à ma connaissance, aucune exception à cette règle. Simplement parce que l'évolution à partir d'une chimie élémentaire de la création du Monde a distingué très tôt ce qui était utile à la constitution de la biologie de ce qui ne l'était pas : espèces di- ou triatomiques simples (O_2 , N_2 , NO, CO, CO_2 , etc.), puis les acides aminés simples, puis plus complexes, aromatiques, les sucres, les lipides, etc. Tout ce qui, au cours de quelques milliards d'années, s'est élaboré par une sélection qui... continue. Tout cela représente ce que j'ai appelé « le magasin du Bon Dieu » dont l'inventaire donne lieu, continuellement, à des découvertes de tous ordres, et notamment dans les domaines biologique et thérapeutique ; ces deux domaines sont, évidemment, liés.

Le grand physiologiste français, Claude Bernard, disait : « *Les médicaments sont les scalpels de la biologie* ». En effet, la découverte d'un nouveau médicament, d'origine naturelle ou de synthèse, amène à étudier son mode d'action, souvent complètement inattendu. Ce faisant, on découvre souvent des pans entiers d'une nouvelle biologie. Un exemple relativement récent est celui de la découverte fortuite de la cyclosporine, substance immunomodulatrice qui a révolutionné l'immunologie, les pronostics des greffes d'organes et le traitement de certaines maladies auto-immunes. L'étude du mode d'action de ce nouveau type de substance a conduit à découvrir de nouvelles voies de recherche en immunologie.

La découverte, il y a un peu plus d'une dizaine d'années, de l'oxyde nitrique, NO, dans les organismes vivants est l'un des plus beaux exemples récents d'un saut prodigieux dans le domaine de la connaissance. Cette simple molécule diatomique, de nature radicalaire, est fabriquée dans nos organismes à partir de la L-arginine. Or, elle a forcément

existé dans les atmosphères de la chimie primitive du début de l'Histoire. Le rôle du NO dans les processus biochimiques et biologiques est encore très loin d'être compris ou, simplement compris. C'est lui qui explique les propriétés vasodilatatrices de la trinitroglycérine, découvertes elles-aussi par hasard, chez les ouvriers et ouvrières qui fabriquaient cet explosif qui, mélangé à du sable (ou des diatomées), devenait de la dynamite due à Nobel. Il y a bien NO dans Nobel ! Souffrant de désordres cardiaques, Alfred Nobel fut bien soigné avec une solution alcoolique de trinitroglycérine !

Le venin d'un serpent venimeux d'Amérique du Sud, connu pour provoquer des hypotensions après morsure, a conduit aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine largement utilisés dans le traitement de l'hypertension.

On pourrait écrire d'innombrables pages sur ce type de découvertes. Le débat est ouvert depuis longtemps au sujet des acides nucléiques (on célèbre cette année le 50^e anniversaire de la double hélice de l'ADN !); lequel fut le premier : l'ADN ou l'ARN ? Ce débat peut être réglé par une très simple réflexion chimique : c'est l'ARN, car le desoxy-2 ribose (de l'ADN) n'est pas un métabolite direct du ribose ; la réduction de l'hydroxyle en C2 du ribose se fait au stade d'un ribo-nucléotide par la ribonucléotide-réductase (le système enzymatique sans doute le plus répandu sur Terre !).

Personne ne peut plus contester que la chimie est bien partout. Son enseignement mériterait d'être revu en fonction de son rôle éminent de science de transfert. Pour découvrir tout ce qui reste à découvrir dans le « magasin du Bon Dieu ». Mais ceci est une autre histoire !



Pierre Potier

est membre de l'Académie des sciences et directeur émérite de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles*.

* ICSN, CNRS, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex.

La synthèse asymétrique de composés biologiquement actifs

Henri Kagan

Abstract

Asymmetric synthesis of biologically active compounds

The importance of enantiomerically pure compounds is recalled as well as the principle of asymmetric synthesis. Three main types of asymmetric synthesis are possible, using a chiral auxiliary as the controller of the stereochemistry. Some examples are given.

Mots-clés

Asymétrique, énantiosélective, catalyse, auxiliaire chiral, chiralité.

Key-words

Asymmetric, enantioselective, catalysis, chiral auxiliary, chirality.

Activité biologique et configuration absolue

De nombreux composés, simples ou complexes, ont la possibilité d'exister sous la forme de deux structures images l'une de l'autre, non superposables. Ce phénomène avait été découvert par Pasteur en 1848, grâce au dédoublement du tartrate double de sodium et d'ammonium. Les deux structures images sont dénommées **énantiomères**. Ce type particulier de stéréoisomérisation a une importance capitale en chimie ; il apparaît quand la molécule impliquée possède certaines caractéristiques structurales (voir encadré 1). Les activités biologiques de deux énantiomères peuvent être différentes (voir encadré 2). Le premier exemple reconnu semble être dû à Piutti qui, en 1894, avait remarqué que la (*L*)-asparagine, amide de l'acide aspartique (un acide aminé naturel) était insipide, tandis que la (*D*)-asparagine avait un goût sucré. Il est intéressant de rappeler que l'aspartame, un dipeptide formé entre l'acide aspartique et l'ester éthylique de la phénylalanine, est un excellent agent sucrant non

calorique. Toutefois, cette propriété utile ne caractérise que la molécule qui est formée à partir des deux composants sous la configuration (*L*). De multiples exemples sont maintenant connus où une activité biologique donnée est essentiellement liée à un seul des deux énantiomères. En 1970, un nouveau sédatif doux, la thalidomide (mélange racémique), avait été commercialisé en Allemagne sous le nom de Contergan. Ce médicament était surtout utilisé par les femmes enceintes. Après quelques années de commercialisation, de nombreuses malformations chez les nouveau-nés ont été attribuées à l'usage de la thalidomide. Une étude pharmacologique sur des animaux a montré que l'activité tératogène néfaste était essentiellement due à l'énantiomère (*D*). Des études plus récentes indiquent toutefois que la thalidomide se racémise aisément dans le sang, ce qui montre que même l'emploi thérapeutique de la (*L*)-thalidomide était voué à l'échec. D'une manière inattendue, la thalidomide est redevenue un objet d'étude pour les biologistes qui lui ont trouvé d'intéressantes propriétés antitumorales (elle est actuellement en phase II

Glossaire

Asymétrique

Absence de tout élément de symétrie (une structure asymétrique est chirale).

Auxiliaire chiral

Molécule chirale utilisée dans une synthèse asymétrique pour contrôler la formation d'une nouvelle unité chirale (habituellement un carbone asymétrique).

Chiralité

Du grec « keir », la main. Propriété géométrique qui caractérise un objet ayant une image dans un miroir qui ne lui est pas identique. Par exemple, la main droite et la main gauche ne sont pas équivalentes et sont images l'une de l'autre dans un miroir.

Configuration absolue

Information permettant de connaître la stéréochimie dans l'espace d'un énantiomère donné (voir nomenclature de la configuration absolue).

Dédoublement

En anglais : « resolution » : opération permettant d'isoler un énantiomère à partir d'un mélange racémique. Pasteur a donné les premiers exemples des divers types de dédoublement.

Diastéréoisomérisation

Toute stéréoisomérisation autre que l'énantiomérisation. Un cas fréquem-

ment rencontré : deux carbones asymétriques dans la même molécule engendrent les combinaisons possibles (*R, R*), (*S, S*), (*R, S*) et (*S, R*). Le composé (*R, R*) est diastéréoisomère des composés (*R, S*) ou (*S, R*), et il est énantiomère du composé (*S, S*).

Éléments de symétrie

Point, droite ou plan autour desquels on effectue une opération qui ramène le système en coïncidence avec lui-même. La chiralité est incompatible avec certains éléments de symétrie (voir encadré 1).

Énantiomères

Molécules chirales images l'une de l'autre.

Excès énantiomérique (ee)

$ee (\%) = \frac{[R - S]}{[R + S]} \times 100$. Il est nul pour le mélange racémique et de 100 % pour un énantiomère pur. Par exemple, 90 % ee signifie 95 % de l'énantiomère majoritaire et 5 % de l'énantiomère minoritaire.

Nomenclature de la configuration absolue

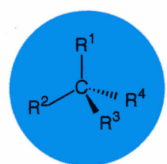
L/D (selon Fischer) ou *R/S* (selon Cahn, Ingold et Prelog). Des règles précises fixent l'emploi des descripteurs *D, L* ou *R, S*. Le système *R, S* est d'emploi très général.

Mélange racémique

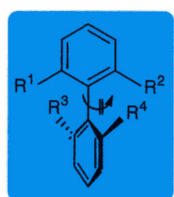
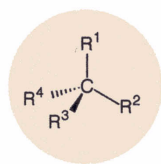
Mélange équimoléculaire des deux énantiomères.

Encadré 1

Exemples de structures énantiomères en chimie organique

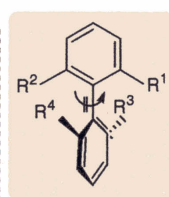


$R^1 \neq R^2 \neq R^3 \neq R^4$
("carbone asymétrique")



$R^1 \neq R^2$ et $R^3 \neq R^4$
("atropoisomérisation")

: rotation bloquée



Conventions pour la représentation
des liaisons :

▼ : en avant de la page

⋮ : en arrière de la page

| : dans le plan de la page

Conditions pour avoir une structure chirale :

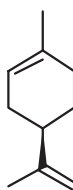
La chiralité moléculaire est incompatible avec la présence de certains éléments de symétrie, tels que :

- un plan de symétrie,
- un centre de symétrie,
- ou un axe impropre de symétrie (combinaison d'une rotation autour d'un axe et d'une symétrie par rapport à un plan perpendiculaire à cet axe).

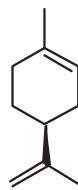
Les axes de symétrie (habituellement d'ordre 2 ou 3) sont compatibles avec la chiralité.

Encadré 2

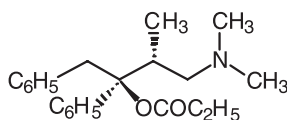
Activité biologique et configuration absolue : quelques exemples



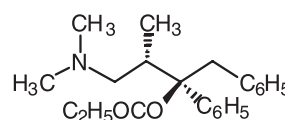
(*R*)-limonène
odeur d'orange



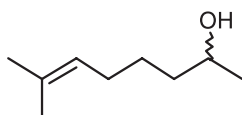
(*S*)-limonène
odeur de citron



(*R, R*)-propoxyphène
analgésique

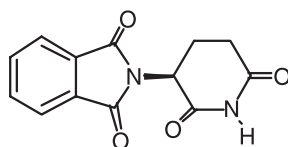


(*S, S*)-propoxyphène
anti-toux

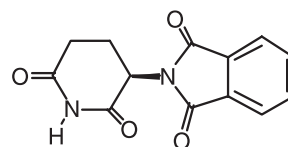


phéromone d'agrégation du
scarabée *ambrosia*

le mélange racémique est plus actif
que chacun des énantiomères



(*S*)-thalidomide
sédatif



(*R*)-thalidomide
tératogène

sous le nom de Thalimid[®]). Cette affaire a eu des répercussions profondes sur l'industrie pharmaceutique, en mettant l'accent sur la prudence nécessaire à la commercialisation d'un médicament racémique. Un cas fréquent est celui où un énantiomère est biologiquement actif, l'autre énantiomère ne possédant aucune activité et agissant comme un simple ballast. Il en est ainsi avec la (*L*)-dopa utilisée comme agent anti-parkinsonien à des doses journalières de l'ordre du gramme. Une situation plus rare est celle où la synergie entre les actions des deux énantiomères rend le médicament racémique plus efficace que le médicament énantiopur.

La législation distingue actuellement très clairement un énantiomère de son mélange racémique. La FDA (Food and

Drug Administration) n'impose pas l'usage systématique d'un énantiomère, mais exige une étude biologique poussée des deux énantiomères du mélange racémique. Cette contrainte incite la plupart des laboratoires pharmaceutiques à commercialiser les médicaments sous forme d'un énantiomère. Aujourd'hui, une autre tendance se fait jour : prolonger un médicament racémique efficace arrivant en fin de brevet par le « nouveau » médicament énantiopur, stratégie appelée « racemic switch » par les Anglo-saxons. Par exemple, l'omeprazole (Prilosec/Losec de chez Astra) est un anti-ulcéreux qui s'est longtemps placé dans le peloton de tête des ventes mondiales des médicaments. La société Astra-Zeneca a lancé en 2001 l'isomeprazole, qui est l'énantiomère possédant l'essentiel de l'activité biologique

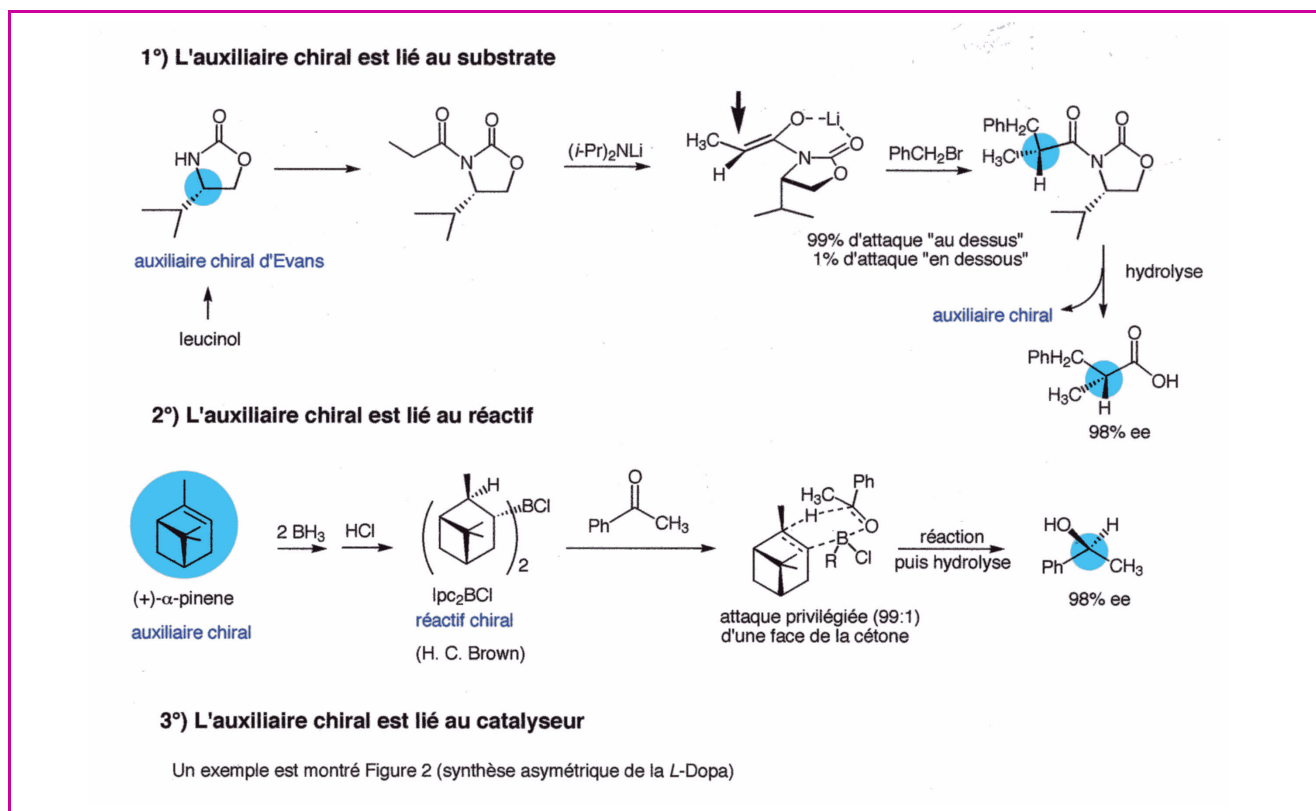


Figure 1 - Les principales classes de synthèses asymétriques.

de l'omeprazole racémique. Un médicament ténor arrivé en fin de protection de brevet sera donc sans doute relayé ou remplacé par un médicament quasi-identique.

La discussion précédente montre qu'il est essentiel de savoir préparer un médicament sous forme d'un seul énantiomère, de configuration bien définie. Diverses méthodes, présentées ci-après, sont à la disposition du chimiste pour résoudre ce problème.

Des méthodes analytiques ont aussi été mises au point pour caractériser la pureté chimique (> 99,9 %) du composé final et sa pureté énantiomérique. Cette dernière s'exprime habituellement soit par le rapport énantiomérique (L/D, si $L > D$), soit par l'excès énantiomérique (%) (voir *glossaire*). La législation impose actuellement un excès énantiomérique d'au moins 98 % pour tout médicament commercialisé comme un seul énantiomère. La chromatographie avec phase stationnaire chirale est la méthode la plus utilisée pour évaluer les excès énantiomériques.

La synthèse asymétrique

La synthèse asymétrique consiste à préparer un produit sous forme d'un énantiomère en partant d'une **matière première achirale**. Cette transformation nécessite l'aide d'un **auxiliaire chiral** qui est temporairement lié au substrat, à un réactif ou à un catalyseur [1]. Dans ce dernier cas, on parle de catalyse asymétrique, situation la plus avantageuse en ce qui concerne l'auxiliaire chiral qui, en principe, peut être utilisé en quantité minime pour engendrer une très grande quantité du produit désiré [2-3]. Dans cet article, on ne considérera pas les réactions enzymatiques qui font intervenir des biocatalyseurs. Les trois principaux types de synthèse asymétrique (diastéréosélective, énantiométrique

ou catalytique) sont illustrés *figure 1*. Les aspects fondamentaux de la synthèse asymétrique ont été récemment développés dans *L'Actualité Chimique* [4], le lecteur pourra s'y référer pour un certain nombre de détails, de même pour la catalyse asymétrique [5-6]. Nous nous contenterons ici de donner quelques principes de base. Par exemple, durant la formation d'un carbone asymétrique de configuration L, l'auxiliaire chiral joue un rôle équivalent à celui d'un contrôleur de travaux sur un chantier ou à celui d'un chef d'orchestre : les instructions « à droite » ou « à gauche » viennent de l'auxiliaire chiral.

Les **réactifs chiraux** transforment directement le substrat chiral en l'énantiomère désiré, l'auxiliaire chiral étant employé en quantité stœchiométrique par rapport au substrat. Il existe diverses classes de réactifs chiraux très efficaces qui sont d'usage courant au laboratoire. Par exemple, H.C. Brown (prix Nobel 1979) a développé une chimie du bore au départ de l' α -pinène (l'auxiliaire chiral), un terpène très bon marché et disponible dans la nature sous forme de l'un ou l'autre énantiomère. Nous citerons un représentant de la famille des réactifs de Brown, le chlorodiisopinocampénylborane (DipCl). Ce borane est capable de réduire énantiosélectivement de nombreuses cétones en alcools ayant des excès énantiomériques compris entre 95 et 99 %. La réaction fait intervenir un état de transition cyclique où les interactions stériques défavorisent l'une ou l'autre des deux attaques possibles de la double liaison prochirale. Les deux énantiomères de DipCl sont disponibles commercialement et sont couramment utilisés en synthèse asymétrique.

L'hydrogénation asymétrique de déhydroaminoacides conduit à des aminoacides ayant de très forts excès énantiométriques. La première synthèse asymétrique industrielle

a été la préparation de la (*L*)-dopa chez Monsanto en 1975 par W.S. Knowles (prix Nobel 2001) en utilisant un **catalyseur chiral** (figure 2). Celui-ci était un complexe de rhodium ayant une diphosphine chirale (dipamp) comme ligand chélatant. La dipamp est ici l'auxiliaire chiral qui permet de réaliser la synthèse énantiosélective catalytique de la (*L*)-dopa. Le catalyseur était employé en quantité infime (de l'ordre du ppm), rendant viable le procédé. La (*L*)-dopa préparée chez Monsanto était ensuite commercialisée par la société Hoffmann-La-Roche comme médicament anti-Parkinson. L'époxydation asymétrique d'alcools allyliques selon la méthode de Sharpless (prix Nobel 2001) donne accès à d'innombrables synthons chiraux qui sont ensuite utilisés pour construire des molécules complexes (voir [4] par exemple). L'auxiliaire chiral est un ester de l'acide tartrique qui fait partie d'un complexe de titane utilisé comme catalyseur. Les quelques exemples développés ci-dessus laissent entrevoir la grande variété d'auxiliaires chiraux disponibles pour le chimiste désirant effectuer des synthèses asymétriques du type diastéréosélective ou énantiosélective.

De nombreux livres ou revues font le point dans ce domaine qui suscite un très grand intérêt dans les laboratoires académiques ou industriels.

Synthèse asymétrique et préparation de composés biologiquement actifs

Les composés biologiquement actifs chiraux dont on désire faire la synthèse peuvent être des composés naturels simples ou de structures complexes. Ils peuvent aussi être des composés non naturels identifiés lors d'essais biologiques ou d'optimisation de l'activité thérapeutique. La synthèse asymétrique est très adaptée pour la préparation de molécules de structures simples telles que celles trouvées chez les α et β -aminoacides, les monoterpènes, les amines ou aminoalcools, etc. La synthèse asymétrique installera en général un ou deux centres asymétriques qui seront à leur tour des contrôleurs chiraux pour l'introduction de centres asymétriques supplémentaires. Par exemple, la synthèse industrielle asymétrique du (-)-menthol (figure 3)

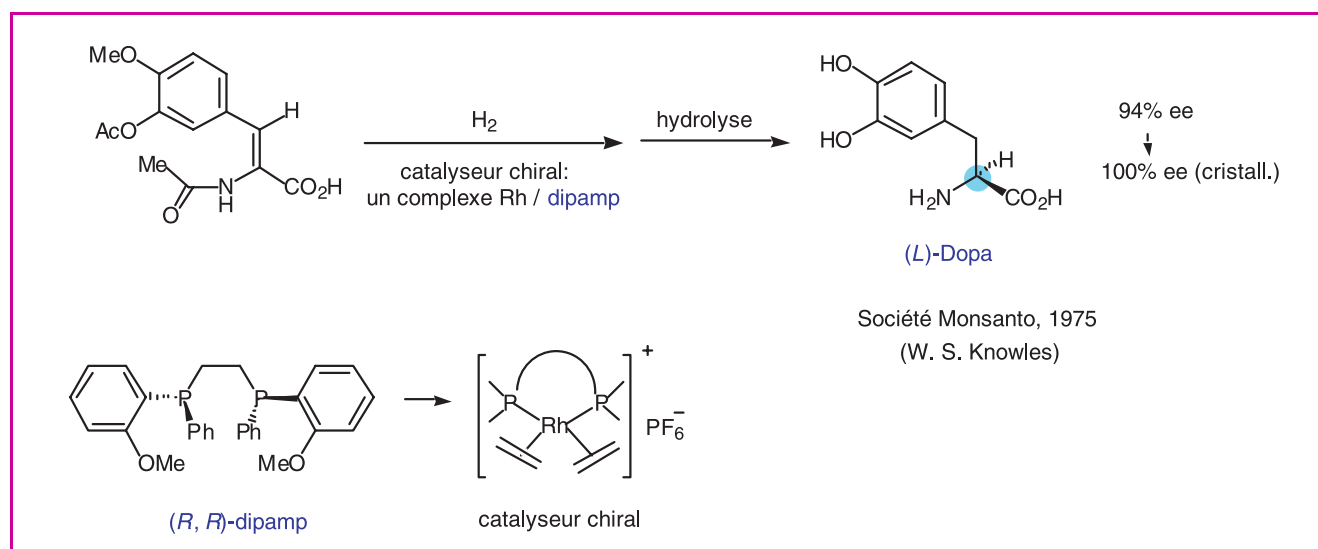


Figure 2 - Synthèse asymétrique industrielle de la (*L*)-dopa.

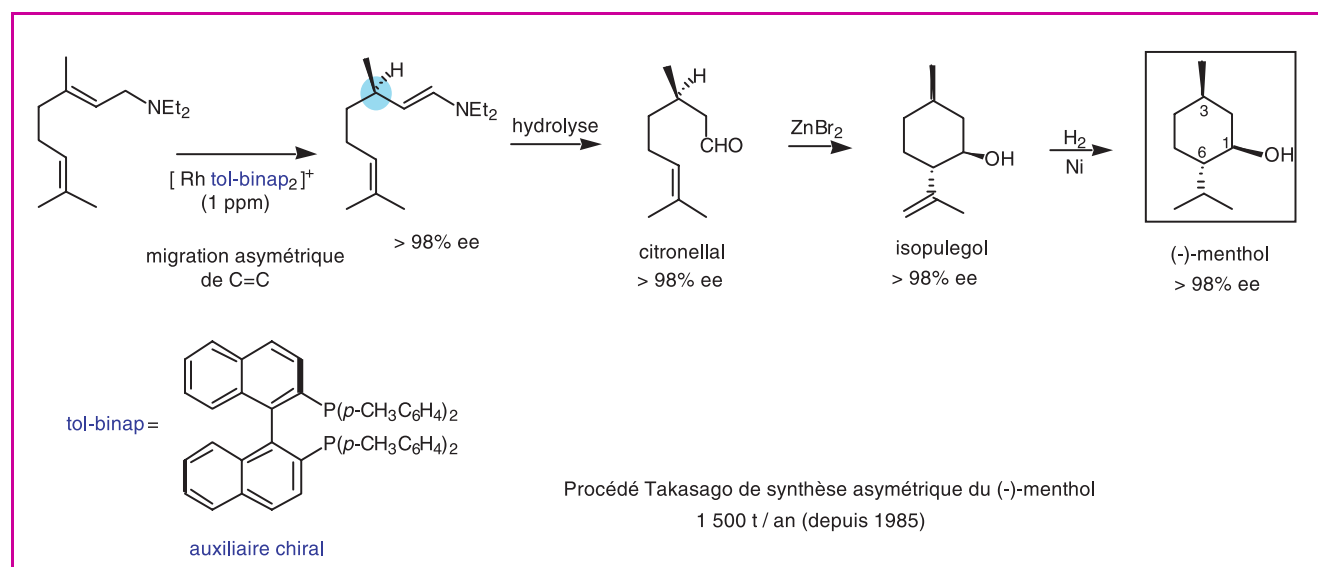


Figure 3 - Synthèse asymétrique industrielle du (-)-menthol.

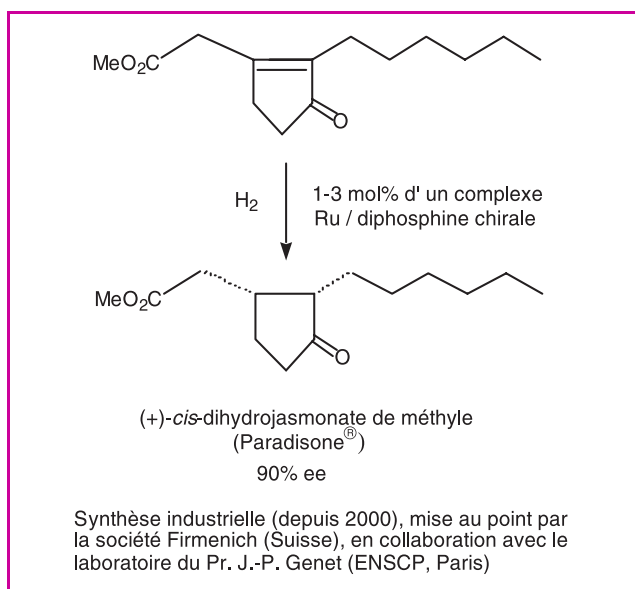


Figure 4 - Synthèse asymétrique industrielle d'un parfum.

consiste d'abord à créer le carbone asymétrique n° 3, lequel sera à l'origine de la configuration absolue des carbones asymétriques n° 1 et 6.

Les médicaments modernes sont majoritairement de masse moléculaire inférieure à 1 000, mais de structure complexe. Ils peuvent, en principe, être préparés par les voies de la synthèse organique. Celle-ci sera simplifiée si la structure finale est construite par la combinaison de fragments préparés indépendamment les uns des autres. Ces fragments, de taille réduite, sont souvent chiraux. Dans ce cas, la synthèse asymétrique est un outil de choix. Les parfums ou les composés agrochimiques sont aussi des cibles intéressantes pour la synthèse asymétrique, comme illustré par les synthèses industrielles du (-)-menthol (*vide supra*), de la Paradisone[®] (figure 4) ou d'un herbicide, le (S)-métolachlor (figure 5). Ce dernier composé (Dual Magnum[®]) est employé dans les cultures du maïs. Sa préparation représente actuellement la synthèse asymétrique industrielle la plus importante (en tonnage).

Conclusion

L'emploi des outils et des concepts de la synthèse asymétrique est d'usage courant pour la préparation des molécules chirales. Un auxiliaire chiral est toujours nécessaire, sa quantité peut être minimale dans le cas de la catalyse asymétrique dont l'importance a été reconnue par le comité Nobel en 2001. Des méthodes enzymatiques sont en compétition avec

les approches non enzymatiques développées dans cet article. Le dédoublement d'un racémique reste aussi très utilisé sur le plan industriel. L'ensemble des méthodes permettant d'accéder à des molécules chirales est souvent baptisé du nom de « chirotechnologie » et des livres sont régulièrement publiés sur ce thème [7]. Le marché des composés chiraux représente un enjeu économique important : le total des ventes des produits pharmaceutiques énantiopurs a été estimé à 150 milliards de dollars pour l'année 2002 [8]. La synthèse asymétrique (stœchiométrique ou catalytique) est de plus en plus utilisée sur le plan académique lors de l'élaboration de molécules complexes. Elle rend aussi de réels services dans l'industrie pharmaceutique pour la préparation rapide d'échantillons des deux énantiomères nécessaires aux premiers essais biologiques (quantités jusqu'à 100 g). Par contre, la synthèse asymétrique est encore relativement peu courante dans les procédés industriels, mais elle tend à se développer.

Références

- [1] Seyden-Penne J., *Synthèse et catalyse asymétriques, Auxiliaires et ligands chiraux*, CNRS Édition et EDP Sciences, Paris, 1994.
- [2] Kagan H.B., *Pour la Science*, 1992, 172, p. 42.
- [3] Noyori R., *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 1994.
- [4] Agbossou-Niedercom F., *L'Act. Chim.*, 2002, 5-6, p. 80.
- [5] Carpentier J.-F., Bulliard M., *L'Act. Chim.*, 2002, 5-6, p. 59.
- [6] Riant O., *L'Act. Chim.*, 2003, 4-5, p. 39.
- [7] Sheldon R.A., *Chirotechnology*, Marcel Dekker Inc., New York, 1993.
- [8] Rouhi A.M., Chiral business, *Chem. Eng. News*, 2003, 5 mai, p. 45.



Henri Kagan

est professeur émérite à l'Université Paris-Sud* et membre de l'Académie des sciences.

* Laboratoire de catalyse moléculaire (UMR 8075), Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex.
Courriel : kagan@icmo.u-psud.fr

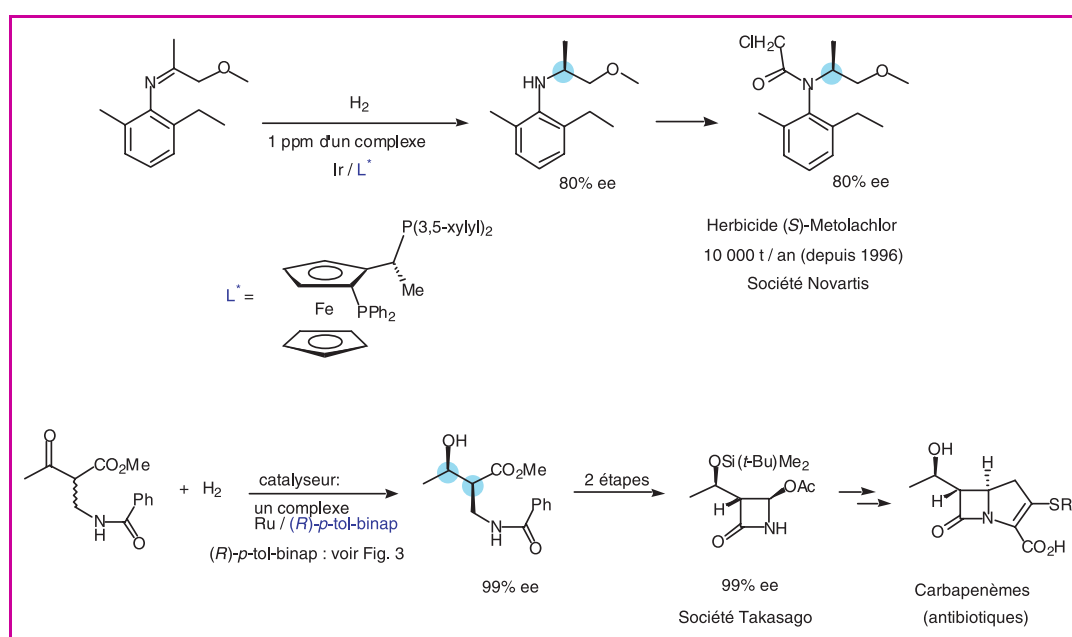


Figure 5 - Synthèse asymétrique industrielle d'un herbicide et d'un précurseur chiral d'antibiotiques.

Des enzymes aux nouveaux biocatalyseurs

Vers le développement de nouvelles approches thérapeutiques

Alain Friboulet

Abstract

From enzymes to new biocatalysts: towards new therapeutic strategies

The variety of uses of enzymes in medicine is potentially immense although, at present, the number of applications is relatively small. This can be mainly explained by the capacity of the body to develop defensive responses to foreign enzymes resulting in their inactivation or removal. In the two last decades, alternative approaches have been proposed to produce new biocatalysts mimicking enzyme activities. The results obtained with abzymes, ribozymes and molecular imprints are presented and discussed in this review.

Mots-clés

Enzyme, abzyme, ribozyme, empreinte moléculaire, biocatalyseur.

Key-words

Enzyme, abzyme, ribozyme, molecular imprinting, biocatalyst.

Les enzymes sont des protéines qui allient la capacité de reconnaître très spécifiquement des molécules au pouvoir de catalyser très efficacement leur transformation en des composés utiles au métabolisme des organismes vivants. Leur propriété de « turnover », c'est-à-dire la capacité pour une même molécule enzymatique de catalyser un nombre considérable de fois la même réaction, a fait des enzymes des outils de choix dans le secteur des biotechnologies, pour la synthèse de composés stéréospécifiques dans l'industrie pharmaceutique, pour les transformations de produits en agro-industrie ou dans le domaine analytique.

Cependant, malgré le potentiel que représentent ces biomolécules pour une utilisation en médecine, que ce soit pour la transformation d'un métabolite toxique pour l'organisme, pour la supplémentation dans les cas de déficiences enzymatiques d'origine génétique, pour l'hydrolyse ciblée de protéines virales ou pour l'activation *in situ* de composés ayant pour objet de tuer spécifiquement certaines cellules, le nombre d'utilisations thérapeutiques d'enzymes reste relativement restreint. Ce faible nombre d'applications des enzymes s'explique principalement par la capacité de l'organisme à se défendre contre toute intrusion de biomolécule étrangère. La réponse physiologique de l'organisme à l'administration d'une enzyme exogène est de produire des anticorps spécifiques contre elle pour la piéger et l'inactiver. Cette capacité à produire des anticorps contre une molécule donnée est ensuite acquise par l'organisme pour une très longue période ; c'est la base de l'immunité acquise. Un autre problème à l'utilisation thérapeutique d'enzymes réside dans le temps de demi-vie des enzymes injectées dans le sérum d'un patient, indépendamment de la réponse immunitaire, qui dépend notamment de l'état de glycosylation de la protéine.

Vers la conception de nouveaux biocatalyseurs à activités enzymatiques

L'idée de créer de nouveaux biocatalyseurs mimant les propriétés fonctionnelles des enzymes, mais échappant au

Glossaire

Anticorps monoclonaux

Anticorps produits par un « clone » de cellules, c'est-à-dire des cellules toutes issues de la même cellule-mère spécialisée du système immunitaire (lymphocyte B). Ces anticorps sont donc tous identiques.

Méthode de « bait and swich »

Méthode d'induction d'anticorps catalytiques qui ajoute à la complémentarité de l'état de transition une complémentarité de charge. Par exemple, en utilisant un antigène porteur d'une charge positive, le site de liaison de l'anticorps devra posséder un résidu acide aminé présentant une charge négative nette à pH physiologique (acide glutamique ou acide aspartique).

Réaction de Diels-Alder

Réaction très utilisée en synthèse organique industrielle qui permet de produire des hydrocarbures cycliques par addition d'un composé diénique sur une molécule diénophile.

Ribozyme

Molécule d'acide ribonucléique (ARN) capable d'activité catalytique sur elle-même (auto-excision) ou sur une autre molécule.

Synthèse de novo (de catalyseurs)

Pour les biochimistes, *de novo* signifie que la production des biocatalyseurs se fait en ne prenant pas comme base de départ une structure déjà connue naturellement pour effectuer un type de réaction, ou de façon plus générale en n'essayant pas de reproduire une solution d'arrangement catalytique sélectionné par la nature au cours de l'évolution.

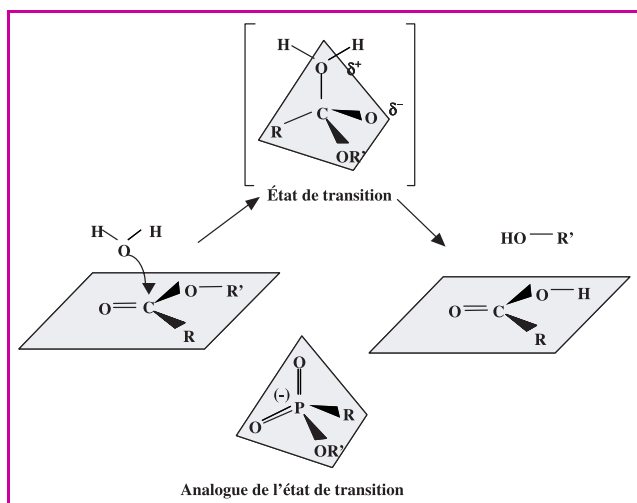


Figure 1 - Exemple de l'hydrolyse d'une liaison ester.

C'est une réaction de transfert d'un groupement acyle vers l'eau. La réaction fait intervenir le passage d'un carbone plan sp^2 à un carbone tétraédrique sp^3 . Pauling proposa que les enzymes à activité estérase accélèrent cette réaction par abaissement de la barrière énergétique, en reconnaissant plus spécifiquement la structure tétraédrique de l'état de transition. Jencks proposa de synthétiser des analogues stables de cet état de transition en remplaçant l'atome de carbone par un atome de phosphore.

moins partiellement aux contraintes liées à la structure et à l'origine de ces enzymes, a été proposée. En fait, les différentes démarches décrites dans cette revue reposent toutes sur les travaux pionniers de Linus Pauling [1]. Dans les années 40, Pauling proposa qu'une enzyme accélère une réaction chimique en abaissant la barrière énergétique par liaison préférentielle à l'état de transition plutôt qu'à la molécule de substrat dans son état énergétique de base (figure 1). Il suggéra à la même période l'idée totalement novatrice qu'un anticorps dirigé contre l'état de transition d'une réaction serait capable de catalyser la réaction correspondante. Ces états de transition ont par définition une durée de demi-vie extrêmement courte, rendant impossible la validation de cette hypothèse. Vingt ans plus tard, William Jencks proposa de mimer la structure des états de transition en synthétisant des analogues stables [2]. Par exemple, en remplaçant l'atome de carbone impliqué dans une liaison ester par un atome de phosphore, il devient possible d'obtenir un analogue stable, mimant la structure tétraédrique du carbone pendant l'état de transition de l'ouverture de la liaison ester, et présentant une répartition des charges électriques sur l'atome d'oxygène semblable à l'état de transition. Jencks proposa que tout composé possédant un site complémentaire de cet analogue de l'état de transition serait capable de catalyser la réaction d'hydrolyse de la liaison correspondante.

Cette hypothèse devait rester encore une vingtaine d'années une simple proposition intellectuelle, avant que les premiers résultats expérimentaux ne soient publiés.

Les abzymes ou anticorps catalytiques

La genèse d'abzyme (terme résultant de la contraction de antibody, ab, et enzyme) a pour objectif de faire exprimer au sein d'une même protéine les fonctions naturellement présentes sur deux entités protéiques distinctes, les anticorps et les enzymes. Les anticorps sont des protéines produites par le système immunitaire des mammifères en réponse à l'intrusion dans l'organisme de tout agent exogène

appelé antigène. La structure du site de fixation des anticorps produits contre un antigène évolue au court de la réponse immunitaire pour atteindre une très grande spécificité et une très grande affinité. Potentiellement, le système immunitaire d'un individu est capable de produire jusqu'à 10^{12} anticorps de spécificités différentes.

Le concept d'anticorps catalytiques est donc né de l'application des propositions de Pauling et de Jencks, mais aussi du développement des techniques pour la production d'anticorps monoclonaux. En effet, en réponse à l'injection d'un antigène, un individu produit un certain nombre d'anticorps spécifiques qui sont mélangés dans le sérum aux anticorps propres à l'individu. La technique de préparation d'anticorps monoclonaux proposée pour immortaliser et séparer les différents clones cellulaires produisant un seul type d'anticorps [3] a conduit à l'obtention de préparations pures d'anticorps, permettant ainsi leur caractérisation.

Les premières abzymes furent obtenues simultanément en 1986 par les équipes de R. Lerner et de P. Schultz [4-5] en immunisant des souris avec des analogues d'états de transition. Ces abzymes catalysaient l'hydrolyse de liaisons chimiques simples, esters et carbonates. Si ces premiers anticorps catalytiques présentaient une accélération de la vitesse de réaction extrêmement faible par rapport à celles obtenues avec des enzymes, ils se comportaient néanmoins comme de vraies enzymes, par rapport à leur spécificité, leur stéréospécificité, leurs cinétiques de saturation ou leur inhibition compétitive par l'analogue de l'état de transition. Depuis ces travaux, plus de 100 réactions d'hydrolyse, de synthèse ou d'isomérisation, catalysées par des anticorps ont été décrites, en utilisant simplement des analogues de l'état de transition ou en développant des méthodes plus sophistiquées [6]. Ainsi, la méthode de « bait and switch » utilise des analogues de l'état de transition porteurs de groupements ioniques permettant d'induire une charge complémentaire dans le site actif de l'anticorps. L'immunisation réactive utilise des analogues de l'état de transition réagissant avec des acides aminés dont la présence est nécessaire à une activité catalytique donnée, et l'approche du puits en tropique a pour but de créer un site actif dans lequel la flexibilité de la molécule à transformer est contrainte. L'ensemble de ces approches a abouti à l'obtention d'anticorps catalytiques très spécifiques dont l'activité est de plus en plus efficace.

Si l'approche initiale dans la genèse d'anticorps catalytiques avait essentiellement pour objet de produire des biocatalyseurs utilisables en synthèse organique, l'évolution dans ce domaine tend actuellement vers une approche plus biologique, avec le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Cette évolution est en partie liée à la découverte d'anticorps catalytiques naturels présents dans certaines pathologies et capables d'hydrolyser des peptides et protéines [7] ou l'ADN [8]. Elle est également liée à la démonstration que le système immunitaire est capable de produire naturellement des anticorps mimant la structure et l'activité catalytique d'enzymes naturelles [9], ou de générer des anticorps capables d'hydrolyser des protéines injectées de façon répétitive à un malade [10].

De nombreuses applications thérapeutiques ont été proposées pour les abzymes, comme par exemple la possibilité de faire produire par le système immunitaire d'un malade souffrant d'une déficience enzymatique son propre médicament, à savoir des anticorps possédant l'activité enzymatique manquante. Cependant, dans l'état actuel des recherches, deux approches principales sont en

développement. La première consiste à utiliser des anticorps catalytiques pour détoxifier l'organisme. L'application la plus avancée est l'utilisation d'abzymes catalysant l'hydrolyse de la cocaïne pour traiter les patients en overdose, mais aussi pour permettre de traiter les problèmes d'addiction en dégradant la cocaïne en produits non toxiques [11]. D'autres travaux portent également sur l'utilisation d'anticorps catalytiques dégradant des composés organophosphorés neurotoxiques. L'autre application principale consiste en l'activation ciblée de molécules cytotoxiques pour le traitement de cellules tumorales. La stratégie de l'ADAPT (« antibody directed abzyme prodrug therapy ») consiste à construire des anticorps bi-spécifiques, une moitié reconnaissant spécifiquement des marqueurs présents à la surface de cellules tumorales, l'autre moitié possédant une activité catalytique naturellement absente dans l'organisme, mais capable d'activer une molécule non toxique en molécule cytotoxique au contact de la cellule tumorale (figure 2). Un anticorps capable de catalyser une réaction séquentielle rétro-aldol/rétro-Michael a permis de démontrer la faisabilité de cette approche *in vivo* sur des souris modèles atteintes naturellement de tumeurs malignes du système nerveux sympathique (neuroblastomes) [12]. Si l'utilisation d'anticorps de souris pose les problèmes rencontrés dans l'utilisation d'enzymes exogènes, les progrès faits dans l'humanisation de ces anticorps devraient permettre de lever cet obstacle. D'autre part, les avancées faites dans le domaine de l'ingénierie des anticorps permettent de n'exprimer de façon fonctionnelle que la partie de l'anticorps impliquée dans la fonction recherchée.

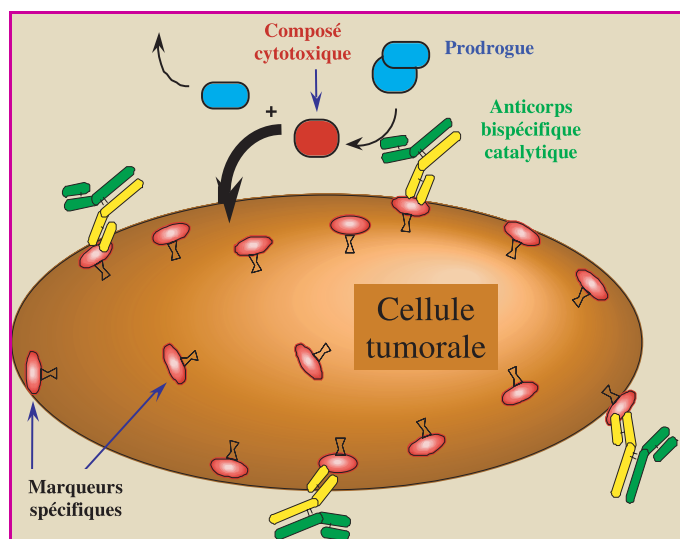


Figure 2 - Stratégie de l'ADAPT.

L'anticorps bi-spécifique, avec une moitié reconnaissant spécifiquement des marqueurs tumoraux et l'autre moitié possédant une activité catalytique, catalyse la transformation de molécules cytotoxiques masquées en molécules actives au contact de la cellule.

D'autres applications, à plus long terme, sont étudiées dans de nombreux laboratoires. L'une des plus ambitieuses consiste en l'élaboration de vaccins « catalytiques », c'est-à-dire induisant l'apparition d'anticorps catalytiques spécifiques, capables par exemple d'hydrolyser certaines protéines virales impliquées dans la fixation d'un virus sur les récepteurs cellulaires. La capacité de turnover de ces anticorps leur conférerait une efficacité largement accrue par rapport aux anticorps classiques.

Les ribosomes ou ARN catalytiques

On a longtemps cru que seules les protéines pouvaient être porteuses d'activité enzymatique. Les travaux pionniers de S. Altman et T. Cech ont bouleversé les idées tant sur la nature des molécules capables de catalyser les réactions chimiques que sur l'élucidation des mécanismes à l'origine de la vie. Les acides ribonucléiques (ARN) sont des molécules formées d'un enchaînement précis de nucléotides servant à transférer les instructions génétiques inscrites dans l'ADN du noyau vers le cytoplasme, et ainsi permettre la synthèse des protéines correspondantes. Il existe différents types d'ARN (messenger, de transfert, ribosomal) qui tous ont un rôle particulier dans le processus complexe de la synthèse des protéines. Les travaux pour lesquels le prix Nobel de chimie leur a été attribué en 1989 ont permis à Altman de démontrer que la Rnase P est une enzyme constituée d'une partie protéique et d'une partie acide ribonucléique et que c'est l'ARN qui catalyse de manière très spécifique la coupure d'autres ARN [13]. Parallèlement, Cech, en étudiant la maturation de l'ARN ribosomal du protozoaire *Tetrahymena thermophilus*, montrait qu'une séquence excédentaire (intron) de la forme précurseur de l'ARN peut s'auto-exciser et assurer la ligature des extrémités adjacentes en absence de toute protéine [14] (figure 3). Ce phénomène d'auto-excision et de ligature a été retrouvé avec différents types d'ARN chez plusieurs espèces. Cependant, ces ARN ne catalysent qu'une fois leur réaction spécifique et ne sont donc pas de véritables

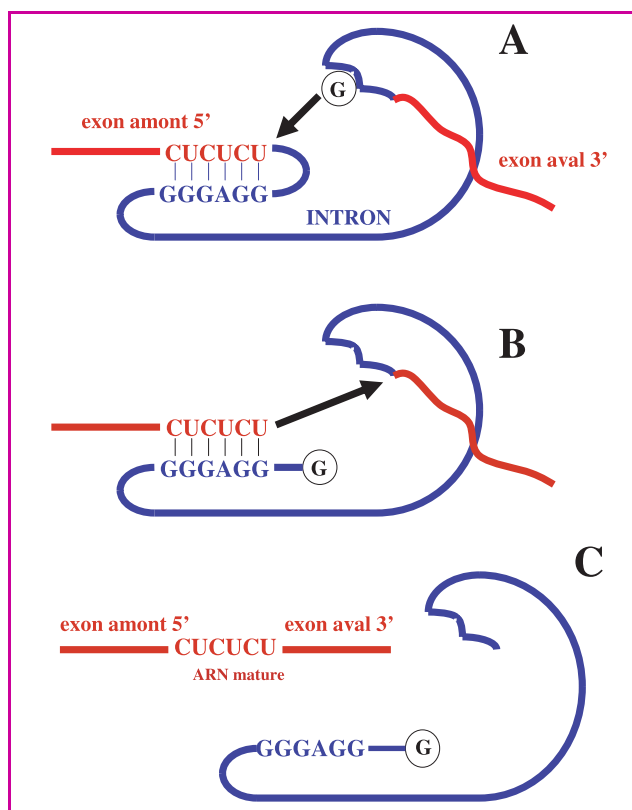


Figure 3 - Ribozyme de *Tetrahymena thermophila*.

Pour être fonctionnels, certains ARN doivent exciser une partie excédentaire (intron) et ligaturer les deux parties fonctionnelles (exons). Certains introns peuvent catalyser leur excision. Le site de coupure est reconnu par une séquence-guide. A : une molécule de guanosine (G) clive la liaison intron/exon située en amont. B : la guanosine est transférée sur l'extrémité amont de l'intron ; l'extrémité libre de l'exon réagit avec l'autre liaison intron/exon. C : les deux exons sont ligaturés pour donner l'ARN mature.

enzymes. Grâce à l'étude des mécanismes impliqués dans la catalyse et à l'étude structurale des ribozymes naturels, des ribozymes synthétiques ont été conçus qui se comportent comme de véritables endoribonucléases en agissant spécifiquement sur des ARN substrats, sans être eux-mêmes modifiés. De nombreux travaux réalisés ont permis de concevoir de véritables enzymes à ARN, capables d'hydrolyser d'autres molécules d'ARN ou au contraire de ligaturer successivement et spécifiquement des fragments d'ARN (ARN polymérases).

Ces ARN catalytiques ont rapidement soulevé un vif intérêt en raison de leurs nombreuses applications potentielles. Dans le domaine médical, divers systèmes sont en cours d'expérimentation. Ainsi les ARN de différents virus, en particulier du virus de l'hépatite B, de l'hépatite C ou du VIH, ont été choisis comme cibles pour le développement de ribozymes spécifiques capables d'inhiber leur réplication. Dans ces trois cas, des résultats significatifs ont été obtenus *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines infectées. Deux autres développements, actuellement en phase II d'essai clinique, portent sur le traitement du cancer du sein et du colon. La cible choisie dans ce cas est l'ARN messager (ARNm) codant pour un récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire ou l'ARNm codant pour le récepteur type 2 de facteur de croissance épidermique. Des essais *in vitro* portant sur de nombreux autres ARN cibles impliqués dans des pathologies sont actuellement en cours.

À côté des stratégies visant à détruire des molécules d'ARN indésirables, une autre approche a été développée dans le but de réparer des ARN mutés. Des ribozymes ont pu être synthétisés pour couper en amont d'une mutation et remplacer l'extrémité mutée par un exon portant l'information correcte, restaurant ainsi l'information génétique sauvage (figure 4). Des essais *in vitro* ont porté sur la réparation d'ARN mutés de la protéine kinase impliqués dans la dystrophie musculaire myotonique, une maladie génétique dégénérative des cellules musculaires, ou de la protéine p53, protéine humaine présente dans le noyau des cellules qui se comporte naturellement en suppresseur de tumeur en induisant la mort cellulaire en réponse à un stress cellulaire (exposition aux agents endommageant l'ADN, hypoxie, déficit en nucléotides...). Le gène de la protéine p53 présente un taux de mutations élevé dans de très nombreux cancers.

Enfin, il est possible de rechercher de nouvelles activités catalytiques en partant de bibliothèques combinatoires

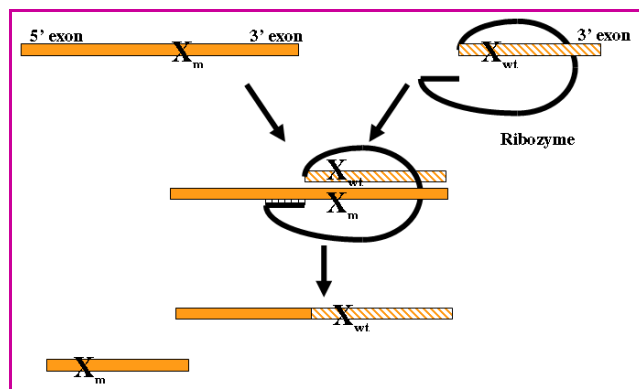


Figure 4 - Correction d'un ARNm muté par un ribozyme. L'ARN muté est clivé en amont de la mutation (X_m ; m = mutation) et le fragment 3' est remplacé par un exon portant la séquence sauvage (X_{wt} ; wt = wild type) pour redonner un ARN fonctionnel.

d'ARN. L'utilisation d'analogues d'état de transition pour le criblage de ces ARN a permis d'isoler quelques ribozymes agissant sur des substrats ARN et non ARN et possédant des activités catalytiques diverses, comme la réaction de Diels-Alder, la formation de liaisons glycosydiques ou amides, ou des réactions d'alkylation et d'acylation [15].

Vers de nouveaux biocatalyseurs synthétiques

Les développements de la chimie supramoléculaire et de la chimie des polymères ont permis de concevoir des molécules ou des polymères capables de reconnaissance spécifique vis-à-vis de composés biologiques, mais permettent aussi d'entrevoir la synthèse *de novo* de catalyseurs doués de propriétés proches de celles des enzymes. Ainsi, la technique de synthèse d'empreintes moléculaires (« molecular imprinting ») qui permet de générer des sites de reconnaissance très spécifiques au sein d'un polymère synthétique a été proposée par Wulff et coll. en 1972 [16] et développée par le groupe de Mosbach [17]. Le concept permettant l'impression moléculaire repose sur la constitution d'une matrice polymérique, assemblée autour d'une molécule servant de gabarit (figure 5). Après élimination de la molécule cible, des sites de reconnaissance spécifiques, complémentaires en termes de forme et de fonctionnalité, sont créés au sein de la matrice. La fixation de monomères fonctionnels à la molécule gabarit, ou dans le site de fixation après son élimination, peut être réalisée par liaison covalente ou interactions non covalentes, permettant une très grande flexibilité dans le choix des monomères et le type de molécule cible qui peut être reconnue. Des polymères qui reconnaissent des composés aussi différents que des sucres, des peptides, des nucléotides, des protéines, des cristaux, et même des cellules entières, ont pu être produits [18]. La caractéristique générale de l'ensemble de ces polymères récepteurs est leur très grande sélectivité, ainsi que leur très forte affinité pour les molécules cibles, avec des valeurs comparables à celles des anticorps.

L'idée d'utiliser la même démarche que celle permettant de générer des anticorps catalytiques, à savoir l'utilisation d'analogues d'état de transition comme molécules cibles, a donc tout naturellement été avancée. Par cette approche, différentes réactions ont pu être catalysées par des polymères imprimés, dont des réactions de formation de liaison carbone-carbone, la réaction de Diels-Alder, des réactions de décarboxylation ou des réactions de type aldolase. Un exemple intéressant est la synthèse de polymères imprimés dans lequel a été induite la présence de groupements hydroxyle, imidazole et carboxylate dans le site de reconnaissance, mimant la triade catalytique sérine-histidine-acide aspartique présente dans de nombreuses enzymes naturelles à activité estérase et protéase.

Si les résultats obtenus à ce jour avec des polymères synthétiques sont encore très loin en termes d'efficacité catalytique des catalyseurs biologiques, les progrès faits dans ce domaine laissent entrevoir la possibilité d'obtenir des composés utilisables non seulement en synthèse organique, où des conditions extrêmes de pression, température et pH rendent l'utilisation d'enzymes difficile, mais également dans le domaine analytique ou médical, où la grande stabilité de ces polymères apporterait des outils utiles à certaines utilisations spécifiques. Ainsi, des « anticorps plastiques » ont été proposés pour le développement de dosages cliniques utilisables sur de très

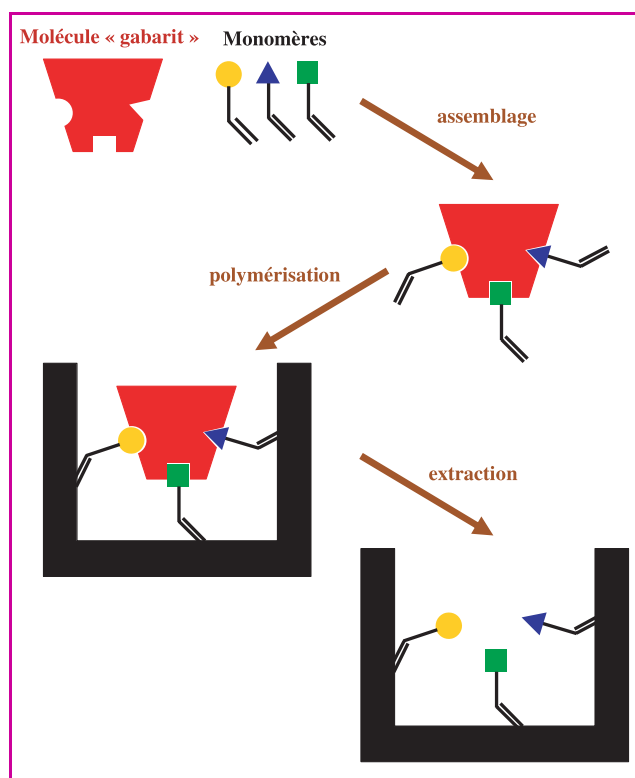


Figure 5 - Stratégie de synthèse de polymères à empreinte moléculaire.

La molécule « gabarit » est incubée avec des monomères choisis pour interagir avec des fonctionnalités spécifiques de la molécule. Le complexe gabarit-monomère est formé par associations covalentes ou non covalentes. Le complexe est polymérisé par un excès de monomères. La molécule « gabarit » est ensuite éliminée afin de libérer les empreintes fonctionnelles créées dans le polymère.

longues périodes et hors des laboratoires. L'addition à ces propriétés de reconnaissance d'une activité catalytique stable dans des polymères imprimés permettrait le développement de biocapteurs moins sensibles aux conditions d'utilisation que ceux produits actuellement avec des enzymes. D'autre part, par couplage à des biomatériaux, la grande stabilité de ces biocatalyseurs permet d'envisager la réalisation d'« implants catalytiques » afin de remplacer des activités enzymatiques déficientes.

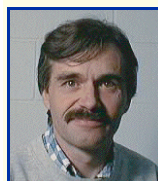
Conclusion

Depuis une vingtaine d'années, différentes stratégies ont été développées pour produire des nouveaux biocatalyseurs mimant l'activité catalytique d'enzymes ou possédant des activités pour lesquelles on ne connaît pas d'enzyme. Si ces approches n'ont pas encore débouché sur de réelles applications thérapeutiques, des stratégies originales ont été

proposées, dont on peut attendre dans un futur plus ou moins proche de nouveaux outils permettant de lever les limitations liées à l'utilisation des enzymes, et mieux exploiter ainsi les propriétés de la fonction biocatalytique dans le domaine médical.

Références

- [1] Pauling L., Molecular architecture and biological reactions, *Chem. Eng. News*, **1946**, 24, p. 1375.
- [2] Jencks W., *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Mc Graw-Hill, New York, **1969**.
- [3] Köhler G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **1975**, 256, p. 495.
- [4] Tramontano A., Janda K.D., Lerner R.A., Catalytic antibodies, *Science*, **1986**, 234, p. 1566.
- [5] Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G., Selective chemical catalysis by an antibody, *Science*, **1986**, 234, p. 1570.
- [6] Blackburn G.M., Garçon A., Catalytic antibodies, *Biotechnology vol. 8B*, D.R. Kelly, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, p. 403.
- [7] Paul S., Volle D.J., Beach C.M., Johnson D.R., Powell M.J., Massey R.J., Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody, *Science*, **1989**, 244, p. 1158.
- [8] Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A., Bogomolova A.E., Smirnov I.V., Gabibov A.G., DNA hydrolyzing autoantibodies, *Science*, **1992**, 256, p. 665.
- [9] Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Alexandrova E.A., Koralewski F., Demin A.V., Titov M.I., Avale B., Tramontano A., Paul S., Thomas D., Gabibov A.G., Friboulet A., Enzyme mimicry by the antiidiotypic antibody approach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, p. 13526.
- [10] Lacroix-Desmazes S., Moreau A., Sooryanarayana, Bonnemain C., Stieljes N., Pashov A., Sultan Y., Hoebeke J., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V., Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia, *Nature Med.*, **1999**, 5, p. 1044.
- [11] Deng S.X., de Prada P., Landry D.W., Anticocaine catalytic antibodies, *J. Immunol. Methods*, **2002**, 269, p. 299.
- [12] Shabat D., Lode H.N., Pertl U., Reisfeld R.A., Rader C., Lerner R.A., Barbas C.F., *In vivo* activity in a catalytic antibody-prodrug system: antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, p. 7528.
- [13] Guerrier-Takada C., Gardinier K., Marsh T., Pace N., Altman S., The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell*, **1983**, 35, p. 849.
- [14] Zaug A.J., Cech T.R., The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme, *Science*, **1986**, 231, p. 470.
- [15] Jäschke A., Seelig B., Evolution of DNA and RNA as catalysts for chemical reactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, p. 257.
- [16] Wulff G., Sharan A., Zabrocki K., Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of race mates, *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 14, p. 4239.
- [17] Mosbach K., Molecular imprinting, *Trends Biochem. Sci.*, **1994**, 19, p. 9.
- [18] Haupt K., Fradet A., Polymères à empreintes moléculaires. Principes et applications, *L'Act. Chim.*, **2001**, 4, p. 23.



Alain Friboulet

est directeur de recherche CNRS au Laboratoire Génie enzymatique et cellulaire de Compiègne*.

* Génie enzymatique et cellulaire, UMR 6022 CNRS, Université de Technologie de Compiègne, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex.
Tél. : 03 44 23 44 13. Fax : 03 44 20 39 10.
Courriel : alain.friboulet@utc.fr

Retrouvez la SFC et L'Actualité Chimique sur la toile

<http://www.sfc.fr>

La chimie pour adapter les dispositifs thérapeutiques polymères à l'organisme humain

Michel Vert

Abstract

Chemistry as a tool to adjust polymeric therapeutic devices to human organism

The application of the notion of a specifications list is justified from the concept of biomaterial and the criteria imposed by application to treat the human organism. The main specifications of this list are then recalled and grouped with respect to the notions of biocompatibility and biofunctionality and with respect to the interest of polymeric biomaterials in surgery and pharmacology. Contrary to permanent surgical prostheses that request biostable polymers, temporary therapeutic aides require the elimination of the artificial polymeric compound after healing. The notion of bioresorbability is introduced. Examples show how one can adapt the properties of degradable polymers to requisites of temporary therapeutic applications.

Mots-clés

Biomatériau, biomédical, chirurgie, pharmacologie, polymères, biorésorbable, fonctionnalisation.

Key-words

Biomaterial, biomedical, surgery, pharmacology, polymers, bioresorbable, functionalisation.

De tout temps, l'Homme a exploité ou tenté d'exploiter les matières disponibles autour de lui afin d'en faire des accessoires de ses activités quotidiennes de plus en plus variées au fil des âges. Ainsi, les matières d'origines animale et végétale, de même que les minéraux, ont été mobilisés pour devenir des matériaux, c'est-à-dire de la matière exploitée à des fins pratiques. A l'âge de pierre a succédé l'âge du fer, puis celui des métaux, suivi de celui des alliages et des céramiques et enfin, au siècle dernier, des matières organiques à base de macromolécules de synthèse, plus communément et improprement appelées « matières plastiques ». Aujourd'hui, quasiment tous les domaines de l'activité humaine exploitent des composés et systèmes à base de macromolécules artificielles, souvent en remplacement de matière macromoléculaire d'origine naturelle (bois, cellulose, laine...). Que ce soient les secteurs (emballages, bâtiments, revêtements...) exploitant à forts tonnages des matières polymères artificielles de grande diffusion, dites de commodité, comme le polyéthylène (PE), le poly(chlorure de vinyle) (PVC), le polystyrène (PS), ou que ce soient les secteurs nobles (micro-électronique, informatique, espace...) exploitant des matières polymères à petits tonnages et hautes performances, on peut dire qu'aujourd'hui les matières polymères sont omniprésentes et pour beaucoup irremplaçables. Le traitement de l'organisme humain et, de plus en plus, celui des animaux de rente ou de compagnie, n'ont pas échappé à la tendance.

C'est en grande partie à leur analogie avec un gigantesque jeu de construction que les composés macromoléculaires doivent leur attrait actuel dans le domaine thérapeutique. En effet, il suffit de disposer d'une molécule portant deux fonctions différentes susceptibles de réagir entre elles, ou de deux molécules portant chacune une paire de fonctions identiques susceptibles de réagir entre elles pour pouvoir générer par des processus chimiques répétitifs simples un composé macromoléculaire. Une fonctionnalité supérieure à deux sur l'un des composés précurseurs permet de générer

des systèmes branchés ou réticulés [1]. Bien qu'encore jeune, la science des polymères artificiels, qui inclut non seulement la chimie macromoléculaire mais aussi une physico-chimie souvent spécifique, la physique du solide, celle des solutions ou encore celle des systèmes dispersés est, à ne nombreux égards, mature. Les connaissances acquises viennent, d'une part, de l'étude des biopolymères, rendue difficile et donc limitée par la diversité des unités de répétition et la complexité des choix faits par la nature et, d'autre part, d'approches plus approfondies sur des polymères synthétiques très simples puisque les plus complexes ne mobilisent encore que 2 ou 3 unités de répétition différentes, et cela avec un contrôle des structures très imparfait.

Le secteur biomédical est un domaine très particulier d'applications des matériaux. En effet, il mobilise l'exploitation de matières dont les propriétés peuvent être

Glossaire

Barrière hémato-encéphalique

Paroi vasculaire constituée de cellules et formant un filtre moléculaire semi-perméable extrêmement efficace pour protéger le cerveau de certains composés chimiques circulant dans les vaisseaux sanguins et susceptibles de passer par diffusion simple, notamment les substances de masses molaires élevées.

Copolymérisation

Réaction de polymérisation conduite avec plus d'un monomère (molécule à l'origine des unités enchaînées pour constituer une macromolécule). Le terme copolymère est utilisé pour refléter la présence de deux types d'unités de répétition et parfois de plusieurs par extension à la place de terpolymère ou multimère.

Cotyle

Partie concave de l'articulation d'une prothèse totale de hanche recevant la tête de fémur artificielle.

Stéréocopolymérisation

Réaction chimique de synthèse de macromolécules chirales impliquant des monomères inverses optiques en proportion variable.

Tableau I - Quelques polymères courants et leurs applications les plus fréquentes.

| Polymères | Exploitations biomédicales |
|--|---|
| poly(méthacrylate de méthyle) | lentilles de contact rigides, cristallin artificiel |
| composés polymères à base de méthacrylate de méthyle | ciments acryliques pour orthopédie et odontologie, prothèses faciales, comblements de pertes de tissus osseux et de tissus poreux |
| poly(méthacrylate d'hydroxy-2 éthyle) | lentilles de contact souples, chirurgie plastique, surface hémocompatible |
| polyamides de type nylon | sutures |
| poly(chlorure de vinyle) | poches à sang, cathéters |
| poly(téréphtalate d'éthylène) | prothèses vasculaires, valves cardiaques |
| polytétrafluoroéthylène | orthopédie, clips vasculaires |
| polyuréthanes | cathéters, pompes cardiaques |
| silicones | chirurgie plastique, tubes, oxygénateurs |

considérées comme maîtrisables en termes de matériau. Cependant, la même matière doit assurer une fonction thérapeutique vis-à-vis de systèmes et phénomènes très complexes dont le paramétrage est quasiment impossible car entièrement sous contrôle de la nature [2].

Conformément à la stratégie historique rappelée au début, c'est tout naturellement que l'Homme a tenté d'exploiter, à des fins thérapeutiques, les composés macromoléculaires synthétiques qu'il a inventés au cours du siècle dernier. Le domaine biomédical, constitué d'un volet chirurgical impliquant des systèmes prothétiques, et d'un volet pharmacologique impliquant des substances médicamenteuses, n'a pas échappé à la tendance. De nos jours, on peut considérer que pratiquement tous les matériaux et bon nombre des composés chimiques ont été ou sont encore testés à ces fins ; les systèmes à base de polymères étant probablement les plus récents. Ainsi, de nombreux composés polymères artificiels aux noms familiers se retrouvent dans la palette des biomatériaux, concurrençant des composés polymères d'origine naturelle plus ou moins modifiés chimiquement, ou des matériaux inorganiques (métaux, alliages, céramiques...) dont les performances insuffisantes sont néanmoins très souvent remarquables [2].

Le *tableau I* présente quelques-uns des polymères les plus courants dans le secteur chirurgical et, dans une moindre mesure, en pharmacologie.

Ce tableau montre au moins deux choses :

1. Les polymères sont exploités comme biomatériaux pour de nombreuses applications thérapeutiques ;
2. Les polymères cités semblent très familiers. Cela tient au fait qu'ils sont exploités pour de nombreuses applications dans la vie courante.

Leur exploitation dans le domaine biomédical résulte, le plus souvent, d'une simple adaptation aux contraintes imposées par le domaine thérapeutique et non d'un développement spécifique. Ainsi, il n'y a pas de différence fondamentale entre des fibres textiles comme le Tergal[®] et des fibres biomédicales comme le Dacron[®] : les deux sont constitués de poly(téréphtalate d'éthylène glycol). Il en est de même des cotyles en polyéthylène ultra hautes masses moléculaires (UHMW) de prothèses totales de hanche qui sont très proches des polyéthylènes utilisés pour les engrenages silencieux. D'un point de vue chimique, la distance entre le ciment acrylique des chirurgiens orthopédistes ou des dentistes et les résines polyacryliques industrielles telles que le Plexiglass[®] est relativement faible. Le monomère de base et la chimie correspondante sont les mêmes, c'est

principalement la formulation qui fait le reste.

De nos jours, la tendance est à la recherche de matière polymère plus sophistiquée, développée spécifiquement pour le domaine biomédical. A cet égard, la chimie macromoléculaire joue un rôle capital et fait de plus en plus appel à des monomères de plus en plus fonctionnalisés, combinables par copolymérisation pour aboutir à des architectures macromoléculaires complexes. Elle fait aussi appel à l'adaptation de systèmes macromoléculaires constitués par modification chimique au niveau de macromolécules ou seulement des surfaces.

Les domaines particulièrement demandeurs de macromolécules ou de biomatériaux polymères spécifiquement fonctionnalisés sont la chirurgie (prothèses) et la pharmacologie (systèmes à libération contrôlée de principes actifs). La différence entre les deux s'atténue au fil du temps avec le développement de prothèses polymères médiquées, c'est-à-dire incorporant des principes pharmacologiquement actifs. Les propriétés conditionnant le comportement chimique et physique des dispositifs polymères doivent prendre en compte les conditions physiologiques du milieu environnant (par exemple le pH généralement fixé à 7,4, la force ionique correspondant à une solution de NaCl 0,15 N, et la température fixée à 37 °C). En ce qui concerne le respect et la réaction des tissus vivants et en dehors du cas où des substances toxiques peuvent diffuser à partir de la matrice polymère (résidus de monomères, solvants, adjuvants), c'est la surface qui est le facteur principal et qui doit être optimisée. Les matériaux polymères sont particulièrement intéressants à cet égard car il n'y a pas de différence fondamentale entre un plastifiant ou une charge selon la terminologie chère au polymériste, et un principe actif dissous ou dispersé au sein d'une matrice polymère par le pharmacien. Formuler une matrice polymère avec un principe actif relève de la grande simplicité. Il en est de même de la libération du principe actif dissous ou dispersé au sein d'une matrice, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, si on se borne au suivi de la cinétique de libération. Il existe un grand nombre de moyens (attaque chimique, greffage chimique, traitement par plasma sous atmosphère particulière, bombardement électronique...).

Où sont les problèmes alors ?

Dans tous les cas, la difficulté est liée à l'obtention et au contrôle des propriétés requises par une application donnée. La notion de matériau ou composé macromoléculaire s'inscrit dans un contexte d'ingénierie et à ce titre, le cahier des charges est un élément capital que trop d'approches à visées thérapeutiques ignorent ou ne prennent en considération que partiellement. Dans le domaine médical, le cahier des charges d'un biomatériau comporte des critères relevant des sciences exactes plutôt faciles à quantifier (biofonctionnalité), à côté de réactions propres aux systèmes et tissus vivants dont les effets sont beaucoup plus qualitatifs car dépendant des processus biologiques (biocompatibilité). A titre d'exemple, le *tableau II* présente un cahier des charges typique constitué des principaux critères à prendre systématiquement en compte.

Tableau II - **Cahier des charges typique** à prendre en compte pour la mise au point d'un dispositif thérapeutique à base de polymère.

| Biocompatibilité | Biofonctionnalité |
|--|---|
| non toxique non immunogène non mutagène non thrombogène | propriétés adéquates : mécaniques physiques chimiques thermiques biologiques |
| | facilité d'usage |
| | stérilisable |
| | stockable |
| | homologation |

Les biomatériaux macromoléculaires prothétiques permanents

D'un point de vue général, une prothèse a pour objectif de remplacer une fonction ou un organe altéré définitivement, c'est-à-dire dans l'impossibilité de mobiliser l'aptitude des systèmes vivants à s'autoréparer. Le cahier des charges correspondant exige alors biocompatibilité et biofonctionnalité pour le reste de la vie du patient. Le problème majeur est la conservation de ces propriétés dans le temps car, d'une part, les matériaux macromoléculaires résistent mal aux agressions chimiques liées à la biochimie des milieux vivants. Par ailleurs, ils doivent être stérilisés et, quelle que soit la méthode, il y a toujours une agression de la matière organique constituant les polymères organiques proches chimiquement de la matière naturelle des agents pathogènes à détruire. Lorsqu'elle fait appel aux rayonnements ionisants, la stérilisation génère des radicaux libres au sein des matrices polymères. Certains de ces radicaux peuvent avoir une durée de vie longue et peuvent interagir avec les radicaux de la biochimie pour conduire à des vieillissements catastrophiques. C'est le cas, par exemple, des cotyles de prothèse de hanche en polyéthylène ultra haute masse moléculaire stérilisés aux rayons γ [3].

Si les propriétés fonctionnelles des parties polymères d'une prothèse dépendent de la nature chimique des composés macromoléculaires et donc des structures moléculaires initiales, la biocompatibilité dépend principalement de la surface si aucun produit toxique ne diffuse vers les fluides biologiques qui ont un caractère amphiphile très prononcé. Une surface polymère peut être modifiée par diverses voies (figure 1). Certaines sont physiques et exploitent le positionnement des chaînes macromoléculaires lors de la mise en forme, les parties apolaires ou hydrophobes ayant tendance à s'orienter vers une surface de mise en œuvre peu polaire. Cependant, de telles orientations sont temporaires car elles évoluent au contact des milieux biologiques après implantation par suite de phénomène lent (relaxation) ou rapide (adsorption de protéines). Il existe de nombreuses voies chimiques pour modifier plus définitivement une surface polymère. La modification par plasma en présence de composés chimiques ou gaz variés, pris seuls ou en mélange, est l'une des plus exploitées. Cette voie est très efficace, mais pas toujours reproductible ni contrôlable au sens réglementaire [4]. Néanmoins, il est possible d'exploiter les plasmas froids pour améliorer l'hémocompatibilité de prothèses vasculaires ou de cathéters. Une surface à base

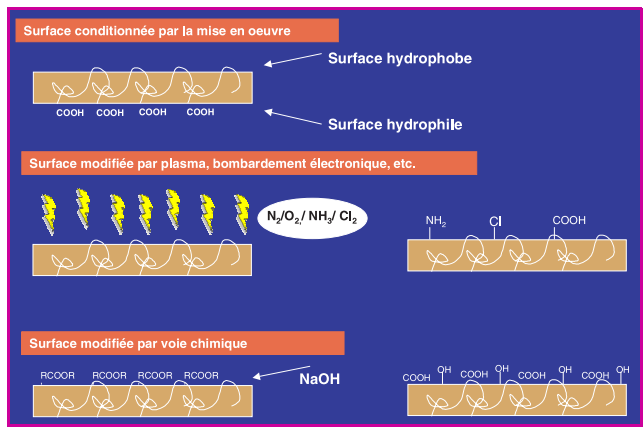


Figure 1 - Représentations schématiques de quelques méthodes de modifications d'une surface polymère.

de macromolécules fonctionnalisées peut être aussi modifiée à l'aide de réactions chimiques mieux définies telles qu'hydrolyse, oxydation, chloration, ou encore couplage (figure 2). Là encore, les phénomènes secondaires d'adsorption de protéines et de relaxation conduisent à des évolutions relativement mal contrôlées. On ne sait plus si c'est la surface modifiée du matériau ou la couche de protéines qui s'y dépose qui conditionne le comportement biologique. Le doute est loin d'être levé.

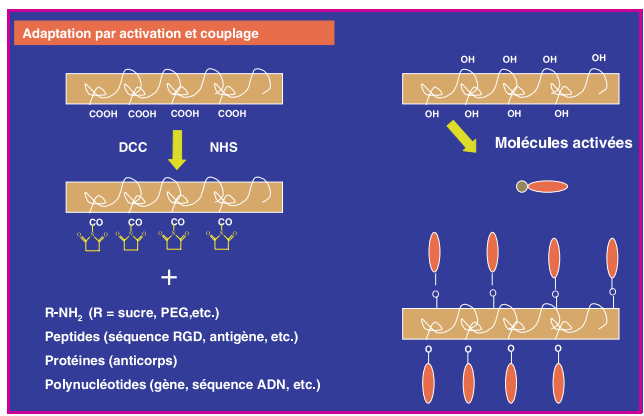


Figure 2 - Représentation schématique de la modification chimique par activation de la surface (gauche) ou de la molécule à coupler (droite), puis couplage.

Les biomatériaux thérapeutiques à usage temporaire

Depuis une vingtaine d'années, une tendance s'est faite jour. Elle repose sur la prise de conscience du fait que l'exploitation de matière biostable pour aider un organisme animal à s'autoréparer n'est pas rationnelle car elle exige, la plupart du temps, une réintervention chirurgicale pour éliminer le corps étranger résiduel macromoléculaire retenu après guérison. En effet, les macromolécules de hautes masses molaires et *a fortiori*, les objets solides ou colloïdaux de taille nanométrique, sont piégés entre la peau et les muqueuses ou compartimentés par les barrières physiologiques internes (parois vasculaires, barrière hémato-encéphalique). C'est la raison pour laquelle la recherche de nouvelles matières polymères dégradables en milieu vivant est l'une des grandes

tendances actuelles dans le secteur biomédical, que ce soit par voie chimique au contact des fluides biologiques, ou par voie enzymatique sous l'action de la biochimie cellulaire et tissulaire [5].

On se rapproche ainsi des biopolymères qui sont adaptés à la biodégradation, voire au biorecyclage. Le problème est de satisfaire de manière cumulée aux critères de biocompatibilité, de biofonctionnalité et de biorésorption après dégradation (voie chimique) ou biodégradation (voie enzymatique sous contrôle cellulaire).

Exemples d'adaptation des propriétés par voie chimique

De nos jours, la chimie macromoléculaire permet l'accès à des macromolécules de plus en plus complexes relevant d'une chimie fine encore relativement confidentielle (bien que de plus en plus attractive chez les polyméristes) car difficile et réservée aux applications à haute valeur ajoutée. Le développement des méthodes de synthèse d'architectures contrôlées par voie anionique, et plus récemment par voie radicalaire contrôlée, n'est pas vraiment adapté au domaine des systèmes macromoléculaires à usage temporaire, car ces méthodes conduisent généralement à des chaînes saturées non fonctionnalisées. De telles macromolécules peuvent se dégrader *in vivo* par vieillissements physique et chimique, mais cela en des temps sans commune mesure avec les exigences d'une exploitation thérapeutique temporaire destinée à aider un organisme vivant à s'autoréparer, la guérison étant relativement rapide dans la plupart des cas. Pour obtenir une dégradation chimique rapide en minimisant les risques de rejets immunitaires fréquents avec les macromolécules d'origine naturelle, il est préférable de s'adresser à des macromolécules fonctionnalisées dans la chaîne principale et donc susceptibles d'être clivées par voie chimique [6]. Ce sont les principales raisons pour lesquelles les méthodes de polycondensation ou de polymérisation par ouverture de cycle sont préférentiellement prospectées et, pour certains, exploitées de nos jours.

La copolymérisation et la stéréocopolymérisation pour adapter la vitesse de dégradation

De nombreux hétérocycles et molécules bifonctionnelles sont exploitables pour synthétiser des chaînes macromoléculaires fonctionnalisées dans la chaîne principale et clivables par la suite sous l'effet de la biochimie et surtout du milieu aqueux qui caractérise les systèmes vivants. Les polyesters et copolyesters aliphatiques ont trouvé là une possibilité de valorisation qui leur était refusée dans les domaines d'exploitation des polymères classiques en raison d'une trop grande sensibilité à l'hydrolyse. En effet, les fonctions ester aliphatiques sont très sensibles aux milieux aqueux, contrairement aux polyesters aromatiques tels que les poly(téréphtalate d'éthyle) (PET), ou encore aux polyamides aliphatiques, notamment les polypeptides et protéines qui requièrent l'aide des enzymes selon un choix particulièrement remarquable effectué par la nature [7].

La valeur ajoutée absorbable par les applications thérapeutiques, qu'elles soient biomédicales ou pharmacologiques, a permis d'exploiter aussi la stéréocopolymérisation, c'est-à-dire la copolymérisation d'entités énantiomères qui conduisent, après enchaînement sous forme de macromolécules, à

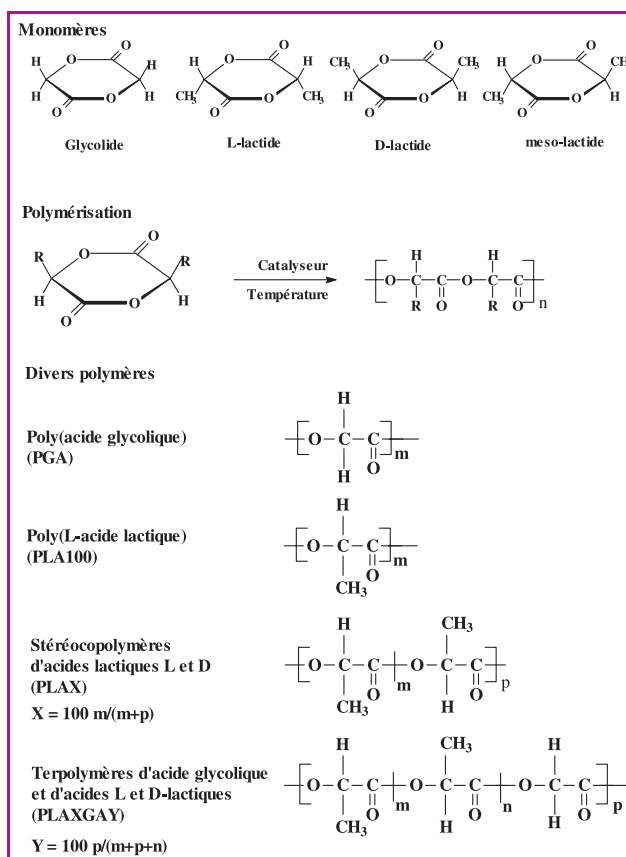


Figure 3.

des structures extrêmement diversifiées par l'intermédiaire de structures d'isomérisation configurationnelle en quantité quasi-infinie.

A titre d'exemples, on peut citer les familles des poly(α -hydroxy acides) fondées sur l'acide glycolique et les acides L- et D-lactiques et glycoliques [8] (figure 3), et des poly(β -hydroxy acides) fondées sur les énantiomères d'acide malique [9] (figure 4).

Cette dernière famille regroupe des polyesters aliphatiques fonctionnalisés en chaîne latérale par des fonctions acide carboxylique. Le poly(β -acide malique) est un polymère hydrosoluble dont les propriétés en solutions aqueuses sont, en première approximation, indépendantes des structures configurationnelles. Il n'en est pas de même pour les copolymères et homopolymères à chaînes rendues hydrophobes (par estérification par exemple) et donc solides en milieux hydrophiles. Leurs propriétés physiques et chimiques (dégradation) à l'état solide sont alors très dépendantes des structures configurationnelles, notamment *via* la morphologie amorphe ou cristalline.

De nombreux copolymères ont été inventés pour étendre et diversifier les propriétés des polymères de type PLAGA. A titre d'exemple, on peut citer les copolymères avec l' ϵ -caprolactone (PLACL) [10] ou avec l'oxyde d'éthylène (PLAOE) [11]. La chimie macromoléculaire offre diverses voies d'accès aux copolymères plus ou moins statistiques. Pour l'obtention de copolymères diblocs ou triblocs, la voie la plus exploitée est certainement la copolymérisation par ouverture de cycle du glycolide et des lactides en présence d'éthyl-2 hexanoate d'étain (octoate d'étain) et d'un précurseur polymère mono ou dialcool selon un mécanisme encore discuté [12]. On peut accéder ainsi à un très grand nombre de polymères dégradables mais pas

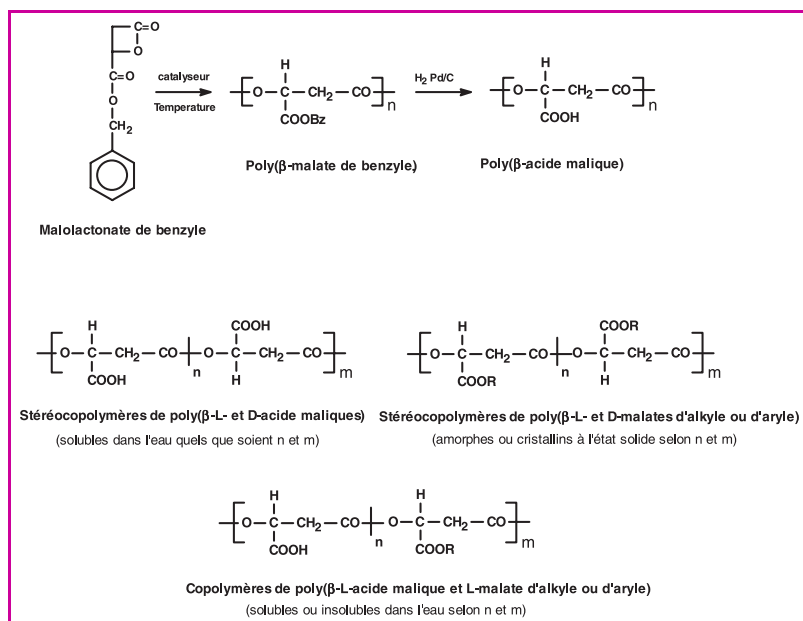


Figure 4.

nécessairement biorésorbables (éliminés de l'organisme ou intégrés à celui-ci après usage), ce qui est un des avantages des polymères constitués d'unités de répétition pro-métabolites, c'est-à-dire conduisant à des métabolites (composés chimiques impliqués dans les processus biochimiques naturels et bio-assimilables ou excrétables) tels que les acides lactiques, l'acide glycolique, les aminoacides, etc. L'intérêt des polymères dérivés de métabolites a été présenté et discuté dans un précédent numéro de *L'Actualité Chimique* [13].

Si la copolymérisation et la stéréocopolymérisation de monomères cycliques ouvrent la voie à de nombreux composés macromoléculaires dégradables, ces polymères ne sont généralement pas fonctionnalisés. Or, de nos jours, la diversification des propriétés et la nécessité de répondre à des cahiers des charges de plus en plus exigeants et spécifiques requièrent la synthèse de polymères fonctionnalisés pour couvrir une gamme plus large d'applications thérapeutiques temporaires, notamment en pharmacologie [14]. En effet, les pharmacologues étudient depuis de nombreuses années le potentiel de divers systèmes de délivrance de molécules (antibiotiques, antitumoraux, hormones...) et de macromolécules bioactives (protéines hormonales, gènes...) à base de polymères. Parmi ces systèmes, on peut citer les implants de taille centimétrique, les microsphères et microcapsules de taille sub-millimétrique, les nanosphères et les nanocapsules de taille sub-micrométrique, les micelles, agrégats et complexes polyélectrolytiques de taille nanométrique à base de macromolécules amphiphiles, ou encore les hydrogels à réticulation physique ou covalente dont certains sont injectables. Les comportements de tels systèmes ont été prospectés et étudiés à l'aide de polymères classiques quasi biostables. L'usage thérapeutique impose ou imposera bientôt de remplacer ces polymères triviaux par des composés macromoléculaires dont la biocompatibilité et la biorésorbabilité sont prouvées.

Pour toutes ces raisons, la diversification est une exigence. A titre d'exemple dans les orientations actuelles, on peut citer le cas des copolymères entre le lactide et son analogue dérivé de l'acide gluconique, le Dipagyl (figure 5) [15], ou

encore entre le lactide et le malolactonate de benzyle [16]. Les premiers sont rendus hydrophiles par la présence de groupes hydroxyle après déprotection partielle; les seconds sont des polymères chargés. Dans les deux cas, on peut exploiter les groupes fonctionnels pour fixer des molécules ou des biomolécules bioactives, les squelettes macromoléculaires de type polyester aliphatique étant hydrolysables *in vivo* [17].

Modification chimique par activation au LDA

La copolymérisation est une méthode exceptionnelle pour adapter les propriétés d'une substance macromoléculaire à un usage donné sans faire appel à des additifs. Cependant, elle présente l'inconvénient d'exiger la synthèse de monomères différents au sein d'une même famille. Si l'on s'en tient aux exemples de familles de polymères mentionnées ci-dessus, on voit que l'accès aux poly(α-hydroxy acides) dérivés des acides glycoliques et lactiques exige la synthèse du glycolide et des divers L-, D-, mésolactides, le lactide racémique étant en fait un mélange 50/50 de L- et D-lactides. Il en est de même dans la série malique où la copolymérisation exige la synthèse de divers malolactonates d'alkyle à côté du malolactonate de benzyle et des énantiomères correspondants, le cas échéant. Notons qu'il est possible d'accéder à des copolymères (acide-ester benzylique par exemple) soit par copolymérisation du malolactonate de benzyle suivie d'une hydrogénéolyse partielle, soit par couplage d'un alcool sur un poly(β-acide

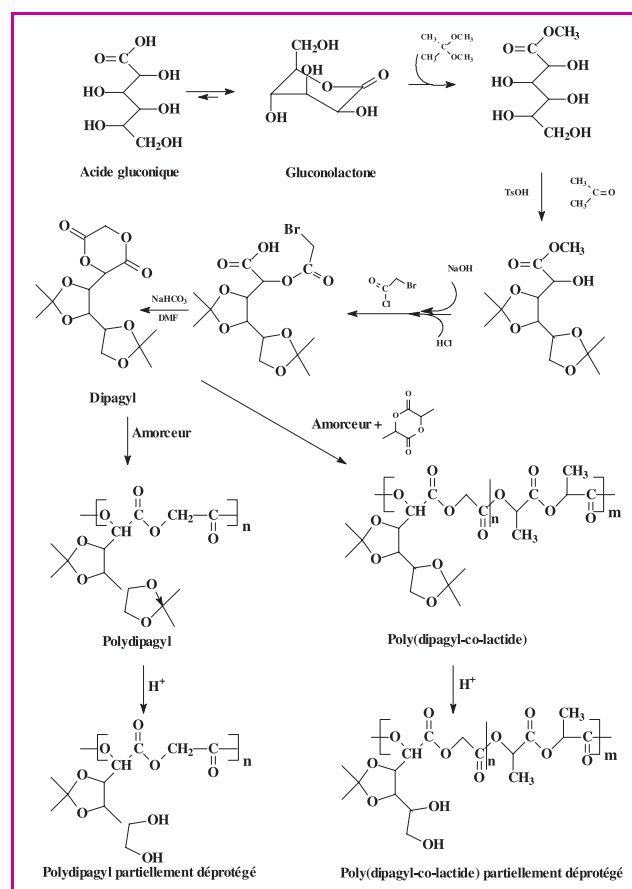


Figure 5.

malique) constitué. Il se trouve que l'hydrogénolyse partielle qui se produit sur catalyseur solide et le couplage chimique à l'aide de réactif de couplage conduisent à des distributions de motifs monomères différentes, et donc à des composés ayant des compositions globales identiques mais des propriétés macroscopiques différentes.

La modification d'un polymère constitué au niveau de la chaîne principale est une solution intéressante mais qui était restée pratiquement ignorée jusqu'à récemment. L'exploitation de la formation d'un carbanion par extraction d'un atome d'hydrogène mobile à l'aide du diisopropylamide de lithium (LDA), bien connue en chimie organique, a montré qu'une chaîne polyester aliphatique peut être activée sous forme polycarbanionique avant d'être combinée avec de nombreux électrophiles pouvant être mis en réaction seuls ou en mélanges pour générer des composés polymères nouveaux dérivés du même précurseur. C'est une voie que Jean Coudane a entrepris de prospecter au sein de notre UMR. La figure 6 présente le schéma réactionnel de base appliqué à un polyester aliphatique à chaîne principale non fonctionnalisée et peu sensible à l'hydrolyse chimique en raison de sa cristallinité et de sa forte hydrophobie [18]. La figure 7 montre quelques exemples d'exploitation de la méthode pour aboutir à des polymères à squelette PCL substitué pour être rendu hydrophile (COOH), fluorescent (naphtyl) ou radioactif (tritiation).

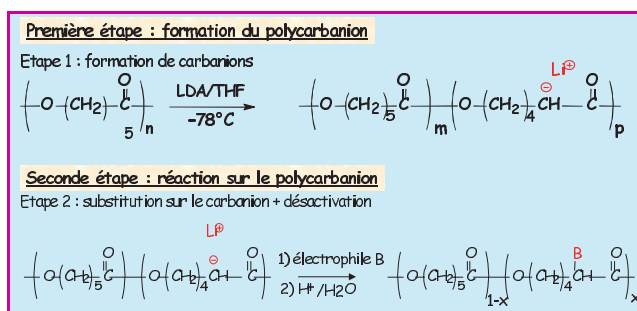


Figure 6 - Modification chimique de la poly(ϵ -caprolactone) par activation anionique au LDA.

Conclusion

La chimie des composés macromoléculaires est une spécialité en plein développement, au-delà des secteurs définis dans les premières décennies qui ont conduit aux polymères de commodité, techniques et de spécialité bien connus de nos jours (polyéthylène, polystyrène, polychlorure de vinyle, polyamides, polyesters...) et qui ont révolutionné notre vie quotidienne. La voie est grande ouverte à la recherche de systèmes macromoléculaires de plus en plus fonctionnalisés, afin de répondre à des applications de plus en plus spécifiques et exigeantes. Mais dans le domaine biomédical, le chimiste macromoléculaire ne peut pas tout faire. Surtout, il ne peut pas travailler uniquement en chimiste car la science des macromolécules et des matériaux polymères thérapeutiques ne peut pas être abordée sous le seul angle de la chimie. La physico-chimie des grandes molécules, la physique du solide et des solutions ou dispersions colloïdales polymères ainsi que la biologie sont des compléments indispensables à considérer simultanément sous peine de perdre son temps et son argent. C'est le domaine de la pluridisciplinarité par excellence.

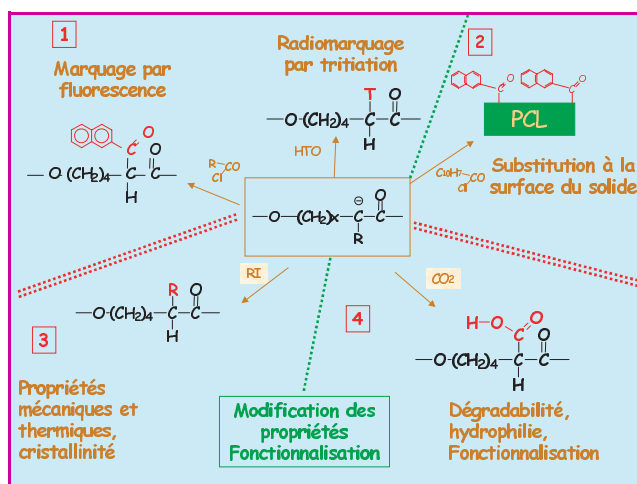


Figure 7 - Exemples de modification chimique de la poly(ϵ -caprolactone) réalisée via l'activation anionique au LDA.

Remerciements

L'auteur remercie très chaleureusement ses fidèles collaborateurs et tous ceux des disciplines complémentaires qui ont contribué ou contribuent à la prospection du domaine des applications biomédicales et pharmacologiques des polymères artificiels biorésorbables par l'UMR CNRS 5473.

Références

- [1] Odian G., *Principles of polymerization*, John Wiley & Sons Inc., New York, **1991**.
- [2] Szycher M., *Biocompatible polymers, Metals and Composites*, Technomics Publ. Co. Inc., USA, **1983**.
- [3] Jahan M.S., King M.C., Haggard W.O., Sevo K.L., Parr J.E., *Rad-Phys. Chem.*, **2001**, 62, p. 141.
- [4] Lens J.P., Terlingen J.G.A., Engbers G.H.M., Feijen J., *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.*, **1998**, p. 1829.
- [5] Vert M., *Biorelated Polymers: Sustainable Polymer Science and Technology*, E. Chiellini, H. Gil, G. Brauneegg, J. Buchert, P. Gatenholm, M. van der Zee (eds), Kluwer Acad./Plenum Publ., New York, **2001**, p. 63.
- [6] Vert M., *Controlled release of drugs from polymeric particles and macromolecules*, S.S. Davis & L. Illum, Wright IOP Publ. Ltd., Bristol, **1987**, p. 117.
- [7] Oppermann F.B., Pickartz S., Steinbuechel A., *Polym. Deg. Stab.*, **1998**, 59, p. 337.
- [8] Brannon-Peppas L., Vert M., *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, D.L. Wise, A. Kilbanov, A. Mikos, L. Brannon-Peppas, N.A. Peppas, D.J. Trantalo, G.E. Wnek, M.J. Yaszemski (eds), Marcel Dekker, New York, **2000**, p. 99.
- [9] Lee B.S., Vert M., Holler E., *Biopolymers-Polyesters I: Biological Systems and Biotechnological Production*, Y. Doi, A. Steinbüchel (eds), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, p. 75.
- [10] Yavuz H., Baba C., Tuzlakoglu K., Piskin E., *Polym. Degrad. Stab.*, **2002**, 75, p. 431.
- [11] Bae Y.H., Huh K.M., Kim Y., Park K., *J. Control. Rel.*, **2000**, 64, p. 3.
- [12] Kowalski A., Libiszowski J., Duda A., Penczek S., *Macromolecules*, **2000**, 33, p. 1964.
- [13] Vert M., *L'Act. Chim.*, **1992**, 9, p. 336.
- [14] Vert M., *CRC Critical Reviews-Therapeutic Drug Carrier Systems*, S.D. Bruck (ed.), CRC Press, Boca Raton, **1986**, p. 291.
- [15] Marcincinova-Benabdillah K., Boustta M., Coudane J., Vert M., *Biomacromolecules*, **2001**, 2, p. 1279.
- [16] He B., Bei J., Wang S., *Polymer*, **2003**, 44, p. 989.
- [17] Li S., Vert M., *The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, E. Mathiowitz (ed.), John Wiley & Sons, New York, **1999**, p. 71.
- [18] Ponsart S., Coudane J., Vert M., *Biomacromolecules*, **2000**, 1, p. 275.



Michel Vert

est directeur de recherche CNRS et dirige le Centre de recherche sur les biopolymères artificiels à la faculté de pharmacie de Montpellier*.

* Centre de recherche sur les biopolymères artificiels, UMR CNRS 5473, Université Montpellier 1, Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 05. Tél. : 04 67 41 82 60. Fax : 04 67 52 08 98. Courriel : vertm@univ-montp1.fr

La vectorisation de pièges à radicaux libres

Nouvelle stratégie thérapeutique

Grégory Durand, Ange Polidori et Bernard Pucci

Abstract Spin-traps vectorization: new therapeutic strategy

Nowadays, it is well admitted that free radicals take place in a lot of natural cells process, but also in various diseases. This review set the record straight about the actual knowledge of free radical involvements in biological and therapeutic fields and the synthetic process able to inhibit their harmful effects in the organism. The synthetic antioxidants or spin-traps molecules currently proposed to reduce or to trap the free radicals are described. Among them, the efficiency of nitrones derived spin-traps and the potentialities of their vectorization to the cytoplasmic or the membrane areas by using amphiphilic carriers are underlined.

Mots-clés

Vectorisation, amphiphile, PBN, « spin-traps », antioxydants, radicaux libres.

Key-words

Vectorization, amphiphile, PBN, spin-traps, antioxidants, free radicals.

Du fait de leur haute réactivité, les espèces oxygénées réactives (EOR) sont responsables de nombreux dommages vis-à-vis des constituants cellulaires. Cette production d'espèces délétères est généralement équilibrée par leur consommation à vitesse égale par le système antioxydant endogène. La rupture de l'équilibre entre espèces pro- et anti-oxydantes est désignée par le terme de **stress oxydant**. Il est maintenant admis que le phénomène de stress oxydant est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington), de désordres pathologiques (syndrome d'ischémie-reperfusion), mais également dans les phénomènes de vieillissement.

En raison de l'implication des radicaux libres dans ces diverses pathologies, les recherches dans la conception de nouvelles molécules pouvant pallier un déficit du système de protection naturel antiradicalaire se sont largement intensifiées. Dans un premier temps, les chimistes ont développé des analogues des antioxydants naturels en les modifiant chimiquement afin d'augmenter leurs propriétés de piégeage des radicaux libres. Ils se sont ensuite intéressés à la mise au point de pièges plus spécifiques basés sur la réactivité particulière de certains groupements chimiques tels que les fonctions nitrones vis-à-vis des espèces radicalaires. Une des difficultés majeures d'une telle approche est de disposer de molécules biocompatibles aptes à franchir les membranes physiologiques et à atteindre leur site d'action. Dans cet article, nous aborderons les propriétés particulières des pièges à radicaux libres de type nitrone vis-à-vis d'un certain nombre de pathologies liées au stress oxydant et l'intérêt que peut représenter leur vectorisation à des fins thérapeutiques.

Les nitrones : des pièges à radicaux libres performants

Les **nitrones** sont des composés qui ont été initialement utilisés pour piéger des radicaux libres dont la durée de vie

était trop courte pour permettre leur observation directe en résonance paramagnétique électronique (RPE). La technique de piégeage de spin ou « spin-trapping » consiste à additionner au système étudié une molécule diamagnétique qui va servir de piège et qui va réagir de façon très rapide avec le radical pour donner un adduit de spin beaucoup plus stable et détectable en milieu physiologique. Les nitrones réagissent avec le radical libre par l'intermédiaire du carbone situé en position α de l'atome d'azote pour donner un adduit de spin particulièrement stable et persistant en raison de la présence d'une liaison π à 3 électrons entre l'atome d'azote et l'oxygène (schéma 1).

Glossaire

Capacité anti-apoptotique

Capacité à réduire ou supprimer le processus de mort cellulaire programmée appelé apoptose, processus qui permet de limiter la taille des populations cellulaires et d'éliminer certaines cellules indésirables. La surproduction de radicaux libres dans une cellule peut être un facteur déclenchant du phénomène d'apoptose.

Capacité antioxydante

Capacité d'une molécule à réduire ou supprimer l'oxydation des composés biologiques par les radicaux libres ou toutes molécules pro-oxydantes.

Étiologie

Recherche des causes d'une maladie.

Molécule diamagnétique

Molécule dont les orbitales ne possèdent pas d'électron non apparié.

Peroxydation lipidique

Processus d'oxydation des chaînes lipidiques insaturées conduisant à la formation d'un intermédiaire réactionnel peroxydique instable dont la décomposition entraîne la coupure de la molécule.

Radical libre

Atome ou molécule dont une orbitale au moins contient un électron non apparié. Un radical libre est une espèce douée de paramagnétisme lié au moment magnétique de spin de l'électron non apparié présentant une très grande réactivité.

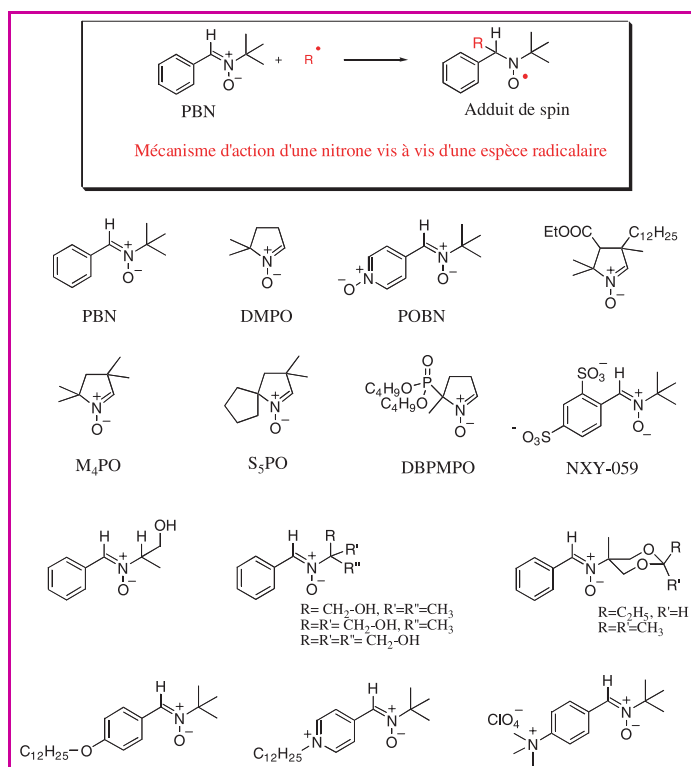


Schéma 1 - Technique de piégeage de spins et structures de quelques nitrones.

Les nitrones habituellement utilisées en spin-trapping sont l' α -phényl-*N-tert*-butylnitronne (PBN), la 5,5-diméthylpyrroline-*N*-oxyde (DMPO) et l' α -(pyridyl-1-oxyde)-*N-tert*-butylnitronne (POBN) (schéma 1).

Idéalement, en imagerie médicale, une molécule piège doit rester pharmacologiquement inerte. Or en 1986, Novelli et son équipe ont découvert que la PBN avait une influence considérable sur le métabolisme et la durée de vie de rats exposés à une endotoxine [1]. Ces résultats ont pu être confirmés par la suite et ont poussé la communauté scientifique à étudier le potentiel thérapeutique de la PBN dans diverses affections impliquant l'apparition de radicaux libres. A haute concentration, la PBN présente des effets protecteurs potentiels remarquables dans divers modèles expérimentaux. Les effets neuroprotecteurs sont actuellement les plus étudiés et font de la PBN un agent potentiellement utilisable dans de nombreuses pathologies associées à une mort neuronale par apoptose [2]. L'effet anti-apoptotique de la PBN est maintenant parfaitement admis [3]. Après injection intra-péritonéale chez le rat, elle est rapidement répartie dans tout l'organisme. En outre, son effet anti-inflammatoire renforce ses potentialités protectrices et neuroprotectrices [4]. Sa toxicité directe est très réduite, mais ses produits d'hydrolyse (benzaldéhyde et *tert*-butyl hydroxylamine) peuvent présenter une toxicité à plus long terme. Même si actuellement son mode d'action n'est pas encore parfaitement compris, de nombreux auteurs ont tenté d'améliorer les propriétés protectrices et la biodisponibilité de la PBN en réalisant des analogues de synthèse, potentiellement moins toxiques.

Les analogues de la PBN

De nombreux travaux ont été consacrés à la modification structurale de la PBN. Dans un premier temps, ceux-ci se

sont résumés à des modifications assez simples visant à moduler la biodistribution du piège par la variation de sa balance hydrophile-lipophile. Des modifications chimiques ont ainsi été réalisées sur les parties *N* terminales et aromatiques (schéma 1). Cependant, ces transformations se sont accompagnées généralement d'une diminution des capacités de piégeage de spin de ces molécules. De plus, peu de résultats biologiques probants ont été obtenus à partir de ces différents composés. Les recherches se sont donc orientées vers la synthèse de dérivés de la PBN présentant une meilleure aptitude à piéger les radicaux libres.

Les modifications chimiques ont essentiellement eu pour objectif d'améliorer les capacités de piégeage de la PBN, soit en augmentant la stabilité des adduits formés, soit en rigidifiant la fonction nitronne par cyclisation. C'est ainsi que la nitronne dérivée du guaiazulène (schéma 2) a la propriété de stabiliser plus efficacement l'adduit de spin formé et présente d'excellentes propriétés antioxydantes voisines de celle de la vitamine E, faisant de ce dérivé un puissant antioxydant de rupture de chaîne contrairement à la PBN [5]. Dhainault *et al* [6] ont mis au point la synthèse de dérivés comportant un motif imidazole dans le but de stabiliser les adduits de spin et de les rendre les moins réactifs possible vis-à-vis des constituants cellulaires les entourant. Les nitrones substituées par un groupement adamantane possèdent quant-à-elles une efficacité accrue de spin-trapping, mais présentent une très faible solubilité dans l'eau.

Constatant que lorsque la fonction nitronne présente une forte rigidité et une plus grande co-planéité, elle piège les radicaux libres de manière plus efficace, Thomas *et al* [7] ont préparé des PBN cycliques (schéma 2). Ces composés ont la faculté de piéger plus facilement les radicaux et diminuent le phénomène de peroxydation lipidique.

Notons enfin qu'actuellement, la société AstraZeneca teste en phase clinique 3, un dérivé disulfonate de la PBN, le NXY-059, pour le traitement des attaques cérébrales.

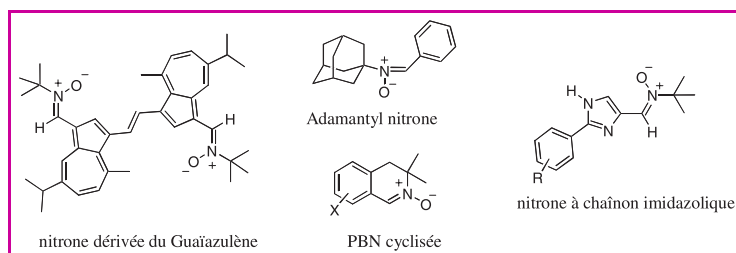


Schéma 2 - Nouvelle génération de nitrones permettant une stabilisation accrue des adduits de spin.

Vectorisation de la PBN : une nouvelle stratégie de lutte antioxydante

Les travaux concernant l'amélioration de l'activité thérapeutique de la PBN ont été en fait principalement axés sur l'augmentation de sa capacité de piégeage. Mais toutes les recherches actuelles démontrent que l'efficacité biologique d'un actif est fortement influencée par la modulation de sa balance hydrophile-lipophile et sa biodisponibilité. En effet, la PBN présente un potentiel thérapeutique indéniable, mais de fortes concentrations

doivent être utilisées en raison de sa faible aptitude à franchir les systèmes membranaires et à se répartir dans les compartiments cytosoliques. Par ailleurs, l'augmentation de la lipophilie de la molécule peut influencer considérablement sa capacité à traverser les membranes phospholipidiques, et donc à investir le compartiment cytoplasmique pour y jouer le rôle d'antioxydant. Tous les outils permettant une amélioration notable de la biodisponibilité tissulaire et cellulaire d'un actif comme la PBN peuvent être regroupés sous le terme de systèmes de vectorisation.

Deux objectifs thérapeutiques peuvent être poursuivis lors de l'élaboration d'un antioxydant : une protection physiologique vis-à-vis soit des radicaux produits à l'intérieur du compartiment cellulaire, soit des espèces radicalaires exogènes circulantes provenant d'une source externe à la cellule. Dans le premier cas, pour augmenter son efficacité, il apparaît nécessaire de favoriser la répartition intra-cytoplasmique du piège à radicaux ; dans l'autre, l'objectif essentiel sera sa localisation dans les membranes phospholipidiques.

Vectorisation par des transporteurs amphiphiles monocaténaire

Afin de favoriser le passage transmembranaire et donc la pénétration de la PBN dans la cellule, celle-ci doit être dotée d'un caractère amphiphile marqué, par le greffage d'une chaîne carbonée hydrophobe et d'une entité hydrophile. Une telle structure apporte à la molécule des propriétés tensioactives. En ce qui concerne la partie hydrophobe, la fixation d'une chaîne perfluorocarbonée est le choix le plus évident à faire car il permet d'éviter les problèmes de détergence membranaire et de cytotoxicité communément observés avec les tensioactifs hydrocarbonés. Pour la partie hydrophile, qui apporte l'hydrosolubilité nécessaire à la molécule, pour les mêmes raisons de biocompatibilité, l'utilisation de motifs glycosidiques non ioniques semble être le meilleur compromis. Dans cette optique, en collaboration avec l'UMR 6517 que dirige le professeur P. Tordo, nous avons mis au point un dérivé amphiphile de la PBN, la TA1PBN [8]. La partie aromatique de la PBN a été fonctionnalisée par un fragment amphiphile perfluorocarboné muni de deux motifs galactose (schéma 3). Une telle modification de la structure de la PBN permet de conserver ses capacités de piégeage de spin.

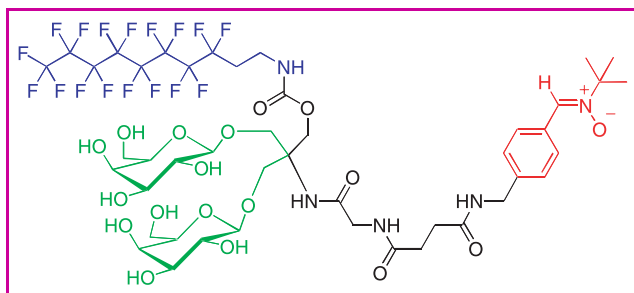


Schéma 3 - Structure de la TA1PBN.

La capacité antioxydante et anti-apoptotique de ce type de composés a été testée à l'hôpital Necker, dans le service du Dr P. Rustin, sur des fibroblastes provenant de patients atteints d'une maladie mitochondriale, « neurogenic ataxia pigmentosa » (NARP), initiée par une mutation du gène codant pour une protéine du complexe enzymatique V

de la chaîne mitochondriale. Ces fibroblastes présentent une importante surproduction d'enzymes superoxyde dismutase (SOD), et l'état de stress oxydant généré par cette mutation est accompagné d'une mort cellulaire par apoptose. Aucun antioxydant classique, y compris la PBN, ne présente d'activité de protection vis-à-vis de ces fibroblastes, alors que la TA1PBN provoque une baisse considérable de l'activité SOD et une forte diminution du pourcentage des cellules présentant une fragmentation de l'ADN (donc en état d'apoptose) [9]. Il apparaît dès lors évident que la structure amphiphile de la PBN est probablement un atout majeur pour sa pénétration intracellulaire et son approche du système membranaire mitochondrial.

Une nouvelle génération de PBN amphiphile dotée d'une structure plus simple, donc plus facile à synthétiser, a été ensuite développée [10]. Afin de pouvoir déterminer les éléments structurels influant sur la capacité antioxydante de ces composés, il était indispensable de pouvoir réaliser des modulations structurales de manière aisée grâce à l'utilisation d'un schéma de synthèse facile à mettre en œuvre.

Dans ce but, le motif PBN a été introduit au cœur même de la structure de transport amphiphile. Le motif nitron apparaît alors non seulement comme la fonction active, mais également comme un bras de liaison entre parties polaire et apolaire de la molécule amphiphile (schéma 4).

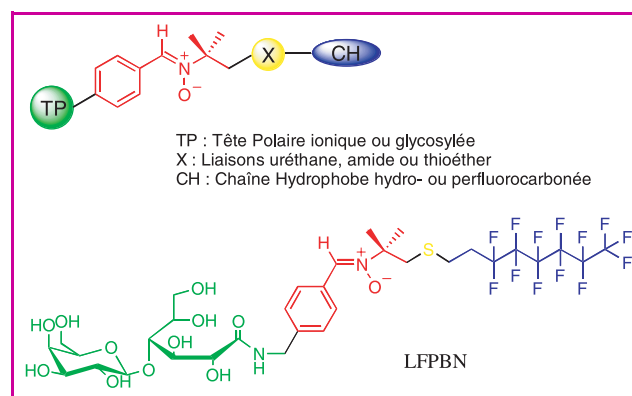


Schéma 4 - Structure générale des nitrones amphiphiles monocaténaire.

Les mesures RPE ont clairement montré que l'introduction de la partie nitron au cœur de la molécule n'inhibe en rien sa capacité à piéger les radicaux libres [11]. Par ailleurs, la chaîne hydrophobe fluorocarbonée ne confère aucun pouvoir détergent à ces molécules et de ce fait n'introduit aucune cytotoxicité limitant leur utilisation thérapeutique. Leur capacité à limiter ou à bloquer le phénomène d'apoptose et la dégradation des constituants cellulaires par des espèces radicalaires oxygénées a été évaluée sur différents systèmes cellulaires. Les tests réalisés sur des fibroblastes atteints du syndrome NARP se sont révélés tout aussi positifs qu'avec le composé TA1PBN. De plus, alors que la PBN est inactive, les dérivés de type LFPBN (schéma 4) réduisent très fortement, à une concentration de 100 μ M, le phénomène d'apoptose provoqué par l'exposition de neurones corticaux de rat à une solution d'eau oxygénée. Enfin, lorsque des globules rouges sont mis au contact des composés de type LFPBN (à des concentrations inférieures à 100 μ M), le processus hémolytique généralement observé lors d'un stress oxydant

induit par initiation radicalaire est inhibé [12]. Ces résultats démontrent d'une part l'importance du facteur amphiphile sur l'efficacité biologique de ces composés, mais également le potentiel thérapeutique très important des dérivés amphiphiles de la PBN.

Vectorisation par des transporteurs amphiphiles bicaténaires

Afin de favoriser une insertion du piège à radicaux libres dans la membrane cellulaire lipidique et la protéger des agressions radicalaires externes, des **analogues bicaténaires** de ces composés ont été préparés (schéma 5) [13].

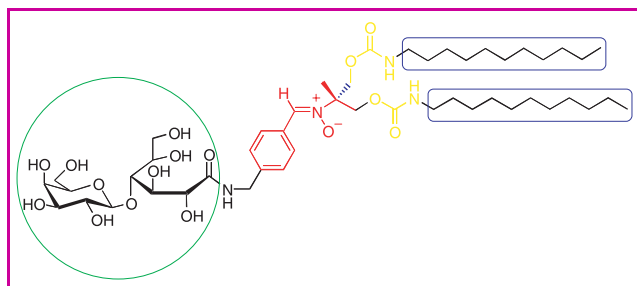


Schéma 5 - Structure d'une nitronne bicaténaire.

De tels composés sont miscibles avec des films phospholipidiques et limitent très fortement l'oxydation des phospholipides naturels insaturés lorsque ces derniers sont soumis aux effets d'une source oxydante radiative. Ils révèlent en effet une efficacité largement supérieure aux plasmalogènes qui sont des structures lipidiques naturelles spécialisées dans la protection des membranes vis-à-vis des agressions radicalaires. De ce fait, de telles structures sont susceptibles d'induire une protection cellulaire vis-à-vis d'une source oxydante exogène et de trouver, dès lors, des applications intéressantes aussi bien dans le domaine thérapeutique que cosmétologique.

Conclusion

L'intervention des radicaux libres oxygénés dans les phénomènes d'apoptose et d'oxydation cellulaire est maintenant démontrée. Leur implication dans des maladies aussi graves que l'athérosclérose, la nécrose cellulaire lors des brûlures graves ou les maladies neurodégénératives, est plus que soupçonnée. De ce fait, la mise au point de systèmes capables d'inhiber leurs effets délétères ou de les piéger est devenue un sujet de recherche majeur. De nombreuses molécules dites antioxydantes ou antiradicalaires ont été proposées et ont montré une

excellente activité *in vitro*. Par contre, leur activité *in vivo* est dans bien des cas sérieusement limitée par leur toxicité, leur biodistribution inadéquate ou leur accumulation dans certains tissus. De ce fait, la modulation des propriétés physico-chimiques, ou mieux, le transport de ces structures antioxydantes ou antiradicalaires par des systèmes vectoriels adaptés et choisis en fonction du site d'action ciblé, apparaît comme un sujet de recherche majeur dans les années à venir.

Références

- [1] Angiolini P., Consales G., Lippi R., Tani R., Novelli G.P., *Oxygen Free Radicals in Shock*, G.P. Novelli, F. Ursini (eds), Krager Basel, **1986**.
- [2] Nakao N., Brundin P., *Neuroscience*, **1997**, *76*, p. 749.
- [3] Li P.A., He Q.P., Nakamura L., Csiszar K., *Free Rad. Biol. Med.*, **2001**, *37*, p. 1191.
- [4] Kotake Y., Sang H., Miyajima T., Wallis G.L., *Biochem. Biophys. Acta*, **1998**, *1448*, p. 77.
- [5] Becker D.A., Ley J.J., Etchegoyen L., Alvarado R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, p. 4678.
- [6] Dhainaut A., Tizot A., Raimbaud E., Lockhart B., Lestage P., Goldstein S., *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, p. 2165.
- [7] Thomas C.E., Ohlweiler D.F., Carr A.A., Nieduzak T.R., Hay D.A., Adams G., Vaz R., Bernotas R.C., *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, p. 3097.
- [8] Ouari O., Polidori A., Pucci B., Tordo P., Chalier F., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, p. 3554.
- [9] Geromel V., Kadhom N., Cebalos-Picot I., Ouari O., Polidori A., Munnich A., Rotig A., Rustin P., *Hum. Mol. Genet.*, **2001**, *10*, p. 1221.
- [10] Durand G., Polidori A., Salles J.-P., Pucci B., *Bio. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *13*, p. 859.
- [11] Durand G., Polidori A., Ouari O., Tordo P., Geromel V., Rustin P., Pucci B., *J. Med. Chem.*, sous presse.
- [12] Durand G., Polidori A., Salles J.-P., Prost M., Durand P., Pucci B., *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2003**, *13*, p. 2673.
- [13] Morandat S., Durand G., Polidori A., Desigaux L., Bortolato M., Roux B., Pucci B., *Langmuir*, sous presse.



G. Durand

Grégory Durand¹ et **Ange Polidori**² sont maîtres de conférences et **Bernard Pucci**³ est professeur au Laboratoire de chimie bioorganique et des systèmes moléculaires vectoriels d'Avignon*.



A. Polidori



B. Pucci

* Laboratoire de chimie bioorganique et des systèmes moléculaires vectoriels, Faculté des Sciences, Université d'Avignon, 33 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon.
Fax : 04 90 14 44 49.

¹ Tél. : 04 90 14 44 45.

Courriel : gregory.durand@univ-avignon.fr

² Tél. : 04 90 14 44 45.

Courriel : ange.polidori@univ-avignon.fr

³ Tél. : 04 90 14 44 42.

Courriel : bernard.pucci@univ-avignon.fr

Chères lectrices, Chers lecteurs,

L'enquête à laquelle vous avez été nombreux à répondre nous a montré, entre autres, que vous teniez à ce que *L'Actualité Chimique* continue à publier les rubriques *Brèves scientifiques*, *Informations générales*, *Manifestations*, *Livres et médias* et *Activités de la SFC*. Nous nous excusons auprès de vous de ne pas avoir été en mesure de publier régulièrement ces rubriques dans nos derniers numéros, du fait d'un impératif du nombre de pages.

En 2004, la rédaction fera tout son possible pour que ces rubriques continuent à vivre dans nos colonnes. D'autre part, les résultats de l'enquête seront publiés prochainement.

La rédaction

Multicouches de polyélectrolytes dans le domaine des biotechnologies

Jean-Claude Voegel, Gero Decher et Pierre Schaaf

Abstract

Polyelectrolyte multilayer films in the biotechnology field

Multilayered self assembled polyelectrolyte films result from a simple dipping process in which polycations and polyanions are alternatively adsorbed on a charged surface. The physico-chemical properties of the resulting architectures can be largely modified by varying the number of deposited layers, by changing the nature of the polyelectrolytes, the pH or the ionic strength... Fonctionnalization for biomedical uses of the constructions can be undertaken by protein or drug « embedding » or by the « insertion » of covalently bound peptides in the architectures. The large versatility of the concept allows numerous applications in the biomedical field going from the modification of biomaterial surfaces to the construction of enzymatic nanoreactors in which a cascade of reactions can be induced.

Mots-clés

Multicouches, polyélectrolytes, auto-assemblage, fonctionnalisation.

Key-words

Multilayers, polyelectrolytes, self assembling, functionalization.

L'objectif de cet article est de faire une revue des possibilités de modification des propriétés de surfaces de biomatériaux par le biais d'assemblages moléculaires constitués de multicouches de polyélectrolytes.

« *La nature de la surface d'un biomatériau assure le contrôle des processus impliqués dans la réponse biologique* ». Cette affirmation de B. Ratner [1] définit largement les objectifs dans un domaine dont l'importance croît d'années en années. L'augmentation des exigences en terme de qualité et la maîtrise des coûts dans le secteur médical nécessitent une mise au point constante d'approches nouvelles. Tout objet interagit avec son environnement *via* sa surface et toutes les interactions avec l'environnement sont dictées par les propriétés surfaciques. Un ajustement des propriétés de surface d'un matériau permet également le contrôle de l'interaction avec le milieu environnant. Cet aspect est essentiel dans des domaines tels que les biomatériaux et la biotechnologie qui nécessitent des méthodes de modification de surface capables d'être utilisées en milieu aqueux et répondant aux contraintes particulières du secteur de la santé. Ces films concernent notamment le contrôle des processus d'interactions avec les cellules (adhérence ou non-adhérence), de libération de médicaments ou plus généralement de la conception de surfaces biomimétiques. Nous décrivons dans cet article une technologie nouvelle, souvent appelée dépôt couche par couche (cpc) qui commence réellement à marquer de son empreinte le domaine des sciences des matériaux et de la vie [2].

La méthode cpc est simple et permet de réaliser des assemblages supramoléculaires sur tout substrat chargé. Elle a été proposée il y a une dizaine d'années [3-4]. Ces assemblages sont réalisés par des trempages successifs du support alternativement dans une solution de polyanion et de polycation. Une étape de rinçage sépare généralement deux dépôts successifs. Le moteur de la croissance de ces films, également appelés multicouches de polyélectrolytes,

réside dans l'excès de charges qui apparaît après chaque nouveau dépôt d'un polyélectrolyte et qui permet ainsi une nouvelle interaction avec le polyélectrolyte de signe opposé. L'apparition de cet excès de charge a été démontrée par l'alternance du signe du potentiel zêta de la surface au cours

Glossaire

Anti-thrombine

Molécule inhibitrice de la coagulation.

Cellules de mélanome

Cellules cancéreuses dérivant des cellules pigmentaires de la peau.

Chondrosarcome

Cellule cancéreuse du cartilage.

Chymotrypsine

Enzyme digestive ; sérine protéase.

Échinocyte

Cellule du sang, de forme sphérique.

IgG (immunoglobuline G)

Molécule d'anticorps de la classe G (protéine de la réponse immunitaire adaptative produite par les lymphocytes B en réponse à une stimulation antigénique).

Laminine

Protéine fibrillaire structurant la matrice extracellulaire et constitutive des membranes basales.

Monocytes

Cellules sanguines mononuclées précurseurs des macrophages.

Myoblaste

Cellule précurseur des cellules du muscle squelettique.

Ostéoblaste

Cellule sécrétrice de matrice osseuse.

Phéochromocytomes

Cellules cancéreuses des glandes surrénales.

Potentiel zêta

Il traduit la densité de charges à l'interface film/solide.

Protéine A

Protéine staphylococcique modulatrice du système immunitaire (à propriétés antitumorales).

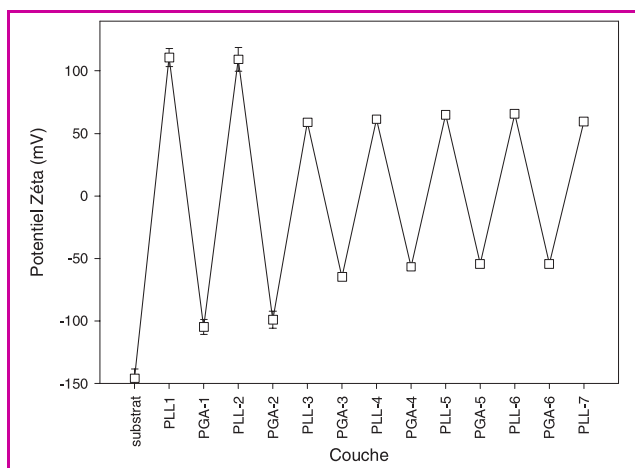


Figure 1 - Évolution du potentiel zêta lors de la construction d'un film de type (PLL/PGA)_n.

Après chaque dépôt de polyélectrolyte, le potentiel zêta change de signe ce qui démontre la surcompensation de charge.

de la construction de tels films [5] (figure 1). La croissance d'une multicouche peut ainsi se poursuivre de façon quasi illimitée. Cette méthode de traitement des surfaces présente de nombreux avantages par rapport à des technologies développées dans le passé telles que les films de Langmuir-Blodgett : elle est simple d'utilisation, s'applique quelle que soit la géométrie du support et ne met généralement en œuvre que des solutions aqueuses. Enfin, elle permet de fonctionnaliser les supports de façon très générale par insertion de molécules ou de particules dans l'architecture au cours de la construction. Cette fonctionnalisation s'effectue généralement par simple adsorption ou insertion comme nous allons le voir.

Au cours de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes, sa masse et son épaisseur augmentent avec le nombre de dépôts réalisés. Cette croissance n'est cependant pas toujours linéaire avec le nombre de cycles. On peut ainsi distinguer entre les films à croissance linéaire et ceux à croissance exponentielle. Les premiers sont construits dans des conditions telles que lors de chaque dépôt, le polyélectrolyte de la solution n'interagit qu'avec le polyélectrolyte de charge opposée constituant la surface externe du film [4]. De telles conditions sont remplies lorsque les polyélectrolytes ne peuvent pas diffuser vers l'intérieur du film, notamment en raison de leur trop forte densité. Ces constructions conduisent à des architectures pseudo-stratifiées donnant naissance à des pics de Bragg en réflectivité des neutrons lorsque des polyélectrolytes deutérés sont utilisés lors des différentes étapes de la construction [4-6]. Le système polystyrène sulfonate/poly(allylamine) (PSS/PAH) constitue l'un des exemples les plus étudiés de ce type de multicouche (figure 2). L'épaisseur, la densité, la rugosité et la structure des films peuvent être variées quasiment à volonté en changeant les paramètres physico-chimiques lors de la construction. En utilisant des polyacides et des polybases faibles, il est possible de faire varier l'épaisseur de chaque nouveau dépôt de moins d'un nanomètre à quelques dizaines de nanomètres en ajustant le pH de la solution de polyélectrolytes [7]. Ainsi, lorsque l'un au moins des deux polyélectrolytes est faiblement chargé, il interagit avec le polyélectrolyte de charge opposée en formant des boucles. L'épaisseur d'une bicouche (polyanion/polycation) devient

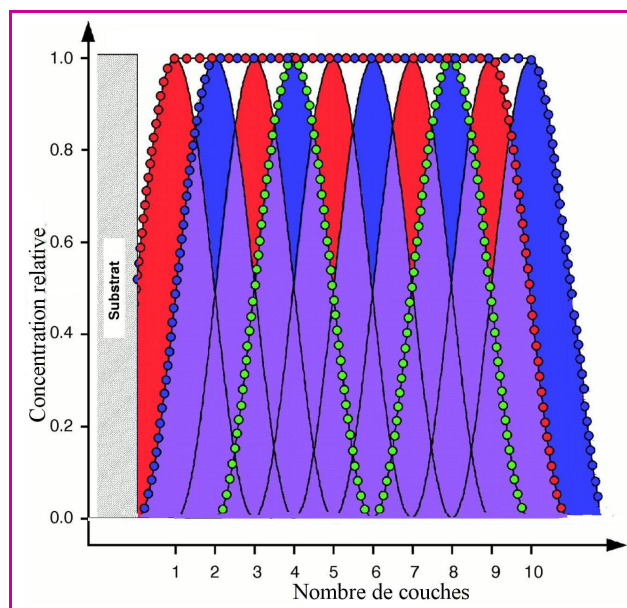


Figure 2 - Représentation schématisée d'un film multicouche à croissance linéaire composé de 10 couches.

Les concentrations en polyanion et en polycation sont arbitrairement représentées par un profil sinusoidal.

alors plus importante. De tels films sont généralement très hydratés. De manière comparable, l'augmentation de la force ionique des solutions de polyélectrolytes lors de la construction des multicouches conduit à des films plus épais à cause de la diminution de la répulsion entre les groupes chargés dans une même chaîne [5]. Une fois formé, un tel film peut se restructurer, notamment gonfler s'il est rincé par une solution dont la teneur saline est plus faible que celle utilisée lors de sa construction [5]. L'effet inverse est observé lorsque le rinçage est effectué à l'aide d'une solution dont la teneur saline est plus élevée. La rugosité d'un film peut également être modifiée en changeant les conditions de salinité et de pH lors de sa construction. Mendelsohn et coll. ont démontré qu'il était possible d'induire une morphologie microporeuse dans des multicouches de polyélectrolytes faibles en les soumettant à de fortes variations de pH après leur construction, la taille modulable des pores étant typiquement de l'ordre de 100 à 500 nm [8]. Ces processus résultent de changements de l'ionisation des polyélectrolytes au sein des films, ce qui conduit à d'importantes réorganisations locales des structures du film. Plus récemment, des films à croissance exponentielle ont également été décrits [9-10]. Cette propriété permet, dans certains cas, d'obtenir des multicouches dont l'épaisseur peut dépasser plusieurs micromètres après le dépôt seulement d'une dizaine de bicouches (polyanion/polycation). Des films construits à l'aide de polypeptides comme poly-(L-lysine)/acide poly-glutamique (PLL/PGA), de polyélectrolytes naturels comme chitosan/acide hyaluronique (Chi/HA) ou encore PLL/HA constituent des exemples types. L'utilisation de la microscopie confocale liée à un marquage fluorescent a permis de démontrer que ce type de croissance est généralement associé à la diffusion à travers l'ensemble de l'édifice, lors de chaque étape de la construction d'au moins un des deux polyélectrolytes constituant le film [11] (figure 3).

Le mécanisme de croissance exponentielle proposé est schématisé sur la figure 4 dans le cas où le polycation est

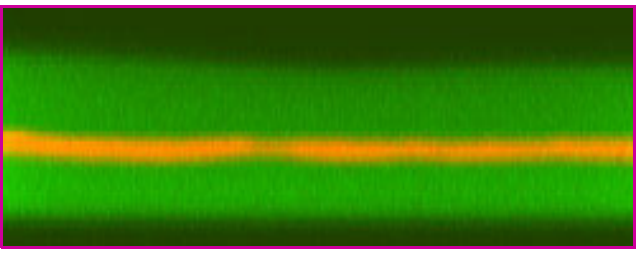


Figure 3 - Film de $(PLL/PGA)_{18}-(PLL/HA_{TR})-(PLL_{FITC}-HA)-(PLL/HA)_5$. HA_{TR} correspond au HA marqué au rouge de Texas (rouge) et PLL_{FITC} correspond à la PLL marquée à la fluorescéine isothiocyanate (vert). L'ensemble du film apparaît en vert à cause de la diffusion de PLL_{FITC} . La bande jaune correspond à la présence simultanée de HA_{TR} et de PLL_{FITC} . La localisation de HA_{TR} prouve que HA ne diffuse pas à travers le film.

uniquement susceptible de diffuser comme pour le système PLL/HA. Brièvement, en mettant la multicouche qui était préalablement au contact avec la solution de polyanions, au contact de la solution de polycations, ces derniers vont à la fois interagir avec l'excès de charges négatives distribuées sur la surface extérieure du film et conduire ainsi à la formation d'un excès de charges positives, et diffuser à l'intérieur du film pour former un réservoir de polycations « libres ». Lorsque la solution de polycations est remplacée par le tampon pur lors de la phase de rinçage, seule une partie des polycations libres du film diffuse hors de la multicouche. Cette libération partielle résulte de l'excès de charges positives qui reste à la surface du film créant une barrière de potentiel. Celle-ci empêche une partie des polycations de quitter la multicouche. Lorsque le film est ensuite mis au contact avec la solution de polyanions, ceux-ci interagissent avec l'excès de charges positives faisant ainsi disparaître la barrière de potentiel positive. Les polycations libres restant dans le film diffusent alors vers l'extérieur. Dès leur arrivée au voisinage de l'interface entre le film et la solution, ils sont complexés par les polyanions. Ces complexes font partie intégrante de la nouvelle couche la plus externe du film. La masse de cette nouvelle couche est proportionnelle à la quantité de polycations restant libres dans le film après la phase de rinçage. Cette quantité est elle-même en première approximation proportionnelle à l'épaisseur du film, ce qui conduit à une croissance de type « exponentiel ».

Quel que soit le type de multicouches, la construction résulte de l'interaction entre des polyanions et des polycations. Le mélange de ces mêmes polyélectrolytes en solution conduit à la formation de complexes de polyélectrolytes. La structure locale des films doit donc être très voisine de celle des complexes en solution. Une telle démonstration a été apportée récemment pour des systèmes de polypeptides dont les complexes en solution possèdent des structures secondaires (hélices α , feuillets β) analogues à celles des protéines [12]. Les applications potentielles des multicouches de polyélectrolytes sont nombreuses et touchent des domaines aussi variés que l'optique non linéaire, l'optoélectronique ou les biomatériaux. C'est ce dernier type d'applications que nous allons décrire dans la suite de cet article.

Surfaces non adhérentes

La mise au point de surfaces ou d'interfaces qui résistent à l'adsorption protéique et/ou à l'adhérence

cellulaire constitue un objectif majeur pour l'élaboration de matériaux destinés à être mis au contact du milieu sanguin, aussi bien pour les implants médicaux que pour les biosenseurs. Des matériaux sur lesquels sont greffées des chaînes de poly(éthylène-glycol) (PEG) ont souvent été considérés comme particulièrement bien adaptés pour atteindre cet objectif. Les méthodes de préparation de telles surfaces sont cependant lourdes et ne sont pas applicables à tous les types de supports et toutes les géométries. En 1999, Elbert et coll. ont déposé des multicouches alginate/PLL sur des supports solides de gélatine, de matrice extracellulaire produite par des fibroblastes ou de collagène de type I [9]. Ces films constituaient un premier exemple de multicouches à croissance exponentielle possédant des propriétés de bio-inertie vis-à-vis de fibroblastes humains. D'autres multicouches à base de polysaccharides comme PLL/HA et Chi/HA se sont depuis également révélées non adhérentes vis-à-vis de cellules de chondrosarcome [13] ou d'ostéoblastes. Récemment, Mendelsohn et coll. ont pu démontrer des propriétés de contrôle d'adhérence vis-à-vis d'une lignée de fibroblastes NR6WT pour des constructions de multicouches réalisées à partir de PAH et d'acide polyacrylique (PAA) [14]. En faisant varier les conditions de pH lors de la construction des films, ils ont généralement noté une bonne adhérence cellulaire. De façon surprenante, des films pour lesquels le polyanion et le polycation étaient déposés tous deux à pH 2,0 se sont montrés très résistants vis-à-vis de l'adhésion cellulaire, aussi bien lorsque le film s'achevait par la couche de polycation que de polyanion. Par ailleurs, les mêmes auteurs n'ont observé aucune corrélation entre l'adhérence des cellules et l'adsorption de protéines, comme le fibrinogène ou le lysozyme, sur ces films. Un comportement similaire était noté vis-à-vis de ces mêmes cellules lorsque le PAA était remplacé par l'acide polyméthacrylique, le poly(styrène sulfonate) ou le chlorure de poly(diallyldiméthylammonium). Une corrélation directe entre le caractère non adhérent des films et leur capacité, une fois séchés, à gonfler lorsqu'ils sont remis au contact d'une solution aqueuse a été mise en évidence [14]. L'ensemble de ces résultats suggère que le caractère non adhérent d'une multicouche est directement lié à son degré d'hydratation. De plus, les mêmes auteurs démontrent l'absence de corrélation directe entre l'adsorption de protéines sur un film et sa non-adhérence vis-à-vis de

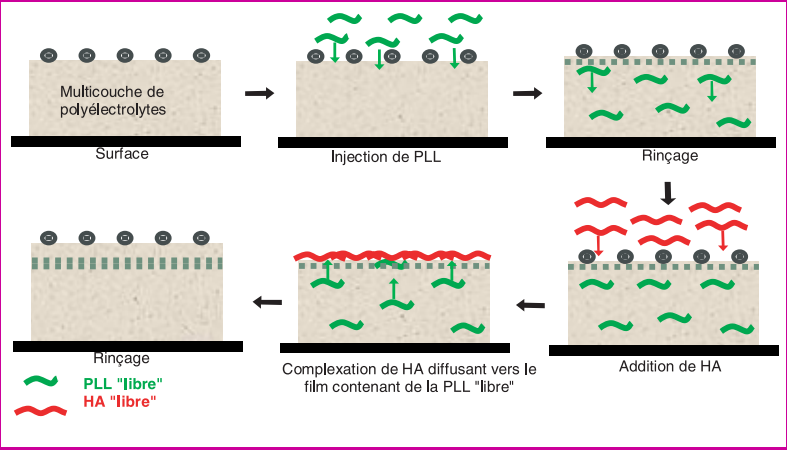


Figure 4 - Représentation schématique la construction d'un film à croissance exponentielle. Le cas représenté est celui d'un film de type $(PLL/HA)_n$ où PLL peut diffuser à travers le film alors que HA ne peut pas diffuser.

cellules. Ce dernier résultat remet en cause le postulat sur lequel étaient fondées toutes les études d'adsorption de protéines durant des dizaines d'années et qui stipulait que des surfaces non adhérentes devaient également être non adsorbantes.

Richert et coll. ont étudié par micromanipulation les forces d'adhésion entre des chondrosarcomes et des films de (PLL/PGA)_n [13]. Alors que pour des films s'achevant par PGA les forces d'adhésion sont très faibles, voire nulles, elles sont beaucoup plus importantes sur les films se terminant par PLL et décroissent avec *n*. Il a aussi été montré que de tels films peuvent empêcher l'adhésion et la prolifération de bactéries [15]. Ce résultat a été atteint à l'aide de films du type PLL/PGA terminés par trois bicouches de PLL/PGA-PEG. PGA-PEG sont des chaînes d'acide poly(L-glutamique) sur lesquelles ont été couplées de façon covalente des chaînes de poly(éthylène glycol) de masse 2 000 Da. Ces films réduisent l'adhésion d'une bactérie comme *Escherichia coli* de plus de 92 %. D'autres multicouches non adsorbantes aux protéines ont également été décrites [14, 16]. Ainsi, à pH 7,4, des protéines telles que le lysozyme, les immunoglobulines, l'albumine sérique humaine (HSA) et la fibronectine ne s'adsorbent pratiquement pas à la surface de films portant des charges opposées à celles de la protéine pour les architectures basées sur le dépôt alterné de poly(éthylèneimine) (PEI) et d'acide polyacrylique, ou de poly(éthylèneimine) et d'acide polyaléique, alors qu'elles se fixent de manière significative sur des films ayant des bases fortes et incluant la poly(éthylèneimine) et le poly(vinylsulfate).

L'élaboration de multicouches non adhérentes constitue non seulement un objectif en soi, mais s'inscrit aussi dans une démarche visant à rendre des surfaces sélectivement adhérentes à certains types cellulaires. La voie utilisée consiste à fonctionnaliser ces films non adhérents par l'intermédiaire de peptides spécifiques de l'adhésion de certains types cellulaires. Des études sont actuellement en cours dans ce domaine dans plusieurs laboratoires qui envisagent des applications biomédicales pour de tels films de polyélectrolytes, notamment pour le recouvrement de surfaces de biomatériaux.

Films adhérents

Des films ont aussi été élaborés en utilisant du collagène de type I en alternance avec du PSS [17]. Les films qui incluent dans leur architecture plusieurs couches de collagène se caractérisent par une bonne adhérence de cellules telles que les myoblastes et les cellules phéochromocytomes de rats. Le recouvrement d'une surface de biomatériau par une architecture constituée par PEI-(PSS-PAH)₃ mise au contact de cellules endothéliales conduit également à une très forte adhésion sans induire une quelconque dédifférenciation cellulaire ou effet cytotoxique [18]. Ce type de film pourrait

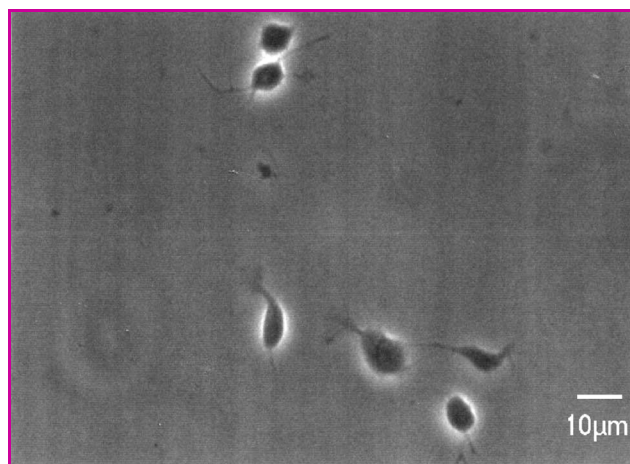


Figure 5 - Motoneurones de la moelle épinière déposés sur un film de trois couches de PEI/PSS/PAH.

ainsi constituer une bonne base pour augmenter la biocompatibilité par rapport au plasma sanguin après ensemencement par des cellules endothéliales, notamment pour des vaisseaux de faible diamètre.

Le contrôle de l'épaisseur du film, associé à une bonne biocompatibilité des précurseurs de cellules nerveuses, laisse également entrevoir l'application de la technique multicouche dans le guidage des neurones. Des études ont été menées par Decher en collaboration avec l'équipe du professeur Ternaux de Marseille [19]. Des motoneurones de la moelle épinière de rat ont été déposés sur différentes architectures de polyélectrolytes et les paramètres cellulaires ont été comparés à ceux de surfaces recouvertes par la laminine [20]. Il a été démontré que l'adhésion et la survie des motoneurones sur les multicouches construites à partir de polyélectrolytes de synthèse sont comparables et parfois supérieures à celles observées sur le système de référence (laminine). La nature chimique de la dernière couche déposée semble particulièrement importante pour le comportement des cellules à la surface du film. Une image typique de la croissance de neurones sur un film poly(éthylène-imine)/PSS/PAH est donnée dans la figure 5, tandis que le tableau I fournit une analyse détaillée de l'adhésion neuronale sur différents types de films.

Les multicouches comme méthode de fonctionnalisation de biomatériaux

Un matériau est dit fonctionnalisé lorsqu'il a été possible de lui conférer une ou des propriété(s) spécifique(s). Ainsi, des matériaux non adhérents sont fonctionnalisés. On peut préparer des supports possédant des propriétés anti-inflammatoires, anti-bactériennes ou capables de libérer

Tableau I - Paramètres de morphologie et de croissance des motoneurones déterminés sur des assemblages. Il apparaît clairement que l'architecture et la nature des polyélectrolytes agissent sur le contrôle cellulaire.

| | Nombre de neurites primaires | Nombre total de bifurcations | Vitesse de pousse de l'axone (µm/jour) | Vitesse de pousse des dendrites (µm/jour) | Surface (µm ²) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|--|---|----------------------------|
| PLL/laminine | 3,97 ± 0,16 | 3,516 ± 0,28 | 61 ± 3,3 | 89 ± 7 | - |
| PEI | 3,92 ± 0,16 | 15,77 ± 1,3 | 45,6 ± 3,4 | 86,5 ± 8,6 | - |
| PSS/PAH | 3,08 ± 0,09 | 18,79 ± 0,85 | 35,9 ± 3,3 | 71 ± 8 | - |
| (PSS/PAH) ₁₂ | 5,93 ± 0,17 | 3,76 ± 0,21 | 40,0 ± 1,8 | 111,4 ± 2,3 | 9 999 ± 567 |

dans le temps des substances actives. Différentes voies de fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes sont envisageables : des protéines actives peuvent notamment être insérées dans les films. Les multicouches peuvent même être constituées exclusivement de protéines. L'insertion de polyélectrolytes sur lesquels sont greffés des peptides actifs est aussi possible. Enfin, les architectures peuvent être fonctionnalisées par des médicaments.

Fonctionnalisation par des protéines

Les multicouches peuvent être fonctionnalisées en adsorbant des protéines au sommet d'un film ou en insérant une ou plusieurs protéines identiques ou différentes à plusieurs niveaux de l'édifice. Ces protéines doivent cependant conserver une structure proche de celle de leur forme native. Une fois enfouies, elles doivent aussi pouvoir interagir avec des cellules déposées au sommet du film (figure 6).

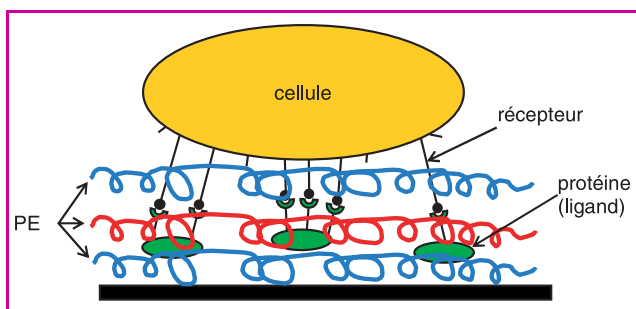


Figure 6 - Représentation schématique d'un film fonctionnalisé par une protéine « enfouie » dans l'architecture du film.

Nous avons décrit dans le paragraphe précédent des multicouches qui se comportaient de façon non adsorbante vis-à-vis des protéines. Celles-ci constituent cependant des exceptions et il y a généralement adsorption de protéines à la surface des multicouches. Des études d'adsorption de différentes protéines sur des films de type PSS/PAH ont montré que les quantités adsorbées sont supérieures lorsque la charge globale des protéines est opposée à celle de la multicouche, bien que les quantités adsorbées ne soient pas nulles lorsque les protéines sont de même signe que le film [21]. On peut ensuite poursuivre la construction du film sur cette couche de protéines adsorbées, ce qui permet de les enfouir dans l'architecture. En utilisant des techniques de fluorescence, il a été montré que des protéines comme la protéine A, enfouies dans un film de PLL/PGA, n'étaient pas capables de diffuser dans la direction perpendiculaire au film et restaient donc confinées dans la couche de dépôt [22]. Par contre, une diffusion latérale dans le film a été mise en évidence pour une fraction importante des molécules d'albumine humaine sérique adsorbées ou insérées dans des films de type PSS/PAH [23-24].

Le maintien dans les films de l'activité des protéines nécessite d'éviter leur dénaturation. Les polyélectrolytes en général et les multicouches de polyélectrolyte en particulier semblent bien remplir ce rôle. Ainsi, il a été démontré que la glucose isomérase, la glucosamylase (GA), la glucose oxydase (GOD) et la peroxydase incluses dans les multicouches de polyélectrolyte conservent toute leur activité enzymatique. De même, des immunoglobulines G (IgG) enfouies sous un petit nombre de couches de

polyélectrolytes conservent leur activité et interagissent avec leurs antigènes [25]. Des analyses par spectroscopie IR par transformée de Fourier ont également montré la conservation de la structure secondaire de la forme native de protéines insérées dans les architectures [26-27]. De plus, la présence des polyélectrolytes empêche la formation de feuillets β intermoléculaires et stabilise thermiquement des protéines comme le fibrinogène.

Un élément primordial de ce type de fonctionnalisation concerne la communication cellulaire qui s'établit entre des cellules déposées au sommet de l'architecture et les protéines enfouies. Jessel et coll. ont étudié cet aspect pour un système modèle : des molécules de protéine A ont été insérées dans des multicouches de type PLL/PGA sur lesquelles ont été déposées ensuite des monocytes [22]. La réponse cellulaire a été analysée en suivant la production de $\text{TNF}\alpha$ induite par l'interaction cellule/protéine A. Il apparaît que la production de $\text{TNF}\alpha$ devient maximale après un contact d'au moins 2 heures entre les cellules et le film lorsque la protéine A est recouverte par 10 bicouches de PLL/PGA. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été constatée dans la production de $\text{TNF}\alpha$ après un temps de contact de 2, 4 et 12 h. La production reste aussi inchangée après 4 ou 12 h de contact lorsque la protéine est simplement adsorbée au sommet de la construction ou recouverte par 10, 15, 20, 25 ou 30 bicouches de PLL/PGA. Par contre, le recouvrement de la protéine A par 10 bicouches de PGA/PDL (poly-D-lysine) bloque totalement la production de $\text{TNF}\alpha$. Ce résultat suggère que le contact entre les cellules et les molécules de protéine A enfouies est probablement dû à une dégradation enzymatique du film. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de microscopie confocale. L'incorporation dans l'architecture de protéine A marquée au rouge de Texas (PA_{TR}) et de PLL marquée au fluorothiocyanate (PLL_{FITC}) indique clairement que la protéine A reste localisée au niveau de sa couche de dépôt, alors que la PLL diffuse à travers tout le film. Cette propriété se manifeste en microscopie confocale par la formation d'une bande rouge mince et continue alors que la coloration verte s'étend sur l'ensemble du film indiquant la diffusion de la PLL (figure 7). Le dépôt de monocytes sur l'architecture marquée montre la formation de pseudopodes au niveau cellulaire qui traversent le film jusqu'au contact de la protéine A, permettant ainsi la communication cellulaire (figure 8).

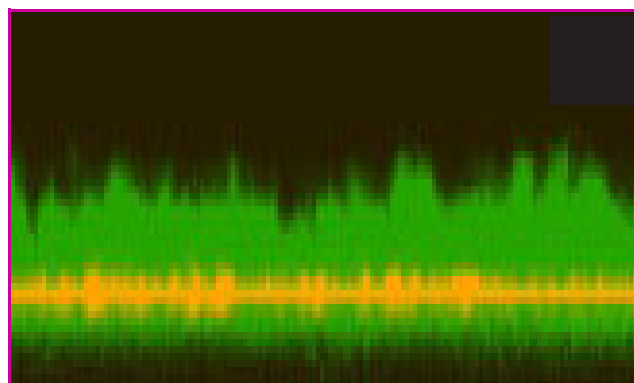


Figure 7 - Film de $\text{PEI}-(\text{PLL}/\text{PGA})-\text{PA}_{\text{TR}}-(\text{PGA}/\text{PLL})_{10}-(\text{PGA}/\text{PLL}_{\text{FITC}})$.

PA_{TR} correspond à la protéine A marquée au rouge de Texas (rouge) et PLL_{FITC} correspond à la PLL marquée à la fluorescéine isothiocyanate (vert). L'ensemble du film apparaît en vert à cause de la diffusion de PLL_{FITC} . La bande jaune correspond à la présence simultanée de PA_{TR} et de PLL_{FITC} . La localisation de PA_{TR} prouve que la PA ne diffuse pas à travers le film.

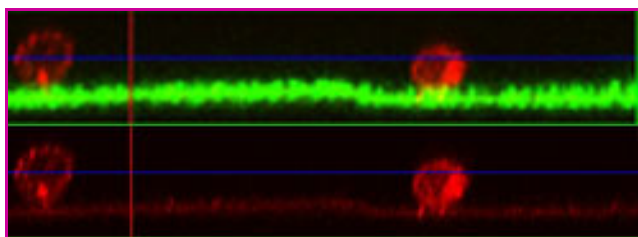


Figure 8 - Images en microscopie confocale de monocytes au contact avec un film de PEI-(PLL/PGA)-PA_{TR}-(PGA/PLL)₁₈-(PGA/PLL-FITC).

Les cellules étaient mises préalablement au contact avec le film pendant 120 min. Image du haut : observation avec les canaux vert et rouge. Le trait vert correspond au film de multicouche. Image du bas : observation avec le canal rouge seulement. On observe les pseudopodes des cellules qui traversent le film jusqu'au dépôt de protéine A qui apparaît légèrement en rouge.

Des assemblages constitués par une alternance de protéines et de polyélectrolytes suivie d'une stabilisation de la multicouche à la glutaraldéhyde ont également été réalisés [28-29]. Des constructions constituées uniquement de protéines peuvent ainsi être obtenues après élimination par rinçage des polyélectrolytes non couplés [30]. Ainsi, des assemblages construits uniquement à partir d'albumine [31] ou d'albumine et d'héparine ont été employés pour le recouvrement d'équipements médicaux utilisés au contact de plasma sanguin. La passivation de surfaces par des multicouches d'albumine a été démontrée par l'absence presque totale d'adsorption d'IgG à partir de plasma sanguin [31]. De telles surfaces semblent donc prévenir le contact direct entre la surface et les cellules ou les protéines du plasma sanguin. Les surfaces se terminant par une couche d'héparine semblent, quant-à-elles, posséder des propriétés anticoagulantes mises en évidence par leur interaction avec l'antithrombine. L'utilisation de polyélectrolytes naturels tels que le chitosan (Chi) et le dextran sulfate (DS) [32-33] pour la construction des films permet de moduler des propriétés pro- ou anti-coagulantes vis-à-vis du milieu sanguin. La force ionique de ces solutions de polyélectrolyte lors de la construction des films joue un rôle primordial dans les propriétés des films avec une variation très importante entre 0,2 et 0,5 M NaCl. L'augmentation de la concentration saline conduit à une augmentation de l'épaisseur déposée par couche ainsi qu'à une augmentation de l'excès de charges négatives observé après chaque dépôt de dextran. Ainsi, à partir du dépôt de la troisième bicouche et pour une teneur saline supérieure à 0,5 M, on note un comportement procoagulant lorsque le film s'achève par Chi et anticoagulant lorsque la structure se termine par DS. Les propriétés anticoagulantes sont expliquées par l'excès de charges introduites par la couche externe de dextran. Pour les autres conditions (films plus minces et taux de sel plus faibles), on observe toujours un comportement procoagulant. Des constructions identiques réalisées par dépôts successifs de chitosan et d'héparine à partir de solution à 1 M en NaCl possèdent des propriétés anticoagulantes fortes, quelle que soit la nature de la couche extérieure.

Fonctionnalisation par des peptides

Une autre voie de fonctionnalisation s'appuie sur l'inclusion dans l'architecture d'un polyélectrolyte modifié par couplage

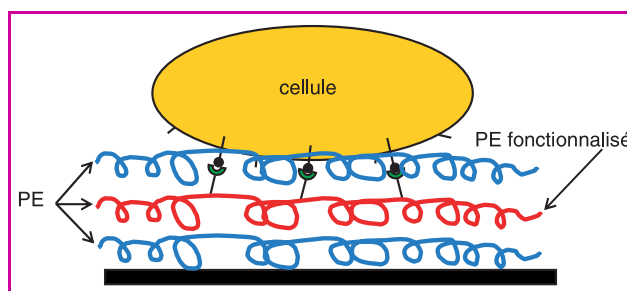


Figure 9 - Représentation schématique d'un film fonctionnalisé par une couche de polyélectrolytes modifiés par le couplage covalent d'un peptide d'adhésion.

covalent d'un peptide (figure 9). Cette démarche a été suivie par Chluba et coll. qui ont testé la réponse de cellules de mélanome (B16-F1) déposées sur des architectures (PGA/PLL)_n dont certaines couches de PLL ont été remplacées par de la PLL couplée à de l' α -mélancortine (α -MSH) [34]. Cette hormone peptidique est un stimulateur potentiel de la mélanogenèse. Il a d'abord été montré que l' α -MSH couplée de manière covalente à PLL et adsorbée au sommet de l'architecture du film conservait une activité tout à fait comparable à celle de l'hormone libre. Par ailleurs, l'activité aux temps courts (production d'AMP cyclique) de films dans lesquels sont enfouies des molécules de α -MSH couplées à la PLL, dépend de la profondeur d'enfouissement du polyélectrolyte modifié, alors que la réponse aux temps longs (production de mélanine) ne varie pas jusqu'à un recouvrement de l' α -MSH couplée par au moins 25 bicouches de PLL/PGA. Dans cette étude, le mécanisme de communication cellulaire n'a pas pu être démontré de façon rigoureuse et pourrait avoir différentes origines. Parmi celles-ci, on peut citer la diffusion des molécules de PLL qui se répartissent partiellement dans l'ensemble de la construction à cause du mécanisme de croissance exponentielle du film [11]. La communication cellulaire pourrait aussi être due à la dégradation des multicouches par les cellules, identique à celle observée pour l'interaction de monocytes avec la protéine A insérée dans des multicouches de même nature. Néanmoins, cette origine, si elle existe, ne peut constituer la seule voie de signalisation car l'insertion, dans l'architecture PLL/PGA, de plusieurs couches de PSS/PAH non dégradables par les enzymes n'empêche pas totalement la communication cellulaire.

Fonctionnalisation par des médicaments

Les multicouches de polyélectrolytes peuvent également être fonctionnalisées en y insérant des médicaments (figure 10). Récemment, Schwinté et coll. ont construit des

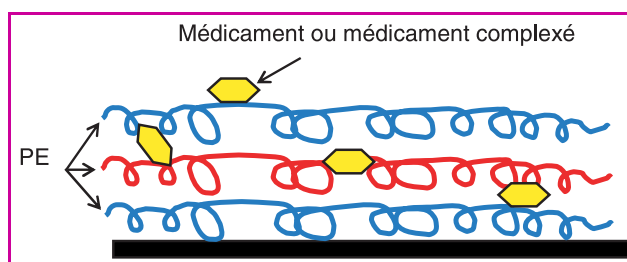


Figure 10 - Représentation schématique d'un film fonctionnalisé par l'intermédiaire de médicaments.

films de type PLL/PGA possédant des propriétés anti-inflammatoires après insertion de pyroxicam (Px), une molécule connue pour ses propriétés anti-inflammatoires [35]. Cette molécule est cependant très peu soluble dans l'eau et elle est généralement administrée sous la forme d'un complexe avec des molécules de cyclodextrine. Afin d'insérer un tel complexe dans les multicouches, ces mêmes auteurs ont utilisé une cyclodextrine chargée, la 6A-carboxyméthylthio- β -cyclodextrine (cCD). Les propriétés anti-inflammatoires de ces films ont été évaluées en suivant la production de TNF α par des monocytes (THP-1) stimulées par le lipopolysaccharide (LPS). Une forte activité anti-inflammatoire a été notée pour les films dont les structures renfermaient plusieurs couches constituées de complexes cCDPx.

Vers la conception de nanoréacteurs

L'activité d'enzymes dans des films multicouches a d'abord été évaluée sur des architectures de type enzyme/polyélectrolyte comme POD/PSS ou PEI/GOD (POD : peroxydase, GOD : glucose oxydase) [36-37]. Des constructions renfermant les deux enzymes GOD et POD ont ensuite été réalisées [38]. Deux couches POD/PSS et deux autres couches PEI/GOD ont été assemblées dans cet ordre sur quatre couches précurseurs PEI/PSS. La réaction en deux étapes impliquant les deux enzymes est induite en rajoutant du glucose et un colorant (DA67) dans la solution au-dessus de la construction. Le premier enzyme (GOD) catalyse la réaction entre le β -glucose et O₂ avec production de H₂O₂ et de D-glucono- δ -lactone. Cette dernière molécule permet l'oxydation du colorant DA67, cette réaction étant catalysée par POD. Des constructions dans lesquelles la glucamylase (GA) a été insérée et catalyse la conversion de l'amidon en β -glucose ont également été réalisées [38]. Ainsi, une construction constituée, du sommet du film vers le bas, par deux bicouches de PEI/GA et deux bicouches de PEI/GOD permet à nouveau l'obtention de H₂O₂ par conversion de l'amidon en β -glucose, cette réaction étant catalysée par GA. Le β -glucose est à son tour converti en D-glucono- δ -galactone (au contact de GOD) avec production de H₂O₂ qui, en solution en présence de POD, permet l'oxydation du colorant DA67. Des constructions permettant une cascade de deux à trois réactions enzymatiques peuvent donc être réalisées à l'aide de multicouches de polyélectrolytes. Une optimisation de la distance de séparation entre les couches enzymatiques permet d'augmenter le rendement de la réaction multi-étape. De telles constructions multi-enzymatiques miment par exemple les organelles naturelles et devraient également permettre de réaliser des réactions en plusieurs étapes avec des produits de réaction intermédiaires instables. De telles réactions sont difficiles à mener en solution lorsque les enzymes sont dissous dans la solution. De plus, ces assemblages ne consomment que peu d'enzymes.

Multicouches et colloïdes

Les particules colloïdales possédant des propriétés spécifiques par fonctionnalisation de leur surface trouvent de nombreuses applications dans des domaines aussi variés que la catalyse, les senseurs, la libération contrôlée de médicaments, mais également en électronique ou en

photonique. Les modifications des propriétés de surface des colloïdes et leur fonctionnalisation peuvent, là aussi, être réalisées par le dépôt de multicouches de polyélectrolytes. Le recouvrement de colloïdes a été entrepris selon deux voies différentes. La première consiste à rajouter dans la solution la quantité de polyélectrolytes juste nécessaire pour la saturation d'une couche, ce qui permet de rajouter immédiatement le polyélectrolyte de signe opposé sans rinçage [39]. Dans la deuxième voie, on utilise une concentration élevée de polyélectrolyte dont l'excès est éliminé après le dépôt [40-43]. L'élimination est réalisée soit par des cycles de centrifugation/rinçage suivis par une resuspension des particules, soit par des méthodes de filtration. D'une manière générale, deux types de colloïdes ont été préparés : des particules soit pleines, soit creuses.

Multicouches « habillant » des particules pleines

Comme pour la construction de films sur des supports plans, des dépôts alternés de polyélectrolytes et de protéines ont été réalisés sur des particules [36-37, 44-45]. La technique a également été étendue à l'encapsulation de matériaux biologiques qui peuvent conserver ainsi leur activité enzymatique [46]. Des assemblages de polyélectrolytes peuvent également être déposés sur des agrégats protéiques tels que la lactate déshydrogénase [47] ou la chymotrypsine [48] dont l'activité est conservée à environ 70 %. Le recouvrement par les polyélectrolytes empêche sans doute l'action d'inhibiteurs de haut poids moléculaire. Des enzymes recouverts de multicouches constituent d'intéressants réacteurs, notamment grâce à la grande surface spécifique développée par ces colloïdes. Des particules de latex recouvertes de couches renfermant de la GOD ou de la POD ont aussi été étudiées montrant que l'adsorption directe d'enzymes dans l'architecture conduisait à une activité dix fois plus importante que lors d'un dépôt de complexes chargés enzymes/polyélectrolytes dans l'édifice [36-37]. L'activité peut également être augmentée par le nombre de couches d'enzymes insérées. Par ailleurs, des constructions ont été réalisées sur les colloïdes, dans lesquelles plusieurs enzymes sont insérées comme dans les films, en vue d'induire des réactions en chaîne comme pour les nanoréacteurs.

Des cellules biologiques ont aussi été employées comme support d'encapsulation, notamment des échinocytes fixés à la glutaraldéhyde [49-50]. Ces constructions sont alors souvent utilisées pour la fabrication de particules poreuses après dissolution du cœur de l'édifice. L'encapsulation de cellules vivantes permet aussi leur protection vis-à-vis d'éventuelles agressions extérieures. Ainsi, l'encapsulation de cellules pancréatiques [51] par des multicouches offre une immuno-protection à ces cellules greffées, ainsi qu'une grande perméabilité à l'oxygène, au glucose et à l'insuline. Par ailleurs, ces films n'interfèrent pas avec le fonctionnement des îlots de Langerhans (cellules du pancréas sécrétant l'insuline) et permettent, *in vivo*, la production d'insuline.

Des particules colloïdales sont largement employées pour les diagnostics immunologiques. L'utilisation des multicouches de polyélectrolytes est notamment attrayante après adsorption d'un polyélectrolyte fluorescent qui est suivie d'un dépôt de protéine. Cette voie a été exploitée en déposant des IgG de souris sur des billes de polystyrène

rendues fluorescentes [52]. Leur réaction avec des anticorps de chèvre dirigés contre les IgG de souris adsorbés sur des boîtes de culture a ainsi été mise en évidence. L'insertion de médicaments de faible poids moléculaire et non chargés dans des multicouches de polyélectrolytes permet la libération contrôlée du médicament après sa solubilisation en variant notamment le nombre de couches de polyélectrolytes déposées [49, 53].

Les multicouches utilisées pour fabriquer des particules creuses

On peut également recouvrir des particules colloïdales de multicouches de polyélectrolytes, le cœur des particules pouvant être dissout après dépôt du film. Les particules supports peuvent être de synthèse (inorganique, organique) ou biologiques. Un des premiers supports utilisés pour cette application a été la mélamine formaldéhyde [50] dont la dissolution par HCl est aisée. Une solution alternative a consisté à utiliser des précipités protéiques ou des cœurs dont la destruction est effectuée par l'hypochlorite de sodium. On peut aussi jouer sur la solubilité ou rajouter un agent complexant tel que l'EDTA dans le cas de CaCO_3 ou CdCO_3 [49]. La calcination de particules de SiO_2 couvertes d'une multicouche conduit à des particules creuses et poreuses avec un film de SiO_2 résiduel sous les polyélectrolytes.

La grande variété de matériaux que l'on peut utiliser pour la fabrication des membranes des particules creuses permet aussi un contrôle de leur perméabilité. Dans les applications, soit une libération contrôlée sur une période longue, soit une libération rapide et ponctuelle d'un principe actif sont recherchées. La variation de l'épaisseur du film permet la modulation de cette libération sur un ordre de grandeur en temps. La libération rapide est plus facile à mettre en œuvre. Une inclusion de protéines sous forme cristalline permet, après dissolution, une libération rapide du contenu protéique. La rupture de la paroi de la particule peut être induite par un choc osmotique tandis que l'insertion des polyélectrolytes de faible masse permet la destruction de l'architecture par une simple variation de la force ionique. Une solution alternative concerne l'inclusion dans les constructions de dérivés sensibles à la chaleur, la lumière ou la pression [54].

L'induction de libérations réversibles et répétées pourrait être obtenues par une modulation de la perméabilité des films. L'inclusion de canaux ioniques comparables à ceux dans les membranes cellulaires pourrait constituer une voie originale. La diffusion d'espèces plus volumineuses peut aussi être induite par des variations de pH. Ainsi, les molécules de dextran-FITC s'adsorbent à l'extérieur de capsules de PSS/PAH préparées à pH 8 [55]. Lorsque le pH est abaissé à 6, les molécules de dextran-FITC diffusent vers le cœur des particules. En ajustant le pH à 8, on observe la présence de molécules marquées uniquement à l'intérieur des particules. Une alternance des pH permet des réactions réversibles et le changement de perméabilité résulte d'une ionisation variable qui découle de l'ionisation partielle du polyélectrolyte à pH 8 qui devient totale à pH 6. Les répulsions entre les polyélectrolytes conduisent à une certaine porosité dans le film construit à pH 8 et permettent la diffusion des molécules de dextran.

Les capsules creuses pourraient trouver de multiples applications dès lors qu'elles pourront facilement être chargées par des molécules actives. Des voies chimiques ou

physiques sont envisageables à cet effet. On peut ainsi établir un équilibre de Donnan en utilisant des parois de capsules qui sont imperméables aux polyélectrolytes. Pour de telles constructions, le rajout d'un polyacide à l'extérieur permet la diffusion de H^+ vers l'intérieur des particules induisant des variations de pH de 1 à 4 unités [56]. La différence de pH induit des variations de porosité qui permettent alors de charger les particules creuses. Une manière différente d'emprisonner un enzyme consiste à l'adsorber sur le support sur lequel le film est construit mais avant le dépôt des premières couches ou en l'incluant dans les premières couches de l'architecture (vers l'intérieur de la capsule creuse). Si ces premières couches sont constituées de polyélectrolytes dégradables [57], les enzymes peuvent être relargués à l'intérieur des capsules après dissolution des couches internes. Une caractéristique majeure des particules poreuses découle de la propriété de diffusion des petites molécules à travers les films alors que les grosses entités ne peuvent le faire. Ainsi l'encapsulation d'enzymes permet leur protection contre les protéases de haut poids moléculaire. Cette propriété a été démontrée pour la chymotrypsine et la peroxidase de raifort [58]. La protection semble efficace mais elle s'accompagne toutefois d'une perte d'activité.

Conclusions

Ce rapide tour d'horizon montre que les multicouches de polyélectrolytes constituent une nouvelle méthode de fonctionnalisation des surfaces et de fabrication de particules colloïdales avec de nombreuses applications potentielles en biologie et médecine. On peut notamment citer la réparation tissulaire (lésion articulaire, peau artificielle...) ou le recouvrement de surfaces de biomatériaux par des films (multi)fonctionnalisés (implants dentaires, prothèses de hanche, de larynx...), ou toute surface en contact avec un fluide ou un tissu biologique. Simple à mettre en œuvre, cette technique de préparation de films minces est très générale et peut être envisagée sur tout type de support chargé.

Références

- [1] Ratner B.D., Johnston A.B.; Lenk T.J., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1987**, *21*, p. 59.
- [2] Decher G., Schlenoff J.B., *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [3] Decher G., Hong J.D. Schmitt J., *Thin Solid Films*, **1992**, *210*, p. 831.
- [4] Decher G., *Science*, **1997**, *277*, p. 1232.
- [5] Ladam G., Schaad P., Voegel J.-C., Schaaf P., Decher G., Cuisinier F., *Langmuir*, **2000**, *16*, p. 1249.
- [6] Lösche M., Schmitt J., Decher G., Bouwnman W.G., Kjaer K., *Macromolecules*, **1998**, *31*, p. 8893.
- [7] Shiratori S.S., Rubner M.F., *Macromolecules*, **2000**, *33*, p. 4213.
- [8] Mendelsohn J.D., Barrett C.J., Chan V.V., Pal A.J., Mayes A.M., Rubner M.F., *Langmuir*, **2000**, *16*, p. 5017.
- [9] Elbert D.L., Herbert C.B., Hubbell J.A., *Langmuir*, **1999**, *15*, p. 5355.
- [10] Picart C., Lavalley P., Hubert P., Cuisinier F.J.G., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C., *Langmuir*, **2001**, *17*, p. 7414.
- [11] Picart C., Mutterer J., Richert L., Luo Y., Prestwich G.D., Schaaf P., Voegel J.-C., Lavalley P., *Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis*, **2002**, *99*, p. 12531.
- [12] Boulmedais F., Schwinte P., Gergely C., Voegel J.-C., Schaaf P., *Langmuir*, **2002**, *18*, p. 4523.
- [13] Richert L., Lavalley P., Vautier D., Senger B., Stoltz J.-F., Schaaf P., Voegel J.-C., Picart C., *Biomacromol.*, **2002**, *3*, p. 1170.
- [14] Mendelsohn J.D., Yang S.Y., Hiller J., Hochbaum A.I., Rubner M.F., *Biomacromol.*, **2003**, *4*, p. 96.
- [15] Boulmedais F., Etienne O., Frisch B., Lavalley P., Picart C., Ogier G., Voegel J.-C., Schaaf P., Egles C., *Biomaterials* (sous presse).
- [16] Muller M., Rieser T., Dubin P.L., Lunskwitz K., *Macromolecular Rapid Communications*, **2001**, *22*, p. 390.

- [17] Grant G.G.S., Koktysh D.S., Yun B., Matts R.L., Kotov N.A., *Biomedical Microdevices*, **2001**, 3:4, p. 301.
- [18] Boura C., Menu P., Payan E., Picart C., Voegel J.-C., Muller S., Stoltz J.-F., *Biomaterials*, **2003**, 24, p. 3521.
- [19] Pointu D., thèse à l'université Louis Pasteur, Strasbourg, **2002**.
- [20] Bataille S., Portalier P., Coulon P., Ternaux J.-P., *Eur. J. Neurosci.*, **1998**, 10, p. 560.
- [21] Ladam G., Schaaf P., Cuisinier F.G.J., Decher G., Voegel J.-C., *Langmuir*, **2001**, 17, p. 878.
- [22] Jessel N., Atalar F., Lavallo P., Mutterer J., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C., Ogier G., *Advanced Materials*, **2003**, 24, p. 692.
- [23] Szyk L., Schaaf P., Gergely C., Voegel J.-C., Tinland B., *Langmuir*, **2001**, 17, p. 6248.
- [24] Szyk L., Schwinté P., Voegel J.-C., Schaaf P., Tinland B., *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, p. 6049.
- [25] Caruso F., Furlong D.N., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T., *Langmuir*, **1998**, 14, p. 4559.
- [26] Schwinté P., Voegel J.-C., Picart C., Haikel Y., Schaaf P., Szalontai B., *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, p. 11906.
- [27] Schwinté P., Ball V., Szalontai B., Haikel Y., Voegel J.-C., Schaaf P., *Biomacromol.*, **2002**, 3, p. 1135.
- [28] Houska M., Brynda E., *J. Colloid Interface Sci.*, **1997**, 188, p. 243.
- [29] Brynda E., Houska M., *J. Colloid Interface Sci.*, **1996**, 183, p. 18.
- [30] Golander C.-G., Lin Y.-S., Hlady V., Andrade J.D., *Colloids Surf.*, **1990**, 49, p. 289.
- [31] Brynda E., Houska M., *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*, Y. Lvov, H. Moehwald (eds), Marcel Dekker, New York, **2000**, p. 251.
- [32] Serizawa T., Yamaguchi M., Matsuyama T., Akashi M., *Biomacromol.*, **2000**, 1, p. 306.
- [33] Serizawa T., Yamaguchi M., Akashi M., *Biomacromol.*, **2002**, 3, p. 724.
- [34] Chluba J., Voegel J.-C., Decher G., Erbacher P., Schaaf P., Ogier J., *Biomacromol.*, **2001**, 2, p. 800.
- [35] Schwinté P., Jessel N., Falvey P., Darcy R., Schaaf P., Voegel J.-C., Ogier J., *Advanced Funct. Materials*, **2003** (sous presse).
- [36] Schuler C., Caruso F., *Macromolecular Rapid Communications*, **2000**, 21, p. 750.
- [37] Caruso F., Schuler C., *Langmuir*, **2000**, 16, p. 9595.
- [38] Ariga K., Kunitake T., *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*, Y. Lvov, H. Moehwald (eds), Marcel Dekker, New York, **2000**, p. 169.
- [39] Caruso F., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, p. 423.
- [40] Donath E., Sukhorukov G.B., Caruso F., Davis S.A., Mohwald H., *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **1998**, 37, p. 2202.
- [41] Caruso F., Donath E., Moehwald H., *J. Phys. Chem.*, **1998**, 102, p. 2011.
- [42] Sukhorukov G.B., Donath E., Lichtenfeld H., Knippel E., Knippel M., Budde A., Mohwald H., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **1998**, 137, p. 253.
- [43] Caruso F., Caruso R.A., Mohwald H., *Science*, **1998**, 282, p. 1111.
- [44] Caruso F., Mohwald H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, p. 6039.
- [45] Lvov Y., Caruso F., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, p. 4212.
- [46] Caruso F., Trau D., Moehwald H., Renneberg R., *Langmuir*, **2000**, 16, p. 1485.
- [47] Bobreshova M.E., Sukhorukov G.B., Saburova E.A., Elfimov L.I., Shabarchina L.I., Sukhorukov B.I., *Biofizika*, **1999**, 44, p. 813.
- [48] Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Moroz N.A., Volodkin D.V., Larionova N.I., Donath E., Mohwald H., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 76, p. 207.
- [49] Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Donath E., Mohwald H., *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, p. 2281.
- [50] Gao C.Y., Moya S., Lichtenfeld H., Casoli A., Fiedler H., Donath E., Mohwald H., *Macromol. Mater. Eng.*, **2001**, 286, p. 355.
- [51] Schneider S., Feilen P.J., Sloty V., Kampfner D., Preuss S., Berger S., Beyer J., Pommersheim R., *Biomaterials*, **2001**, 22, p. 1961.
- [52] Yang W., Trau D., Renneberg R., Yu N.T., Caruso F., *J. Colloid Interface Sci.*, **2001**, 234, p. 356.
- [53] Shi X.Y., Caruso F., *Langmuir*, **2001**, 17, p. 2036.
- [54] Moehwald H., Donath E., Sukhorukov G., *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, G. Decher, J.B. Schlenoff (eds), Wiley-VCH Weinheim, **2003**, p. 363.
- [55] Sukhorukov G.B., Antipov A.A., Voigt A., Donath E., Mohwald H., *Macromolecular Rapid Communications*, **2001**, 22, p. 44.
- [56] Sukhorukov G.B., Brumen M., Donath E., Mohwald H., *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, p. 6434.
- [57] Radtchenko I.L., Sukhorukov G.B., Mohwald H., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **2002**, 202, p. 127.
- [58] Tiourina O.P., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Larionova N.L., Lvov Y., Mohwald H., *Macromol. Biosci.*, **2001**, 1, p. 209.



J.-C. Voegel



G. Decher



P. Schaaf

Jean-Claude Voegel

est directeur de recherches à l'Inserm, directeur de l'Unité Inserm U595 à la Faculté de chirurgie dentaire de Strasbourg*.

Gero Decher et Pierre Schaaf

sont professeurs à l'université Louis Pasteur de Strasbourg** et responsables d'équipe à l'Institut Charles Sadron (ICS), UPR 22 du CNRS.

* Unité Inserm U595, Faculté de chirurgie dentaire, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex.

Tél. : 03 90 24 33 87. Fax : 03 90 24 33 79.

Courriel : Jean-Claude.Voegel@medecine.u-strasbg.fr

** Université Louis Pasteur, 6 Rue Boussingault, 67083 Strasbourg Cedex.

Tél. : 03 88 41 40 66. Fax : 03 88 41 40 99.

Courriels : decher@cerbere.u-strasbg.fr

schaaf@cerbere.u-strasbg.fr

NOUVEAUX



STRATOSPHERES™



Polymer Laboratories

Resines Scavenger

A Forte Capacité Pour La Synthèse En Solution

Polymer Laboratories vient de mettre sur le marché une gamme de résines microporeuses « scavenger » à forte capacité pour la synthèse en solution dans la série des résines StratoSpheres™ développées pour la chimie combinatoire et la synthèse peptidique.

Un nouveau kit de démarrage comprenant 10 résines différentes est disponible pour faciliter le choix du support et disposer d'un grand champ d'application. Pour obtenir des renseignements sur notre gamme de produits, visitez notre site internet www.polymerlabs.com/stratospheres, envoyez un message à Support@polymerlabs.fr ou téléphonez nous.

Polymer Laboratories réalise des résines qui possèdent de grandes performances et un excellent rapport qualité-prix pour la synthèse en solution, la chimie combinatoire et la synthèse peptidique.

www.polymerlabs.fr

Ingénierie et électrochimie moléculaires pour la conception de puces à ADN

Gérard Bidan, Martial Billon, Thierry Livache, Pascal Mailley et André Roget

Abstract

Molecular engineering and electrochemistry for the implementation of DNA chips

The concept of DNA chips for the identification of biological sample answers the need of multiparametric analytical tools (one analyte is submitted to several characterizations simultaneously) imposed by the combinatorial chemistry of DNA. Their implementation is based on three key steps: (i) immobilization of ODN probes onto a micro-structured support; (ii) hybridization, (iii) reading. These steps involve complementary knowledges in various disciplinary fields such as surface physical chemistry, molecular electrochemistry, micro-technologies, optics, electronics and biochemistry. We present here, in a non-exhaustive way, how chemistry and particularly molecular electrochemistry play a central role in the two steps of immobilization and detection. We focus on the electro-addressed immobilization of DNA probes via the electropolymerization of DNA grafted polypyrrole and on the electrochemical detection based on redox or enzymatic labeling.

Mots-clés

Puce à ADN, polypyrrole fonctionnalisé, électropolymérisation, électrode modifiée, biocapteur, résonance plasmonique de surface, marquage enzymatique, couplage par affinité.

Key-words

DNA chips, functionalized polypyrrole, electropolymerization, modified electrode, biosensor, surface plasmon resonance, enzymatic labelling, affinity coupling.

Les puces à ADN, une révolution dans l'analyse génétique

Au cours de ces dix dernières années, les puces à ADN ont envahi le marché de la recherche, bientôt celui du diagnostic, et s'imposent comme un outil incontournable dans l'ère du « post-génome ». Elles ont changé la vision des chercheurs en leur offrant la possibilité de réaliser des milliers d'analyses génétiques en parallèle, que ce soit dans le domaine du diagnostic, du génotypage, de la pharmacogénomique ou de l'analyse globale de l'expression des gènes.

Il y a seulement dix ans, le séquençage des génomes semblait une tâche ambitieuse et démesurée. Aujourd'hui, le déchiffrement de ces codes est simplement une étape préliminaire : il faut désormais identifier les gènes, leur fonction, et comprendre l'organisation spatio-temporelle de l'activité des gènes et de leurs produits au niveau cellulaire. C'est pourquoi l'accès à la technologie des puces à ADN est devenu une priorité scientifique pour les centres de recherche académiques et industriels. Il est également une priorité économique puisque le marché mondial des biopuces en 2000 était de 550 millions de dollars, et avec une croissance de 15 % par an, il devrait dépasser le milliard de dollars en 2005 [1]. Les principaux acteurs actuellement présents sur le marché sont américains (Affymetrix, Hyseq, Incyte-Synteni, Motorola-Argonne, Molecular Dynamics-Amersham...).

Les applications de tels outils sont très variées : de la recherche fondamentale jusqu'à la médecine légale (empreinte ADN) et aux applications militaires (détection de menaces bactériologiques), en passant par la découverte de nouveaux médicaments et de nouvelles cibles thérapeutiques, le diagnostic des mutations et polymorphismes de gènes

responsables d'une maladie génétique, le contrôle environnemental et agroalimentaire. Les publications les plus récentes parlent de l'identification et de la détection de mutations dans des gènes impliqués dans certains cancers et proposent que les puces à ADN puissent guider le médecin dans le choix de la thérapie la mieux adaptée à son patient. Dans

Glossaire

Complexité ou densité

Par abus de langage, on désigne souvent par « densité » le nombre de sondes de natures différentes immobilisées. Le terme « complexité » convient mieux. En effet, une biopuce de faible complexité d'une centaine de plots d'hybridation peut être de forte densité (surfactive) si ces plots sont de taille micrométrique et répartis avec des espacements micrométriques. La densité réfère aussi à la concentration surfactive en sondes à la surface d'un plot, elle varie de 10^{10} à 10^{13} molécules.cm⁻².

ODN

OligoDesoxyriboNucléotide, séquence courte (10 à 25-mères) d'un simple brin d'ADN.

PCR

« Polymerase chain reaction » : technique de laboratoire permettant d'augmenter par duplication grâce à une enzyme particulière, l'ADN polymérase, le nombre de copies d'une séquence d'ADN, et ainsi d'amplifier la sensibilité des tests ADN.

Séquence d'ADN

Sa taille (n-mères) est définie par le nombre n de nucléotides la constituant (A, T, G ou C), et sa nature est définie par la succession des nucléotides (e.g. : AATGCT est la séquence complémentaire de TTACGA).

Synthèse « on chips » ou synthèse sur puce

L'ODN qui servira de sonde est synthétisé directement sur la puce.

Synthèse « off chips »

Les sondes sont d'abord préparées (ADNc) ou synthétisées (ODN), purifiées, puis elles sont ensuite greffées sur la puce.

les applications environnementales, l'analyse par puce à ADN vise à détecter rapidement et à quantifier une grande variété de micro-organismes.

La problématique des biopuces

Les puces à ADN sont un système miniaturisé comprenant une surface structurée de plastique (polypropylène, nylon), de verre ou de silicium, sur laquelle sont greffés des milliers de brins d'ADN. Le principe repose sur la capacité d'un simple brin d'ADN à pouvoir spontanément et spécifiquement reconnaître et former un complexe (duplex ou double hélice) avec le brin contenant une séquence complémentaire. C'est ce que les biologistes appellent l'hybridation. Les milliers de simples brins d'ADN fixés sur la puce (les séquences sondes) peuvent ainsi « interroger » les séquences cibles dans l'échantillon d'analyse.

Les gains en temps et en efficacité liés à l'utilisation des biopuces reposent sur la réalisation simultanée de quelques dizaines à des centaines de milliers d'analyses. Une biopuce à ADN peut se définir comme un biocapteur multiparamétrique d'analyses en parallèle. A ce niveau de parallélisation, les systèmes de micro-plaque des biologistes ne permettent pas une miniaturisation suffisante et l'apport des microtechnologies devient fondamental. Les étapes clés de la fabrication et de l'utilisation d'une biopuce à ADN sont l'immobilisation spatialement adressée de l'ODN (séquence courte, oligomère de simple brin d'ADN) sonde sur un micro-plot, l'étape d'hybridation, puis la détection du plot où a eu lieu cette hybridation (figure 1).

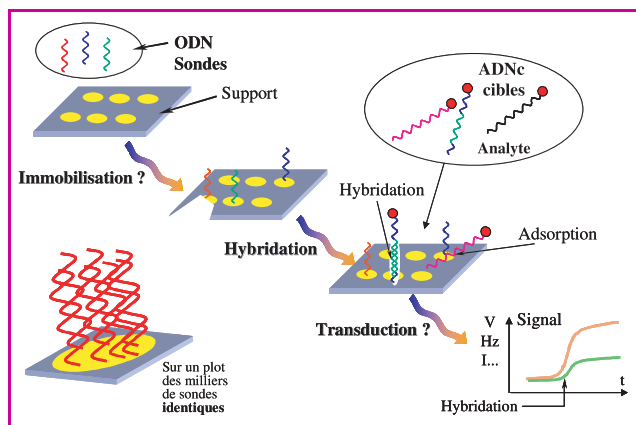


Figure 1 - La problématique des puces à ADN.

Le nombre de plots d'hybridation ou « complexité » (chaque plot comportant des sondes identiques mais de natures différentes d'un plot à un autre) est un critère qui détermine les applications visées (tableau I).

La complexité conditionne à son tour la technologie de fabrication. Tandis qu'il est concevable de manipuler des centaines, voire des milliers de sondes ODN présynthétisées, répertoriées et stockées, au-delà il a été imaginé un autre procédé d'élaboration avec la croissance des sondes ODN sur leur plot d'hybridation. On distingue donc la technologie « off chip » où les sondes sont présynthétisées de façon enzymatique ou chimique, contrôlées puis déposées sur le substrat par des moyens mécaniques, électrochimiques ou par jet d'encre, et la

technologie « on chip » où les sondes ODN sont synthétisées chimiquement *in situ* sur le support structuré.

Les deux étapes clés que sont l'accrochage de l'ODN sonde sur la surface et la détection de l'évènement biologique d'hybridation exploitent des méthodologies issues de disciplines très diverses. Certaines relèvent des sciences chimiques, comme la chimie et l'électrochimie des surfaces, la biochimie de synthèse des séquences d'ODN, la transduction électrochimique. Cet article est plus particulièrement consacré aux apports de l'électrochimie moléculaire dont ceux issus de nos travaux sur ces dix dernières années. Pour des revues récentes sur l'élaboration et les applications des puces à ADN, voir [2-4].

Immobilisation des ODN sondes

Cette chimie de surface est traitée en détail par M. Pirrung [2]. Le challenge est double : les différents produits (sondes présynthétisées ou bases nucléotidiques et composés de couplage) doivent être adressés précisément sur les plots de la surface tandis que les réactions de couplage ou d'accrochage doivent s'effectuer rapidement (quelques secondes à quelques minutes) avec des rendements élevés (> 98 % lors des synthèses « on chips »), compte tenu du grand nombre de réactions à réaliser afin de fabriquer la biopuce en un temps raisonnable.

La synthèse « on chip » ou *in situ*

Affymetrix, leader dans ce domaine, développe principalement des puces à haute complexité et vient d'annoncer la mise sur le marché de son produit CustomSeq™ capable de reséquencer rapidement les différents isolats du virus SARS qui comprend environ 30 000 paires de bases. Ce créneau du reséquençage ou du séquençage de cibles inconnues nécessite des « arrays » (matrices) de hautes complexité et densité. Affymetrix a donc opté pour la synthèse « on chip ». Les quatre bases constitutives de l'ADN sont déposées successivement dans l'ordre qui caractérise la sonde sur le support de verre. Cette opération est réalisée par un procédé de photo-déprotection localisée grâce à un jeu de masques (figure 2).

Cette étape de photo-déprotection remplace l'étape classique de détrituration en milieu acide dans le cycle conventionnel de la synthèse phosphoramidite des synthétiseurs d'ADN (schéma 1). Le rendement moyen d'un cycle de synthèse avec le premier groupe photolabile utilisé, MeNPoc, (schéma 2) était de 91-98 % ($\lambda = 365$ nm), ce qui limitait fortement la pureté des sondes et leur longueur (une vingtaine de bases). Il a été récemment montré que le groupe NPPoc permet des synthèses photochimiques sur « arrays » avec des rendements pratiquement quantitatifs [5].

Cette technique nécessite cependant une technologie coûteuse (environ 80 masques pour un 20-mère), mais le nombre de plots annoncé peut aller jusqu'à 100 000, et le nombre de solutions à manipuler est réduit aux quatre bases et aux rinçages nécessaires.

Tableau I.

| Degré de complexité | Nombre de plots d'hybridation | Application visée |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Basse complexité | 10-1 000 | diagnostic |
| Moyenne complexité | 1 000-10 000 | étude de mutation, génotypage |
| Haute complexité | 10 000-100 000 | séquençage des gènes |

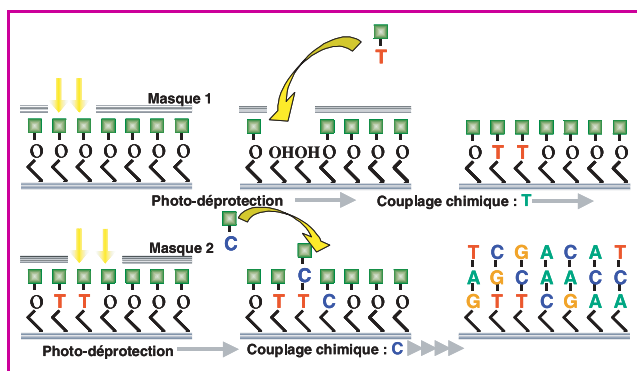


Figure 2.

Les sondes sont synthétisées *in situ* par photolithographie.

Au départ, tous les sites sont protégés par un groupement photolabile. ■

L'illumination au travers d'un masque déprotège des plots spécifiques. =||=

On peut alors procéder au greffage d'une première base protégée. ■

Le process est réitéré avec les bases ■ ■ ■ ■

jusqu'à la synthèse complète des ODN sondes.

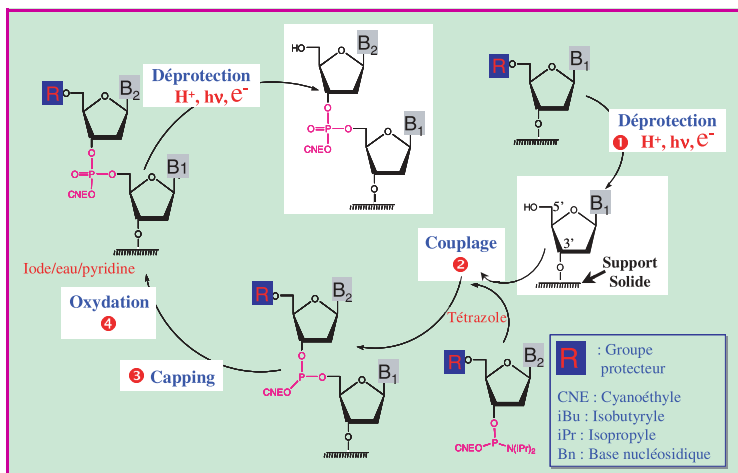


Schéma 1 - Synthèse conventionnelle phosphoramidite de l'ADN.

Les synthétiseurs automatiques de séquence d'ADN mettent en œuvre une synthèse conventionnelle dite « phosphoramidite » en 6 étapes : mis à part la fixation sur support de la première base puis après synthèse, la libération à l'ammoniaque qui fournit la séquence libre, 4 étapes sont répétitives : ① la déprotection qui active le OH en 5' de la base n (B_1), celle-ci consiste en l'élimination acide du DMTr ($R = \text{diméthoxytrityle}$) ; l'approche photochimique utilise un groupe photolabile ($R = \text{MeNPoc}$ ((α -méthyl-2-nitropipéronyl)-oxy)carbonyle), l'approche électrochimique utilise un groupe électrolabile ($R = p\text{-nitrobenzoyle}$) par réduction. Les étapes suivantes sont inchangées : ② couplage par addition du phosphoramidite activé en 3' de la base $n+1$ (B_2) avec l'hydroxyle en 5' de la base n , ③ « capping », non détaillé ici, élimine les réactifs n'ayant pas réagi, ④ oxydation du phosphore trivalent instable en son homologue pentavalent avant d'entreprendre le cycle suivant.

Des solutions alternatives ont été proposées pour réduire les coûts et augmenter la flexibilité de production. Par exemple, Protogène utilise une technologie jet d'encre pour délivrer successivement les quatre précurseurs des bases sur une surface structurée en zones hydrophiles et hydrophobes. Nous avons validé (préparation d'un 9-mère) une approche électrochimique de la synthèse « on chip » basée sur la déprotection électrochimique de bases nucléotidiques par

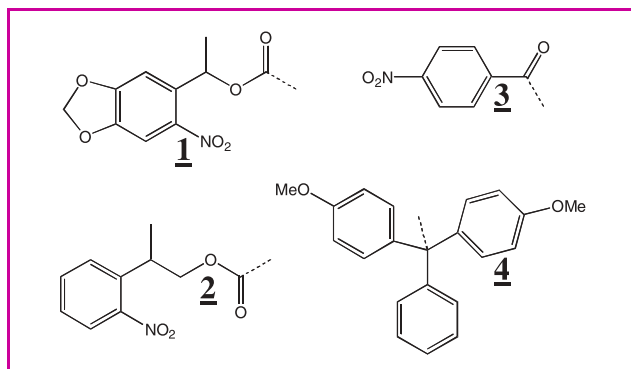


Schéma 2 - Groupements protecteurs pour la synthèse d'ADN selon le schéma 1.

1, 2: groupements photolabiles MeNPoc et NPPoc respectivement ; 3: *p*-nitrobenzoyle, déprotection par électroréduction à $-1,4\text{ V vs Ag/Ag}^+$; 4: DMTr, déprotection en milieu acide trifluoroacétique.

coupure cathodique du groupe électrolabile *p*-nitrobenzoyle [6] (schéma 2).

Cette électroréduction à $-1,4\text{ V vs Ag/Ag}^+$ est compatible avec l'ensemble du cycle conventionnel de synthèse qui est inchangé, à part l'étape de déprotection (schéma 1). Il faut cependant souligner que le rendement de coupure de 90 %, excellent en électrochimie, est insuffisant en synthèse oligonucléotidique et devra être optimisé afin qu'une itération sur un 20-mère donne un rendement global acceptable.

La synthèse « off chip »

Lorsque la cible ODN est connue, comme les variations génétiques de l'ADN codant les différentes mutations répertoriées d'une protéine ou les différents types génétiques d'un virus, le nombre de plots correspondant aux différentes natures des sondes à immobiliser va de quelques dizaines à quelques centaines. Il s'agit là de puces dites de faible et moyenne complexités. Il devient alors réalisable de présynthétiser des sondes purifiées, de composition parfaitement connue (jusqu'à une centaine de bases) et de stocker et manipuler les solutions correspondantes.

Les technologies classiques de dépôts (ou « spotting ») impliquent de positionner une aiguille (ou un stylet) au contact avec une surface ou de projeter une gouttelette à partir d'une microbusse. Les volumes de liquide délivrés vont de la dizaine de pL à quelques nL. Les procédés peuvent être mécaniques (TeleChem, Genemachines, Genetic Microsystems, Genomic solutions, BioRobotics...) ou piézoélectriques (GeSiM, Packard...). De nombreux robots sont disponibles sur le marché, cependant leur fiabilité reste à améliorer. La chimie intervient à trois niveaux :

- La structuration du support : en plus d'une structuration volumique en microcuvettes, des motifs hydrophiles ou hydrophobes permettent de contenir les gouttelettes par la tension de surface afin qu'elles ne s'étendent pas.

- L'activation du support : celui-ci souvent inerte (la lame de verre étant la plus utilisée) est modifié en surface par des groupements fonctionnels capables de réagir avec les fonctions introduites à l'extrémité 5' (ou 3') de l'ODN durant la synthèse ou la PCR.

- La fonctionnalisation de l'ODN pour un greffage direct ou un couplage sur le support préfonctionnalisé.

La littérature propose des centaines de combinaisons possibles entre les supports, leur activation et la chimie de

Tableau II - Stratégies les plus développées pour l'immobilisation d'une sonde ADN présynthétisée sur un support.

On peut distinguer 3 étapes clés : (i) l'activation du support qui apportera en surface des groupements réactifs thiol, amino, carboxyle ou hydroxyle ; (ii) la fonctionnalisation de l'ODN sonde bien souvent par ces mêmes fonctions ; (iii) le couplage des fonctions de surface avec celles portées par les ODN sondes. Ces réactions de couplage se font en conditions très douces mises au point depuis longtemps par les biochimistes pour coupler les fonctions thiol, amino, carboxyle ou hydroxyle entre elles.

| Supports | Réactifs d'activation des surfaces | Agents de couplage | Fonction en 5' ou 3' de l'ODN |
|-------------------------|---|---|---|
| Lame de Verre, Silicium | <p>Silanisation</p> | <p>NH₂ ↔ SH et Inversement, ex.:</p> | <p>NH₂-()-ODN HS-()-ODN OH-()-ODN</p> |
| Platine | <p>Polylysine (NH₂)</p> <p>Adsorption Streptavidine</p> | <p>Affinité</p> | <p>biotine-()-ODN</p> |
| Or | <p>SAM (prétraitement): HS-(CH₂)_n-NH₂</p> | <p>Auto-assemblage</p> | <p>SAM (direct): HS-()-ODN</p> |
| | | <p>NH₂ ↔ SH</p> | <p>HS-()-ODN</p> |

couplage avec l'ODN sonde. Le *tableau II* présente les stratégies les plus communément mises en œuvre pour l'immobilisation de sondes présynthétisées.

Les groupements d'accrochage sur lame de verre ou silicium préalablement oxydé sont des trialkoxysilanes, le triéthoxysilane étant le plus utilisé. Cette silanisation modifie la surface du support et apporte les fonctions réactives amino, thiol, carboxyle ou hydroxyle. On retrouve ces mêmes fonctions greffées sur le phosphate terminal en 5' de la sonde ODN à accrocher. L'agent de couplage relie une fonction amino ou hydroxyle avec un thiol et inversement, il est constitué d'un bras portant à une extrémité une fonction réagissant avec un thiol (maléimide) et à l'autre extrémité un ester activé (succinimide) ou un époxyde réagissant avec le groupement amino. Le *tableau II* donne un exemple d'un tel agent de couplage. Le dépôt de polylysine est une méthode aisée de fonctionnalisation de lame de verre par des groupements NH₂. La streptavidine est une protéine qui s'adsorbe spontanément sur beaucoup de surfaces (verre, métaux...). La très forte reconnaissance streptavidine/biotine ($K_a \approx 10^{15}$) permet d'accrocher une sonde ODN comportant une biotine. L'interaction or/thiol est exploitée pour faire directement l'accrochage d'un ODN-thiol. Cependant, afin de mieux contrôler l'accessibilité de la sonde pour l'hybridation, on procède souvent à l'élaboration d'une monocouche auto-assemblée (SAM) intermédiaire. Des motifs de zone active peuvent être dessinés sur cette SAM par déprotection photochimique de groupements amino protégés par des groupes photolabiles.

L'adressage électrique de l'immobilisation est une alternative qui offre de nombreux avantages en terme de manipulation et de miniaturisation, puisque la connectique passive ou active (CMOS) peut être intégrée au support. Ainsi Nanogen utilise un concept proche de l'électrophorèse, si ce n'est que les molécules d'ODN sont libres en solution [7]. Dans ce concept, on applique un potentiel positif à une électrode pour guider la sonde à greffer et pour produire un champ électrique qui améliore la dynamique et la spécificité

de l'hybridation. Cette approche repose sur l'interaction électrostatique avec les charges négatives (phosphate) portées par l'ADN. Une matrice d'électrodes de platine (jusqu'à 10 000) recouvertes de streptavidine immobilisées des sondes 12 à 26-mère greffées par une biotine. Le dispositif implique une microfluidique importante.

Deux propriétés essentielles des polymères conducteurs électroniques, l'électropolymérisation et leur fonctionnalisation aisée, expliquent leur implication dans la conception de capteurs à ADN. Du fait de sa biocompatibilité et d'une électropolymérisation qui peut être menée en milieu aqueux et à des pH biologiques, le polypyrrole (PPy) est de loin le polymère conjugué le plus utilisé. Ainsi, l'électropolymérisation du monomère pyrrole ou de ses dérivés en solution aboutit au dépôt à la surface d'une électrode d'un film mince de PPy. Cette réaction d'électrosynthèse est stœchiométrique (*schéma 3*) ; par conséquent, l'épaisseur du film polymère est directement reliée à la quantité d'électricité utilisée. L'adressage électrique par électropolymérisation est aussi une clé de la miniaturisation car le film polymère recouvre seulement et entièrement le spot d'or adressé quelle que soit sa taille.

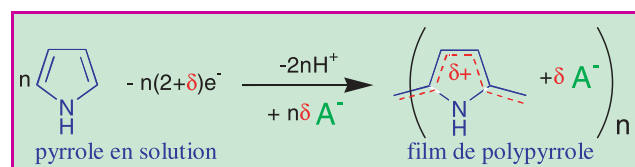


Schéma 3 - Réaction d'électropolymérisation du polypyrrole.

Cette réaction de couplage par électro-oxydation condensante associée à chaque unité monomère pyrrolique $(2 + \delta)$ électrons, δ étant le taux de dopage (classiquement $\delta = 0,2-0,3$) et A^- est l'anion dopant.

Trois approches mettent en œuvre une réaction d'électropolymérisation du PPy pour déposer un film polymère incluant en volume et/ou en surface les séquences ADN sonde :

- **Le procédé MICAMTM**, initié en 1993 par notre équipe du Département de recherche fondamentale sur la matière condensée en collaboration avec le CEA/LETI, est maintenant développé par Apibio, filiale CEA-BioMérieux. Ce procédé permet, en une étape, l'adressage et l'immobilisation simultanés des sondes ODN par copolymérisation électrochimique de sondes ODN portant un pyrrole **5** (*schéma 4*) avec du pyrrole libre [8] (*figure 3A*).

Cette simultanéité apporte un avantage considérable en gain de temps, puisque le dépôt peut être mené en 0,5 s, tandis qu'un couplage chimique nécessite au moins 30 mn. Le « design moléculaire » du pyrrole-ODN **5** intègre deux paramètres importants : respecter un espace de fonctionnalisation à l'azote devant éviter un encombrement stérique qui bloquerait le couplage électrochimique en α , et permettre une bonne accessibilité de la sonde afin d'atteindre de bon rendement d'hybridation. Ce greffage covalent assure la stabilité et l'accessibilité pour l'hybridation des sondes ADN à la surface des puces MICAMTM.

- **Le dopage électrochimique du polypyrrole** par des sondes ODN : celles-ci sont emprisonnées dans la matrice polymère durant l'électrosynthèse, elles se comportent comme un dopant anionique multichargé [9]. La perte du dopant ODN par échange avec d'autres anions de l'électrolyte contribue à la dérive du signal.

- **Un procédé en deux étapes**, introduit par F. Garnier *et al* [10] et nommé « post-fonctionnalisation », comprend une

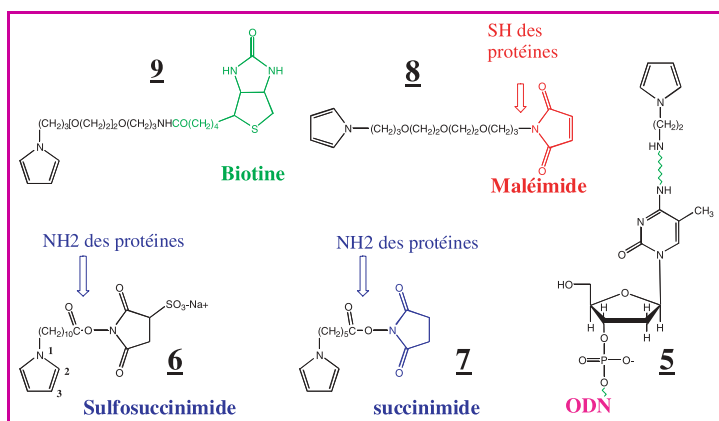


Schéma 4 - Différents réactifs pyrrole et leurs cibles réactionnelles développés par notre laboratoire.

Les synthèses de pyrrole portant différents groupes réactifs, greffés sur l'azote par l'intermédiaire de bras espaceurs, ont été réalisées à partir de diméthoxytétrahydrofurane et d' ω -aminoacides ou de diamines. Les groupements amino ou acide sont ensuite protégés, puis couplés avec une biotine ou introduit à la dernière étape d'une synthèse d'ODN. On obtient : (i) des pyrrole portant un groupe carboxyle qui est transformé en ester activé réactif sur les fonctions amines. Ces réactifs permettent d'introduire un pyrrole sur un oligonucléotide ou sur les lysines des protéines ; (ii) des pyrrole portant un groupe amine capable de réagir sur un ester activé de maléimides, ces « maléimide pyrrole » réagissent sur les fonctions SH des protéines ; (iii) des pyrrole portant une biotine capable de se coupler par affinité avec une avidine (ou streptavidine) ; (iiii) un pyrrole portant la sonde ODN.

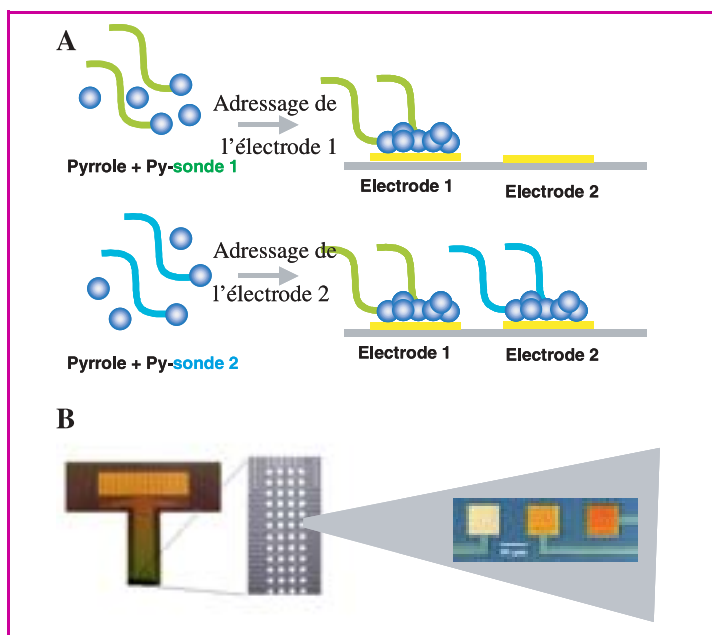


Figure 3. A : principe de la fabrication d'une puce à ADN développée par Apibio (technologie MICAM™) :

- Les sondes ODN fonctionnalisées par le pyrrole, Py-sonde, sont « greffées » sur le substrat par copolymérisation électrochimique avec le pyrrole libre, Py .

- L'adressage est réalisé en appliquant un potentiel adéquat sur l'électrode sélectionnée.

B : puce sur silicium MICAM™ de première génération élaborée par le CEA/LETI comportant 48 plots d'or de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ connectés individuellement.

première étape « d'activation de la surface » par dépôt électrochimique d'un PPy fonctionnalisé par un groupement (ester activé). Ce groupement est capable de se coupler à une séquence d'ODN. L'étape de couplage/adressage peut être effectuée par jet d'encre.

Les premiers greffages du PPy par une séquence simple brin d'ADN furent réalisés sur macro-électrode ($0,7 \text{ mm}^2$) ; puis en 1995, la miniaturisation était entreprise avec le Laboratoire de microélectronique (LETI) du CEA-Grenoble : un réseau d'oligonucléotides a été construit sur un dispositif silicium comportant une matrice de 48 plots d'or de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ adressables électriquement (figure 3B). Cette approche a été validée par le génotypage du virus de l'hépatite C dans des échantillons de sang [11] et par la caractérisation des mutations de l'oncogène K-ras [12]. Le procédé d'électrocopolymérisation a été étendu à l'immobilisation en une étape de peptides (antigènes) pour concevoir des « immuno-chips » [13]. Une chimie de modification du monomère pyrrole compatible avec les protéines a été développée afin d'obtenir des esters activés du pyrrole (schéma 4), capables de réagir en solution aqueuse avec les groupes $-\text{NH}_2$ ou $-\text{SH}$ des protéines (6, 7 et 8 respectivement).

Afin de s'affranchir de cette chimie de modification du monomère pyrrole qui doit être adaptée à chaque nouvelle entité biologique ou d'éviter la réaction de couplage ester activé/ NH_2 qui endommage le support de PPy, nous avons développé un couplage plus doux et polyvalent reposant sur l'affinité biotine/avidine. Les études couplées d'électrochimie, de fluorescence et de microbalance à quartz, ont permis d'optimiser la nature du monomère pyrrole-biotine (longueur, hydrophobie du bras espaceur, 9, schéma 4) et les conditions d'électrosynthèse. Récemment, nous avons pu proposer un modèle de capteur à ADN régénérable [14] (schéma 5). Après une perte de 10 % au 2^e cycle d'hybridation, le système se stabilise et une dizaine de cycles de dénaturation/hybridation successifs ont pu être réalisés.

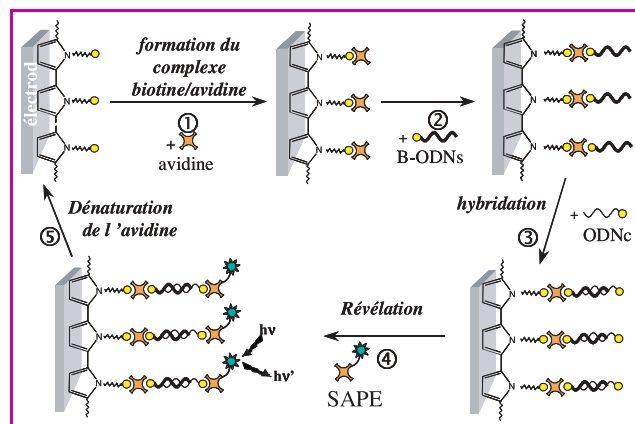


Schéma 5 - Cycle de fabrication/régénération d'un capteur à ADN.

Étapes 1-3 : construction de l'assemblage ODN sonde/ADN cible sur polypyrrole biotinylé, PPy-B. Étape 4 : révélation par addition du fluorophore streptavidine-phycoérythrine, SAPE. Étape 5 : régénération de la surface du PPy-B obtenue par dénaturation de l'avidine par une solution de SDS 0,1 M à 100°C .

« L'électrosputting » est un nouveau format d'électrocopolymérisation qui permet par des copolymérisations successives une préparation aisée de matrices d'ODN directement sur un substrat d'or non structuré, sans l'utilisation de réactifs ODN-thiols ou de synthèses multi-étapes [15] (figure 4A). Ce procédé a été appliqué à la surface uniformément métallisée du prisme d'un montage de détection par résonance plasmonique de surface (SPR) (figure 4B) et permet le suivi en temps réel de la cinétique d'hybridation de l'ADN [16].

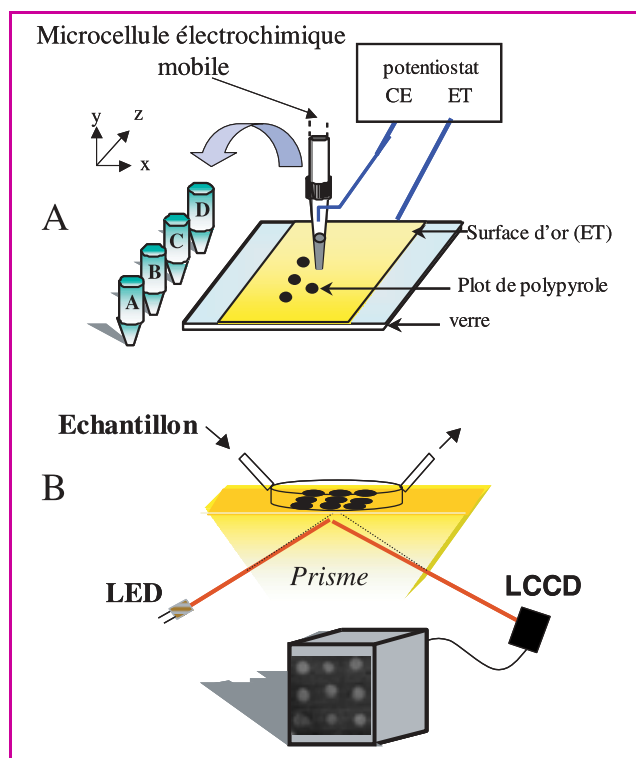


Figure 4.

A : principe de « l'électrosporting ».

La transformation d'un cône de micropipette en cellule électrochimique mobile permet d'effectuer des électrodépositions successives sur une surface d'or utilisée comme électrode de travail. Un robot permet d'effectuer les réactions successives de rinçage et de remplissage de la pipette-cellule et d'électropolymérisation pour fabriquer la matrice d'ODN.

B : représentation schématique d'un dispositif d'imagerie SPR.

Un faisceau collimaté et p-polarisé d'une LED illumine la face interne d'une surface d'or recouverte des plots de PPy/assemblage biologique. La lumière réfléchie qui contient toute l'information SPR est collectée sur une caméra CCD.

Des films très fins, d'épaisseur contrôlée au nanomètre près (5 à 10 nm) ont été réalisés de façon très reproductible par des électrosynthèses « flash » afin que le film de PPy ne puisse faire écran à l'interaction entre l'assemblage biologique et les plasmons du film d'or. Un excellent taux de greffage des ODN sondes est obtenu (10-20 pmole/cm²). Les études cinétiques montrent une bonne spécificité et une bonne sensibilité ; de plus, l'utilisation d'un capteur à 9 plots permet par exemple une détection en temps réel de mutations ponctuelles de l'oncogène P53 [17]. Les études actuelles réalisées en collaboration avec la société Genoptics, qui développe l'appareillage d'imagerie SPR, ont permis de réaliser des puces comportant 50 et 100 plots.

Procédés de détection

La détection du phénomène d'hybridation d'un oligonucléotide sonde immobilisé est en règle générale effectuée par microscopie de fluorescence. Dans ce contexte, un fluorophore est greffé sur l'ADN cible durant l'étape de PCR. La fluorescence est une technique sensible et possédant une très bonne résolution spatiale. Cependant, du fait de la miniaturisation des biocapteurs et de leur intégration dans des dispositifs électroniques, d'autres voies de détection ont été développées avec un fort engouement pour les techniques électrochimiques.

La détection directe

Elle repose sur la transduction en valeurs mesurables de phénomènes physiques perturbés par l'hybridation. Nous la définissons au sens large, c'est-à-dire ne nécessitant pas le marquage chimique ou enzymatique de la cible (réalisé au cours de l'amplification de l'acide nucléique à analyser), ni celui du duplex ou du support. Les dispositifs les plus communément utilisés (électrochimiques, piézo-électriques ou à résonance plasmonique) détectent les variations de charges électriques, d'indice de réfraction et de masse résultant de la formation du duplex. En détection électrochimique directe, le signal électrique provient des perturbations engendrées par l'hybridation, soit à l'interface entre le double brin et le support (méthodes impédimétriques, ChemFET) [18], soit des propriétés électroniques du support PPy [10] (voir ci-après la détection électrochimique indirecte).

Une autre approche de la détection électrochimique sans marquage consiste à oxyder les bases guanine de l'ADN [19]. En effet, cette base nucléique présente un potentiel redox (0,81 V/ECS) permettant sa détection en milieu aqueux, ce qui n'est pas le cas de l'adénine (1,4 V/ECS). L'oxydation des guanines peut aussi être relayée par un médiateur redox en solution. Ainsi, le complexe de ruthénium, Ru(bipy)₃²⁺, a été utilisé comme relais d'électron entre l'ADN et une électrode modifiée par des sondes oligonucléotides après hybridation [20]. Ces méthodes de détection n'étant pas totalement spécifiques de la séquence analysée, de nouveaux matériaux, tels que le diamant dopé au bore qui présente une large fenêtre électrochimique sans adsorption de l'ADN [21] et permet l'oxydation des deux bases électro-oxydables, sont actuellement étudiés [22]. Toutefois, la détection électrochimique directe de l'ADN n'est pas totalement compatible avec l'immobilisation des sondes oligonucléotides qui donne aussi une réponse électrochimique sans hybridation. La société Xanthon a tenté de commercialiser une plate-forme de détection électrochimique comportant des sondes modifiées en remplaçant les guanines par la base nucléique non physiologique et électro-inactive, l'inosine [23]. Le signal résiduel de la sonde est minimisé au dépend de la qualité du phénomène de reconnaissance. Ainsi, une séquence cible 21-mère comportant 5 guanines a pu être détectée à des niveaux de 43 attomoles (amole ; 10⁻¹⁸ moles).

La détection indirecte

En détection indirecte, et selon l'objectif recherché (révélation, suivi cinétique ou quantification de l'hybridation), chaque méthode de détection (optique, électrochimique...) apporte sa spécificité et son choix dépend du type de substrat et du procédé d'immobilisation. Les différentes stratégies de détection électrochimique indirecte peuvent ainsi être répertoriées de manière générique :

- Marquage redox, soit par une sonde électro-active, soit par une oxydoréductase ;
- Utilisation de petites molécules redox interagissant spécifiquement avec le double brin ;
- Modulation de la réponse redox de la matrice d'immobilisation des sondes de capture par le phénomène d'hybridation. Comme exemple de marquage préalable de l'ADN cible par une espèce redox, on peut citer l'utilisation du ferrocène [24] qui a été mise à profit par la société Motorola pour l'élaboration de capteurs d'ADN. Très récemment, A. Hegger

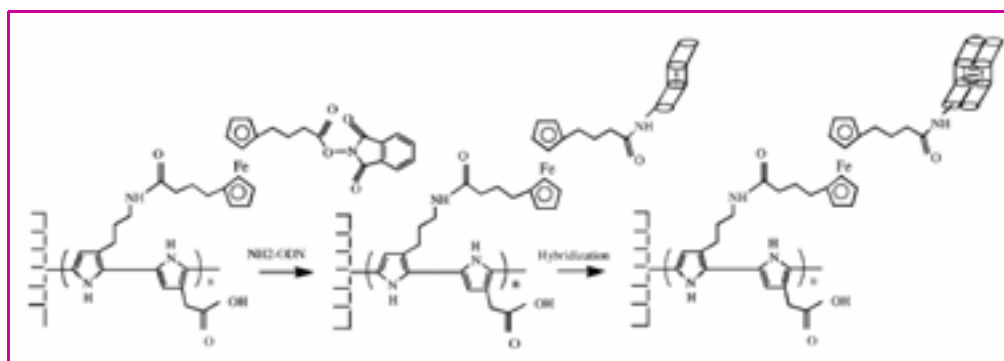


Schéma 6 - Structure des films électro-actifs destinés à la détection de l'hybridation d'ADN (d'après [27]). Le film électro-actif est synthétisé électrochimiquement, les sondes redox étant liées de manière covalente au monomère, puis est post-fonctionnalisé par l'oligonucléotide sonde avant de procéder à l'hybridation.

et coll. ont détecté par voltampérométrie cyclique le changement de conformation après hybridation d'un ODN-boucle portant un ferrocène à l'une de ses extrémités [25]. Toutefois, le marquage unitaire de la cible ne permet pas d'obtenir un facteur d'amplification suffisant ; ainsi J. Wang et coll. ont développé le marquage des sondes par des billes polymères poreuses chargées de ferrocène et permettant un facteur d'amplification lié à la charge en molécule électro-active [26]. Garnier et coll. ont montré que la réponse électrochimique du support PPy était modifiée par l'hybridation donnant lieu à un déplacement du potentiel et à une diminution du courant mesurés lors de l'oxydation de la matrice hôte [10]. Afin d'obtenir un signal plus stable, Korri-Youssouffi et coll. ont modifié les films obtenus en intercalant un centre redox ferrocène entre l'oligonucléotide sonde et la matrice polymère (schéma 6) et ont observé le même type de phénomène électrochimique lié à la reconnaissance [27]. Par ailleurs, l'amplification redox peut être menée par l'utilisation d'enzymes redox tels que la peroxydase de Raifort ou l'alkaline phosphatase. Des mutagénèses dirigées ont permis d'accroître l'activité enzymatique de la phosphatase d'un facteur 40, tout en maintenant une haute stabilité thermique [28]. Infineon Technologie (Allemagne) [29] annonce la mise au point pour 2003 d'une biopuce (ADN, protéine) 128 plots sur CMOS. L'alkaline phosphatase est liée à la cible par une interaction biotine/extravidine et catalyse un substrat sacrificiel (p-aminophénylphosphate) en un produit (p-aminophénol) détectable par ampérométrie. La détection électrochimique totale prend moins de 3 mn. A. Heller et coll. ont développé ce principe en immobilisant les sondes dans

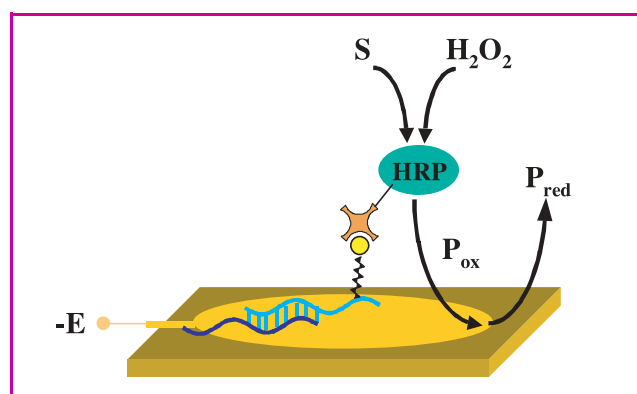


Schéma 7 - Principe de la détection amplifiée de l'hCMV. P_{ox} est détecté par DPV. HRP = peroxydase de raifort, S = o-phénylènediamine, P = 2,2'-diaminoazobenzène.

un polymère électro-actif médiateur de l'activité enzymatique, obtenant ainsi des seuils de détection de 3,3 amole/L sur microfibre de carbone [30].

B. Limoges *et al* ont mis en œuvre des conjugués acides nucléiques-enzymes comme :

- la phosphatase greffée sur l'ADN du cytomégalovirus humain (hCMV, virus de la famille des herpès), quantifiée par la détection électrochimique d'un dérivé du cobaltocénium qu'elle relargue *via* l'hydrolyse d'un sel de phosphate monoester-cobaltocénium (des limites

de détection de 10 amole/mL sont rapportées [31] ;
- la peroxydase de raifort (HRP), greffée sur l'hCMV et quantifiée par la détection du chromophore généré à partir du substrat o-phénylène diamine (schéma 7). Les limites de détection sont de 0,6 amole/mL [32].

Willner *et al.* ont récemment développé un nouveau concept qui implique la formation d'une réplique redox active et son utilisation comme relais d'électron dans une transformation bioélectrocatalytique [33]. La glucose oxydase est en solution, tandis que le cofacteur de l'enzyme, dérivé du ferrocène, est inclus par PCR dans la réplique de l'ADN viral cyclique M13 ϕ qui comprend 7 229 bases.

Le marquage de l'ADN cible par des nanoparticules d'or a été exploité dans diverses voies de détection comme l'amplification du signal SPR ou de microgravimétrie [34], la dissolution par oxydation des nanoparticules d'or qui génère les ions Au^{III} détectés électrochimiquement [35] ou la variation de conductivité engendrée par la connexion de deux électrodes au travers d'un réseau plan de nanoparticules d'or [36].

Les techniques de détection par marquage redox précédemment citées nécessitent la modification chimique des sondes ADN. Afin d'éviter cette étape, certains chercheurs se sont penchés sur l'utilisation de molécules électro-actives possédant une spécificité importante pour le duplex. On peut citer plusieurs familles de ces petites molécules incluant les intercalants (daunomycine [37], bleu de méthylène), les « threading agents » (SND-1) et enfin les molécules de reconnaissance du petit (Hoechst 33258) ou du grand sillon. Récemment, Takenaka a présenté une revue des différentes molécules utilisées [38]. L'amplification résulte de la multiplicité de l'intercalation le long du duplex. Wang *et al* rapporte des niveaux de détection de 4×10^{-9} M pour une séquence d'HIV-1 intercalée par Co(phen)₃³⁺ [39]. En règle générale, les intercalants sont des molécules planes polyaromatiques venant interagir avec le duplex en s'insérant dans l'empilement des bases nucléiques. Ces molécules sont rarement spécifiques de la séquence détectée, contrairement aux molécules interagissant avec le petit sillon qui doivent présenter une courbure et une densité électronique en rapport avec la taille du duplex et la nature des bases nucléiques impliquées. Excepté quelques molécules, telles que le SND-1 synthétisé par Takenaka, le bleu de méthylène ou les complexes de cobalt (Co(phen)₃³⁺ par exemple), la plupart des systèmes d'interaction avec le duplex sont des molécules pharmaceutiques développées pour leurs propriétés thérapeutiques et présentant une activité redox difficilement exploitable (réversibilité,

potentiel). Dans ce contexte, les recherches s'orientent vers le design moléculaire de nouveaux intercalants redox tels que ceux développés par M. Demeunynck (LEDSS, Univ. J. Fourier, Grenoble I) et caractérisés au laboratoire. La figure 5 présente la structure de l'une de ces molécules dérivées des pyridoacridones et son mode d'interaction avec le duplex, ainsi que la réponse électrochimique par voltamétrie pulsée différentielle (DPV) après interaction avec un simple brin ou un double brin d'ADN immobilisé sur électrode.

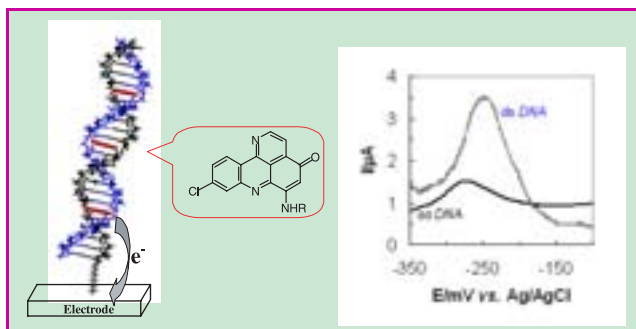


Figure 5 - Intercalant dérivé de la pyridoacridone et réponse électrochimique enregistrée par DPV sur électrode de platine modifiée par un film de polypyrrole après interaction avec un ADN simple ou double brin adsorbé.

Conclusion

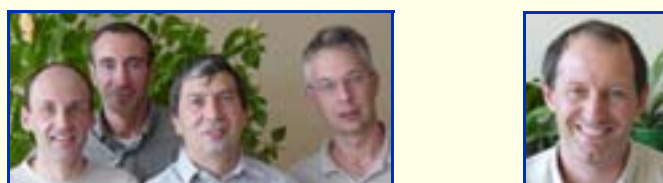
Si le concept est simple, la technologie des puces à ADN est complexe car elle recouvre des compétences complémentaires dans des disciplines très diverses comme la chimie des surfaces, l'électrochimie moléculaire, les microtechnologies, l'électronique et la biologie moléculaire. Parmi les méthodes classiques d'adressage et d'immobilisation comme le « spotting » sur verre, l'adressage électrochimique de l'immobilisation de biomolécules (dont l'ADN) sur des électrodes est désormais un domaine mature qui devrait aboutir à des produits commercialisables (APIBIO, Genopics...) dans les deux ans à venir.

La détection électrochimique est attractive par sa souplesse d'utilisation (on évite un matériel lourd en remplaçant l'excitation laser par un signal électrique), et offre une palette de possibilités, que ce soit par amplification électrocatalytique à l'aide d'un marqueur redox (greffé ou intercalé) ou par transduction électrochimique en utilisant un support polymère conducteur. Pour l'avenir, l'intégration de la partie puce à ADN dans un système « lab-on-chip » ayant pour fonction d'intégrer différentes opérations dont l'immobilisation des sondes, l'électrophorèse et PCR intégrées de l'échantillon biologique, l'hybridation et la détection, sera bien plus compatible avec une interrogation/détection électrique qu'avec un guidage optique dont le tracé ne doit pas interférer avec le réseau de la microfluidique.

Références

- [1] Yole Micronews, avril 2002, 2, p. 4 (www.yole.fr).
- [2] Pirrung M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, p. 1276.
- [3] Delpech M., *Ann. Bio. Clin.*, **2000**, 58, p. 28.
- [4] Souteyrand E., *Analysis*, **1999**, 27, p. 639.
- [5] Beir M., Hoheisel I.D., *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, p. 11.
- [6] Roget A., Livache T., *Mikrochim. Acta*, **1999**, 131, p. 3.
- [7] Heller M.J., Forster A.H., Tu E., *Electrophoresis*, **2000**, 21, p. 157.
- [8] Bidan G., Billon M., Galasso K., Livache T., Mathis G., Roget A., Torres-Rodriguez L.M., Vieil E., *Appl. Biochem. & Biotech.*, **2000**, 89, p. 183.

- [9] Wang J., Cai X., Rivas G., Shiraishi H., Farias P., Dontha N., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, p. 2629.
- [10] Korri-Youssoufi H., Garnier F., Srivastava P., Godillot P., Yassar A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, p. 7388.
- [11] Livache T., Fouqué B., Roget A., Marchand J., Bidan G., Téoule R., Mathis G., *Anal. Biochem.*, **1998**, 255, p. 188.
- [12] Lopez-Crapez E., Livache T., Marchand J., Grenier J., *Clinical Chem.*, **2001**, 47, p. 186.
- [13] Livache T., Bazin H., Caillat P., Roget A., *Biosensors and Bioelectronics*, **1998**, 13, p. 629.
- [14] Dupont-Filliard A., Roget A., Livache T., Billon M., *Anal. Chem. Acta*, **2001**, 449, p. 45.
- [15] Livache T., Guédon P., Brakha C., Roget A., Levy Y., Bidan G., *Synth. Met.*, **2001**, 121, p. 1443.
- [16] Guédon P., Livache T., Martin F., Lesbre F., Bidan G., Levy Y., *Anal. Chem.*, **2000**, 72, p. 6003.
- [17] Livache T., Maillart E., Lassalle N., Mailley P., Corso B., Guédon P., Roget A., Levy Y., *J. Pharm. & Biomed. Anal.* (accepté).
- [18] Souteyrand E., Cloarec J.P., Martin J.R., Wilson C., Laurence I., Mikkelsen S., Lawrence M.F., *J. Phys. Chem.*, **1997**, 101, p. 2980.
- [19] Jelen F., Tomschik M., Palecek E., *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, 423, p. 141.
- [20] Popovich N.D., Eckardt A.E., Mikulecky J.C., Napier M.E., Thomas R.S., *Talanta*, **2002**, 56, p. 821.
- [21] Prado C., Flechsig G.U., Gründler P., Foord J., Marken F., Compton R., *Analyst*, **2002**, 127, p. 329.
- [22] Fortin E., Chane-Tune J., Mailley P., Szunerits S., Marcus B., Petit J.-P., Mermoux M., Vieil E., *Bioelectrochemistry* (accepté).
- [23] Xanthou.htm, Thorp H., *Trends in Biotech.*, **1998**, 16, p. 117.
- [24] Ihara T., Nakayama M., Murata M., Nakano K., Maeda M., *Chem. Commun.*, **1997**, 17, p. 1609.
- [25] Fan C., Plaxco K., Heeger A., *Proc. Nat. Amer. Soc.*, **2003**, 100, p. 9134.
- [26] Wang J., Polsky R., Merkoci A., Turner K.L., *Langmuir*, **2003**, 19, p. 989.
- [27] Korri-Youssoufi H., Makrouf B., *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 469, p. 85.
- [28] Boulain J.-C., Muller B., Ducancel F., *L'Act. Chim.*, **2002**, 8-9, p. 18.
- [29] <http://www.infineon.com/news/press/archive.htm>
- [30] Dequaire M., Heller A., *Anal. Chem.*, **2002**, 74, p. 4370.
- [31] Bagel O., Degrand C., Limoges B., Joannes M., Azek F., Brossier P., *Electroanalysis*, **2000**, 12, p. 1447.
- [32] Azek F., Grossiord C., Joannes C., Limoges B., Brossier P., *Anal. Biochem.*, **2000**, 284, p. 107.
- [33] Patolsky F., Weismann Y., Willner I., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, p. 770.
- [34] Patolsky F., Ranjit K., Lichtenstein A., Willner I., *Chem. Commun*, **2000**, p. 1025.
- [35] Autier L., Grossiord C., Brossier P., Limoges B., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, p. 4450.
- [36] Park S.J., Andrew T., Mirkin C., *Science*, **2002**, 295, p. 1503.
- [37] Mascini M., Lucarelli F., Palchetti I., Marrazza G., *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **2001**, 4414, p. 8.
- [38] Takenaka S., *Electrochemical detection of DNA with small molecules, DNA and RNA Binders, vol. 1*, M. Demeunynck, C. Bailly, W.D. Wilson (eds), Wiley VCH, **2002**, p. 224.
- [39] Wang J., Cai X., Rivas G., Shiraishi H., Dontha N., *Biosens. & Bioelectr.*, **1997**, 12, p. 587.



De gauche à droite : **Martial Billon**¹, maître de conférences à l'université Joseph Fourier (Grenoble I), électrochimiste, développe l'immobilisation électrochimique et par affinité de biomolécules, et la biodétection par électrochimiluminescence ; **Gérard Bidan**², expert senior CEA, directeur adjoint de l'UMR SprAM*, a introduit dès 1981 la fonctionnalisation du polypyrrole ; **André Roget**, chercheur CEA, biochimiste, spécialiste de la bioconjugaison de monomères du pyrrole et de quantum dots et **Thierry Livache**³, chercheur CEA, responsable du groupe CREAB, biochimiste, développe l'imagerie de résonance plasmonique de surface pour le suivi en temps réel d'interactions biologiques. Ces trois dernières personnes ont initié avec **Robert Teoule** (CEA, retraité) le procédé MICAMTM d'immobilisation électro-adressée d'ODN. En encart : **Pascal Mailley**⁴, maître de conférences à l'université Joseph Fourier (Grenoble I), bio-électrochimiste, développe l'utilisation des intercalants redox comme marqueurs de capteurs à ADN et l'utilisation des électrodes de diamant pour la bio-électroanalyse.

* UMR 5819, CEA/CNRS/UJF, Structures et propriétés des architectures moléculaires, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09.

¹ Tél. : 04 38 78 48 33. Courriel : billon@drfmc.ceng.cea.fr

² Tél. : 04 38 78 48 41 - Fax : 04 38 78 51 45. Courriel : gidan@cea.fr, **auteur correspondant**

³ Courriel : thierry.livache@cea.fr

⁴ Tél. : 04 38 78 32 19. Courriel : mailley@drfmc.ceng.cea.fr

La chimie au service de l'imagerie médicale

Jean-Paul Meunier, Gilbert Schorsch et Richard Zimmermann

Abstract

Medical imaging and chemistry

Diagnostic imaging frequently requires the use of agents that do not show an obvious role to patients. Nevertheless, these products fall definitely in the drug category and therefore are bound to the same development constraints, although no therapeutic effects are expected. This article attempts to explain the physical background of the most common imaging technologies as well as the mechanisms of action of the administered products. With these substances it is now possible to get morphological information with techniques based on X-rays, magnetic resonance or ultrasound, but also to obtain information on the functions of organs or cells by using radiolabeled molecules. Progresses, perspectives and limits of these technologies are described through several concrete examples. This overview demonstrates also that imaging participates strongly to the development of medicine. Diagnostics benefit simultaneously from technology improvements and new pharmaceuticals.

Mots-clés

Imagerie médicale, analyse morphologique, analyse fonctionnelle, rayons X, IRM, échographie, scintigraphie, médecine nucléaire, agents de contraste, radioéléments, scanner, tomographie, fusion d'images.

Key-words

Medical imaging, morphological analysis, functional analysis, X-rays, MRI, ultrasound, scintigraphy, nuclear medicine, contrast agent, radiopharmaceutical, tomography, image fusion.

L'imagerie médicale

L'expérience emblématique de Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923)

Le 22 décembre 1895, Röntgen obtient, dans son laboratoire à l'Université de Würzburg, la première image d'une main : celle de son épouse, traversée par des rayons X produits dans un tube de Crookes. Sa découverte est récompensée dès 1901 par le premier prix Nobel de physique. Son retentissement rapide et universel contraste avec le temps mis pour identifier la nature exacte des rayons utilisés.

Cette expérience démontre qu'il est possible de visualiser un squelette, riche en phosphate de Ca, moyennant l'utilisation de rayonnements invisibles. Ces rayons « X » sont atténués par les milieux riches en électrons. Les milieux opaques apparaissent donc en noir sur une plaque photographique. Rapidement, les rayons X permettent d'examiner en détail le crâne ou la cage thoracique d'un patient. Ils facilitent aussi la localisation des éclats d'obus des blessés de la Première Guerre Mondiale. Marie Curie y prend une part active en créant « un service de radiologie auxiliaire du Service de Santé Militaire » et en l'équipant de voitures légères de radiologie. Par la suite, les rayons X sont à l'origine de collaborations fructueuses entre radiologues et chirurgiens.

Incontestablement, cette expérience marque le début de l'imagerie médicale et, reconnaissons-le par voie de conséquence, des avancées de la médecine.

Des progrès constants grâce à la chimie

Par la suite, tous les types de rayonnements seront étudiés, et la plupart trouveront des applications en médecine dès

lors que des moyens de détection appropriés seront disponibles.

Au départ, l'imagerie médicale est utilisée essentiellement pour l'**analyse morphologique** : voir un organe, vérifier sa forme, sa taille ou son intégrité, suivre sa croissance. Après les rayons X, d'autres signaux physiques, la résonance magnétique et les ultrasons, permettent de visualiser les différents organes du corps humain avec des contrastes et des définitions spécifiques. Progressivement, la résolution est devenue telle que les défauts, constatés à ces petites échelles, permettent également d'apprécier l'état pathologique de l'organe et l'extension éventuelle d'une maladie. Néanmoins, ce diagnostic se limite à l'analyse morphologique. Mais comme nous le verrons, l'imagerie médicale profite aussi de l'accès aux radio-isotopes et s'intéresse progressivement à

Glossaire

Cholangiographie

Étude fonctionnelle de l'élimination hépatique.

Lymphome

Cancer apparaissant dans les cellules du système lymphohématopoïétique (lymphocytes).

Période radioactive ou demi-vie

Temps au bout duquel la moitié des atomes d'un élément radioactif initialement présents a disparu par transformation spontanée. La période, appelée aussi demi-vie, est une constante physique précise pour un radio-isotope donné, n'est influencée ni par la température, ni par la pression, et varie d'un radionucléide à l'autre.

Système lymphatique

Système naturel parallèle au système sanguin chargé de combattre toutes les agressions externes et drainant la lymphe vers les ganglions lymphoïdes.

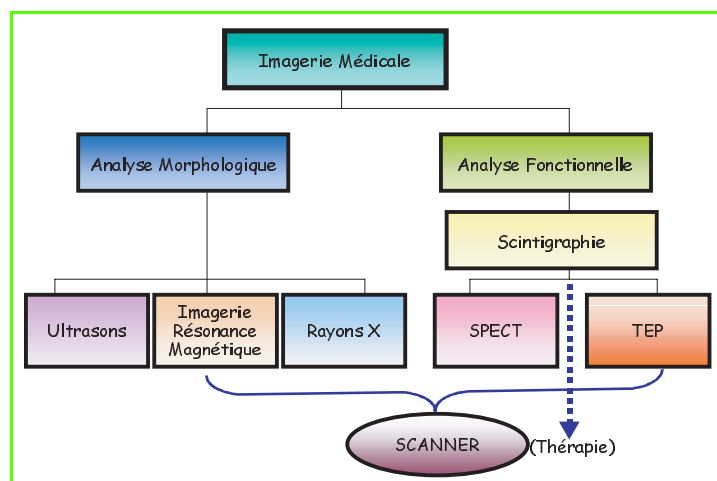


Figure 1 - Schéma d'ensemble des techniques d'imagerie médicale.

l'analyse fonctionnelle, c'est-à-dire à la compréhension et au suivi du fonctionnement des organes vitaux et plus généralement à celui des tissus, et donc de cellules spécifiques. Le domaine couvert par cet article est résumé dans la figure 1.

Durant ces vingt dernières années, les développements de l'imagerie médicale ont été foisonnants. Ils ont profité simultanément :

- des **progrès décisifs de l'instrumentation** en matière de génération des divers signaux (rayons X et γ , champs électromagnétiques, ultrasons, cyclotrons pour la production d'isotopes radioactifs...) et de leur détection (scanners, gamma-caméras, TEP-scan, voir ci-après...). Les examens deviennent plus précis, gagnent en résolution et leurs durées sont de plus en plus courtes ;
- des **apports considérables des logiciels informatiques**. Grâce au numérique, ces derniers permettent d'accéder et d'interpréter des images en 2D ou 3D et, plus récemment, de

procéder à des fusions d'images : issues d'une combinaison judicieuse de techniques, elles conduisent à des diagnostics plus pertinents.

Mais ces progrès n'auraient pas été possibles sans **l'apport décisif de la chimie** qui a permis de mettre à la disposition des médecins des produits de contraste, des vecteurs, des radio-isotopes et des molécules marquées sous des formes diverses (sels, complexes minéraux et organiques...), de mieux en mieux ciblés et tolérés.

Les marchés et ses principaux acteurs

En 2002, le marché mondial des produits d'imagerie, toutes techniques confondues, représentait environ 4,5 milliards d'euros. Parmi les 800 millions de clichés réalisés, environ 120 millions nécessitaient l'injection d'un produit. Quelques 28 millions de patients ont pu bénéficier d'une image de médecine nucléaire utilisant des produits radioactifs pour un montant de 1,7 milliards d'euros.

Les sociétés qui se répartissent le marché des agents de contraste (RX, IRM et ultrasons) et de médecine nucléaire sont peu nombreuses. Six sociétés se partagent plus de 90 % du marché : Amersham Health (rachetée par GE-General Electric en octobre 2003), Bracco, Tyco Healthcare (Mallinckrodt Imaging), Schering et Bristol-Myers Squibb Medical Imaging (précédemment Dupont) et Guerbet. Les cinq premières sont, dans le désordre, les principaux producteurs de produits radiopharmaceutiques. Il est intéressant de voir que les acteurs de ce marché sont plutôt européens. Mais GE-General Electric, producteur d'équipement ayant racheté récemment Amersham Health, va rétablir un peu l'équilibre. Incontestablement, les trois acteurs principaux sont Amersham Health, Schering et Mallinckrodt.

Avec Schering SA près de Lille, Guerbet à Roissy (entreprise familiale produisant des produits de contraste) et CIS Bio International (Schering) à Saclay (spécialisée en médecine nucléaire), la France joue un rôle respectable.

Encadré 1

Scanner : une technique d'acquisition générique

Le scanner (visualiser en anglais), et nom familier de la tomographie (du grec *tomein*, couper), utilise un détecteur de rayonnement tournant autour du corps. La puissance des calculateurs actuels permet de déduire l'origine d'un signal ponctuel et de le situer dans un plan de façon à reconstruire l'équivalent d'une image en coupe. Le scanner spiralé (ou hélicoïdal) combine une ou plusieurs rotations autour du corps avec un mouvement axial du patient permettant l'acquisition d'une image tridimensionnelle du corps. La qualité de l'image est fonction de la capacité de l'appareil à visualiser des détails de petites dimensions (résolution spatiale) et du pouvoir discriminatoire du détecteur pour pouvoir différencier deux structures de coefficient d'atténuation ou d'émission proche (résolution de densité). Contrairement aux autres modalités, un appareil de tomographie scannographique par rayons X doit nécessairement être équipé d'une source disposée à l'opposé du détecteur et qui tourne en même temps que lui. Pour la tomographie SPECT, TEP (voir les outils de détection) ou IRM, les constructeurs sont allés jusqu'à adapter trois têtes de détection se déplaçant simultanément afin de réduire d'autant le temps d'acquisition des données. Les dernières générations d'appareils réunissent une tête de détection RX associée à sa tête source avec un autre type de multidétecteur pour obtenir des images simultanées dites de fusion ou combinées.



Figure 3 - Cliché scanner.

Reconstruction 3D au scanner multicoupe des structures portales : la flèche indique une dérivation par l'intermédiaire d'une veine coronaire stomacique. Utilisation d'Iopamiron 370[®] comme agent de contraste.

Les principales techniques de radiologie

La radiologie par rayons X

Une adaptation constante des agents de contraste

En première approximation, les rayons X sont atténués proportionnellement à la densité électronique du milieu qu'ils traversent. Après la visualisation directe des structures osseuses, des articulations ou de la forme des organes, l'utilisation d'agents de contraste s'est imposée rapidement, après opacification, pour l'observation des cavités : angiographie des vaisseaux sanguins, urographie des reins et des voies urinaires, examen de la vésicule et des canaux biliaires...

En première approximation, il suffit d'augmenter la densité électronique du milieu pour augmenter localement le contraste. Seuls des éléments de numéro atomique élevé peuvent être utilisés. Le bismuth, employé initialement en digestif, est vite abandonné à cause de sa toxicité. Le sulfate de baryum, adopté préférentiellement en lavement, le remplace. La mise en évidence, inopinée, de leur facilité d'élimination rénale a permis aux produits à base d'iode de s'imposer progressivement et probablement définitivement. Dès 1931, apparaissent des hétérocycles mono- puis di-iodés. Il faut attendre 1950 pour voir apparaître le premier cycle benzénique tri-iodé. Il constitue la référence des produits actuels.

L'iode est lié à une molécule vectrice par covalence et la qualité du produit en dépend. Les **produits dits ioniques** furent utilisés en premier. Exemple : l'amidotrizoate de sodium et de méglumine qui est un dérivé d'un tri-iodobenzoate à chaînes latérales, obtenu à partir d'acide benzoïque tri-iodé. L'acide de base peut être également de l'acide isophtalique ou trimésique.

Des dimères, formés par deux monomères tri-iodés reliés entre eux, donc hexa-iodés, de plus faible osmolalité, furent proposés pour les examens cardiaques et d'autres dimères comme produits de cholangiographie. Ces produits à visée hépatique disparurent rapidement, car moins bien tolérés que les monomères éliminés par le rein.

En effet, les premiers produits ioniques tri-iodés possédaient une pression osmotique trop élevée. Exprimée en osmolalité, celle-ci atteignait plus de 7 fois celle du plasma qui se situe aux environs de 300 milliosmoles/kg d'eau.

Il fallait par conséquent éliminer les groupements ioniques des molécules tout en assurant leur hydrosolubilité. La diminution de l'osmolalité permet ainsi d'effectuer des examens réputés risqués, en limitant considérablement l'appel d'eau massif lors des injections à gros volumes.

La pression osmotique des solutions admise aujourd'hui comme optimale se situe aux environs du double de l'osmolalité plasmatique. Elle permet ainsi d'assurer une diurèse positive par filtration glomérulaire (par les entités élémentaires de la fonction rénale). La disparition du caractère ionique est obtenue en amidifiant les fonctions carboxyliques, et l'amélioration de la solubilité du produit en augmentant le nombre de fonctions hydroxyles sur les chaînes latérales. Les produits utilisés aujourd'hui datent des années 80. La formule de la molécule d'Iopamidol[®], produit de contraste tri-iodé non ionique peu osmolaire, utilisée couramment, est donnée dans la *figure 2*.

L'injection directe de produits dit non ioniques a permis la réalisation de myélographies, désormais bien tolérées, mais remplacées de plus en plus par l'IRM. Ces derniers produits

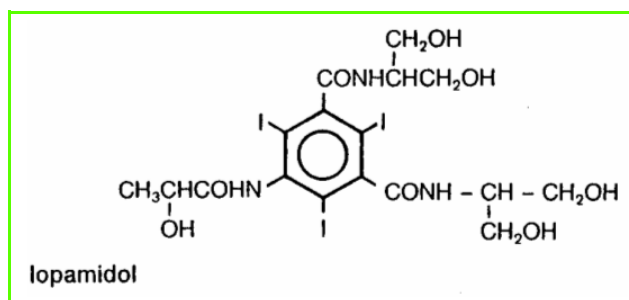


Figure 2 - Formule chimique de l'Iopamidol[®], l'un des agents de contraste de la gamme Schering.

sont surtout utilisés en injection intraveineuse dans approximativement 70 % des examens au scanner. Des sels de baryum BaSO₄, très insoluble, survivent encore, mais probablement plus pour longtemps. Ce produit reste réservé à quelques examens digestifs. Notons enfin qu'il est possible d'effectuer des coloscopies virtuelles après traitement 3D d'un scanner du colon, et ce uniquement après insufflation d'air, sans utilisation de produit.

Les différents contrastes en rayons X sont la densité aérique, la densité hydrique, les densités graisseuse et calcique.

Le produit de contraste idéal ?

Les spécifications du produit de contraste idéal sont ainsi faciles à établir. Il doit apporter le contraste, là où il faut, quand il faut, en quantité nécessaire et suffisante, et disparaître le plus rapidement possible. Il doit s'éliminer, de préférence par le rein par filtration glomérulaire, ou par un processus naturel connu. Le produit doit être stable, sans métabolisation et s'éliminer, inchangé. Il ne doit pas posséder d'effets adverses mineurs - au mieux, aucun -, ni montrer d'effet pharmacologique. Le produit doit être présenté à des concentrations et dans des présentations utilisables directement, c'est-à-dire accompagné d'un matériel d'injection ou d'ingestion performant et compatible.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Ses bases physiques

En créant la locution « imagerie par résonance magnétique », les médecins ont voulu retirer de leur vocabulaire le mot « nucléaire » qui pouvait effrayer les patients. La technologie utilisée est bien la résonance magnétique nucléaire.

Soumis à un champ magnétique d'une intensité qui peut aller jusqu'à plusieurs teslas, les noyaux de certains atomes (ici uniquement celui d'hydrogène, c'est-à-dire un proton), pouvant eux-mêmes être considérés comme de mini aimants, s'alignent dans ce champ. En soumettant ces noyaux à une onde de radiofréquence, de durée très courte et bien spécifique de cet atome, leur spin va pouvoir être modifié. Ils entrent en résonance avec cette onde. Lors de la coupure de cette radiofréquence externe, leur remise en état normal va se traduire par une restitution de cette énergie sous forme d'un signal que l'on pourra capter et mesurer selon deux critères : la relaxation longitudinale avec retour de la polarité initiale, T1, et la relaxation transversale avec dérésonance, T2. L'IRM permet la lecture des images pondérées en T1 et/ou en T2, qui fournissent des contrastes avec des intensités exponentielles. On peut, sans inconvénient, trouver l'origine du signal émis et donc le localiser dans l'espace, en ayant modifié légèrement le

champ magnétique principal dans sa longueur en gradients localisables.

Or l'hydrogène est précisément le constituant majoritaire des tissus humains en termes de nombre d'atomes, car il est l'élément prépondérant de l'eau et des graisses, matières qui constituent près des neuf dixièmes de notre corps.

L'IRM permet donc de visualiser en trois dimensions la densité d'eau, de graisses et d'autres matières organiques contenant de l'hydrogène dans notre corps. C'est la densité monoprotonique qui est à la base du signal IRM. Comme cette densité diffère d'un organe à un autre, on pourra sans inconvénient obtenir les contours de ces éléments avec une précision de l'ordre de quelques millimètres. La technique étant encore onéreuse, on préférera utiliser les méthodes classiques de radiologie pour visualiser un bras cassé, mais le résultat est tout aussi probant.

Les agents de contraste pour IRM

Les produits de contraste les plus utilisés en IRM utilisent les propriétés paramagnétiques de certains atomes. Le paramagnétisme dépend du nombre d'électrons célibataires des couches externes. L'atome qui s'avère être le plus paramagnétique est le gadolinium avec sept électrons célibataires. Il est utilisé sous forme d'un complexe hydrophile afin de lui apporter une pharmacocinétique d'élimination essentiellement rénale. Les produits diffèrent en général par le type de complexe mis en œuvre : ce sont tous des « gadocycles ».

Les examens du foie requièrent parfois des produits qualifiés de « superparamagnétiques » qui procurent un contraste lacunaire en T2. D'autres produits à base de gadolinium réalisent de véritables cholangiographies, mais ils doivent aussi être engagés dans des complexes lipophiles. Ils se lient alors volontiers aux protéines circulantes et sont éliminés préférentiellement par la bile.

Encadré 2

Retour aux sources

Les radionucléides sont des atomes instables qui se désintègrent en émettant divers types de rayonnements pour conduire directement ou par cascade à un autre nucléide stable. Quatre types de rayonnements ont un intérêt en médecine nucléaire :

- **Les rayonnements gamma (γ)**, de courte longueur d'onde et d'énergies très variables, capables de traverser des épaisseurs importantes de matière ;

- **Les rayonnements de type bêta + (β^+)**, constitués de positons, des électrons chargés positivement, qui dès qu'ils se recombinent avec des électrons s'annihilent mutuellement pour se transformer en énergie sous la forme de deux photons γ de 511 keV s'éloignant de façon linéaire dans des directions opposées ;

- **Les rayonnements de type bêta - (β^-)**, constitués d'électrons de vitesse très élevée et de pénétration importante ;

- **Les rayonnements alpha (α)**, constitués de noyaux d'hélium comportant deux protons et deux neutrons. Ils sont très ionisants, mais du fait de leur masse, ils sont très rapidement absorbés par la matière.

Certains isotopes sont également émetteurs d'électrons Auger, mais le rayon d'action de ce type de rayonnement est tellement faible qu'on ne peut envisager leur utilisation thérapeutique que liée à des vecteurs qui sont eux-mêmes capables d'approcher les noyaux cellulaires.

Outre le type de rayonnement, les radionucléides sont caractérisés non seulement par leur énergie mais aussi par leur période ou demi-vie. L'énergie a une importance primordiale car sa valeur est directement liée à sa capacité à traverser la matière ou à la détruire, et donc à la dangerosité de l'isotope.

Curieusement, ce n'est pas le produit de contraste que l'on voit, mais son effet sur la relaxation des protons proximaux qu'il accélère. Apparemment, le signal en T1 des protons situés à proximité de l'agent paramagnétique semble amplifié.

L'analyse fonctionnelle est possible dans certains cas bien précis comme le suivi de l'irrigation du cerveau ou du fonctionnement du cœur au travers de l'analyse en direct des taux d'oxygène contenus dans le sang.

Si l'IRM n'était pas aussi chère et plus développée (moins de 200 appareils en France en 2002), elle remplacerait facilement la plupart des techniques décrites ci-dessus. On la réserve pour le moment aux examens pour lesquels le diagnostic paraît plus délicat (muscles, tendons, cerveau, tumeurs) ou pour lesquels cette méthode est bien plus efficace ou unique (neurologie, ophtalmologie, cardiovasculaire, endocrinologie, oncologie...).

Mais comme pour les rayons X et les ultrasons, l'IRM ne peut pour le moment être utilisée qu'en tant que modalité de diagnostic limitée à l'imagerie anatomique.

Le signal échosonore et l'effet Doppler

Ses bases physiques

Les ultrasons se transmettent dans la matière (et non dans le vide). Ils sont partiellement renvoyés vers leur source lorsqu'ils rencontrent une interface ou un brusque changement d'impédance de deux milieux consécutifs. Une rupture de densité ou d'élasticité d'une membrane, ou d'un tissu, comparativement à une matière isomorphe accolée (os et air, eau et air, tissu et sang...), constitue au sens large une interface. C'est l'infime partie d'ultrasons renvoyée à la même fréquence vers la sonde émettrice-réceptrice (un piézo-électrique en général) qui procure le signal après traitement.

L'échographie bénéficie aussi de l'apport de l'effet Doppler. Rappelons-nous : la fréquence d'une onde s'allonge quand sa source s'éloigne, et inversement. C'est l'effet Doppler qui explique qu'un spectateur d'une compétition de Formule 1, sur le bord de la piste, entend un bruit de moteur plus aigu quand le bolide se rapproche et plus grave lorsqu'il s'éloigne, alors que le conducteur ne perçoit aucune variation sonore.

L'effet Doppler-couleur permet ainsi d'analyser des flux. Sans contraste, il permet de colorier et de visualiser les flux se dirigeant vers la sonde et ceux qui s'en éloignent dans des couleurs différentes. Les échographes actuels couplent ces deux techniques sur une même image.

Les produits pour l'échographie

Afin de bien visualiser l'endovasculaire (intérieur du vaisseau), il fallait disposer d'un produit échogène. La cristallisation de galactose, dans des conditions précises, a apporté la solution. Lorsque le cristal de galactose se dissout, il libère des microbulles que l'on piège dès leur formation : recouvertes d'un film d'acide palmitique, elles sont stabilisées et peuvent ainsi franchir facilement la barrière pulmonaire. Ces microbulles d'air renvoient les ultrasons de manière efficace. Elles modifient l'impédance du sang dans lequel elles sont microdispersées : changement de milieu, création de nombreuses interfaces, renvoi des ultrasons vers leur source, le signal est ainsi considérablement amplifié. Plutôt que de « produits de contraste », il serait plus exact de parler d'« amplificateurs de signal écho-sonore ».

Injectés en intraveineuse, ces produits ont permis de visualiser l'arbre veineux et artériel. Le signal permet en outre d'intégrer un signal Doppler et d'augmenter ainsi le rapport signal/bruit permettant l'obtention d'images plus précises.

Deux produits sont actuellement disponibles sur le marché français. L'un dévolu au cœur droit et au réseau veineux en amont (uniquement des cristaux de galactose) : Echovist®. L'autre, aux réseaux veineux et artériel et au cœur droit et gauche (cristaux de galactose additionnés de 0,1 % d'acide palmitique) : Levovist®.

Signalons que des essais sont actuellement tentés pour utiliser des microbulles de gaz fluorés comme amplificateurs du signal ultrasonore. Ces essais profitent de l'expérience accumulée dans l'utilisation des produits fluorés comme substituants de produits sanguins. Altana Pharma Bracco vient d'ailleurs de lancer le Sonovue (qui est en fait du SiF₆) en mai dernier.

L'évolution des techniques de radiologie

Les performances actuelles du scanner font rentrer l'imagerie médicale dans une nouvelle ère (encadré 1). Vitesse, définition des images, reconstruction 3D, interprétation facilitée, tout concourt à banaliser aujourd'hui des examens considérés hier comme des prouesses techniques.

Les techniques seront moins généralistes et devraient se spécialiser progressivement. Des IRM dédiées à un organe sont parfaitement concevables (crâne, genou, oncologie). L'écho-Doppler, utilisé dès à présent comme premier recours dans le diagnostic vasculaire, sera de plus en plus employé dans l'obstétrique.

Les apports de la médecine nucléaire pour l'analyse fonctionnelle

L'analyse fonctionnelle vise le suivi d'un marqueur spécifique qui participe au fonctionnement des cellules ciblées. Elle nécessite le recours à des vecteurs, c'est-à-dire des molécules capables d'intégrer ces cellules pour donner

les informations nécessaires. Pour suivre ces vecteurs, il faudra tout simplement les marquer, soit avec un élément émetteur de radiations (radionucléide), soit possédant une fonction répondant spécifiquement à une radiation externe (fluorescence). Dès 1940 – et en dépit des effets secondaires potentiellement néfastes de la radioactivité liée à leur utilisation chez l'Homme –, la médecine nucléaire est devenue incontournable dans le domaine de l'analyse fonctionnelle. Nous verrons ci-après qu'en jouant sur le type de radionucléides, une molécule marquée avec un radio-émetteur spécifique du diagnostic peut, de plus et très simplement, être transformée en molécule de thérapie. Le vecteur, qui doit être le plus spécifique possible par rapport à l'organe ciblé, joue dès lors un rôle primordial.

Les isotopes à usage médical

Plusieurs milliers de radio-isotopes ont été identifiés, mais seul un faible nombre répond aux critères requis pour une utilisation en médecine nucléaire (Tableau 1). Leur sélection s'est faite sur la base d'un compromis. Pour des questions pratiques, en particulier d'élimination du corps humain, les périodes de ces isotopes doivent rester très courtes, de préférence de l'ordre de quelques jours. Au contraire, les contraintes de production et de logistique nécessitent des isotopes avec des durées de vie plus longues. La période idéale se situe donc entre un et quatre jours. En dessous de quelques heures, il faut envisager la production de l'isotope sur place, soit au moyen d'un cyclotron dédié, soit à l'aide d'un générateur. Un générateur est un outil permettant de produire un isotope de courte durée (technétium 99m, forme métastable du technétium 99, par exemple, période 6,02 h) par séparation de l'isotope parent de période plus longue

Encadré 3

Unités de mesures, émission et exposition aux radiations

La radioactivité est mesurée en becquerels (Bq). Un becquerel correspond à une désintégration par seconde. Il remplace le curie qui vaut $3,7 \times 10^{10}$ Bq. La quasi-totalité des matières qui nous entourent est radioactive naturellement. A titre d'exemple, voici quelques valeurs moyennes :

- croûte terrestre : 2 000 Bq/kg,
- eau de mer : 10-12 Bq/L,
- lait : 80 Bq/L,
- pommes de terre : 100-150 Bq/kg,
- fertilisants : 5 000 Bq/kg,
- corps humain : 150 Bq/kg, soit en moyenne 12 000 Bq par individu.

Pour ce qui concerne l'Homme, cette radioactivité est évidemment due aux aliments ingérés et principalement au potassium 40 (période $1,28 \times 10^9$ années) stocké dans les os.

L'exposition aux radiations est mesurée en sieverts (Sv), unité quantifiant l'énergie absorbée par une matière, corrigée par la nature du rayonnement et le type d'organe irradié. La dose moyenne de radiations d'origine naturelle absorbée annuellement par un individu est de 2,33 mSv, dont la plus grande partie est due à l'inhalation de gaz terrestres (radon, 1,26 mSv), aux rayonnements d'origine terrestre (0,41 mSv) et aux rayonnements d'origine cosmique (0,36 mSv). A ces 2,33 mSv, il faut ajouter en moyenne 1,12 mSv d'origine artificielle dont 0,10 mSv résultant des essais de bombes atomiques du passé, mais surtout 1,00 mSv d'origine médicale (RX majoritairement). Cette dernière valeur correspond à la dose absorbée lors d'une radiographie pulmonaire.

Tableau 1 - Radionucléides de médecine nucléaire les plus couramment utilisés ou potentiellement intéressants.

| Radionucléide | Radiation | Période |
|----------------|-------------------|----------|
| Carbone 11 | β^+ | 20,4 min |
| Erbium 169 | β^- | 9,40 j |
| Fuor 18 | β^+ | 108 min |
| Holmium 166 | β^- | 26,8 h |
| Indium 111 | γ | 67,3 h |
| Iode 123 | γ | 13,3 h |
| Iode 124 | γ, β^+ | 4,18 j |
| Iode 131 | γ, β^- | 8,02 j |
| Lutétium 177 | β^- | 6,71 j |
| Rhénium 186 | γ, β^- | 3,77 j |
| Rhénium 188 | β^- | 16,9 h |
| Technétium 99m | γ | 6,02 h |
| Thallium 201 | γ | 3,05 j |
| Yttrium 90 | β^- | 64,1 h |

(en l'occurrence le molybdène 99, période 2,75 j), généralement par simple chromatographie sur alumine.

Le choix du radio-isotope sera fonction du type de radiation émise, γ ou β^+ pour un radiopharmaceutique à visée diagnostique, β^- pour un produit de thérapie. Les émetteurs α pourraient également être utilisés en thérapie, mais leur nombre restreint et la crainte qu'ils soulèvent cantonnent pour le moment leurs dérivés au stade de produits en développement.

Enfin, l'élément crucial qui prime dans le choix de l'isotope est bien la chimie de l'élément en question. Ainsi, certains métaux monovalents intéressants d'un point de vue radiologique, sont malheureusement écartés parce qu'il est difficile d'en faire des dérivés organométalliques stables chimiquement et biologiquement.

Les outils de détection de la médecine nucléaire : de la spectrométrie par émission monophotonique à la tomographie par émission de positons

En diagnostic nucléaire, la source de rayonnement est localisée dans le patient, le radio-isotope ayant été injecté, et celui-ci irradie donc tout autour de lui. La collecte d'informations peut se faire soit dans un plan, soit simultanément dans plusieurs directions en disposant les détecteurs en couronne autour du patient. **Les appareils diffèrent par le type de détecteurs adaptés au type de rayonnement et à leur énergie.** La SPECT (« single photon emission computed tomography ») est une technique d'imagerie qui, comme son nom l'indique, analyse les émissions monophotoniques γ , alors que la TEP (tomographie par émission de positon) a la particularité de mesurer les deux photons γ émis simultanément à 180° résultant de la collision entre un positon et un électron.

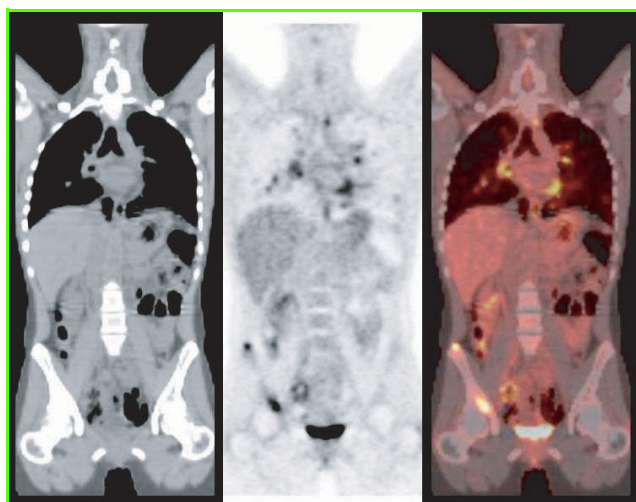


Figure 4 - Imagerie CT (RX, sans produit de contraste), TEP (après injection de FDG) et CT/TEP combinée, montrant le thorax d'un patient et identifiant nettement plusieurs tumeurs (ou métastases) parfaitement localisées.

L'évolution très récente des appareillages – et surtout du traitement informatique des données – a permis le développement d'imagerie en 3D, que ce soit en SPECT ou en TEP, mais surtout des images de fusion combinant les résultats de plusieurs technologies telles l'IRM ou le RX avec la SPECT ou la TEP.

Très récemment, les constructeurs d'outils d'imagerie ont développé des appareils mixtes permettant d'obtenir en un seul passage des images CT/SPECT, voire CT/TEP.

Quelques applications de médecine nucléaire

Une utilisation courante : la scintigraphie myocardique

La scintigraphie myocardique nécessite l'emploi d'une substance ayant une affinité pour le muscle cardiaque. L'émetteur γ thallium 201 utilisé sous forme de chlorure en solution a la particularité de mimer l'ion potassium. Il restitue très bien la capacité du cœur à se contracter au travers de l'image donnée par la distribution, donc de l'irrigation de ce muscle. Les parties ischémiques et nécrosées, donc non irriguées, deviennent nettement identifiables. Le technétium 99m, émetteur γ pur, a également trouvé un terrain de prédilection en cardiologie du fait d'une période plus courte. Le technétium seul ne permet pas cette analyse myocardique. Il faut le complexer par des substances qui passent elles-mêmes les barrières cellulaires. Le mécanisme d'action du complexe technétium n'est pas précisément connu, mais toujours est-il que la qualité des images obtenues avec ce produit n'a rien à envier au thallium et la méthode est devenue routine en cardiologie (voir aussi l'article de H. Belhadj-Tahar et M.H. Darbieu).

Le fludéoxyglucose (FDG) pour suivre le métabolisme cellulaire du glucose

La fixation idéale du radio-isotope au vecteur est bien évidemment la liaison covalente. Les isotopes d'atomes entrant dans la composition de molécules organiques sont malheureusement de période trop longue (tritium : 12,34 ans, carbone 14 : 5 730 ans), ou trop courte (carbone 11 : 20,4 min, azote 13 : 9,97 min, oxygène 15 : 2,04 min).

Le fluor 18 fait exception. Sa demi-vie de 108 min, pourtant relativement courte, se prête néanmoins à la synthèse organique pour peu que l'introduction de cet atome se fasse en dernière étape, que les rendements soient excellents et que la réaction puisse être réalisée en quelques dizaines de minutes. Ces critères sont remplis pour la synthèse du fludéoxyglucose (FDG), molécule de glucose fluorée. Le FDG mime le glucose et intègre les cellules avides de sucre. Du fait de la présence de l'atome de fluor, le premier métabolite ne peut pas être biologiquement modifié, mais ne peut non plus s'échapper de la cellule. Celle-ci s'enrichit donc proportionnellement en fluor. Les cellules neuronales, cardiaques et tumorales sont les plus grandes consommatrices en sucre du fait de leur taux d'activité ou de reproduction supérieur aux autres. Le rayonnement β^+ émis par le fluor transformé en deux rayonnements γ opposés de 511 keV est enregistré par un détecteur placé en couronne autour du patient. C'est la technique de TEP qui commence à trouver un intérêt croissant. Cette technique récente est essentiellement orientée vers la cancérologie car elle permet de visualiser les tumeurs primaires et toutes les métastases. Elle est aussi appelée à rendre de grands services en neurologie et en cardiologie.

La production de FDG est cependant soumise à une limitation de taille qui est la disponibilité du fluor. Du fait de sa demi-vie courte, la préparation du FDG ne peut se faire que sur le site de production du fluor. En d'autres termes, les caméras doivent être localisées à moins de deux heures de distance d'un cyclotron de production de fluor. A terme (2005), la France disposera d'un réseau de 7 à 8 centres bien

répartis sur le territoire, équipés d'un cyclotron pouvant distribuer du FDG à toutes les caméras du secteur considéré.

Plus largement, on peut envisager de transformer n'importe quelle molécule organique en traceur, pour peu que l'on puisse lui greffer facilement et surtout rapidement un atome de fluor.

Des nanoparticules pour la détection des ganglions sentinelles et le traitement de la polyarthrite rhumatoïde

Les formes les plus simples de vecteurs sont basées sur leurs propriétés physiques plutôt que biologiques. Une suspension d'un colloïde piégeant un radio-isotope de diagnostic (technétium 99m) est injectée en périphérie d'une tumeur. Ces particules vont migrer à l'image des cellules cancéreuses libérées par la tumeur en suivant le tracé du système lymphatique et se laisser piéger dans le ganglion le plus proche (ganglion sentinelle), normalement chargé de détruire les intrus à l'aide des macrophages qu'il contient. Au moyen d'une sonde per-opératoire, on localise facilement ce ganglion sentinelle dans lequel se sont concentrées les particules émettrices γ , emplacement potentiel de la première métastase. Après excision de la tumeur et du ganglion, une analyse anatomo-pathologique de ce dernier permettra de conclure ou non à une invasion métastatique. En cas de réponse négative, le médecin pourra conclure à une non-prolifération du cancer et éviter une chirurgie lourde de lymphadenectomie – c'est-à-dire de l'ablation chirurgicale d'une partie du système lymphatique, en particulier des ganglions lymphoïdes dans lesquels se localisent les métastases ; pour les femmes atteintes d'un cancer du sein, il s'agit généralement de la suppression du ganglion lymphoïde le long du bras du même côté que le sein portant la tumeur –, et un traitement de chimiothérapie complémentaire.

Cet exemple simple basé sur une particule marquée a cependant nécessité le développement d'un support adéquat. Non seulement la **taille des particules** a son importance (nanoparticules), mais également sa **compatibilité avec le corps humain** (allergisant, toxicité) **et avec le radio-isotope**, et celles-ci ont dû être étudiées. Ces particules sont essentiellement formées de colloïdes de sulfure de rhénium ou d'albumine humaine. Le technétium produit sur site est ajouté juste avant l'injection à une préparation lyophilisée de ces particules. Toute une technologie a été mise au point pour permettre une production contrôlée de particules de tailles identiques, stable après lyophilisation et facile à remettre en suspension lors du marquage. Cette technique est applicable dans la détection de ganglions sentinelles de cancers du sein, mais aussi de mélanomes.

D'autres particules de tailles plus importantes (microparticules) marquées à l'erbium 169, au rhénium 186 ou à l'yttrium 90 émetteurs β^- , sont utilisées en suspensions pour traiter la polyarthrite rhumatoïde. Le mélange est injecté dans l'interstice articulaire au niveau du liquide synovial dans lequel le radio-isotope détruit les cellules excédentaires (technique de radiosynoviorthèse). Le choix de l'isotope se fait sur la base de la taille de l'articulation à traiter et le lien est direct avec l'énergie de la radiation : ^{169}Er pour les articulations des doigts, ^{186}Re pour les poignets, coudes, hanches et épaules, ^{90}Y pour les genoux. Ce traitement déjà ancien, mais peu connu, a fait ses preuves. Dans les cas où l'effet positif est constaté dans les jours qui suivent l'injection, il a pu être démontré qu'il perdure plus de deux années.

Un exemple d'activité duale : diagnostic et thérapie

A partir de l'image obtenue après injection d'une molécule marquée par un émetteur γ , on confirme sa biodistribution et l'on peut même suivre la cinétique d'élimination biologique dans le temps. Ces informations permettent de valider la spécificité de la molécule par rapport à l'organe visé. On en déduira le débit de dose reçue par chaque organe pour en évaluer le risque si l'activité devait être augmentée.

Quel que soit l'isotope utilisé, à structure chimique identique, on pourra en conclure que le vecteur se distribuera de la même façon. On peut dès lors envisager de substituer le radio-isotope γ diagnostique par un émetteur β^- thérapeutique. Les radiochimistes se sont donc efforcés de trouver des couples d'isotopes diagnostic/thérapie dont la chimie était voisine.

L'iode 123 pour le diagnostic substitué par l'iode 131 pour la thérapie correspond au couple le plus ancien. Il existe un isotope iode 124 émetteur β^+ qui pourrait être utilisé pour la TEP. En fait, aucun de ces trois isotopes n'est idéal car soit trop énergétique, soit de période trop longue ou possédant un rayonnement mixte. De plus, la chimie de l'iode conduit à des produits moins stables d'un point de vue biologique et le risque d'échange et de relargage *in vivo* d'iode radioactif est important.

On préfère à l'iode les couples $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ ou $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$, bien que d'un point de vue couplage, ceux-ci nécessitent l'utilisation de complexes de type tri-(ou tétra)amine tri-(ou tétra)acétique.

A titre d'exemple, prenons le cas d'un anticorps marqué utilisé pour le traitement du lymphome non hodgkinien. Le rituximab, un anticorps anti CD 20, est d'abord injecté marqué à l'indium 111 pour confirmer que le patient à traiter est bien répondeur à cet anticorps. Une semaine plus tard, le traitement se fera en injectant cette fois-ci le même substrat marqué à l'yttrium 90. Les résultats sont surprenants, bien que ce traitement ne s'adresse aujourd'hui qu'aux patients réfractaires à la chimiothérapie. Ce produit, commercialisé aux États-Unis depuis 2002, démontre pour la première fois l'efficacité réelle de ce concept.

Plusieurs vecteurs, majoritairement des peptides et des anticorps, sont en cours de développement pour différents types de cancers (lymphomes, leucémies, cancers du poumon, mélanomes...) en utilisant ce concept de marquage successif. D'autres isotopes ayant une similarité de chimie, tels que l'holmium 166 ou le lutétium 177, pourraient présenter d'autres avantages (période, énergie) dans certaines thérapies spécifiques.

Perspectives de développement de nouveaux marqueurs

Nous avons vu qu'un atome radioactif isolé n'a que peu d'intérêt médical. L'iode 123 et l'iode 131, utilisés respectivement en diagnostic et en thérapie du cancer de la thyroïde, sont les seuls éléments que l'on administre sous forme de sels par voie orale. C'est donc bien le vecteur qui joue le rôle le plus important dans l'application de cette technologie. Toute molécule ayant démontré une affinité très forte pour un substrat ou une participation spécifique dans un mécanisme biologique peut servir de vecteur. Les effets indésirables qui limitent fortement le développement de nouvelles molécules n'ont aucune importance car les doses utilisées sont tellement faibles que la radiotoxicité sera toujours plus contraignante. De nombreuses molécules initialement à visée pharmaceutique, abandonnées pour cette raison, pourraient

être ressorties des tiroirs et servir dans un premier temps d'outil pharmacologique, puis de moyen diagnostique humain, et enfin dans certains cas de produit de thérapie.

La taille n'est pas plus un facteur limitant pour peu que l'on soit capable d'identifier la partie de la molécule qui n'intervient pas dans le mécanisme biologique considéré. Ainsi, de nombreux peptides sont radio-marqués et le développement d'anticorps marqués revient également sur le devant de la scène.

La chimie des radionucléides courants est aujourd'hui bien maîtrisée. Par contre, des chimies telles que celles du gallium, de l'holmium et du lutétium n'ont été que très peu développées. Du côté du fluor, il manque cruellement des méthodes de substitutions nucléophiles ou électrophiles à haut rendement mais réalisables à température ambiante. La recherche n'avance que lentement du fait de la rareté des laboratoires intéressés et des personnes compétentes dans ces domaines.

En France, il est très difficile de trouver des radiochimistes et des radiopharmaciens, et la relève ne semble pas assurée concernant les médecins nucléaires. Il faut espérer que les avancées de ces dernières années et les perspectives de ces technologies créeront de nouvelles vocations.

Références

Pour la radiologie

- Katayama H., Adverse reactions to ionic and non-ionic contrast media, *Radiology*, **1990**, 175, p. 621.
- Palmer F.J., Survey of intravenous CM reactions, *Australian Radiology*, **1988**, 32, p. 426.

Pour la radiopharmacie

- Helou A., *Atlas of Diagnostic Nuclear Medicine*, **2001**, Springer Verlag.
- Rubinstein M., Laurent E., Stegen M., *Médecine Nucléaire : Manuel Pratique*, **2000**, De Boeck University.

- Delbeke D., Marin W.H., *Practical FDG Imaging, a Teaching File*, **2002**, Springer Verlag.
- Murray I.P.C., Ell P.J., *Nuclear Medicine in Clinical Diagnosis and Treatment*, 2nd ed., **1998**, Churchill Livingstone Ed.
- Zimmermann R., livre à paraître sur la médecine nucléaire.
- Comet M., Vidal M., *Radiopharmaceutiques – Chimie des radiotracteurs et applications biologiques*, **1998**, Presses Universitaires de Grenoble.



J.-P. Meunier

Jean-Paul Meunier

est formateur « imagerie médicale » chez Schering¹.

Gilbert Schorsch

a été rédacteur en chef de *L'Actualité Chimique* (1997-1998)².



G. Schorsch



R. Zimmermann

Richard Zimmermann

est directeur Recherche & Développement chez CIS Bio International-Schering³.

¹ Schering France, BP 69, 59452, Lys-Les-Lannoy.

Tél. : 03 30 20 87 75.

Courriel : jean-paul.meunier@schering.fr

² 250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris.

Tél. : 01 40 46 71 64. Fax : 01 40 46 71 61.

Courriel : cgschorsch@aol.com

³ BP 32, 91192 Gif-sur-Yvette Cedex.

Tél. : 01 69 85 70 50.

Courriel : rzimmermann@cisbiointernational.fr

Complétez votre collection !

Les numéros de 2000, 2001 et 2002 de *L'Actualité Chimique* sont accessibles, dans la limite des stocks disponibles, au prix exceptionnel de :

- **11 euros** (frais de port compris) pour les **numéros spéciaux**
- **9 euros** (frais de port compris) pour les **autres numéros**

Les sommaires des numéros « à rubriques » de 2001 et 2002 et de tous les numéros spéciaux sont accessibles via le site Internet. Les autres sommaires sont consultables dans la base de données.

Commande : Nadine Colliot, SFC, 250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris

Tél. : 01 40 46 71 66. Fax : 01 40 46 71 61. E-mail : adhesion@sfc.fr

Offre valable jusqu'au 31 décembre 2003

Application de la chimie de coordination du technétium 99 dans le domaine de la biologie et de la médecine

Hafid Belhadj-Tahar et Marie-Hélène Darbieu

Abstract

Coordination chemistry of technetium 99 applied to biology and medicine

Rational conceptualisation of new photon emitter probes for *in vivo* investigations with technetium 99m (on the tracer scale) requires the coordination chemistry of ponderable technetium 99 isotope. Physicochemical and structural studies carried out on technetium 99 complex models enable us to identify predictive parameters involved in radiopharmaceutical *in vivo* tropism (specificity) for the target bodies. In addition, this work leads to the development and control of a new technetium complexation protocol under physiological conditions (pH \approx 7.4 and T° C < 45°) in order to label bio-vectors without denaturing them.

Mots-clés

Technétium 99, tropisme, radiopharmaceutique, agent d'imagerie.

Key-words

Technetium 99, tropism, radiopharmaceutical, imaging agent.

A la mémoire de nos êtres chers emportés par le cancer

Depuis la découverte de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie en 1934, les radio-isotopes n'ont cessé de trouver des applications de plus en plus étendues dans des domaines très divers : médecine, biologie, agronomie, archéologie, génie chimique, pétrochimie...

Les sciences biologiques et médicales sont sans doute celles qui en ont le plus bénéficié, notamment par le développement de l'imagerie médicale scintigraphique. Cet examen consiste à suivre *in vivo* par télé-détection le rayonnement électromagnétique émis par des sondes radioactives (radiopharmaceutiques) introduites dans l'organisme. L'utilisation de ces sondes isotopiques est indispensable à la compréhension des mécanismes intimes de la vie car elles permettent de fournir des informations morphologiques (anatomiques) et dynamiques, et surtout fonctionnelles. De ce fait, la scintigraphie représente un outil puissant d'imagerie médicale pour la détection précoce de cancers et de certaines maladies dégénératives, en particulier en neuropsychiatrie (Alzheimer, démence vasculaire...) et en cardiologie (insuffisance coronarienne).

Rappelons que les potentialités de ces explorations radio-isotopiques en médecine se sont particulièrement renforcées au cours de ces dernières années pour deux raisons principales :

- les progrès décisifs en matière d'instrumentation à la suite des développements de la physique nucléaire et de l'informatique ; le développement de la tomographie par émission monophotonique (TEM) ou par émetteurs de positons (TEP) en est le meilleur exemple ;
- les travaux de recherche des radiochimistes qui ont permis de diversifier l'éventail des radiopharmaceutiques disponibles.

Cependant, la démocratisation de ces examens souvent coûteux reste conditionnée par des contraintes économiques à l'échelle nationale et internationale.

Dans ce contexte, le technétium 99m (^{99m}Tc) est le radionucléide de choix du fait de son émission γ pure de 140 keV bien adaptée au matériel de détection par gamma caméra à cristaux d'iodure de sodium, d'une période

relativement courte (T = 6 h) associée à une faible radiotoxicité, de sa disponibilité grâce à l'existence d'un générateur et de son faible coût d'exploitation. Enfin, ses propriétés électrochimiques font qu'il peut se présenter sous 8 états d'oxydation différents, ce qui explique son aptitude à former de nombreux complexes. C'est ainsi que le technétium 99m est utilisé dans environ 80 % des examens diagnostics en médecine nucléaire. Ce radioélément est élué du générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ sous forme de solution saline hautement diluée (à l'échelle des ultratrace, 10^{-10} M). Il est ensuite complexé avec des ligands vecteurs appropriés (L).

Glossaire

Apoptose

Mort cellulaire programmée.

Clairance

Vitesse d'épuration relative au sang ou à un organe.

Étude hémodynamique

Étude consistant à mesurer les débits sanguins locaux et régionaux au niveau de l'encéphale en utilisant les radiotraceurs de perfusion. Ces études hémodynamiques sont non invasives par rapport à celles dites sanglantes qui consistent à introduire des cathéters ou « tuyaux » à partir de la carotide et à les pousser jusqu'aux vaisseaux du cerveau pour pouvoir faire des mesures manométriques et prélever des colorants préalablement injectés dans le sang.

Ischémie

Asphyxie tissulaire ou cellulaire faisant suite à un trouble de vascularisation.

Neurones dopaminergiques

Neurones fonctionnant avec la dopamine, médiateur chimique impliqué dans la maladie de Parkinson et dans les phénomènes de dépendance.

Neurones sérotoninergiques

Neurones qui utilisent la sérotonine, médiateur chimique intervenant notamment dans le contrôle de la personnalité et dans le rythme veille-sommeil.

Pentagastrine

Dérivé d'une hormone naturelle, la gastrine, formé de 5 acides aminés.

Le technétium

Le technétium (du grec *technos*, artificiel) est un élément du groupe VII B, de numéro atomique 43. Il a été découvert par Perrier et Segré en 1937 [24], après qu'ils aient noté la présence d'activité β^- lors de l'irradiation du molybdène par des deutons générés par le cyclotron de Berkeley (figure A). Tous les isotopes du technétium connus sont radioactifs, le plus stable (^{98}Tc) a une période de 4,2 millions d'années alors qu'elle n'est que de quelques dixièmes de seconde (0,83 s) pour le moins stable (^{110}Tc). Les plus intéressants sont le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (6,02 h) pour ses applications médicales et le ^{99}Tc ($2,1 \cdot 10^5$ ans) pour son utilisation en chimie macroscopique. Ce dernier est actuellement obtenu par extraction des produits de fission de l'uranium 235 (6 % de l'ensemble des produits de fission).

Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

Le molybdène 99 se transmute en technétium 99m par désintégration β^- qui fait augmenter le numéro atomique du molybdène (42 protons) donnant ainsi le technétium 99m (43 protons). Le technétium 99m est un élément métastable qui se transforme en technétium 99 en émettant un rayonnement γ de 140 keV et de période 6 h. A son tour, le technétium 99 donne le ruthénium après une désintégration β^- (d'énergie 0,3 MeV et de période 210 000 ans) (figure A).

Notons qu'environ 87 % des transformations de ^{99}Mo donnent du $^{99\text{m}}\text{Tc}$, les 13 % qui restent donnant directement du ^{99}Tc . Un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (figure B) est constitué par une colonne d'alumine sur laquelle est adsorbé très fortement le molybdate polymérisé ($^{99}\text{Mo}_7\text{O}_{24}$)⁶⁻. Après la transformation radioactive, le pertechnétate $^{99\text{m}/99}\text{TcO}_4^-$ formé se désolidarise du polymère et peut être facilement élué de la colonne par une solution de sérum physiologique [25-26]. Ce système stérile est protégé par plusieurs centimètres de plomb pour la radioprotection.

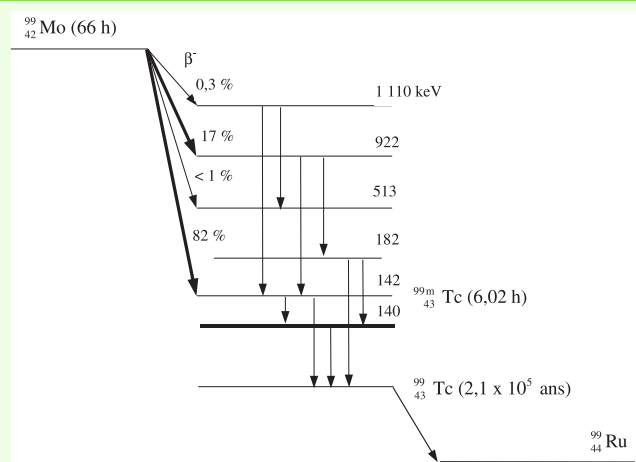


Figure A - Schéma de décroissance du molybdène 99 vers le technétium 99m.

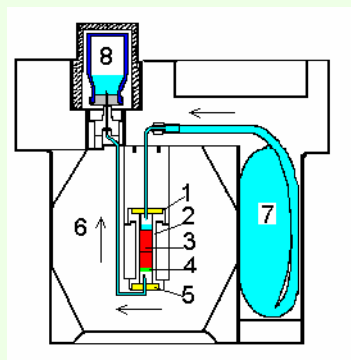


Figure B. Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.
 1 : capsule métallique, 2 : colonne de verre, 3 : alumine, 4 : filtre, 5 : capsule métallique, 6 : blindage de plomb, 7 : soluté physiologique, 8 : flacon d'éluat.

Élaboration de nouvelles trousse radiopharmaceutiques

Les kits radiopharmaceutiques en pratique médicale courante doivent satisfaire à deux critères de qualité essentiels qui sont :

- **Intrinsèques** : liés aux protocoles simples et efficaces de complexation du technétium en une seule étape et avec un haut rendement de marquage (pureté radiochimique > 95 %), et aboutissant à des complexes dont la sphère interne de coordination reste stable et inerte vis-à-vis de l'oxygène et de la haute dilution en milieu biologique saturé en acides aminés soufrés. Ce critère dépend exclusivement de la maîtrise de la chimie de coordination du technétium vis-à-vis du ligand vecteur.

- **Extrinsèques** : dominés par la spécificité du radiopharmaceutique qui conditionne le contraste entre le signal utile et le bruit de fond lié à la clairance sanguine et à la fixation de ces molécules au niveau des organes avoisinant la zone à explorer. La spécificité dépend du tropisme des complexes radio-isotopiques pour les cellules cibles à explorer (organisées en tissus, organes, appareils ou tumeurs). Cette étape de développement des nouveaux radiopharmaceutiques reste limitante étant donnée la complexité des facteurs mis en jeu dans le comportement des complexes *in vivo*. L'environnement chimique autour du site de chélation détermine en grande partie ce phénomène. Nous pouvons citer deux critères empiriques reconnus comme déterminants : la liposolubilité et la neutralité des charges pour le cerveau et le caractère acido-basique pour le rein. Or, jusqu'à présent et en l'absence de paramètres

prédictifs fiables *in vitro*, la recherche de nouveaux radiopharmaceutiques reste soumise à la loi de criblage *in vivo* chez l'animal des complexes synthétisés. En effet, les complexes du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ obtenus à l'échelle de traces ne se prêtent pas aux études analytiques, physico-chimiques et structurales classiques qui sont indispensables pour mener une stratégie rationnelle de conception de nouveaux radiopharmaceutiques.

Par conséquent, l'utilisation des complexes de l'isotope du technétium 99 à l'échelle pondérale s'avère nécessaire pour la maîtrise de la chimie de coordination et pour appréhender les facteurs impliqués dans le devenir *in vivo* des complexes injectés (cf. les radiopharmaceutiques technétiés).

Notons que dans le cadre de dépistage de certaines maladies nécessitant une prise en charge précoce, les cliniciens sollicitent des radiopharmaceutiques pour ciblage avec des biovecteurs marqués. Ces derniers sont obtenus par la conjugaison de ligands chélateurs du technétium avec des substances naturellement reconnues *in vivo* par certains récepteurs endogènes. C'est le cas de la pentagastrine dans le dépistage de certaines tumeurs digestives [1] et des dérivés de la cocaïne dans le diagnostic de la maladie de Parkinson par quantification de la densité des neurones dopaminergiques viables [2].

Par ailleurs, le marquage sans dénaturation de ces biomolécules nécessite le recours à des protocoles de complexation du technétium dans les conditions physiologiques de température et de pH qui aboutit à des complexes thermodynamiquement stables à haute dilution. C'est la raison pour laquelle les algorithmes, basés sur le marquage du ligand bifonctionnel dans les conditions

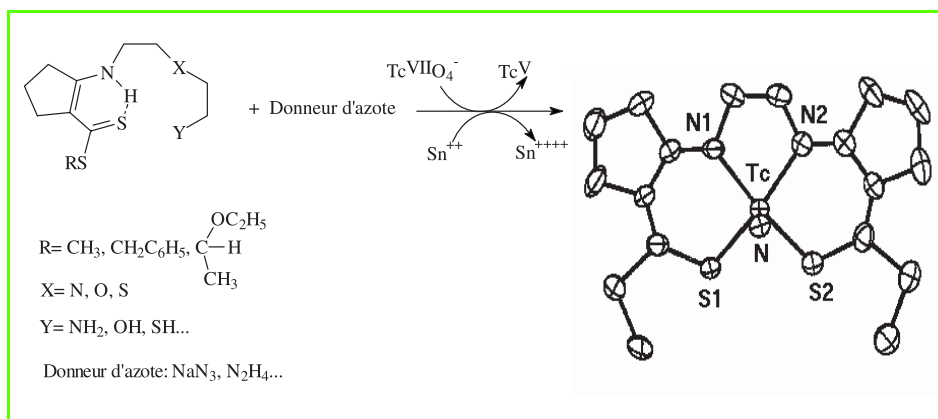


Figure 1 - Formation de complexe du technétium 99 avec les ligands de type aminothiols. Exemple d'un schéma ORTEP représentant un complexe nitruro-technétium 99 avec un ligand dianionique du type N₂S₂ (N,N' éthylène bis [méthyl-2-aminocyclopentène-1-dithiocarboxylate]).

drastiques suivi de son ancrage sur la biomolécule, ont longtemps été confinés seulement dans les centres de recherche. En effet, la présence de précurseurs hautement réactifs, en particulier le ligand fonctionnalisé, nécessite la purification délicate des produits marqués ainsi obtenus.

Dans ce contexte, nous avons proposé un protocole de complexation du technétium dans les conditions douces en utilisant des ligands aminothiols dérivés de l'acide 2-aminocyclopentène-1-dithiocarboxylique (figure 1) [3]. La structure de ce type de ligand présente plusieurs caractéristiques intéressantes :

- du fait de la présence d'un système d'électrons π délocalisés, les potentiels des couples redox du métal dans les complexes correspondants sont sensibles à la nature de leur substituants, ce qui permet de moduler la valeur de ces potentiels et de stabiliser différents degrés d'oxydation ;
- les quatre atomes donneurs se trouvent dans le même plan, cette situation est favorable à la stabilisation des complexes ;
- la présence de ponts N-H...S avec des liaisons hydrogène protège les atomes de soufre de l'oxydation et empêche la formation des ponts S-S souvent observés dans la chimie de ces composés.

Ces ligands ont été récemment reconnus de grande importance dans le domaine biologique par plusieurs instances internationales (National Cancer Institute et National Institute of Health) [4].

Les radiopharmaceutiques technétiés

A l'heure actuelle, on peut considérer que la médecine nucléaire dispose en moyenne d'un radiopharmaceutique pour chaque organe (figure 2). Les explorations cérébrales et cardiaques tiennent une place de choix car, d'une part les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité de la population des pays industrialisés et d'autre part, avec l'accroissement de l'espérance de vie et le vieillissement, l'incidence des maladies cardio-vasculaires et cérébrales sur la morbidité et la mortalité va augmenter. Or, la prévention et le traitement de ces maladies dépendent du diagnostic et de l'établissement d'un bilan précoce et fiable. Les radiotraceurs des flux sanguins « nourriciers », qui sont en relation étroite avec l'activité métabolique des organes étudiés, nous renseignent sur la viabilité et sur l'état physiologique de leurs tissus cellulaires.

Le cœur

L'exploration scintigraphique du cœur donne des renseignements topographiques, fonctionnels et dynamiques, permettant l'établissement du diagnostic d'ischémie et d'infarctus myocardiques.

Un traceur de perfusion idéal devrait présenter :

- un taux d'extraction élevé qui permettrait d'obtenir une bonne représentation de la distribution de la réserve coronaire à l'effort,
- une relation linéaire entre le taux de fixation myocardique et le débit sanguin,
- une rétention tissulaire stable ou tout du moins n'évoluant pas de façon significative pendant le temps nécessaire à

l'acquisition des données,

- une clairance hépatique rapide ainsi qu'une fixation pulmonaire négligeable,

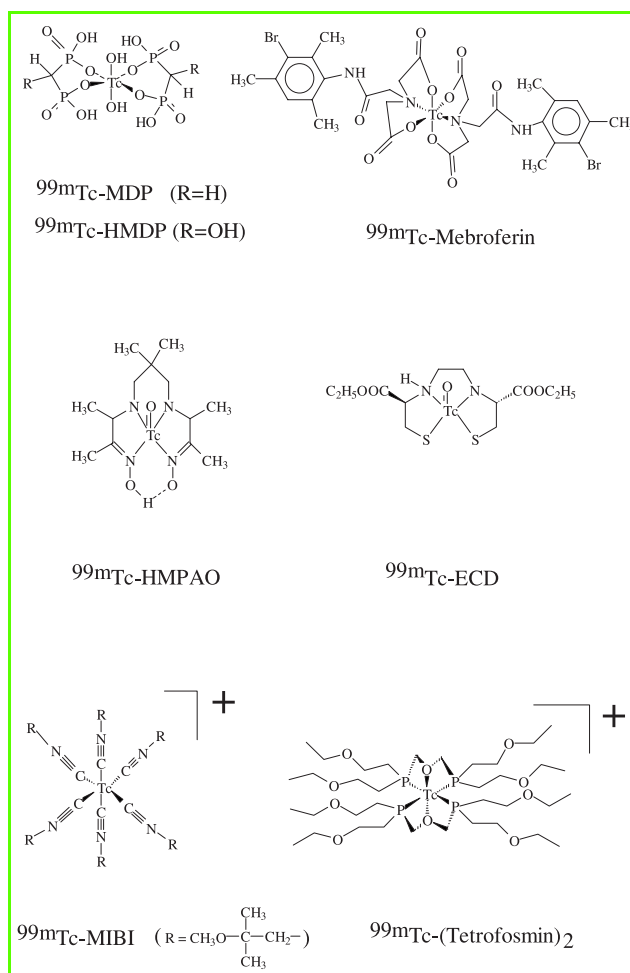


Figure 2 - Les radiopharmaceutiques technétiés.

Il existe actuellement diverses trouses radiopharmaceutiques pour les explorations de différents organes. Parmi lesquelles : ^{99m}Tc-MDP (^{99m}Tc-méthylène diphosphonate) et ^{99m}Tc-HMDP (^{99m}Tc-hydroxyméthylène diphosphonate) pour le squelette, ^{99m}Tc-mebroferin pour les voies hépatobiliaires, ^{99m}Tc-HMPAO (^{99m}Tc-hexaméthylpropylène-amine-oxime) et ^{99m}Tc-ECD (^{99m}Tc-éthylène-diyl bis-L-cystéine-diéthyl-ester) pour le cerveau et le ^{99m}Tc-MIBI (^{99m}Tc-hexakis méthoxy isobutyl isonitrile) et ^{99m}Tc-tetrofosmin pour le cœur.

- enfin, des conditions de marquage les plus simples et efficaces possibles.

En usage clinique courant, nous disposons du thallium 201 (^{201}Tl), traceur de référence, du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexakis méthoxy isobutyl isonitrile ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI) et de la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrafosmin. Le ^{201}Tl reste un bon traceur de perfusion myocardique, mais il présente les inconvénients liés à la nature de son émission (RX de 68-82 keV dont l'énergie n'est pas optimale pour les détecteurs utilisés), à la dose d'irradiation plus élevée que celle des traceurs technétiés, à la relative difficulté de la gestion des stocks en raison de sa demi-vie (73 h) et enfin à son coût supérieur à celui des traceurs technétiés. Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI présente un temps de rétention long, n'est pas redistribué et permet l'acquisition de bonnes images de tomographie d'émission monophotonique (TEM) avec les photons γ du $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Mais aux forts débits, l'extraction n'est plus linéaire et en outre, la captation hépatique est gênante. La $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrafosmin, dont l'utilisation est plus récente, présente une élimination plus rapide, en particulier par clairance hépatique, ce qui permet l'acquisition d'images plus précoces.

Jusqu'à récemment et en particulier suite aux travaux de Deutsch [5], il était généralement admis que les complexes cationiques étaient les seules espèces qui pouvaient avoir une fixation cardiaque durable et donc intéressante pour l'exploration cardiaque prolongée, en raison de leur extraction précoce et importante par le myocarde et leur clairance (élimination) lente. En effet, les complexes neutres de type $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -teboroxime qui présentent une clairance cardiaque de quelques minutes ne permettent l'acquisition d'images de TEM qu'avec des caméras multi-têtes.

Au début des années 1990, l'équipe de R. Pasqualini ainsi que notre équipe au Laboratoire de chimie de coordination ont mis au point une nouvelle famille de complexes nitrurotechnétiés neutres, destinée à l'exploration du myocarde, prouvant ainsi que la charge n'est pas l'élément déterminant dans le tropisme des radiopharmaceutiques pour le cœur [6-7]. A ce titre, le $^{99\text{m}}\text{TcN}(\text{NOEt})_2$ (NOEt = N-éthyl-N-éthoxy dithio-carbamate) est le seul complexe neutre de forme nitrurotechnétiée évalué chez l'Homme jusqu'à présent (figure 3). Cette nouvelle famille à partir de

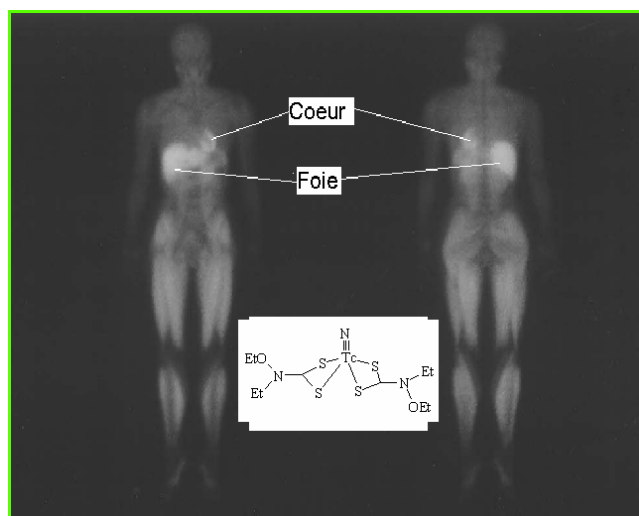


Figure 3 - Image scintigraphique obtenue avec un complexe neutre du nitrurotechnétium.

Il s'agit d'une image qui a été réalisée chez un volontaire sain et qui montre distinctement le cœur. Notons que le bruit de fond émanant du foie ne gêne pas l'exploration cardiaque.

complexes neutres ouvrirait de nouvelles perspectives dans l'exploration cardiaque car elle semblait plus adaptée comme traceurs du débit coronarien que les complexes cationiques. En effet, le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI cationique est activement extrait et accumulé par le système mitochondrial intracellulaire, ce qui atténue la linéarité de l'effet « extraction/débit ».

Les études réalisées sur des complexes modèles nitrurotechnétium 99 ont permis de conclure à leur neutralité et de tester par voltamétrie que les valeurs des potentiels d'oxydation observées sont suffisamment élevées pour que le processus d'oxydoréduction soit improbable en milieu biologique [8]. L'étude comparative de ces complexes après leur incubation en milieu biologique montre que leur état reste inchangé et qu'ils sont fixés à la membrane d'une façon non spécifique en établissant une liaison faible du type lipophile. Nos travaux ont permis de conclure que la structure de ces complexes neutres nitruro était pyramidale avec dans le plan équatorial les atomes donneurs du soufre et de l'azote, le sommet étant occupé par l'atome azoté (N^3) engagé avec le technétium par une triple liaison, ce qui lui confère un caractère particulièrement polarisé (figure 1) [8]. Nous avons prouvé pour la première fois, que le caractère neutre et polaire de ces complexes était à l'origine de leur affinité pour les membranes myocardiques en reproduisant ce phénomène *in vitro* par l'ultracentrifugation à travers une membrane anisotrope triphasique polaire/apolaire/polaire. En effet, une étude menée sur une série de complexes du technétium oxo et nitruro neutres et chargés a permis d'établir une corrélation entre le taux de fixation cardiaque et le coefficient d'adsorption membranaire. Cette adsorption serait donc due à des interactions polaires entre le complexe et la membrane [9].

Le cerveau

L'exploration scintigraphique du cerveau s'oriente de plus en plus vers les études hémodynamiques et fonctionnelles, en particulier pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, de l'épilepsie partielle (figure 4), voire même des maladies psychiatriques telle la démence ou la schizophrénie [10-11]. Nous pouvons distinguer deux types de radiopharmaceutiques à tropisme cérébral (affinité pour le cerveau) :

- les marqueurs spécifiques des entités physiologiques qui sont particulièrement intéressants pour détecter les altérations de certains noyaux centraux à l'origine de manifestations neurologiques : c'est le cas de dérivés de la cocaïne complexés avec le technétium 99m qui permettent, en quantifiant la densité des transporteurs de la dopamine et donc des circuits neuronaux dopaminergiques, de trancher entre la maladie de Parkinson et le tremblement involontaire ;
- les traceurs du débit qui sont réalisés à l'aide de radiopharmaceutiques diffusibles, pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique. La répartition de ces radiotraceurs se fait en fonction du débit sanguin régional et de l'activité métabolique du tissu cérébral.

Pour la perfusion cérébrale, un radiopharmaceutique doit présenter différentes qualités :

- une extraction tissulaire élevée, très rapide, proportionnelle au débit, et un passage libre de la barrière hémato-encéphalique,
- une rétention tissulaire prolongée,
- une distribution tissulaire spécifique de l'activité.

L'hexaméthylpropylène-amine-oxime-technétium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO), premier traceur utilisé en médecine nucléaire, et

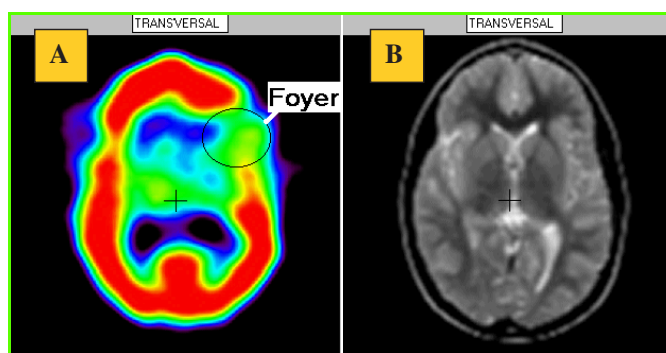


Figure 4 - Imagerie cérébrale comparative par scintigraphie à ^{99m}Tc -ECD (A) versus résonance magnétique nucléaire (B).

Diagnostic d'épilepsie partielle chez un enfant de 12 ans présentant un trouble du comportement avec retard scolaire. Il s'agit d'un foyer hypofixant post critique (après la crise) au niveau de la région temporale de l'hémisphère gauche dominante. On peut remarquer que contrairement à la scintigraphie, l'image par IRM ne révèle rien d'anormal.

plus récemment le 1,2-éthylènediyl bis-L-cystéine-diéthyl-ester (ECD), sont couramment utilisés pour mesurer le débit du flux sanguin régional cérébral (rCBF). Ainsi, D.J. Wiper a montré la relation existant entre l'hypovascularisation bitemporale et le début de la maladie d'Alzheimer [10].

Pour ces traceurs, la diffusion à travers la barrière hémato-méningée est essentielle et nécessite une certaine liposolubilité des complexes [12]. Par contre, la rétention des complexes est due à un changement des propriétés physico-chimiques de ces molécules (liposolubilité et polarité). Le ^{99m}Tc -HMPAO serait transformé en espèce plus hydrosoluble grâce à l'action de la glutathionine, tandis que la fonction ester du ^{99m}Tc -ECD est hydrolysée [13]. En réalité, il persiste beaucoup de doutes sur les hypothèses relatives aux mécanismes de la rétention cérébrale des radiopharmaceutiques technétiés [14-15].

La chimie de coordination du technétium 99 nous a permis de cerner les paramètres impliqués dans l'affinité des complexes pour l'encéphale. Ainsi, la liposolubilité due à la neutralité des complexes ne permet pas d'expliquer à elle seule leur tropisme cérébral. En effet, la stabilité des complexes neutres n'est pas en faveur de leur rétention cérébrale qui passe par une transformation *in situ* de leur sphère externe de coordination. Par contre, il y a une corrélation entre le coefficient d'adsorption membranaire et la fixation cérébrale qui serait liée au ralentissement de la constante vitesse de la clairance (« wash out »).

D'autre part, la taille et la conformation du ligand ainsi que la nature et la position des substituants sont des facteurs très importants de l'accumulation de ces complexes dans l'encéphale [16-17]. Ainsi pour le ^{99m}Tc -ECD, la rétention de ce radiopharmaceutique résulte de sa transformation en espèce hydrophile *in situ* par hydrolyse enzymatique d'un des deux groupements esters ; or cette estérase possède une stéréospécificité pour l'énantiomère L,L. L'énantiomère L,L ECD est donc sélectivement retenu dans l'encéphale [18]. La mise au point de ce radiopharmaceutique nécessite la recherche d'un processus de purification très élaboré pour séparer la forme active du mélange racémique. Par ailleurs, la richesse du tissu nerveux en estérases ainsi que la concentration plasmatique de cette enzyme sont très différentes d'une espèce animale à l'autre, et tout particulièrement entre les primates et les autres espèces moins évoluées, ce qui modifie radicalement les résultats de la biodistribution en fonction de l'espèce considérée [19].

Les autres organes

Les examens scintigraphiques sont d'une grande aide pour le clinicien dans l'établissement du bilan diagnostic et pré-thérapeutique [19-22]. Dans ce contexte, les organes (ou appareils) les plus explorés sont :

- **l'appareil squelettique** : une image pathologique peut se manifester par une hyperfixation (*fixation exagérée*) ou au contraire par une hypofixation (ou lacune) des complexes du ^{99m}Tc -diphosphonate par l'os et qui indique une inflammation, un abcès ou une métastase.

- **les reins** : la fonction d'épuration rénale est explorée avec des complexes qui diffusent librement dans les urines comme le diéthylène-triamine-penta-acétique-technétium et le mercapto-acétyl-triglycine-technétium. La localisation topographique des lésions rénales se fait avec l'acide dimercaptosuccénique-technétium qui ne se fixe durablement que sur le tissu rénal sain.

- **le système hépatobiliaire** : les dérivés de l'acide imino-diacétique visualisent le tissu hépatique et sa fonction épuratoire.

- **les poumons** : les macro-agrégats d'albumine ayant une taille de 20 à 50 μm sont de bons traceurs de la vascularisation du parenchyme pulmonaire car ils ne peuvent pas diffuser en dehors du lit vasculaire.

Les voies d'avenir

L'avancée des connaissances biologiques et pharmacologiques permet désormais à la médecine nucléaire d'investir audacieusement des domaines qui étaient jusqu'à récemment hors de sa portée (car considérés comme spéculatifs) puisqu'ils touchaient le psychisme, le pronostic de survie d'un cancéreux, voire même le vieillissement et la mort (ou l'apoptose dans les maladies dégénératives cérébrales ou autres) [23].

En psychiatrie

Ainsi, nous constatons l'essor de la radioneuroparmacologie appliquée à la psychiatrie dans l'établissement du diagnostic de certitude de maladies mentales et leur pathogénèse (mécanismes) neurochimique.

Dans la prise en charge des addictions, le suivi de l'évolution des dysfonctionnements neurologiques occasionnés par les drogues psychotropes peut tirer avantage de l'utilisation de traceurs technétiés qui permettent de dresser une cartographie des débits loco-régionaux du cortex cérébral. A titre d'exemple, la scintigraphie cérébrale avec ^{99m}Tc -HMPAO montre que la cocaïne diminue le débit vasculaire cérébral par action vasoconstrictive directe (spasme), alors que l'héroïne agit indirectement par boucle de contrôle neurologique sur la baisse de la consommation du glucose et donc du flux sanguin proportionnellement dans les régions frontale et pariétale.

Par ailleurs, le marquage de médiateurs chimiques inter-neuronaux (synaptiques) a permis d'identifier des circuits impliqués dans les grandes fonctions neurologiques. De nombreux travaux de recherches radioneuroparmacologiques se focalisent sur les circuits sérotoninergiques qui contrôlent le rythme veille-sommeil, la personnalité et le comportement (notamment l'impulsivité, l'agressivité, la perception de la douleur et l'appétit). Tout dérèglement de ce système détermine de graves atteintes de la personnalité qui se

manifestent par la schizophrénie, la dépression, l'anxiété, le suicide, voire même les conduites addictives.

Dans ce contexte, les biovecteurs du technétium 99m qui reconnaissent spécifiquement deux sous-types de récepteurs de la sérotonine (5HT₁ et 5HT₂) nous paraissent être des éléments décisifs dans la compréhension des dysfonctionnements neurochimiques à l'origine des troubles psychiatriques les plus fréquents. Cette exploration scintigraphique permettra au thérapeute de faire un diagnostic étiologique (de la cause neurochimique des troubles) chez le patient et de pouvoir lui proposer un traitement personnalisé.

Notons qu'à cet effet, les travaux récents de chimie de coordination ont montré que la modulation de l'action mimétique des biovecteurs du technétium pour un sous-type déterminé de récepteurs résulte :

- d'une part de la modification du motif de base (noyau indole) qui vise l'hétérocycle azoté à proximité du cycle benzénique. Le WAY-100635 (hétérocycle azoté : pipérazine) et kétansérine (hétérocycle azoté : cyclodiamide) ont une affinité spécifique pour 5HT₁ et 5HT₂ respectivement. Rappelons que ces deux médiateurs (antagonistes de la sérotonine) sont bien connus des neurobiologistes.

- d'autre part de la nature du chélate (sphère interne et externe de coordination du technétium), ainsi que de son éloignement optimal du motif de base reconnu par le récepteur. D'une façon générale, un vecteur idéal sera le compromis entre deux conditions contradictoires régissant la diffusion et l'affinité. En effet, il faudrait non seulement un volume réduit du biovecteur pour pouvoir diffuser à travers la barrière hématoencéphalique, mais aussi l'éloignement de l'encombrement stérique de la sphère de coordination et de son influence électronique vis-à-vis du motif de base afin de ne pas perturber son affinité pour le récepteur.

En cancérologie

Les tendances futures s'orientent vers l'utilisation des vecteurs du technétium pour la localisation des tumeurs, des micrométastases, la prédiction de leur potentiel de diffusion (ou de généralisation) et la détection de cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Ceci s'inscrit dans une stratégie de prise en charge thérapeutique correspondant au profil tumoral réel du patient, établi sur des éléments de certitude et qui s'oppose radicalement au concept probabiliste actuel se basant sur des scores pronostics (combinant le stade et le grade). En effet, il est évident que l'histoire des cancers et de leurs métastases reste longtemps occulte (non détectables cliniquement) en raison des moyens actuels d'imagerie dont le seuil de détection et de fiabilité est de l'ordre centimétrique.

Dans ce contexte, un nombre de biovecteurs du technétium ayant une affinité pour des récepteurs spécifiquement exprimés par certaines cellules pathologiques est d'ores et déjà en cours de développement et de mise au point. Nous citerons à titre d'exemple :

- **Pour la détection** : la pentagastrine pour les tumeurs digestives, la bombésine pour les tumeurs prostatiques et mammaires, et la somatostatine pour les tumeurs cérébrales et pulmonaires.

- **Pour le choix de la stratégie thérapeutique** : l'endostatine, l'angiostatine et l'intégrine marquées au technétium permettent de distinguer les tumeurs primitives

qui ont tendance à se généraliser et orientent de ce fait le cancérologue vers une chimiothérapie générale.

- **Pour cibler les tumeurs résistantes au traitement conventionnel** : notons que les tumeurs qui fixent des complexes de coordination du technétium avec les ligands imidazolés trahissent leur caractère radiorésistant lié à leur état hypoxique (paradoxalement, les dérivés imidazolés sont des radiosensibilisants puisqu'ils interagissent avec le système xanthine oxydase en générant de l'eau oxygénée). Par ailleurs, les tumeurs affines pour le biovecteur interagissant avec la P-glycoprotéine sont multichimiorésistantes puisqu'elles ont acquis la capacité de modifier la perméabilité de leurs canaux transmembranaires en augmentant le flux sortant des produits antimitotiques. Ces biovecteurs, co-régulateurs de la P-glycoprotéine, sont des molécules ayant une structure particulière faite d'un cycle aromatique leur conférant le caractère hydrophobe et d'un domaine formé par deux ou trois bases de Lewis (donneur d'électrons et en particulier les amines tertiaires).

Conclusion

En raison de son coût d'exploitation modeste, la scintigraphie avec le technétium 99m est actuellement l'un des moyens de diagnostic les plus utilisés en médecine à travers le monde. Cependant, il existe une marge de progression importante entre les traceurs technétiés disponibles sur le marché et le traceur idéal. Ce retard peut être facilement rattrapé grâce à une stratégie rationnelle de l'élaboration de nouveaux radiopharmaceutiques qui doit se baser sur des facteurs prédictifs *in vitro* fiables. Dans ce contexte, la chimie de coordination du technétium 99 est un élément clef et décisif qui permettra de transmuter ce radiométal en nouvelle pierre philosophale et dont on peut prédire sans trop se tromper sur ses vertus de diagnostic et de guérison.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier tout le personnel du Laboratoire de chimie de coordination UP 8241 de Toulouse, et en particulier Jean-Jacques Bonnet, son directeur, Gérard Cros et Jean-Pierre Laurent, anciens chercheurs, ainsi que Yvon Coulais, Jean-Paul Esquerré, Pierre Payoux et tout le personnel du Laboratoire de médecine nucléaire du CHU de Purpan. Les auteurs remercient également R. Pasqualini, responsable du département R & D au Laboratoire CIS Bio International.

Références

- [1] Belhadj-Tahar H., Darbieu M.-H., Esquerré J.-P., Coulais Y., *Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine*, Servizi Grafici, Padoue, Italie, **2002**, p. 323.
- [2] Madras B.K., Jones A.L., Mahmood A., Zimmerman R.E., Garada B. et coll., *Synapse*, **1996**, *22*, p. 239.
- [3] Belhadj-Tahar H., Ouhayoun E., Cros G., Darbieu M.-H., Tafani J.A.M., Fabre J., Esquerré J.-P., Coulais Y., *Nucl. Med. Biol.*, **1998**, *25*, p. 65.
- [4] http://207.238.28.146/ChemOffice/molialpha7b/molli_refs/refs.asp
- [5] Deutsch E., Bushong W., Glavan K.A., Elder R.C., Sodd V.J., Scholz K.L., Fortman D.L., Lukes S.J., *Science*, **1981**, *214*, p. 85.
- [6] Pasqualini R., Duatti A., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1992**, p. 1354.
- [7] Coulais Y., Cros G., Darbieu M.-H., Tafani J.A.M., Belhadj-Tahar H., Bellande E., Pasqualini R., Guiraud R., *Nucl. Med. Biol.*, **1994**, *21*, p. 263.
- [8] Cros G., Belhadj-Tahar H., De Montauzon D., Gleizes A., Coulais Y., Guiraud R., Bellande E., Pasqualini R., *Inorg. Chim. Acta*, **1994**, *227*, p. 25.
- [9] Belhadj-Tahar H., Boumahdi R., Darbieu M.-H., *Alternative To Laboratory Animals (ATLA)*, **2000**, *28*, p. 303.
- [10] Wiper D.J., *Cerebrovascular And Brain Metabolism Reviews*, Raven Press Ltd., New York, **1993**, *5*, p. 199.

- [11] Grunwald F., Menzel C., Pavics L., Bauer J., Hufnagel A., Reichmann K., Sakowski R., Elger C.E., Biersack J., *J. Nucl. Med.*, **1994**, *35*, p. 1896.
 [12] Dischino D., Welch M.J., Kilbourn M.R., Raichle M.E., *J. Nucl. Med.*, **1983**, *24*, p. 13.
 [13] Baldas J., *Adv. Org. Chim.*, **1994**, *41*, p. 62.
 [14] Schwochau K., *Angew. Chem. Int. Engl.*, **1994**, *33*, p. 2258.
 [15] Britton K.E., *Eur. J. Nucl. Med.*, **1990**, *16*, p. 373.
 [16] Kung H.F., Guo Y.Z., Billings J.B., Subramanyam V., Calabrese J.C., *J. Med. Nucl.*, **1989**, *32*, p. 433.
 [17] Dizio J.P., Anderson C.J., Davison J.A., Ehrhardt G.J., Carlson K.E., Welch M.J., Katzenellenbogen J.L., *J. Nucl. Med.*, **1992**, *32*, p. 3114.
 [18] Jurisson S., Berning D., Jia W., Ma D., *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, p. 1137.
 [19] Dewanjee M.K., *Semin. Nucl. Med.*, **1990**, *20*, p. 5.
 [20] Hjelstuen O.K., *Analyst*, **1995**, *120*, p. 863.
 [21] Fritzberg A.R., *Radiopharmaceuticals: Progress and Clinical Perspectives*, **1987**, *1*, p. 61.
 [22] Stoffel M., Jamar F., Van Nerom C., Verbruggen A., Mourad M., Leners N., Squifflet J.P., Beckers C., *J. Nucl. Med.*, **1994**, *35*, p. 1951.
 [23] Johannsen B., Pietzsch H.J., *Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine*, Servizi Grafici, Padoue, Italie, **2002**, p. 323.
 [24] Schriver L., Jungfleisch M.L., Tribalat S., *Compléments au Nouveau Traité de Chimie Minérale - Technétium-Rhénium*, Masson, **1978**, p. 42.
 [25] Shaha G.B., *Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine*, Springer-Verlag, **1992**, p. 65.
 [26] Sampson C.B., *Textbook of Radiopharmacy*, Gordon & Breach Science Publishers, **1990**, p. 33.



H. Belhadj-Tahar

Hafid Belhadj-Tahar

est directeur médical et scientifique au Groupe Santé Recherche de Toulouse*.



M.-H. Darbieu

Marie-Hélène Darbieu

est maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Toulouse**.

* Groupe Santé Recherche, 35 rue Bernard de Ventadour, 31300 Toulouse.

Tél. : 05 61 49 20 30. Fax : 05 61 49 20 40.

Courriel : belhadj.h@oreka.com

** Laboratoire de chimie de coordination, CNRS UPR 8241, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse.



PUBLICATION
RÉGIE PUBLICITAIRE
EDITION
IMPRESSION

Depuis 1988

Les Editions **D'Île de France**

Expérience,
la différence

www.edif.fr

Notre société est spécialisée dans l'édition d'annuaires et de revues professionnelles pour sociétés savantes, associations d'anciens élèves d'écoles d'ingénieurs, fédérations professionnelles,....

Notre présence depuis près de 15 ans dans un secteur d'activités en mutation permanente, la transparence de nos résultats régulièrement positifs depuis la création de notre société, la fidélité de nos partenaires éditoriaux sont autant de preuves du professionnalisme de notre équipe et constituent de fait notre meilleure « carte de visite ».

Notre atout majeur, et c'est aussi notre spécialité, est de vous garantir la gratuité de vos ouvrages papiers en contrepartie de l'exclusivité de la régie publicitaire entièrement assurée par notre service commercial.

Régisseur exclusif
de la Revue
l'Actualité Chimique

Editions D'Île de France
102, avenue Georges Clémenceau • 94700 Maisons-Alfort
Tél. : 33 1 43 53 64 00 • Fax : 33 1 43 53 48 00
e-mail : edition@edif.fr

Chimie physique des solutions

Solutions moléculaires pour des problèmes biomédicaux

Margarida F. Costa Gomes et Agílio A.H. Pádua

Abstract

Physical chemistry of solutions: molecular solutions for biomedical problems

Recent progress in molecular modelling and in experimental techniques, that allow direct observation of molecular structures, lead to an interpretation of physicochemical properties of solutions from the standpoint of microscopic details. Quantum chemistry provides a route to the intermolecular forces and statistical mechanics establishes the connection between the molecular domain and the macroscopic properties of solutions. A strategy combining experiment and theory improves the understanding of fundamental aspects underlying solubility, phase behaviour and many other thermodynamic properties of increasingly complex systems. For example, these developments contribute to the research of new therapeutic compounds such as fluorinated fluids used as *in vivo* gas carriers or as ultrasound contrast agents.

Mots-clés

Solubilité, simulation moléculaire, forces intermoléculaires, molécules fluorées, transporteurs de gaz, agents de contraste pour les ultrasons.

Key-words

Solubility, molecular simulation, intermolecular forces, fluorinated molecules, gas carriers, ultrasound contrast agents.

Le caractère fondamental de la physico-chimie moléculaire est de plus en plus présent dans les domaines du vivant. Par l'application des lois physiques de base, décrivant les structures électroniques et les interactions entre atomes en solution, elle contribue à des avancées dans des domaines tels que l'élucidation des relations entre structure et propriétés des protéines ou la formulation de nouveaux systèmes de transport de médicaments. La chimie physique peut jouer un rôle structurant apportant une explication univoque à des processus normalement traités de manière plus ou moins isolée par la biophysique, la chimie médicale ou la pharmacologie [1]. Par exemple, si la molécule active est le centre de la formulation d'un nouveau médicament, ce sont ses propriétés physico-chimiques qui déterminent sa vitesse d'administration, la possibilité de la solubiliser ou de la stabiliser en solution ou en suspension.

Les évolutions notables des dernières décennies sont marquées par l'accès aux détails moléculaires en solution. Ceci est constaté aussi bien dans la chimie physique expérimentale que théorique [2]. Les progrès au niveau des techniques expérimentales, d'une part avec l'accroissement de la précision des données et d'autre part avec l'utilisation de nouveaux principes de mesure, permettent l'observation directe des structures (macro)moléculaires et même des forces entre les molécules [3]. Les avancées les plus spectaculaires incluent la « vision » directe des macromolécules par des techniques telles que la microscopie (électronique, à force atomique) ou la diffusion de rayons X et de neutrons, donnant accès à des informations configurationnelles [4]. Des approches macroscopiques plus classiques, comme des mesures de solubilité, sont pertinentes pour élucider le comportement de solutions diluées et pour mettre en évidence des phénomènes de nature thermodynamique (facteurs entropiques et énergétiques).

Au niveau théorique, ce sont les méthodes de la chimie quantique et de la mécanique statistique qui, grâce à la disponibilité d'énormes capacités de calcul, sont devenues applicables à des systèmes complexes. Des modèles d'interaction sont établis à partir de calculs quantiques pour décrire effectivement les forces intermoléculaires. C'est la simulation moléculaire qui les utilise ensuite pour déterminer les propriétés macroscopiques d'un échantillon. Si le traitement de systèmes de plus en plus réalistes reste le challenge le plus médiatisé, des études plus fondamentales sur des modèles simples, façonnés pour viser la compréhension de certains aspects particuliers, constituent une voie tout autant prometteuse.

Les méthodes expérimentales et de modélisation en chimie physique moléculaire des solutions seront ici brièvement présentées. Ensuite, à la place d'une liste exhaustive de problèmes biomédicaux pour lesquels le concours de la chimie physique est important voire même capital, deux exemples seront décrits : la recherche de milieux liquides transporteurs de gaz *in vivo* et l'étude de nouveaux agents contrastants pour l'imagerie médicale. Dans les deux cas, il s'agit de solutions relativement simples (solutions liquides de molécules pour la plupart gazeuses aux conditions ambiantes), pour lesquelles il est possible de décrire avec une bonne rigueur les forces intermoléculaires. Les propriétés thermodynamiques de ces systèmes sont interprétées au niveau microscopique et les mécanismes qui déterminent la solubilité et la stabilité des solutions sont élucidés, permettant ainsi le choix de nouvelles formulations pharmacologiques.

Expérimentation : « voir » les molécules

Si une image vaut mieux qu'un long discours, l'observation directe des molécules en solution est le but de nombreux

développements expérimentaux. Une telle observation aiderait à comprendre comment les molécules fonctionnent ensemble, par exemple dans une cellule ou dans un organisme vivant. A l'acquisition de détails de la structure des molécules doit s'ajouter la connaissance des forces entre elles, en fonction de leurs distances et de leurs orientations relatives. Ces deux aspects (structure et interactions) ne sont pas toujours faciles à obtenir par une mesure expérimentale directe. Même si les techniques disponibles évoluent de façon rapide, il semblerait que pour pouvoir tracer un portrait complet des molécules en solution, il soit souvent nécessaire d'associer plusieurs informations expérimentales.

La microscopie optique a une limite de détection (la plus petite distance à partir de laquelle deux objets peuvent se distinguer) trop importante, déterminée par la longueur d'onde du rayonnement incident. La microscopie électronique a permis de surmonter cette difficulté : elle permet de descendre au-delà des 0,2 μm observés par le microscope optique, et d'atteindre les dimensions de l'atome avec des résolutions de l'ordre de 0,2 nm sur des substrats solides. Ces méthodes sont l'objet d'améliorations techniques constantes qui ont permis, par exemple, d'accroître la profondeur de champ des images (microscopie électronique à balayage) et d'avoir ainsi de meilleurs portraits de structures macromoléculaires ou mésoscopiques (colloïdes, émulsions), avec néanmoins une perte de résolution. Les techniques de microscopie électronique ne peuvent pas être utilisées directement pour des phases fluides car les échantillons à observer doivent être solides [5]. Des techniques mécaniques comme le microscope à force atomique ou la microscopie à force de surface permettent également l'accès à l'échelle atomique et la mesure directe des forces exercées entre les molécules. Dans le premier cas, la surface d'un substrat est parcourue par un capteur de la taille de quelques atomes sensible à la topologie nanométrique. Dans le second cas, la force exercée entre deux surfaces en présence de liquides ou de gaz est déterminée jusqu'à des distances de l'ordre de l'Angström [2].

Les configurations moléculaires en phase liquide sont accessibles par l'observation de leur interaction avec le rayonnement. Des expériences de résonance magnétique

nucléaire, et surtout de diffusion ou diffraction de rayons X et de neutrons, permettent l'obtention d'informations très précises et complémentaires sur les positions des atomes et des molécules [4]. La quantification de ces positions en milieu fluide est opérée par la fonction de distribution de paires. Cette fonction, de nature statistique, correspond à la probabilité, en se plaçant sur une particule, d'en trouver une autre à une distance et avec une orientation données. Le plus souvent, les orientations sont prises en moyenne et la fonction de distribution de paires est ainsi exprimée uniquement selon la coordonnée radiale. Pour un cristal, la fonction de distribution radiale est composée d'une suite de pics étroits à des distances bien définies. Dans un liquide, une série d'oscillations d'amplitude décroissante est obtenue, ce qui traduit les positions relatives les plus probables adoptées par les particules. L'aire sous le premier pic de la fonction de distribution radiale donne accès au nombre de proches voisins d'une molécule, donc à son nombre de coordination. Une autre manière de voir la fonction de distribution radiale est de la considérer comme le rapport entre la densité locale, à une distance donnée de la particule centrale, et la densité moyenne du fluide. A longue distance, le fluide se présente normalement comme un milieu isotropique, désordonné, et la fonction de distribution radiale tend donc vers l'unité.

L'exploitation des données expérimentales obtenues par diffraction de rayons X et de neutrons conduit aux fonctions de distribution radiale. La différence entre ces deux techniques est que les rayons X sondent la densité électronique des molécules, tandis que les neutrons sont sensibles à la nature isotopique et à l'état de spin des noyaux [3]. Les informations procurées sont complémentaires en deux aspects principaux : d'une part, un atome avec une faible densité électronique comme l'hydrogène est presque invisible aux rayons X, mais du fait de leurs propriétés nucléaires, il s'avère que l'hydrogène et le deutérium présentent un très fort contraste aux neutrons ; d'autre part, les atomes constituant les molécules biologiques (C, N, O) ont des facteurs de diffusion aux rayons X proches, mais leurs noyaux sont mieux distingués par les neutrons. Ceci peut être mis au service de l'étude de molécules en solution aqueuse, en utilisant la différence de contraste entre l'eau et l'eau lourde pour créer un mélange de manière à ce que le

Glossaire

Champ de force moléculaire

Équations qui expriment l'énergie des molécules en interaction, décomposée en un nombre de termes intramoléculaires (étirements, flexions et torsions des liaisons covalentes entre atomes) et intermoléculaires (interactions entre charges et entre sites atomiques). Des spécifications cohérentes de champ de force ont été développées pour les familles de molécules organiques et biologiques les plus importantes (hydrocarbures, alcools, amines, acides nucléiques, etc.). Parmi les plus utilisées se comptent AMBER, CHARMM et OPLS.

Configuration moléculaire

Ensemble des coordonnées tridimensionnelles de tous les atomes ou groupes d'atomes d'un échantillon d'une phase fluide ou solide.

Conformation moléculaire

Disposition spatiale adoptée par les atomes ou groupes d'atomes d'une molécule flexible.

Couche de solvation

Molécules de solvant associées à une molécule de soluté. La première couche de solvation est formée des molécules de solvant en contact direct avec le soluté. Les couches suivantes sont en général de moins en moins structurées.

Énergie libre de solvation

Énergie mise en jeu lors du transfert réversible d'une molécule de soluté d'un état de gaz parfait vers une solution diluée, sans changement de température ni de pression.

Fonction de distribution radiale

Fonction qui donne la densité de probabilité de trouver une molécule à une certaine distance d'une autre.

Forces intermoléculaires

Forces d'attraction ou de répulsion s'exerçant entre les molécules, en fonction de leurs distances, orientations et conformations, d'origine électrostatique ou quantique.

Loi de Henry

Loi exprimant la proportionnalité entre la pression partielle d'un gaz et sa concentration dans une solution liquide.

Méthode de dynamique moléculaire

Technique de simulation moléculaire basée sur le calcul de la trajectoire d'un ensemble de molécules avec le temps.

Méthode de Monte Carlo

Technique de simulation moléculaire par laquelle des configurations d'un ensemble de molécules sont générées en ayant recours à des nombres aléatoires.

solvant ait des caractéristiques de diffusion très différentes de celles du soluté choisi.

Les données brutes obtenues par des expériences de diffraction ne sont pas des images des molécules ni même des fonctions de distribution radiale, mais plutôt des figures d'interférence produites par le rayonnement diffusé, et qui doivent être traitées numériquement à l'aide de modèles moléculaires. La justesse des fonctions de distribution radiale résultantes s'est considérablement améliorée grâce aux progrès récents dans la qualité des signaux (sources de radiation synchrotron, sources de neutron intenses) et dans le traitement des informations (accumulation et traitement numérique des données, apport de corrections). L'interprétation des résultats reste encore fréquemment controversée même pour des molécules aussi petites que l'eau [6-7].

Des propriétés thermodynamiques comme le point d'ébullition ou la chaleur de vaporisation fournissent également des informations sur l'énergie de cohésion intermoléculaire. C'est ainsi, de cette façon plus globale, que les propriétés de la thermodynamique des solutions comme les équilibres entre phases, la solubilité ou la pression osmotique, permettent d'accéder aux interactions moléculaires [8]. Un exemple illustratif est la détermination de l'énergie de Gibbs de solution, accessible à travers la mesure de la solubilité. Cette énergie libre caractérise la solvation d'une espèce, notamment le bilan entre effets enthalpiques et entropiques. Dans le cas de solutions diluées, elle est particulièrement sensible aux interactions soluté-solvant.

Simulation : les molécules virtuelles

La modélisation des propriétés physico-chimiques des solutions peut se faire selon des optiques différentes :

- par des traitements thermodynamiques classiques, mettant en relation des grandeurs macroscopiques mesurables plus ou moins directement comme la composition, l'entropie ou le potentiel chimique ;
- par des modèles de la thermodynamique moléculaire, qui expriment ces grandeurs macroscopiques à l'aide de paramètres moléculaires de forme et d'interaction ;
- et par la simulation numérique explicite des molécules, leurs structures et interactions étant décrites en détail à un niveau élémentaire.

La mécanique statistique est l'édifice théorique qui permet de calculer les propriétés de systèmes macroscopiques, constitués d'un très grand nombre d'atomes ou de molécules, à partir de leur constitution microscopique. Cette discipline fournit l'interprétation moléculaire aux propriétés thermodynamiques [9]. Celles-ci résultent de valeurs moyennes ou de fluctuations de certaines grandeurs physiques attribuées à un ensemble de particules, distribuées parmi des états quantiques ou interagissant selon des fonctions d'énergie potentielle spécifiées. Les différentes théories statistiques des milieux fluides, qui sont à la base des modèles de la thermodynamique moléculaire, ne sont applicables rigoureusement qu'à des systèmes simples, composés de petites molécules rigides.

Ce sont les évolutions en puissance de calcul informatique et en génie des logiciels qui ont suscité l'émergence des méthodes de simulation moléculaire, c'est-à-dire de mécanique statistique numérique. Ici, la mise en place d'une construction théorique visant à obtenir les propriétés d'ensemble est abandonnée et remplacée par la simulation

explicite du comportement des particules, décrites individuellement par leurs forces d'interaction. Cette stratégie de calcul intensif n'est envisageable que s'il est possible de considérer un nombre important de particules et de configurations, représentatif d'un état fluide. Cette transition des théories analytiques vers les méthodes numériques plus générales a été aussi constatée dans beaucoup d'autres disciplines, comme la mécanique des fluides, la mécanique des milieux continus et la chimie quantique.

Deux classes de techniques sont employées pour simuler les phases fluides : la dynamique moléculaire et les méthodes de Monte Carlo [10]. Les deux opèrent à partir d'une spécification du champ de forces d'interaction et considèrent un nombre restreint (quelques centaines) de molécules représentant le système d'intérêt, dans une « boîte », le plus souvent un parallélépipède, mesurant quelques dizaines de nanomètres de côté. Certaines astuces sont mises en œuvre pour tromper l'échantillon et prétendre qu'il est plus vaste : des répliques virtuelles de la boîte de simulation peuvent être raccordées selon les différentes dimensions de l'espace pour enlever les problèmes liés à la taille finie de l'échantillon ; la portée des interactions est aussi limitée artificiellement, mais des corrections sont apportées ensuite.

En dynamique moléculaire, les équations de mouvement des particules sont intégrées en fonction du temps pour créer des trajectoires. En Monte Carlo, des configurations sont générées en ayant recours à des nombres aléatoires, mais avec des probabilités respectant les règles de la mécanique statistique. La dynamique moléculaire est donc l'outil d'excellence pour accéder à des propriétés en rapport avec des phénomènes de transport, de diffusion moléculaire ou de relaxation. Le Monte Carlo est en principe plus efficace dans l'échantillonnage des configurations et est employé pour caractériser des états d'équilibre. Une grande créativité a été, et est toujours, exprimée par les architectes de méthodes de Monte Carlo, car il est possible d'imaginer des procédures d'échantillonnage spécialement adaptées pour traiter un problème spécifique.

Les prévisions de la simulation sont aussi justes que les modèles d'interaction présumés le permettent. Les différents termes de ces champs de force décrivent les étirements, flexions et torsions du squelette moléculaire, ainsi que les interactions répulsives et attractives entre sites. Ils sont construits avec le concours de calculs de chimie quantique et de données expérimentales, spectroscopiques, thermodynamiques et de diffraction. Même pour une petite molécule comme l'eau, le potentiel d'interaction continue à procurer de nombreux défis. Une pléthore de modèles a été, et continue à être, publiée dans la littérature, en essayant de reproduire les particularités de cette molécule, en cherchant par des charges fixes ou polarisables à rendre compte de la liaison hydrogène ou des déformations de la densité électronique d'une molécule provoquées par ses voisines. L'étude des biomolécules est possible car le pas entre les familles de molécules organiques simples (alcane, alcools, etc.) et les acides aminés ou les acides nucléiques a été franchi. Des familles de champs de forces, par exemple AMBER, CHARMM ou OPLS [11-12], sont actuellement utilisées par une large communauté de chercheurs.

Certains aspects des interactions, comme les forces d'induction et de corrélation électronique, ne sont pas facilement représentés par les modèles de champs de force classiques. Dans ces cas, il devient fréquent d'associer

directement les méthodes de structure électronique (chimie quantique) aux techniques de simulation [10]. Par ailleurs, beaucoup de phénomènes macromoléculaires ont lieu sur une échelle de temps difficilement accessible à la simulation atomistique. En effet, la dynamique moléculaire peut suivre des milliers d'atomes durant quelques dizaines de nanosecondes, donc encore loin des échelles de temps (micro, voire millisecondes) requises pour couvrir certains processus macromoléculaires en solution. Le domaine de la simulation mésoscopique, dans lequel une échelle de description « gros grains » est adoptée, est en plein essor, avec des applications aux polymères, aux verres et aux macromolécules.

La propriété thermodynamique clef qui peut établir le lien entre les phénomènes moléculaires et des processus macroscopiques ayant lieu en solution, tels que la stabilité relative ou le partage entre phases, est l'énergie libre de solvation [8]. Les mécanismes responsables de la solvation d'un soluté ont été l'objet de traitements par la thermodynamique moléculaire qui décompose ce processus en deux pas : la création d'une cavité au sein du solvant capable de loger le soluté, suivie par l'activation des interactions soluté-solvant (le solvant et le soluté étant décrits de façon simplifiée par des particules sphériques). La simulation permet également d'accéder aux énergies libres en solution, mais apporte beaucoup plus de richesse au niveau des détails moléculaires [10]. Notamment, elle montre comment la cage de solvant s'organise, permet de calculer les fonctions de distribution radiale, et donne les orientations moyennes adoptées par les molécules de solvant ainsi que leurs temps de résidence dans la couche de solvation. Ces détails microscopiques peuvent être directement comparés à ceux accessibles par les mesures de diffraction [2, 7]. La solubilité constitue pareillement une source d'information moléculaire importante, spécialement dans le cas des systèmes dilués (formés d'espèces peu solubles) qui, par leur nature, posent des problèmes de détection aux techniques d'observation moléculaire directe, et fournit donc un moyen d'affiner les paramètres des champs de force.

Solubilité : transporteurs de gaz *in vivo*

L'utilisation de molécules fluorées en médecine et en pharmacologie est largement déterminée par leurs propriétés physico-chimiques. Les fluorocarbures employés sont chimiquement et biologiquement inertes donc non toxiques, stables thermiquement, ont une basse tension de surface, une faible viscosité et dissolvent de larges quantités de gaz tels que l'oxygène et le dioxyde de carbone. D'autres propriétés déterminantes dans le choix des espèces fluorées sont leur structure moléculaire et leur affinité par les phases lipidiques qui conditionnent la vitesse à laquelle elles peuvent être éliminées par l'organisme [13]. Différents hydrocarbures fluorés sont aujourd'hui proposés comme transporteurs de gaz *in vivo*, sous forme d'émulsions injectables : par exemple le bromoperfluorooctane ou la perfluorodécane associés à des émulsifiants d'usage courant dans l'industrie pharmaceutique [13]. Leurs applications incluent la substitution partielle du sang, l'oxygénation des tissus pendant des interventions chirurgicales (notamment des chirurgies oculaires) et la conservation d'organes. L'objectif de ces produits n'est pas de remplacer toutes les

fonctions physiologiques du sang, mais de proposer un vecteur alternatif pour les gaz respiratoires. Un avantage de leur utilisation par rapport à l'hémoglobine est que ces molécules fluorées dissolvent les gaz « physiquement » (les molécules de gaz ne sont pas liées chimiquement au solvant), la quantité de gaz dissoute étant directement proportionnelle à sa pression partielle (loi de Henry).

Même si la structure moléculaire des composés fluorés ressemble à celle de leurs homologues hydrogénés, leurs propriétés sont substantiellement différentes, d'où l'immiscibilité fréquemment observée entre alcanes et perfluoroalcanes. L'usage médical de molécules fluorées est conditionné en partie par les propriétés d'équilibre liquide/liquide qui déterminent l'immiscibilité des molécules fluorées avec des milieux aqueux (comme le sang ou autres fluides corporels) ou lipidiques, nécessitant leur administration en tant qu'émulsions. Néanmoins, il s'avère que c'est la solubilité des gaz qui guide, dans un premier temps, le choix des liquides fluorés à utiliser. Il sera illustré comment la chimie physique des solutions, par une double approche expérimentale (mesure de solubilité) et théorique (simulation numérique) peut contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires de solubilisation des gaz dans les liquides fluorés. Pour cela, une stratégie analogue à celle de la thermodynamique moléculaire classique a été suivie en analysant par simulation les effets de création de cavités et d'interactions soluté-solvant.

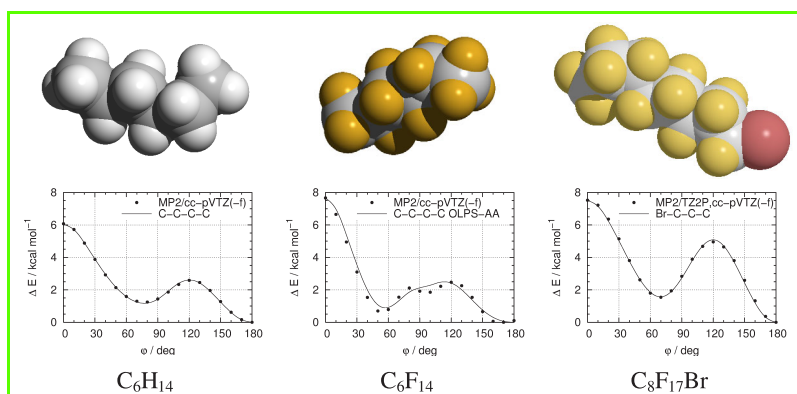


Figure 1 - Modèles moléculaires et profils d'énergie de torsion des composés étudiés par simulation en phase liquide.

Les profils d'énergie de torsion calculés des méthodes quantiques *ab initio* (symboles) sont reproduits par les champs de forces utilisés (lignes). A noter la différence entre le profil pour la torsion C-C-C-C dans l'hexane et dans le perfluorohexane.

Quelques molécules fluorées simples ont été choisies pour illustrer cette approche (figure 1). D'une part, ces espèces sont effectivement employées comme transporteurs de gaz *in vivo*, et d'autre part, parce qu'elles servent de prototypes pour des substances plus complexes nécessaires dans d'autres applications (par exemple en tant que tensioactifs fluorés). Leurs champs de force détaillés avec tous les atomes explicitement considérés ont été établis récemment [14]. Les solutés sont des gaz importants du point de vue respiratoire (oxygène et dioxyde de carbone) qui, étant des substances simples du point de vue moléculaire, peuvent servir de sondes pour les interactions soluté-solvant. Des configurations en phase liquide de différents solvants organiques (hexane, perfluorohexane et 1-bromoperfluorooctane), ainsi que l'énergie libre nécessaire à la formation de cavités, ont été étudiées par dynamique moléculaire. Les profils d'énergie de torsion autour des liaisons C-C sont

assez différents entre alcanes et alcanes perfluorés. Ces derniers présentent des barrières de rotation interne plus importantes et, curieusement, le minimum d'énergie conformationnelle ne correspond pas à une géométrie en zigzag (*trans*) du squelette carboné caractéristique des alcanes, mais plutôt à des conformations légèrement de travers (*gauche*) qui peuvent engendrer des conformations hélicoïdales (*figure 1*). Cette rigidité accrue des chaînes fluorées engendre en phase liquide une plus importante population de cavités d'une taille donnée spontanément présentes dans le solvant fluoré, associée à une plus faible énergie libre de formation de cavités (*figure 2*), d'où sa plus grande facilité à dissoudre des gaz.

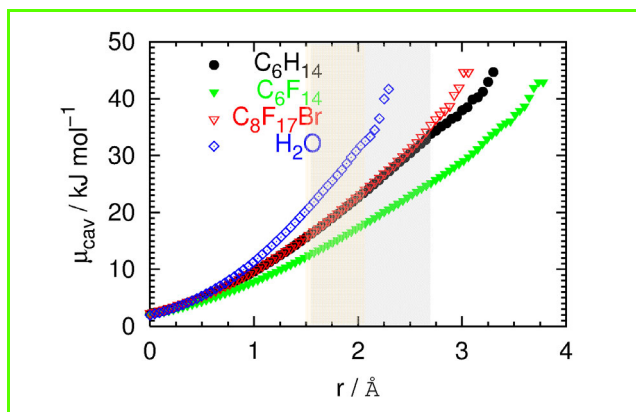


Figure 2 - Énergie libre de formation de cavités dans différents liquides, à 30 °C.

Les régions ombragées indiquent approximativement les tailles de cavités explorées par les molécules d'oxygène (beige) et de dioxyde de carbone (gris). L'énergie libre de formation de cavités est plus élevée pour l'eau que pour les solvants organiques. C'est dans le perfluorohexane que la formation de cavités est plus favorable.

Partant d'un grand nombre de configurations moléculaires du solvant générées par simulation, il devient possible de calculer l'énergie libre d'un soluté en employant une technique appropriée. Pour des solutés de petite taille, la procédure est simple, mais pour des espèces plus complexes, elle peut devenir plus lourde et assujettie à des erreurs. Le lien entre l'énergie libre de solvatation et la solubilité est immédiat et permet, par comparaison avec l'expérience, d'inférer sur la justesse du modèle d'interaction, en particulier des termes croisés soluté-solvant [15]. Une fois validés, ces modèles deviennent des outils de prévision performants qui peuvent être appliqués à l'étude de nouvelles propriétés, difficilement accessibles expérimentalement, ou dans des contextes éloignés des conditions de départ.

La simulation moléculaire permet de traduire clairement l'observation expérimentale que les liquides fluorés sont capables de dissoudre de grandes quantités de gaz. En plus, il est possible d'inférer sur les mécanismes moléculaires en jeu : l'absorption physique des gaz respiratoires par les liquides fluorés est surtout fonction de caractéristiques structurales, comme les cavités du liquide, et dépend pour une moindre part des forces d'attraction de nature dispersive entre les gaz et les solvants.

Dispersion gazeuses : agents de contraste

Une autre application médicale des phases fluides fluorées se trouve dans certaines formulations d'agents de contraste

pour l'imagerie par ultrasons qui emploient des dispersions gazeuses dans le flux sanguin [16-17]. Un agent dispersé provoque un contraste marqué aux ultrasons quand il présente de fortes différences de masse volumique et de compressibilité par rapport au milieu. Tel est le cas des dispersions de gaz (air ou hydrocarbures perfluorés de bas poids moléculaire), sous forme de bulles avec une taille de quelques micromètres, stabilisées dans une microcapsule formée de surfactants (typiquement des phospholipides courants dans l'industrie pharmaceutique). Les microbulles doivent être suffisamment stables pour traverser le système cardio-pulmonaire et persister dans l'organisme le temps nécessaire à l'observation. Elles accroissent le contraste des compartiments vasculaires et en particulier des tissus du foie, permettant l'utilisation efficace de l'imagerie par ultrasons dans ces organes.

Il a été démontré qu'un paramètre physico-chimique décisif pour juger la stabilité d'une dispersion gazeuse est la solubilité du gaz dans l'eau [17]. Les molécules fluorées de petite taille (du perfluoropropane au perfluorohexane), gazeuses à la température du corps, sont moins solubles que l'air et se présentent comme candidats idéaux au rôle d'agent de contraste. La solubilité dans l'eau des alcanes perfluorés diminue avec l'augmentation de leur poids moléculaire, ce qui est donc bénéfique pour cette application. Par contre, leur tension de vapeur baisse et mènera éventuellement à la condensation de l'agent de contraste à l'intérieur des microbulles, réduisant ainsi leur efficacité. Même si aux conditions de pression atmosphérique la substance fluorée est gazeuse à 37 °C, l'augmentation significative de la pression à l'intérieur de la bulle par effet de la tension de surface peut induire la condensation.

La connaissance des propriétés thermodynamiques des gaz est une question résolue. Par contre, la solubilité d'espèces fluorées dans l'eau est particulièrement difficile à mesurer à cause des très faibles concentrations [18]. La solubilité des gaz fluorés apolaires dans l'eau, qui est un liquide associé possédant de fortes liaisons intermoléculaires, est contrôlée par l'effet hydrophobe. C'est-à-dire que c'est la contribution entropique défavorable liée à l'organisation des molécules d'eau autour du soluté qui limite la solubilité, et non pas les faibles interactions soluté/solvant. C'est donc la structure moléculaire de l'eau qui détermine la solubilité de ces gaz.

Les détails de la structure de l'eau liquide, observés par diffusion de rayons X et de neutrons, sont bien reproduits par

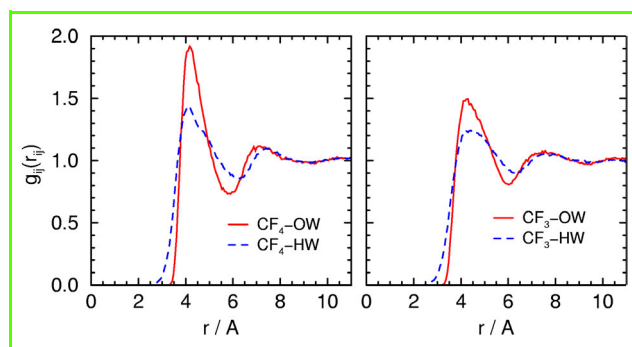


Figure 3 - Fonctions de distribution radiale site-site soluté-solvant du perfluorométhane (A) et du perfluoroéthane (B) dans l'eau à 30 °C.

Les lignes pointillées bleues indiquent la fonction de distribution radiale entre les centres des sites dans les molécules des solutés et les atomes d'hydrogène de l'eau. Les lignes rouges correspondent aux atomes d'oxygène.

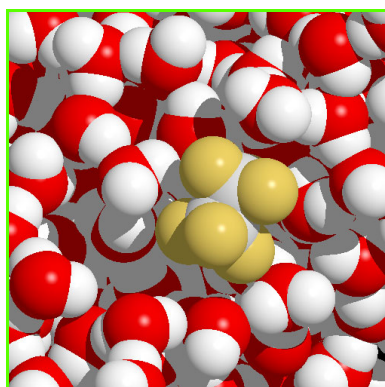


Figure 4 - Configuration instantanée de molécules d'eau autour du C_2F_6 à 30 °C, obtenue au cours d'une simulation.

les potentiels intermoléculaires récents [6-7]. Les valeurs expérimentales de solubilité sont prévues par simulation, ce qui confirme la justesse des champs de force. Par ailleurs, l'analyse des fonctions de distribution radiale site-site du soluté avec les atomes d'oxygène et hydrogène du solvant montre que les premiers maxima coïncident (figure 3). Par conséquent, les molécules d'eau de la première couche de solvation se

trouvent orientées de manière tangentielle autour du soluté et participent intégralement au réseau de liaisons hydrogène de l'ensemble du solvant (figure 4) [18]. La simulation moléculaire s'impose comme un outil puissant dans l'étude des bases moléculaires de ces processus de solvation qui sont en relation directe avec la stabilité des dispersions gazeuses utilisées comme agents de contraste pour l'imagerie médicale.

Conclusions

La chimie physique des solutions repose sur un ensemble d'équations mathématiques dérivées pour des conditions bien précises : systèmes moléculaires simples, souvent dilués, et constitués d'un nombre limité de composants. Dans la plupart des cas, les équations exactes ne peuvent s'appliquer directement (sans simplification) aux processus biologiques qui ont lieu dans des milieux beaucoup plus complexes que ceux reproduits dans un laboratoire de physico-chimie. Ces outils sont cependant un point de départ capable de conduire à une compréhension des propriétés de solutions complexes [1].

La disponibilité d'informations expérimentales à l'échelle moléculaire et la possibilité de travailler directement sur des modèles atomistiques en simulation sont deux facteurs qui ont changé la manière d'étudier les propriétés des solutions. Ceci mène à l'identification des phénomènes microscopiques implicites aux mécanismes de solvation : modifications de structure et d'organisation moléculaires, et interactions soluté-solvant. Par rapport à la modélisation thermodynamique classique [8], l'approche qui emploie explicitement les interactions moléculaires possède une nature plus fondamentale et permet une application plus étendue. Il est notamment possible d'envisager des extrapolations fiables et des passerelles vers de nouveaux problèmes. L'utilité de ceci est de réduire le recours à des essais expérimentaux exhaustifs lorsqu'une ou plusieurs familles de composés sont examinées en visant à optimiser simultanément plusieurs fonctions ou caractéristiques. Ce fait est particulièrement intéressant en recherche pharmacologique et biomédicale.

Les deux exemples présentés concernent un aspect particulier de la chimie physique des solutions qu'est la modélisation moléculaire des interactions de solvation, mettant en jeu les propriétés de composés fluorés en deux situations distinctes suscitées par des applications biomédicales : à la fois comme solvants liquides (transporteurs de gaz) et

comme solutés gazeux (agents de contraste). De nombreux autres points de contact existent entre la chimie physique des solutions et les sciences médicales. En plus des exemples décrits, les interactions gaz-liquide et les transferts de principes actifs entre phases déterminent respectivement l'utilisation de gaz anesthésiques et la vectorisation de médicaments par voie oculaire ou transdermique [1, 5]. Il est possible d'anticiper que la connaissance des mécanismes moléculaires, qui déterminent ces propriétés et d'autres telles que la stabilité de suspensions et le comportement aux interfaces, contribuera à l'effort multidisciplinaire derrière de futurs développements dans le domaine médical et pharmacologique comme la découverte de nouvelles voies pour l'administration de médicaments et l'amélioration des outils de diagnostic.

Références

- [1] Florence A.T., Attwood D., *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 3^e ed., Palgrave, Royaume-Uni, 1998.
- [2] Israelachvili J., *Intermolecular & Surface Forces*, 2^e ed., Academic Press, Londres, 1992.
- [3] Gerschel A., *Liaisons Intermoléculaires*, EDP Sciences/CNRS Éditions, Paris, 1995.
- [4] Roe R.-J., *Methods of X-Ray and Neutron Scattering in Polymer Science*, Oxford University Press, New York, 2000.
- [5] Van Holde K.E., Johnson W.C., Ho P.S., *Principles of Physical Biochemistry*, Prentice Hall, New Jersey, 1998.
- [6] Soper A.K., *J. Phys.: Condens. Matter*, 1997, 9, p. 2717.
- [7] Sorensen J.M., Hura G., Glaeser R.M., Head-Gordon T., *J. Chem. Phys.*, 2000, 113, p. 9149.
- [8] Ben-Naim A., *Water and Aqueous Solutions: Introduction to a Molecular Theory*, Plenum Press, New York, 1974.
- [9] Chandler D., *Introduction to Modern Statistical Mechanics*, Oxford University Press, New York, 1987.
- [10] Frenkel D., Smit B., *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*, 2^e ed., Academic Press, Londres, 2001.
- [11] Cornell W.D., Cieplak P., Bayley C.I., Gould I.R., Merz K.M. Jr, Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, p. 5179.
- [12] Jorgensen W.L., Maxwell D.S., Tirado-Rives J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, p. 11225.
- [13] Riess J.G., *Chem. Rev.*, 2001, 101, p. 2797.
- [14] Pádua A.A.H., *J. Phys. Chem. A*, 2002, 106, p. 10116.
- [15] Dias A.M.A., Bonifácio R.P., Marrucho I.M., Pádua A.A.H., Costa Gomes M.F., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2003, 5, p. 543.
- [16] Harvey C.J., Pilcher J.M., Eckersley R.J., Blomley M.J.K., Cosgrove D.O., *Clinical Radiology*, 2002, 57, p. 157.
- [17] Kabalnov A., Klein D., Pelura T., Schutt E., Weers J., *Ultrasound in Med. and Biol.*, 1998, 24, p. 739.
- [18] Bonifácio R.P., Pádua A.A.H., Costa Gomes M.F., *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105, p. 8403.



M.F. Costa Gomes

Margarida F. Costa Gomes¹

est chargée de recherche au CNRS et effectue ses recherches au Laboratoire de thermodynamique des solutions et des polymères*.



A.A.H. Pádua

Agílio A.H. Pádua²

est professeur à l'université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand et effectue ses recherches dans ce même laboratoire.

* Laboratoire de thermodynamique des solutions et des polymères, UMR CNRS 6003, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex.

¹ Tél. : 04 73 40 72 05. Fax : 04 73 40 71 85.

Courriel : margarida.c.gomes@univ-bpclermont.fr

² Tél. : 04 73 40 71 66. Fax : 04 73 40 71 85.

Courriel : agilio.padua@univ-bpclermont.fr

La photonique pour l'étude du milieu biologique

De la réactivité au diagnostic

Sandrine Lévêque-Fort, Karine Steenkeste, Pascaline Lacroix, Francis Tfibel et Marie-Pierre Fontaine-Aupart

Abstract Photonics for the study of biological systems: from the reactivity to the diagnostic

Fluorescence microscopy under two photon excitation is a recent biophotonic development aiming at original fluorescence analysis by intensity and fluorescence lifetime imaging. After a brief description of the performance of the instrumental set up, its utilization for studies of pharmacological and biomedical interest is presented.

Mots-clés Biophotonique, microscopie biphotonique, FLIM, anti-VIH-1, biofilms, cancers de vessie.

Key-words Biophotonic, two-photon microscopy, FLIM, anti-HIV-1, biofilms, bladder cancers.

L'optique/photonique appliquée aux milieux vivants (biophotonique) est une discipline en forte émergence qui vise à élaborer et intégrer des technologies optiques innovantes pour des domaines aussi variés que la recherche fondamentale en biologie et biotechnologie, le biomédical (diagnostic, étude des tissus et thérapie clinique), la pharmacologie (photochimiothérapie) ou encore l'environnement (substances infectieuses en milieu médical). En tirant parti d'une part des propriétés des photons (confinement spatial, temporel, couverture spectrale), et d'autre part des propriétés optiques des systèmes biologiques (absorption, autofluorescence, diffusion, réfraction, anisotropie), différentes techniques d'imagerie non invasives des milieux vivants par voie optique ont émergé ces dernières années. Parmi les plus innovantes, on peut distinguer celles qui utilisent de nouvelles méthodes de détection des signaux optiques (méthodes de cohérence optique (OCT) et acousto-optique [1-2], imagerie spectrale en mode fluorescence ou Raman [3-4]) et celles qui exploitent les nouvelles sources laser femtoseconde pour le développement de l'optique non linéaire (génération d'harmoniques [5], microscopie biphotonique [6]).

Cependant, si l'on compare le développement des dispositifs biophotoniques, on peut constater que les méthodes utilisant la fluorescence sont les plus largement répandues. Elles constituent en effet de puissants outils dans la mesure où elles permettent d'une part de faire le lien entre le comportement *in vitro* et *in vivo* des biopolymères, et d'autre part sont tout à fait adaptées aussi bien à l'étude de la cellule qu'à l'outil thérapeutique. C'est en particulier la spécificité de la microspectroscopie de fluorescence qui a la capacité de détecter, quantifier et fournir des images aussi bien des composants naturels des systèmes biologiques (acides aminés, collagène, NAD(P)H, flavines oxydées, porphyrines, etc.) que des sondes extrinsèques (médicaments, photosensibilisateurs, marqueurs d'ions...). Le développement et l'application de ces techniques à l'étude des biomolécules, cellules et tissus exigent une parfaite compréhension de l'interaction rayonnement

(photons)-matière (systèmes biologiques), compréhension acquise au moyen d'études photophysiques et photochimiques. Il s'agit donc d'un domaine de recherche pluridisciplinaire fondé sur des collaborations entre physiciens, chimistes, biologistes et cliniciens.

C'est grâce à une synergie de compétences que le laboratoire a pu développer, en association avec le Laboratoire Charles Fabry (Institut d'Optique de l'Université Paris Sud Orsay) et le Laboratoire de chimie-physique (Université Paris Sud Orsay), un dispositif prototype original d'imagerie de la dynamique d'émission de fluorescence intracellulaire par

Glossaire

Autofluorescence

Fluorescence provenant des fluorophores endogènes au milieu cellulaire et tissulaire (acides aminés aromatiques des protéines, NAD(P)H, flavoprotéines, collagène, élastine, porphyrines, etc.).

Cellules HeLa

Fibroblastes servant de modèles, isolés à partir d'un cancer de l'utérus.

Comptage de photons

Méthode de détermination de durée de vie de fluorescence basée sur la détection de photons de fluorescence uniques (statistiquement, moins d'un photon est émis pour chaque impulsion laser excitatrice).

Cytologie

Étude de la cellule.

Cytoscopie

Acte de diagnostic au moyen d'un endoscope (source de lumière blanche).

Déclin de fluorescence

Décroissance temporelle (mono ou multi-exponentielle) de l'intensité de fluorescence.

Histologie

Étude du tissu normal.

Lésion papillaire

Structure d'une lésion en forme de papille.

Photonique

Génération, manipulation, transmission et détection de photons.

excitation à deux photons (système IDEFIX). Cette instrumentation s'appuie sur les développements récents en biophotonique que sont la microscopie par excitation à deux photons (*encadré 1*), l'analyse de la dynamique d'émission de fluorescence par imagerie des durées de vie de fluores-

cence (FLIM pour « fluorescence lifetime imaging ») (*encadré 2*) et la microscopie de corrélation de fluorescence (FCS pour « fluorescence correlation spectroscopy »). Le principe de la FCS et les exemples d'applications biomédicales que nous avons développés peuvent être consultés

Encadré 1

L'excitation biphotonique (TPE pour « two photon excitation »)

La microscopie par excitation à deux photons représente l'une des avancées les plus significatives en microscopie optique depuis l'introduction de la microscopie confocale à balayage laser [7]. Le caractère non linéaire du processus d'absorption à deux photons localise strictement l'excitation de la fluorescence ainsi que les photodommages (voir schémas A et B), au point de plus grande focalisation du faisceau (~ 1 µm³), ce qui présente toute une série d'avantages très attractifs pour l'imagerie cellulaire et tissulaire dont les plus importants dans le cadre de notre recherche sont (i) une minimisation de la photo-destruction des échantillons biologiques pendant la collection des images permettant des observations prolongées, (ii) une amélioration de la profondeur de pénétration dans des échantillons épais du fait de l'utilisation de sources laser proche infrarouge (laser titane/saphir accordable dans le domaine spectral 650-900 nm), (iii) une parfaite séparation des longueurs d'onde d'excitation et d'émission permettant ainsi de s'affranchir du « bruit » issu de la lumière diffusée par l'échantillon, proche de la longueur d'onde d'excitation.

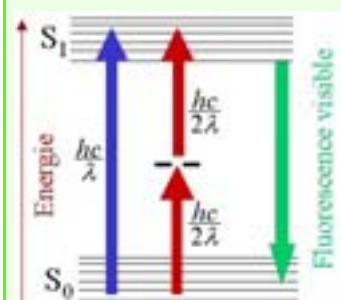


Schéma A - Principe de l'absorption et de l'émission de fluorescence sous excitation à un (bleu) et deux (rouge) photons.

Dans le cas d'une absorption à deux photons, on montre que le flux de photons de fluorescence émis est proportionnel à $\delta C F^2$ où δ est la section efficace d'absorption biphotonique (en cm⁴.s/molécule/photon), C la concentration du fluorophore et F le flux de photons incident. Étant données les très faibles probabilités de transition à deux photons, le flux de photons incident doit être très élevé afin d'obtenir une bonne efficacité d'excitation de la fluorescence.

On démontre qu'il dépend de E, l'énergie par impulsion, $\Delta\tau$, la durée des impulsions et ω , la section du faisceau laser. Cette expression montre clairement que le flux de photons incident sera d'autant plus élevé que la largeur des impulsions et la section du faisceau laser seront faibles. Ainsi, pour les expériences d'absorption à deux photons, on utilise typiquement des lasers à saphir dopés au titane délivrant des impulsions infrarouges d'une durée ~ 100 femtosecondes. Par ailleurs, lorsqu'un faisceau laser est focalisé au foyer d'un objectif, la taille minimale de la section de focalisation ω dépend de l'ouverture numérique de l'objectif (ON) selon l'expression $\omega \propto 1/ON$. Pour concentrer l'énergie spatialement et obtenir une section de focalisation la plus petite possible, on utilise donc des objectifs de grande ouverture numérique.

$$F \propto \frac{E}{h\nu} \frac{1}{\Delta\tau\omega^2}$$

On démontre qu'il dépend de E, l'énergie par impulsion, $\Delta\tau$, la durée des impulsions et ω , la section du faisceau laser. Cette expression montre clairement que le flux de photons incident sera d'autant plus élevé que la largeur des impulsions et la section du faisceau laser seront faibles. Ainsi, pour les expériences d'absorption à deux photons, on utilise typiquement des lasers à saphir dopés au titane délivrant des impulsions infrarouges d'une durée ~ 100 femtosecondes. Par ailleurs, lorsqu'un faisceau laser est focalisé au foyer d'un objectif, la taille minimale de la section de focalisation ω dépend de l'ouverture numérique de l'objectif (ON) selon l'expression $\omega \propto 1/ON$.

Pour concentrer l'énergie spatialement et obtenir une section de focalisation la plus petite possible, on utilise donc des objectifs de grande ouverture numérique.

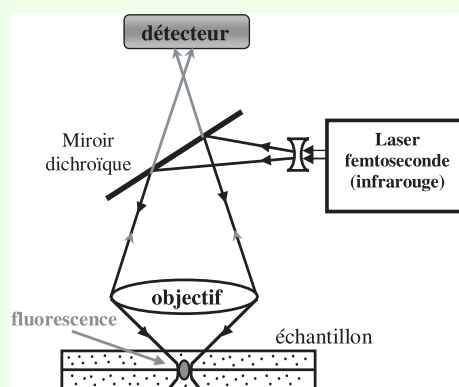


Schéma B - Principe d'un microscope par excitation à deux photons.

Encadré 2

L'imagerie de durées de vie de fluorescence (FLIM)

En plus des mesures stationnaires d'intensité de l'émission de fluorescence, le signal de fluorescence peut aussi être analysé par une discrimination temporelle. En effet, la détermination de la cinétique d'émission d'un fluorophore est une caractéristique de l'émetteur donnant accès non seulement à sa durée de vie moyenne mais aussi le cas échéant à ses durées de vie multiples. Ce paramètre caractérise quantitativement ses propriétés intrinsèques et les effets de son environnement immédiat (variation de pH, de polarité, de concentration en oxygène...). Il échappe à de nombreux artefacts qui affectent la quantification des intensités stationnaires en microscopie de fluorescence : photoblanchiment, variations de concentrations locales, mouvements cellulaires, variation dans l'efficacité de l'excitation ou de détection. En utilisant la durée de vie de fluorescence comme facteur de contraste fonctionnel, la fluorescence résolue en temps est une méthode qui allie une très haute sensibilité avec des conditions de mesure non destructives. Combinée à des techniques de microscopie et d'imagerie de milieux cellulaires, l'imagerie de fluorescence résolue en temps (FLIM) permet, en complément des

informations de localisation et de topologie apportées par la microscopie conventionnelle, une analyse dynamique de processus moléculaires et métaboliques au sein des cellules. Différentes méthodes d'analyse numérique de la distribution des durées de vie en chaque point d'une image sont disponibles. Si l'on souhaite obtenir une image FLIM **en temps réel**, on utilisera une méthode MLE (« maximum a posteriori lifetime estimator ») [19] qui donne accès à une durée de vie moyenne sans tenir compte de la réponse instrumentale. C'est une méthode suffisante si l'on désire uniquement visualiser des modifications de durées de vie sans chercher à les déterminer précisément. Au contraire, si l'on recherche la quantification des différentes composantes que peut contenir un déclin de fluorescence, en particulier celles à très courtes durées de vie, il est alors nécessaire d'utiliser un traitement numérique du signal plus performant comme une méthode d'analyse globale [20] ou de détermination du maximum d'entropie [21]. Un tel traitement est certes plus performant mais plus coûteux en temps et ne peut être appliqué que pour quelques points spécifiques d'une image.

dans la littérature [7-8]. Nous nous limiterons dans le présent article à la présentation de travaux récents réalisés par imagerie d'intensité et de durée de vie de fluorescence sous excitation à deux photons sur (i) l'étude du ciblage cellulaire de nouveaux inhibiteurs du VIH et (ii) les premiers pas vers la mise au point d'un diagnostic précoce de cancers, des études développées au Laboratoire de photophysique moléculaire en collaboration avec d'autres structures de recherche fondamentale et hospitalières.

L'instrumentation IDEFIX

L'instrumentation IDEFIX, basée sur l'utilisation d'une source laser titane/saphir femtoseconde, offre l'accès à différentes voies d'excitation et plusieurs modes de détection de l'émission de fluorescence. En effet, la puissance disponible de chaque impulsion en sortie de cavité (~ 700 mW) est utilisée pour servir deux voies d'excitation simultanées. La première, à ~ 100 mW, permet une excitation biphotonique monopoint des échantillons : les images de fluorescence sont obtenues en balayant le point de mesure submicronique sur l'ensemble du plan focal par déplacement du faisceau laser au moyen de miroirs galvanométriques (balayage laser) (figure 1a). La seconde voie d'excitation (~ 600 mW) constitue un dispositif original de microscopie multifocale (MIM) [9], récemment développé par le laboratoire en collaboration avec l'équipe de Patrick Georges du

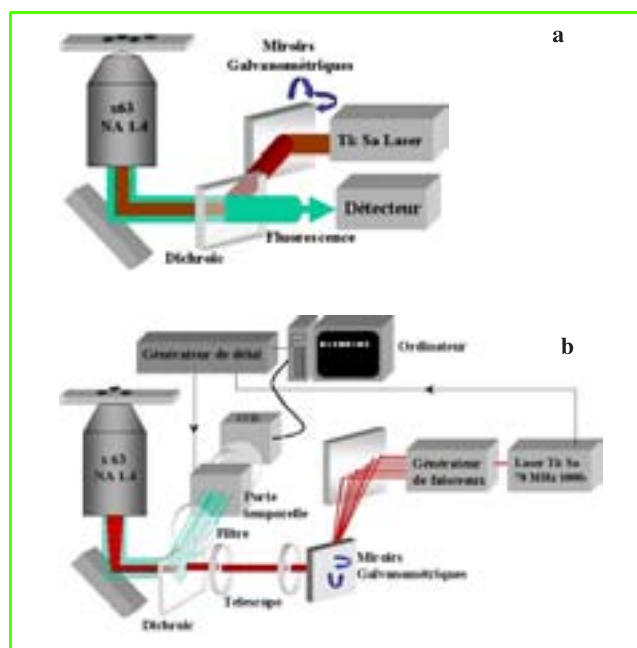


Figure 1 - Représentation schématique du montage de microscopie de fluorescence IDEFIX.

La source laser femtoseconde (modèle MIRA 900-F, Coherent) est accordable en longueur d'onde de 690 à 1 000 nm. Le microscope est un modèle fonctionnant en mode inverse (modèle Axiovert 135, Carl Zeiss). (a) Voie d'excitation monopoint : le système de détection est interchangeable selon que l'on effectue des mesures d'intensité de fluorescence ou des mesures de FLIM. Dans tous les cas, le signal de fluorescence est détecté par un photomultiplicateur rapide (picoseconde) fonctionnant en régime de comptage de photons et relié à un amplificateur/sélecteur d'impulsions (EG & G Ortec). L'acquisition d'images d'intensité de fluorescence est obtenue au moyen d'une carte de comptage de photons (National Instrument). Pour les données FLIM, le signal amplifié est dirigé sur un analyseur en temps picoseconde (Picosecond Time Analyzer, EG & G Ortec). (b) Voie d'excitation multipoints et détection de la fluorescence par intensité et FLIM. Le système de détection se compose d'une caméra CCD 12 bits (Hamamatsu) devant laquelle est placée une porte temporelle picoseconde à haute cadence (200 ps à 80 MHz, Kentech Instruments).

Laboratoire Charles Fabry, permettant de générer une ligne de 8 faisceaux d'excitation biphotonique. L'ensemble de ces points disposés typiquement à 4 μm l'un de l'autre peut être balayé sur l'ensemble du plan focal de l'échantillon au moyen du même système de balayage laser que celui utilisé pour l'excitation monopoint (figure 1b).

Sur chacune des voies, l'analyse de la fluorescence émise par les constituants cellulaires ou par des chromophores piégés dans une matrice (cellule, tissus, biofilm) peut être réalisée par les modes complémentaires d'imagerie d'intensité et de déclin de fluorescence (encadré 2). Ce sont à la fois la durée du balayage de l'excitation laser et le système d'acquisition des photons de fluorescence qui conditionnent le rythme d'acquisition des images.

Sur la voie d'excitation monopoint, les déclin de fluorescence sont obtenus par la méthode de comptage de photon unique corrélé en temps (TCSPC pour « time correlated single photon counting »), méthode la plus performante en terme de sensibilité et résolution temporelle (quelques picosecondes) [10]. L'étude de la fluorescence des inhibiteurs du VIH mettra en évidence la nécessité de disposer d'une telle résolution temporelle. Cependant, cette précision est atteinte au détriment de la rapidité d'acquisition qui est typiquement ~ 30 s par point (pour des mesures de FLIM), un temps trop long pour l'étude de certains systèmes biologiques. Dans le cas de l'excitation multipoints, l'acquisition des images des déclin est réalisée par échantillonnage temporel du déclin [11]. Cette méthode repose sur l'utilisation d'une caméra CCD très sensible, devant laquelle est placée une porte temporelle qui donne accès à l'obtention d'images d'intensité et de durée de vie de fluorescence se rapprochant de la cadence vidéo (30 images/seconde). La résolution de la méthode est alors limitée par la largeur des portes temporelles utilisées lors de l'acquisition des déclin de fluorescence (20 ps pour notre système). Ce système sera particulièrement bien adapté pour le balayage rapide de milieux biologiques photosensibles ou encore pour l'examen rapide de lames cytologiques comme décrit ci-après.

Imagerie de la dynamique d'émission de fluorescence (FLIM) pour l'étude du ciblage cellulaire d'inhibiteurs du VIH-1

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), décrit pour la première fois au début des années 80, est dû à l'infection par un virus appelé virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le développement de la pandémie de SIDA et l'apparition de résistances aux médicaments utilisés à l'heure actuelle justifient la recherche active autour du développement de nouveaux inhibiteurs de la réplication du virus. L'article de J.-F. Mouscadet (Laboratoire de l'ENS Cachan) dans ce même numéro fait état des récents développements de la pharmacologie anti-VIH.

L'intégrase est, avec la transcriptase inverse et la protéase, la troisième enzyme virale dont dépend la réplication du VIH. Elle catalyse l'insertion covalente ou intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules infectées. Mais contrairement à la transcriptase inverse et à la protéase pour lesquelles plusieurs classes d'inhibiteurs ont été développées, aucun inhibiteur d'intégrase n'est actuellement utilisé en traitement clinique. Les progrès récents de la biologie structurale de l'enzyme ont néanmoins permis d'identifier plusieurs séries d'inhibiteurs de son activité. Parmi ceux-ci, les

2 styrylquinolines substituées [12], synthétisées par l'équipe du Pr Jean d'Angelo (Laboratoire de chimie organique du Centre d'études pharmaceutiques du site de Châtenay-Malabry, Université Paris Sud), dont le composé le plus prometteur, objet de notre étude, est représenté sur la *figure 2*. Cependant, ces molécules présentent une activité inhibitrice insuffisante *in vitro* et *in vivo* ; la recherche active dans ce domaine a pour objectif d'améliorer leur index thérapeutique. A dessein, il était nécessaire d'identifier le ciblage cellulaire de ce type d'inhibiteurs et de déterminer leur profil d'action. Par ailleurs, l'amélioration de leur efficacité thérapeutique nécessite de découpler activité spécifique et non spécifique et donc d'identifier les déterminants moléculaires de la non-spécificité de ces antiviraux potentiels. C'est l'objectif de notre recherche développée en étroite collaboration avec l'équipe de J.-F. Mouscadet.

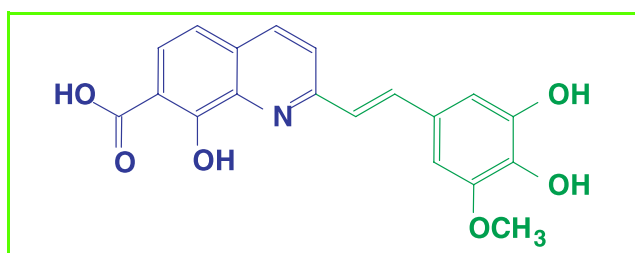


Figure 2 - Structure moléculaire de l'inhibiteur d'intégrase de type 2-styrylquinoline substituée utilisé dans le cadre de ce travail.

Il se compose d'une partie quinoline possédant une fonction salicylique et d'une partie styryle substituée par deux fonctions alcool en position ortho (également appelée catéchol) et une fonction méthoxy.

Pour mener à bien cette étude, nous avons étudié dans un premier temps les propriétés (photo)physico-chimiques de ces composés de type *trans*-2 styrylquinoline en solution. En effet, ces molécules sont susceptibles d'adopter différentes géométries (appelées formes tautomères ou rotamères) en raison d'une possible rotation des parties styryle et quinoline autour de la simple liaison les reliant entre elles (*figure 2*). Les propriétés physico-chimiques des *trans*-2 styrylquinolines correspondent aux contributions de chacune de ces différentes conformations. Il était ainsi fondamental de connaître la structure moléculaire prédominante de notre anti-intégrase dans différentes conditions d'environnement, en particulier en milieu cellulaire. Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'inhibiteur sont représentés sur la *figure 3*. Leur évolution dans diverses conditions d'environnement (pH, force ionique, polarité du solvant) ainsi que l'analyse dynamique de l'émission de fluorescence de la molécule ont permis de montrer qu'au pH physiologique, il existait effectivement un équilibre entre deux types de rotamères présentant chacun une signature spectroscopique spécifique [13]. Ce résultat est illustré sur la *figure 3* où l'on observe que le déclin d'émission de

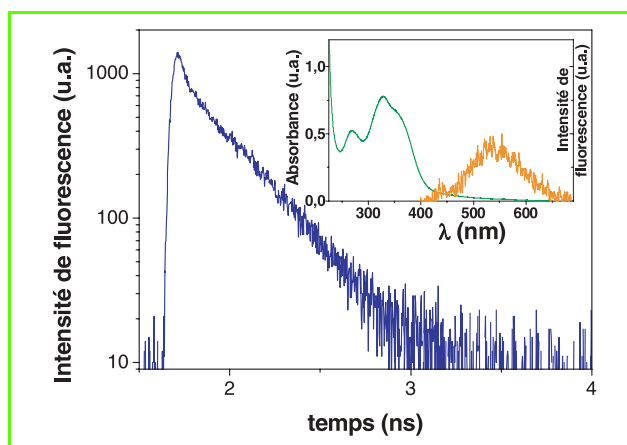


Figure 3 - Cinétique de déclin de l'émission de fluorescence de l'anti-intégrase en solution (40 µM) après excitation à 760 nm.

Dans l'encadré, spectres d'absorption (vert) et d'émission de fluorescence (orange) de la molécule en solution aqueuse.

fluorescence de l'anti-intégrase n'est pas une simple exponentielle. On mesure deux durées de vie de 45 ps et 350 ps (1 ps = 10^{-12} s) correspondant chacune à un type de rotamère (*tableau 1*).

Sur la base de ces données, nous avons localisé et analysé l'émission de fluorescence de l'inhibiteur au sein de cellules HeLa. Sur les images d'intensité de fluorescence de la *figure 4*, on observe clairement que celle-ci est émise principalement au niveau du cytoplasme de la cellule (dans ces conditions d'analyse, le signal d'autofluorescence cellulaire est négligeable par rapport à celui de l'anti-intégrase). Ces variations de rendement de fluorescence en fonction de la localisation intracellulaire peuvent provenir (i) soit de différentes concentrations locales du médicament, la membrane nucléaire jouant alors le rôle de barrière à la pénétration, (ii) soit de modifications de l'environnement immédiat de l'inhibiteur. En effet, comme il est précisé dans l'*encadré 2*, la sensibilité aux conditions du milieu de la molécule (pH, viscosité, complexation...) peut entraîner une augmentation ou une extinction de sa fluorescence, ce que ne permettent pas d'identifier les mesures d'imagerie d'intensité de fluorescence. Il était donc nécessaire de compléter ces mesures d'intensité de fluorescence par des mesures de FLIM. L'analyse de ces images a permis d'estimer une durée de vie de fluorescence moyenne τ_m comprise entre 0,76 et 0,88 ns (1 ns = 10^{-9} s) identique en tout point sondé de la cellule (*figure 4*). Ce résultat permet d'affirmer que les variations d'intensité de fluorescence observées sur l'image de la *figure 4* résultent bien de différents gradients de concentrations locales de l'inhibiteur au sein de la cellule.

L'analyse de la distribution des durées de vie obtenue en milieu cellulaire par comparaison à celle obtenue en solution

Tableau 1 - Durées de vie de fluorescence τ_i de l'anti-intégrase en solution et dans des cellules HeLa déterminées à partir d'une méthode globale d'analyse (*encadré 2*).

a_i représente le poids de chacune des composantes à la fluorescence totale. τ_{m1} correspond à la durée de vie moyenne de fluorescence déterminée à partir des différentes valeurs de τ_i et τ_{m2} , celle obtenue par la méthode MLE (*encadré 2*).

| | | τ_1 (ps) | a_1 (%) | τ_2 (ps) | a_2 (%) | τ_3 (ns) | a_3 (%) | τ_{m1} (ns) | τ_{m2} (ns) |
|-------------------|------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|------------------|------------------|
| solution | | 45 | 70 | 350 | 30 | | | 0,280 | |
| milieu cellulaire | noyau | 63 | 60 | 440 | 32 | 1,98 | 8 | 1,12 | 0,80 |
| | cytoplasme | 63 | 61 | 448 | 32 | 2,00 | 7 | 1,08 | 0,85 |

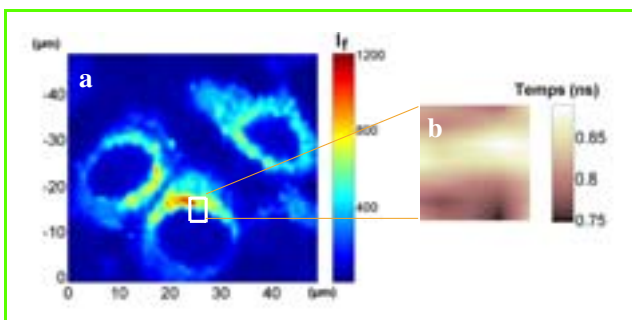


Figure 4 - (a) Image de l'intensité de fluorescence (I_f : nombre de photons pour une porte temporelle de 10 ms) (en fausses couleurs) sous excitation biphotonique ($\lambda_{exc} = 760$ nm) de l'inhibiteur de l'intégrase du VIH (ajouté dans une cellule HeLa non infectée à la concentration de 40 μM) obtenue avec une puissance moyenne de quelques mW/cm^2 : image de $50 \times 50 \mu\text{m}$, déplacement du balayage laser par pas de $1 \mu\text{m}$. (b) Image de durée de vie moyenne (méthode MLE, encadré 2) de l'inhibiteur en milieu cellulaire résultant de l'acquisition des déclins de fluorescence sur la surface matérialisée par un encadré blanc sur la figure (a) : $5 \times 5 \mu\text{m}$ par pas de $1 \mu\text{m}$ (25 points).

est répertoriée dans le *tableau I*. On constate que l'on retrouve *in vivo* les deux durées de vie de fluorescence caractéristiques des deux types de rotamères de l'inhibiteur révélant que chacune des formes pénètre dans la cellule jusqu'au sein du noyau. L'augmentation sensible des durées de vie en milieu cellulaire, par rapport à celles mesurées en solution, est une observation courante lorsque les processus de désactivation non radiatifs de dissipation de l'énergie avec le solvant sont limités comme c'est le cas. Par ailleurs, on mesure une nouvelle composante de durée de vie nanoseconde, non observée en solution. Cette composante reflète une interaction non spécifique de l'un des deux rotamères avec les composants cellulaires, celui de plus courte durée de vie pour lequel le facteur a_1 diminue en milieu cellulaire (*tableau I*). Ce résultat est particulièrement

important d'un point de vue pharmacologique puisqu'il suggère que la synthèse d'une 2-styrylquinoline substituée bloquée dans une forme rotamérique augmenterait la spécificité de l'inhibiteur en milieu cellulaire.

Cette localisation intracellulaire de l'inhibiteur ne laisse rien présager de son site d'action dans des cellules infectées. Rappelons que ces molécules interagissent avec l'enzyme virale intégrase dont l'action se manifeste au niveau du cytoplasme cellulaire par la formation d'un complexe de pré-intégration avec l'ADN viral, puis au niveau du noyau en catalysant l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN génomique. Nous avons ainsi cherché à identifier le site d'action du médicament dans des cellules infectées. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules HeLa infectées par le biais d'un vecteur lentiviral dérivé du VIH-1. Ce vecteur code pour la GFP (« green fluorescent protein ») dont l'expression dépend de l'intégration de l'ADN viral. L'émission de fluorescence de la GFP sert de signature spectroscopique du bon déroulement des étapes précoces de la réplication du VIH (pénétration, transcription inverse, intégration). Ainsi, la mesure d'intensité et de durée de vie de fluorescence au cours du temps permet de visualiser l'infection d'une telle cellule. Au moment de l'infection, on ne détecte que l'autofluorescence cellulaire (émission provenant des fluorophores endogènes de la cellule), alors qu'au bout de 24 heures, l'émission de fluorescence de la GFP (durée de vie 2,5 ns) est mesurable dans toute la cellule.

La cinétique du cycle d'infection du virus du VIH est schématisée sur la *figure 5*. Nous avons incubé l'inhibiteur avec des cellules infectées à deux temps caractéristiques suivant l'infection (PI pour « post infection ») comme indiqué sur la *figure 5*, ce qui permet d'évaluer l'efficacité de l'inhibiteur en fonction de l'étape de réplication du virus. Les images d'intensité et de durées de vie de fluorescence démontrent sans ambiguïté que l'inhibiteur ajouté au temps $\text{PI} = 5$ h est efficace (détection de sa durée de vie de fluorescence), alors que dans le cas d'une injection au temps $\text{PI} = 10$ h, la détection de l'émission de fluorescence de la GFP révèle l'inefficacité du médicament.

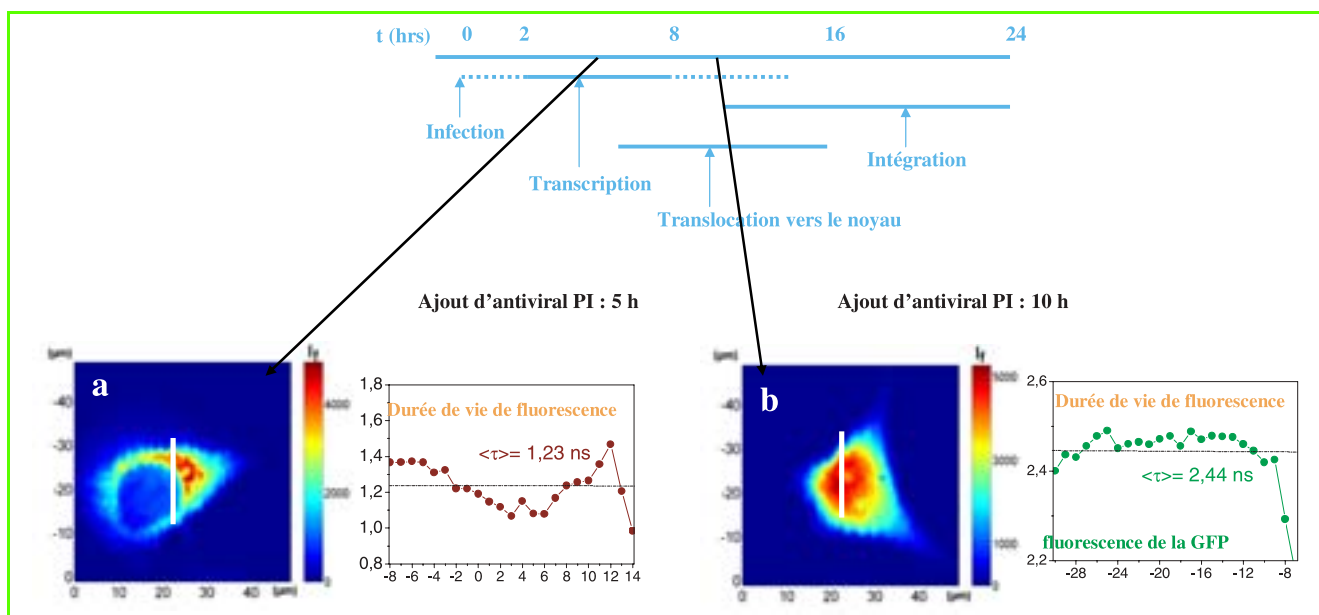


Figure 5 - Schéma cinétique du cycle d'infection du VIH.

L'inhibiteur a été ajouté à deux temps caractéristiques post-infection (PI). Les images d'intensité et de durées de vie de fluorescence (a) et (b) ont été obtenues au bout de 48 heures. Leurs conditions d'acquisition sont les mêmes que celles décrites *figure 4*. (a) Les images correspondent à celles de l'inhibiteur, mettant en évidence son efficacité. (b) Les images correspondent à celles de la GFP, montrant l'inefficacité de l'inhibiteur à cette étape du cycle d'infection du virus.

Ces données nous permettent de conclure que les inhibiteurs d'intégrase de type *trans*-2 styrylquinolines font partie des antiviraux qui agissent sur les premières étapes du cycle de réplication du VIH.

Application de la microscopie de fluorescence résolue en temps (FLIM) pour le diagnostic précoce de cancers de la vessie

Les cancers de la vessie, avec ~ 8 000 nouveaux cas par an, représentent la 8^e cause de mortalité par cancer (~ 3 000 décès par an).

De nombreux arguments cliniques, épidémiologiques et expérimentaux, suggèrent que les tumeurs urothéliales de la vessie sont inductibles par des carcinogènes endogènes et exogènes. Il s'agit en particulier du tabac et de carcinogènes industriels (colorants, amines aromatiques, benzène...). Le pronostic des patients atteints dépend principalement du degré d'invasion de la maladie : une atteinte locale et superficielle a aujourd'hui de bonnes chances de guérison alors qu'une maladie infiltrant le muscle ou avec atteinte métastatique présente un pronostic peu favorable. Le diagnostic précoce des tumeurs malignes est donc essentiel pour améliorer la probabilité de succès des thérapies, ce qui justifie les efforts réalisés pour favoriser le dépistage de ce type de cancers.

Le protocole de diagnostic initial vésical, puis la surveillance des malades pendant et après traitement, peuvent être réalisés par des moyens radiologiques (échographie de la vessie, urographie intraveineuse, scanner pelvien), mais aussi par des examens de pathologie cellulaire (cytoscopie, biopsie, cytologie urinaire). Plusieurs approches sont en effet nécessaires, en fonction de la nature des tumeurs vésicales. Par exemple, dans le cas de tumeurs superficielles, les lésions papillaires sont bien reconnues par la cytoscopie et classiquement par l'histologie, alors que les lésions muqueuses planes précancéreuses et cancéreuses posent un problème de détection précoce car elles sont difficilement observables par cytoscopie conventionnelle en lumière blanche. Dans ce cas, la cytologie urinaire est particulièrement importante.

L'objectif que nous poursuivons en collaboration avec les Dr Pascal Eschwège (Laboratoire de chirurgie expérimentale, Hôpital du Kremlin-Bicêtre) et Sophie Ferlicot (Service d'anatomie et de cytologie pathologiques, Hôpital du Kremlin-Bicêtre) est de parvenir à identifier sur des cytologies urinaires, les cellules de « bas grade » de malignité en utilisant l'autofluorescence dynamique intracellulaire comme facteur de contraste. Les retombées attendues seraient d'une part un nouvel outil pour le diagnostic non invasif et précoce en cancérologie, notamment comme un premier examen de dépistage pour des populations à risque (professionnel surtout), et d'autre part une augmentation significative du succès des thérapies.

La fluorescence endogène des milieux cellulaires est un indicateur naturel de leur activité métabolique ; les teneurs et les propriétés des fluorophores des cellules lésées ou pathologiques pouvant être différentes de celles des cellules saines, cela induit d'importantes variations de l'intensité de la fluorescence émise. Les fluorophores endogènes des cellules susceptibles d'être excités par effet biphotonique sont peu nombreux : ce sont des composés tels que le NAD(P)H, les flavines et riboflavines (flavines liées à des

protéines) oxydées et les porphyrines naturelles [14-15] absorbant dans le domaine spectral proche UV et visible (350-450 nm). Les caractéristiques de fluorescence de ces entités biologiques dépendent fortement de leur état d'oxydoréduction et par conséquent du métabolisme cellulaire [16-17].

Le domaine d'émission du NAD(P)H et des flavines (400-600 nm) est bien adapté au système de détection implanté sur IDEFIX. Nos premières mesures ont ainsi porté sur différentes lames cytologiques urinaires en sélectionnant la longueur d'onde d'excitation laser à 780 nm afin de couvrir l'excitation biphotonique de chacun de ces deux fluorophores endogènes. La *figure 6* montre les images en transmission de cellules saines et tumorales (on notera l'importante variation du rapport nucléocytoplasmique entre les deux types de cellules), ainsi que celles de l'intensité d'autofluorescence obtenues sous excitation à deux photons. On observe que les distributions d'intensité relatives à chaque type de cellule sont notablement différentes (*figure 6b* et *f*). La mise en place d'un filtre interférentiel à 550 nm permet de mettre en évidence une

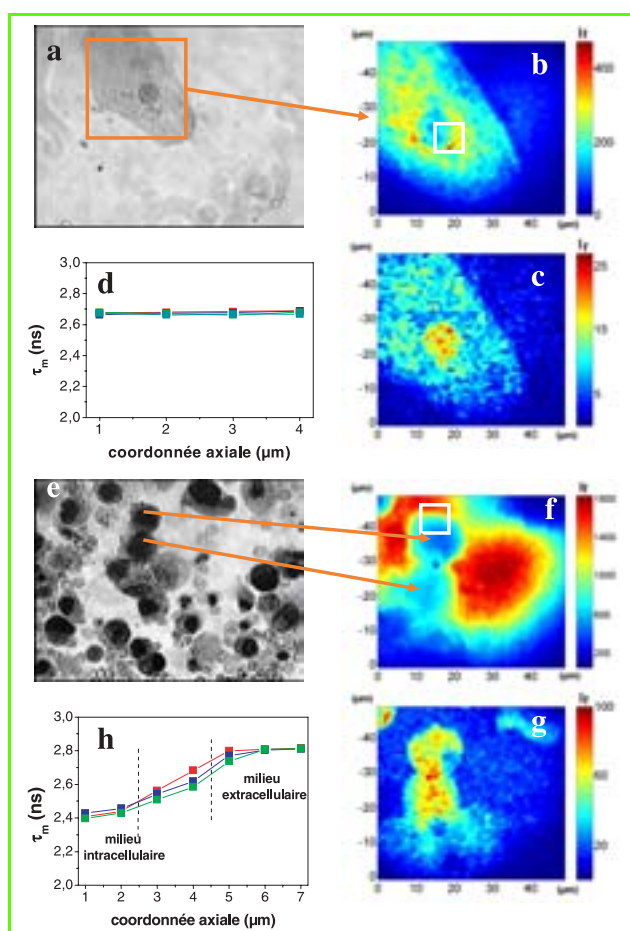


Figure 6 - Images en transmission (100 × 100 μm), sous illumination en lumière blanche, de cellules urinaires (a) saines et (e) tumorales. (b), (c), (f) et (g) : images d'intensité d'autofluorescence de ces mêmes cellules saines (b et c) et tumorales (f et g) sous excitation biphotonique à 780 nm et avec une puissance moyenne incidente de quelques mW/cm² : images de 50 × 50 μm par déplacement du faisceau laser par pas de 1 μm. (b) et (f) : images obtenues en plaçant un filtre interférentiel à 550 nm devant le détecteur de la fluorescence. (c) et (g) : images enregistrées en utilisant un filtre interférentiel à 450 nm. (d) et (h) : images de durées de vie moyennes de fluorescence d'une cellule saine et tumorale respectivement résultant de l'acquisition des déclins de fluorescence sur les surfaces matérialisées par un carré blanc sur (b) et (f).

forte émission de fluorescence des cellules saines, principalement au niveau du cytoplasme, alors qu'une quasi-extinction de la fluorescence des cellules tumorales est observée. Si l'on considère que le domaine spectral sélectionné avec ce filtre correspond à celui des flavines et/ou des flavoprotéines, nous pouvons en conclure que ces protéines, dans les cellules tumorales, sont en faible concentration et/ou ont perdu leurs propriétés natives. Une autre observation d'importance que l'on peut faire à partir des figures 6b et f est l'absence de détection de fluorescence extracellulaire pour les cytologies saines. En revanche, une forte émission centrée à 550 nm est observée dans le cas des cytologies malignes. Cette discrimination, encore inexplicée, mérite sans doute d'être exploitée en tant que paramètre de diagnostic de malignité.

En présence d'une sélection spectrale dans le domaine d'émission de fluorescence du NAD(P)H (420-470 nm), l'intensité d'auto fluorescence est plus élevée au niveau du noyau que du cytoplasme des cellules saines ou tumorales (figure 6c et g). On observe par ailleurs que l'émission dans ce domaine spectral est 10 à 20 fois plus faible qu'autour de 550 nm (figure 6b et f). Le renseignement essentiel que l'on obtient à partir de ces mesures est qu'il n'existe pas de différence de l'émission de fluorescence du NAD(P)H entre cellules saines et tumorales et que celle-ci est faible comparée à celle des flavoprotéines.

Ces mesures d'imagerie d'intensité de fluorescence ont été complétées par des données FLIM (figures 6d et h). Dans le cas des cellules saines, la durée de vie de fluorescence moyenne est identique en tout point de la cellule (figures 6a) et est compatible avec celle des flavines (2,5-2,8 ns) [15]. Cette observation confirme celle de la figure 6b, à savoir que l'auto fluorescence des cellules saines provient essentiellement de ce type de protéines.

Dans le cas des cellules malignes, la durée de vie de fluorescence moyenne (2,4 ns) est significativement plus faible que celle obtenue pour les cellules saines (2,7 ns). On peut raisonnablement conclure de ce résultat qu'au sein de cellules cancéreuses, à la fois les flavoprotéines et le NAD(P)H (durée de vie de fluorescence mesurée *in vitro* ~ 1-1,5 ns [18]) contribuent au signal d'auto fluorescence cellulaire.

L'imagerie d'intensité et de durées de vie d'auto fluorescence se révèle donc être une méthode efficace pour suivre la fluorescence endogène de cellules urinaires et permettre une discrimination des zones saines et tumorales au sein d'une lame de cytologie. Dans chaque type de cellule, la différenciation peut se faire par la mesure de la concentration locale de NAD(P)H et des flavines/flavoprotéines (imagerie d'intensité) et par l'analyse des propriétés physico-chimiques de chaque type de protéines (mesures FLIM). Nous pensons avoir démontré par cette étude que les mesures de FLIM appliquées à la détection de cellules tumorales de « bas grade » de malignité méritaient d'être poursuivies en tant qu'outil de diagnostic. Sur le plan expérimental, nous comptons approfondir ce type d'études au moyen du système d'excitation multipoints précédemment décrit qui nous permettra une détermination extrêmement rapide (cadence vidéo) des durées de vie de fluorescence.

Conclusion

Les travaux de recherche décrits ici ont permis de montrer que la microscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps est un outil performant pour l'étude des

assemblages biologiques aussi bien isolés que *in situ*. L'utilisation conjointe des différents systèmes de détection accessibles avec cette technique permet de couvrir un large domaine d'études, s'étendant de l'analyse topologique et structurale d'entités cellulaires et tissulaires en liaison avec leur réactivité à la caractérisation des interactions moléculaires et leur dynamique.

L'instrumentation IDEFIX développée pour ces études utilise le principe de l'optique non linéaire de l'excitation à deux photons au moyen d'un laser femtoseconde qui, outre ses avantages uniques en terme de confinement spatial (encadré 1), a aussi démontré ses performances pour exciter un grand nombre de fluorophores endogènes ou exogènes et étudier leur dynamique à partir de quelques picosecondes. Nous avons aussi montré que ces travaux ouvraient la voie à la mise au point de nouveaux systèmes d'imagerie (système MIM) spécifiquement adaptés aux systèmes biologiques à étudier.

L'une des avancées attendues de ces développements et applications en imagerie est de permettre leur intégration au sein d'un plateau technique permettant un transfert de savoir-faire à une large communauté de biologistes et de médecins. Le Centre de photonique biomédicale du Centre Laser du projet POLA de l'Université Paris Sud a cette vocation qui permettra sans nul doute, dans les années à venir, de faire des avancées significatives dans le domaine des sciences biomédicales.

Mais l'utilisation de la microscopie biphotonique et plus généralement de l'optique non linéaire sollicite également le savoir-faire des chimistes. En effet, de nombreuses études démontrent la nécessité de mettre au point de nouvelles sondes photo-activables (marqueurs, nanocristaux, nanoparticules...) devant répondre à la fois à des critères d'intensification du signal détecté et de non-toxicité pour les applications biomédicales. Ces développements constituent aujourd'hui encore un axe de recherche novateur en biophotonique.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement les Dr Elvire Guiot (Institut d'Optique, Université Paris XI Orsay), Mironel Enescu (chercheur associé au CNRS) et Pascal Pernot (Université Paris Sud) qui ont activement participé à ce travail. Ils remercient également le CNRS, l'Université Paris Sud Orsay, la Région Ile-de-France Sud, la Fondation pour la Recherche Médicale et le Conseil Général de l'Essonne (CPER POLA) pour avoir permis le financement de l'instrumentation IDEFIX.

Références

- [1] Dubois A., Vabre L., Boccara A.C., Beaufort E., *Applied Optics*, **2002**, 41, p. 805.
- [2] Lévêque-Fort S., Selb S., Pottier L., Boccara A.C., *Optics Communications*, **2001**, 196, p. 127.
- [3] Morjani H., Aouali N., Belhoussine R., Veldman R.J., Levade T., Manfait M., *International Journal of Cancer*, **2001**, 94, p. 157.
- [4] Sandt C., Sockalingum G.D., Aubert D., Lèpan H., Lepouse C., Jaussaud M., Leon A., Pinon J.M., Manfait M., *Journal of Clinical Microbiology*, **2003**, 41, p. 954.
- [5] Moreaux L., Sandre O., Blanchard-Desce M., Mertz J., *Opt. Lett.*, **2000**, 25, p. 320.
- [6] Denk W., Piston D.W., Webb W.W., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, **1995**, 28, p. 445.
- [7] Guiot E., thèse n° 2001PA112307, **2001**.
- [8] Guiot E., Georges P., Brun A., Fontaine-Aupart M.-P., Bellon-Fontaine M.-N., Briandet R., *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 75, p. 570.

- [9] Lévêque-Fort S., Penon J., Fontaine-Aupart M.-P., Roger G., Georges P., *Proceedings SPIE Confocal, Multiphoton and Non linear Microscopic Imaging*, **2003**, sous presse.
- [10] O'Connor D.V., Philips D., *Time Correlated Single Photon Counting*, Academic Press, London, **1984**.
- [11] Draajer A., Sanders R., Gerritsen H.C., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, **1995**, 31, p. 491.
- [12] Zouhiri F., Mouscadet J.-F., Mekouar K., Desmaële D., Savouré D., Leh H., Subra F., Le Bret M., Auclair C., d'Angelo J., *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, p. 1533.
- [13] Burdujan R., d'Angelo J., Desmaële D., Brochon J.-C., Tauc P., Auclair C., Mouscadet J.-F., Tfibel F., Enescu E., Fontaine-Aupart M.-P., *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2001**, 3, p. 3797.
- [14] Gordon Scott T., Speencer R.D., Leonard N.J., Weber G., *J.A.C.S.*, **1970**, 92, p. 687.
- [15] Visser A.J., *Photochem. Photobiol.*, **1984**, 40, p. 703.
- [16] Mottin S., thèse n° 1993INPG4206, **1993**.
- [17] Etori D., thèse n° 1996PA132005, **1996**.
- [18] Couprie M.E., Mérola F., Tauc P., Garzella D., Delhoué A., Hara T., Billardon M., *Rev. Sci. Instrum.*, **1994**, 65, p. 1485.
- [19] Maus M., Cotlet M., Hofkens J., Gensch T., De Schryver F.C., *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, p. 2078.
- [20] Eaton D.F., *Pure & Applied Chemistry*, **1990**, 62, p. 1631.
- [21] Blandin P., Mérola F., Brochon J.-C., Trémeau O., Ménez A., *Biochemistry*, **1994**, 33, p. 14643.



S. Lévêque-Fort



K. Steenkeste



P. Lacroix



F. Tfibel

Sandrine Lévêque-Fort¹ est chargée de recherche CNRS, **Karine Steenkeste**² est post-doctorante (financée par l'ARC), **Pascaline Lacroix**³ est doctorante, **Francis Tfibel**⁴ est maître de conférences et **Marie-Pierre Fontaine-Aupart**⁵ est directeur de recherche CNRS au Laboratoire de photophysique moléculaire d'Orsay*.



M.-P. Fontaine-Aupart

* UPR 3361 du CNRS, Université Paris Sud Orsay, 91405 Orsay Cedex.

Tél. : 01 69 15 73 64. Fax : 01 69 15 67 77.

Courriels :

¹ sandrine.fort@ppm.u-psud.fr

² karine.steenkeste@ppm.u-psud.fr

³ pascaline.lacroix@ppm.u-psud.fr

⁴ francis.tfibel@ppm.u-psud.fr

⁵ marie-pierre.fontaine-aupart@ppm.u-psud.fr

La verrerie hermétiquement étanche sans graisse et ultra propre

Bagues d'étanchéité PTFE Glindemann®

Informations techniques : www.glindemann.net, dglinde@aol.com.

Une alternative économique et étonnamment efficace aux manchons et bouchons en PTFE pour joints coniques en verre. Les fuites sont extraordinairement faibles : Taux de fuite d'air < 10⁻⁸...10⁻⁶ mBar * Litre / sec. Taux de fuite de solvant < 0.1...0.03 mg/jour. Température -200...+300 °C. Utiles pour le stockage hermétique de produits chimiques et d'échantillons dans des pots en verre ou bien des appareils. Adaptent aux pinces en plastique pour joints. La verrerie chimique pharmaceutique et organo-métallique et l'échantillonnage de chimie environnementale sont quelques-unes des nombreuses applications.



50 bagues en PTFE sur un tube pour un joint de 29 mm.
L'anneau ne se déforme pas et est réutilisable.
Prix : environ 25 Euros par paquet de 50 bagues PTFE.

Distributeurs et numéros de catalogue : (Aldrich, Carl Roth (Roth-Sochiel), Fisher Scientific, Quadrolab (Sodipro), VWR)
www.glindemann.net
GLINDEMANN cherche un distributeur français en France.



Les polymères de synthèse, supports du diagnostic médical

Thierry Delair, Abdelhamid Elaissari, Agnès Perrin et Bernard Mandrand

Abstract

Polymers as medical diagnostic supports

Medical diagnostic tests are designed to detect the presence or to quantify the concentration of biological molecules in various samples. Polymers are mainly used as supports to help the extraction of the analyte for further quantification or as tools to amplify the detection signal. The need for more sensitive, robust, reliable, quicker and cheaper tests has led diagnostics to evolve towards integrated systems allowing multiparametric analyses. In these structures, polymers may not only serve as supports as they may have other specific functions such as information provider, gates... Finally these polymers, often obtained via polymerization processes, will be in presence of biomolecules and thus, their interactions need to be understood and controlled.

Mots-clés

Diagnostic, polymères, biomolécules, biopuces, multiparamétrage.

Key-words

Diagnostics, polymers, biomolecules, biochips, multidetection.

Le diagnostic : objectifs, enjeux et évolutions

Si les tests d'analyse biologique existent depuis des temps très anciens, depuis Louis Pasteur pour la microbiologie par exemple, les outils diagnostiques intégrés à une instrumentation spécialisée sont, par contre, très récents.

L'industrie des réactifs et instruments à usage diagnostique *in vitro* pour les tests standardisés sur des prélèvements biologiques est une activité répertoriée depuis 1960. Les premiers tests industrialisés ont concerné la chimie clinique, puis les immuno-essais, suivis par les tests fonctionnels d'hémostase, les milieux de culture bactériens et viraux. Les premières trousse de biologie moléculaire utilisables en routine clinique sont apparues vers 1990 pour les virus et la génétique.

Aujourd'hui, le diagnostic *in vitro* s'étend, avec les mêmes méthodes et souvent des cibles identiques, au suivi pronostic des traitements (théragnostic), au contrôle des fabrications agroalimentaires... L'analyse biologique au service de la santé humaine est devenue incontournable, sa pratique a pris des formes nouvelles. En effet, dans la période initiale de création et de diffusion des protocoles standardisés, les analyses étaient réalisées dans des laboratoires privés ou hospitaliers de quelques dizaines d'employés biologistes ou laborantins. Les laboratoires de taille moyenne, s'ils existent encore, font de plus en plus place, soit à de très grandes chaînes de laboratoires centralisés, très automatisées, soit, à l'inverse, à des pratiques de tests proches du patient utilisant des outils intégrés, d'emploi très simple, généralement qualifiés de « tests rapides ». Ces deux extrêmes de l'analyse biologique se développent à une cadence élevée. Le seul domaine des tests rapides connaît une progression mondiale de l'ordre de 15 % par an.

Les tests diagnostiques utilisent des molécules de très grande spécificité : substrats d'enzymes, anticorps, antigènes, oligonucléotides, qui leur confèrent une extrême sélectivité. Dans le domaine de la recherche des germes

infectieux, par exemple, on sait aujourd'hui détecter quelques molécules d'ADN appartenant à un agent pathogène parmi plusieurs milliards de molécules de même taille et de même composition chimique, mais possédant une séquence différente. Un anticorps reconnaît la conformation spécifique d'un antigène avec une très forte sélectivité, la limite de sensibilité étant de l'ordre de 10^5 molécules dans un échantillon qui peut en contenir 10^{16} , dont certaines sont de structures proches. Cette limite de sensibilité tient actuellement presque exclusivement au compromis à trouver entre le volume de prélèvement et celui de l'analyse.

L'usage des polymères s'est répandu depuis le début de cette industrie. Les véhicules de tests (tubes, objets consommables) sont réalisés en polystyrène pur ou en mélange. Seuls les tubes de prélèvement restent encore pour certains en verre, mais beaucoup de travaux sont

Glossaire

Analyte

Molécule ou macromolécule dont on souhaite effectuer le dosage. Dans le diagnostic médical, ce peut être des hormones, des antigènes, des anticorps, des ADN ou ARN...

Hémostase

Ensemble des processus qui permet l'arrêt du saignement après une blessure ou une hémorragie.

Liquide céphalorachidien

Liquide physiologique qui baigne les cellules nerveuses de la moelle épinière et du cerveau. Il est filtré à partir du sang par la barrière hémato-méningée.

PCR

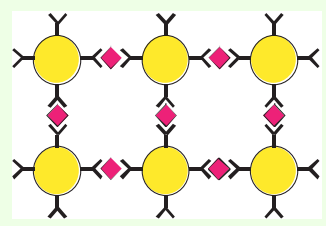
« Polymerase chain reaction », méthode biochimique permettant la réplication à l'identique d'acide désoxyribonucléique. Cette méthode d'amplification se déroule par alternance de phases de chauffage (pour dissocier les doubles brins), d'hybridation d'amorces (pour délimiter la région à amplifier) et de polymérisation enzymatique (pour copier la séquence sélectionnée). Chaque cycle permet une amplification d'un facteur 2, soit pour n cycles, 2^n .

Encadré 1

Les tests d'agglutination

Les premiers test latex reposaient sur la formation de réseaux de particules décelables à l'œil nu par formation de complexes immunologiques entre les anticorps portés par des particules de latex et l'antigène présent dans l'échantillon. Ces tests sont très simples à effectuer, il suffit de mélanger une goutte d'échantillon à analyser à une goutte de dispersion de latex et d'agiter doucement deux ou trois minutes. La formation d'agrégats traduit un échantillon positif.

Dans le schéma, les anticorps sont représentés par des Y, les antigènes par des losanges et les particules comme des sphères pleines.



réalisés pour leur substituer des matériaux plastiques, plus sûrs. La prévention des risques pour le personnel effectuant les prélèvements est plus facilement assurée de ce fait.

Les bactéries sont cultivées en boîtes plastiques et les tests biochimiques conduits dans des cuvettes transparentes également en polymères injectés.

Les polymères de synthèse, qui sont ainsi le contenant universel des tests diagnostiques, sont aussi dans une large part des éléments actifs qui concourent non seulement à la praticabilité de l'analyse, mais aussi à sa qualité. Les tests d'agglutination (voir encadré 1) permettent la quantification d'antigènes jusqu'à des limites de concentration de l'ordre de 1 µg/mL, le réactif étant commercialisé sous forme liquide. Pour des concentrations plus faibles, les méthodes d'immuno-essais de type ELISA (« enzyme linked immunosorbent assay ») (voir encadré 2) utilisent soit des particules, soit la surface d'un tube ou d'un cône de polystyrène, les biomolécules étant adsorbées puis séchées en surface du support. Un développement récent de ce format est la possibilité de réaliser des multitests en fonctionnalisant par secteur (via le dépôt de gouttes de quelques nL) la surface du fond d'une plaque de microtitration. Le test se réalise selon les méthodes décrites dans l'encadré 2, la quantification étant obtenue par l'usage d'un substrat précipitant de l'enzyme qui se dépose sur la zone de réaction (tests OLISA, Apibio).

Les procédés en cours de développement doivent intégrer plusieurs types de polymères différents dans le même objet. Les réactifs sont contenus dans des réservoirs qui sont mis en contact avec la zone réactionnelle par des canaux de quelques centaines de µm. La libération de ces produits s'opère grâce à des microvannes en polymère souple obéissant à des activateurs externes ou intégrés. Une simple couche de polymère en brosse passant alternativement d'un état hydrophile à un état hydrophobe peut constituer une barrière très efficace pour gérer des ajouts successifs de réactifs.

Des polymères linéaires peuvent être utilisés pour orienter des molécules et accroître leur réactivité à la surface d'un polymère support.

Par ailleurs, les méthodes d'analyses directes, sans marqueur, utilisent le changement d'état des polymères pour effectuer des mesures d'interactions moléculaires

(polypyrrole et voltampérométrie par exemple). Ainsi, l'usage des polymères reste omniprésent dans le développement des outils du diagnostic moderne.

Dans la suite de cet article, nous passerons en revue les principales mises en œuvre de polymères utilisés en diagnostic *in vitro*.

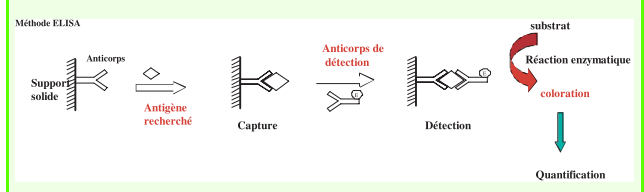
Interactions biomolécules-polymères

Les milieux dans lesquels s'effectuent la détection et la quantification des molécules à doser sont souvent complexes, chargés en sels, en protéines, en lipides, en polysaccharides, qu'il s'agisse du sérum (sang total moins ses composants cellulaires), des urines, du liquide céphalo-rachidien, etc. La stratégie suivie pour réaliser une quantification sensible et rapide consiste à extraire de façon spécifique l'analyte de l'échantillon et à procéder, dans une seconde étape, à la quantification proprement dite. Cette approche constitue la base de la technique ELISA couramment utilisée en diagnostic et dans laquelle la

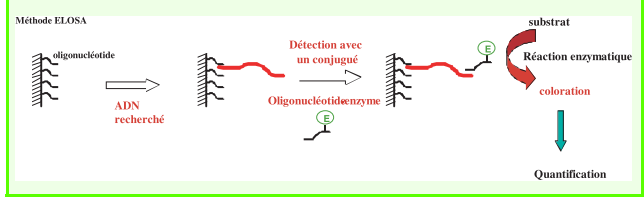
Encadré 2

La méthode ELISA-ELOSA

Les tests ELISA (« enzyme linked immunosorbent assay ») se déroulent en deux étapes, la capture et la détection. Dans la première, un anticorps spécifique de la substance à doser a été immobilisé à la surface d'un support solide (tube à essais, particules de latex...). Si l'analyte est présent dans l'échantillon à doser, ce dernier va se fixer spécifiquement sur l'anticorps à l'exclusion de tout autre contaminant. Ainsi, en fin d'étape de capture, la substance à doser a été extraite de l'échantillon et immobilisée sur le support solide, par l'intermédiaire de l'anticorps. La seconde étape consiste en la détection et la quantification de l'analyte contenu dans l'échantillon. Pour ce faire, un second anticorps portant une enzyme ira reconnaître un autre site de l'analyte immobilisé sur la phase solide pour constituer un sandwich anticorps de capture/analyte/anticorps de détection. Comme l'anticorps de détection est couplé à une enzyme, en ajoutant son substrat, on amorce la réaction enzymatique qui va provoquer une coloration du milieu par exemple. Ainsi, l'intensité de la couleur sera proportionnelle à la quantité d'enzyme fixée en fin d'étape de détection, donc à la quantité d'analyte immobilisé pendant l'étape de capture, et par conséquent sera indicateur de la concentration de cet analyte dans l'échantillon issu du patient.



Pour le diagnostic moléculaire, le principe reste identique sauf que ce sont des acides nucléiques qui sont utilisés. Des oligonucléotides de synthèse (souvent de petite taille) sont adsorbés sur la phase solide ou utilisés comme conjugués de détection après couplage avec une enzyme. La molécule cible est un ARN ou un ADN génomique monobrin. Les réactions impliquées sont les réactions d'hybridation entre brins complémentaires.

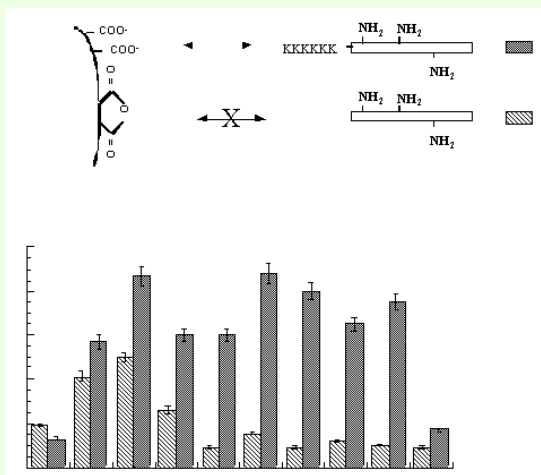


Encadré 3**Contrôle de la régio-sélectivité du couplage covalent**

Le greffage covalent d'une entité biologique permet d'obtenir des conjugués biomolécules/polymères stables utilisables en diagnostic. Toute modification chimique d'une molécule issue du vivant, et c'est tout particulièrement vrai pour les protéines, peut être considérée comme une altération de l'intégrité de cette dernière, ce qui peut se traduire par des pertes d'activité biologique. Pour éviter ce problème, il faut que les réactions chimiques impliquées dans le greffage aient lieu à des positions prédéfinies sur la protéine, c'est-à-dire dans des sites de la biomolécule qui ne soient pas impliqués dans les processus de reconnaissance macromoléculaire constitutifs de la spécificité des enzymes, des antigènes ou des anticorps. C'est le contrôle de la régio-sélectivité de la réaction qui peut se faire de deux façons :

- en utilisant des réactions chemiosélectives entre le support et une fonction particulière portée par la biomolécule (soit naturellement comme les thiols des régions charnières des anticorps, soit par mutation ponctuelle en apportant par des techniques de génie génétique un acide aminé fonctionnel à une position prédéfinie). Une telle réaction se trouve par exemple dans la spécificité de la chimie des thiols [22] ;

- en utilisant des interactions physico-chimiques qui vont préférentiellement mettre en contact un site sur la protéine et le polymère. Les techniques de génie biologique permettent d'ajouter en une position, C ou N terminale, d'une protéine une succession de six lysines, ou tag, dont les fonctions amine pendantes sont protonées. Si le polymère réactif est chargé négativement, l'étiquette polycationique interagira préférentiellement avec le polymère, favorisant donc la réaction de greffage avec l'étiquette et non sur le site actif [5, 23].



spécificité est apportée par un anticorps dirigé contre la substance à doser, fixé sur la phase solide.

Les modes de fixation des molécules biologiques sur les supports sont d'une part l'adsorption, faisant intervenir des interactions physiques, et d'autre part la fixation covalente qui repose sur la formation de liaisons chimiques entre les deux partenaires. Les propriétés interfaciales des supports utilisés seront donc déterminantes à la fois pour l'établissement des interactions, mais aussi pour les conséquences de ces interactions sur l'activité des molécules biologiques fixées sur les phases solides. Par exemple, la fixation de protéines sur des supports plastiques tels que microplaques, cônes, cuvettes... à base de polymères rigides préformés (polystyrène ou polypropylène essentiellement) aura lieu *via* des interactions hydrophobes. Ces dernières peuvent aussi induire des modifications conformationnelles des biomolécules, se traduisant par une

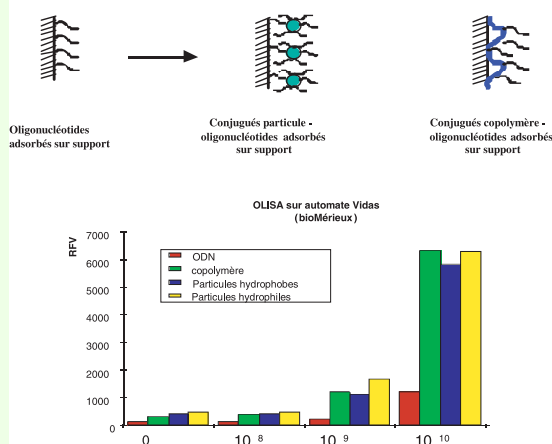
perte (partielle) de l'activité biologique [1]. De façon similaire, le greffage covalent sur un support d'une molécule à activité biologique peut être considéré comme une altération chimique et, afin de minimiser les pertes d'activité, il faut pouvoir contrôler la régio- ou la chemo-sélectivité des réactions (voir *encadré 3*). Les protéines sont plus sensibles à la dénaturation que les petites molécules (peptides, oligonucléotides). Inversement, l'accessibilité des petites molécules greffées sur une surface est un point critique à cause de l'encombrement stérique généré par la phase solide. Les polymères jouent un rôle important dans la levée de cette gêne stérique (voir *encadré 4*). A titre d'exemple, les acides nucléiques peuvent être orientés à l'aide d'une fonction amine terminale qui se greffe de façon covalente sur des fonctions anhydride maléique [2] ou saccharidique présentes sur des polymères linéaires [3-4]. Les protéines recombinantes modifiées par ajout d'une séquence de plusieurs lysines à leur extrémité C ou N terminale bénéficient également d'une orientation privilégiée [5]. Par ailleurs, un bon contrôle de la densité de greffage est nécessaire afin d'éviter un encombrement stérique lié à un excès de ligands défavorable à l'approche des analytes. Ces polymères sont souvent des gels à base d'acrylamide, d'agarose, de nitrocellulose ou des (co)polymères linéaires dont l'architecture peut être optimisée jusqu'à l'obtention de structures complexes.

Il est également possible de fonctionnaliser les surfaces inorganiques par dépôt d'un film métallique lui-même recouvert d'une couche de polymère biocompatible (polysaccharide ou autre). Cette technologie est adoptée avec succès par la société Biacore (Uppsala, Suède) pour son biocapteur optique basé sur le phénomène des ondes évanescentes [6].

Encadré 4**Polymères et sensibilité des tests**

Les tests ELOSA (« enzyme linked oligosorbent assay ») utilisent des oligonucléotides synthétiques de faible taille. Avec ces « petites » molécules, le problème de l'accessibilité est important et la gêne stérique engendrée par la phase solide limite la capacité de capture de la cible ADN, souvent de très grande taille. Pour résoudre ce problème, des conjugués copolymères/oligonucléotides ou particules/nucléotides sont adsorbés sur la phase solide originelle. En éloignant les oligonucléotides du support solide, les copolymères ou les particules permettent d'accroître la sensibilité du test, comme on peut le voir sur le graphe qui montre le signal de fluorescence obtenu en fonction du nombre de molécules d'ADN à détecter dans l'échantillon [24].

Accroissement de l'accessibilité des oligonucléotides par utilisation de polymères



Les supports colloïdaux dispersés

Outre les polymères rigides utilisés comme phase solide sous forme de cônes, cuvettes, plaques de microtitrations, les supports colloïdaux constituent une famille importante de matériaux pour le diagnostic. Cela est dû au fait que, pour un volume donné, les supports colloïdaux étant dispersés, il est possible de disposer d'une grande surface d'interaction. Celle-ci permet d'accroître la cinétique ou la sensibilité des tests. De plus, avec les divers procédés de polymérisation, émulsion, dispersion, précipitation, une grande variété de matériaux peut être obtenue : hydrophiles, hydrophobes, de diamètre et de fonctionnalité interfaciale contrôlés, ainsi que des matériaux composites par encapsulation de substances inorganiques [7].

Dans le diagnostic, comme nous l'avons déjà vu précédemment, les latex ont tout d'abord été utilisés en tant que support dans des tests immunologiques d'agglutination (voir encadré 1). Mais leur utilisation s'est élargie au diagnostic moléculaire, à la concentration et purification de molécules biologiques. C'est aussi un outil de détection des réactions de reconnaissance biologique.

Utilisation des latex comme support

Pour cet aspect, nous nous focaliserons sur les particules magnétiques dont le potentiel d'utilisation dans le domaine biomédical *in vitro* est considérable en raison de la possibilité de séparation rapide de ces matériaux lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique. La simplicité de mise en œuvre de la séparation magnétique permet d'envisager l'automatisation des systèmes d'analyse assurant à la fois un gain en sensibilité, en rapidité des tests et aussi la réduction des coûts.

La concentration de biomolécules revêt un intérêt particulier dans le domaine biomédical notamment dans le cas où une sensibilité élevée est requise. Cette étape de concentration est généralement réalisée après (ou pendant) une étape d'extraction spécifique ou non spécifique des biomolécules. La capture spécifique requiert que soient immobilisées en surface des particules des molécules capables d'interagir avec l'analyte à doser. En revanche, la capture non spécifique repose sur l'adsorption physique, généralement *via* des interactions électrostatiques, des molécules d'intérêt comme l'ADN ou des virus.

La concentration des acides nucléiques permet de répondre au besoin sans cesse accru de sensibilité des tests de biologie moléculaire. Considérant le caractère polyanionique des acides nucléiques, les latex cationiques, éventuellement magnétiques, sont particulièrement adaptés à l'extraction et à la purification des acides nucléiques [8]. Afin d'accroître la sensibilité de détection des acides nucléiques, ces derniers peuvent être amplifiés par voie enzymatique (PCR par exemple) après élution des particules, ou même en leur présence si le matériau n'inhibe pas les enzymes impliquées. La concentration de virus contenus dans un échantillon est une technologie qui permet de faciliter l'identification de ces derniers ou la remise en culture. Cette concentration, ou purification, est réalisée par une étape préalable de capture non spécifique des virus *via* des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogènes entre ces derniers et la surface des particules magnétiques. Les virus ainsi isolés peuvent être soit lysés, pour le relargage de leur matériel nucléique, soit utilisés tels quels dans des procédés de culture. Cette

méthode d'extraction générique, basée sur l'utilisation des latex magnétiques hydrophiles et fonctionnalisés, permet principalement de s'affranchir des étapes lourdes des techniques conventionnelles de purification de virus.

Utilisation des latex en détection

Le format des tests rapides de type bandelettes est basé sur la migration par capillarité des réactifs à partir de l'échantillon dans une membrane sur laquelle sont greffés en un lieu bien défini des anticorps spécifiques d'une substance à doser. Parmi ces réactifs, des particules de latex colorées (en rouge, bleu...) porteuses d'anticorps vont permettre de visualiser la réponse par l'apparition d'une bande colorée au site où les anticorps de capture ont été greffés sur la membrane.

Les latex peuvent être rendus fluorescents par diffusion à l'intérieur des particules, ou par greffage covalent en surface, de fluorophores [9]. Une nouvelle approche repose sur l'encapsulation de quantum dots (QD) qui sont des nanocristaux fluorescents d'atomes des groupes II-VI ou III-V des éléments du tableau périodique, par exemple CdSe, ZnSe, InAs. Il est possible de constituer des mélanges de familles de particules, chacune pouvant être identifiée par leur fréquence d'émission, ce qui permet d'envisager des possibilités de multiplexage pour la détection multiple [10]. Les particules magnétiques peuvent être utilisées pour mettre en évidence les réactions de reconnaissance macromoléculaire en mesurant des paramètres comme la perméabilité magnétique [11] ou la magnéto-résistance [12].

Évolutions du diagnostic : multidétection et systèmes intégrés multiparamétriques

Le diagnostic moléculaire, et de plus en plus le diagnostic immunologique, sont bouleversés depuis quelques années par l'avènement de systèmes d'analyses multiplexées connus sous le nom de puces à ADN et puces à protéine [13], ou micro-réseaux. De tels systèmes nécessitent l'immobilisation sur une phase solide plane de quelques dizaines à plusieurs milliers de ligands différents, susceptibles de réagir avec une ou plusieurs substances biologiques recherchées dans des échantillons d'origines diverses (produit d'amplification génomique, sérum,

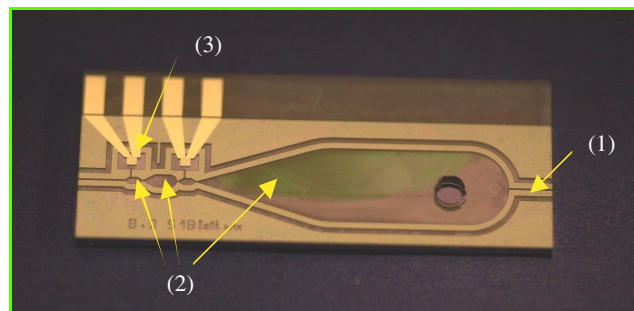


Photo d'un microcomposant gravé sur silicium comprenant un réseau capillaire (1) pour l'acheminement des fluides et différentes chambres réactionnelles (2) thermostatées (3).
Photo LETI-bioMérieux.

biomasse résultant de la culture cellulaire, produit alimentaire...). Les réponses qu'apportent ces puces sont extrêmement diversifiées, de l'analyse de la susceptibilité génétique d'un patient pour une maladie donnée, à la recherche de bactéries pathogènes dans l'eau de consommation, en passant par les tests d'allergie...

Les polymères représentent une alternative intéressante dans ce domaine en temps que phase de capture. Tous les types de supports plan décrits précédemment sont applicables aux systèmes multiplexés : surfaces plastiques, de verre ou de silice, gels ou polymères linéaires greffés. La totalité de la surface active de la puce peut être fonctionnalisée par un film continu de polymère avant d'y greffer localement les ligands. Les complexes présynthésés biomolécules/polymères peuvent également être déposés sous forme de spot sur le support. L'énorme potentiel que représentent les polymères pour l'immobilisation des biomolécules sur puces se révèle alors largement car il est possible d'adopter pour chaque ligand la solution de greffage optimale. Cette liberté est particulièrement intéressante pour toutes les applications en protéomique, car les protéines sont naturellement beaucoup plus variables structurellement et chimiquement que les acides nucléiques, ce qui induit de fortes variations quant à leur affinité pour un support donné. Par exemple, les anticorps supportent très bien une adsorption directe sur un support de type plaque de microtitration, alors que des antigènes de masse molaire inférieure seront avantageusement immobilisés par l'intermédiaire d'un polymère linéaire [14]. Les propriétés « intelligentes » de certains polymères, c'est-à-dire leur faculté à répondre à des stimuli externes comme le pH, la température, une insolation UV, sont également exploitables pour améliorer la spécificité et la sélectivité des puces multiplexées [15].

Les propriétés des polymères conducteurs sont remarquablement exploitées dans le domaine des puces à ADN [16]. Ces polymères peuvent être obtenus par électro-polymérisation amorcée localement par application d'un potentiel sur une électrode de surface de l'ordre de quelques centaines de μm^2 , à partir d'un mélange de monomères dont un faible pourcentage est modifié par un acide nucléique de séquence d'intérêt. Il est ainsi possible de réaliser de façon automatisée un réseau dont la complexité égale celle du nombre d'électrodes [17]. Ces mêmes polymères conducteurs peuvent également générer le signal réponse de la puce, la formation d'une double hélice modifiant les propriétés conductrices du polymère [18]. Alternativement, des polymères porteurs de groupement réactifs sont tout d'abord générés sur des électrodes avant d'être mis en réaction avec la molécule à immobiliser pour former des conjugués covalents polymères électroconducteurs/molécules d'intérêt biologique [19].

Conclusions et perspectives : des polymères intelligents dans des microlaboratoires sur puces jetables

Les propriétés des polymères se diversifient puisqu'ils sont capables de répondre à des stimuli physiques externes ou de véhiculer de l'information. De plus, on assiste à une intégration de plus en plus importante des divers procédés de la biologie, représentée par l'émergence de microréseaux au sein de dispositifs miniaturisés autonomes appelés

laboratoires sur puce [20]. Ces microlaboratoires seront capables de prendre en charge l'échantillon biologique issu du prélèvement, de le traiter afin de libérer les molécules recherchées, de multiplier si nécessaire la quantité de matériel biologique par amplification génomique, puis de capturer, reconnaître et quantifier les analytes sur une puce. De tels dispositifs nécessitent des efforts considérables pour le développement de canaux et chambres réactionnelles aux dimensions submillimétriques compatibles avec le matériel biologique (inertie chimique, contrôle de l'adsorption, absence de contamination...), avec les procédés et les réactions mis en jeu (résistance thermique, mécanique et chimique...), avec les contraintes liées à la fluidique dans ces dimensions où l'écoulement des fluides est généralement laminaire (absence d'angle vif, contrôle de la rugosité, bonne mouillabilité...), et enfin avec la lecture de la puce aujourd'hui généralement basée sur une mesure optique (transparence, absence de fluorescence parasite...). Historiquement, la plupart de ces dispositifs sont issus des technologies de la microélectronique et sont réalisés par photolithographie sur silicium. Leur handicap essentiel est un coût souvent incompatible avec une utilisation en routine par les laboratoires d'analyse. Ainsi émergent des microsystèmes conçus entièrement dans des matériaux polymères (polyméthylméthacrylate, polycarbonate, polydiméthylsiloxane) qui sont moulés, produits en grande quantité, et dont le prix de revient est largement moindre. De tels matériaux peuvent être modifiés localement de manière à créer à volonté des zones aux propriétés physico-chimiques variables, par exemple des régions fonctionnelles permettant l'adhésion des biomolécules, une alternance de zones hydrophiles/hydrophobes pour gérer l'acheminement des liquides, des vannes sous contrôle thermique par l'utilisation de polymères thermosensibles [21].

L'avenir des polymères dans le diagnostic biologique apparaît très riche, les applications se diversifient largement au fur et à mesure que les propriétés des polymères évoluent.

Remerciements

Nous remercions tout particulièrement les collaborateurs de l'UMR CNRS-bioMérieux dont les résultats ont été cités dans cet article, ainsi que le Dr F. Ginot de l'Unité Mixte LETI-bioMérieux pour la photographie du microcomposant.

Références

- [1] Andrade J.D., Principles of protein adsorption, *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, vol. 2 Protein Adsorption, J.D. Andrade, Plenum Press, Londres, 1985, pp. 1-80.
- [2] Ladavière C., Véron L., Domard A., Delair T., Pichot C., Mandrand B., *J. Appl. Polym. Sci.*, 1997, 65, p. 2567.
- [3] Delair T., Badey B., Domard A., Pichot C., Mandrand B., *Polym. Adv. Technol.*, 1997, 8, p. 545.
- [4] D'Agosto F., Charreyre M.T., Pichot C., Mandrand B., *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2002, 203, p. 146.
- [5] Allard L., Cheynet V., Oriol G., Veron L., Merlier F., Scremin G., Mandrand B., Delair T., Mallet F., *Bioconj. Chem.*, 2001, 12, p. 972.
- [6] Cooper M.A., *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1, p. 515.
- [7] Pichot C., Delair T., Elaissari A., Polymer colloids for biomedical and pharmaceutical applications, *Polymeric Dispersions: Principles and Applications*, J.M. Asua, Kluwer Press, Londres, 1997, p. 515.
- [8] Elaissari A., Holt L., Voisset C., Pichot C., Mandrand B., Mabilat C., *Journal of Biomaterials Science*, Polymer Edition, 1999, 10, p. 403.
- [9] Charreyre M.T., Yekta A., Winnik M.A., Delair T., Pichot C., *Langmuir*, 1995, 11, p. 2423.
- [10] Han M., Gao X., Su J.Z., Nie S., *Nature Biotechnology*, 2001, 18, p. 631.
- [11] Kriz K., Gerhke J., Kriz D., *Biosens. Bioelectron.*, 1998, 13, p. 817.
- [12] Baselt D.R., Lee G.U., Natesan M., Mtezger S.W., Sheehan P.E., Colton R.J., *Biosens. Bioelectron.*, 1998, 13, p. 731.

- [13] Stears R.L., Martinsky T., Schena M., *Nature Medicine*, **2003**, *9*, p. 140.
 [14] Perrin A., Duracher D., Allard L., Cleuziat P., Theretz A., Mandrand B., *Polymer International*, **2003**, sous presse.
 [15] Ding Z.L., Fong R.B., Long C.J., Stayton P.S., Hoffman A.S., *Nature*, **2001**, *411*, p. 59.
 [16] Jager E.W.H., Smela E., Inganas O., *Science*, **2000**, *290*, p. 1540.
 [17] Caillat P., David D., Belleville M., Clerc F., Massit C., Revol-Cavalier F., Peltié P., Livache T., Bidan G., Roget A., Crapez E., *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1999**, *61*, p. 154.
 [18] Lee T.Y., Shim Y.B., *Analytical Chemistry*, **2001**, *72*, p. 5629.
 [19] Garnier F., Korri-Youssoufi H., Srivastava P., Mandrand B., Delair T., *Synthetic Metals*, **1999**, *100*, p. 89.
 [20] Krishnan M., Namasivayam V., Lin R.S., Pal R., Burns M.A., *Current Opinion in Biotechnology*, **2001**, *12*, p. 92.
 [21] Yu C., Mutlu S., Selvaganapathy P., Mastrangelo C.H., Svec F., Frechet J.M.J., *Analytical Chemistry*, **2003**, *75*, p. 1958.
 [22] Rao S.V., Anderson K.W., Bchas L.G., *Mikrochim Acta*, **1998**, *128*, p. 127.
 [23] Ladavière C., Delair T., Domard A., Novelli-Rousseau A., Mandrand B., Mallet F., *Bioconj. Chem.*, **1998**, *9*, p. 655.
 [24] Charles M.H., Charreyre M.T., Delair T., Elaissari A., Pichot C., *S.T.P. Pharma Sciences*, **2001**, *4*, p. 251.



T. Delair



A. Perrin

Thierry Delair¹ est responsable du groupe chimie, Abdelhamid Elaissari² est directeur de recherche CNRS et Agnès Perrin³ est chargée de recherche bioMérieux au sein de l'Unité Mixte CNRS-bioMérieux de Lyon* dirigée par Bernard Mandrand⁴.



A. Elaissari



B. Mandrand

* Unité Mixte CNRS-bioMérieux (UMR 2142), ENS-Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07.

¹ Tél. : 04 72 72 83 63.
Fax : 04 72 72 85 33.

Courriel : Thierry.delair@ens-lyon.fr

² Tél. : 04 72 72 81 34. Fax : 04 72 72 85 33.

Courriel : Hamid.Elaisari@ens-lyon.fr

³ Tél. : 04 72 72 85 92.

⁴ Tél. : 04 72 72 83 59. Fax : 04 72 72 85 33.

Courriel : Bernard.Mandrand@ens-lyon.fr

F FOURNIER PHARMA



L'expansion internationale,

à travers notamment une politique active de partenariats, associée à une stratégie d'innovation constante, sont pour Fournier Pharma les principaux piliers de la croissance.

Avec un investissement en Recherche & Développement

atteignant aujourd'hui 13% de son chiffre d'affaires, Fournier Pharma s'appuie sur ses 30 années d'expérience en lipidologie afin de mettre au point des molécules à forte valeur ajoutée dans les pathologies du métabolisme et les pathologies associées (dyslipidémies, diabète, syndrome métabolique).

Directement établi dans 30 pays,

Fournier Pharma complète sa logique d'ouverture grâce à un solide réseau de partenaires comptant parmi les leaders mondiaux de l'industrie pharmaceutique.

Laboratoires Fournier S.A. - 42, rue de Longvic - 21300 Chenôve
 Tél.: 33 (0)3 80 44 70 00 - Fax: 33 (0)3 80 44 73 10
 www.fournierpharma.com

LABORATOIRES
FOURNIER

Le rôle de la chimie dans l'élucidation de mécanismes biologiques et le développement des médicaments

L'exemple des métallopeptidases à zinc

Bernard P. Roques

Abstract **The role of chemistry to investigate biological mechanisms aimed at designing new drugs: illustration with zinc metallopeptidases**

Zinc metallopeptidases constitute a group of enzymes with about the same mechanism of action. Therefore, modern techniques of medicinal chemistry such as molecular modeling, high throughput screening, libraries, combinatorial chemistry can be used with these proteins. The review illustrates the crucial role of zinc metallopeptidases in three domains: analgesia, cardiovascular, neurotoxicity of botulinum neurotoxin. In each case, new concepts and methods have been developed leading to molecules active in humans. This demonstrates the critical requirement of interdisciplinary approaches at the frontier of chemistry and biology in the field of medicinal sciences.

Mots-clés **Inhibiteurs de métallopeptidases à zinc, nouveaux analgésiques et antihypertenseurs, modélisation moléculaire, banques d'inhibiteurs, synthèse stéréosélective.**

Key-words **Zinc metallopeptidase inhibitors, new analgesics and anti-hypertensives, molecular modelling, inhibitor's libraries, stereoselective synthesis.**

Les enzymes jouent un rôle crucial dans le fonctionnement des êtres vivants. Elles participent aux étapes essentielles qui permettent l'expression des gènes et leur traduction en protéines actives (protéome), y compris en réglant leur concentration intracellulaire par clivage de ces macromolécules en composés inactifs (protéasome). Ce sont également des enzymes, essentiellement des protéases, qui participent au métabolisme et *in fine* au catabolisme des effecteurs peptidiques ou protéiques.

On comprend dès lors qu'un nombre très important de médicaments ont pour cibles des enzymes. Pour prendre des exemples récents, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent une ou deux cyclo-oxygénases (COX-1 et/ou COX-2) qui génèrent des substances participant à l'inflammation des tissus et à la douleur qui en résulte. La plus grande partie des antitumoraux sont des inhibiteurs des enzymes qui contrôlent la division cellulaire au niveau de l'ADN et réduisent ainsi la prolifération des cellules tumorales. De même, un inhibiteur de la phosphorylation d'une protéine oncogénique au niveau de résidus tyrosines s'est récemment démontré extrêmement efficace contre certaines formes de leucémies. La synthèse enzymatique des précurseurs du cholestérol est la cible des statines, capables de réduire très efficacement l'excès de cholestérol. Les anti-protéases bloquent l'enzyme codée par le génome du virus VIH-1, ce qui inhibe la formation de la particule virale et donc sa multiplication. Le rôle des protéases est donc d'hydrolyser une liaison peptidique à un endroit (site) déterminé. Parmi elles se trouvent les métalloprotéases, constituées en majorité d'enzymes contenant un atome de zinc catalytique.

Les métallopeptidases à zinc (MPZ) : des enzymes physiologiques

On connaît actuellement environ 50 à 60 métallopeptidases à zinc (MPZ). Des prédictions à partir du décryptage du

Glossaire

Analgésique

Produit capable d'annihiler complètement une douleur intense. L'exemple type en est la morphine.

Antalgique

Produit diminuant la sensation douloureuse, le plus souvent grâce à ses propriétés anti-inflammatoires (ex. : aspirine).

Central

Désigne le cerveau.

Épissage

Liaison entre les exons (séquences nucléotidiques qui seront traduites en protéines). Cette liaison peut se faire en éliminant une partie d'un exon créant une protéine tronquée.

Jonction neuromusculaire

Espace (synapse) qui sépare la terminaison nerveuse et le muscle qu'elle innerve.

Leucémie

Processus tumoral qui affecte les globules blancs (cancer du sang).

Matrixines

Métallopeptidases à zinc dont la fonction physiologique est de digérer les protéines qui séparent les cellules. Elles sont très actives lors de la progression tumorale.

Nocicepteurs

Fines arborisations des nerfs périphériques présents dans tous les tissus et dont la fonction est de transmettre la douleur à la moelle épinière. Des récepteurs opioïdes par exemple peuvent se trouver au niveau de ces nocicepteurs.

Spinal

Désigne la moelle épinière.

génomme humain en prévoient 5 à 6 fois plus, dont un nombre important sont sans doute des isoformes obtenues par épissage alternatif.

La majorité des MPZ bien caractérisées ont des rôles physiologiques. Deux grands groupes peuvent être distingués : celui des protéases impliquées dans le métabolisme et/ou le catabolisme d'effecteurs peptidiques, et celui des protéases (matrixines) dont le rôle est de modifier le tissu (matrice) intra et/ou extracellulaire. Parmi les protéases, il faut distinguer les endoprotéases qui clivent un substrat au sein de sa séquence peptidique, et les exopeptidases qui libèrent un acide aminé terminal : aminopeptidase ou carboxypeptidase (schéma 1).

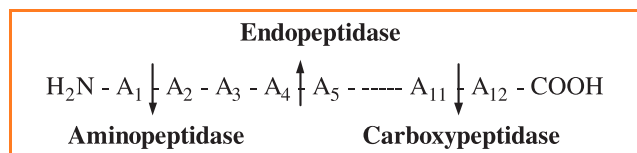


Schéma 1.

Les deux premières MPZ cristallisées ont été la carboxypeptidase A et l'endopeptidase bactérienne, thermolysine (TLN). C'est cette dernière, dont la structure a été établie seule et en présence de différents inhibiteurs, qui a conduit B. Matthews à proposer un mécanisme d'action très simple pour ces métalloenzymes [1].

La figure 1 montre que le zinc de la TLN est lié à trois acides aminés (deux histidines et un acide glutamique). Le 4^e ligand du zinc est une molécule d'eau. La polarisation de cette dernière est accentuée lors de la liaison du carbonyle de la liaison peptidique qui sera clivée, le complexe pentacoordiné conduisant à une transconformation de l'enzyme avec rapprochement spatial du carboxyle du glutamate catalytique. L'énergie d'activation est abaissée et le complexe de Michaelis se dissocie par rupture de la liaison amide et formation de deux métabolites. L'affinité et la sélectivité des MPZ sont assurées par l'occupation des sous-sites de l'enzyme selon la figure 2.

Les sites occupés par un substrat varient d'une peptidase à l'autre, mais à l'exception des toxines clostridiales, il est rare que plus de 5 ou 6 sous-sites soient réellement occupés, le substrat étant alors hors de la peptidase ou à sa surface.

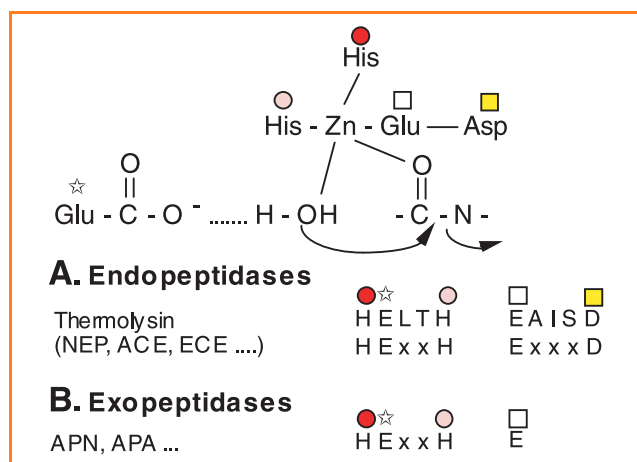


Figure 1 - Acides aminés essentiels des MPZ impliqués dans l'hydrolyse d'une liaison peptidique et schéma des liaisons avec le zinc et du mécanisme d'hydrolyse.

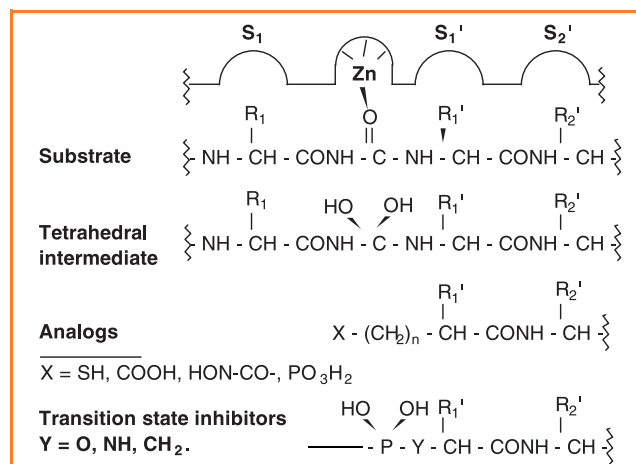
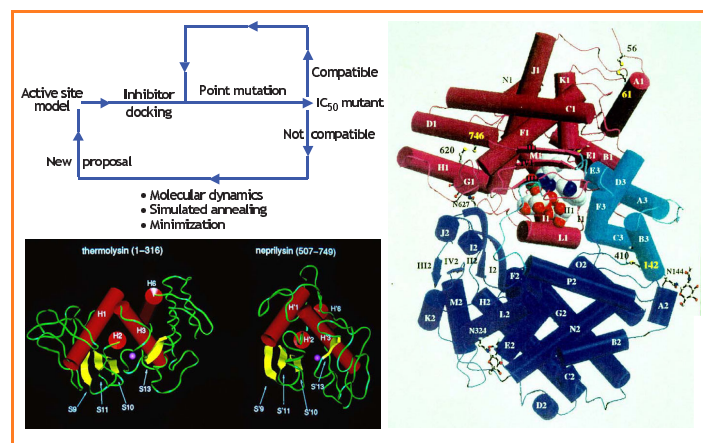


Figure 2 - Modes d'interaction d'un substrat avec une MPZ, état intermédiaire et différents types d'inhibiteurs.

Les manipulations génétiques et la modélisation des MPZ

La première MPZ physiologique clonée et séquencée a été l'endopeptidase neutre (NEP) [2]. Ceci a permis de démontrer la présence de deux séquences consensus HExxH et ExxD (H : histidine, E : acide glutamique, D : acide aspartique) présentes dans le site catalytique de la TLN (figure 1). En dépit d'une différence de taille très importante (TLN = 315 acides aminés (a.a), NEP = 747 a.a) et d'une homologie de séquence très faible (~ 15 %), il a été possible par des expériences de mutagenèse dirigée de retrouver les aminoacides essentiels du site catalytique de la NEP (revue dans [3]) et constater qu'ils sont identiques à ceux de la TLN. Par ailleurs, le clonage de la NEP a entraîné celui de nombreuses autres MPZ (ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine, APA : aminopeptidase A, APN : aminopeptidase N, ECE : enzyme de conversion de l'endothéline...) et la détermination de la structure des matrixines de petite taille (stromélysine, astacine).

Les sites actifs de ces trois enzymes ont été superposés montrant une identité d'arrangement des structures secondaires en hélices et feuilletts. En s'appuyant sur ce résultat, un modèle de site actif de la NEP (400 résidus) a été proposé [4] et étayé par mutagenèse dirigée [5] (figure 3). Sa cohérence a été confirmée en le confrontant à la structure RX de la NEP obtenue quelques mois plus tard [6]. Cette



stratégie de modélisation englobant des étapes de dynamique moléculaire est désormais couramment utilisée comme par exemple avec l'ECE. Ces approches ont permis d'explorer en détail les sous-sites de la NEP et l'ECE permettant d'améliorer encore les affinités mono- ou pluri-sélectives des inhibiteurs.

L'inhibition des MPZ : le rôle crucial de la chélation du métal

Les enzymes sont certainement les cibles pharmacologiques qui se prêtent le mieux à une démarche rationnelle dans le développement d'agents inhibant leur fonction. Dans le cas des MPZ, la recherche plus ou moins aléatoire de molécules par tri systématique, qui permet de faire émerger une tête de série (« lead »), est contrainte par la présence du zinc qui doit impérativement être coordonné par un ou plusieurs atomes pour conduire à des inhibiteurs puissants. Ceci réduit la combinatoire dans la mesure où l'exploration des sous-sites effectuée, il est indispensable d'incorporer à la structure choisie un groupe X à forte affinité pour le zinc : thiol, carboxyl, hydroxamate, reste phosphinique, phosphonamide, phosphonamides mono ou bidentés (figure 2). Très peu de nouveaux chélatants du zinc ont été proposés depuis 1970 et ceci rend le dépôt de brevets de plus en plus complexe. Nous avons récemment démontré la bidentation d'un thiol et d'un carbonyle au sein d'une même molécule, ouvrant la voie au développement de nouveaux ligands. La mise au point d'inhibiteurs de MPZ, souvent destinée à la clinique, requiert la mise au point de synthèses stéréospécifiques, souvent par des voies nouvelles [7], nécessitant le développement de réactifs nouveaux. En effet, la molécule finale doit posséder une seule configuration spatiale et donc des centres chiraux tous définis. Ceux-ci sont souvent nombreux (voir figure 8a). La synthèse industrielle d'un médicament doit reprendre ces méthodes de laboratoire et les optimiser, ce qui est également difficile mais fascinant (voir [7, 16] et références citées).

Modulation de la transmission peptidergique par les ectopeptidases à zinc

Les effecteurs peptidiques (molécule capable de se lier à une cible pour transmettre une information et générer une réponse) souvent présents dans le système nerveux central et dans les organes périphériques sont sécrétés selon un mécanisme d'exocytose calcium-dépendant classique pour aller agir au niveau de récepteurs appartenant le plus souvent à la classe des récepteurs couplés aux protéines G (figure 4). Ces dernières, intracellulaires, servent à transmettre le message reçu à l'extérieur de la cellule pour conduire à la réponse attendue (sécrétion d'une hormone par exemple). L'interruption du message est conditionnée non pas par la recapture cellulaire du peptide, mais par sa dégradation en fragments incapables de se lier aux récepteurs et ce, par des ectopeptidases à zinc [3]. Ces enzymes ont leur site actif à l'extérieur de la cellule et sont enchâssées dans la membrane de celle-ci par un court segment transmembranaire (figure 4).

Ce mécanisme a été particulièrement étudié dans le cas des peptides opioïdes (enképhalines qui sont inactivées par deux peptidases à zinc, la NEP et l'APN) et dans le cas des MPZ impliquées dans la régulation de la pression artérielle et de l'homéostasie des fluides circulants (figure 5).

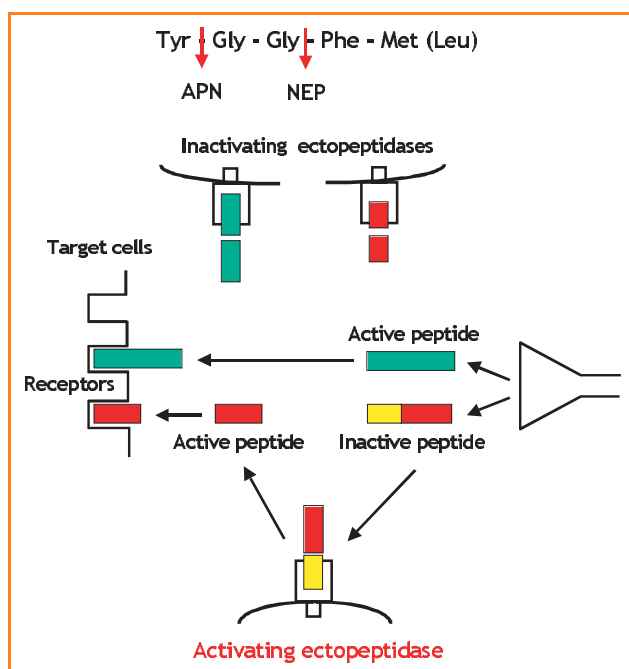


Figure 4 - Schéma de la transmission peptidergique montrant les récepteurs et les peptidases d'activation et/ou d'inactivation (la partie active de l'enzyme est à l'extérieur de la cellule).

L'inhibition de l'une ou plusieurs de ces MPZ aura donc pour effet de moduler la concentration extracellulaire (cerveau) et/ou circulante des effecteurs peptidiques endogènes. La très grande différence avec la démarche classique, qui consiste à synthétiser des agonistes ou antagonistes des récepteurs capables de les activer ou les bloquer, est que l'on échappe à deux inconvénients majeurs : la stimulation ou le blocage excessifs par des molécules exogènes et le caractère ubiquitaire de l'action de celles-ci. Ceci peut conduire, comme dans le cas de la morphine par exemple, à des effets secondaires majeurs tels que : tolérance, constipation par action sur les récepteurs opioïdes de l'intestin, dépression respiratoire (overdose chez les héroïnomanes), etc. Dans le cas des inhibiteurs, la réponse est conditionnée par la libération tonique (basale) ou phasique (provoquée par la douleur par exemple) des morphines internes (enképhalines). Elle est donc localisée et recrute des récepteurs à l'endroit désiré. Par ailleurs, la concentration de peptide augmentera par inhibition du catabolisme, mais sans altérer la sécrétion naturelle par la cellule [3]. Les inconvénients peuvent être

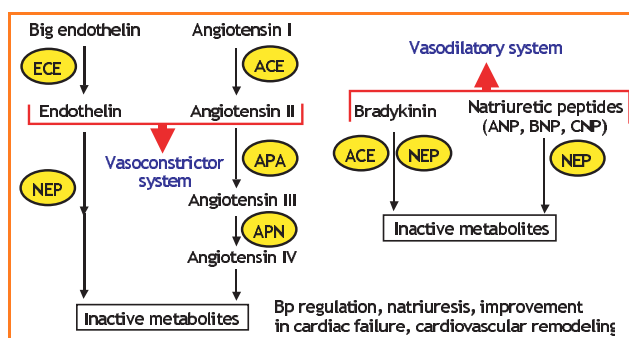


Figure 5 - Les différentes MPZ impliquées dans le contrôle de la pression artérielle. NEP : néprylisine, ACE : « angiotensin-converting enzyme », ECE : « endothelin-converting enzyme ».

une moindre sélectivité et efficacité mais dans ce dernier cas, c'est ce qui est recherché par exemple pour l'analgésie.

La première MPZ « thérapeutique » a été l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui génère dans la circulation le très puissant peptide vasoconstricteur angiotensine II (A_{II}) à partir de l'angiotensine I. En 1977, l'inhibition de l'ECA par le captopril a démontré que l'on pouvait diminuer la pression artérielle en diminuant la concentration circulante de A_{II} [8]. Cette découverte a joué un rôle très important en pharmacologie.

Le concept d'inhibiteur mixte

Les figures 4 et 5 montrent clairement qu'il existe plusieurs peptidases qui participent au contrôle d'une voie peptidergique (système d'information utilisant un effecteur peptidique). Dans le cas des enképhalines, ce sont la NEP et l'APN. Le thiorphan (figure 6a), premier inhibiteur synthétique de la NEP développé dans le laboratoire [9], ne produit pas une augmentation suffisante du taux d'enképhalines et donc pas de réponse analgésique suffisante. Il en est de même pour des inhibiteurs sélectifs d'APN. Ceci nous a conduit à proposer le concept d'inhibiteur mixte (une molécule capable d'inhiber deux enzymes) pour le couple NEP/APN [10] que nous avons étendu ensuite à l'inhibition NEP/ACE [11], puis à l'inhibition triple ACE/NEP/ECE [12] (figures 4 et 5). L'inhibition sélective de la NEP par le thiorphan a néanmoins trouvé une application clinique comme puissant antidiarrhéique (du nourrisson à l'adulte) protégeant les enképhalines dans la partie ultérieure de l'intestin. Ces peptides ont un

| | animal models | opiates | NSAIDs | dual inhibitors |
|---------------------|--|---------|--------|-----------------|
| severe | tail flick hot plate electric stimulation | ++ | 0 | + |
| inflammatory | formalin arthritic rats carragenin | ++ | ± | ++ |
| neuropathic | sciatic nerve compression sciatic nerve ligature diabetic rats | ± | 0 | + |
| visceral | writhing | ++ | + | ++ |

effet sélectif de réduction des transferts d'eau et d'ions au travers de la muqueuse intestinale par interaction primaire avec les récepteurs opioïdes delta. Le Tiorfan® ne ralentit donc pas le transit intestinal comme le font les agonistes mu (loperamide par exemple) dont l'usage comporte un risque de retenue fécale avec augmentation des effets délétères des entérotoxines, sources de décès fréquents chez l'enfant dans les pays en voie de développement.

C'est néanmoins l'effet analgésique qui a été recherché en priorité grâce aux inhibiteurs mixtes (figure 6a). Il existe en effet un besoin impérieux de substances actives sur les douleurs difficilement prises en charge (post-opératoires, ostéoarticulaires, neurogéniques, douleurs de l'enfant, du patient âgé, etc.). La protection des enképhalines endogènes remplit cette fonction (figure 6b).

Plusieurs types de molécules existent désormais et leur action est fonction de leur biodisponibilité. Il faut rappeler que la douleur est contrôlée par les enképhalines endogènes à trois niveaux périphériques : au niveau des nocicepteurs qui reçoivent l'influx douloureux au niveau de la peau, des organes, etc. et où se trouvent des récepteurs (y compris opioïdes), lieu d'action du kétolorphan ; au niveau spinal (site d'action des inhibiteurs aminophosphiniques), et enfin central pour les disulfides (figure 6a). Parmi ces derniers, certains étant actifs par voie orale agissent aux trois niveaux. Les analgésies obtenues comblent le fossé séparant les antalgiques (aspirine, anti-inflammatoire non stéroïdien...) et les analgésiques opioïdes (tableau I). Ils représentent une percée importante et attendue dans le domaine du traitement de la douleur (revue dans [13]). Deux sont en essais précliniques.

Dosages optimisés et sondes radioactives pour visualisation de la distribution des MPZ

Il s'agit d'outils essentiels pour étudier le rôle physiologique des peptidases dans les différents tissus et pour faciliter le développement d'inhibiteurs par les méthodes de tri rapide (bibliothèque, chimie combinatoire).

La figure 7 montre la structure et les affinités des inhibiteurs radioactifs sélectifs développés pour les NEP, APN et APA, et la bonne cohérence dans la distribution dans le cerveau de rat des deux enzymes d'inactivation des enképhalines et des récepteurs μ et δ sur lesquels se lient ces peptides endogènes. Pour ce qui est des dosages enzymatiques, il est crucial de posséder une méthode simple, rapide, sensible et sélective pour un tri rapide. Plusieurs dosages désormais commercialisés ont été mis au point.

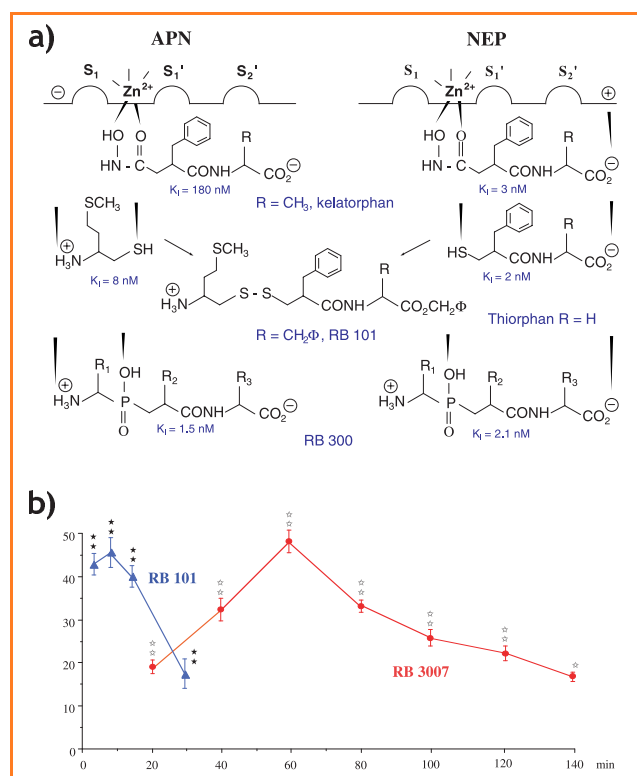


Figure 6 - (a) Structures des différents types d'inhibiteurs mixtes d'APN et NEP et mode de reconnaissance des enzymes ; (b) Test de la plaque chaude chez la souris (analgésie 25 mg/kg, i.v.) (on mesure le temps mis par l'animal à sauter pour échapper à la douleur ; l'appareil s'arrête automatiquement pour ne pas blesser l'animal).

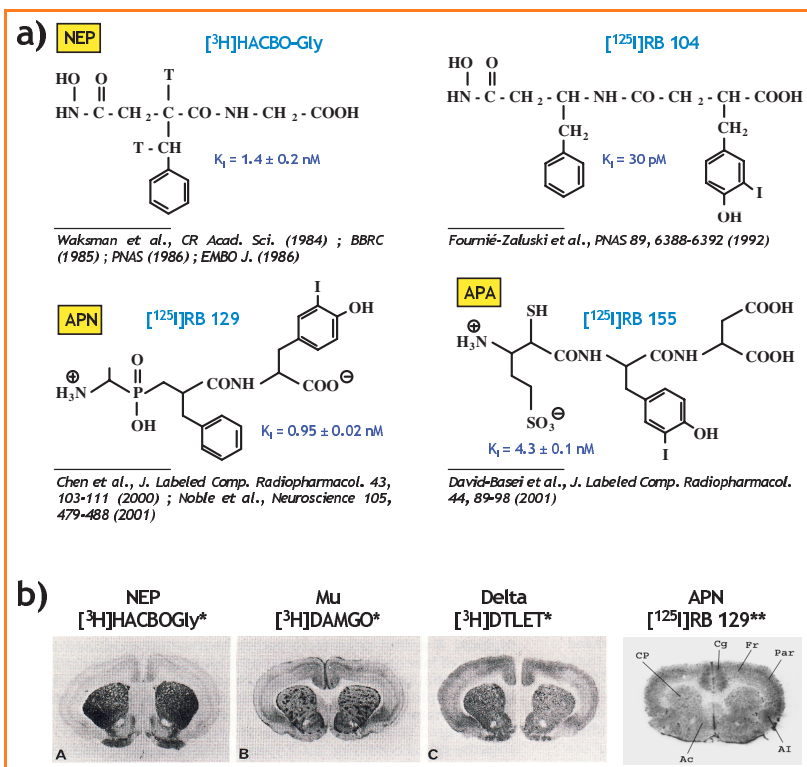


Figure 7.

Le plus intéressant concerne la toxine botulique BoNT dont l'extrême toxicité est due à son activité de MPZ capable de cliver un élément essentiel (synaptobrevine, Sb) de la libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire, entraînant ainsi une paralysie très grave (revue dans [14]). Il n'existe pas de traitement spécifique et la BoNT fait partie des substances utilisées dans le bioterrorisme au même titre que l'anthrax. L'idée a été d'utiliser le plus petit fragment de Sb hydrolysable par la BoNT et d'encadrer le site de clivage par un fluorophore très puissant, la pyrénylalanine (Pya) et un reste p.NO₂-Phe capable d'éteindre quasi totalement cette fluorescence à cause de la proximité de Pya (figure 8). La BoNT hydrolyse le Sb et « libère » une intense fluorescence permettant la détection de la présence de la toxine à des concentrations 10 000 fois inférieures à la dose létale chez l'Homme [15]. C'est actuellement la méthode la plus efficace

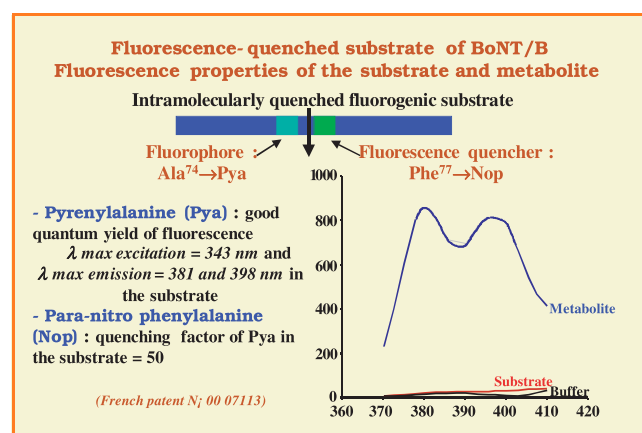


Figure 8 - Méthode de détection très sensible et rapide de la toxine botulique B.

en cas de bioterrorisme. Elle est évidemment utilisable pour la mise au point d'inhibiteurs de l'activité MPZ de BoNT (vide infra).

Traitement de l'hypertension et de l'insuffisance cardiaque par les inhibiteurs des vasopeptidases (ACE, ECE, NEP, APA)

Le contrôle de la pression artérielle est assuré entre autres par des peptides physiologiquement antagonistes. Ainsi, l'A_{II} et l'endothéline sont de puissants vasoconstricteurs formés par action de métallopeptidases spécifiques, l'ACE et l'ECE (figure 5). Inversement, il existe un contre-système vasodilatateur et diurétique exercé par la bradykinine (BK) et le peptide natriurétique atrial (ANP) rapidement inactivé par l'ACE et la NEP.

On peut donc modifier la pression artérielle en bloquant tout ou partie du système vasopresseur et en favorisant la durée de vie des peptides vasodilatateurs. C'est dans cet esprit que le concept d'inhibiteurs mixtes a été étendu au couple ACE/NEP [11] puis développé le premier inhibiteur triple : ACE/NEP/ECE [16] (figure 9).

Des molécules telles que le SR 21402, développé avec Servier, et l'Omapatrilat de BMS ont donné des réponses extrêmement prometteuses sur le problème majeur que représente l'insuffisance cardiaque et ce tant chez l'animal que chez l'Homme. Cependant, des essais à grande échelle avec l'Omapatrilat ont montré l'apparition de réactions d'obstruction trachéale probablement dues à une protection trop efficace de la BK. Ceci a entraîné l'interruption des essais cliniques des deux molécules (figure 9).

Il est trop tôt pour dire ce qu'il adviendra des inhibiteurs triples qui pourraient s'avérer moins délétères grâce à l'absence de vasoconstriction résiduelle due à l'endothéline. Le rôle du système rénine/angiotensine cérébral demeure mystérieux. Très récemment, nous avons montré, grâce à des inhibiteurs sélectifs de l'APN, que le contrôle central de la pression artérielle impliquait non pas l'A_{II} mais l'A_{III} [17]

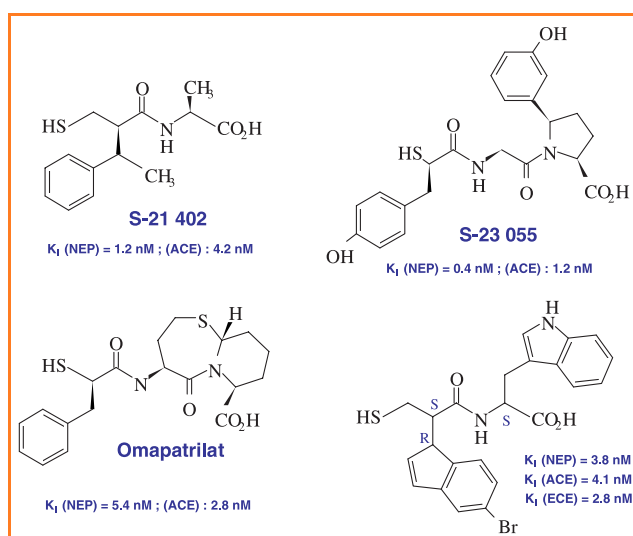


Figure 9 - Structure d'inhibiteurs mixtes de NEP et d'ACE.

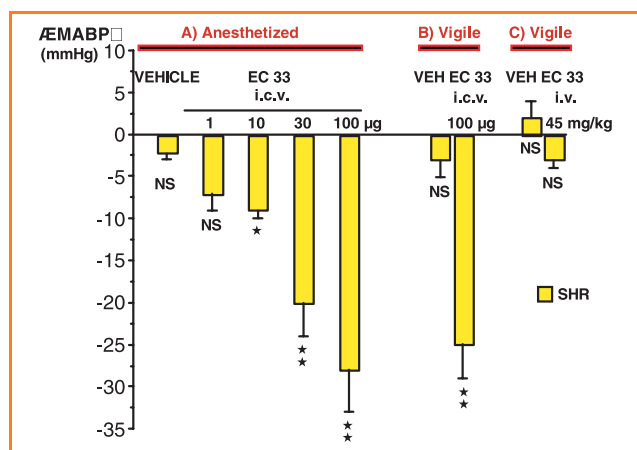


Figure 10 - Effet hypertenseur de l'EC 33 résultant de son action inhibitrice de l'aminopeptidase A.

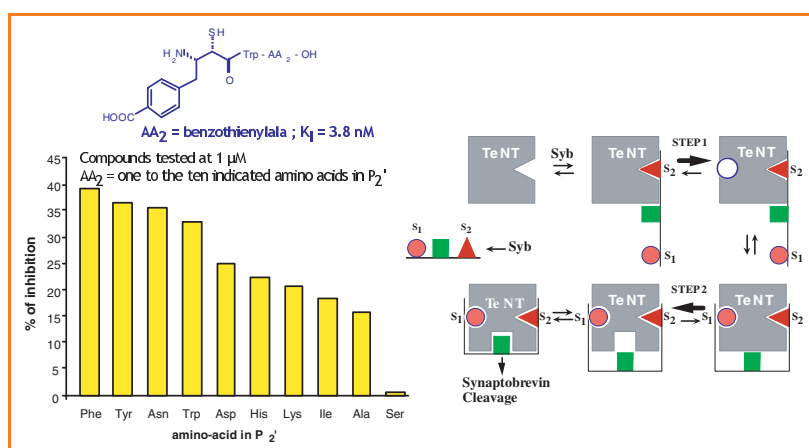


Figure 11 - (a) librairie d'inhibiteurs ; (b) mécanisme coopératif d'hydrolyse par la toxine tétanique.

(figure 10). Les résultats obtenus (coll. Inserm/Collège de France, Lab. Glaxo, France) sur divers types d'hypertension, y compris après administration orale, sont intéressants. A la suite de l'échec des inhibiteurs mixtes NEP/ACE, ils représentent un nouvel espoir dans les traitements de l'insuffisance cardiaque.

Détection et inhibition des neurotoxines tétanique et botulique

Le mécanisme d'action de ces neurotoxines explicité précédemment est dû à une activité MPZ. Des études de cinétique enzymatique à l'aide de fragments de Sb ont permis de montrer que la toxine tétanique (TeTx) clivait la Sb selon un mécanisme de coopération positive par étapes successives d'occupation de deux exosites présents sur la protéine [18] (figure 11). Ceci gêne la mise au point d'inhibiteurs compétitifs mais un bloquant à 10^{-7} a tout de même été mis au point (revue dans [14]).

Dans le cas de la BoNT, l'inhibition est directe ; et en utilisant des librairies d'inhibiteurs, nous avons mis au point le premier inhibiteur nanomolaire de cette enzyme (figure 11).

Les expériences sur cellules montrent que ces molécules ont au minimum une action de protection de l'infection [19].

Conclusion

Les pays où la recherche est la plus florissante (États-Unis, Suède, Japon, Grande-Bretagne...) favorisent la chimie à la frontière de la biochimie. Je crains que ce ne soit pas le cas en France où les enseignements et la recherche en chimie organique qui faisaient la spécificité des facultés de pharmacie sont remis en cause. Quelle erreur ce serait ! Les connaissances fondamentales attendues de la protéomique ne se feront pas sans l'apport des techniques chimiques (caractérisation de familles des protéines, cinétique des assemblages, trafic intra- et extracellulaire, etc.). Que dire de la thérapeutique sinon que plus de 40 % des médicaments innovants sont issus de recherches académiques. L'exigence d'ambition et de réussite est une contrainte dans ces domaines frontières souvent mal perçus par les organismes de recherche qui doivent impérativement s'associer des évaluateurs compétents. La réputation scientifique d'un pays et son indépendance économique sont étroitement liées à ces disciplines d'avenir. Pour les jeunes, elles sont extrêmement formatrices par l'étendue de connaissances qu'elles exigent et également source de joie intense. Qu'y a-t'il de plus ludique que d'explicitier un mécanisme biologique resté obscur ou d'apporter une lueur d'espoir dans le traitement d'une affection majeure ?

Références

- [1] Matthews B.W., *Acc. Chem. Res.*, **1988**, *21*, p. 333.
- [2] Devault A., Lazure C., Nault C., Le Moulal H., Seidah N.G., Chretien M., Kann P., Powell J., Mallet J., Beaumont A., Roques B.P., Crine P., Boileau C., *Embo J.*, **1987**, *6*, p. 1317.
- [3] Roques B.P., Noble F., Dauge V., Fournié-Zaluski M.C., Beaumont A., *Pharmacol. Rev.*, **1993**, *45*, p. 87.
- [4] Tiraboschi G., Jullian N., Théry V., Antonczak S., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., *Prot. Engineering*, **1999**, *12*, p. 141.
- [5] Marie-Claire C., Tiraboschi G., Ruffet E., Inguibert N., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., *Proteins: Struct. Funct. Gen.*, **2000**, *39*, p. 365.
- [6] Oeffner C., d'Arcy A., Henning M., Winkler F.K., Dale G.E., *J. Mol. Biol.*, **2000**, *296*, p. 341.
- [7] David L., Bischoff L., Meudal H., Mothé A., Demota N., Danascimento S., Llorens-Cortes C., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, p. 5197.
- [8] Ondetti M.A., Rubin B., Cushman D.W., *Science*, **1977**, *196*, p. 441.
- [9] Roques B.P., Fournié-Zaluski M.C., Soroca E., Lecomte J.M., Malfroy B., Llorens C., Schwartz J.C., *Nature*, **1980**, *288*, p. 286.
- [10] Fournié-Zaluski M.C., Chaillet P., Bouboutou R., Coulaud A., Chérot Waksman G., Costentin J., Roques B.P., *Eur. J. Pharmacol.*, **1984**, *102*, p. 525.
- [11] Roques B.P., Beaumont A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **1990**, *11*, p. 245.
- [12] Roques B.P., *Pathol. Biol.*, **1998**, *46*, p. 191.
- [13] Roques B.P., *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**, *21*, p. 475.
- [14] Roques B.P., Anne C., Turcaud S., Fournié-Zaluski M.C., *Biol. Cell.*, **2000**, *92*, p. 445.
- [15] Anne C., Cornille F., Lenoir C., Roques B.P., *Anal. Biochem.*, **2001**, *291*, p. 253.
- [16] Inguibert N., Poras H., Teffo F., Beslot F., Selkti M., Tomas A., Scalbert E., Bennejean T., Renard P., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, p. 2001.
- [17] Réaux A., Fournié-Zaluski M.C., David C., Zini S., Roques B.P., Corvol P., Llorens-Cortes C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, p. 12028.
- [18] Cornille F., Martin L., Lenoir C., Cussac D., Roques B.P., Fournié-Zaluski M.C., *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, p. 3459.
- [19] Anne C. et al, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, p. 4648.



Bernard P. Roques

est professeur au Laboratoire de pharmacochimie moléculaire et structurale Inserm/CNRS à la Faculté de Pharmacie de Paris* et membre de l'Institut.

* Laboratoire de pharmacochimie moléculaire et structurale, Inserm/CNRS, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06.
Tél. : 01 43 25 50 45. Fax : 01 43 26 69 18.
Courriel : roques@pharmacie.univ-paris5.fr

Espèces réactives de l'oxygène

Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?

Monique Gardès-Albert, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh et Daniel Jore

Abstract

Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic?

Dysfunctions of oxygen metabolism generate an excess of very reactive chemical species known as « reactive oxygen species » (ROS), among them are free radicals (like $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{RO}_2\cdot$), and non-radical products (like H_2O_2 , RO_2H). These species, and particularly the radical species, create oxidative damages on biological macromolecules (DNA, lipids, proteins), which can considerably disturb the cell machinery. Oxidative stress is involved in numerous pathologies (atherosclerosis, diabetes, neurodegenerative diseases, cancer...) and in the aging process. Antioxidants aimed at more or less inhibiting oxidative damages generated by ROS. In order to better understand the oxyradical-induced reactions, radiolysis is a very efficient method.

Mots-clés

Radicaux libres oxygénés, dommages oxydatifs, antioxydants, radiolyse.

Key-words

Oxygenated free radicals, oxidative damages, antioxidants, radiolysis.

L'oxygène (ou dioxygène, O_2) est un gaz indispensable à la vie, apparu sur la Terre il y a plus de 2 500 millions d'années, simultanément au développement de la photosynthèse par les algues bleues. A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, l'oxygène est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celle existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes. Au cours de l'évolution, l'adaptation des espèces vivantes à l'oxygène s'est traduite par l'apparition d'enzymes facilitant non seulement sa consommation, mais également la détoxification de ses métabolites réduits que sont le radical superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$ (voir encadré) et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces espèces sont appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) car elles sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'oxygène lui-même. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée. C'est ainsi que dans l'athérosclérose, le rôle des ERO apparaît comme majeur, validant la « théorie oxydative de l'athérosclérose » proposée il y a une quinzaine d'années par Steinberg *et al* [1] et rejoignant la théorie inflammatoire. Les ERO produites par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les monocytes-macrophages, sont susceptibles d'oxyder les lipoprotéines, notamment les lipoprotéines de basse densité (LDL), conduisant à la formation de stries lipidiques, première étape dans l'apparition de la plaque d'athérome (épaississement des artères par un dépôt composé, en partie, d'esters de cholestérol). De même, dans le diabète sucré, le stress oxydant provoqué par les concentrations anormalement élevées de glucose dans l'organisme joue un rôle très important, en particulier dans la survenue des complications diabétiques, qu'elles soient macro- ou micro-vasculaires [2]. Les ERO seraient également impliquées dans les maladies neurodégénératives à début tardif, notamment la maladie d'Alzheimer, où la mort neuronale pourrait être

liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres [3]. La maladie de Parkinson s'accompagne elle aussi d'un stress oxydant en relation à la fois avec un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées par le protéasome [4]. Enfin, les ERO semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer [5].

Glossaire

Constante de vitesse

Constante caractéristique de la vitesse d'une réaction chimique. Par exemple, la réaction d'un radical avec un substrat a une vitesse proportionnelle à la concentration de chaque réactif et à la constante de vitesse k (vitesse = $k \times [\text{radical}] \times [\text{substrat}]$). La constante de vitesse est ici exprimée en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ si chaque concentration est exprimée en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, la vitesse étant exprimée en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Cytosol

Contenu du cytoplasme à l'exclusion des organites membranaires (réticulum endoplasmique et mitochondries).

Dismutation

Réaction d'une espèce moléculaire (ou radicalaire) sur elle-même, générant simultanément une espèce plus oxydée et une espèce plus réduite que la molécule de départ.

Kinase

Enzyme qui transfère une fonction phosphate à une protéine cible.

Mitochondrie

Organite intracellulaire où siège le métabolisme énergétique de la cellule.

Peroxisome

Organite cellulaire bordé d'une seule membrane et équipé d'enzymes effectuant des réactions d'oxydation utilisant l'oxygène moléculaire.

Second messenger

Molécule qui aide à relayer un signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule.

Qu'est-ce qu'un radical libre ?

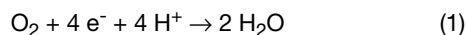
Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire (non apparié).

Radicaux libres centrés sur l'oxygène

- $O_2^{\cdot -}$: radical superoxyde
- HO_2^{\cdot} : radical perhydroxyle
- $\cdot OH$: radical hydroxyle
- RO_2^{\cdot} : radical peroxyde
- RO^{\cdot} : radical alkoxyde

Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène *in vivo*

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale.

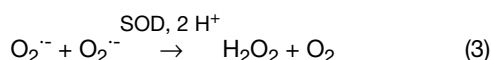


Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) [6].



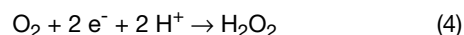
De même, la NADH-deshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales [7], peuvent conduire à la formation de radicaux $O_2^{\cdot -}$. Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits ($FMN H_2$, $FAD H_2$), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique [8].

Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité (voir le paragraphe sur les effets délétères du stress oxydant) est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation (réaction (3)). Il existe deux types de superoxyde dismutases, l'une dont le site actif contient du cuivre et du zinc ($Cu,Zn-SOD$) et qui est essentiellement localisée dans le cytosol, tandis que l'autre contient du manganèse ($Mn-SOD$) et est présente dans les mitochondries.

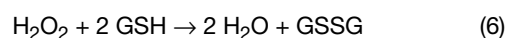
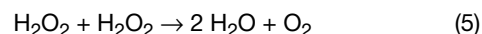


L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) ainsi formée n'est pas elle-même un radical libre mais une molécule (ayant tous ses électrons périphériques appariés). Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène (réaction (4)) en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase,

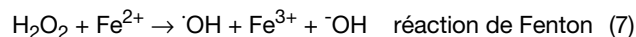
urate oxydase...) qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxyosomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de H_2O_2 .



L'eau oxygénée est un intermédiaire réduit de l'oxygène qui est relativement toxique. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxyosomes) et les glutathion peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (réaction (5)), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique, symbolisé ici par GSH) par l'eau oxygénée (réaction (6)).



La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $\cdot OH$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction (7), dite de Fenton) ou Cu^+ [9]. Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques comme nous le verrons par la suite.



Remarque : le radical hydroxyle $\cdot OH$ et l'anion basique $\cdot OH^-$ sont tous deux formés au cours de la réaction (7). Toutefois, ce sont deux espèces chimiques nettement distinctes, puisque l'une ($\cdot OH^-$) a tous ses électrons périphériques appariés, tandis que l'autre ($\cdot OH$) a un électron célibataire sur sa couche périphérique. Leur différence de réactivité est directement corrélée à cette différence de structure électronique.

D'un point de vue formel, la réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur O_2 , en conduisant aux intermédiaires respectifs $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 et $\cdot OH$ (figure 1). Ces intermédiaires sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou encore espèces activées de l'oxygène, car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance.

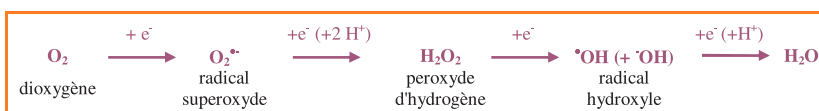


Figure 1 - Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène.

Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatiques et non enzymatiques), ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs d'ERO et systèmes de défense caractérise l'état de stress oxydant [8], sans qu'il soit aisé de déterminer si ce dernier est causal ou s'il constitue seulement une réponse de l'organisme à des stimuli, notamment inflammatoires.

Production et analyse des radicaux libres oxygénés par radiolyse de l'eau

La radiolyse de l'eau est un outil précieux pour l'étude physico-chimique des phénomènes radicalaires. En effet, c'est une méthode de production de radicaux libres *in vitro* qui permet d'étudier leur action sur des molécules cibles dissoutes dans l'eau. De plus, la radiolyse de l'eau offre la possibilité d'analyser d'une manière rigoureuse les mécanismes radicalaires complexes résultant de l'action de ces radicaux libres.

La décomposition de l'eau pure par des rayonnements ionisants tels que les rayons gamma (provenant de sources radioactives de ^{137}Cs ou de ^{60}Co) produit en quelques nanosecondes les espèces radicalaires e^-_{aq} (électron hydraté), $\cdot\text{OH}$ et $\text{H}\cdot$, ainsi que les espèces moléculaires H_2 , H_2O_2 et H^+ (figure 2). La quantité de chacune de ces espèces est bien connue ; elle s'exprime en terme de rendement radiolytique, c'est-à-dire en nombre de moles formées par unité d'énergie absorbée (le Joule). Les valeurs de ces rendements sont données figure 2 [10]. En présence d'oxygène (milieu aéré), les radicaux e^-_{aq} et $\text{H}\cdot$ réagissent avec O_2 pour donner respectivement les radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$ et HO_2^{\cdot} . Ces derniers sont liés entre eux par un équilibre acido-basique dont le pKa est égal à 4,8. Par conséquent, la radiolyse de l'eau, en générant les radicaux hydroxyle et superoxyde, mime parfaitement les conditions d'un stress oxydant. Un phénomène similaire se produit lors d'irradiations (accidentelles ou thérapeutiques) d'organismes vivants, puisque ces derniers sont constitués majoritairement d'eau (70 à 80 % en poids). Les ERO générées par radiolyse de l'eau provoquent des dommages oxydatifs, au même titre que ceux impliqués dans le stress oxydant résultant d'un déséquilibre du métabolisme de l'oxygène.

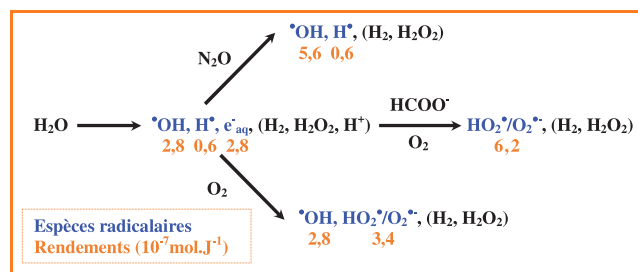


Figure 2 - Production d'espèces radicalaires en quelques nanosecondes par radiolyse de l'eau (rayons γ).

Entre parenthèses, espèces non radicalaires également produites par radiolyse. Selon la nature des solutés dissous dans l'eau (N_2O , $\text{HCOO}^\cdot/\text{O}_2$, O_2), il est possible de sélectionner les radicaux libres $\cdot\text{OH}$ et/ou $\text{O}_2^{\cdot-}$, afin de pouvoir les étudier spécifiquement.

La mise en œuvre de la méthode de la radiolyse est relativement aisée. Il suffit de dissoudre dans l'eau, en faible concentration, un substrat bioorganique choisi (ADN, protéine, lipide...) et de soumettre la solution à l'action des rayonnements ionisants (rayons X, rayons γ , faisceaux d'électrons...). Tant que la concentration de substrat est inférieure à 10^{-2} mol.L $^{-1}$, celui-ci ne subit pas d'ionisation directe par les rayonnements ionisants mais il est soumis à l'attaque des radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau. Deux méthodes d'analyse des processus radicalaires peuvent être utilisées : la radiolyse gamma et la radiolyse pulsée. En radiolyse gamma (ou radiolyse à l'état quasi-stationnaire), des durées d'irradiation croissantes (de quelques minutes

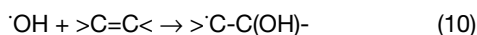
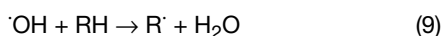
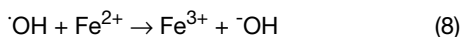
à quelques heures) conduisent à des concentrations « cumulées » croissantes de radicaux libres, tandis que leurs concentrations « instantanées » restent extrêmement faibles (par exemple 10^{-10} à 10^{-12} mol.L $^{-1}$ pour les radicaux $\cdot\text{OH}$), en raison de la grande réactivité de ces radicaux. Il n'est donc pas possible de doser les espèces radicalaires pendant les irradiations. En revanche, le substrat transformé peut être analysé après chaque irradiation. En radiolyse pulsée, l'irradiation a lieu pendant une durée extrêmement courte (par exemple 10^{-9} s), générant des radicaux en concentrations relativement élevées (10^{-6} à 10^{-4} mol.L $^{-1}$). Par conséquent, il est possible d'analyser les espèces radicalaires en temps réel, à l'échelle de quelques nanosecondes. L'une des principales voies de caractérisation des radicaux libres est la spectrophotométrie d'absorption qui permet, en outre, de les quantifier. Les cinétiques de formation et de disparition des transitoires radicalaires peuvent alors être suivies, en temps réel (de 10^{-9} à plusieurs secondes), à l'aide d'enregistreurs appropriés. Les propriétés physico-chimiques (constantes de vitesse, constantes d'équilibre, potentiels d'oxydoréduction, coefficients d'extinction molaire...) des radicaux libres oxygénés $\cdot\text{OH}$ et $\text{O}_2^{\cdot-}$, ainsi que de nombreux autres radicaux libres dérivant de molécules biologiques ont ainsi pu être déterminées. De plus, grâce aux données cinétiques ainsi acquises, les mécanismes de formation des lésions oxydatives (initiées par les radicaux libres oxygénés) ont pu être établis d'une manière rigoureuse pour de nombreux composés d'intérêt biologique.

La méthode que nous venons de décrire présente en outre l'intérêt de pouvoir choisir et isoler le radical initiateur (hydroxyle ou superoxyde) à l'aide de capteurs appropriés. C'est ainsi qu'irradier une solution désaérée et saturée de gaz N_2O , permet d'éliminer tous les radicaux e^-_{aq} au profit des radicaux $\cdot\text{OH}$ qui sont alors produits sélectivement (figure 2). De même, irradier une solution aqueuse contenant du formiate de sodium offre la possibilité de transformer tous les radicaux libres de la radiolyse de l'eau ($\cdot\text{OH}$, $\text{H}\cdot$ et e^-_{aq}) en radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui sont alors les seules espèces radicalaires sélectionnées (figure 2). Enfin, la méthode de la radiolyse n'est pas limitée à l'étude des solutions aqueuses. En effet, l'irradiation de solvants autres que l'eau, et en particulier de l'éthanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), permet de générer des radicaux peroxydes RO_2^\cdot ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{O}_2^\cdot)\text{OH}$) qui servent de modèles à la détermination des propriétés des peroxyradicaux (autres espèces radicalaires du stress oxydant) vis-à-vis de nombreux substrats bioorganiques insolubles dans l'eau.

Effets délétères du stress oxydant au niveau moléculaire

Les radicaux hydroxyles sont les ERO les plus dommageables du stress oxydant, en raison de leur extrême réactivité qui se traduit par des constantes de vitesse ($k(\cdot\text{OH} + \text{substrat})$) comprises entre 10^8 et 10^{10} mol $^{-1}$.L.s $^{-1}$. Ces constantes de vitesse sont dites limitées par la diffusion, c'est-à-dire limitées seulement par le mouvement des molécules et non par une barrière énergétique (énergie d'activation). Par conséquent, la durée de vie des radicaux $\cdot\text{OH}$ est extrêmement faible (inférieure à la microseconde) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles (inférieures à la dizaine de nanomètres). Ce sont donc des radicaux qui diffusent peu et qui réagissent quasiment sur le lieu de leur production, à l'opposé des radicaux superoxydes qui, comme nous le verrons, « ont le temps »

de diffuser en raison de leur relative inertie chimique. Les radicaux hydroxyles attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides...). Ce sont des oxydants puissants qui réagissent selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron (réaction (8)), soit en arrachant un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH, réaction (9)), soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons (réaction (10)).



Par exemple, dans le cas de l'ADN, le radical hydroxyle réagit avec les bases en s'additionnant sur les doubles liaisons (figure 3) [11]. Le radical hydroxyle peut également réagir avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique. De même, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. En outre, lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif [12].

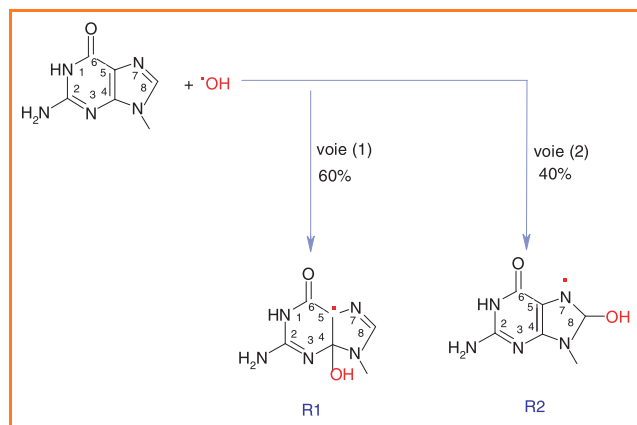
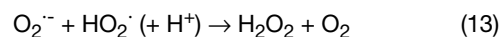
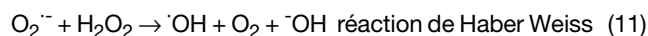


Figure 3 - Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine.

Deux radicaux libres sont formés : R1 (centré sur l'atome de carbone 5) et R2 (centré sur l'atome d'azote 7). Ce dernier (R2) donne naissance à la 8-oxo-guanine, un des principaux marqueurs du stress oxydant dans l'ADN.

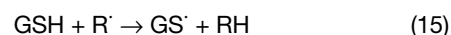
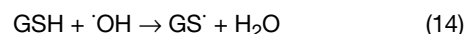
Paradoxalement, les radicaux superoxydes sont eux-mêmes peu réactifs vis-à-vis de la majorité des substrats bioorganiques (acides nucléiques, protéines, lipides et leurs constituants). Cela se traduit en terme de cinétique par des constantes de vitesse ($k(\text{O}_2^{\cdot-} + \text{substrat})$) plutôt faibles, généralement inférieures à $10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce sont donc des espèces dont la durée de vie est relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes) et qui peuvent diffuser bien au-delà de leur lieu de production pour atteindre leur cible. Toutefois, il existe très peu de cibles privilégiées des radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$; citons à titre d'exemple les SOD (dont $\text{O}_2^{\cdot-}$ est le substrat, $k(\text{O}_2^{\cdot-} + \text{SOD}) = 2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), le cytochrome c(Fe^{3+}) ($k(\text{O}_2^{\cdot-} + \text{cytc}(\text{Fe}^{3+})) = 2,6 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), ou encore l'ascorbate ($k(\text{O}_2^{\cdot-} + \text{ascorbate}) = 2,7 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) [8]. En réalité, la toxicité des radicaux superoxydes semble s'exercer plutôt d'une manière indirecte. En effet, en réagissant avec l'eau oxygénée, les radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$ peuvent donner naissance à des radicaux $\cdot\text{OH}$ (réaction (11), dite

de Haber Weiss, catalysée par Fe^{3+}) ou bien encore, en réagissant avec des radicaux $\cdot\text{NO}$ (monoxyde d'azote, radical centré sur l'azote), conduire à l'apparition de peroxy-nitrites (réaction (12)) dont la toxicité est maintenant bien établie [13]. En outre, la dismutation spontanée des radicaux superoxydes (réaction (13)) est suffisamment rapide, même en l'absence de SOD ($k = 9,7 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), pour que la production d'eau oxygénée soit en elle-même un phénomène délétère via les réactions de Fenton (réaction (7)) et de Haber Weiss (réaction (11)), c'est-à-dire via la production de radicaux hydroxyles.



Il est important de noter le rôle de second messenger que les radicaux superoxydes peuvent jouer au niveau des mécanismes de signalisation cellulaire. Ils sont ainsi impliqués dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée), dans la prolifération des cellules musculaires lisses (cellules vasculaires), dans l'adhésion des monocytes (types de globules blancs) aux cellules endothéliales, ou bien encore dans l'agrégation plaquettaire. De plus, les radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$ sont capables de modifier l'activité enzymatique de tyrosine kinases et de sérine/thréonine kinases (telles que les « mitogen-activated protein kinases » ou MAPK), conduisant en aval à activer des facteurs de transcription (protéines spécifiques) qui vont initier l'expression de gènes « redox-sensibles ».

L'ensemble des dommages radicalaires semble pouvoir être limité, tout au moins en partie, par l'action de molécules dites antioxydantes. Celles-ci ont pour rôle d'empêcher les ERO d'atteindre leurs cibles biologiques, d'où leur fonction de protecteur chimique. Il est habituel de dire qu'un bon antioxydant est un bon « capteur » de radicaux libres. Toutefois, cette condition n'est pas suffisante ; il faut en outre que l'antioxydant soit régénéré (recyclé) *in vivo* de manière à jouer plusieurs fois son rôle. Parmi les antioxydants non enzymatiques se trouvent les thiols (fonction SH) dont certains sont synthétisés *in vivo*, comme le glutathion (symbolisé ici par GSH). Le glutathion est un tripeptide dont la concentration intracellulaire est importante puisqu'elle est de l'ordre de 10^{-4} à $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [8]. La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H), qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée (voir réaction (6)) et des radicaux hydroxyles (réaction (14)). Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone R \cdot (réaction (15)). En effet dans ce cas, un phénomène de « réparation » des radicaux R \cdot en RH se produit [14], par opposition à l'oxydation possible des radicaux R \cdot par O_2 , donnant naissance à des radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot$.



Cependant, les radicaux thiyles $\text{GS}\cdot$ formés lors des réactions (14) et (15) sont loin d'être eux-mêmes « inoffensifs » car leurs réactions ultérieures peuvent générer de nouveaux radicaux libres susceptibles d'initier à leur tour des dommages moléculaires. Par conséquent, l'effet protecteur des thiols reste relativement limité. La

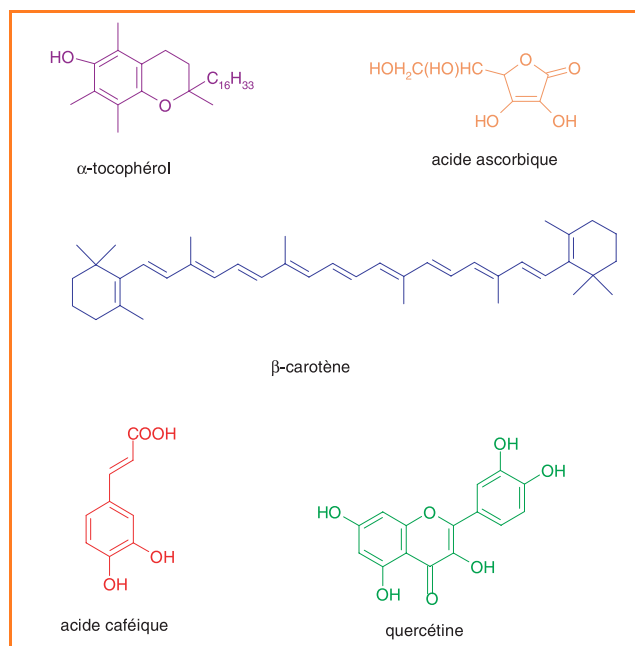
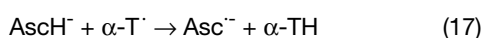
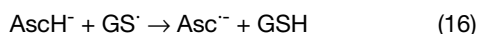


Figure 4 - Antioxydants d'origine alimentaire : α -tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C), β -carotène (famille des caroténoïdes), acide caféique et quercétine (famille des polyphénols).

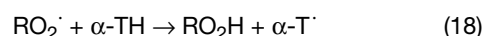
régénération de la fonction thiol SH semble se faire, *in vivo*, à l'aide d'autres réducteurs tels que l'ascorbate.

Les antioxydants d'origine alimentaire, comme l'ascorbate, les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols (figure 4), exercent des effets protecteurs importants *in vivo*. La concentration d'ascorbate (vitamine C) est comparable à celle du glutathion puisqu'elle peut atteindre 10^{-3} mol.L⁻¹ dans certains types cellulaires. La molécule d'acide ascorbique (figure 4) et sa forme déprotonée, l'ascorbate (présent majoritairement à pH physiologique), sont des agents réducteurs. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ (et leur forme protonée $\text{HO}_2\cdot$), ce qui est tout à fait remarquable puisque ces derniers sont connus pour être très peu réactifs. En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. En réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'ascorbate (symbolisé ici par AscH^+) est oxydé en radical ascorbyle $\text{Asc}^{\cdot-}$ qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. Par conséquent, à l'opposé du radical thiyle $\text{GS}^{\cdot-}$ susceptible d'initier de nombreuses réactions secondaires, le radical ascorbyle $\text{Asc}^{\cdot-}$ ne développe pas de réactions ultérieures dommageables. Une propriété importante de l'ascorbate est la « réparation » possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol (symbolisé par $\alpha\text{-TH}$) à partir de leurs formes radicalaires (réactions (16) et (17)). L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle.



Parmi les tocophérols naturels (d- α , d- β , d- γ et d- δ -tocophérols), le d- α -tocophérol (vitamine E) est celui qui est le plus efficace *in vivo*. C'est un antioxydant liposoluble, en raison de sa longue chaîne aliphatique comportant 16 atomes de carbone (figure 4), ce qui le différencie nettement

de l'ascorbate qui, lui, est hydrosoluble. Le d- α -tocophérol est donc localisé parmi les chaînes d'acides gras des phospholipides constituant les membranes et les lipoprotéines. Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques $\text{RO}_2\cdot$ qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice (symbolisée ici par $\alpha\text{-TH}$), celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, $\alpha\text{-T}^{\cdot-}$, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (réaction (18)). De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée $\text{HO}_2\cdot$), les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, ainsi que l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (espèce réactive de l'oxygène, non radicalaire). Bien que la concentration d' α -tocophérol soit relativement faible *in vivo* ($2 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ dans le sang), le recyclage de ce dernier par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate (réaction (17)), lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises.



Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène (famille des caroténoïdes), l'acide caféique et la quercétine (famille des polyphénols) (figure 4). Caroténoïdes et polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace semble-t-il que ne le fait l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydantes permettrait d'expliquer, tout au moins en partie, les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation de fruits, de légumes, de thé et de vin rouge (en quantité modérée).

Conclusion

Les espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , radicaux libres superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ et hydroxyles $\cdot\text{OH}$) sont produites d'une manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée (stress oxydant). Ces espèces sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires. Les radicaux hydroxyles sont les espèces les plus agressives et donc les plus dommageables du stress oxydant, tandis que les radicaux superoxydes semblent peu réactifs. Toutefois, ces derniers demeurent des espèces potentiellement toxiques *via* leurs réactions avec le peroxyde d'hydrogène ou le monoxyde d'azote, générant respectivement des radicaux hydroxyles et des anions peroxydites, tous deux très délétères vis-à-vis des matériaux biologiques. La majeure partie des connaissances acquises sur les oxyradicaux est le résultat d'études modèles effectuées par radiolyse de l'eau (ou de l'éthanol) *in vitro*. La radiolyse est un outil précieux pour la détermination rigoureuse des mécanismes bioradicalaires puisqu'elle permet non seulement de produire sélectivement les oxyradicaux, mais également d'analyser quantitativement leurs réactions vis-à-vis de nombreuses cibles biologiques ainsi que vis-à-vis des

antioxydants. Ces données ont permis une meilleure compréhension des phénomènes de stress oxydant *in vivo* impliqués dans plusieurs pathologies (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives...), ainsi que dans les processus de vieillissement. La recherche sur les oxyradicaux et sur les antioxydants reste donc parfaitement d'actualité car de nombreux mécanismes bioradicalaires restent encore à préciser, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Références

- [1] Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L., *N. Engl. J. Med.*, **1989**, 320, p. 915.
 [2] Bonnefont-Rousselot D., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2002**, 5, p. 561.
 [3] Klein J.A., Ackerman S.L., *J. Clin. Invest.*, **2003**, 111, p. 785.
 [4] Jenner P., *Ann. Neurol.*, **2003**, 53, p. S26.
 [5] Migliore L., Coppedè F., *Mut. Res.*, **2002**, 512, p. 135.
 [6] Cadenas E., Davies J.A., *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, 29, p. 222.
 [7] Griending K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M., *Circ. Res.*, **2000**, 86, p. 494.
 [8] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, **1999**.
 [9] Wardman P., Candeias L.P., *Radiat. Res.*, **1996**, 145, p. 523.
 [10] Spinks J.W.T., Woods R.J., Water and inorganic aqueous systems (chap. 7), *Introduction to Radiation Chemistry*, J. Wiley & Sons Inc., New York, **1990**, p. 243.
 [11] Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L., Sauvaigo S., *Mut. Res.*, **1999**, 424, p. 9.
 [12] von Sonntag C., Enzymes (chap. 14), *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, Londres, **1987**, p. 429.
 [13] Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A., *Pharmacol. Rev.*, **1991**, 43, p. 109.
 [14] Lal M., *Radiat. Phys. Chem.*, **1994**, 43 (6), p. 595.

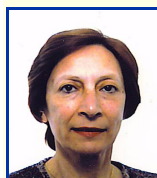


M. Gardès-Albert

Monique Gardès-Albert¹ est professeur à l'Université René Descartes (Paris 5) et responsable du Laboratoire de chimie-physique*.

Dominique Bonnefont-Rousselot² est professeur à l'Université René Descartes et praticien hospitalier à l'Hôpital de la Salpêtrière (AP-HP)**.

Zohreh Abedinzadeh³ est professeur à l'Université René Descartes*.



Z. Abedinzadeh

Daniel Jore⁴ est professeur à l'Université René Descartes et directeur de l'UFR Biomédicale des Saints-Pères*.



D. Bonnefont-Rousselot



D. Jore

* Laboratoire de chimie-physique, UMR 8601 CNRS, UFR Biomédicale des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06.

** Laboratoire de biochimie métabolique et clinique (EA 3617), Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06.

¹ Tél. : 01 42 86 21 79. Fax : 01 42 86 22 13.

Courriel : gardes@biomedicale.univ-paris5.fr

² (UFR) Tél. : 01 53 73 96 13. Fax : 01 53 73 97 08.

Courriel : dominique.rousselot@psl.ap-hop-paris.fr

³ Tél. : 01 42 86 22 65. Fax : 01 42 86 83 87.

Courriel : abedinzadeh@biomedicale.univ-paris5.fr

⁴ Tél. : 01 42 86 21 74. Fax : 01 42 86 22 13.

Courriel : jore@biomedicale.univ-paris5.fr

Dégradation de l'ADN par les rayonnements ionisants

Influence de la structure et de l'environnement

Mélanie Spothem-Maurizot, Marie Begusova et Michel Charlier

Abstract

DNA damaging by ionising radiations. Influence of the structure and of the environment

DNA which bears the genetic information of the cell is the critical target for radiolytic attack. In the nucleus, DNA is not a straight and naked double helix in B-form. The sequence of the bases, the topological stress, the interactions with other partners (proteins) induce structures different from the canonical B-form. The effects of radiations occur through the attack by radicals issued from water radiolysis. The most reactive one is the oxidative hydroxyl radical. The radiolytic process is a chemical process in which both reactivity and accessibility of reactive sites, and consequently the structure of DNA, are involved. We have developed a simulation code to calculate the hydroxyl radical attack of different DNA structures. This procedure uses structural data obtained by either NMR, crystallography or molecular modelling, and accurately fits the experimental results.

Mots-clés

ADN, rayonnements ionisants, structure, radical hydroxyle, stress oxydant.

Key-words

DNA, ionising radiations, structure, hydroxyl radical, oxidative stress.

Les rayonnements ionisants (rayons α , β , γ , X, neutrons, particules lourdes) sont largement utilisés comme auxiliaires de la médecine : sondes en radiodiagnostic, agents destructeurs en radiothérapie anticancéreuse. Leur nocivité potentielle fait aussi l'objet d'une grande attention en direction des personnels normalement ou accidentellement exposés dans l'industrie du nucléaire civil ou militaire, des spationautes, du personnel des services de radiologie, radiothérapie ou de médecine nucléaire. Il s'agit là de radioprotection. Les deux problématiques sont cependant différentes. La radiothérapie suppose la stérilisation d'une tumeur, aussi complètement et rapidement que possible. En dehors des situations accidentelles heureusement fort rares, la radioprotection s'intéresse aux phénomènes très étalés dans le temps, aux conséquences tardives, mais cependant graves. Ce sont les effets stochastiques liés aux faibles ou très faibles expositions. Ces effets intéressent l'ADN : ce sont les inductions de mutations, de remaniements chromosomiques, de modification du génome qui sont à l'origine de désordres cellulaires dramatiques, comme la cancérisation.

La radiobiologie fait souvent appel à deux concepts lorsqu'il s'agit de l'attaque du matériel biologique. Le concept d'effet direct, où la molécule étudiée (ADN, protéine) est elle-même touchée par le rayonnement ionisant, donc ionisée et sujette à une évolution chimique conduisant à une molécule endommagée. Le concept d'effet indirect, où la molécule est attaquée par les radicaux issus de la radiolyse de l'eau (*encadré 1*). Il est bien clair qu'en solution aqueuse, seuls les effets indirects seront visibles car ils seront très majoritaires. Dans une solution d'ADN à 1 mg/mL, qui en physico-chimie est considérée comme concentrée, l'eau représente encore 99,9 % de la masse, et l'ADN ne subira en première approximation qu'une ionisation pour 1 000 produites sur l'eau. On comprend donc que les effets directs, s'ils existent,

ne peuvent se produire que dans des phases où l'ADN est très condensé et l'eau très minoritaire, ce qui n'est jamais le cas, les tissus mous étant composés de 70 à 80 % d'eau.

Nous nous sommes donc intéressés aux effets indirects sur l'ADN, c'est-à-dire à l'attaque par les radicaux issus de la radiolyse de l'eau. En milieu aérobic, seuls les radicaux hydroxyle OH \cdot jouent un rôle important. L'attaque des sites sensibles (sucres, bases) de l'ADN sera une réaction d'oxydation qui nécessite la rencontre entre les deux

Glossaire

ADN en forme B, Z et quadruplex

L'ADN en forme B (Watson-Crick) est une double hélice droite. L'ADN en forme Z est une double hélice gauche qui se forme généralement avec des séquences GC alternées. Le quadruplex est une hélice droite quadruple, ou les plans des bases comportent quatre guanines reliées par des liaisons hydrogène.

FSB, ARB

Coupures franches (*frank strand break*) et coupures révélées par traitement alcalin (*alkali revealed breaks*). Les FSB, observables sur la molécule d'ADN sans aucun traitement postérieur à l'irradiation, résultent généralement de l'oxydation des sucres (désoxyribose). Les ARB apparaissent après traitement en milieu alcalin (pipéridine) aux sites des bases endommagées.

Histones – Core de nucléosome

Les histones sont des protéines associées à l'ADN dans la chromatine. Le core de nucléosome est un assemblage globulaire d'histones, entouré par un fragment d'ADN. C'est le niveau d'organisation primaire de la chromatine.

Sillons de l'ADN

Les squelettes des deux hélices ne sont pas symétriques par rapport à l'axe de la double hélice. De ce fait, deux sillons de largeur et de profondeur différentes sont créés (voir *figure 3* et *encadré 3*).

Télomères

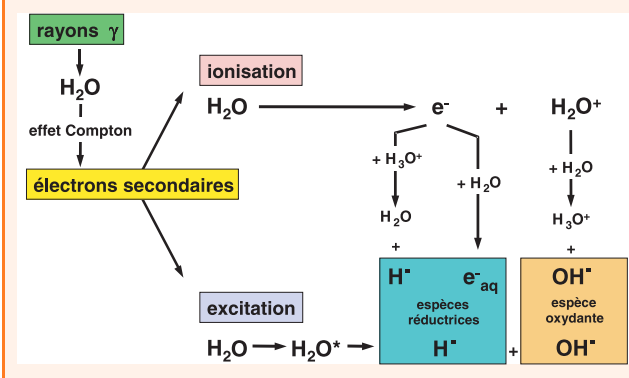
Parties terminales des chromosomes.

Encadré 1

Radiolyse de l'eau

Les rayons γ , neutres, ne sont pas des particules ionisantes. Leur interaction avec la matière se fait principalement par effet Compton. Des électrons secondaires sont générés. Chargés, ils ionisent ou excitent les molécules d'eau, qui se décomposent alors en radicaux : atome d'hydrogène, électron solvaté, radical hydroxyle.

En milieu aérobie, les radicaux réducteurs sont rapidement éliminés par réaction avec l'oxygène moléculaire. Seul subsiste le radical hydroxyle, très oxydant, qui attaque l'ADN.



partenaires de la réaction. Le radical OH^\cdot doit pouvoir arriver au contact du site réactionnel, ce qui suppose une conformation locale adéquate. Le problème que nous nous sommes posé, et que nous avons étudié, est alors celui-ci : comment la structure locale de l'ADN module-t-elle l'attaque des sucres et des bases le long d'une séquence d'ADN ? Et son corollaire : comment des ligands de l'ADN modifient-ils l'attaque des sites où ils sont fixés ?

Le problème n'est pas académique car l'ADN n'est jamais, dans la cellule eucaryote, une double hélice B canonique. Il peut adopter des structures variées [1]. Il est structuré par les histones et soumis à un stress topologique important. Des régions en forme Z peuvent apparaître en amont des zones de transcription, les télomères des chromosomes peuvent adopter des structures en quadruple hélice (quadruplex). L'ADN est déformé localement par les protéines qui interviennent dans la régulation, la traduction, la transcription, la réparation. Cela conduit évidemment à l'étude de la radiolyse des complexes ADN-protéines, que nous ne ferons qu'évoquer ici.

Mécanismes et sites d'attaque

Sur l'ADN, les sites d'attaque du radical hydroxyle OH^\cdot sont soit portés par le sucre (désoxyribose), soit par les bases A, T, G et C [2].

Sur le sucre, le radical OH^\cdot va ôter un atome d'hydrogène et laisser un radical centré sur un carbone. Le devenir le plus probable de ce radical sera une rupture du cycle furanne avec libération de la base. La situation ultime la plus courante est une extrémité 5'-phosphate en aval et une extrémité 3'-phosphate ou 3'-phosphoglycolate en amont. Ces coupures sont appelées coupures franches (*frank strand breaks*, FSB) car elles sont directement observables après l'irradiation.

Les bases sont des résidus à forte composante aromatique. Les radicaux OH^\cdot pourront abstraire un atome d'hydrogène, par exemple sur le méthyle de la thymine, mais beaucoup plus fréquemment s'additionner sur les carbones des

liaisons π : C5 et C6 des pyrimidines, C4, C5 et C8 des purines. *In fine*, les pyrimidines donneront majoritairement des dérivés 5-hydroxy, et les purines, soit des formamidopyrimidines, soit des dérivés 8-oxo. La majorité de ces bases modifiées ont leur liaison N-glycosidique fragilisée, ce qui permet de libérer la base lors d'un traitement alcalin. La liaison phosphodiester est alors aussi fragilisée, et le traitement alcalin conduira à une rupture de la chaîne ; ce sont les coupures révélées en milieu alcalin (*alkali revealed breaks*, ARB), essentiellement dues aux altérations des bases [3].

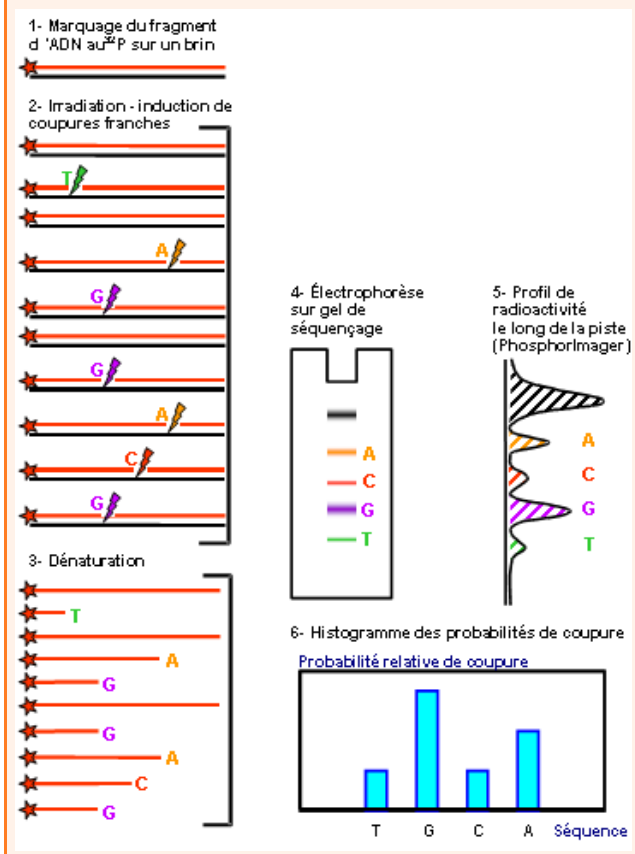
Modulation de l'attaque par la structure

L'étude de la probabilité d'attaque radiolytique - FSB ou ARB - en chaque site nucléotidique de l'ADN utilise la technique d'électrophorèse sur gel de séquençage [4]. Le brin d'ADN que l'on veut étudier est marqué, puis irradié. Si l'ADN n'est soumis à aucun traitement avant électrophorèse, on révèle uniquement les FSB, c'est-à-dire essentiellement les attaques des sucres (*encadré 2*). Si l'ADN est soumis à un

Encadré 2

Probabilité de coupure franche (FSB)

Après marquage d'un des deux brins (1), l'ADN est irradié (2), ce qui induit des coupures franches au niveau des sucres et des attaques des bases. Les coupures franches sont révélées directement par séparation des fragments générés sur gel de séquençage (4). A une bande correspond un oligonucléotide de longueur donnée qui porte l'extrémité marquée. L'intensité de cette bande (5) est proportionnelle à la quantité d'oligonucléotide correspondant, donc à la probabilité de coupure (6) en son extrémité non marquée.



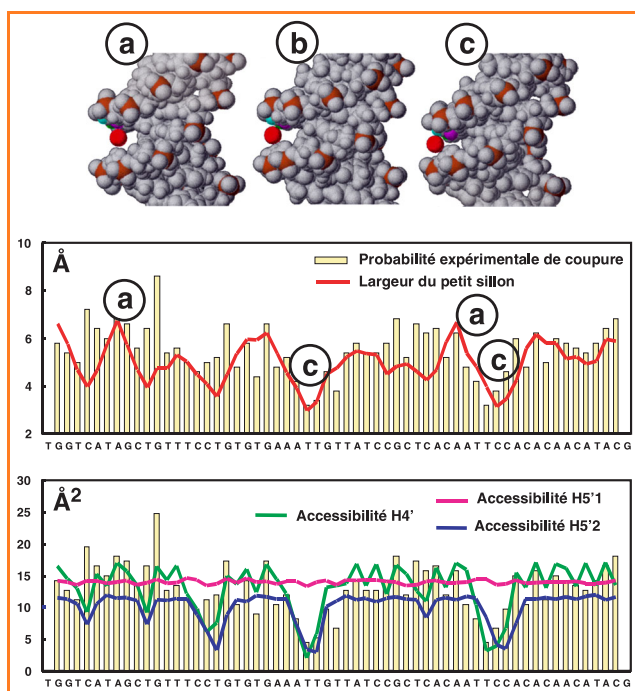


Figure 1 - Largeur du petit sillon et accessibilité des atomes H4' et H5' du désoxyribose.

Le modèle montre la pénétration d'un radical OH[•] à l'intérieur d'un petit sillon large (a), moyen (b) et étroit (c). Les courbes représentent les probabilités d'attaque mesurées expérimentalement (histogrammes) auxquelles sont superposées la largeur du petit sillon (partie médiane) et les accessibilités des atomes H4', H5'1 et H5'2 (partie basse).

traitement alcalin avant l'électrophorèse, on révèle alors la somme FSB + ARB, c'est-à-dire l'ensemble des attaques aux sucres et aux bases.

L'ADN que nous avons utilisé pour cette étude est un fragment de 80 paires de bases encadrant le promoteur et l'opérateur du gène *lac* chez *E. coli* [5-6]. La figure 1 montre les probabilités de coupure franche au long de la partie centrale du fragment.

On constate que tous les sucres sont des sites d'attaque potentiels, mais que tous ne sont pas attaqués avec la même

probabilité. Deux régions de l'ADN au voisinage de séquences 5'-AATT sont significativement moins attaquées que la moyenne. Ces régions sont connues pour présenter une courbure vers le petit sillon, qui se trouve alors légèrement refermé.

A l'aide d'un logiciel de modélisation moléculaire (SYBYL), nous avons construit un fragment d'ADN comportant les 67 paires de bases centrales du fragment étudié, et la structure a été établie par minimisation d'énergie. Il est alors possible de déterminer, en chaque point de la séquence, la largeur du petit sillon, et l'accessibilité au radical OH[•] des atomes d'hydrogène (encadré 3).

Sur la figure 1, nous avons superposé au profil des probabilités de FSB, la largeur du petit sillon et les accessibilités aux radicaux OH[•] des atomes H4', H5'1 et H5'2 des sucres, calculés tout au long de la séquence du fragment.

Nous observons une excellente corrélation entre la probabilité de coupure franche et la largeur du petit sillon d'une part, et les accessibilités aux radicaux OH[•] des atomes H4' et H5'2 d'autre part, alors que l'accessibilité de l'atome H5'1 ne varie pas au long de la séquence.

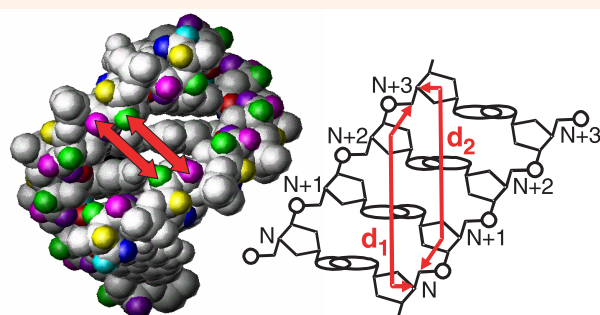
Il apparaît donc clairement que dans les régions de l'ADN où le petit sillon a une largeur inférieure à 4,5 Å, et où les accessibilités des atomes H4' et H5'2 sont inférieures à 15 et 11 Å² respectivement, la probabilité d'induction d'une coupure franche résultant de l'attaque du sucre est réduite. Il apparaît aussi clairement que dès que la largeur du petit sillon dépasse 4,5 Å, les accessibilités des atomes H4' et H5' du sucre ont atteint leurs valeurs maximales. La probabilité d'induire des FSB sera plus faible dans les régions où le petit sillon est resserré. Il est cependant vain d'imaginer qu'elle puisse être significativement plus grande dans des régions où le petit sillon s'élargit au-delà de 4,5 Å.

Simulation de l'attaque

Pour que l'attaque oxydante ait lieu, il est indispensable que les sites réactifs soient accessibles aux radicaux OH[•]. Cependant, deux sites également accessibles mais n'ayant pas la même réactivité vis-à-vis du radical OH[•] ne conduiront pas à des probabilités de coupure identiques.

Encadré 3

Largeur du petit sillon - Accessibilités



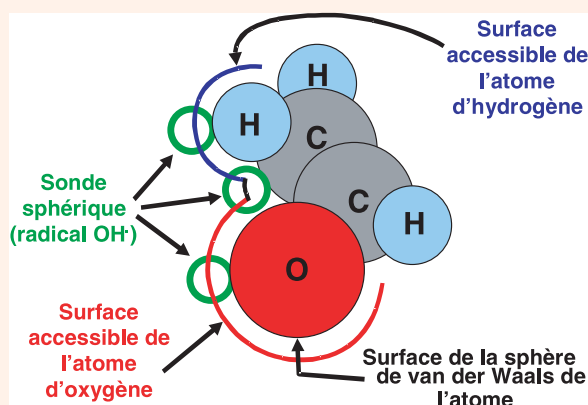
La largeur du petit sillon est la moyenne des distances d_1 et d_2 définies par :

d_1 : distance entre le centre de l'atome H4' du résidu N sur le brin 3' et l'atome H5'1 du résidu N+3 sur le brin 5'.

d_2 : distance entre le centre de l'atome H5'1 du résidu N sur le brin 3' et l'atome H4' du résidu N+3 sur le brin 5'.

On fait rouler sur la molécule, représentée par les sphères de van der Waals des atomes, une sonde sphérique (ici, le radical OH[•])

pour laquelle on veut évaluer les accessibilités des atomes de la molécule. La surface accessible, ou accessibilité d'un atome à la sonde, est la surface de la portion de sphère engendrée par le centre de la sonde tant qu'elle reste en contact avec l'atome considéré.



Nous avons mis au point un code de calcul permettant la simulation de l'attaque oxydante par OH^\cdot [6-8]. Par l'intermédiaire de la structure, il tient compte des accessibilités des sites sensibles, et il permet aussi de tenir compte de leur réactivité (figure 2).

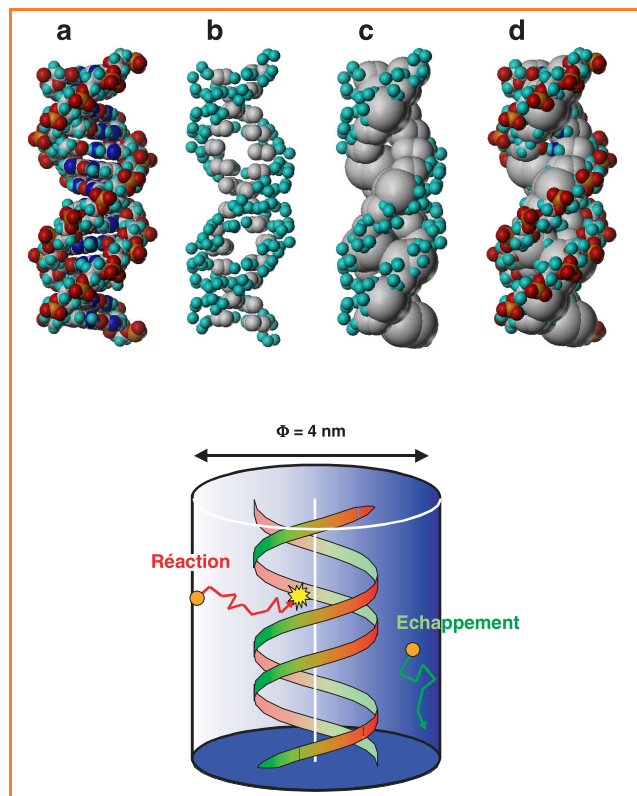


Figure 2 - En haut : différentes représentations de l'ADN en forme B.

En bas : schéma du principe de la simulation RADACK.

a : tous les atomes sont représentés avec leur rayon de van der Waals.
b : seuls les atomes réactifs sont représentés avec leur rayon de van der Waals.

c : mêmes atomes qu'en b, mais avec leur rayon de réactivité $r_{\text{OH}, A}$.

d : les atomes non réactifs ont été rajoutés avec leur rayon de van der Waals. Le radical OH^\cdot « voit » l'ADN tel qu'en d.

Les coordonnées atomiques de la molécule d'ADN étant connues (cristallographie, RMN, modélisation moléculaire), chaque atome A est représenté par une sphère dont le rayon est le rayon de van der Waals si A n'est pas réactif, ou, s'il est réactif, par le rayon $r_{\text{OH}, A}$, que nous appellerons rayon de réactivité. Le rayon $r_{\text{OH}, A}$ est proportionnel à la constante de vitesse de réaction $k_{\text{OH}, A}$ du radical OH^\cdot avec l'atome A [9]. C'est par cet intermédiaire que la réactivité est prise en compte.

On génère alors, à l'intérieur d'un volume de travail entourant l'ADN, des radicaux OH^\cdot que l'on fait se déplacer au hasard dans toutes les directions de l'espace par pas de 1 Å. Quand le radical rencontre la sphère représentant un atome non réactif, il reprend son parcours au hasard dans la solution. Quand il rencontre une sphère représentant un atome réactif, on comptabilise une réaction en ce site. On génère un nombre suffisant de radicaux pour que la précision soit acceptable. Pour chaque site sensible du sucre (par exemple H4', H5'1 et H5'2) ou des bases, on dénombre les réactions sur les atomes réactifs. On obtient alors les probabilités relatives d'attaque en chaque site tout au long de la séquence.

Cette simulation, que nous avons appelée RADACK (**RADI**ation **attACK**), a été utilisée pour décrire l'attaque oxydante des radiations sur l'ADN en forme B, Z, en quadruplex, et sur des complexes ADN-protéines (figure 2).

L'ADN en forme B

La simulation par RADACK de l'attaque de l'ADN en forme B a été réalisée sur le même fragment que celui sur lequel nous avons effectué les mesures d'accessibilité et de largeur du petit sillon [6].

FSB : pour les atomes très exposés en surface de la molécule d'ADN (H5'1), les accessibilités comme les probabilités d'attaque sont importantes. Pour les atomes très enterrés (H1'), l'accessibilité comme la probabilité d'attaque sont très faibles. Pour les situations intermédiaires (H4', H5'2, H2'1 et H2'2), les probabilités d'attaque chutent plus vite que les accessibilités. Même si l'atome reste accessible, il est plus difficile au radical de l'atteindre lors de son parcours stochastique, car les probabilités de rencontrer d'autres atomes réactifs sur son parcours sont importantes. Nous avons donc considéré en première analyse que l'abstraction des seuls hydrogènes H4', H5'1 et H5'2, qui donnent des radicaux centrés sur les carbones C4' et C5', conduisait à un FSB. Une régression multilinéaire sur les données expérimentales permet de déduire que les radicaux centrés en C4' ont une probabilité trois fois plus grande d'évoluer vers un FSB que les radicaux centrés en C5'. La figure 3 montre la probabilité relative d'induire un FSB calculée par RADACK (courbe rouge) superposée au profil expérimental.

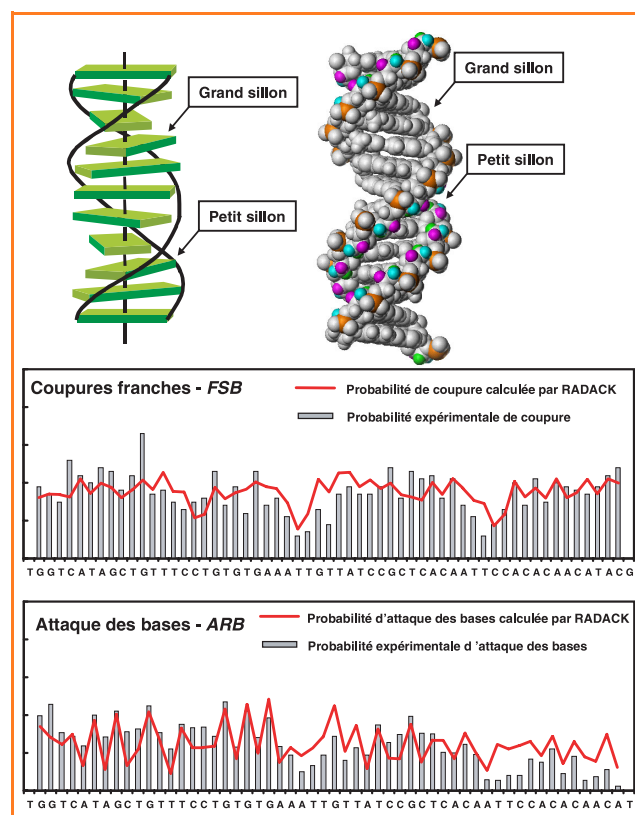


Figure 3 - Radiolyse de l'ADN en forme B.

Les histogrammes sont les probabilités de coupure franche ou de coupure révélée par traitement alcalin. Les courbes en rouge sont les simulations RADACK correspondantes.

ARB : une étude identique peut être effectuée sur les dommages aux bases qui vont, après traitement alcalin, être transformés en coupures. Une régression multilinéaire sur les valeurs expérimentales montre que la faculté de transformer un site où la base est modifiée en coupure de chaîne par traitement alcalin est, pour les quatre bases T : A : C : G, dans les proportions 4 : 2 : 2 : 1 (figure 3).

L'ADN en forme Z

À partir d'expériences de radiolyse de l'ADN en forme Z (séquence GC alternée en hélice gauche) [10], les mêmes traitements ont pu être appliqués : calculs des probabilités d'attaque par RADACK et ajustement sur les résultats expérimentaux [8]. Les résultats sont montrés sur la figure 4.

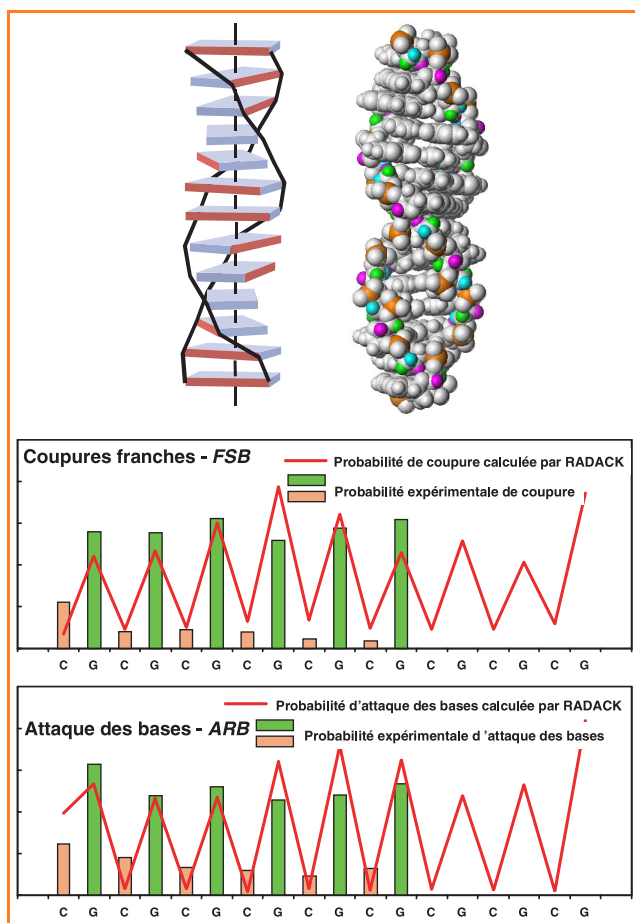


Figure 4 - Radiolyse de l'ADN en forme Z.

Les histogrammes sont les probabilités de coupure franche ou de coupure révélée par traitement alcalin. Les courbes en rouge sont les simulations RADACK correspondantes.

Le quadruplex

La séquence étudiée est $G_4(T_4G_4)_3$, analogue de la séquence répétée dans les télomères des chromosomes d'*Oxytricha*. La structure utilisée pour les calculs RADACK a été déterminée par RMN par Wang et Patel [11]. L'ajustement des probabilités d'attaques calculées par RADACK [12] sur les sucres et les bases nous a conduits, après ajustement sur les valeurs expérimentales, aux profils montrés sur la figure 5.

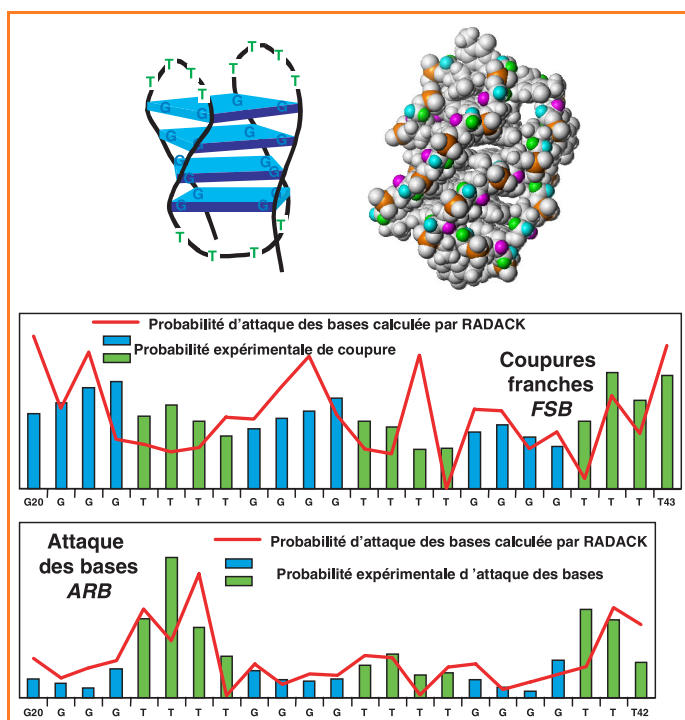


Figure 5 - Radiolyse de l'ADN en quadruplex.

Les histogrammes sont les probabilités de coupure franche ou de coupure révélée par traitement alcalin. Les courbes en rouge sont les simulations RADACK correspondantes.

Complexes ADN-protéines

La fixation d'une protéine sur l'ADN modifie, dans la région où elle est fixée, la possibilité pour un radical OH[•] d'attaquer les sites sensibles de l'ADN. En général, elle modifie localement la structure de l'ADN, souvent en provoquant une courbure, ce qui a pour effet de resserrer les brins vers l'intérieur de la courbure et de les écarter vers l'extérieur. Mais surtout, la protéine agit comme un écran qui empêche simplement les radicaux de venir en contact de l'ADN. Les chaînes latérales des acides aminés qui constituent la protéine sont, pour la majorité d'entre eux, de très bons capteurs de radicaux OH[•]. Il s'ensuit donc qu'une protéine fixée sur l'ADN le protège de la radiolyse, et que cette protection s'exerce au site de fixation de la protéine. La figure 6 montre les empreintes par radiolyse obtenues avec trois systèmes : le répresseur de l'opéron lactose d'*E. coli*, fixé sur le site opérateur, la protéine CRP d'*E. coli*, fixée sur son site spécifique, et l'octamère d'histones fixé sur un ADN de 146 paires de bases, formant le core de nucléosome extrait de sang de poulet [5].

Dans les trois cas, on observe des régions de l'ADN n'ayant subi aucun FSB. Pour les protéines de régulation (répresseur et CRP), ces régions sont au nombre de trois, correspondant aux parties de l'ADN en contact avec la protéine sur une distance d'un peu plus de 20 paires de bases [5]. Pour le core de nucléosome [5, 13], les parties de l'ADN dirigées vers le centre du nucléosome sont protégées de l'attaque par l'ensemble des histones comblant la partie centrale. La protection s'exerce donc périodiquement, environ toutes les 10,5 paires de bases, sur toute la longueur de l'ADN en contact avec les histones [14].

A partir de la structure des complexes entre l'opérateur *lac* et le domaine de la protéine qui interagit avec lui, obtenus soit

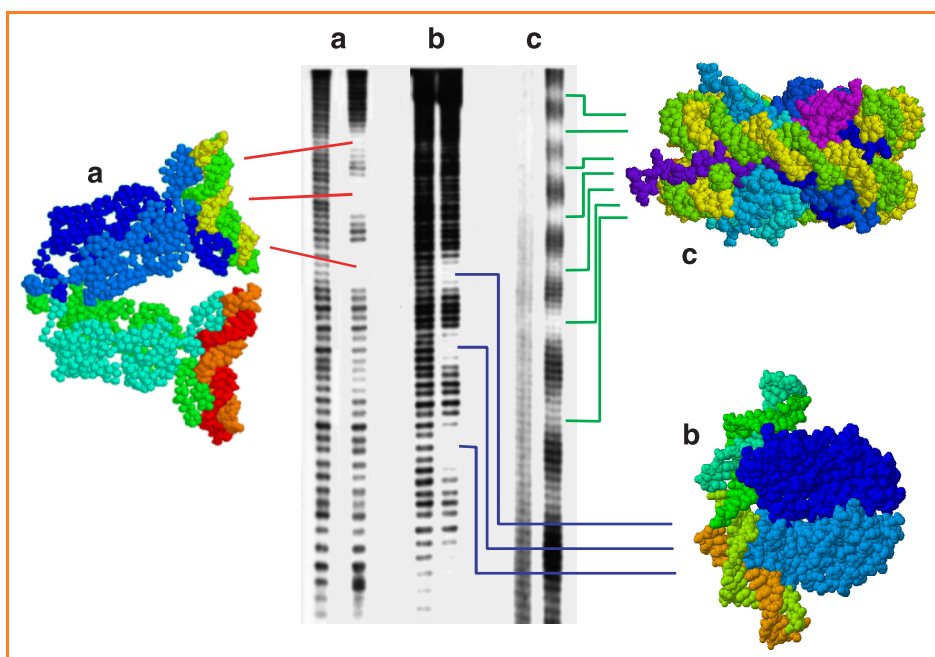


Figure 6 - Empreintes par radiolyse laissées sur l'ADN par le répresseur de l'opéron lactose d'*E. coli* (a), la protéine CRP d'*E. coli* (b) et l'octamère d'histones dans le core de nucléosome (c).

Dans les trois cas, les pistes de droite représentent la radiolyse de l'ADN seul. Les traits de couleur montrent sur les pistes de gauche les zones de l'ADN qui ont été protégées de la radiolyse par la présence des protéines fixées. Les représentations des protéines ont été réalisées à partir des fichiers 1LBG, 1CGP et 1AOI de la Protein Data Bank.

par RMN [15], soit par cristallographie aux rayons X [16], nous avons pu calculer en utilisant RADACK, les probabilités d'attaque de l'ADN dans les complexes en présence de la protéine. L'accord est excellent entre les profils d'attaque mesurés expérimentalement et les résultats de la simulation RADACK [17].

Conclusion

La radiolyse de l'ADN en milieu aérobie est majoritairement due à l'attaque oxydante par le radical OH[•]. L'attaque des sites sensibles aux radicaux est très dépendante de leur accessibilité, c'est-à-dire de la structure de l'ADN et de la présence de ligands. La simulation de l'attaque radicalaire par la méthode RADACK est en remarquable accord avec l'expérience dans les cas étudiés. Ceci permet d'espérer que cette simulation, explicative, peut devenir prédictive : à partir d'une structure connue (ADN, protéine, complexe), il deviendrait possible, *in silico*, de prévoir la position et la sensibilité des sites potentiels d'attaque radiolytique. L'intérêt fondamental est évident : c'est la compréhension des mécanismes moléculaires de la radiolyse de l'ADN. L'intérêt médical est en aval, et peut-être à plus long terme. Tout progrès dans la perception des mécanismes de la radiolyse de l'ADN peut déboucher sur une meilleure utilisation de la radiothérapie, ou une mise en œuvre plus pertinente et plus efficace des techniques de radioprotection.

Références

- [1] Saenger W., *Principles of nucleic acid structure*, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1984.
- [2] Von Sonntag C., *The chemical bases of radiation biology*, Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia, 1987.
- [3] Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J.-L., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1997, 31, p. 1.
- [4] Charlier M., Spothem-Maurizot M., *DNA-protein interactions, A practical approach.*, A. Travers, M. Buckle (eds), Oxford University Press, New York, 2000, p. 175.
- [5] Franchet-Beuzit J., Spothem-Maurizot M., Sabattier R., Blazy-Baudras B., Charlier M., *Biochemistry*, 1993, 32, p. 2104.
- [6] Sy D., Savoye C., Begusova M., Michalik V., Charlier M., Spothem-Maurizot M., *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, 72, p. 147.

- [7] Michalik V., Spothem-Maurizot M., Charlier M., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1995, 13, p. 565.
- [8] Begusova M., Spothem-Maurizot M., Sy D., Michalik V., Charlier M., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2001, 19, p. 141.
- [9] Smoluchowski M.V., *Physikalische Z.*, 1916, 17, p. 557.
- [10] Tartier L., Michalik V., Spothem-Maurizot M., Rahmouni A.R., Sabattier R., Charlier M., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, p. 5565.
- [11] Wang Y., Patel D.J., *J. Mo. Biol.*, 1995, 251, p. 76.
- [12] Begusova M., Tartier L., Sy D., Spothem-Maurizot M., Michalik V., Charlier M., *Int. J. Radiat. Biol.*, 1999, 75, p. 913.
- [13] Lüger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J., *Nature*, 1997, 389, p. 251.
- [14] Begusova M., Sy D., Charlier M., Spothem-Maurizot M., *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000, 76, p. 1063.
- [15] Spronk C., Bonvin A., Radha P., Melacini G., Boelens R., Kaptein R., *Structure*, 1999, 7, p. 1483.
- [16] Lewis M., Chang G., Horton N., Kercher M., Pace H., Schumacher M., Brennan R., Lu P., *Science*, 1996, 271, p. 1247.
- [17] Begusova M., Eon S., Sy D., Culard F., Charlier M., Spothem-Maurizot M., *Int. J. Radiat. Biol.*, 2001, 77, p. 645.



M. Spothem-Maurizot

Mélanie Spothem-Maurizot¹ est chargée de recherche à l'Inserm et **Michel Charlier**² est directeur de recherche CNRS au Centre de biophysique moléculaire*.



M. Charlier



M. Begusova

Marie Begusova

est ingénieur en sciences nucléaires à l'Institut de physique nucléaire de Prague**.

* Centre de biophysique moléculaire, CNRS, rue Charles-Sadron, 45071 Orléans Cedex 2.

¹ Tél. : 02 38 25 55 75. Fax : 02 38 63 15 17.

Courriel : spotheim@cns-orleans.fr

² Tél. : 02 38 25 55 49. Fax : 02 38 63 15 17.

Courriel : micharli@cns-orleans.fr

** Institut de physique nucléaire, Département de dosimétrie des radiations, Na Truhlarce 39, CZ-18086 Prague (République Tchèque).

Tél. : +420 283 842 791. Fax : +420 283 842 788.

Courriel : begusova@ujf.cas.cz

Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux

Bertrand Friguet

Abstract

Aging at the cellular and molecular levels and future perspectives

The damage induced to cellular components by reactive oxygen species is believed to be a main contributor to the aging process. Cellular aging is characterized by a build up of oxidized proteins that can be due to increased protein damage, decreased oxidized protein elimination (i.e. degradation or repair), or the combination of both mechanisms. The proteasome is the major intracellular proteolytic system involved in both degradation of oxidatively modified proteins and general turnover of cytosolic proteins. Evidence has been provided that proteasome function is declining with age. Other protein maintenance systems, such as the repair enzyme peptide methionine sulfoxide reductases or the Lon mitochondrial protease, seem to be also affected with age, and may therefore contribute to the age-associated impairment of protein quality control.

Mots-clés Key-words

**Viellissement, dommages oxydatifs, protéines, maintenance, protéasome.
Aging, oxidative damage, proteins, maintenance, proteasome.**

Le déclin progressif et irréversible des différentes fonctions de l'organisme durant la dernière partie de sa vie, communément défini comme le processus du vieillissement, est un phénomène complexe qui implique des aspects génétiques mais qui est surtout lié à une forte influence de l'environnement. Ainsi, au cours du vieillissement cellulaire, on assiste à une accumulation de composants cellulaires endommagés (acides nucléiques, lipides, protéines) dont l'élimination et/ou la réparation semble ne plus être aussi efficace que celle assurée par la cellule jeune. La formation de composants cellulaires endommagés s'effectue principalement par des réactions impliquant les espèces réactives de l'oxygène telles que l'anion superoxyde, $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , ou le radical hydroxyle, OH^{\bullet} . D'autres réactions impliquant la fixation sur les macromolécules de glucides ou d'aldéhydes issus de la peroxydation lipidique contribuent également à la formation de composants cellulaires endommagés.

L'idée que les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène constituent un facteur important dans le processus du vieillissement a été proposée dès 1956 par D. Harman dans sa « Free radical theory of aging » [1]. Par conséquent, le vieillissement cellulaire apparaît comme fortement dépendant de la production des espèces réactives de l'oxygène, des défenses antioxydantes, mais également des systèmes de maintenance cellulaire qui sont responsables de l'élimination ou de la réparation des composants cellulaires endommagés [2-3]. Cette théorie déjà ancienne a reçu le support récent d'études génétiques qui ont montré pour des organismes modèles comme *Drosophila melanogaster* qu'un allongement de la vie pouvait résulter de la surexpression dans des animaux transgéniques d'enzymes antioxydantes telles que la catalase et la superoxyde dismutase (tableau I). Il a été observé que l'allongement de la vie noté chez certains mutants de *Caenorhabditis elegans* était associé à une résistance accrue aux espèces réactives de l'oxygène et à une activité élevée des enzymes antioxydantes [4]. Les

systèmes de maintenance cellulaire ont également été proposés plus récemment comme jouant un rôle majeur dans le vieillissement par T. Kirkwood dans sa « Disposable soma theory of aging » [5]. De manière intéressante, il a été montré que la restriction calorique, qui constitue l'une des seules interventions permettant de ralentir le vieillissement chez les mammifères, agissait en modulant l'accumulation des composants cellulaires endommagés, notamment en stimulant le renouvellement des protéines [6].

Dommages oxydatifs et modifications des macromolécules avec l'âge

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont formées à l'intérieur même de la cellule, principalement par la chaîne de transport d'électron mitochondriale pendant la respiration aérobie, et résultent en la production du radical instable superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Le superoxyde est transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase qui, en présence de traces de métaux (Cu^+ ou Fe^{2+}), est lui-même converti par la réaction de Fenton en radical hydroxyle (OH^{\bullet}), espèce réactive de l'oxygène la plus délétère (figure 1). Les peroxysomes (organelles intervenant dans le métabolisme oxydatif des molécules organiques) contribuent également à la formation endogène d'ERO. Les stress

Glossaire

Animaux transgéniques

Animaux à qui on a transféré un ou plusieurs gènes supplémentaires.

Cellules post-mitotiques

Cellules n'ayant plus la capacité de se diviser.

Homéostasie

Stabilisation des différentes constantes physiologiques.

Protéasome

Complexe protéolytique multicatalytique intracellulaire.

Thioredoxine

Petite protéine impliquée dans l'équilibre redox intracellulaire.

Tableau I - Relations entre résistance au stress oxydant et longévité.

L'augmentation de l'expression des différents gènes dans les organismes modèles a été obtenue par transfection. SOD : superoxyde dismutase ; msrA : peptide méthionine sulfoxyde réductase A.

| Systèmes | Effet sur la durée de vie | Effet sur le stress oxydant | Références |
|--|--|---|---|
| Manipulation génétique | | | |
| Mouche (<i>Drosophila melanogaster</i>) | | | |
| Augmentation de la catalase | pas d'effet | réduction de la sensibilité | Orr et Sohal (1992) Griswold <i>et al.</i> (1993) Sun et Tower (1999) |
| Augmentation de la SOD 1 | pas d'effet augmentation dans certaines souches | pas d'effet réduction de la sensibilité dans ces mêmes souches | Seto <i>et al.</i> (1990) Reveillaud <i>et al.</i> (1991) Orr et Sohal (1993) |
| Augmentation de la catalase et de la SOD 1 | augmentation | réduction de la sensibilité | Staveley <i>et al.</i> (1990) Parkes <i>et al.</i> (1998) Sun et Tower (1999) |
| Augmentation de la SOD 2 | pas d'effet augmentation | pas d'effet non déterminé | Orr et Sohal (1994) Mockett <i>et al.</i> (1999a) Sun <i>et al.</i> (2002) |
| Augmentation de la glutathion Réductase | augmentation de la durée de vie sous hypoxie | réduction de l'oxydation des protéines sous hypoxie | Mockett <i>et al.</i> (1999b) |
| Augmentation de la msrA | augmentation | augmentation de la résistance | Ruan <i>et al.</i> (2002) |
| Souris (<i>Mus musculus</i>) | | | |
| Augmentation de la SOD 1 | non déterminé | augmentation de la sensibilité | Epstein <i>et al.</i> (1987) Cardozo-Pelaez <i>et al.</i> (1998) |

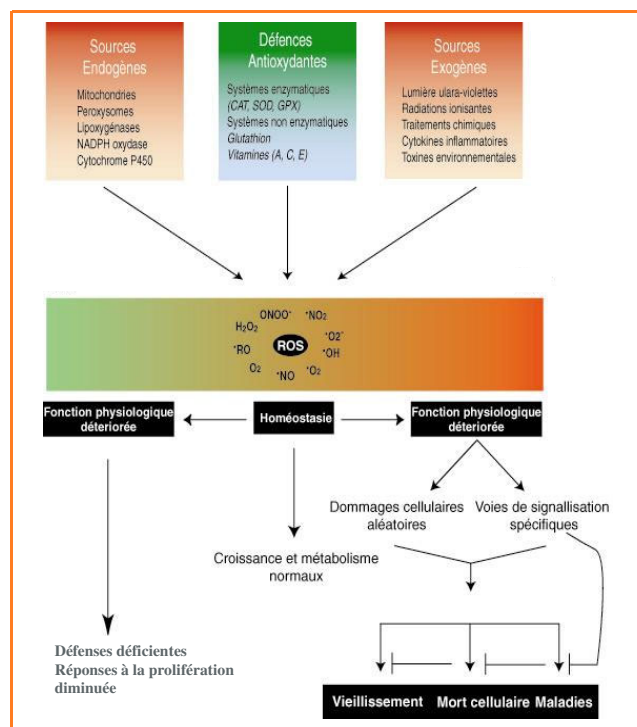


Figure 1 - Implication du stress oxydant dans le vieillissement.

Le système de défense vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est assuré par des systèmes enzymatiques comme la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx). L'abaissement de la quantité de ERO en dessous du niveau physiologique nécessaire à la cellule peut perturber les réponses face aux agressions extérieures ou le maintien de la prolifération cellulaire. Une augmentation des ERO peut entraîner la mort cellulaire, une accélération du vieillissement ou des pathologies liées à l'âge. (d'après [4]).

externes de nature physique (comme les rayonnements ultraviolets) ou chimique (toxines ou xénobiotiques) peuvent aussi participer à la production intracellulaire d'ERO.

Pour piéger ces ERO, la cellule dispose d'un arsenal de défenses antioxydantes, à la fois enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, peroxyredoxines, etc.), et non enzymatiques (vitamine C, vitamine E, flavonoïdes, caroténoïdes, etc.). Cependant, lorsque leur production devient trop importante pour pouvoir être totalement piégée par les défenses antioxydantes, ces espèces réactives de l'oxygène vont endommager les macromolécules biologiques (lipides, protéines et acides nucléiques), entraînant des modifications irréversibles.

A l'inverse de l'acide desoxyribonucléique (ADN des chromosomes et ADN mitochondrial) pour lequel la cellule dispose de systèmes de réparation sophistiqués, il n'y a quasiment pas de système de réparation des protéines puisque que seule l'oxydation des cystéines en pont disulfure ou disulfure mixte et celle de la méthionine en méthionine sulfoxyde peuvent être réversées par des systèmes enzymatiques spécifiques, respectivement les systèmes thioredoxine/thioredoxine réductase et peptide méthionine sulfoxyde réductases. Dans les protéines, tous les acides aminés sont des cibles potentielles de l'attaque par les espèces réactives de l'oxygène, particulièrement par le radical hydroxyle. De plus, l'oxydation de la chaîne polypeptidique peut conduire à des cassures ou encore à des réticulations inter- ou intramoléculaires. Les résidus cystéine, méthionine, tyrosine, phénylalanine, tryptophane et histidine sont les plus sensibles et les résidus proline, arginine et lysine sont tout particulièrement susceptibles à l'oxydation catalysée par les métaux et sont convertis en dérivés carbonyles (tableau II).

D'autres réactions, mettant en jeu des oxydations et impliquant la fixation sur les protéines de glucides (réactions de glycation et de glycoxydation) ou d'aldéhydes issus de la peroxydation lipidique, résultent aussi en la formation d'adduits (dont certains présentent également des groupements carbonyles) sur les résidus lysine, arginine, histidine ou cystéine des protéines. Les protéines ainsi modifiées sont généralement affectées dans leur fonction,

Tableau II - Acides aminés les plus sensibles à l'oxydation.

La formation d'oxo-acides et d'aldéhydes comme produits d'oxydation de certains acides aminés conduit à l'apparition de groupements carbonyles sur les protéines oxydées.

| Acide aminé | Produits d'oxydation |
|------------------|--|
| Cystéine | Pont disulfure, acide sulfénique, acide sulfonique, acide sulfonique |
| Méthionine | Méthionine sulfoxyde, méthionine sulfone |
| Tryptophane | Hydroxytryptophane, kynurénine, hydroxy- et formyl-kynurénine |
| Phénylalanine | Hydroxyphénylalanine, dihydroxyphénylalanine |
| Tyrosine | Dihydroxyphénylalanine, ponts tyrosine-tyrosine, nitrotyrosine |
| Histidine | Oxohistidine, asparagine, acide aspartique |
| Arginine | Semialdéhyde glutamique |
| Lysine | Semialdéhyde α -aminoadipique |
| Proline | Semialdéhyde glutamique, hydroxyproline, pyrrolidone |
| Thréonine | Acide 2-amino 3-cetobutyrique |
| Acide glutamique | Acide oxalique, acide pyruvique |

voire complètement inactivées. Les dommages oxydatifs aux protéines ont été associés à la dégénérescence cellulaire qui apparaît au cours du vieillissement, mais également à de nombreuses maladies liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, la cataracte, la sclérose amyotrophique latérale ou l'arthrite rhumatoïde.

Enfin, il convient de noter que l'ADN chromosomique ou mitochondrial accumule des mutations ou délétions avec l'âge [7], dont une des causes principales est son exposition à des agents chimiques et physiques parmi lesquels figurent en première ligne les espèces réactives de l'oxygène. Dans la mesure où ces dommages affectent la fidélité de la transcription et de la traduction, ils peuvent contribuer à l'accumulation des protéines oxydées, les protéines aberrantes ainsi formées étant particulièrement susceptibles aux modifications par oxydation [8].

L'une des questions importantes à résoudre consiste à savoir si toutes les protéines cellulaires sont sensibles aux modifications oxydatives ou bien s'il existe des protéines qui seraient des cibles préférentielles des dommages. Des études récentes effectuées chez *Drosophila melanogaster* ont effectivement montré que deux protéines mitochondriales, l'aconitase et l'adénine nucléotide translocase, étaient des cibles privilégiées des dommages oxydatifs [9]. La perturbation de l'homéostasie redox observée dans le vieillissement pourrait aussi affecter spécifiquement certaines voies de signalisation, des facteurs impliqués dans la transcription et la traduction, ou encore des enzymes clés du métabolisme pour lesquels il a été montré qu'il existe une régulation de leur activité via l'état d'oxydation de résidus cystéines critiques.

Élimination des protéines endommagées par oxydation

A l'exception notable de l'oxydation des cystéines et des méthionines pour lesquelles des systèmes spécifiques de réversion de l'oxydation ont été mis en évidence, l'oxydation des autres acides aminés apparaît comme un phénomène irréversible [10]. D'autre part, les systèmes de réparation des cystéines et des méthionines peuvent réguler l'activité

d'enzymes ou de protéines si celle-ci est modulée par l'état d'oxydation de ces résidus.

Dans toutes les autres situations où la modification d'acides aminés de la chaîne polypeptidique est considérée comme irréversible, le problème se pose quant à l'élimination de la protéine oxydée par voie de dégradation. Au niveau cellulaire, aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, la dégradation des protéines oxydées est assurée principalement par le protéasome, un complexe multicatalytique protéolytique de haut poids moléculaire [11]. Le protéasome abrite trois types d'activité protéolytique dans sa cavité catalytique : « trypsin-like », « chymotrypsin-like » et « peptidylglutamyl-peptide hydrolase ». La dégradation des protéines oxydées s'effectue par le protéasome 20S selon un mécanisme indépendant de l'ubiquitine et de l'ATP [12]. Le protéasome, ubiquitaire chez les eucaryotes et les archaebactéries, participe également au renouvellement basal des protéines intracellulaires, processus complexe jouant un rôle majeur dans l'homéostasie et la survie cellulaire. Il assure aussi la dégradation ciblée des protéines marquées par l'ubiquitine par l'intermédiaire de son activateur PA 700 (ou complexe 19S qui, associé au protéasome 20S, forme le protéasome 26S) qui fixe sélectivement les chaînes de poly-ubiquitine couplées aux protéines. A ce titre, le protéasome participe à nombre de fonctions essentielles de la cellule telles que le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la présentation des antigènes, la réparation de l'ADN, la dégradation de différents enzymes clés du métabolisme, ainsi que la protéolyse spécifique de certaines protéines régulatrices suite à leur oxydation. Il a été montré que les protéines modifiées par le produit de peroxydation lipidique, 4-hydroxy-2-nonenal, lors d'un stress oxydant induit par nitroacétate ferrique dans le rein de rat [13], ainsi que les protéines portant des adduits carboxyméthyl-lysine issues du traitement de fibroblastes de derme humain par le glyoxal, étaient ubiquitinylées [14].

En général, les protéines oxydées sont plus thermolabiles et deviennent plus susceptibles à la dégradation par le protéasome. Cependant, les protéines très endommagées par oxydation peuvent devenir résistantes à la dégradation, ce qui pourrait expliquer leur accumulation. Ainsi, il a été montré que les protéines modifiées par le produit de peroxydation lipidique, 4-hydroxy-2-nonenal, du fait de la formation de réticulations intramoléculaires, devenaient non seulement résistantes à la dégradation par le protéasome mais qu'elles pouvaient également agir comme inhibiteurs du protéasome pour la dégradation d'autres protéines oxydées [15]. Plus récemment, il a été montré que le protéasome était inhibé en présence de lipofuscine, un pigment de composition mal définie constitué par des lipides et des protéines réticulées, qui s'accumule dans les cellules post-mitotiques avec l'âge [16]. Le protéasome est lui-même sensible à l'attaque par les ERO et certains produits dérivés de la peroxydation des lipides, comme le 4-hydroxy-2-nonenal. Ainsi, l'oxydation catalysée par les métaux du protéasome 20S sous sa forme active induit l'inactivation des activités « trypsin-like » et « peptidylglutamyl-peptide hydrolase ». A l'inverse, le protéasome sous sa forme latente voit ses activités protéolytiques stimulées par oxydation. Cette différence de comportement est à rapprocher de la plus grande sensibilité à l'oxydation du protéasome 26S par rapport au protéasome 20S. Les activités « chymotrypsin-like » et « trypsin-like » du protéasome sont sélectivement inactivées par l'oxyde nitrique et le 4-hydroxy-2-nonenal respectivement. Cette inactivation directe du protéasome

par le 4-hydroxy-2-nonanal pourrait expliquer sa baisse d'activité observée chez le rat lors d'un stress oxydant induit par injection de nitriloacétate ferrique dans le rein et suite à l'ischémie reperfusion cardiaque [13, 17].

Protéasome et vieillissement

Le ralentissement du renouvellement des protéines avec l'âge et l'accumulation des protéines endommagées par oxydation ou autres voies apparentées suggèrent une baisse d'efficacité de la dégradation des protéines par le protéasome (figure 2). Ainsi, il a été montré par notre équipe et plusieurs autres laboratoires que l'activité du protéasome diminuait au cours du vieillissement dans différents types cellulaires ou tissulaires [10]. Cette baisse d'activité du protéasome permet d'expliquer, au moins en partie, l'accumulation de protéines anormales dans la cellule. Nous avons montré que cette baisse d'activité du protéasome était associée à une diminution de son expression pour les fibroblastes et kératinocytes humains ainsi que pour des cardiomyocytes de rat. L'étude à grande échelle des variations de l'expression des gènes lors du vieillissement dans des cellules mitotiques (fibroblastes de derme humain) et post-mitotiques (muscle squelettique de souris) a révélé qu'une soixantaine de gènes (c'est-à-dire moins de 1 % des 6 347 gènes analysés) voyaient leur expression modifiée [7, 18]. Dans les deux situations, la transcription de plusieurs sous-unités du protéasome 20S ou 26S se trouvait affectée. De manière intéressante, l'analyse des effets de la restriction calorique sur l'expression des gènes dans le muscle squelettique a conduit les auteurs à proposer que l'effet anti-vieillesse de la restriction calorique s'effectuait en stimulant le renouvellement des protéines et en diminuant les dommages aux protéines.

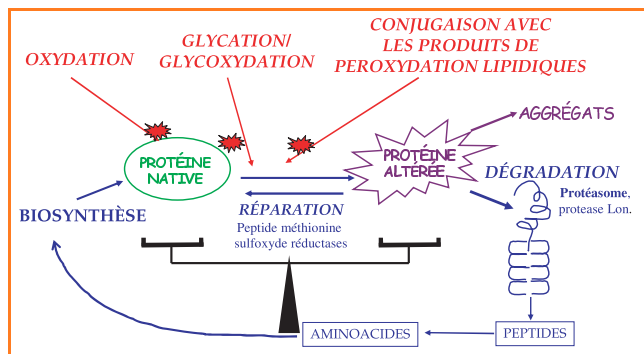


Figure 2 - Systèmes de maintenance des protéines au cours du vieillissement et du stress oxydant.

Suite à leur biosynthèse, les protéines cellulaires acquièrent leur forme native et biologiquement active mais sont soumises à diverses agressions, notamment celles induites par le stress oxydant qui conduisent à la formation de protéines altérées. Selon la nature de l'altération, la protéine peut être réparée, soit dégradée. Seules les oxydations des cystéines et des méthionines sont considérées comme réparables. Dans les cellules jeunes, le contrôle de qualité des protéines est très strict et le taux de protéines endommagées est maintenu à un niveau très bas. Avec l'âge, on assiste à une accumulation de protéines endommagées, ce qui pose le problème d'un relâchement du contrôle de qualité des protéines et tout particulièrement celui de la baisse d'efficacité des systèmes de maintenance tels que le protéasome et les peptide méthionine sulfoxyde réductases.

La nature des événements conduisant à une diminution de l'activité du protéasome au cours du vieillissement nécessite encore d'être caractérisée plus précisément (figure 3). Cependant, parallèlement à une diminution de son expression, l'existence de modifications du protéasome a été observée à partir de protéasome purifié soit de cœur ou de

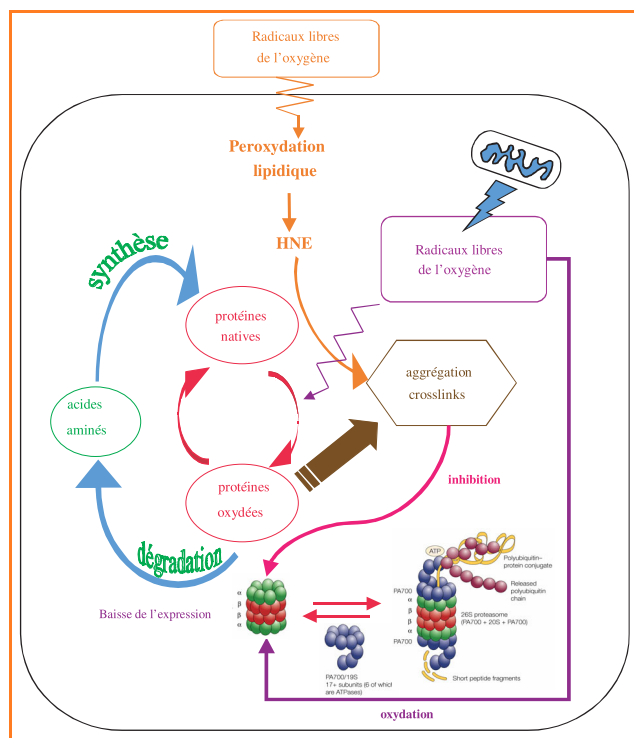


Figure 3 - Mécanismes impliqués dans la baisse d'activité du protéasome au cours du vieillissement.

La nature des événements conduisant à une diminution de l'activité du protéasome au cours du vieillissement nécessite encore d'être caractérisée plus précisément. Cependant, selon le type cellulaire ou tissulaire, la diminution de l'activité du protéasome avec l'âge pourrait provenir de l'action combinée de : 1) la diminution de son expression ; 2) l'existence de modifications structurales des sous-unités du protéasome et 3) la présence dans les cellules sénescents de protéines endommagées inhibitrices du protéasome.

foie de rat, soit encore de cellules épidermiques ou de lymphocytes humains. L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle de la composition en sous-unités couplée à une immunodétection par des anticorps spécifiques de certaines modifications oxydatives a montré que les sous-unités du protéasome issues de lymphocytes étaient graduellement modifiées avec l'âge [19]. L'activité du protéasome pourrait être également diminuée du fait de la formation de protéines modifiées (réticulées suite à des réactions d'oxydation ou des réactions de couplage covalent avec des produits de peroxydation lipidique comme le 4-hydroxy-2-nonanal) qui agissent comme inhibiteurs endogènes. En effet, nous avons observé que certaines activités protéolytiques du protéasome, qui étaient très diminuées dans les extraits cellulaires, étaient partiellement restaurées lors de la purification du protéasome à partir de cœur de rat âgé, suggérant une élimination d'agents inhibiteurs lors des étapes de purification [20]. De plus, le traitement d'une protéine modèle, la glucose-6-phosphate deshydrogénase, par le 4-hydroxy-2-nonanal conduit à la formation de réticulations intramoléculelaires qui rendent la protéine résistante à la protéolyse par le protéasome, cette protéine réticulée ayant un effet inhibiteur sur l'activité protéolytique du protéasome [15]. Plus récemment, une inhibition du protéasome dans des fibroblastes a été observée suite à l'introduction dans la cellule de lipofuscine artificielle (ou pigment céroïde) suggérant une implication directe de ces protéines réticulées dans l'altération fonctionnelle du protéasome [16]. Ainsi, selon le type cellulaire ou tissulaire, la diminution de l'activité du protéasome avec l'âge pourrait provenir de trois actions combinées : la

diminution de son expression, l'existence de modifications structurales des sous-unités du protéasome, et la présence dans les cellules sénescences de protéines endommagées inhibitrices du protéasome.

Vieillessement et systèmes de maintenance

La baisse de l'activité du protéasome avec l'âge joue un rôle crucial dans l'accumulation de protéines oxydées anormales, qui peut se révéler toxique pour la cellule. D'autres systèmes de maintenance des protéines sont également susceptibles soit de réparer, soit de dégrader les protéines endommagées par oxydation [21]. Il s'agit du système peptide méthionine sulfoxide réductase, qui a la capacité de réverser l'oxydation de la méthionine au sein des protéines, et qui constitue de ce fait l'un des deux systèmes connus de réparation des protéines oxydées, le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase permettant la réduction des ponts dissulfures entre deux cystéines à l'intérieur des chaînes polypeptidiques. Comme pour le protéasome, l'activité ainsi que l'expression de la peptide méthionine sulfoxide réductase sont également altérées au cours du vieillissement [22]. Comme indiqué plus haut, la mitochondrie représente un élément majeur dans la production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène par la chaîne respiratoire. L'augmentation de cette production au cours du vieillissement est généralement couplée à un déclin de l'activité mitochondriale. Les causes de ce dysfonctionnement ont été recherchées et des modifications de l'ADN mitochondrial, notamment une large délétion dont la fréquence augmente avec l'âge, ont été observées. Cependant, ce sont les altérations des protéines qui là encore constitueraient un facteur majeur dans le déclin de la fonction mitochondriale. Peu d'études s'étaient intéressées jusqu'alors à la dégradation et à la réparation des protéines mitochondriales. Il apparaît que la mitochondrie possède des systèmes de réparation analogues à ceux du cytoplasme (peptide méthionine sulfoxide réductase, par exemple) et que plusieurs systèmes protéolytiques sont impliqués dans le renouvellement des protéines mitochondriales. La protéase Lon pourrait jouer un rôle particulier car elle est impliquée dans la dégradation des protéines oxydées et son activité a été récemment décrite comme étant diminuée chez le rat âgé, à la fois dans le foie et le muscle squelettique [23-24]. Ainsi, puisque la maintenance des protéines via l'élimination des protéines oxydées par le protéasome est maintenant reconnue comme un phénomène important dans le processus du vieillissement, l'implication des autres systèmes de maintenance comme les systèmes de réparation et/ou dégradation mitochondriaux doit être recherchée.

D'autre part, l'essor de nouvelles techniques de chimie analytique de plus en plus performantes, notamment dans le domaine de la spectrométrie de masse, permettra d'identifier de nouvelles modifications (ou cicatrices moléculaires) des protéines associées au vieillissement, ainsi que de définir la contribution des différents types de modification dans l'accumulation des protéines altérées. Ces études, couplées à l'identification des protéines préférentiellement endommagées, contribueront à définir des stratégies destinées à ralentir l'apparition des effets délétères du vieillissement. Par ailleurs, l'influence de la perturbation avec l'âge de l'homéostasie redox sur les protéines sensibles ou régulées par le potentiel redox constitue également une voie d'investigation très prometteuse située en amont des dommages

oxydatifs aux protéines. Ces dernières études nécessitent également de déterminer à la fois les protéines cibles de ces régulations redox et de définir la nature chimique précise des modifications post-traductionnelles réversibles impliquées dans la régulation de la fonction de ces protéines.

Références

- [1] Harman D., Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **1956**, *11*, p. 298.
- [2] Berlett B.S., Stadtman E.R., Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, p. 2013.
- [3] Beckman K.B., Ames B.N., The free radical theory of aging matures, *Physiol. Rev.*, **1998**, *78*, p. 547.
- [4] Finkel T., Holbrook N.J., Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, **2000**, *408*, p. 239.
- [5] Kirkwood T.B., Immortality of the germ-line versus disposability of the soma, *Basic. Life. Sci.*, **1987**, *42*, p. 209.
- [6] Lee C.K., Klopp R.G., Weindruch R., Prolla T.A., Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction, *Science*, **1999**, *285*, p. 1390.
- [7] Vijg J., Somatic mutations and aging: a re-evaluation, *Mut. Res.*, **2000**, *447*, p. 117.
- [8] Dukan S., Farewell A., Ballestros M., Taddei F., Radman M., Nystrom T., Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, p. 5746.
- [9] Yan L.J., Sohal R.S., Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, p. 12896.
- [10] Friguet B., Bulteau A.L., Chondrogianni N., Conconi M., Petropoulos I., Protein degradation by the proteasome and its implication in aging, *Ann. Rev. N.Y. Acad. Sci.*, **2000**, *908*, p. 143.
- [11] Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L., Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, *65*, p. 801.
- [12] Davies K.J., Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome, *Biochimie*, **2001**, *83*, p. 301.
- [13] Okada K., Wangpoengtrakul T., Osawa S., Tokoyuni K., Tanaka K., Uchida K., 4-hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress: identification of proteasomes as target molecules, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, p. 23787.
- [14] Bulteau A.L., Verbeke P., Petropoulos I., Chaffotte A.F., Friguet B., Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20S proteasome degradation in vitro, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, p. 45662.
- [15] Friguet B., Szveda L.I., Inhibition of the multi-catalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein, *FEBS Lett.*, **1997**, *405*, p. 21.
- [16] Sitte N., Huber T., Grune T., Ladhoff A., Doecke W.D., Von Zglinicki T., Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during post-mitotic aging of fibroblasts, *FASEB J.*, **2000**, *14*, p. 1490.
- [17] Bulteau A.L., Lundberg K.C., Humphries K.M., Sadek H.A., Szveda P.A., Friguet B., Szveda L.I., Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion-reperfusion, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, p. 30057.
- [18] Ly D.H., Lockhart D.J., Lerner R.A., Schultz P.G., Mitotic misregulation and human aging, *Science*, **2000**, *287*, p. 2486.
- [19] Carrard G., Dieu M., Raes M., Toussaint O., Friguet B., Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2003**, *35*, p. 728.
- [20] Bulteau A.L., Szveda L.I., Friguet B., Age-dependent declines in proteasome activity in the heart, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2002**, *397*, p. 298.
- [21] Friguet B., Protein repair and degradation during aging, *The Scientific World Journal*, **2002**, *2*, p. 248.
- [22] Petropoulos I., Mary J., Perichon M., Friguet B., The peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA and down-regulation of gene expression and enzyme activity during ageing, *Biochem. J.*, **2001**, *355*, p. 819.
- [23] Bota D.A., van Remmen H., Davies K.J., Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress, *FEBS Lett.*, **2002**, *532*, p. 103.
- [24] Bakala H., Delaval E., Hamelin M., Bismuth J., Borot-Laloi M., Corman B., Friguet B., Changes in rat liver mitochondria with aging: Lon protease-like activity and N ϵ -carboxymethyllysine accumulation in the matrix, *Eur. J. Biochem.*, **2003**, *270*, p. 2295.



Bertrand Friguet

est professeur de biochimie et responsable du Laboratoire de biologie et biochimie cellulaire du vieillissement à l'Université Paris 7-Denis Diderot*.

* Laboratoire de biologie et biochimie cellulaire du vieillissement (EA 3106/IFR 117), Université Paris 7-Denis Diderot, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05. Tél./Fax : 01 44 27 82 34. Courriel : bfriguet@paris7.jussieu.fr

Le stress oxydant

Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique

Alain Favier

Abstract

The oxidative stress: concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches

Free radicals and their precursors are members of a reactive chemical family named reactive oxygen species. Living beings use their beneficial reactivity in a lot of processes, as weapon in defence mechanisms or as signal inside or inter cells. So a useful level of beneficial reactive species is maintained inside cell by an equilibrium between the generating system producing free radicals such as mitochondrial respiration, phagocytosis, redox cycle or radiations, and the antioxidant systems such as scavenger molecules absorbed from the diet (vitamin C, E, carotenoids, polyphenols) or produced endogenously (glutathione, thioredoxin) or such as antioxidant enzymes (superoxide dismutases, glutathione peroxidases). Unfortunately an oxidative stress may occur, resulting from a disequilibrium between prooxidant sources of radicals and antioxidant systems. Oxidative stress will damage intracellular macromolecules, oxidizing lipids, DNA or proteins. Many cellular dysfunctions result from these biochemical damages, variable according to the level of stress: excess in cell proliferation, cell death by apoptosis, lipid deposition, mutagenesis. By creating such disorders, oxidative stress is partly responsible from a great number of age-related diseases as cancer, cardiovascular disorders, neurodegenerative diseases as Alzheimer disease. So many therapeutical strategies have been tested in animal and human to prevent the occurrence of these oxidative diseases. They use nutritional improvement of antioxidant capacities, plant or chemical antioxidants. Chemists designed various new molecules chelating iron, scavenging free radicals or catalysing destruction by miming the activity of antioxidant enzymes. But new ways of research have to be now explored to create more specific and tissue targeted molecules able to regulate the intracellular level and not only to destroy oxygen radicals.

Mots-clés

Antioxydant, stress oxydant, radicaux libres, maladies.

Key-words

Antioxidant, stress, free radicals, diseases.

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines. Qu'en est-il exactement ? Est-ce une mode ou une réalité, et dans ce cas, pouvons-nous trouver de nouvelles armes médicamenteuses pour lutter contre ce phénomène ?

Origine du stress oxydant

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit

que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant ».

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. L'organisme peut avoir à faire face à

Glossaire

Adduit

Fixation d'une molécule sur une des bases de l'ADN par une liaison covalente pouvant parfois former un pont intra-caténaire entre les deux chaînes de l'ADN.

Cytosol

Liquide contenu à l'intérieur des cellules.

Facteur de transcription

Protéine permettant la lecture d'un gène lorsqu'elle se fixe sur son promoteur.

Radical libre

Espèce chimique possédant un électron non apparié.

Régulon

Chez les bactéries, ensemble contigu de gènes codant pour des protéines et de gènes codant pour des protéines régulatrices.

Sites abasiques

Partie de l'ADN dépourvue d'une base purique ou pyrimidique et ayant perdu l'information génétique par rupture de la liaison entre une base et le désoxyribose.

Xénobiotique

Molécule étrangère, susceptible de pénétrer dans le corps humain.

une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée, qui sera observée dans les intoxications aux métaux lourds, dans l'irradiation, dans les ischémies/reperfusions suivant des thromboses. La rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantité limitée dans l'alimentation française. Enfin, la mauvaise adaptation peut résulter d'anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydante, soit synthétisant un antioxydant (comme la gamma glutamyl synthétase produisant le glutathion), soit régénérant un antioxydant, soit couplant la défense à l'énergie (comme la G6PD), soit d'un promoteur de ces mêmes gènes que la mutation rendra incapable de réagir à un excès de radicaux. Généralement, le stress oxydant sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme.

Les radicaux libres de la biologie

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} [1]. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène** (figure 1).

Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) comme le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telles la vasodilatation capillaire, la prolifération ou le message de neurones. En revanche, des radicaux comme les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) ou surtout le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Ces radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote, même réactifs, ne sont pas uniquement toxiques ; au contraire, ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la **respiration mitochondriale** dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaires. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du

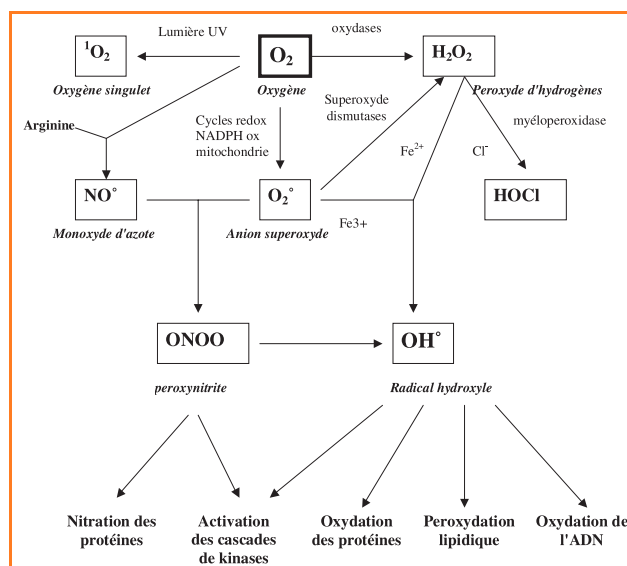


Figure 1 - Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.

fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, production que l'on peut comparer aux inévitables déchets des centrales industrielles d'énergie. Si usuellement cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2 %), elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie), ou lorsque interviennent des désordres inflammatoires (effet du $TNF\ \alpha$) ou nutritionnels (carence en ubiquinone), qui augmentent avec l'âge.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les **cellules phagocytaires activées** qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases (ou NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Rappelons que la production concomitante dans un même lieu de NO^{\bullet} et de superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxyde.

Des sources importantes de radicaux libres sont les **mécanismes de cycles redox** que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments ; mais il se produit aussi avec des composés endogènes comme l'acide lévulinique et surtout les catécholamines. Les **métaux** toxiques (chrome, cuivre, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 , par une réaction appelée **réaction de**

Fenton. Les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer. Les **rayonnements** sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou γ , soit en activant des molécules photosensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet.

Un paradoxe : les radicaux libres sont-ils indispensables à la vie ?

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes.

La phagocytose des bactéries et parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène si brutale et intense qu'elle est connue, depuis les travaux de Baldrige sur le polynucléaire en 1933, sous le nom de « burst oxydatif », c'est-à-dire explosion respiratoire. Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase et l'action des superoxydes dismutases (SOD) et NOS aboutissent à un mélange très corrosif de O_2^* , H_2O_2 , HO^* , $ONOOH$, avec en plus dans le polynucléaire $HOCl$ et 1O_2 . Ce mélange réactionnel, que l'Homme a imité en utilisant comme désinfectant l'eau de javel ou l'eau oxygénée, détruit par oxydation l'ensemble des composants bactériens.

Les radicaux libres constituent aussi un système de transmission de signaux, sans doute apparu très tôt dans l'évolution de la vie. Ce système est présent dans les êtres unicellulaires qui réagissent à l'oxygène du milieu ambiant en adaptant leurs systèmes de défense, et il s'est conservé chez les êtres évolués, y compris les mammifères, qui se sont dotés de systèmes cellulaires de production de radicaux libres et de systèmes de détection et de transduction du signal. Les radicaux oxygénés peuvent donc être considérés comme des messagers intra et extracellulaires. Ils permettent d'induire la réponse cellulaire à de nombreux stress, thermiques, ultraviolets, xénobiotiques, permettant l'expression de gènes de défense. Chez les bactéries, les gènes de défense contre le stress oxydant sont organisés en régulon : un gène exprime un premier facteur de transcription qui, après activation par un dérivé oxygéné, va activer le gène d'un deuxième facteur de transcription ubiquitaire pour un ensemble de systèmes antioxydants. Ainsi, il existe plusieurs ensembles de gènes mis en jeu lors des stress oxydants chez *E. coli* : le régulon *oxyR-oxyS* dont l'expression aboutit à la synthèse de 9 protéines en une vingtaine de minutes après activation par H_2O_2 , le régulon *soxR-soxS* dont l'expression aboutit à la synthèse de nombreuses enzymes antioxydants (la

SOD-Mn, l'endonucléase IV, la glucose 6 phosphate déshydrogénase qui fournira le NADPH nécessaire à la glutathion réductase, une paraquat réductase qui paradoxalement produit O_2^* , la protéine ribosomiale S6, et la porine membranaire OmpF).

Chez l'Homme, les gènes antioxydants les plus inductibles par un stress oxydant sont ceux de la superoxyde dismutase à manganèse, de la catalase, de la ferritine, de l'hème oxygénase, de la γ glutamyl-cystéine synthase, de la iNO synthase, de la thioredoxine, de l'HSP 70, des métallothionéines, alors que ceux de la superoxyde dismutase Cu-Zn et de la glutathion peroxydase sont peu inductibles [2]. Cette inductibilité des gènes antioxydants explique le phénomène d'adaptation au stress oxydant des cellules et des animaux qui exposés régulièrement à de faibles doses deviennent résistants à de fortes doses de radicaux oxygénés. Mais les espèces actives de l'oxygène peuvent aussi activer des gènes de fonctions cellulaires autres que ceux de la lutte contre les radicaux libres, ceci par l'intermédiaire de facteurs redox sensibles comme AP1, HIF-1 ou NF-KB [3]. Ainsi, les gènes des cytokines TNF, IL1, IL6, de la lipoprotéine lipase, de la collagénase, de l'aldose réductase, des oncogènes c-jun et c-fos, de GADD153, de p21(waf1/cip1), de ELAM 1 et ICAM 1, de la tyrosine protéine phosphatase, de la β actine ou de l'ornithine décarboxylase sont activés par les espèces oxygénées, alors que ceux de la PEPCK et de l'activateur du plasminogène sont inversement inhibés par les espèces actives de l'oxygène.

Les radicaux libres peuvent aussi servir de relais physiologiques entre cellules différentes, dans la stimulation de certains récepteurs membranaires et régulent de nombreuses fonctions comme la vasodilatation des vaisseaux, la prolifération cellulaire. Dans des circonstances dramatiques, ils seront des signaux de mort cellulaire lorsque les capacités de réparation seront dépassées. L'effet du stress oxydant sur la transduction du signal a déjà fait l'objet de plusieurs revues montrant que ce concept est désormais accepté en nutrition, immunologie, diabétologie ou cancérologie [4]. Les radicaux oxygénés pourraient même être les premiers responsables de l'activation des kinases en cas de réponse à des agressions comme l'irradiation, les cytokines inflammatoires ou les carcinogènes chimiques.

Ayant besoin d'une certaine quantité d'espèces réactives de l'oxygène, l'organisme ne cherche donc pas à les détruire mais à contrôler leur niveau pour éviter le stress oxydant. Ceci explique la régulation très fine du génome antioxydant et de ses mécanismes d'adaptation. La thérapie antioxydante ne doit pas oublier ces activités utiles des radicaux libres sous peine d'échec, voir d'effets toxiques paradoxaux, tel l'effet procarcinogène observé dans certaines études de supplémentation par des doses très élevées de β carotène.

Le contrôle des radicaux libres par la cellule

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables [5]. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est

elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases [6]. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons). De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes, phytates [7]. Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO^\bullet . D'autres composés endogènes jouent un rôle sans doute important mais encore mal évalué : les thioredoxines, les glutaredoxines, les métallothionéines, l'acide lipoiïque ou les polyamines. La plupart des composés biologiques réagissant avec (donc piégeant) le radical hydroxyle, il conviendra de réserver le terme d'antioxydant à des composés dont la teneur dans les tissus diminue lors d'un stress oxydant *in vivo* et qui ne donnent pas de dérivés toxiques.

L'autre stratégie utilisée est de nature enzymatique, visant à détruire les superoxydes et peroxydes. Ainsi, les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Les superoxydes dismutases existent sous plusieurs isoformes dont la structure d'ensemble est très bien conservée lors de l'évolution, formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde [8]. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD), la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD). Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer, présentes dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, et les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium [9]. Des glutathions peroxydases à sélénium existent dans le cytosol (cGPX) dans le plasma (pGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et une isoenzyme est spécifique des cellules digestives (GIGPx). Ces enzymes sont sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium.

Le rôle des SOD et des peroxydases est complémentaire car une bonne protection ne peut être obtenue par les superoxydes dismutases seules (figure 2). Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases. La plupart des enzymes décrites ci-dessus, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante. La production d'énergie ne semble pas ici en elle-même capitale (la diminution de l'ATP facilitant même la formation du NADPH).

Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de

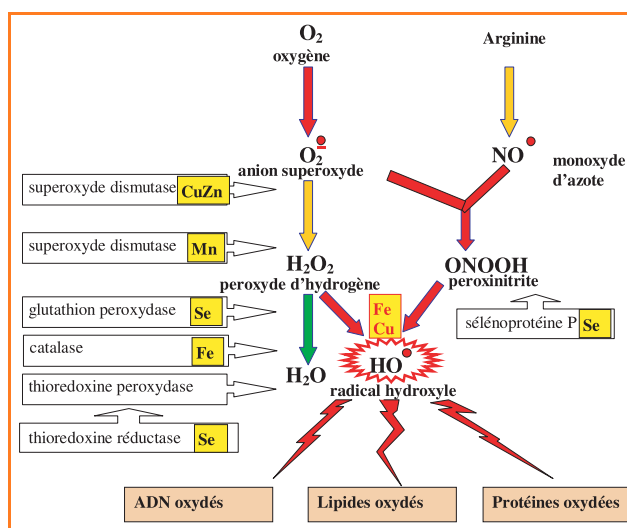


Figure 2 - Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.

l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique.

Conséquences biochimiques

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée **peroxydation lipidique** forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué [10]. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, de par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différentes aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonanal. La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes (figure 3). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux.

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par

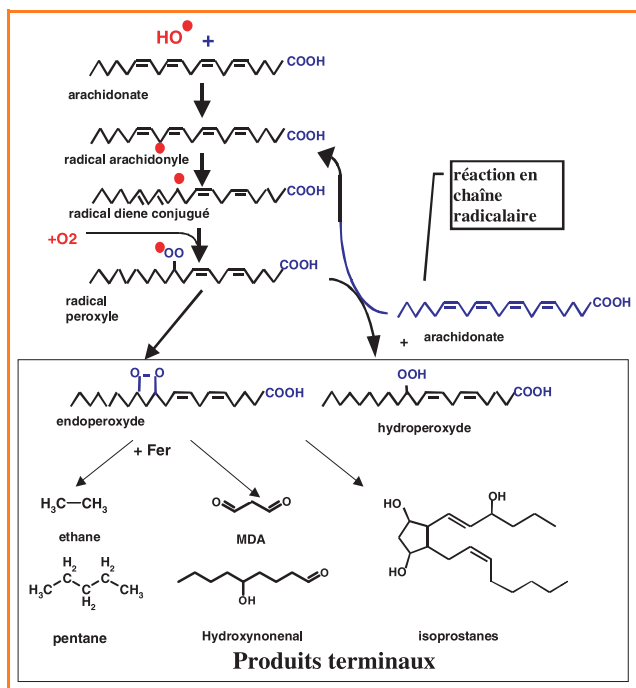


Figure 3 - Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.

OH[•] peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines [11]. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimido uracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone. Un très grand nombre de ces composés et de leurs mécanismes de formation ont été identifiés dans notre laboratoire. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine. Le rôle des nombreux métaux fixés à l'ADN, qui est un polyanion (Fe, Mg, Zn, Cu, Ni, Cd...), est crucial pour amplifier ou orienter le profil de ces lésions. Cette attaque de l'ADN est quotidienne puisque le nombre de lésions se formant chaque jour dans une cellule est estimé à 10⁴. Heureusement, la fidélité de la séquence des 4.10⁹ paires de bases de notre ADN cellulaire est maintenue depuis des milliers d'années et dans des milliards de cellules grâce à des systèmes de réparation perfectionnés, dont les principaux sont la réparation par excision de base (BER) ou par excision de nucléotide (NER), couplées ou non à la transcription, le système de réparation des misappariements et la réparation par recombinaison (figure 4). Malheureusement, ce beau mécanisme peut se dérégler soit par une surcharge de lésions en cas de stress

massif, soit par un mauvais fonctionnement de ces systèmes de réparation chez des sujets déficients en cofacteurs (thio-redoxines, zinc) ou atteints d'une anomalie génétique. Dans ce cas, les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases translésionnelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome, soit une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par un mécanisme appelé apoptose. *In fine*, cette modification de l'ADN induit des mutations par transversions GC (guanine/cytosine) vers TA (thymine/adénine) souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. Ces sont les premières étapes de la carcinogenèse et ce n'est pas une coïncidence si les agents carcinogènes sont tous des générateurs puissants de radicaux libres (radiations ionisantes et UV, fumée, alcool, fibres d'amiante, métaux carcinogènes, hydrocarbures polycycliques).

Si la chimie de l'attaque radicalaire des **polysaccharides** a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H₂O₂ et OH[•], qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGE.

Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine.

Les **protéines** les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques

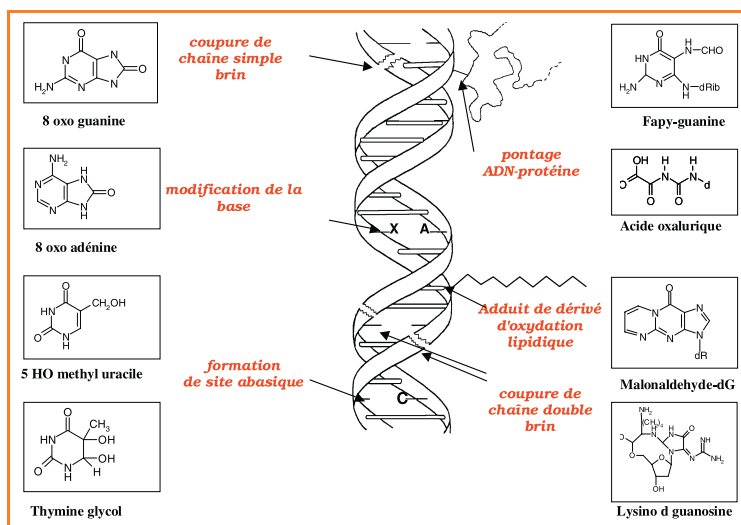


Figure 4 - Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

(enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés.

Les **conséquences biologiques du stress oxydant** seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression.

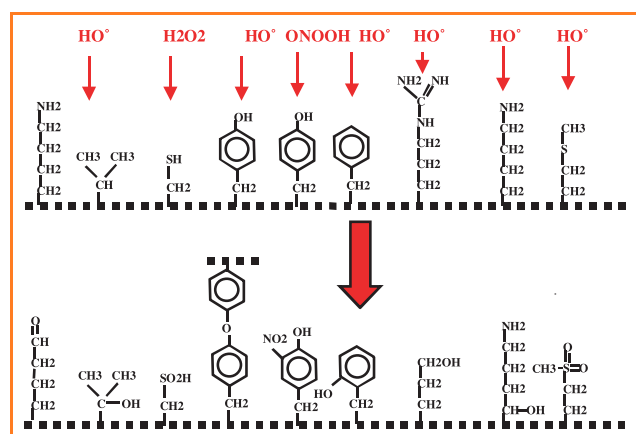


Figure 5 - Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.

Comment mettre en évidence un stress oxydant chez un malade ?

Un grand nombre de techniques actuellement utilisables pour évaluer le stress oxydant ont fait l'objet d'ouvrages ou de revues [12]. Toutefois, ce domaine de la biologie n'a pas encore été étudié avec la rigueur et le souci de standardisation et d'optimisation des méthodes, habituels en biologie clinique. Une grande disparité de techniques et de résultats complique donc l'interprétation des résultats et alimente polémique et désarroi de celui qui est désireux d'aborder ces techniques. Par ailleurs, il existe des difficultés inhérentes à cette exploration, liées à la rapide fugacité des espèces radicalaires, à l'oxydabilité des paramètres redox, ainsi qu'à la localisation de ce stress dans un type donné et d'un nombre réduit de cellules dans un tissu sain.

L'exploration du statut radicalaire peut se faire par trois abords : la mesure de la production de radicaux (statut prooxydant), la mesure des capacités de défenses (statut antioxydant) et la mesure de l'étendue des désordres biochimiques spécifiques résultant d'un déséquilibre entre la balance antioxydants/prooxydants.

Les maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux [13].

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré. Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme p53.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [14]. Dans la genèse de la plaque d'athérome, l'oxydation des LDL est un des phénomènes clefs transformant les monocytes en cellules spumeuses. Le stress oxydant joue également un rôle dans l'apparition des autres facteurs athérogènes : augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs prooxydants (prostacycline, cytokine, facteur de fibrinolyse, superoxyde, NO), augmentation de la prolifération des fibres lisses. Un facteur de risque découvert récemment, l'homocystéine, voit son action liée en partie à la génération de radicaux libres au cours de son métabolisme. Les causes essentielles de ce stress oxydant sont soit d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, ou inversement de surcharges en facteurs prooxydants (fer, acides gras), soit d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques prooxydants...), soit d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira au mécanisme pathogène.

La responsabilité la plus nette des radicaux libres est mise en évidence dans les maladies directement induites par des anomalies d'un gène antioxydant. Plusieurs mutations de la CuZn superoxyde dismutase ont été observées dans les formes familiales d'une maladie neurologique de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Le transfert du gène de malade chez la souris recrée d'ailleurs une maladie analogue à la maladie humaine. La dégénérescence maculaire liée à l'âge est fortement associée avec la forme valine/alanine du polymorphisme du gène de la superoxyde dismutase.

Comment lutter contre le stress oxydant ?

Le stress oxydant étant à l'origine de nombreuses maladies, il semble logique de chercher à le supprimer. Toutefois, il faut bien se garder d'être « simpliste » sur un sujet aussi complexe et ambigu. Tout d'abord, le stress oxydant est

souvent à l'origine des premières anomalies responsables de modifications irréversibles de molécules et de cellules, et ces anomalies se produisent plusieurs années avant l'apparition des signes de la maladie qui sont irréversibles. Ainsi dans une maladie auto-immune, les antioxydants ne pourront réverser le phénomène lorsque les lignées de lymphocytes auront été sélectionnées et activées, même si les radicaux libres ont participé à modifier les protéines cellulaires plusieurs années auparavant, pour les rendre antigéniques. On peut envisager sous le titre d'« antioxydants » au sens large, l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces actives de l'oxygène [15]. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (figure 6).

renforcement global des défenses par un apport simultané d'un ensemble d'antioxydants à activité complémentaire, plutôt que l'apport massif d'un seul d'entre eux. Cet apport préventif d'antioxydants nutritionnels a montré ses limites avec plusieurs essais de grande envergure qui se sont avérés négatifs, sans doute à cause d'un apport à des doses excessives de β carotène chez des sujets déjà à fort risque de lésions précancéreuses [16]. Par contre, plusieurs autres études utilisant du sélénium (étude Precise) ou un mélange vitamines C et E et sélénium (étude du Linxian) ont permis une réduction du risque de cancers. Nous venons d'obtenir les résultats d'une étude similaire réalisée en France, l'étude Suvimax. La prise d'un mélange au sein d'une cohorte de 15 000 volontaires a entraîné au bout de 8 ans une réduction de 30 % des cas de cancers chez les sujets masculins, alors que le supplément n'a pas entraîné de bénéfice chez les sujets de sexe féminin. Il faut dire que ces dernières possédaient au début de l'étude un statut antioxydant en β carotène nettement supérieur, dû à leurs meilleures habitudes alimentaires et notamment à une plus grande consommation de fruits et légumes.

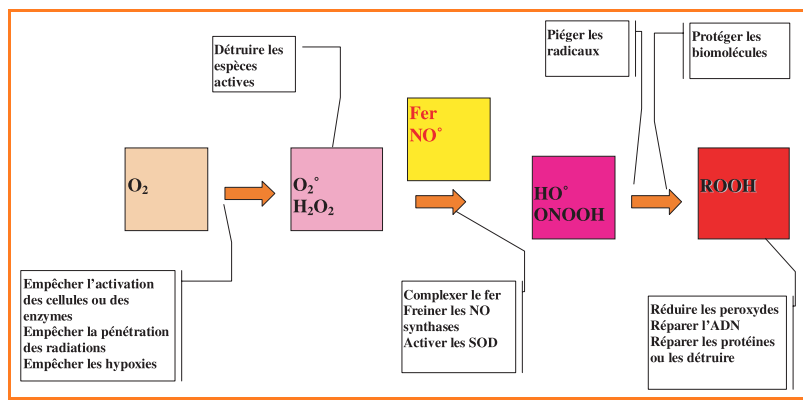


Figure 6 - Stratégie de conception de systèmes antioxydants susceptibles de prévenir la formation de radicaux libres oxygénés ou de permettre leur destruction.

La prévention nutritionnelle

L'augmentation de l'apport nutritionnel en antioxydants visera donc essentiellement à prévenir ces maladies. Or nous ne savons pas toujours quels sont les antioxydants responsables des effets bénéfiques observés en épidémiologie avec les aliments riches en antioxydants comme les fruits et les légumes. L'alimentation contient un grand nombre d'antioxydants, non seulement les vitamines (E, C, Q, β carotène) et les oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse), mais aussi 600 sortes de caroténoïdes, 4 000 polyphénols et flavonoïdes (trouvés dans les choux, le thé, le vin, les céréales, les fruits), des alcaloïdes, des acides organiques, des phytates, des dérivés soufrés de l'ail et de l'oignon, des dérivés indoliques du chou...

En dehors de la prévention primaire, l'apport d'antioxydants pourra être utile pour éviter les récives. Il permettra aussi de stabiliser la tolérance à l'insuline, d'améliorer l'immunité. Enfin, les antioxydants pourront être utilisés pour diminuer la toxicité des médicaments, souvent générateurs de radicaux oxygénés dans leur métabolisme. Toutefois, il faudra se méfier des effets paradoxaux de fortes doses d'antioxydants, car tous deviennent prooxydants s'ils sont administrés en excès. De plus, il ne faut pas supprimer le bruit de fond physiologique des radicaux libres. Nous avons vu leur utilité dans la défense anti-infectieuse. N'oublions pas que l'apoptose est aussi un phénomène utile qui supprime les cellules infectées par des virus ou les cellules cancéreuses.

Dans tous les cas, l'apport d'antioxydants devra se faire dans la limite des apports recommandés et en préférant un

Les antioxydants naturels et de synthèse

Les antioxydants non nutritionnels comprennent des produits naturels extraits de plantes, utilisés tels quels ou après modifications chimiques, des produits extraits d'animaux terrestres ou marins (enzymes ou protéines antioxydantes), des produits de synthèse imitant les enzymes, chélatant le fer ou piégeant les radicaux. Ce dernier groupe de piégeurs de radicaux de synthèse comprend d'anciens médicaments utilisés depuis longtemps comme fluidifiants bronchiques, anti-inflammatoires ou anti-hypertenseurs et redécouverts récemment comme étant antioxydants, et de nouvelles molécules dessinées à finalité d'être antioxydantes. Toutefois, les molécules historiques ont l'avantage de posséder une autorisation de mise sur le marché (AMM) comme médicaments, alors que bien peu de nouvelles molécules ont réussi à obtenir cette coûteuse et difficile autorisation.

Les dérivés végétaux sont extrêmement nombreux à être utilisés principalement dans le domaine des suppléments et des produits cosmétologiques anti-vieillesse, qu'il s'agisse de principes extraits de légumes, d'épices, de fruits ou de plantes médicinales. Ils appartiennent à de nombreuses familles chimiques, alcaloïdes, glucosides, dérivés indoliques, mais celle des polyphénols a donné le plus de molécules. Les plus utilisés sont la quercétine (chef de file des flavonoïdes), le resvératrol, extrait de l'écorce du raisin rouge et la curcumine, extraite de la racine de curcuma.

Les chélateurs du fer ont été très étudiés, mais peu de molécules ont réussi à détrôner la desferrioxamine qui est un sidérophore naturel extrait de la bactérie *Nocardia*. Toutefois, cette molécule doit être administrée par voie parentérale. La Dexrazoxane est un chélateur de cations divalents bidentate qui, en pré-traitement avant la doxorubicine, permet de diminuer l'incidence et la sévérité de la toxicité cardiaque. Toutefois, sa faible durée de vie, comparée à celle du médicament, diminue son efficacité. L'utilisation des enzymes a été très limitée par leur peu d'efficacité clinique et par le risque de contamination accrue depuis l'apparition de l'encéphalopathie bovine spongiforme. Par contre, les chimistes ont fabriqué un grand

nombre de molécules à propriétés superoxydes dismutases, dits « SOD likes », basées sur des complexes de cuivre, de fer ou de manganèse. Mais pour être efficace *in vivo*, une molécule montrant une activité SOD *in vitro* doit être non toxique, stable, avoir une longue demi-vie, ne pas former de complexes ternaires avec les composants cellulaires, réagir lentement avec l'oxygène moléculaire sous sa forme réduite, être capable de traverser des membranes cellulaires et de gagner un site hydrophile ou lipophile. De même, des dérivés du sélénium présentent des propriétés peroxydasiques. Parmi eux, l'Ebselen [2-phényl-1,2-benzosélenazol-3(2H)-one] est maintenant commercialisé dans de nombreux pays européens comme anti-inflammatoire.

Les piègeurs chimiques appartiennent à de nombreuses familles : dérivés phénoliques (butyl hydroxy toluène, probucol ou 4,4'[(1-méthyléthylidène) bis(thio)]bis-[2,6-bis(1,1-diméthyl) phéno]), dérivés stéroïdiens (lazaroides), dérivés soufrés (N-acétyl cystéine, DMSO, pénicillamine), dérivés de la méthyl xanthine (caféine, théobromine, théophylline, pentoxifylline, allopurinol, trimétazidine), dérivés hydroxylés (mannitol, dipyrimadol).

L'approche biologique

L'utilisation en thérapeutique des enzymes antioxydantes s'est avérée décevante, sans doute parce que la quasi-totalité des essais thérapeutiques ont porté sur la superoxyde dismutase cuivre-zinc cytosolique, enzyme ambiguë quant à son rôle strictement antioxydant puisque sa surexpression fait produire à la cellule du peroxyde d'hydrogène plus dangereux que le superoxyde, car étant neutre, il traverse les membranes et peut générer OH^{*} par la réaction de Fenton. Les enzymes à sélénium comme les protéines soufrées (méthylthionéines, thioredoxines) seraient théoriquement beaucoup plus intéressantes mais doivent être produites en grande quantité par génie génétique et testées chez l'animal. Deux autres approches semblent prometteuses : la thérapie génique et le transfert de protéines ciblées. La thérapie génique par transfert de gènes antioxydants a donné des résultats encourageants chez l'animal : diminution des conséquences de l'ischémie du myocarde par les gènes de la catalase ou des SOD, suppression des métastases de cancer du poumon par le gène de la SOD extracellulaire, suppression des tumeurs gliales par la SOD. Le transfert de protéines taguées permet de les faire pénétrer dans les cellules, grâce à une petite séquence peptidique cationique, le PTD (ou « protein transduction domain »), qui par un récepteur membranaire et de l'énergie, permet à la protéine fusionnée de traverser la membrane plasmique et même la barrière hémato-méningée. Nous avons récemment montré qu'il était ainsi possible de faire entrer des protéines antioxydantes dans des îlots de Langerhans (cellules sécrétant l'insuline au sein du pancréas) et de les protéger des stress oxydants très importants chez le diabétique.

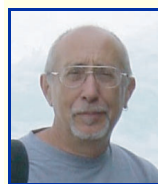
Avenir

Le stress oxydant est devenu une notion incontournable en biologie médicale et porteuse d'espoir thérapeutique, mais une notion plus complexe et plus riche que ce que nous en percevions initialement. De nombreuses lacunes demeurent dans l'arsenal thérapeutique contre le stress oxydant. Nous ne disposons d'antioxydants efficaces et utilisables en médecine que contre les radicaux superoxydes (peu

toxiques) ou hydroxyles (difficiles à atteindre car réagissant instantanément). Il est donc capital de trouver de nouvelles molécules efficaces pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, le monoxyde d'azote et surtout le peroxyde nitrite. Toutefois, l'idéal serait d'aboutir à des médicaments ciblés à un tissu et permettant un contrôle de l'état redox des cellules ou la prévention du stress, plutôt qu'à un effet global antioxydant qui ferait perdre à la cellule le bénéfique potentiel qu'elle tire paradoxalement des radicaux libres de l'oxygène. Pour cela, les chimistes pourraient fabriquer des molécules modulant l'expression des gènes antioxydants. L'industrie cosmétologique développe ainsi beaucoup de recherches sur les inducteurs de ces protéines au niveau cutané. Un autre abord est la synthèse de mimétiques d'enzymes autorégulés par le niveau redox de la cellule. Mais l'industrie chimique peut aussi chercher, comme notre organisme, à utiliser les radicaux libres pour activer par voie redox des prodrogues, permettant une action ciblée aux cellules activées produisant ces radicaux, soit pour réduire l'inflammation, soit pour stopper l'infection virale, soit pour déclencher l'apoptose de cellules cancéreuses.

Références

- [1] Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., Free radicals in chemistry, *Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres, **2000**.
- [2] Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A., Regulation of gene expression by reactive oxygen, *Signalling*, **2002**, *14*, p. 879.
- [3] Haddad John J., Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1999**, *39*, p. 67.
- [4] Droge W., Free radicals in the physiological control of cell function, *Cellular Physiol. Rev.*, **2002**, *82*, p. 47.
- [5] Kinsky N., Antioxydants function of carotenoides, *Free Rad. Biol. Med.*, **1989**, *7*, p. 617.
- [6] Packer L., Protective role of vitamin E in biological systems, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1991**, *53*, p. 1050S.
- [7] Bors W., Heller W., Michel C., Satan M., Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies, *Methods in Enzymology*, **1990**, *186*, p. 343.
- [8] Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J., Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Rad. Biol. Med.*, **2002**, *33*(3), p. 337.
- [9] Ganther H.E., Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase, *Carcinogenesis*, **1999**, *20*(9), p. 1657.
- [10] Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G., The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Rad. Biol. Med.*, **1992**, *13*, p. 341.
- [11] Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.*, **2002**, *383*(6), p. 93.
- [12] Favier A., Cadet J., Kalaryanman R., Fontecave M., Pierre J.-L., *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, Birkhauser, New-York, **1995**.
- [13] Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C., Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.*, **2002**, *33*(5), p. 575.
- [14] Montagnier L., Olivier R., Pasquier C., *Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases*, Marcel Dekker, New York, **1998**.
- [15] Sies H., Antioxidant in disease mechanisms and therapy, *Advances in Pharmacology*, Academic Press, New York, **1997**, *38*.
- [16] The Alpha-tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancer in male smokers, *New. Engl. J. Med.*, **1994**, *330*, p. 1029.



Alain Favier

est professeur de biochimie, directeur du Laboratoire de recherche Lésions des acides nucléiques du CEA de Grenoble*, et directeur du Département de biologie intégrée au CHU de Grenoble.

* Laboratoire Lésions des acides nucléiques, Centre d'Étude Nucléaire de Grenoble, rue des Martyrs, 38054 Grenoble. Tél. : 04 76 76 54 84. Fax : 04 76 76 56 64. Courriel : favier@drfmc.ceng.cea.fr

Lutte contre le cancer

Un arsenal thérapeutique progressivement renouvelé

Christian Bailly

Abstract

Fight against cancer: a therapeutic arsenal progressively renewed

The array of drugs currently used for the treatment of cancers includes old molecules, cytotoxic and often poorly selective for tumor cells, and new molecules better targeted to proteins specific of the cancer cell. Slowly, the arsenal of the medical oncologist is enriched with novel molecules and drug combinations more effective against different tumor pathologies, and better tolerated by the patients. Most of the old molecules interact with DNA or the microtubule network. But the therapeutic strategies evolve with the improved knowledge of the physiology of the cancer cell and the identification of specific targets. Novel antitumor agents, from natural or synthetic origin, are permanently developed and tested in Human. In the field of anticancer pharmacology, the design of novel anticancer drugs, through conventional structure-activity relationship studies, by means of high throughput screening methods, or based on *in silico* molecular models, invariably requires the use of organic synthesis and a better integration of the chemistry-biology interface. Yesterday, today and tomorrow chemistry was and will be at the heart of the fight against cancer.

Mots-clés

Cancer, médicaments anticancéreux, conception de médicaments, reconnaissance moléculaire, cibles thérapeutiques.

Key-words

Cancer, anticancer drugs, drug design, molecular recognition, therapeutic targets.

Les armes chimiques de destruction massive des cellules cancéreuses sont activement recherchées. A l'instar de la guerre contre le cancer déclarée par le président américain Richard M. Nixon en 1971, un nouveau Plan Cancer est actuellement établi en France pour mobiliser l'ensemble des moyens de lutte contre cette maladie et structurer davantage les laboratoires impliqués dans cette guerre qui n'en finit plus de secouer notre monde. Selon les dernières statistiques, le cancer représente la seconde cause de mortalité en France après les maladies cardiovasculaires, mais dans peu de temps, si ce n'est pas déjà le cas, il aura le triste privilège de la première place. Un institut national du cancer sera dressé et le territoire national découpé en plusieurs cancéropôles qui ouvriront chacun une nouvelle ligne de front contre le cancer.

Les moyens mis en œuvre pour faire face à la maladie cancéreuse sont multiples : renforcement du diagnostic précoce, meilleure information sur des facteurs de risques, amélioration des traitements, prise en charge sociale et économique accrue, etc. Sur le front thérapeutique, qu'elles soient chirurgicales, radiologiques ou chimiques, les armes déployées sont toutes destinées à des frappes de plus en plus ciblées. Mais en matière de chimiothérapie, la précision reste encore très peu chirurgicale. Certes des progrès considérables ont été réalisés pour certaines formes de cancers, mais dans l'ensemble, l'arsenal actuel du chimiothérapeute se compose encore de médicaments anciens, forts cytotoxiques et bien peu ciblés, sur le plan cellulaire tout au moins. Les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) bénéficient désormais d'un remède efficace et sélectif, le Glivec[®], inhibiteur sélectif de la protéine kinase Bcr-Abl directement impliquée dans la genèse et la progression de la LMC [1]. Ce même médicament est également actif vis-à-vis des tumeurs stromales gastro-intestinales [2]. Malheureusement, les

patients atteints d'un cancer du poumon, du sein, du colon, de la prostate et du pancréas ne sont pas logés à la même enseigne et ne bénéficient pas de cette avancée thérapeutique révolutionnaire. Pour eux, la guerre continue avec son cortège d'espoir et de révolte face à ce fléau dévastateur.

La guerre contre le cancer : vieux médicaments et nouveaux espoirs

Il est courant de définir la recherche contre le cancer comme une guerre, non seulement à la suite de l'action médiatique du président américain il y a 30 ans, mais aussi et surtout parce qu'il existe effectivement un lien entre guerre et cancer. Certes, le concept de traitement du cancer avec des agents chimiques remonte à plus de 500 ans, quand des préparations à base d'argent, de mercure et de zinc étaient

Glossaire

Aplasia

Arrêt du développement d'un tissu ou d'un organe (ici la moelle osseuse).

Cancer

Tumeur maligne.

Chimiothérapie

Thérapeutique (traitement de la maladie) par les agents chimiques.

Cytokine

Molécule, généralement protéique, produite par le système immunitaire pour défendre l'organisme des agressions externes (virus, parasites).

Leucopénie

Diminution du nombre des globules blancs du sang.

Oncogène

Gène responsable de la transformation des cellules saines en cellules tumorales et de leur prolifération.

initialement utilisées pour soigner, ou au moins tenter de soulager les patients atteints de cette maladie alors totalement méconnue. Le premier traitement systématique du cancer date de 1865 lorsque le médecin allemand Lissauer observe un effet positif en soumettant un patient atteint d'une leucémie à un traitement à base d'arsénite de potassium. Mais c'est dans la première moitié du XX^e siècle que naît véritablement la pharmacologie antitumorale à l'issue des deux conflits mondiaux.

Les moutardes azotées, comme la trichloroéthyle amine, utilisées lors de la première guerre mondiale sont à l'origine des premiers médicaments anticancéreux. C'est un des paradoxes de notre monde où guerre rime avec avancée thérapeutique. L'exposition aux gaz moutardes (il s'agit en fait de leurs précurseurs, les gaz soufrés ou gaz-H) a fait plus de 400 000 victimes en 1917, principalement dans le nord de la France, notamment dans la région d'Ypres (d'où le nom d'ypérites donné à ces gaz). L'action cytotoxique du gaz moutarde devait d'abord être attribuée à la production d'acide chlorhydrique, mais rapidement les lésions de la moelle osseuse étaient mises en cause. On était loin alors de l'usage thérapeutique de cet agent. Les signes cliniques étaient de deux ordres : d'une part, le pouvoir vésicant était responsable de graves brûlures de la peau, des yeux et de l'appareil respiratoire ; d'autre part, l'exposition au gaz s'accompagnait d'une aplasie de la moelle osseuse, d'une leucopénie, de la dissolution du tissu lymphoïde ou encore d'ulcérations du tractus gastro-intestinal.

Après la première guerre mondiale, l'observation chez l'animal des lésions induites par la trichloroéthyle amine comme la suppression des granulocytes (variétés de globules blancs), la thrombocytopenie (diminution du taux des plaquettes sanguines) et la leucopénie (diminution du nombre des globules blancs) devait déjà conduire à la prescription de ce gaz moutarde chez l'Homme aux alentours des années 1930. Quelques années plus tard, Alfred Gilman et ses collègues démontrent les effets lymphocytolytiques des moutardes azotées dans le cas du lymphosarcome induit chez la souris ; et en 1942, ils procèdent aux premiers essais cliniques chez des patients atteints d'un lymphosarcome. Il fallut attendre 1946, après la seconde guerre mondiale, pour que soient publiés les travaux sur le pouvoir antitumoral des β -chloroéthylamines et des dérivés sulfidés apparentés [3]. A cette première série de moutardes azotées appartient la méchloréthamine, toujours utilisée aujourd'hui en chimiothérapie antitumorale, principalement dans le traitement des lymphomes de Hodgkin (tumeurs malignes caractérisées par la présence de grandes cellules à noyaux polylobés et multinucléolés), en association avec la vincristine et la procarbazine.

L'utilisation persistante de la méchloréthamine pendant plus d'un demi-siècle soulève deux réflexions. D'une part, cette longévité témoigne du bien fondé de l'approche thérapeutique, de la validité de la cible ADN et de l'efficacité relative (faute de mieux) du composé. D'autre part, cette constatation souligne le peu de progrès réalisés en matière de développement d'agents antitumoraux. Il est regrettable d'admettre que la méchloréthamine, dont on connaît les toxicités (hématologiques mais aussi les vomissements, les nausées sévères) qu'elle peut induire, occupe toujours une place non négligeable de notre arsenal thérapeutique. D'autres produits de la même famille des moutardes azotées ont été développés (chlorambucile, melphalan, cyclophosphamide, ifosfamide), mais force est d'admettre qu'il s'agit d'analogues mieux tolérés et/ou un peu plus actifs

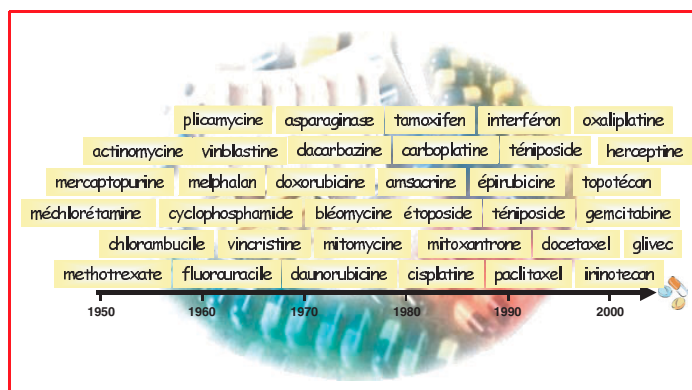


Figure 1 - L'arsenal actuel du chimiothérapeute se compose d'une panoplie de médicaments synthétiques ou d'origine naturelle, isolés de plantes et de microorganismes.

mais sans grande originalité chimique par rapport au produit de référence. C'est avouer notre impuissance face à cette maladie que d'utiliser encore en 2003 la méchloréthamine pour soigner les malades atteints de cancer. Ce n'est malheureusement pas un cas isolé puisque bien d'autres médicaments de la pharmacopée actuelle, comme le méthotrexate (synthétisé en 1949), l'actinomycine D (isolée en 1940), la 6-thioguanine (utilisée depuis 1953), mais aussi le cisplatine (1965), la bléomycine (1966), le 5-fluorouracile (1965), la cytosine arabinoside (1968), la mitomycine C (1959), la doxorubicine (adriamycine, 1969), restent parmi les médicaments les plus courants en chimiothérapie « moderne » (figure 1).

Cette vision pessimiste, mais néanmoins réaliste, ne doit pas pour autant masquer les nombreux progrès réalisés en matière d'optimisation des protocoles de traitements et la découverte de quelques nouveaux médicaments efficaces, et les immenses espoirs que suscitent les nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous pouvons au contraire faire preuve d'optimisme face à l'avènement des nouveaux outils de l'ère « omic », sensés à terme apporter un traitement à la carte pour chaque patient. Transcriptome, protéome, métabolome, et autres « outil-omes » permettront une caractérisation fine et individuelle des tumeurs cancéreuses. La révolution biologique initiée par le décryptage du génome humain permet d'entrevoir de nouveaux espoirs pour qu'enfin nous puissions combattre efficacement la maladie cancéreuse [4].

Mais la meilleure connaissance de la biologie de la cellule tumorale (figure 2) et de la physiologie des tumeurs permettra-t-elle pour autant de concevoir plus facilement des médicaments ciblés et efficaces ? Découvrir une cible est une chose, la valider (preuve de concept), dessiner et synthétiser un ligand spécifique de cette cible, qui soit aussi (bio)chimiquement stable, si possible hydrosoluble, correctement transporté et délivré au site d'action, dépourvu d'effets secondaires indésirables, etc., est une autre histoire. L'explosion de la biologie moléculaire dans les années 1980-1990 avait suscité les mêmes espoirs qui ne se sont pas concrétisés ou tout au moins de manière limitée. Espérons néanmoins que les nouveaux outils et les stratégies nouvelles apporteront les armes tant recherchées. L'optimisme est de mise puisque le directeur du National Cancer Institute aux États-Unis annonçait récemment son intention « d'éliminer la mort et la souffrance » dues au cancer à l'horizon 2015 [5]. Nul ne doute qu'il s'agit là d'un

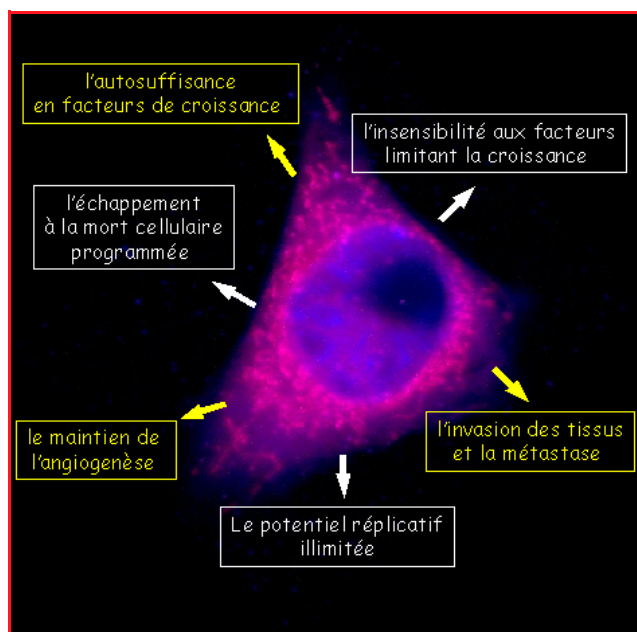


Figure 2 - Les principales propriétés acquises par la cellule cancéreuse [12].

vœu pieu, mais c'est néanmoins le signe d'une confiance aux travaux des chercheurs.

L'art de la guerre chimique : définir les cibles, affûter les armes, concevoir un plan d'attaque

En temps de guerre contre le cancer, tous les moyens sont permis, y compris l'emploi des armes chimiques et biologiques. Depuis quelques années déjà, les thérapies cellulaires ont apporté la preuve de leur efficacité pour le traitement de certaines formes de leucémies (greffes de moelle osseuse...), mais d'autres types de biothérapies font leur apparition pour le traitement des tumeurs solides, par exemple l'utilisation de cellules dendritiques pour le traitement des tumeurs de la prostate. Les chimiothérapies ont, elles aussi, largement évolué, mais le « bon vieux » médicament cytotoxique occupe toujours une place majeure de l'arsenal thérapeutique actuel.

C'est notamment le cas de la méchloréthamine évoquée précédemment. Le potentiel génotoxique de la moutarde azotée (2,2'-dichlorodéthyl sulfide) ou soufrée (2,2'-dichlorométhine) est établi depuis fort longtemps. Dès 1953, l'action carcinogène de ces deux composés était démontrée dans des modèles animaux [6]. On peut donc s'inquiéter lorsque que l'on sait que ces composés toxiques sous forme de gaz de combat sont régulièrement utilisés lors de divers conflits. Ils auraient été employés par les Égyptiens contre le Yémen en 1963-1967, par les combattants iraqiens durant la guerre Iran-Iraq en 1984, ainsi qu'en 1988 dans le village d'Halbja occupé par les Iraniens. Par ailleurs, les soldats américains auraient été exposés à ce type de composés dans le Golfe Persique en 1991 lors de l'opération Tempête du Désert [7]. Sur le plan moléculaire, les moutardes azotées ont pour cible privilégiée le matériel génétique de la cellule cancéreuse. Au travers de ses bases, l'ADN offre de multiples points d'ancrage pour des agents alkylants,

intercalants, ou des molécules susceptibles de s'étendre dans l'un des deux sillons qui délimitent la double hélice. Tous les moyens sont bons pour endommager le matériel génétique (figure 3) :

- le cisplatine se fixe de manière covalente dans le grand sillon de l'ADN pour induire des courbures de la double hélice,
- la bléomycine coupe cet ADN en multiples fragments,
- l'actinomycine et la daunomycine l'envahissent en insérant leurs chromophores phénoxazinone et anthraquinone entre les plans des paires de bases et en déployant les deux peptides cycliques ou le résidu glycosylé dans le petit sillon,
- et l'ecteinascidine s'étale dans le petit sillon pour tenter de capturer des protéines avoisinantes par l'intermédiaire de son bras tétrahydroisoquinoline.

La double hélice d'ADN, dont on célébrait récemment le cinquantenaire, reste un formidable biorécepteur pour les agents antitumoraux, des plus anciens au plus récents, ciblant par exemple les séquences télomériques 5'-(dTTAGGG)_n qui forment des structures à quatre brins protégeant l'extrémité des chromosomes [8].

L'ADN est une cible majeure en chimiothérapie antitumorale, mais qui s'affirme peu à peu également sous le label médicament. La thérapie génique du cancer offre des perspectives intéressantes pour traiter de façon hautement spécifique un type défini de tumeurs en épargnant les tissus sains. Sur ce front, les approches nouvelles actuellement mises à l'épreuve pour détruire les cellules néoplasiques sont :

- d'une part, le transfert de gènes destiné à inhiber des oncogènes et à augmenter l'expression d'anti-oncogènes (gènes de protection vis-à-vis de la transformation des cellules saines en cellules tumorales) ou l'anti-génécité des cellules tumorales ;
- d'autre part, l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens, anti-gènes, d'aptamères (molécules d'ARN simple brin adoptant une conformation tridimensionnelle spécifique vis-à-vis d'une protéine sélectionnée), ou encore l'interférence génique par des petits ARN.

Dans plusieurs cas, les premières expérimentations chez l'Homme utilisant l'une ou l'autre de ces thérapies à base d'acides nucléiques ont apporté des résultats encourageants et laissent entrevoir des traitements efficaces, voire curatifs, pour certains types de tumeurs pour lesquelles la chimiothérapie et la radiothérapie conventionnelles n'ont pas ou peu d'effet durable. Ainsi évolue l'ère de l'ADN médicament.

Les chimiothérapies actuelles ne sont pas toujours d'une grande efficacité. Le taux de survie à 5 ans est élevé pour les patients atteints de tumeurs des testicules ou du sein (tout au moins si le dépistage est relativement précoce), mais reste faible pour ceux atteints de tumeurs du pancréas ou du poumon par exemple [9]. Il est temps de changer le plan d'attaque vis-à-vis du cancer, de faire face à cette maladie de manière différente et collective en utilisant nos connaissances approfondies des mécanismes à la base de la cancérisation.

Par exemple, nous savons, tout au moins en partie, comment les cellules communiquent entre elles pour s'échanger des signaux de différenciation et de transformation maligne. Les cytokines peuvent exercer de puissants effets sur la prolifération et la mobilité cellulaire. Accroître leur production, notamment au travers d'une immunothérapie, semble donc être une voie prometteuse pour enrayer la prolifération tumorale. Nous connaissons

également une grande partie des voies de signalisation empruntées par la cellule cancéreuse au cours de sa prolifération. Il est donc logique de s'attaquer à ces processus en développant des molécules susceptibles de bloquer les signaux de survie de la cellule tumorale et les messages moléculaires transmis d'une cellule à l'autre, que ce soit en tentant d'intercepter directement le messager par capture ou en bloquant l'expansion des routes où circulent ces informations.

L'angiogenèse tumorale est une cible fort prisée actuellement [10]. Sans moyen de communiquer, la cellule cancéreuse isolée n'est pas viable. Empêcher la formation de néovaisseaux au sein des tumeurs est une stratégie théoriquement fort efficace pour limiter la croissance tumorale. Aussi a-t-on vu exploser au cours des cinq dernières années les familles chimiques d'agents anti-angiogéniques (molécules inhibant la formation de vaisseaux sanguins au sein des tumeurs), qu'ils soient ciblés vers la cyclooxygénase-2, le récepteur au VEGF ou d'autres facteurs pro-angiogéniques comme par exemple les protéines CYR61 et CD105.

Le théoricien militaire chinois Sun Zi (dit aussi Sun Tse, VI^e s. av. J.-C.) privilégiait la connaissance, le renseignement, la surprise et les stratagèmes, de préférence à l'usage de la force brute. Son *Art de la guerre* constitue le plus ancien traité de stratégie militaire connu. Nous pouvons peut-être tirer des leçons de cet enseignement ancien pour l'appliquer à la guerre contre le cancer [11]. La stratégie anti-angiogénique consiste à isoler l'ennemi, limiter sa croissance locale et ne plus lui permettre d'envahir un territoire tissulaire nouveau. Le médicament anti-angiogénique vise à fixer l'ennemi pour que le cytotoxique puisse plus aisément l'atteindre, le pénétrer et le tuer sur place. La stratégie est riche de promesses, mais ne serait-il pas aussi judicieux au contraire de tenter de déplacer la tumeur vers un territoire plus aisément opérable? Ne pourrait-on pas essayer d'activer la mobilité cellulaire pour induire un stress supplémentaire et provoquer des altérations à la surface des cellules qui permettraient de les identifier plus aisément? A la suite d'une première phase de chimiothérapie conventionnelle destinée à affaiblir la cellule

cancéreuse, ne pourrait-on pas la désolidariser de son environnement initial pour rompre son confort local, l'obliger à bouger pour la fatiguer davantage? Face à un opposant supérieur, pourquoi ne pas le forcer à l'amener sur un terrain favorable, sur un champ de combat qui pourrait être plus facilement défendable ou circonscrit, où il n'aurait plus ses repères moléculaires et où sa réaction pourrait être plus aisément anticipée? Cette stratégie n'a semble-t-il jamais été prise en compte tant le risque est grand en déplaçant l'ennemi de ne plus pouvoir contrôler une situation déjà délicate. A priori, favoriser le déplacement tumoral, c'est faire le jeu de la tumeur et amplifier son action délétère. Mais c'est aussi forcer la cellule cancéreuse à sortir de son confort et perdre ses repères, et c'est peut-être par ce genre de manipulation audacieuse que nous connaissons davantage les limites de la maladie cancéreuse. Et si nous pouvions interrompre le voyage dans l'organisme d'une cellule métastatique pour la forcer à regagner son compartiment tissulaire original. Comment pourrions-nous agir sur la métastase hépatique par exemple pour lui intimer l'ordre de prendre le chemin inverse pour rejoindre le foie d'où elle s'est échappée? L'idée est utopique, voire saugrenue à présent, mais demain peut-être pourrions-nous agir sur le rétro-traffic des cellules tumorales dans l'organisme pour amener les cellules circulantes vers un site sanctuaire opérable ou tout au moins chimiosensible [11]. Mais pour le moment, les agents chimiotactiques cancer-spécifique ne sont pas légion.

Les dommages collatéraux

Toutes les guerres font malheureusement des victimes innocentes. Les armes chimiques utilisées pour le traitement du cancer sont censées détruire les cellules cancéreuses en épargnant les cellules saines. Mais la sélectivité est toute relative, et la plupart des médicaments utilisés en chimiothérapie présentent une toxicité hématologique non négligeable. Celle-ci est particulièrement importante pour les inhibiteurs de la topoisomérase II, notamment les épipodophylotoxines (étoposide, téniposide), les anthracyclines et les anthracénediones (daunomycine,

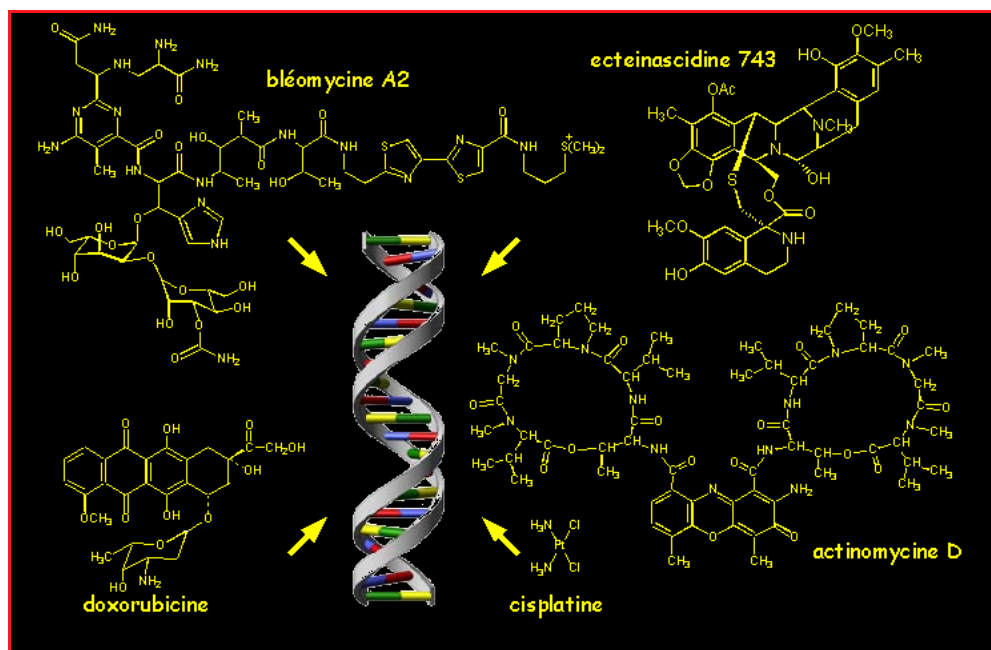


Figure 3 - La double hélice d'ADN constitue le récepteur de nombreux médicaments anticancéreux anciens (actinomycine, cisplatine, doxorubicine, bléomycine A2) et nouveaux (ecteinascidine 743).

mitoxantrone). Il est désormais bien établi que ces produits présentent une activité leucémogène importante. Ces dernières années, les lésions du matériel génétique induites par l'étoposide ont été bien caractérisées. Elles touchent principalement la région chromosomique 11q23 et plus spécifiquement le gène *MLL* dont la translocation conduit à l'expression d'une protéine chimérique impliquée dans la leucémogénèse. Induire une leucémie en voulant soigner un cancer, cela ressemble à un mauvais scénario de film d'horreur. C'est pourtant une triste réalité, certes peu fréquente, mais néanmoins occasionnelle et redoutable. Réduire les effets secondaires néfastes, surtout ceux aux conséquences graves sur le plan médical et psychologique, est aussi important que de tenter d'améliorer l'efficacité d'un médicament donné.

Conclusion

C'est une longue guerre harassante que mènent les pharmaco-chimistes depuis près d'un demi-siècle contre le cancer. Des batailles décisives ont été remportées, mais la guerre fait toujours rage, plus que jamais d'ailleurs avec l'avènement de ce nouveau plan d'action national fondé sur des pôles d'excellence et un institut central représentant l'organe de pilotage stratégique pour lancer de nouvelles phases d'attaque contre le cancer. L'arsenal thérapeutique s'est étoffé peu à peu et se compose de spécialités anciennes mais toujours forts utiles, et de spécialités nouvelles agissant de manière moins brutale et plus spécifique. Le cocktail favori du chimiothérapeute à base de 5FU-cisplatine-méthotrexate-anthracycline laisse place peu à peu à des molécules chimiques plus finement adaptées à la nature propre de la tumeur traitée et de son environnement. Le chimiste se nourrit des avancées structurales et fonctionnelles apportées par le biologiste pour concevoir de nouveaux agents antitumoraux et de nouveaux outils moléculaires qui guideront à leur tour le

biologiste vers une meilleure connaissance de la physiologie du cancer. Le renforcement de l'interface chimie-biologie est certainement l'une des clés pour lutter plus efficacement contre le cancer.

Références

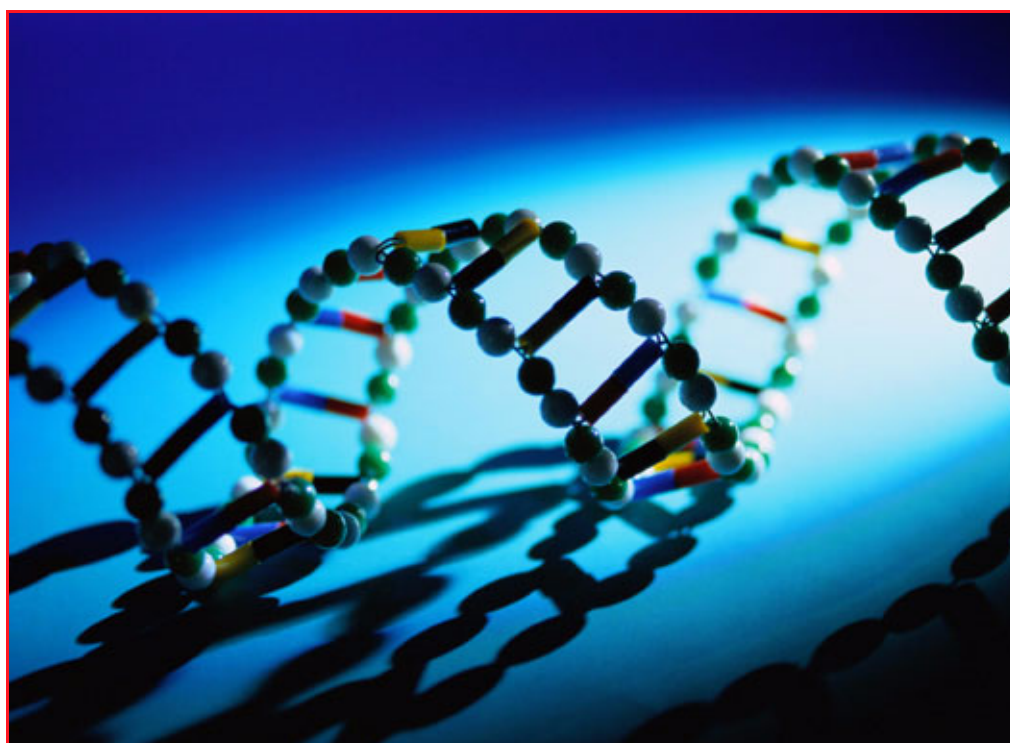
- [1] Capdeville R., Buchdunger E., Zimmermann J., Matter A., *Nature Rev. Drug Discov.*, **2002**, 1, p. 493.
- [2] Eisenberg B.L., von Mehren M., *Expert Opin Pharmacother.*, **2003**, 6, p. 869.
- [3] Gilman A., Philips F.S., *Science*, **1946**, 103, p. 409.
- [4] Clarke P.A., te Poele R., Wooster R., Workman P., *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, 62, p. 1311.
- [5] Kaiser J., *Science*, **2003**, 299, p. 1297.
- [6] Heston W.E., Levillain W.D., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **1953**, 82, p. 457.
- [7] Bullman T., Kang H., *Ann. Epidemiol.*, **2000**, 10, p. 333.
- [8] Hurley L.H., *Nature Rev. Cancer*, **2002**, 2, p. 188.
- [9] Hill C., Doyon F., *Bull Cancer*, **2003**, 90, p. 207.
- [10] Scappaticci F.A., *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2003**, 12, p. 923.
- [11] Brudnak M.A., Hoener S.G., *Medical hypotheses*, **2003**, 60, p. 603.
- [12] Hanahan D., Weinberg R.A., *Cell*, **2000**, 100, p. 57.



Christian Bailly

Après avoir occupé les fonctions de directeur de recherche et de chef de laboratoire (laboratoire de pharmacologie antitumorale*) à l'Inserm, Christian Bailly a quitté temporairement l'Inserm pour occuper des fonctions dans l'industrie pharmaceutique et est actuellement directeur du département de cancérologie expérimentale à l'Institut de Recherches Pierre Fabre à Castres.

* Inserm UR 524 et Laboratoire de pharmacologie antitumorale du Centre Oscar Lambret, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59045 Lille.
Courriels : bailly@lille.inserm.fr
et christian.bailly@pierre-fabre.com



Une santé de fer

Pathologies humaines et thérapeutiques chélatrices : quel rôle pour les chimistes ?

Jean-Louis Pierre et Gérard Lescoat

Abstract

Iron and health. Human pathologies and iron chelation therapies: what role for the chemists?

Iron fulfils a vital role in virtually all living organisms, from bacteria to mammals. Iron in excess is toxic and iron deficiency is also a problem, such that iron homeostasis is a major preoccupation in biology. The primarily role of the chemists is the design of iron chelators involving complex specifications to reach efficiently and selectively the biological target. Iron chelators are needed not only for the treatment of iron overload but they may also be of clinical practice in antioxidant therapy, in the treatment of cancers, of malaria or in antibiotherapy. Moreover, iron chelators conjugated with probes (fluorophores, spin labels, radioactive...) may be efficient diagnostic tools. Recent discoveries allow to speculate on new therapies, more discerning than the simple iron chelation.

Mots-clés

Métabolisme du fer, hémochromatoses, cancer, chélateurs du fer.

Key-words

Iron metabolism, haemochromatosis, cancer, iron chelators.

Le fer joue un rôle fondamental dans les organismes vivants ; seules les bactéries du genre *Lactobacillus* ne requièrent pas de fer. Il est impliqué dans le transport, le stockage et l'activation de l'oxygène moléculaire, dans la réduction des ribonucléotides et de l'azote, dans l'activation et la décomposition des peroxydes et dans le transport des électrons *via* divers transporteurs couvrant une gamme de potentiels redox de l'ordre de un volt [1]. La vie est apparue dans un environnement anaérobie et le fer, sous forme ferreuse hydrosoluble, était biodisponible. Lorsque les microorganismes photosynthétiques émergèrent, transformant l'eau en oxygène, le fer devenant ferrique (Fe^{III}) précipita irréversiblement sous formes d'oxydes et d'hydroxydes. Les réactions entre le fer et l'oxygène engendrèrent des radicaux hautement toxiques (superoxyde, hydroxyle). L'arrivée de O_2 fut donc une catastrophe à laquelle peu d'organismes vivants survécurent. Ils durent développer des mécanismes protecteurs contre les radicaux de l'oxygène et des mécanismes pour solubiliser le fer qui leur était nécessaire. Le « paradoxe du fer » réside entre son rôle vital, donc sa nécessité, et sa forte toxicité. Son homéostasie doit donc être très précisément régulée par les organismes vivants, carence et surcharge constituant des pathologies majeures.

Le fer chez l'humain

La femme et l'homme adultes contiennent un niveau constant de fer de l'ordre de 45 et 55 mg par kg. L'hémoglobine en représente environ 70 % ; myoglobine, cytochromes et autres enzymes à fer en comprennent 10 %, le reste se distribuant entre la protéine de stockage ferritine et son produit de dégradation, l'hémosidérine. La transferrine, protéine de transport extracellulaire, n'intervient que pour 0,1-0,2 %. Le fer fonctionne pratiquement en circuit fermé. L'apport alimentaire est de 1-3 mg/jour, compensant la perte *via* la bile, l'urine et les cellules excrétées par l'intestin et la peau. Absorbé au niveau

intestinal, il est solubilisé par une protéine plasmatique, la transferrine, qui le transporte aux cellules. La source principale de fer pour la transferrine résulte du catabolisme des globules rouges non viables. Une vue générale et très complète du métabolisme du fer est donnée dans la référence [1].

Glossaire

Apoptose

Mort cellulaire programmée.

Fluorophore

Groupement d'atomes conférant à la molécule des propriétés de fluorescence.

Hémochromatose

Coloration des tissus par des pigments ferrugineux ; l'hémochromatose est le signal visible d'une surcharge en fer.

Homéostasie

Maintien à leur valeur normale des différentes constantes physiologiques.

Ischémie

Arrêt de la circulation sanguine dans un organe ou un tissu.

Porphyrie

Trouble du métabolisme des porphyrines.

Sidérémie

Présence de fer dans le sérum.

Sidérose

Infiltration des tissus par le fer.

Sidérophores

Molécules de faible poids moléculaire produites par les microorganismes pour chélater le fer (III) avec une très haute affinité et être ensuite captées par des récepteurs spécifiques.

Sphère de coordination d'un métal

Ensemble des atomes du ligand qui sont liés au métal dans le complexe métal-ligand.

Traitement parentéral

Par une autre voie que la voie digestive.

Thalassémies

Anémies infantiles héréditaires caractérisées par leurs caractères hématologiques (hémoglobine anormale).

Les carences en fer

La première des pathologies liée au fer est la carence en cet élément vital. Elle constitue la première déficience nutritionnelle (près d'un milliard de personnes sont carencées en fer). Les carences s'observent surtout dans les pays sous-développés ou encore chez les enfants ou les vieillards qui consomment moins de viande. La carence peut aussi provenir, non d'un défaut d'absorption, mais d'un excès de pertes. Ainsi, les femmes sont plus souvent carencées du fait de leurs pertes menstruelles. En outre, les besoins en fer sont augmentés durant la grossesse, la lactation et la croissance. Tout saignement entraînant une perte de fer, de nombreuses pathologies ont pour effet secondaire une carence en ce métal. L'anémie hyposidérémique est une mauvaise redistribution du fer après destruction des globules rouges. La conséquence la plus immédiate de la carence en fer est l'anémie.

Le fer joue un rôle fondamental dans l'infection microbienne [2]. Celle-ci entraîne une baisse rapide du fer sérique ; il est reconnu que les individus carencés en fer ont une résistance accrue à certaines infections. En région tropicale, le traitement par voie orale d'individus carencés en fer par du sulfate ferreux entraîne l'activation de malaria, de brucellose ou de tuberculose : le fer ainsi apporté « nourrit » les microorganismes envahisseurs.

Les carences en fer entraînent également une baisse des défenses immunitaires [3]. En diminuant la croissance bactérienne et aussi l'immunité de l'hôte, il est clair que les conséquences d'une carence en fer sont contradictoires. Le traitement des carences consiste usuellement en une supplémentation (régime nutritionnel). Dans les cas les plus graves, un traitement parentéral par des complexes fer-sucrose ou fer-dextrane est requis.

Les surcharges en fer

La surcharge en fer peut être définie comme une situation pathologique dans laquelle la concentration en fer plasmatique excède plusieurs fois la capacité totale de fixation de la transferrine. La surcharge en fer, qui peut être létale, intervient dans diverses situations (répertoriées dans [1]). De manière générale, les surcharges (ou hémochromatoses) associent cirrhose, diabète et pigmentation cutanée. Les hémochromatoses primaires sont dues à un excès d'absorption de fer. Cet excès peut être dû à une intoxication alimentaire (un exemple célèbre de sidérose fut observé dans une tribu bantoue avec plusieurs décès dus à de la bière acide contenue dans des boîtes en fer). Hémochromatose génétique, porphyrie cutanée tardive, hémochromatoses néonatales et juvéniles ou encore hémochromatoses associées à un syndrome dysmétabolique entraînent également une surcharge en fer [4]. Des surcharges secondaires par excès d'absorption interviennent dans certaines anémies (en particulier dans le cas de la thalassémie qui exige des transfusions régulières entraînant une surcharge). D'autres surcharges secondaires peuvent être observées malgré une absorption de fer normale ou même déficiente. Dans ce cas, elles sont dues à des transfusions multiples sur des patients présentant des anémies particulières ou encore à des anomalies génétiques de protéines liées au transport du fer (ex. : atransferrinémie). Enfin, des surcharges locales sont connues (cerveau dans la maladie de Halleroven-Spatz, poumon dans l'hémosidérose pulmonaire idiopathique ou dans le

syndrome de Goodpasture, etc.). Le traitement des surcharges en fer dans le cas des hémochromatoses héréditaires consiste en phlébotomies hebdomadaires de 500 mL. De manière générale, le traitement consiste en l'utilisation de chélateurs du fer.

La surcharge en fer stimule la production de radicaux hydroxyles [5], espèces hautement réactives qui dégradent tous les tissus. En outre, les espèces produites lors d'un stress oxydant sont aptes à libérer le fer primitivement lié aux protéines. Le fer se trouve donc impliqué, indirectement, dans toutes les pathologies entraînant un stress oxydant (inflammations, maladies auto-immunes, dermatoses, effets des radiations ionisantes, effets de certains polluants, de certains médicaments, de l'ischémie-reperfusion, etc.). La surcharge en fer semble favoriser l'apparition de tumeurs et de nombreuses hémochromatoses se compliquent de cancers. Le fer des particules inhalées est sans doute à l'origine du déclenchement de cancers chez les mineurs de fer ou d'amiante. Les thérapeutiques chélatrices semblent donc pouvoir être utilisées afin de prévenir la formation des radicaux oxygénés toxiques.

Les chélateurs du fer

Les sidérophores sont des molécules de bas poids moléculaires, chélatrices du fer ferrique, excrétées par les microorganismes pour solubiliser le fer de l'environnement et permettre sa nécessaire « capture » par le microorganisme [1]. La majorité des sidérophores sont des ligands hexadentates qui impliquent des sous-unités acide hydroxamique, catéchol ou acide α -hydroxycarboxylique. Leur pouvoir chélateur est en premier lieu relié à la valeur de leur pFe ($pFe = -\log[Fe^{3+}]$ à $pH = 7,4$, $[Fe]_{total} = 10^{-6} M$, $[ligand]_{total} = 10^{-5} M$, $T = 25^\circ C$, $I = 0,1 M$). En tenant compte de toutes les formes possibles de complexes, le pFe ainsi normalisé permet des comparaisons entre chélateurs. A l'inverse, les constantes globales de complexation ne permettent pas de comparer les affinités d'un ligand pour le fer car chacune ne rend compte que d'une seule forme de complexe. Plus le pFe est élevé, plus l'affinité est grande puisque le pFe est égal à $-\log$ de la concentration en fer libre, c'est-à-dire non complexé par le chélateur. Le seul chélateur utilisé cliniquement est le Desféral[®] (méthane sulfonate de la desferrioxamine B naturelle, pFe : 26,6). La découverte dans les années 60 de sa capacité à chélater le fer ferrique de l'organisme et à permettre son élimination par l'urine a révolutionné le traitement de bon nombre de surcharges sidériques. Cependant, dans l'hémochromatose génétique, les saignées répétées demeurent encore le traitement le plus couramment utilisé. Malheureusement, le Desféral[®] est particulièrement coûteux et n'est administrable que par voie parentérale longue et douloureuse. Il présente en outre une toxicité notable (déformations osseuses, anomalies oculaires et auditives, toxicité cérébrale et autres effets secondaires). Ces inconvénients ont entraîné d'intenses recherches de chélateurs synthétiques par les chimistes. Des milliers de publications existent sur le sujet ! Les modèles synthétiques de sidérophores impliquent des sphères de coordination strictement biomimétiques (catécholates, hydroxamates...) ou plus éloignées des modèles naturels (hydroxypyridinones, dérivés de EDTA, de la 8-hydroxyquinoline, etc.). Nous ne citerons brièvement ici que quelques exemples à partir d'excellentes et récentes mises au point sur la chimie de coordination des sidérophores naturels et synthétiques (K.N. Raymond fut le

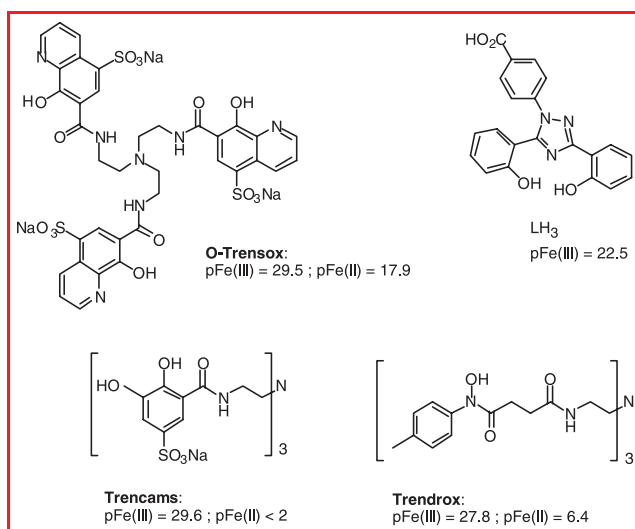


Figure 1 - Quelques chélateurs synthétiques du fer.

premier à développer cette chimie) ou encore sur les chélateurs du fer à visée clinique [6-9]. Il faut souligner que le rôle fondamental des chimistes est double, synthèses et physico-chimie avancée étant les « pré-requis » indispensables à l'étude des propriétés biologiques de ces chélateurs. La figure 1 regroupe à titre d'exemple quelques chélateurs synthétiques. O-Trensox, Trendrox et Trencams forment des complexes de stœchiométrie 1:1 entre le ligand complètement déprotoné et le cation ferrique. Le nouveau chélateur LH₃, développé par le groupe Novartis, forme un complexe 2 ligand/1 fer. Au pH physiologique, le complexe de O-Trensox est un *tris* hydroxyquinolinolate, celui de Trencams un *tris* catéchololate et celui de Trendrox un *tris* hydroxamate.

La plupart des chélateurs de synthèse ont également fait l'objet d'études biologiques plus ou moins avancées. Ainsi par exemple, le chélateur hydrosoluble O-Trensox est très sélectif pour Fe(III) par rapport à Fe(II), Cu(II), Zn(II), Ca(II) et Al(III). Son complexe ferrique n'est pas photoréductible (contrairement à celui de EDTA) et son complexe ferreux ne catalyse pas la réaction de Fenton productrice des radicaux hydroxyles. O-Trensox présente en outre des propriétés particulièrement prometteuses : il mobilise *in vitro* le fer de la ferritine et *in vivo*, le fer hépatique de rats surchargés [10]. O-Trensox présente également des effets antiprolifératifs et apoptotiques dans les lignées d'hépatoblastome humain HepG2 [11] et d'hépatome de rat Fao [12]. Des études chimiques ont également été développées pour étudier l'incidence de la balance hydrophilie/lipophilie du chélateur sur son activité biologique. A titre d'exemple, on peut citer le développement d'une famille dérivée de O-Trensox (substitution par des chaînes « polyoxyde d'éthylène » de longueurs variables) au sein de laquelle, pour une même valeur du pFe, les chélateurs peuvent être hydrosolubles, solubles en milieu organique ou répartis entre les deux phases [13].

Shanzer a étudié des analogues de ferrichromes lipophiles qui deviennent hydrophiles dans les cellules suite à l'hydrolyse des groupes acétoxy méthyl terminaux du ligand sous l'action d'estérases [14] (figure 2). La rétention intracellulaire est visualisée en marquant ces analogues par des groupes fluorescents. Ce superbe travail illustre parfaitement quel peut être l'apport des chimistes dans le domaine de la chélation du fer en milieu biologique.

Ces composés semblent prometteurs comme antimalariens. Dans le cas de la malaria (*Plasmodium falciparum*), Shanzer avait auparavant développé des « sidérophores inverses », analogues des sidérophores trishydroxamates, ferrioxamines, porteurs de substituants lipophiles, permettant de pénétrer les membranes cellulaires par diffusion, de capturer le fer et d'agir comme inhibiteurs de la croissance du parasite [15]. L'activité antimalarienne des chélateurs du fer a été également mise en évidence pour le Desféral[®] ainsi que pour d'autres chélateurs [16-17]. Trouver des chélateurs qui priveraient de fer le parasite préférentiellement à l'hôte apporterait une arme nouvelle contre ce qui reste l'une des premières causes de mortalité sur la planète.

Parmi les sidérophores qui, à l'heure actuelle, font l'objet d'essais cliniques, signalons que les dérivés de EDTA (DTPA, HBED) sont insuffisamment sélectifs pour le fer. Le plus intéressant est une 3-hydroxypyridine-4-one (CP20, déféripone ou Ferriprox[®]), administrable oralement, qui forme un complexe 3:1 ligand-Fe(III) (pFe³⁺ : 19,5). Cependant, ce chélateur semble relativement toxique [7-8]. Le composé LH₃ (ou ICL670A) (figure 1) développé par Novartis pour remplacer le Desféral[®], conçu par modélisation sur ordinateur, est actif par voie orale ; il a donné des résultats prometteurs sur des animaux surchargés en fer [18].

Une « piste » intéressante est également ouverte par un récent travail de R.J. Bergeron [19] : alors que les sidérophores de type catécholiques sont considérés comme inutilisables en thérapeutique du fait de leur stimulation de la croissance bactérienne (ils « nourrissent la bactérie » avec le fer qu'ils ont mobilisé chez l'hôte), Bergeron a montré que l'énantiomère du sidérophore naturel de certaines bactéries est un agent de déférration effectif pour l'hôte, sans pour autant promouvoir la croissance bactérienne. Il était connu que la reconnaissance du sidérophore était énantiomérique, mais cet aspect n'avait jamais été appliqué.

Les chélateurs du fer, vecteurs d'antibiotiques : la stratégie du « cheval de Troie »

Dans quelques cas, des sidérophores ou des analogues peuvent agir directement comme antibiotiques en privant de fer un microbe pathogène, soit par chélation compétitive, soit en bloquant le récepteur du ferrisidérophore avec un analogue de sidérophore non fonctionnel [20].

L'utilisation du sidérophore naturel d'une bactérie à combattre, comme vecteur d'un antibiotique fixé de façon covalente au sidérophore, a été développée en particulier par le groupe de M.J. Miller [20]. Cette stratégie est particulièrement élégante puisqu'elle utilise le système de transport du fer propre à l'organisme pathogène pour le combattre (figure 3). Cette approche a nécessité un très gros

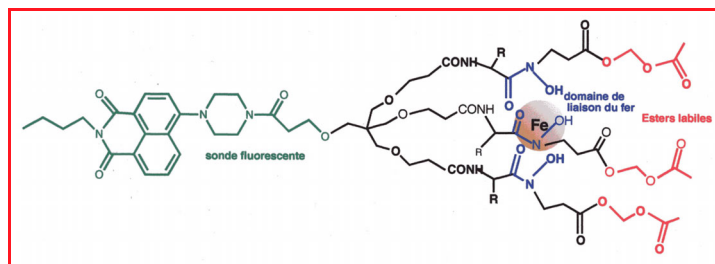


Figure 2 - Chélateur lipophile fluorescent, rendu hydrophile sous l'action des estérases (emprunté à [14]).

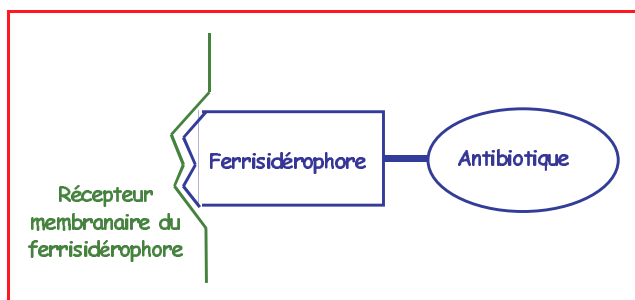


Figure 3 - Conjugué sidérophore-antibiotique : la stratégie du cheval de Troie.

développement de synthèses organiques, soit à partir du sidérophore proprement dit (semi-synthèses), soit par synthèses totales ; ceci est résumé dans la mise au point de M.J. Miller [20].

L'utilisation de « conjugués sidérophore-antibiotique » doit permettre de résoudre les problèmes de perméabilité cellulaire associés au phénomène de résistance aux antibiotiques. Cette voie constitue un moyen d'obtenir des antibiotiques sélectifs de tel ou tel pathogène.

Les chélateurs du fer comme antiprolifératifs

Le fer joue un rôle important dans la prolifération cellulaire normale ou pathologique. En effet, la surcharge en fer, notamment dans l'hémochromatose génétique, est fréquemment associée au développement d'un carcinome hépatocellulaire. Les chélateurs du fer apparaissent donc être un outil intéressant pour inhiber la prolifération tumorale. De nombreuses études ont été réalisées pour conforter cette hypothèse. Dans cet ordre d'idée, il a été montré que la desferrithiocine inhibe, avec une efficacité supérieure à celle du Desféral[®], la prolifération de cellules tumorales hépatiques de rat en culture [21]. Ces travaux ont montré que le Desféral[®] et les hydroxypyridinones (CP20 ou déféprone et CP411) inhibent la synthèse d'ADN en bloquant la prolifération à la phase S du cycle cellulaire [12, 22]. En culture de cellules d'hépatome humain, un effet antiprolifératif et apoptotique nettement supérieur à celui du Desféral[®] a été démontré avec le O-Trensox [10]. Le mode d'action des chélateurs du fer implique probablement l'inhibition d'enzymes fer dépendantes, elles-mêmes impliquées dans la prolifération cellulaire. La ribonucléotide réductase en est un exemple [16]. De l'ensemble de ces résultats, il résulte que les propriétés antiprolifératives et apoptotiques des chélateurs du fer permettent d'envisager leur utilisation comme élément adjuvant dans le traitement de certains cancers.

Vectorisation de chélateurs du fer

L'approche qui consiste à vectoriser un médicament par un ferrisidérophore n'en est qu'à ses balbutiements. Elle est en quelque sorte l'inverse de celle décrite plus haut. La vectorisation semble prometteuse dans la mesure où l'un des problèmes majeurs des thérapeutiques chélatrices est l'atteinte de la cible par le chélateur. La cible peut être simplement le fer en excès, mais aussi la cellule cancéreuse dans le cas des effets antiprolifératifs des sidérophores. Des

travaux ont été abordés récemment en collaboration entre chimistes et biologistes de Grenoble et de Rennes, impliquant la conjugaison de sidérophores avec des polyamines, ces derniers ayant la capacité de vectoriser des drogues [23], ou encore avec des cyclopeptides, dans le but de cibler le chélateur vers des cellules hépatiques cancéreuses.

Des chélateurs du fer comme outils de diagnostic

Ce point sort un peu du cadre de cet article ; néanmoins, il faut signaler tout le potentiel des sidérophores modifiés comme outils pour l'étude du métabolisme du fer, lequel recèle encore bien des « boîtes noires ». Les élégants travaux de Shanzer, fondés sur la préparation des analogues de ferrichromes conjugués à des sondes fluorescentes, ont permis le suivi du chélateur au cours et après la livraison du fer à des bactéries [24]. Sur le plan prospectif, le développement de chélateurs du fer comme outils pour étudier la biologie du fer est un domaine particulièrement ouvert. La figure 4 schématise de façon simplifiée un certain nombre de possibilités. Ainsi, par exemple, greffer de manière covalente un groupement nitroxyde (marqueur de spin) à un chélateur du fer peut permettre de préciser une localisation membranaire : inséré dans une couche lipidique, le groupement nitroxyde s'oriente, ce dont rend compte le spectre de RPE. Un groupement radioactif peut également être utilisé comme sonde de la pénétration cellulaire. Une électrode sélective du Fe(III) est en cours de développement dans notre laboratoire. Le principe consiste à greffer un groupe électropolymérisable sur O-Trensox pour en faire un matériau d'électrode. La miniaturisation de l'électrode peut permettre des dosages à l'échelle d'une cellule.

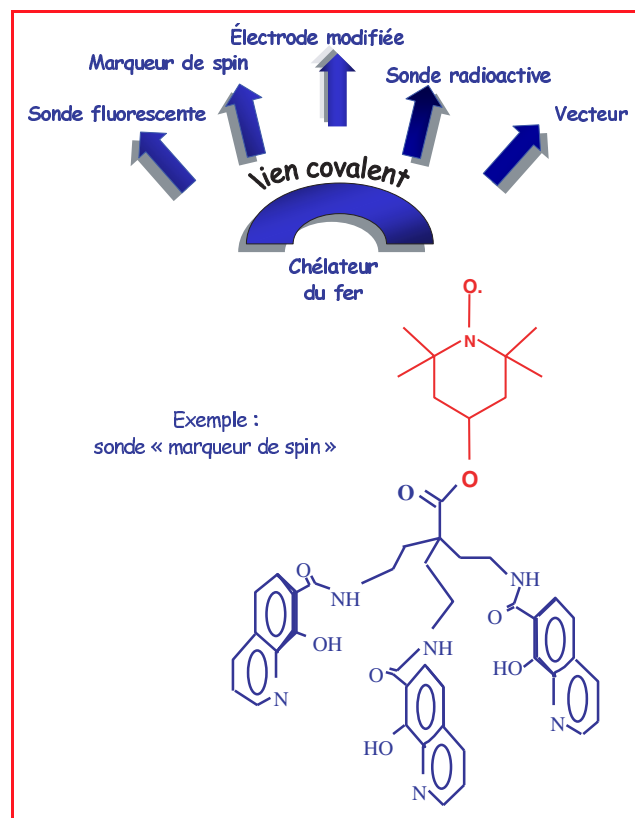


Figure 4 - Vers des outils pour l'étude du métabolisme du fer.

Prospective : vers de nouvelles générations de médicaments intervenant dans le métabolisme du fer

Cet article décrit essentiellement l'utilisation des chélateurs du fer(III). « Prendre le fer avec des pincettes » lorsqu'il est en excès, donc pathologique, n'est déjà pas un problème simple. Cependant, dans beaucoup de cas, cela peut être considéré comme une thérapeutique relativement primitive. On peut donc « rêver » d'approches plus subtiles. Ainsi, la découverte d'un transporteur intestinal du fer (Nramp2, désormais DMT1), généralement exprimé dans la plupart des tissus, permet d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques ; trouver des médicaments administrables oralement et bloquant spécifiquement la fonction de Nramp2 chez les patients atteints d'hémochromatose devient une approche réaliste [25]. La découverte très récente de l'hepcidine ouvre des perspectives thérapeutiques fascinantes [26-28]. Cette protéine, qui semble contrôler l'absorption du fer dans l'intestin, pourrait être une véritable hormone régulant le taux de fer dans le sang. « L'hepcidine serait au fer ce que l'insuline est au glucose ». A l'avenir, pour soigner les anomalies du métabolisme du fer, il s'agira de trouver des médicaments mimant l'action de l'hepcidine ou ayant l'effet inverse. D'autres cibles thérapeutiques peuvent encore être envisagées telles la protéine Fur qui « gère » l'absorption du fer chez les bactéries ou encore les IRP (protéines de régulation du fer chez les mammifères). Mais ceci est encore totalement spéculatif. Les futurs progrès nécessiteront une étroite collaboration entre biologistes et chimistes et, bien entendu, de l'imagination.

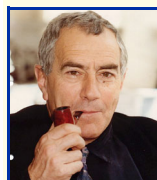
Remerciements

Nous tenons à remercier P. Baret (Grenoble) pour des discussions concernant ce manuscrit ainsi que tous les membres du GDR 1879 du CNRS (Dérégulation du métabolisme du fer : chimie, biologie et thérapeutiques) pour le creuset culturel dans le domaine concerné que furent les rencontres de ce groupe.

Références

- [1] Crichton R.R., *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, Wiley, Chichester, **2001**.
- [2] Weinberg E.D., *Physiol. Rev.*, **1984**, *64*, p. 65.
- [3] De Souza M., *La Recherche*, **1988**, *200*, p. 762.
- [4] Turlin B., Mendler M.H., Moirand R., Guyader D., Guillygomarc'h A., Deugnier Y., *Am. J. Clin. Pathol.*, **2001**, *116*, p. 263.
- [5] Pierre J.-L., Fontecave M., *Biometals*, **1999**, *12*, p. 195.
- [6] Albrecht-Gary A.M., Crumbliss A.L., *Metal ions in biological systems, vol. 35: Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals*, A. Sigel, H. Sigel (eds), M. Dekker, New York, **1998**, p. 239.
- [7] Tilbrook G.S., Hider R.C., *Metal ions in biological systems, vol. 35: Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals*, A. Sigel, H. Sigel (eds), M. Dekker, New York, **1998**, p. 691.

- [8] Merson L., Olivieri N., *Blood Reviews*, **2002**, *16*, p. 127.
- [9] Liu Z.D., Hider R.C., *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *232*, p. 151.
- [10] Rakba N., Aouad F., Henry C., Caris C., Morel I., Baret P., Pierre J.-L., Brissot P., Ward R., Lescoat G., Crichton R.R., *Biochem. Pharmacol.*, **1998**, *55*, p. 1797.
- [11] Rakba N., Loyer P., Gilot D., Delcros J.G., Glaise D., Baret P., Pierre J.-L., Brissot P., Lescoat G., *Carcinogenesis*, **2000**, *21*, p. 943.
- [12] Lescoat G., Gaboriau F., Delcros J.G., Pasdeloup N., Havouis R., Baret P., Pierre J.-L., Brissot P., *Hepatology*, **2002**, *36*(4), Pt2, 447A.
- [13] Imbert D., Baret P., Gaude D., Gauier-Luneau I., Gellon G., Thomas F., Serratrice G., Pierre J.-L., *Chem. Eur. J.*, **2001**, *8*, p. 1091.
- [14] Meijler M.M., Arad-Yellin R., Cabantchik Z.I., Shanzer A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, p. 12666.
- [15] Lytton S.D., Mester B., Dayan Y., Glickstein H., Libman J., Shanzer A., Cabantchik Z.I., *Blood*, **1993**, *81*, p. 214.
- [16] Liu Z.D., Hider R.C., *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *232*, p. 151.
- [17] Pradines B., Rolain J.M., Ramiandrasoa F., Fusai T., Mosnier J., Rogier C., Daries W., Baret E., Kunesh G., Le Bras J., Parzy D., *J. Antimicrob. Chemother.*, **2002**, *50*, p. 177.
- [18] Heinze U., Hegetschweiler K., Acklin P., Faller B., Lattmann R., Schnebli H.P., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, p. 2568.
- [19] Bergeron R.J., Xin M.G., Weimar W.R., Smith R.E., Wiegand J., *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, p. 2469.
- [20] Roosenberg J.M., Lin Y.-M., Lu Y., Miller M.J., *Current Med. Chem.*, **2000**, *7*, p. 159.
- [21] Kicic A., Chua A.C.G., Baker E., *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, *135*, p. 1393.
- [22] Chenoufi N., Drénou B., Loréal O., Pigeon C., Brissot P., Lescoat G., *Biochem. Pharmacol.*, **1998**, *56*, p. 431.
- [23] Delcros J.G., Tomasi S., Carrington S., Martin B., Renault J., Blagbrough I.S., Uriac P., *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, p. 5098.
- [24] Shanzer A., Liebman J., *Metal ions in biological systems, vol. 35: Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals*, A. Sigel, H. Sigel (eds), M. Dekker, New York, **1998**, p. 329.
- [25] Andrews N.C., Levy J.E., *Blood*, **1998**, *92*, p. 1845.
- [26] Pigeon C., Ilyin G., Courselaud B., Leroyer P., Turlin B., Brissot P., Loréal O., *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, p. 7811.
- [27] Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S., *Proc. Ntl. Acad. Sci.*, États-Unis, **2001**, *98*, p. 8780.
- [28] Nicolas G., Bennoun M., Porteux A., Mativet S., Beaumont C., Grandchamp B., Sirito M., Sawadogo M., Kahn A., Vaulont S., *Proc. Ntl. Acad. Sci.*, États-Unis, **2002**, *99*, p. 4596.



J.-L. Pierre

Jean-Louis Pierre

est professeur de chimie à l'université Joseph Fourier, Grenoble I*.



G. Lescoat

Gérard Lescoat

est directeur de recherche CNRS à l'Unité Inserm 522 de Rennes**.

* Laboratoire de chimie biomimétique (LEDSS, UMR CNRS 5616), Université J. Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9.
Courriel : Jean-Louis.Pierre@ujf-grenoble.fr

** Régulations des équilibres fonctionnels du foie normal et pathologique (Inserm U522), Centre Hospitalier Pontchaillou, 35033 Rennes Cedex.

Courriel : Gerard.Lescoat@rennes.inserm.fr

Récents développements de la pharmacologie anti-VIH

Jean-François Mouscadet et Éric Deprez

Abstract

Recent advances in anti-HIV pharmacology

Compounds that are currently licensed for the treatment of human immunodeficiency virus infections are either reverse transcriptase (RT) or protease (PR) inhibitors. In spite of the dramatic efficiency of therapies associating several of such compounds, new antiretrovirals are needed to thwart the rapid emergence of antiviral resistance. RT and PR inhibitors belonging to new structural classes that possess activity against viral strains, resistant to the first generation drugs, are currently developed. Regarding new targets, considerable progress has been made in the understanding of the viral integrase, enabling the design of agents that can inhibit the viral DNA integration step. In addition to viral enzymes, the process of HIV cell entry has been recently deciphered. New promising agents impairing cell recognition, co-receptor binding or viral-cell fusion have now entered clinical trials.

Mots-clés

Virus de l'immunodéficience humaine (VIH), intégrase, protéase, transcriptase inverse, fusion.

Key-words

Human immunodeficiency virus (HIV), integrase, protease, reverse transcriptase, fusion.

En 1995, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) créait la division de *Surveillance et contrôle des maladies émergentes et autres maladies transmissibles*. Cette création était motivée par les apparitions répétées de ce que l'on nomme des maladies émergentes dont la plupart sont dues à des virus. Ceux-ci, identifiés grâce aux progrès du diagnostic, ne sont pas nouveaux au sens strict mais sont qualifiés d'émergents du fait de leur extension récente. Ces virus

apparaissent du fait de mutations ou de recombinaisons entre des virus existants et/ou parce que les conditions dans lesquelles ils subsistaient ont été modifiées. L'expansion de la population mondiale et de ses activités qui favorisent les contacts entre les animaux porteurs de virus pathogènes et les humains ainsi que la transmission d'homme à homme est particulièrement en cause. C'est le cas notamment pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui résulterait de l'entrée dans l'espèce humaine, au cours de la première moitié du XX^e siècle, de virus de singes [1-3]. Les problèmes posés en santé publique par le VIH-1 comme par les autres virus émergents sont à l'origine d'un fort regain d'intérêt pour la pharmacologie antivirale. Au début des années 1980, seulement cinq composés étaient commercialisés comme antiviraux. Vingt ans plus tard, une trentaine de produits sont présents dans la pharmacopée humaine dont quinze sont utilisés comme anti-VIH (voir *tableau I*). Les polythérapies combinant deux ou trois de ces antiviraux avec une remarquable efficacité sont devenues le traitement standard du sida [4-5].

Glossaire

Cytoplasme

Espace interne de la cellule, limité par la membrane cellulaire, à l'exclusion du noyau.

Essais cliniques

Ensemble des essais thérapeutiques d'un produit administré à l'Homme. Phase I : étude de tolérance du produit ; phase II : étude des propriétés pharmacodynamiques et collecte des premières données sur l'effet thérapeutique ; phase III : appréciation des effets thérapeutiques et des effets indésirables ; phase IV : essai tardif destiné à affiner les connaissances sur le médicament et à en préciser les modalités et conditions d'utilisation.

Génome

Ensemble des gènes d'un organisme particulier.

Intégrase

Enzyme virale codée par l'extrémité C-terminale du gène *pol*, responsable de l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule infectée.

Protéase

Enzyme virale codée par l'extrémité N-terminale du gène *pol*, responsable du clivage des précurseurs polyprotéiques en protéines fonctionnelles.

RnaseH

Activité enzymatique qui dégrade l'ARN des duplex ADN/ARN. Elle est portée par le domaine C-terminal de la transcriptase inverse et est nécessaire pour la transcription inverse de l'ARN en ADN.

Transcriptase inverse

Enzyme virale codée par la partie centrale du gène *pol* qui catalyse la transcription de l'ARN viral simple brin en ADN double brin à partir duquel les gènes viraux s'expriment.

Tableau I - Inhibiteurs du VIH commercialisés.

| | |
|---|--|
| Analogues de nucléosides (INTI) | AZT (zidovudine) ddI (didanosine) ddC (zalcitabine) d4T (stavudine) 3TC (lamivudine) ABC (abacavir) |
| Analogue nucléotidique | ténofovir |
| Analogues non nucléosidiques (INNTI) | nevirapine delavirdine efavirenz |
| Inhibiteurs de protéase (IP) | amprenavir indinavir nelfinavir ritonavir saquinavir |

Les virus sont des parasites intracellulaires stricts dont le génome est de taille limitée, de l'ordre de 10 kilobases pour le VIH. La plupart utilisant la machinerie cellulaire pour assurer leur réplication, la conception d'antiviraux peut donc tirer profit soit de cibles strictement virales, soit de cibles cellulaires. La première approche est la plus susceptible de fournir des inhibiteurs spécifiques et peu toxiques, mais avec une probabilité importante d'émergence de virus résistants. La seconde approche pourrait permettre d'identifier des composés à large spectre avec une probabilité moindre de voir apparaître des résistances. Toutefois, le risque de toxicité y est plus important. En pratique, la première approche est celle qui a donné le plus de résultats. Jusqu'à présent, elle a été essentiellement consacrée à la recherche d'inhibiteurs des enzymes virales pour lesquelles il est plus aisé d'obtenir des tests d'activité simples, adaptés au criblage des grandes chimiothèques. Dans le cas du VIH, la réplication du virus dépend de trois enzymes virales qui constituent le moteur moléculaire de la réplication du virus (figure 1) : la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase. Une quatrième activité enzymatique, l'activité RNaseH, qui est une activité nucléasique dégradant l'ARN, est portée par un domaine de la transcriptase inverse. Ces activités enzymatiques sont donc les cibles privilégiées de la pharmacologie. Les inhibiteurs de transcriptase inverse ont été découverts très tôt, à partir d'inhibiteurs connus de polymérase. Le premier d'entre eux, l'azidothymidine (AZT), a été utilisé dès 1986. Par la suite, la résolution de la structure de la protéase virale a permis la conception rationnelle d'inhibiteurs basés sur des analogues de substrat non clivables. Les polythérapies actuelles utilisent des combinaisons d'antirétroviraux (ARV) dirigés contre ces deux cibles. Toutefois, quels que soient les régimes médicamenteux, on observe à plus ou moins brève échéance l'apparition de virus résistants aux ARV.

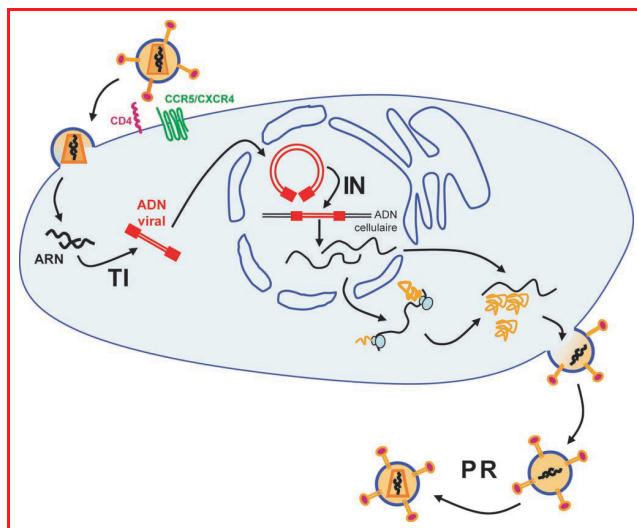


Figure 1 - Cycle de réplication du VIH.

Le cycle rétroviral présente plusieurs étapes qui sont les cibles des antirétroviraux actuels. Après l'adsorption du virus sur la membrane cellulaire par fixation sur le CD4 et l'un des deux co-récepteurs (CCR5/CXCR4), le virus pénètre dans la cellule par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Le génome viral sous forme de deux molécules d'ARN est transcrit par la transcriptase inverse (TI) en ADN. Celui-ci migre dans le noyau où il est intégré définitivement dans l'ADN cellulaire par l'intégrase virale (IN). Après la transcription et la traduction, les ARN viraux et les protéines viraux s'assemblent pour former une particule virale qui bourgeonne à la membrane cellulaire. Ces particules deviennent infectieuses après maturation par la protéase virale (PR) qui clive les précurseurs polyprotéiques en protéines structurales et en enzymes.

Abréviations

ARV : antirétroviral.
IN : intégrase.
INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse.
INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse.
IP : inhibiteur de la protéase.
OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
PR : protéase.
RnaseH : ribonucléase H.
Sida : syndrome de l'immunodéficience humaine acquise.
TI : transcriptase inverse.
VIH : virus de l'immunodéficience humaine.

La résistance est liée à la présence de mutations dans la séquence du virus qui modifient la structure de l'une ou des deux enzymes ciblées. Ces mutations sont générées par le mode de réplication du virus qui utilise une polymérase, la transcriptase inverse, dénuée d'activité de relecture. Les mutations, constamment produites, émergent sous la pression de sélection imposée par la présence de l'inhibiteur. Les ARV deviennent alors moins actifs car les mutations sélectionnées se traduisent par une perte d'affinité du produit pour sa cible. La résistance aux ARV est devenue un problème majeur du traitement de l'infection par le VIH. Bien que des dizaines de milliers de composés à activité anti-VIH aient été identifiés (voir http://apps1.niaid.nih.gov/struct_search/ pour une liste exhaustive), les progrès les plus significatifs portent sur l'obtention de composés actifs contre les isolats viraux résistants et/ou dirigés contre de nouvelles cibles. Ce sont ces progrès que nous détaillons ci-après.

Nouveaux inhibiteurs de transcriptase inverse

Le génome du virus qui pénètre dans la cellule est constitué de deux molécules d'ARN simple brin. Pour que le virus puisse se répliquer, cet ARN doit être transcrit en ADN double brin (figure 1). Cette étape est catalysée par la transcriptase inverse virale (TI) dont les nucléotides cellulaires sont les substrats endogènes. Les inhibiteurs de TI sont classés en deux catégories selon leur mécanisme d'action.

La première catégorie comprend les analogues de nucléosides (inhibiteurs nucléosidiques ou INTI) qui rentrent en compétition avec les substrats naturels de l'enzyme. Ces composés doivent être triphosphorylés en nucléotides pour pouvoir agir. La première phosphorylation, prise en charge par une kinase cellulaire, est l'étape limitante de leur activité antivirale. Du point de vue virologique, ces inhibiteurs génèrent tous l'apparition de résistances. Les différents produits sélectionnent des mutations différentes, mais celles-ci induisent souvent des résistances croisées [6]. Les principaux enjeux actuels sont l'obtention d'analogues actifs contre les virus résistants aux produits actuels et la synthèse d'analogues de nucléosides monophosphorylés de façon à contourner la première étape de phosphorylation. Citons pour l'exemple deux analogues particulièrement avancés : l'emtricitabine ou FTC (**1**), un analogue de la cytosine, et l'amdoxovir ou DAPD (**2**), un analogue de la guanosine (figure 2). L'intérêt de ce dernier réside dans sa capacité à bloquer la réplication des virus portant la mutation dite d'insertion à la position 69 de la TI, mutation associée à une large résistance aux autres INTI. Concernant les analogues

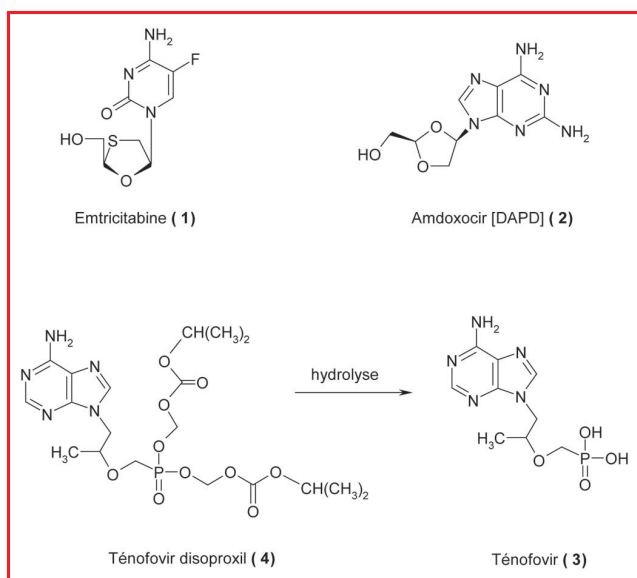


Figure 2 - Nouveaux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.

L'emtricitabine et l'amdoxovir sont deux analogues de nucléosides dont l'activité antivirale dépend d'une triphosphorylation en nucléotides. L'amdoxovir est une prodrogue, désaminée *in vivo* en DXG (dioxolane guanine) par une adénine désaminase cellulaire. Le ténofovir est une nucléotide monophosphorylée dont la prodrogue active est le ténofovir disoproxil.

phosphorylés, le ténofovir (**3**), récemment commercialisé, est actuellement l'unique produit dans cette catégorie. C'est un analogue monophosphorylé qui ne requiert donc que deux étapes cellulaires de phosphorylation. Le ténofovir illustre également une autre voie de recherche sur les ARV puisque le produit lui-même n'ayant pas été utilisé du fait de sa très faible biodisponibilité, il est commercialisé sous forme de prodrogue, le ténofovir disoproxil (**4**), un précurseur hydrolysable. Le ténofovir est également intéressant du point de vue des résistances puisque la mutation M184V, qui est très rapidement sélectionnée sous lamivudine (3TC), confère une hyper-susceptibilité au ténofovir. En contrepartie, la seule mutation majeure associée au ténofovir à ce jour, la mutation K65R, présente un profil de résistance croisée avec l'abacavir, l'amdoxovir, la didanosine, la lamivudine et la zalcitabine.

La seconde catégorie comprend des composés qui se fixent à l'enzyme sur un site différent de celui du substrat (inhibiteurs non nucléosidiques ou INNTI). Dans cette catégorie, une trentaine de classes chimiques différentes ont été identifiées dont trois produits seulement sont actuellement commercialisés (nevirapine, delavirdine et efavirenz). Les INNTI induisent l'émergence de résistances en quelques semaines. L'apparition de mutations est ralentie par l'utilisation de doses élevées et la combinaison avec des INTI. Une seconde génération d'INNTI est actuellement en développement. Deux produits sont particulièrement avancés : le DPC083 (**5**) et le TMC125 (**6**) qui sont actifs à des concentrations nanomolaires non seulement contre la transcriptase sauvage, mais également contre un certain nombre de mutants résistants aux autres INNTI (figure 3). Plus encore, la résistance au DPC083 nécessite la combinaison de plusieurs mutations, ce qui n'est pas le cas des autres INNTI [7]. Ces deux produits ont montré une activité remarquable dans les essais de phase II et sont actuellement en essais cliniques avancés.

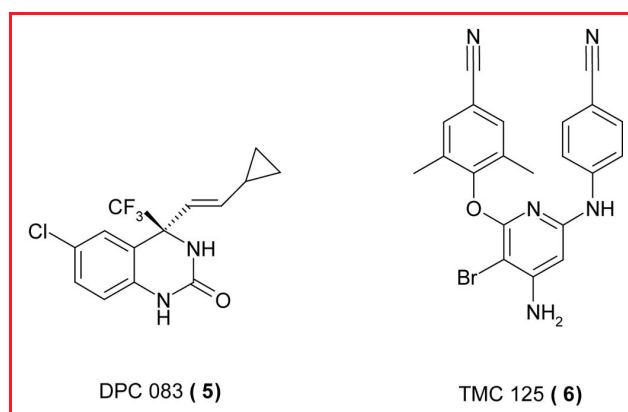


Figure 3 - Nouveaux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

DPC083 et TMC125 sont deux exemples de nouveaux dérivés qui inhibent la transcriptase inverse selon un mode non compétitif. Ils sont tous deux actifs contre des isolats viraux résistants aux mutants sélectionnés par les INNTI actuels.

Nouveaux inhibiteurs de protéase

Les protéines de structures et les enzymes du VIH sont produites à partir des gènes viraux sous forme de précurseurs polyprotéiques. La formation de nouveaux virus infectieux nécessite le clivage de ces précurseurs en entités fonctionnelles. Cette maturation, réalisée par la protéase virale, est bloquée par les inhibiteurs de celle-ci (IP). Tous les IP actuellement utilisés sont des peptido-mimétiques du substrat de la protéase qui contiennent une liaison hydroxyéthylène à la place d'une liaison peptidique et qui sont par conséquent non clivables. L'atazanavir (**7**), un peptido-mimétique approuvé par la FDA en juin 2003 (sous le nom de Reyataz) constitue le développement le plus récent de ce type de composé (figure 4). Cet inhibiteur reste efficace contre certaines mutations associées à la résistance aux autres IP. Par ailleurs, comme l'utilisation de peptido-mimétiques conduit systématiquement à l'apparition de résistances croisées, la recherche d'inhibiteurs non peptidiques est devenue un objectif majeur. De ce point de vue, un premier composé, le tripanavir (**8**), a démontré une excellente efficacité contre des isolats viraux isolés de patients résistants aux IP. D'autres inhibiteurs non

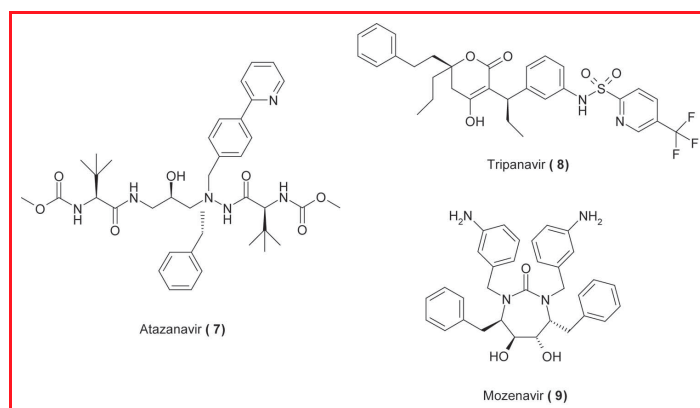


Figure 4 - Nouveaux inhibiteurs de la protéase virale.

L'atazanavir est le peptido-mimétique le plus récent capable de bloquer l'activité de la protéase virale. Le tripanavir et le mozenavir sont les deux premiers IP non peptido-mimétiques à présenter un intérêt clinique potentiel.

peptidiques aux propriétés semblables comme le mozenavir (9) ont également montré une activité intéressante en essai de phase I/II et sont en cours d'évaluation. Ces inhibiteurs non peptidiques offriraient de surcroît une meilleure biodisponibilité orale.

Inhibiteurs de l'intégrase virale

Conception des inhibiteurs

Contrairement à la transcriptase inverse et à la protéase, aucun inhibiteur d'intégrase (IN) n'est disponible dans la pharmacopée actuelle. A la différence des deux premières qui ont bénéficié de travaux antérieurs sur des enzymes homologues, l'intégrase n'a pas d'équivalent cellulaire ayant fait l'objet d'une recherche pharmacologique antérieure. Cette enzyme, strictement indispensable à la réplication du virus, s'est donc présentée au début des années 90 comme un nouveau défi. L'intégrase est l'enzyme qui catalyse l'insertion covalente du génome viral dans le génome hôte (figure 5) (voir [8] pour une bibliographie exhaustive concernant les mécanismes de l'intégration). Ce processus qui suit l'étape de transcription inverse et précède l'expression des gènes viraux comprend deux réactions distinctes qui sont toutes les deux des trans-estérifications. Dans un premier temps, l'intégrase se fixe spécifiquement sur deux séquences courtes situées aux deux extrémités de l'ADN viral et catalyse une maturation endonucléolytique des extrémités 3'-OH de l'ADN viral (ou « 3'-processing ») qui se traduit par l'élimination d'un dinucléotide à chaque extrémité. Cet ADN clivé sert ensuite de substrat pour l'intégration *sensu stricto* ou transfert de brins qui conduit à l'insertion covalente de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée. *In vivo*, les deux réactions sont spatialement et temporellement séparées puisque la maturation des extrémités a lieu dans le cytoplasme tandis que le transfert de brins est évidemment nucléaire. L'intégrase est constituée de trois domaines structuraux indépendants. Parmi ceux-ci, le domaine central ou cœur catalytique porte la triade D,D(35)E d'acides aminés, responsable de la catalyse. La protéine présente des flexibilités inter-domaines importantes, ce qui a jusqu'à présent empêché l'obtention

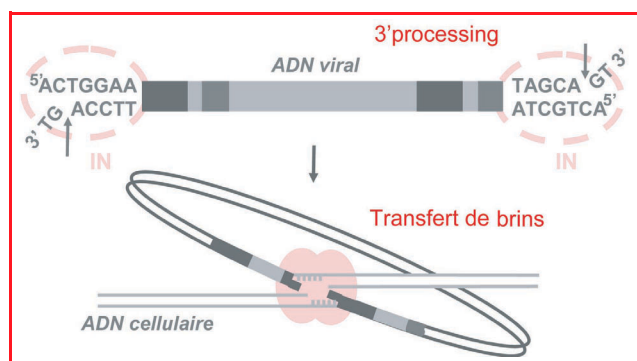


Figure 5 - Mécanisme d'action de l'intégrase virale.

Après la transcription inverse, l'intégrase virale se fixe à chaque extrémité de l'ADN du VIH linéaire. Elle libère un dinucléotide GT en catalysant une attaque nucléophile de la liaison phosphodiester en aval d'un dinucléotide 5'CA très conservé. La nucléoprotéine migre dans le noyau où l'intégrase catalyse une réaction de transfert de brins entre les extrémités 3'OH et deux liaisons phosphodiester de l'ADN cible, séparées de cinq paires de bases. La réaction d'intégration s'achève par une étape de réparation des ruptures restantes sur les deux brins complémentaires. Cette dernière étape est vraisemblablement réalisée par des enzymes cellulaires.

d'une structure cristalline complète. Cependant, la structure du cœur catalytique isolé de la protéine a été résolue. Celle-ci a révélé un repliement caractéristique de la famille des polynucléotidyl transférases à laquelle appartient également le domaine RNaseH de la transcriptase inverse. Il est intéressant de noter que la très forte homologie structurale des domaines catalytiques de l'intégrase et de la RNaseH suggère que l'on puisse utiliser cette structure comme plateforme commune de conception de produits capables de bloquer les deux enzymes. Toutefois, aucun dérivé ciblant spécifiquement l'activité RNaseH n'est actuellement développé.

Il est largement admis que l'activité des polynucléotidyl transférases requiert la présence d'un ou deux ions divalents dans le site actif de l'enzyme, ce qui a été confirmé pour l'intégrase [9]. Il a donc été proposé que des composés capables de coordonner les ions métalliques et en particulier le Mg^{2+} , co-facteur physiologique de l'intégrase, soient à même d'interférer avec la réaction catalysée par cette enzyme. Dans un premier temps, les criblages ont cependant privilégié l'activité dépendante du Mn^{2+} du fait de l'inactivité inattendue des préparations d'intégrase recombinante en présence de Mg^{2+} . Ces criblages ont mené à l'identification de nombreux inhibiteurs dont aucun n'a montré d'activité cellulaire (pour une revue complète des inhibiteurs de l'intégrase, voir [10]). Cette recherche infructueuse tenant au manque de pertinence physiologique de l'activité Mn^{2+} -dépendante de l'enzyme, plusieurs groupes dont le nôtre ont entrepris d'identifier les déterminants moléculaires de l'activité Mg^{2+} -dépendante. Avec l'équipe de photobiologie moléculaire de Jean-Claude Brochon (ENS Cachan), nous avons démontré que la propension de l'intégrase recombinante à utiliser le Mn^{2+} plutôt que le Mg^{2+} est corrélée à l'oligomérisation différentielle de la protéine en fonction du cofacteur présent (figure 6) [11-12]. Dès lors, il a été possible de tester des composés sur la base de groupements capables d'interagir avec les ions Mg^{2+} . De tels dérivés basés sur la 8-hydroxyquinoléine ont été conçus et synthétisés par le groupe de Jean d'Angelo (CEP, Châtenay-Malabry) (dérivés SQL) [13]. Ces composés se sont révélés d'excellents inhibiteurs de l'activité de 3'-processing de l'intégrase avec une activité antivirale importante. Les études de modélisation moléculaire ont mis en évidence un site de forte affinité pour ces inhibiteurs qui recouvre des résidus impliqués dans la liaison à l'ADN viral expliquant ainsi leur mode d'action. Une seconde famille de produits, basée sur un pharmacophore de type dicéto-acide (ou ADC) s'est révélée également très active (figure 7). Les effets inhibiteurs de ces deux familles sont différents puisque les ADC sont des inhibiteurs spécifiques du transfert de brins [14]. Cette différence d'activité *in vitro* se traduit par deux modes d'actions cellulaires différents du fait de la séparation des deux réactions dans la cellule infectée (voir ci-après).

Mise en évidence de la cible *ex vivo*

Une des principales difficultés de la chimiothérapie antivirale est de déterminer la cible réelle des inhibiteurs dans le contexte de la réplication du virus. L'émergence de résistances à un inhibiteur liée à la présence de mutations dans la séquence de la cible supposée est généralement considérée comme la preuve la plus robuste d'un effet spécifique. La sélection de mutants résistants nécessite de cultiver le virus en présence de quantités croissantes du

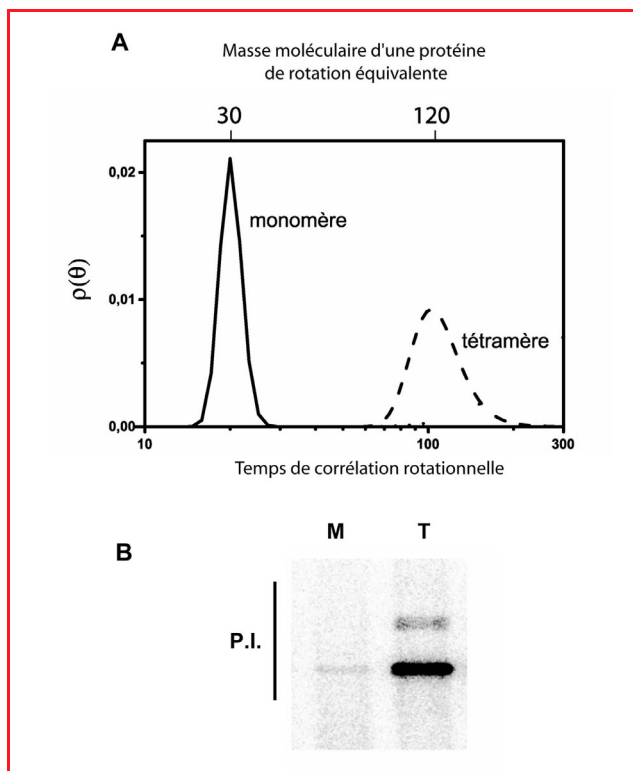


Figure 6 - Étude de la relation entre l'oligomérisation de l'intégrase du VIH-1 et son activité spécifique dépendante du Mg^{2+} .

A : comparaison par mesure de l'anisotropie de fluorescence résolue en temps (AFRT) de l'oligomérisation de deux préparations actives d'intégrase soit en présence de Mn^{2+} (trait plein), soit en présence de Mg^{2+} (trait pointillé).

B : mise en évidence de l'activité dépendante du Mg^{2+} de l'intégrase tétramérique. P.I. : produits d'intégration dans un essai utilisant l'intégrase recombinante et un substrat oligonucléotidique en présence de 10 mM Mg^{2+} . M : IN monomérique. T : IN tétramérique.

composé actif jusqu'à observer une augmentation significative de la dose de celui-ci nécessaire pour bloquer la réplication virale. Le génome du virus est alors séquencé et les mutations responsables de la résistance sont identifiées. Pour apporter la preuve de l'importance de ces mutations, celles-ci sont réintroduites dans un virus sauvage dont on teste la capacité répliquative en présence de l'inhibiteur. Dans le cas des anti-intégrases, une sélection en présence soit de dérivés ADC, soit de dérivés SQL, a fait émerger des mutations effectivement localisées dans l'intégrase, démontrant ainsi que celle-ci est bien la cible intracellulaire de ces composés. Les mutations associées aux deux familles d'inhibiteurs sont différentes. Il n'y a pas de résistance croisée, ce qui montre d'une part que les mécanismes d'action *in vivo* de ces familles sont différents, mais également que celles-ci pourraient être utilisées en combinaison pour ralentir l'apparition des mutants résistants à l'une ou l'autre. Par ailleurs, les deux séries sont actives contre les virus présentant des multi-résistances. A l'heure actuelle, les premières études cliniques de phase I/II sont en cours pour deux composés : le L-870,812 (Merck) et un second produit de type ADC, le S-1360 (Glaxo/Shionogi) (figure 7).

Les inhibiteurs de l'entrée du virus

Avec l'identification de composés anti-intégrase et dans l'attente d'éventuels composés anti-RNaseH, toutes les cibles enzymatiques virales font maintenant l'objet de

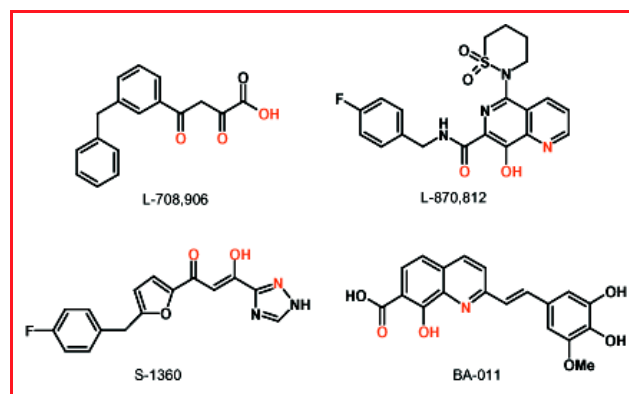


Figure 7 - Inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1.

Les composés actifs contre l'intégrase et présentant une activité antivirale importante appartiennent soit à la famille des dicétoacides (L-708,906, S-1360), soit à celle des styrylquinolines (BA-011). Les résidus en rouge constituent les pharmacophores putatifs responsables de l'activité anti-intégrase. Les premiers inhibent le transfert de brins tandis que les seconds bloquent le 3'processing. Le composé L-870,810 est une optimisation du composé L-708,906 qui présente un pharmacophore se rapprochant de celui des styrylquinolines.

développements cliniques. Les nouvelles pistes sont donc à présent à rechercher dans l'inhibition de processus non catalytiques résultant par exemple d'interactions entre macromolécules. De ce point de vue, l'entrée du virus dans la cellule est particulièrement riche de possibilités. Il s'agit en effet d'un processus en trois étapes, successivement l'interaction avec le récepteur, avec le co-récepteur et la fusion proprement dite, chacune d'entre elles mettant en jeu des interactions extrêmement spécifiques entre protéines virales et/ou cellulaires [15].

Inhibiteurs de l'interaction CD4/gp120

La première étape de l'entrée du virus est la fixation de la particule virale sur une cellule du fait d'une liaison spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe, la gp120, et le récepteur CD4 présent dans la membrane cellulaire de certaines cellules de l'immunité (lymphocytes T4 et macrophages). Il a été proposé de longue date d'utiliser le récepteur CD4 sous forme soluble pour bloquer les particules virales. Cette approche rencontre depuis peu un certain succès avec la conception d'un anticorps recombinant développé sous l'appellation PRO 542 (« progenics pharmaceutical ») qui a démontré une bonne activité antivirale en phase I/II. Les études se poursuivent actuellement.

Inhibiteurs de l'interaction gp120/co-récepteur

La seconde étape implique la fixation de la gp120 sur un co-récepteur qui peut être soit le récepteur CCR5 (virus dit à tropisme R5), soit le récepteur CXCR4 (virus dit à tropisme X4), selon le type cellulaire infecté. Le potentiel thérapeutique des ligands de CCR5, susceptible de bloquer l'interaction gp120/CCR5, s'est imposé lorsque l'on a découvert que des individus porteurs d'un récepteur inactif étaient résistants à l'infection par le VIH [16]. Les effets à long terme de l'utilisation de ligands des co-récepteurs sont toutefois mal évalués. CCR5 ne devrait pas poser de problème étant donné que l'inactivation de celui-ci ne paraît pas affecter la santé des individus porteurs de cette délétion. Concernant le CXCR4, celui-ci est exprimé sur un plus large rang de cellules et la délétion du récepteur homologue chez

la souris est létale. Les éventuels effets secondaires de ligands de ce récepteur sont donc potentiellement plus importants. Dans ce contexte, deux antagonistes du CCR5, SCH-C et SCH-D (Schering-Plough), actifs contre la majeure partie des isolats viraux, sont actuellement en essais cliniques. Leur activité antivirale *in vitro* est de l'ordre du nanomolaire et ils agissent de façon synergique avec les inhibiteurs de transcriptase inverse et de protéase. Il faut souligner que le développement de résistances contre le SCH-C n'est pas accompagné d'un changement de tropisme du co-récepteur CCR5 vers CXCR4. Un tel changement aurait été potentiellement néfaste car les isolats viraux X4 sont prédominants dans les stades tardifs de la maladie et paraissent plus agressifs que les virus R5. Il existe également un antagoniste puissant du CXCR4, l'AMD070 (Anormed) qui empêche la fixation du ligand naturel du co-récepteur et dont l'activité antivirale est de l'ordre du nanomolaire *in vitro*. L'AMD070 n'a pas d'effet contre les isolats R5. Son action semble également additive ou synergique en combinaison avec les inhibiteurs de fusion, de la reverse transcriptase et de la protéase.

Inhibiteurs de fusion

Finalement, l'interaction de la gp120 avec le co-récepteur découvre la seconde protéine d'enveloppe du virus, la gp41, dont le dépliement permet à son extrémité N-terminale (dit peptide de fusion) de s'ancrer dans la membrane cellulaire (figure 8). En amont de ce peptide de fusion se trouvent deux domaines protéiques (dits HR1 et HR2) dont l'interaction spécifique permet à la gp41 étendue de se replier sur elle-même, favorisant de ce fait le rapprochement de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Au cours de cette fusion, la gp41 étendue est temporairement vulnérable à un agent capable de se lier à l'un des deux domaines bloquant ainsi son repliement [17-18]. Un premier succès a été obtenu avec le T-20 (ou enfurvirtide) (Triméris, Roche), un peptide de 36 acides aminés qui bloque la fusion de l'enveloppe virale

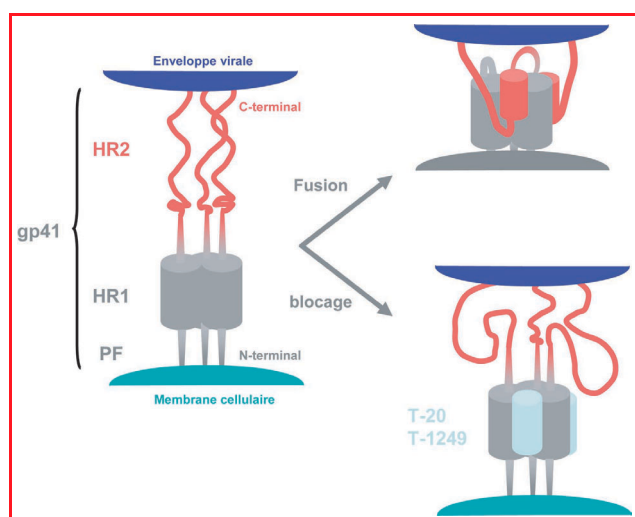


Figure 8 - Mécanisme de fusion de l'enveloppe virale.

L'interaction de la protéine d'enveloppe virale gp120 avec le récepteur CD4 et l'un des co-récepteurs permet la libération de la gp41 dont l'extrémité N-terminale (PF : peptide de fusion) vient s'ancrer dans la membrane cellulaire, formant un intermédiaire étendu dans lequel le domaine HR1 est structuré en trimère d'hélices. L'interaction des hélices correspondant au domaine HR2 avec HR1 induit le repliement de la gp41 et le rapprochement de l'enveloppe avec la membrane cellulaire. Les peptides T-20 et T-1249 dérivés du domaine HR2 bloquent ce repliement et empêchent la fusion.

in vitro et *in vivo*. Les premiers résultats des essais de phase III qui démontrent un bénéfice virologique certain de l'utilisation du T-20 ont été rendus publics récemment [19]. Il est cependant à nouveau clair que des résistances dues cette fois à des mutations dans la gp41 apparaissent rapidement. Un peptide de deuxième génération, le T-1249, qui conserve une activité antivirale contre des souches virales résistantes au T-20 est en cours d'évaluation. Le succès de cette stratégie tient essentiellement au fait que la cible est de nature extracellulaire et donc facilement accessible à un agent pharmacologique. La nature peptidique du médicament vient tout de même tempérer cette réussite. Sa synthèse nécessite plusieurs dizaines d'étapes, entraînant un coût actuel de traitement par l'enfurvirtide (Fuzeon®) de l'ordre de 20 000 \$/an. Par ailleurs, il s'agit d'un traitement par injection sous-cutanée, donc particulièrement contraignant.

Pour finir, notons tout de même que malgré l'apparition constante de nouveaux produits, un grand nombre de progrès récents concernent les traitements déjà disponibles. Il s'agit de l'amélioration des dosages et de l'optimisation de la fréquence des prises, ainsi que la mise au point de formulations multiples permettant la prise simultanée de plusieurs produits. Concernant ces associations, il a été découvert que le ritonavir est un ligand très fort des cytochromes P450 3A4 qui sont des enzymes de détoxication hépatique, responsables de l'élimination de certains produits. L'usage du ritonavir en association avec d'autres IP (notamment l'indinavir) permet d'augmenter la concentration plasmatique de ces produits et par conséquent de diminuer la fréquence de leurs prises.

Conclusion

Malgré une diminution notable, dans les pays occidentaux, de la morbidité et la mortalité dues au VIH du fait des thérapies anti-rétrovirales, l'émergence de virus résistants, les effets secondaires des traitements et surtout l'impact dramatique de la pandémie de sida dans le monde, nécessitent de maintenir un effort de recherche constant. Un nombre croissant de produits capables d'inhiber de nouvelles étapes de la réplication du VIH-1 ont été découverts récemment. L'arsenal des produits de première génération bloquant l'activité des enzymes virales sera vraisemblablement complété dans un futur proche par les inhibiteurs d'intégrase. Ceux-ci sont développés depuis peu sur la base de la compréhension des mécanismes moléculaires des réactions catalysées par cette enzyme. Mais surtout, un progrès important a été obtenu avec les inhibiteurs d'entrée, un processus mettant en jeu des interactions complexes entre protéines. Ces deux exemples témoignent d'une évolution remarquable de la place de la chimie au sein des programmes de pharmacologie anti-VIH. Cette discipline, cantonnée dans les années 1980-90 à un rôle d'optimisation des composés issus des criblages, reprend actuellement toute sa dimension à travers les programmes d'interfaces, au sein desquels virologistes structuraux et chimistes collaborent pour établir et exploiter les modèles d'interactions complexes qui constituent les nouvelles cibles de la pharmacologie. La conception de composés capables de remplacer avantageusement les inhibiteurs peptidiques, coûteux et compliqués d'utilisation, est à elle seule un défi majeur dont l'enjeu est l'obtention d'analogues innovants, accessibles à tous, sans considération d'origine géographique.

Remerciements

Nous remercions l'Agence Nationale de la Recherche contre le Sida (ANRS), Ensemble contre le Sida (ECS) et BioalliancePharma pour leur soutien aux travaux mentionnés dans cet article.

Références

- [1] Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A., Hahn B.H., Wolinsky S., Bhattacharya T., Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains, *Science*, **2000**, *288*, p. 1789.
- [2] Gao F., Bailes E., Robertson D.L., Chen Y., Rodenburg C.M., Michael S.F., Cummins L.B., Arthur L.O., Peeters M., Shaw G.M., Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes, *Nature*, **1999**, *397*, p. 436.
- [3] Bailes E., Gao F., Bibollet-Ruche F., Courgnaud V., Peeters M., Marx P.A., Hahn B.H., Sharp P.M., Hybrid origin of HIV in chimpanzees, *Science*, **2003**, *300*, p. 1713.
- [4] Delfraissy J.F., New French guidelines for antiretroviral treatment, *HIV Med.*, **2000**, *1*, p. 133.
- [5] Palella F.J.J., Delaney K.M., Moorman A.C., Loveless M.O., Fuhrer J., Satten G.A., Aschman D.J., Holmberg S.D., Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators [see comments], *N. Engl. J. Med.*, **1998**, *338*, p. 853.
- [6] Shirasaka T., Kavlick M.F., Ueno T., Gao W.Y., Kojima E., Alcaide M.L., Chokekijchai S., Roy B.M., Arnold E., Yarchoan R., Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, *92*, p. 2398.
- [7] Corbett J.W., Ko S.S., Rodgers J.D., Jeffrey S., Bachelier L.T., Klabe R.M., Diamond S., Lai C.M., Rabel S.R., Saye J.A., Expanded-spectrum nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors inhibit clinically relevant mutant variants of human immunodeficiency virus type 1, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*, p. 2893.
- [8] Brown P.O., Integration, *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, H.E. Varmus (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1997**, p. 161-203.
- [9] Beese L.S., Steitz T.A., Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism, *Embo. J.*, **1991**, *10*, p. 25.
- [10] Pommier Y., Marchand C., Neamati N., Retroviral integrase inhibitors year 2000: update and perspectives, *Antiviral Res.*, **2000**, *47*, p. 139.
- [11] Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.-C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.-F., **2000**, Determinants of Mg²⁺-dependent activities of recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase, *Biochemistry*, **2000**, *39*, p. 9285.
- [12] Deprez E., Tauc P., Leh H., Mouscadet J.-F., Auclair C., Brochon J.-C., Oligomeric states of the HIV-1 integrase as measured by time-resolved fluorescence anisotropy, *Biochemistry*, **2000**, *39*, p. 9275.
- [13] Zouhiri F., Mouscadet J.-F., Mekouar K., Desmaele D., Savoure D., Leh H., Subra F., Le Bret M., Auclair C., d'Angelo J., Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of HIV-1 integrase and replication of HIV-1 in cell culture, **2000**, *J. Med. Chem.*, *43*, p. 1533.
- [14] Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells (in process citation), *Science*, **2000**, *287*, p. 646.
- [15] Chan D.C., Kim P.S., HIV entry and its inhibition, *Cell*, **1998**, *93*, p. 681.
- [16] Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene, *Nature*, **1996**, *382*, p. 722.
- [17] Eckert D.M., Kim P.S., Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, *98*, p. 11187.
- [18] Eckert D.M., Kim P.S., Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition, *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, *70*, p. 777.
- [19] Lazzarin A., Clotet B., Cooper D., Reynes J., Arasteh K., Nelson M., Katlama C., Stellbrink H.J., Delfraissy J.F., Lange J., Huson L., DeMasi R., Wat C., Delehanty J., Drobnes C., Salgo M., Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, *348*, p. 2186.



J.-F. Mouscadet



E. Deprez

Jean-François Mouscadet¹

est directeur de recherche CNRS à l'ENS de Cachan. Il dirige l'équipe de Biologie et pharmacologie des intégrases rétrovirales de l'UMR 8113*.

Éric Deprez²

est chargé de recherche CNRS dans l'UMR 8113 à l'ENS Cachan au sein de l'équipe de Photobiologie moléculaire*.

* LBPA, UMR 8113 CNRS, IFR 121, École Nationale Supérieure de Cachan, 61 avenue du Président Wilson, 94235 Cachan Cedex.

¹ Tél. : 01 47 40 76 75. Fax : 01 47 40 76 71.

Courriel : mouscadet@lbpa.ens-cachan.fr

² Courriel : deprez@lbpa.ens-cachan.fr



Nanotechnologies et nouveaux médicaments

Karine Andrieux, Didier Desmaële, Jean D'Angélo et Patrick Couvreur

Abstract

Nanotechnologies and new drugs

Nanotechnologies in drug targeting have a great development during last years and concern works at the interface of chemistry, physics and biology. This article shows how dispersed and sub-microscopic systems are able to pilot drugs into the organism after intravascular administration. Colloidal vectors like liposomes and nanoparticles have been created to control the drug tissular distribution and have contributed to improve the therapeutic index of numerous drugs in domains of cancer and infectious or autoimmune illness. The development of « intelligent » vectors able to modulate the intracellular distribution of a drug is also presented.

Mots-clés

Vectorisation de médicaments, liposome, nanoparticule, copolymère, distribution tissulaire et intracellulaire.

Key-words

Drug targeting, liposome, nanoparticle, copolymer, tissular and intracellular distribution.

L'adressage (ou délivrance spécifique) de molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique. Dès le début du XX^e siècle, le savant Paul Ehrlich rêvait déjà de « magic bullet » susceptible d'acheminer un médicament de manière spécifique vers son site d'action. Son rêve est aujourd'hui plus proche de la réalité grâce au développement des nanotechnologies qui ont permis de proposer le concept de vectorisation des médicaments.

En effet, de nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physico-chimiques (hydrophilie, poids moléculaires, etc.) peu favorables au passage des barrières biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. D'autres molécules actives se heurtent aussi à des barrières enzymatiques entraînant leur dégradation et métabolisation rapides. D'une manière générale, il faut noter que les barrières à traverser sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs éléments (épithélium, endothélium, membrane cellulaire) et plusieurs composantes (barrières mécaniques et physico-chimiques et barrières enzymatiques). L'obtention de concentrations efficaces en thérapeutique au niveau du site d'action ne peut donc se faire qu'au détriment d'une importante déperdition de médicament vers d'autres tissus ou cellules, ce qui occasionne des effets toxiques importants et parfois rédhibitoires, c'est-à-dire entraînant l'abandon du traitement par ce médicament en dépit de son efficacité.

D'autre part, le développement des biotechnologies a donné accès en grandes quantités à des protéines recombinantes et à des gènes clonés. Parallèlement, les progrès de la chimie organique sur support fournissent des oligopeptides et des oligonucléotides. Ces molécules sont, sans doute, à la base des médicaments de demain : très sélectifs au niveau moléculaire, ils conduisent à des métabolites endogènes, c'est-à-dire non toxiques. Cependant, les caractéristiques physico-chimiques et biomimétiques de ces molécules aboutissent à les rendre très difficiles à administrer. En effet, elles sont toujours mal absorbées (au

niveau cellulaire et tissulaire), souvent très rapidement dégradées et métabolisées, et donc incapables d'atteindre leur cible au niveau tissulaire ou cellulaire. C'est l'une des principales limites au développement de ces molécules comme médicaments.

C'est pour toutes ces raisons que le développement de vecteurs de médicaments a pris un essor considérable au cours des dernières années. S'appuyant sur de nouveaux concepts physico-chimiques et sur le développement de

Glossaire

Carcinome

Cancer développé à partir d'une lignée cellulaire épithéliale, c'est-à-dire aux dépens de la peau et des muqueuses (intestin, estomac, poumons, appareil génital, appareil urinaire...).

Endocytose

Mécanisme de transport permettant à de grosses molécules ou à de petites particules de pénétrer dans la cellule grâce à la formation d'une vésicule par invagination de la membrane cytoplasmique ; trois types d'endocytose sont distingués : la phagocytose, la pinocytose et l'endocytose médiée par un récepteur.

Macrophages

Leucocytes (globules blancs) présents dans tous les tissus du corps ayant des fonctions importantes dans l'homéostasie des tissus et la réponse immunitaire ; cellules spécialisées qui éliminent des particules comme des bactéries, des substances étrangères et des cellules mortes par un processus de phagocytose utilisant des opsonines ou d'autres molécules de reconnaissance.

Opsonines

Protéines plasmatiques (immunoglobulines, complément...) reconnues par les récepteurs transmembranaires des cellules phagocytaires comme les macrophages.

Poloxamers et poloxamines

Copolymères constitués de polyéthylène glycol (PEG) et de polypropylène glycol (PPG).

La formule d'un poloxamer est de type : $(\text{PEG})_x-(\text{PPG})_y-(\text{PEG})_x$, alors que la poloxamine a une formule type : $[(\text{PEG})_x-(\text{PPG})_y]_2-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-[(\text{PPG})_y-(\text{PEG})_x]_2$.

nouveaux matériaux (synthèse de nouveaux polymères par exemple), la recherche galénique a permis d'imaginer des systèmes submicroniques d'administration capables : (i) de protéger la molécule active de la dégradation et (ii) d'en contrôler la libération dans le temps et dans l'espace. Cet article fait le point des recherches dans ce domaine en montrant l'immense potentiel de ces nouveaux systèmes d'administration et leur rôle dans la découverte de nouveaux médicaments. Cette revue traitera principalement de la voie intravasculaire.

Les vecteurs à tropisme hépato-splénique

Destinés à être administrés par voie intravasculaire, les vecteurs de médicaments relèvent des nanotechnologies. Celles-ci mettent généralement en œuvre des procédés de type « top-down » (réduction de taille en partant d'un objet de taille supérieure ou miniaturisation) ou « bottom-up » (assemblage d'objets infiniment petits, atomes ou molécules). Les vecteurs de médicaments relèvent souvent de la deuxième approche en mettant à profit les concepts fondamentaux de la physico-chimie pour construire des édifices supramoléculaires (organisés ou non). Pratiquement, la taille des vecteurs destinés à être administrés dans le torrent circulatoire doit être largement inférieure au micron afin de permettre leur circulation dans les capillaires sanguins les plus fins et d'éviter leur obturation.

Les liposomes (*figure 1A*) sont des systèmes colloïdaux vésiculaires, biocompatibles et biodégradables, composés d'une bicouche (liposomes unilamellaires) ou de plusieurs bicouches (liposomes multilamellaires) de phospholipides organisés en phase lamellaire, et délimitant un ou plusieurs compartiments aqueux. Des principes actifs hydrophiles peuvent être encapsulés dans la phase aqueuse tandis que les molécules lipophiles se localisent dans la (les) bicouche(s). Les nanoparticules (*figure 1B-C*) sont des systèmes colloïdaux dont la structure est généralement constituée de polymères, de préférence biodégradables. Les nanoparticules peuvent être de type matriciel (nanosphères, *figure 1B*) ; dans ce cas, le principe actif peut être dispersé ou dissous dans la matrice polymère et être libéré par simple diffusion de la matrice vers l'extérieur ou à la suite de la biodégradation du polymère dans l'organisme. Les nanoparticules peuvent aussi être de type réservoir (nanocapsules, *figure 1C*) ; dans ce cas, elles sont

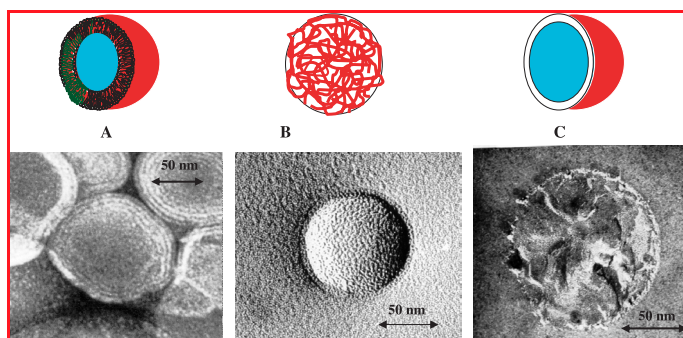


Figure 1 - Les liposomes (A) sont des vésicules formées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Les nanosphères (B) sont des particules formées d'une matrice de polymères et les nanocapsules (C) sont constituées d'un cœur aqueux ou huileux entouré d'une fine membrane polymère.

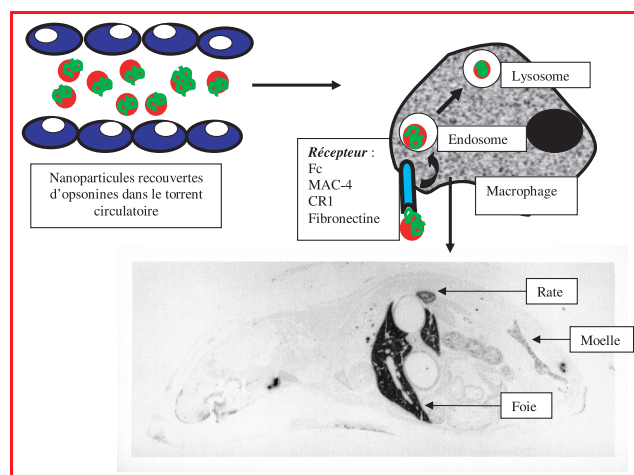


Figure 2 - Après administration intraveineuse, les nanoparticules sont recouvertes d'opsonines plasmatiques et reconnues par les macrophages dans lesquels elles sont endocytées et dégradées par les enzymes lysosomiales. Elles se concentrent dans les tissus du système des phagocytes mononucléés (SPM) : foie, rate, moelle, indiqués par les flèches sur une autoradiographie (radiographie réalisée avec un marqueur radioactif) de rat.

constituées d'un noyau central généralement liquide entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres.

Lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse, les nanoparticules comme les liposomes interagissent fortement avec les protéines plasmatiques (*figure 2*) en raison de la très grande surface spécifique qu'ils développent (plusieurs dizaines de m^2/g). Celle-ci favorise la création d'interactions hydrophobes fortes entre la surface du vecteur et certaines protéines plasmatiques appelées opsonines (immunoglobulines de type G (IgG), éléments du complément, fibronectine, etc.) qui sont reconnues par des récepteurs spécifiques localisés au niveau des macrophages du système des phagocytes mononucléés (SPM) (foie, rate, moelle) (*figure 2*). Les vecteurs colloïdaux décorés d'opsonines et circulant dans le sang sont donc captés principalement par les cellules de Kupffer (macrophages du foie) et les macrophages de la zone marginale de la rate dont les récepteurs reconnaissent spécifiquement les opsonines [1]. Après avoir interagi avec le récepteur macrophagique, les vecteurs sont internalisés par la voie de l'endocytose et ils finiront dans des lysosomes où ils pourront éventuellement être dégradés par les enzymes lysosomiales [2]. Cette distribution hépato-splénique (*figure 2*) est également favorisée par la structure histologique de l'endothélium vasculaire qui, au niveau de ces tissus, a un caractère discontinu autorisant le passage des colloïdes (liposomes et nanoparticules). La distribution tissulaire (hépatosplénique) et intracellulaire (lysosomotropisme) de ces vecteurs de première génération a été mise à profit pour vectoriser des molécules d'intérêt thérapeutique au niveau de ces sites biologiques et traiter ainsi différentes pathologies, notamment le cancer, auquel de nombreux travaux sont consacrés. Ainsi par exemple, la distribution hépatique des vecteurs de première génération a été exploitée pour traiter les métastases hépatiques. Dans ce cas, il s'agit d'un ciblage indirect puisque le médicament anticancéreux est livré aux cellules de Kupffer du foie qui jouent ainsi le rôle de réservoir de médicament. Le principe actif peut alors diffuser dans

l'ensemble du tissu et notamment vers les cellules cancéreuses [3]. La distribution hépato-splénique des vecteurs de première génération permet aussi, dans certains cas, de réduire la toxicité de médicaments en les détournant des tissus où ils exercent leur toxicité. Ainsi, la toxicité cardiaque de la doxorubicine a pu être réduite après son encapsulation dans des liposomes ou des nanoparticules [4]. De la même manière, la toxicité rénale de l'amphotéricine B est fortement diminuée après son administration à des patients sous la forme de liposomes [5]. Des spécialités issues de ces concepts ont été mises récemment sur le marché comme l'Ambisome® (liposomes d'amphotéricine B) ou la Daunoxome® (liposomes de daunorubicine).

Le traitement des infections intracellulaires a également fait l'objet de travaux particulièrement prometteurs. En effet, lorsqu'elles se trouvent dans le compartiment sanguin, les bactéries sont également opsonisées et captées par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse. Dans certaines situations (immunodépression, maladies opportunistes, etc.), les lysosomes de ces macrophages constituent des sanctuaires pour la multiplication des bactéries intracellulaires. Beaucoup d'antibiotiques sont peu actifs sur ces germes à localisation intracellulaire car ils diffusent mal à l'intérieur de la cellule ou ils n'atteignent pas les compartiments intracellulaires infectés (endosomes/lysosomes). La localisation tissulaire (foie, rate), cellulaire (macrophages) et subcellulaire (endosomes/lysosomes) des vecteurs de première génération en font donc une navette de tout premier choix pour le transport efficace d'antibiotiques au niveau des cellules infectées [6] (figure 3). Des résultats spectaculaires ont d'ailleurs été obtenus sur des modèles d'infection expérimentale tant avec les liposomes qu'avec les nanoparticules. Ainsi, dans un modèle d'infection expérimentale à *Salmonella typhimurium*, il a été montré qu'un antibiotique vectorisé par des nanoparticules biodégradables de polyalkylcyanoacrylate était 100 fois plus efficace que lorsqu'il était administré sous une forme pharmaceutique conventionnelle [7].

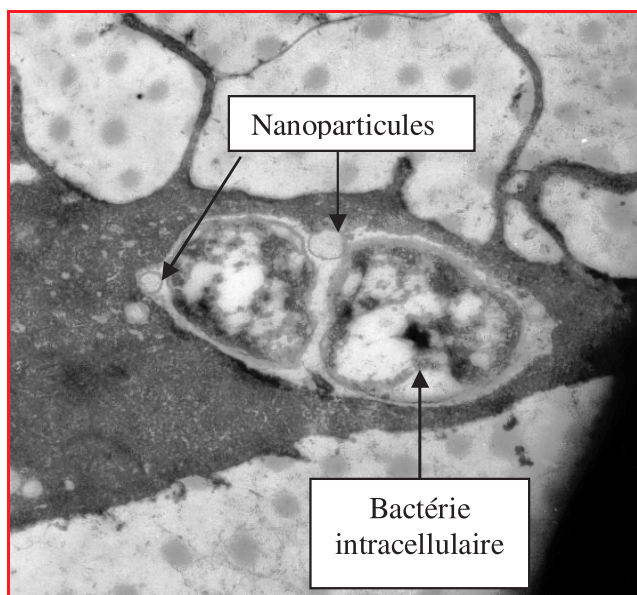


Figure 3 - Ciblage d'une bactérie intracellulaire localisée dans un endosome macrophagique par des nanoparticules de première génération (d'après [6]) (photo : H. Alphanbary).

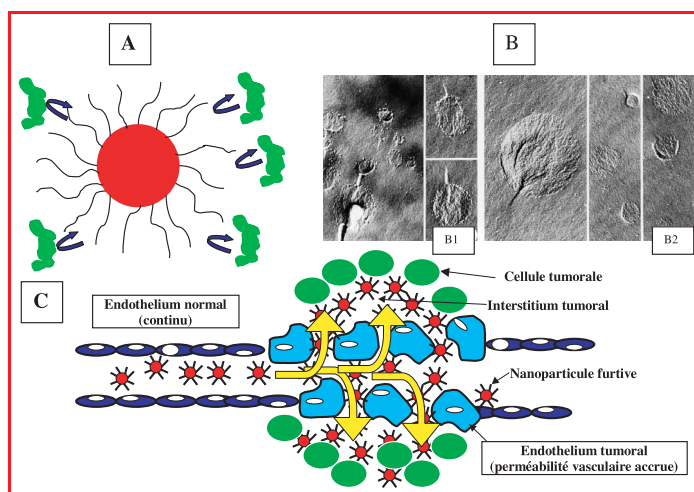


Figure 4 - Représentation schématique du concept de répulsion stérique qui évite l'opsonisation et la reconnaissance par les macrophages (vecteurs de 2^e génération) (A).

Lorsque les nanoparticules ne sont pas décorées de PEG, on peut observer en microscopie électronique qu'elles sont recouvertes par les protéines du sérum (B1, la surface des particules est granuleuse). Au contraire, lorsqu'elles sont recouvertes de PEG, elles exercent un effet de répulsion vis-à-vis des protéines plasmatiques (B2, la surface des particules est lisse) (d'après [12]). Ces particules sont alors capables de diffuser sélectivement à travers l'endothélium vasculaire tumoral dont la perméabilité est accrue, et d'atteindre ainsi le tissu tumoral (C).

Les vecteurs de 2^e génération ou le concept de résidence vasculaire prolongée

Comme il a été expliqué plus haut, l'accumulation principalement hépatique des vecteurs de première génération peut constituer un avantage pour améliorer le traitement de certaines affections localisées au niveau de ce tissu (cas des métastases hépatiques ou des infections intracellulaires). Toutefois, dans de nombreux cas, cette distribution particulière peut constituer un inconvénient. Il est tout à fait remarquable que ce verrou technologique ait pu être contourné grâce à l'application du concept physico-chimique de la « répulsion stérique » développé par l'équipe de de Gennes dès le début des années 1990 [8]. Le recouvrement des vecteurs par des polymères hydrophiles et flexibles, comme les polyéthylène glycols (PEG), les polysaccharides, les poloxamers et les poloxamines, empêche les protéines, en particulier les opsonines, de s'adsorber à leur surface.

De très nombreux travaux [9] ont alors été entrepris afin d'insérer dans la bicouche des liposomes, des phospholipides (comme la phosphatidyléthanolamine) couplés au PEG. Après administration intraveineuse, ces liposomes « peggylés » se caractérisent par un temps de demi-vie plasmatique prolongé et une capture hépatique réduite. Le caractère « furtif » (absence de reconnaissance par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse) est d'autant plus prononcé que les liposomes sont de faible taille (c'est-à-dire avec un rayon de courbure important). Il a été montré que la durée de la résidence vasculaire dépendait à la fois de la longueur des chaînes de PEG (un poids moléculaire de 2 000 semble être une valeur limite en deçà de laquelle l'effet de répulsion stérique ne joue plus) et de leur densité à la surface des liposomes [10]. Des approches similaires ont été effectuées avec les nanoparticules en y greffant, comme dans le cas des liposomes, des chaînes de PEG [11-12] (figure 4A). Les

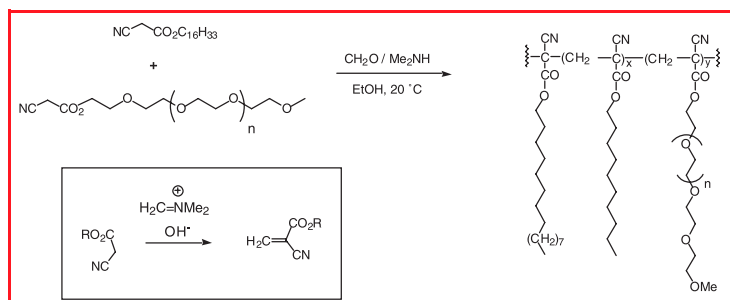


Figure 5 - Schéma général de la synthèse d'un copolymère poly(méthoxy polyéthylène-glycol-co-hexadécyl)cyanoacrylate (poly(MePEGCA-co-HDCA) cyanoacrylate) par réaction de Mannich des cyanoacétates correspondants. Le MePEG utilisé a un poids moléculaire de 2 000 et le copolymère présente un rapport MePEGCA/HDCA de 1/4.

particules ainsi « peggyées » ne sont plus reconnues par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse (figure 4B) et elles résident plus longtemps dans la circulation générale.

Ces vecteurs « furtifs », à rémanence vasculaire prolongée, ont une probabilité importante de traverser des endothéliums vasculaires de perméabilité accrue comme ceux localisés au niveau des tumeurs ou des foyers infectieux (figure 4C). Cet effet de perméabilité et de rétention tissulaire permet donc le ciblage de tumeurs localisées hors du territoire hépato-splénique [13]. L'adressage tumoral de liposomes recouverts de PEG a d'ailleurs été démontré sur des modèles de tumeurs expérimentales grâce à l'utilisation de sondes de fluorescence [14].

Ces vecteurs « furtifs » de 2^e génération ont montré une efficacité remarquable dans le traitement de tumeurs expérimentales [15], ce qui a d'ailleurs abouti récemment à la mise sur le marché du Doxil[®] (liposomes « peggylés » chargés en doxorubicine).

Un autre domaine d'application thérapeutique a été abordé récemment avec des nanoparticules préparées à l'aide d'un copolymère « peggylé » (polyéthylène-glycol-co-hexadécyl cyanoacrylate) (figure 5). Ces nanosystèmes sont capables de pénétrer dans le tissu cérébral d'animaux de laboratoire atteints d'une encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) [16] ou présentant une tumeur cérébrale (gliome 9L) [17], maladies qui s'accompagnent d'une perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (figure 6). De plus, un passage significatif de ces nanoparticules « peggylés » a été mis en évidence au travers de la BHE d'animaux sains (rats ou souris) qui est une barrière infranchissable pour la plupart des molécules thérapeutiques et pour les vecteurs de première génération [17-18]. Cette possibilité de transporter des molécules thérapeutiques jusqu'au cerveau ouvre des perspectives prometteuses à ces vecteurs « peggylés » et nécessite une élucidation de leurs mécanismes de passage à travers la barrière hémato-encéphalique.

Les vecteurs de 3^e génération ou l'utilisation de ligands à reconnaissance moléculaire

Lorsque les vecteurs de 2^e génération sont décorés de ligands (anticorps, peptides, sucres, acide folique), ils sont alors capables de reconnaître de manière sélective des antigènes ou des récepteurs qui sont hyper-exprimés à la surface des cellules cibles (cellules cancéreuses,

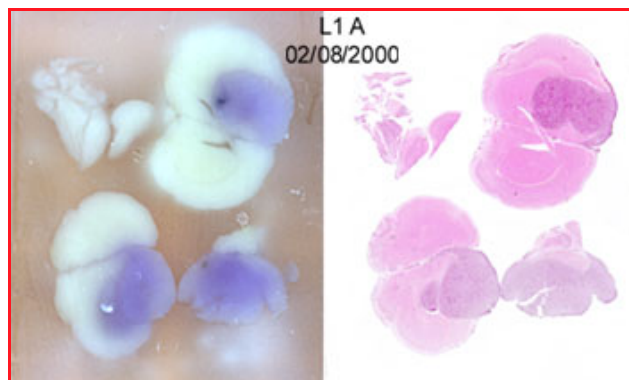


Figure 6 - Perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique de rat Fischer, 9 jours après l'implantation intracérébrale d'une tumeur 9L.

30 min après l'injection intraveineuse d'un colorant, le bleu Evans, la tumeur apparaît comme une masse cohésive bleue, démontrant une rupture de la BHE (image de gauche). A noter que cette rupture est localisée au niveau de la tumeur, comme le démontre la coloration du même cerveau au réactif HES (haematoxiline-éosine-safran) (image de droite).

cellules infectées, etc.). La conception de ces vecteurs de 3^e génération nécessite la construction d'édifices supramoléculaires composés : (i) d'une particule type liposome ou nanoparticule, (ii) d'une couche de polymères hydrophiles et flexibles (par exemple, le PEG) pour éviter la reconnaissance hépato-splénique, et (iii) d'un ligand de reconnaissance membranaire à l'extrémité de certaines chaînes de PEG (figure 7).

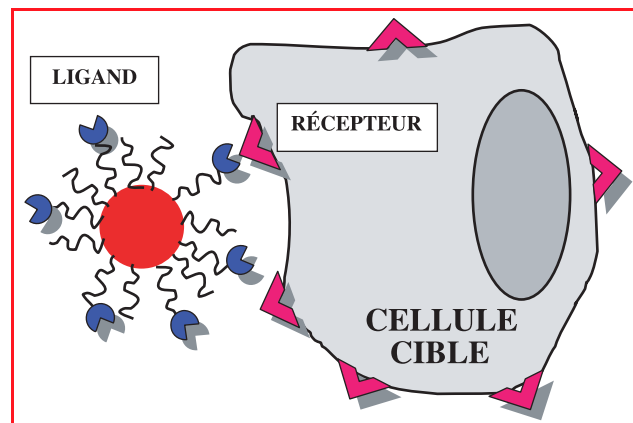


Figure 7 - Représentation schématique de l'adressage moléculaire d'un vecteur à une cellule cible grâce à un ligand de reconnaissance (vecteurs de 3^e génération).

Toutefois, le couplage chimique d'un ligand à la surface d'un vecteur particulière est une opération délicate qui peut parfois altérer les capacités de reconnaissance moléculaire du ligand avec le récepteur en raison de l'encombrement stérique dû à la particule. Dans d'autres cas, certains groupements chimiques indispensables à l'adressage du ligand peuvent être masqués ou impliqués dans la fixation au vecteur. Un autre point important concerne le choix judicieux de la cible biologique (récepteur ou antigène). Celle-ci doit :

- être présente à la surface des cellules pour permettre leur reconnaissance,
- être internalisée dès qu'elle a été reconnue par son ligand afin de permettre la libération du principe actif associé au vecteur à l'intérieur de la cellule (et non à l'extérieur).

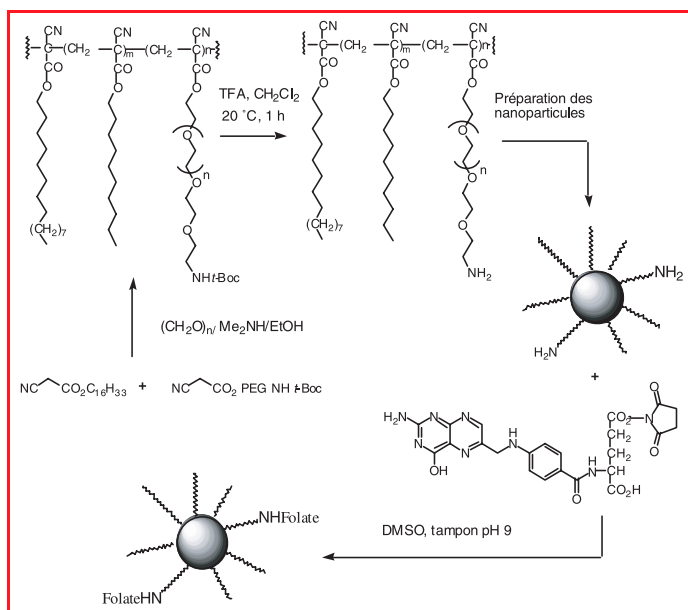


Figure 8 - Schéma général de préparation des nanoparticules recouvertes de PEG et d'acide folique.

Le cyanoacétate-PEG-NHt-Boc utilisé a un poids moléculaire de 3 400 et le copolymère a un rapport PEG/HDCA de 1/4.

L'internalisation cellulaire se fait généralement par la voie de l'endocytose, le vecteur étant alors localisé au niveau des lysosomes ou du cytoplasme cellulaire en fonction du trafic intracellulaire suivi par le ligand.

Concrètement, cette stratégie a abouti, par exemple, à coupler à la surface de liposomes « peggylés » un anticorps monoclonal (anticorps 34A) reconnaissant des glycoprotéines de surface exprimées au niveau luminal de l'endothélium vasculaire pulmonaire. Lorsque ces liposomes sont chargés d'amphotéricine B, ils sont très actifs dans les aspergilloses pulmonaires expérimentales [19]. Une autre construction a consisté à conjuguer le fragment Fab' d'un anticorps orienté contre le proto-oncogène HER2 à l'extrémité des chaînes PEG de liposomes. Ces liposomes chargés en doxorubicine ont fait la preuve de leur remarquable efficacité dans des cancers expérimentaux consistant en des greffes, chez la souris, de cellules du sein humaines hyper-exprimant l'antigène HER2 [20].

Comme le récepteur de l'acide folique est surexprimé de manière très sélective à la surface de certaines cellules cancéreuses (carcinomes ovariens), l'acide folique a aussi été utilisé comme ligand de reconnaissance et couplé à la surface de nanoparticules *via* des chaînes de PEG (figure 8). Il a été montré que ce vecteur était capable de reconnaître son récepteur *in vitro* avec une très grande affinité [21]. Cette nouvelle stratégie présente un double avantage : l'acide folique est une petite molécule (contrairement aux anticorps) qui n'induit pas d'encombrement excessif à la surface du vecteur et ne masque pas l'effet de répulsion des opsonines par les chaînes de PEG. D'autre part, le complexe acide folique/récepteur de l'acide folique est internalisé par endocytose dès qu'il est formé ; dans les endosomes, le ligand est libéré dans le cytoplasme cellulaire pour permettre le recyclage du récepteur à la surface de la membrane cellulaire. Cette stratégie ouvre des perspectives particulièrement intéressantes pour la délivrance au niveau cytoplasmique des acides nucléiques et de leurs dérivés, et pour éviter ainsi leur destruction par les enzymes lysosomiales.

Conclusion

Les recherches menées à l'interface de la physique, de la chimie et de la biologie ont abouti à concevoir des systèmes galéniques submicroscopiques capables de transporter des molécules biologiquement actives au plus près de leur cible (tissulaire, cellulaire ou même moléculaire). Bien que futuristes, ces avancées ont dépassé le stade de la simple curiosité de laboratoire puisqu'elles ont déjà donné lieu à la mise sur le marché de nouveaux médicaments pour le traitement de cancers et de certaines maladies infectieuses.

Références

- [1] Juliano R.L., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **1988**, 2, p. 31.
- [2] Couvreur P., Tulkens P., Roland M., Trouet A., Speiser P., *FEBS Letters*, **1977**, 84, p. 323.
- [3] Chiannikulchai N., Ammoury N., Caillou B., Devissaguet J.-P., Couvreur P., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1990**, 26, p. 122.
- [4] Couvreur P., Kante B., Grislain L., Roland M., Speiser P., *J. Pharm. Sci.*, **1982**, 71, p. 790.
- [5] Hartsel S., Bolard J., *Btr. J. Cancer*, **1996**, 17, p. 445.
- [6] Balland O., Pinto-Alphandary H., Viron A., Puvion E., Andreumont A., Couvreur P., *J. Antimicrob. Chemother.*, **1996**, 37, p. 105.
- [7] Fattal E., Youssef M., Couvreur P., Andreumont A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, 33, p. 1540.
- [8] Jeon S.I., Lee J.H., Andrade J.D., de Gennes P.G., *J. Colloid Interf. Sci.*, **1991**, 142, p. 159.
- [9] Woodle M.C., Lasic D.D., *Biochem. Biophys. Acta*, **1992**, 1113, p. 171.
- [10] Woodle M.C., *Adv. Drug Del. Rev.*, **1998**, 32, p. 139.
- [11] Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Tubetsky V., Torchilin V., Langer R., *Science*, **1994**, 263, p. 1600.
- [12] Peracchia M.T., Harnisch S., Pinto-Alphandary H., Gulik A., Dedieu J.-C., Desmaële D., D'Angelo J., Müller R.H., Couvreur P., *Biomaterials*, **1999**, 20, p. 1269.
- [13] Gabizon A., Papahajopoulos D., *Proc. Natl. Acad. Sci. États-Unis*, **1988**, 85, p. 6949.
- [14] Unezaki S., Maruyama K., Hosoda J., Nagae I., Koyanagi Y., Nakata M., Ishida O., Iwatsuru M., Tsuchida S., *Internat. J. Pharm.*, **1996**, 144, p. 11.
- [15] Gabizon A., *Cancer Res.*, **1992**, 52, p. 891.
- [16] Calvo P., Gouritin B., Villaroya H., Eclancher F., Giannavola C., Klein C., Andreux J.-P., Couvreur P., *Europ. J. Neurosci.*, **2002**, 15, p. 1317.
- [17] Brigger I., Morizet J., Aubert G., Chacun H., Terrier-Lacombe M.J., Couvreur P., Vassal G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 303, p. 928.
- [18] Calvo P., Gouritin B., Chacun H., Desmaële D., D'Angelo J., Noel J.-P., Georgin D., Fattal E., Andreux J.-P., Couvreur P., *Pharm. Res.*, **2001**, 18, p. 1157.
- [19] Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K., *Adv. Drug Del. Rev.*, **1999**, 40, p. 89.
- [20] Park J.W., Hong K., Carter P.P., Asgari H., Guo L., Wirth C., Shalaby R., Kotts C., Keller G.A., Wood W.I., Papahajopoulos W.I., Benz C., *Proc. Natl. Acad. Sci. États-Unis*, **1995**, 92, p. 1327.
- [21] Stella B., Arpico S., Peracchia M.T., Desmaële D., Hoebeke J., Renoir M., D'Angelo J., Cattel L., Couvreur P., *J. Pharm. Sci.*, **2000**, 89, p. 1452.



De gauche à droite : J. D'Angelo, K. Andrieux, P. Couvreur et D. Desmaële.

Karine Andrieux¹ est maître de conférence au sein du Laboratoire de pharmacie galénique à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry*, laboratoire dirigé par le professeur **Patrick Couvreur**². **Didier Desmaële**³ est directeur de recherche au sein de l'UMR 8076 BioCIS à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry** et **Jean D'Angelo**⁴ y est professeur.

Les auteurs appartiennent à la Fédération de Recherche « Innovation thérapeutique : de la conception à la mise en forme du médicament ».

* UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex.

¹ Tél. : 01 46 83 59 09. Fax : 01 46 61 93 34. Courriel : karine.andrieux@cep.u-psud.fr

² Tél. : 01 46 83 53 96. Fax : 01 46 61 93 34. Courriel : patrick.couvreur@cep.u-psud.fr

** UMR 8076 BioCIS, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex.

³ Tél. : 01 46 83 57 53. Fax : 01 46 83 57 52. Courriel : didier.desmaele@cep.u-psud.fr

⁴ Tél. : 01 46 83 56 99. Fax : 01 46 83 57 52. Courriel : jean.dangelo@cep.u-psud.fr

Les associations chimio-radiothérapeutiques

Vincent Favaudon et Christophe Hennequin

Abstract

Chemo-radiotherapeutic associations in cancer treatment

For over ten years concomitant chemo-radiotherapeutic combinations have been used in the treatment of locally advanced epithelial tumors. Randomized assays have shown that these combinations result in improved local control and reduced metastatic disease. Interaction between both modalities may take place at the molecular level with altered DNA repair or modification of the lesions induced by drugs or radiation. The most efficient processes occurring at the cellular and tissular level involve altered cell cycle progression, tumor reoxygenation or inhibition of tumor cell repopulation or neoangiogenesis. Recent studies suggest that the control of the signalization pathways initiated in response to radiation might allow increasing the therapeutic index of radiation therapy.

Mots-clés

Cancer, radiothérapie, chimiothérapie, association.

Key-words

Cancer, radiotherapy, chemotherapy, combination.

Associations chimiothérapie-radiothérapie dans le traitement du cancer : pourquoi et comment ?

Quarante ans après la découverte des anthracyclines, l'oncologie médicale dispose d'une large palette d'agents cytotoxiques, souvent dérivés de composés naturels. La recherche actuelle privilégie de nouvelles cibles (angiogénèse, glycosylation, tyrosine kinases, récepteurs des facteurs de croissance), dans l'espoir encore incertain de parvenir à une plus grande spécificité et à une moindre toxicité. La radiothérapie s'est affirmée au cours du XX^e siècle comme une thérapeutique majeure du traitement des tumeurs localisées. Efficace et peu coûteuse, elle a beaucoup progressé au cours de la dernière décennie. Ces progrès sont liés, pour partie à ceux de l'imagerie, des programmes de dosimétrie et des accélérateurs qui permettent désormais un traitement conformationnel adapté à chaque cas, et pour partie à la mise en œuvre d'associations chimio-radiothérapeutiques concomitantes (ACRC), efficaces et relativement bien tolérées [1]. La recherche fondamentale a joué dans la validation de ces associations un rôle de premier plan et a permis d'en mieux comprendre les mécanismes.

En théorie, les agents utilisables en ACRC sont de quatre types :

- les drogues antitumorales cytotoxiques ;
- les agents radiosensibilisateurs, en eux-mêmes dénués d'activité cytotoxique mais capables de potentialiser l'effet létal des radiations ;
- les agents protégeant les tissus sains des complications aiguës ou tardives de la radiothérapie ;
- les anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux permettant de diriger des agents radioactifs sur les tumeurs.

Les mécanismes d'interaction entre les deux modalités de traitement sont au nombre de trois [2] :

- la coopération spatiale, dans laquelle la chimiothérapie est destinée à stériliser tumeurs disséminées ou métastases, le ciblage de la tumeur primaire étant dévolu à la radiothérapie ;

- la protection des tissus sains contre les complications aiguës ou tardives de la radiothérapie ;

- une synergie cytotoxique à l'endroit de la tumeur primaire.

En pratique, les ACRC utiles en clinique s'adressent au traitement des tumeurs solides et mettent en œuvre des drogues antitumorales cytotoxiques. Les premiers essais cliniques randomisés ont été publiés au début de la décennie 1990 [3-4]. Ces essais s'étaient montrés assez décevants, avec des toxicités cumulatives nécessitant l'arrêt du

Glossaire

ACRC

Associations chimio-radiothérapeutiques concomitantes.

Chimiothérapie

Traitement à visée systémique des cancers par des médicaments antitumoraux (drogues antitumorales), souvent associé à la chirurgie et/ou à la radiothérapie. La plupart des drogues antitumorales utilisées à ce jour sont des agents cytotoxiques.

Cytotoxicité

Aptitude d'un traitement à détruire les cellules, c'est-à-dire à induire la mort cellulaire. La cytotoxicité des traitements anticancéreux est le plus souvent liée à l'induction de lésions de l'ADN.

Dose physique

Quantité d'énergie radiante absorbée par la matière irradiée. L'unité légale de dose est le Gray (Gy).

1 Gy = 1 Joule/kg = 100 rad.

Radiothérapie

Traitement à visée locale ou loco-régionale des tumeurs par les radiations ionisantes. Il existe trois modalités de traitements : (i) la radiothérapie externe, dans laquelle les tumeurs sont ciblées par des faisceaux de rayonnement produits par des accélérateurs de particules (photons-X, électrons, protons ou neutrons), quelquefois (photons- γ) par des sources de cobalt-60 ; (ii) la curiethérapie, ou brachythérapie, dans laquelle des sources radioactives (césium-137, iridium-192, iode-125) sont implantées au sein des tumeurs ou posées à leur contact ; (iii) la médecine nucléaire, consistant à injecter des composés radioactifs, par exemple pour le traitement des cancers de la thyroïde par les isotopes radioactifs de l'iode.

traitement et conduisant donc à l'échec thérapeutique. Les essais ultérieurs ont permis de sélectionner les drogues utiles et les protocoles permettant une meilleure maîtrise des toxicités, et de montrer que les ACRC apportant un bénéfice sensible sont celles dans lesquelles chaque modalité peut être utilisée à plein dosage. Une interaction supra-additive, si elle conduit à un cumul des toxicités, doit être évitée. En définitive, les drogues les plus fréquemment utilisées en association concomitante avec la radiothérapie sont le cis-dichloro-diammine-Pt^{II} (cisPt), l'étoposide, le 5-fluorouracile et les taxanes (figure 1).

Quantification des interactions

La survie cellulaire au rayonnement (S) est décrite par une loi linéaire-quadratique (voir encadré). Exprimées en fonction de la dose, les courbes de survie au rayonnement ont une allure convexe et présentent un « épaulement » aux faibles doses. Ceci est vrai *in vivo* et *in vitro*.

Les courbes de survie de cellules exposées aux drogues antitumorales *in vitro* sont souvent exponentielles, mais il n'est pas rare qu'elles présentent une inflexion ou un plateau, indices de la résistance d'une fraction de la population cellulaire. Si la survie à deux antitumoraux A1 et A2 répond à une loi de variation exponentielle en fonction des concentrations $\ln S = -\gamma[A1] - \delta[A2]$, et que cette

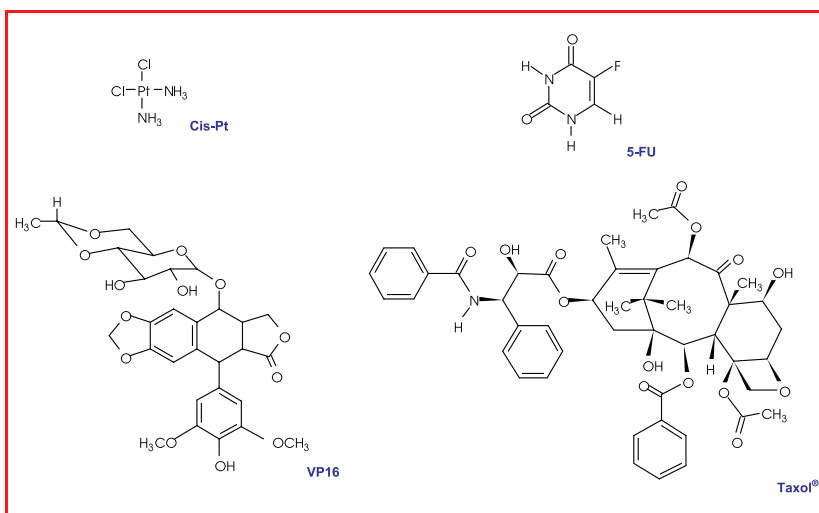


Figure 1 - Structure des quatre principales drogues antitumorales cytotoxiques utilisées dans les associations chimio-radiothérapeutiques.

Les quatre molécules présentent des mécanismes d'action très différents : (i) le cis-dichlorodiammine-Platine^{II} (cisPt) se fixe sur les bases puriques de l'ADN, principalement sur l'atome d'azote (nucléophile) en position 7 des résidus guanine (G), produisant des adduits monofonctionnels et des pontages intra- et inter-brins. Le cisPt possède en conséquence une affinité marquée pour les domaines riches en G de l'ADN, notamment les régions télomériques ; (ii) l'étoposide (VP16) est un poison de topoisomérase II α . Il agit par inhibition de la réversion d'intermédiaires enzymatiques connus sous le nom de « complexes clivables », et induit par ce biais des cassures double-brin de l'ADN ; (iii) Le 5-fluorouracile (5FU) agit principalement par inhibition de la thymidilate synthétase et induit la mort cellulaire par carence en thymine ; une fraction du 5FU est intégrée à l'ARN des nucléoles et serait responsable d'un effet radiosensibilisateur ; (iv) le paclitaxel (Taxol[®]) et ses analogues stabilisent les microtubules en se fixant sur la tubuline β . Cette stabilisation des microtubules inhibe les fonctions qui sont liées à leur renouvellement dynamique et produit une désorganisation du fuseau mitotique⁵ avec blocage des cellules à la jonction prophase-métaphase par suite de l'inhibition de l'assemblage du centrosome.

Encadré

Détermination du statut d'additivité dans l'association concomitante de l'étoposide (VP16), poison de topoisomérase II α , et d'une exposition au rayonnement γ (d'après [21])

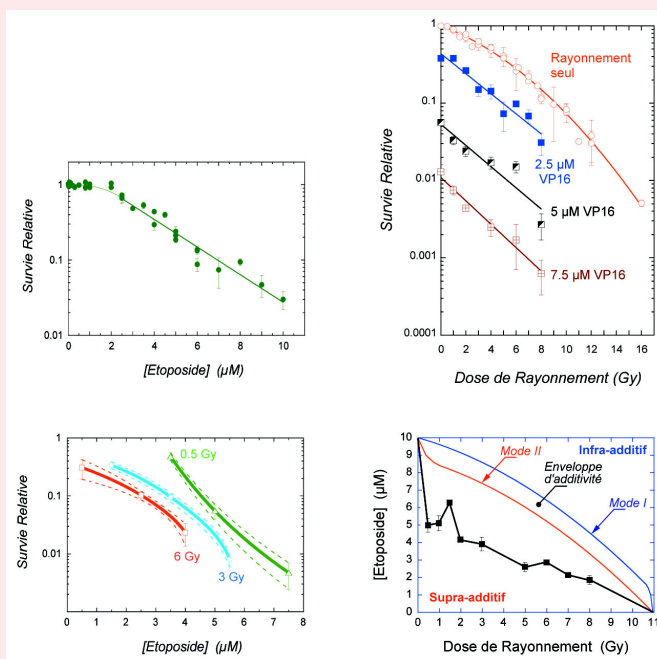
Dans un premier temps, on détermine la courbe dose-réponse de la lignée cellulaire considérée à la drogue seule (quadrant supérieur gauche) et au rayonnement seul (quadrant supérieur droit). Les courbes doses-réponse doivent être ajustées à un modèle mathématique approprié. Dans le cas du rayonnement, la survie (S) est décrite par une loi linéaire-quadratique :

$$-\ln S = \alpha D + \beta D^2$$

où D est la dose de rayonnement et α , β les paramètres caractérisant la radiosensibilité de la lignée cellulaire considérée. Dans une seconde série d'expériences, les courbes de survie au rayonnement ont été déterminées en présence de trois concentrations d'étoposide (quadrant supérieur droit). On voit que la présence d'étoposide, en sus de la cytotoxicité propre à la drogue, modifie la forme de la courbe de survie au rayonnement. Cette courbe devient en effet exponentielle en présence de drogue.

La construction de l'isobologramme requiert l'exploration de la réponse à l'étoposide pour différentes doses de rayonnement. Un exemple de cette détermination est présenté dans le quadrant inférieur gauche. Les courbes ainsi obtenues permettent de déterminer les couples concentration de drogue vs dose de rayonnement qui, dans l'association, produisent l'isoeffet choisi. Nous avons pris l'exemple d'une survie de 5 % (quadrant inférieur droit). Les points expérimentaux s'inscrivent dans un diagramme bidimensionnel dont les axes figurent la concentration de drogue et la dose de rayonnement qui, seules ou en association, produisent l'isoeffet considéré. On construit une enveloppe d'additivité à partir des équations décrivant la réponse à chacun des agents appliqués indépendamment. Deux modes d'additivité correspondant à des hypothèses extrêmes sont envisagés [7]. Les aires situés au-dessus et au-dessous de l'enveloppe d'additivité

déterminent les domaines d'infra-additivité et de supra-additivité, respectivement. Dans l'exemple choisi, l'interaction apparaît fortement supra-additive, c'est-à-dire que l'effet cytotoxique du traitement combiné est très supérieur à celui qui serait obtenu pour la même dose de chaque agent appliqué indépendamment.



loi de variation est conservée dans l'association des deux drogues, l'additivité des traitements se déduit aisément de la comparaison du résultat de la combinaison au produit algébrique des probabilités de survie pour chaque agent appliqué isolément. La méthode de Chou (« median effect ») est la plus fréquemment employée dans ce contexte [5].

La non-linéarité des équations décrivant la réponse au rayonnement ne permet pas une approche aussi rudimentaire. La seule méthode qui permette de traiter le problème de manière rigoureuse est celle des isobogrammes (voir encadré). Elle repose sur le concept d'isoeffet et avait été établie par Loewe [6] dans un contexte pharmacologique. Cette méthode a été adaptée au cas des ACRC par Steel et Peckham [7].

Autre conséquence de la non-linéarité des courbes de survie au rayonnement, le statut d'additivité varie avec le niveau de cytotoxicité, de sorte que les interactions supra-additives s'observent plutôt aux faibles taux de survie, c'est-à-dire dans le domaine des fortes doses de rayonnement.

Mécanismes d'interaction : lésions radio-induites

Les radiations ionisantes induisent un large spectre de lésions dans l'ADN des cellules cibles : oxydation des bases, sites apuriques-apyrimidiques, pontages ADN-protéines, cassures simple-brin et cassures double-brin. Plusieurs drogues antitumorales ciblent également l'ADN et produisent des adduits (alkylants, mitomycine C, cisPt) ou des cassures (camptothécine, anthracyclines, épipodophylotoxines, néocarzinostatine, bléomycine).

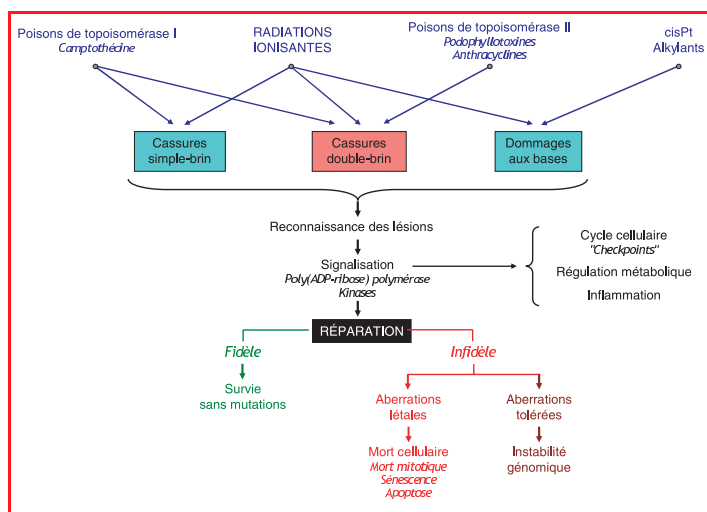


Figure 2 - Conséquences d'une exposition aux radiations ionisantes ou à des drogues antitumorales génotoxiques.

La réponse au rayonnement conditionne l'interaction avec des drogues antitumorales administrées de manière concomitante ou à proximité de l'irradiation, selon trois mécanismes principaux : (i) la reconnaissance et la réparation des lésions radio-induites s'accompagnent d'un remaniement de la conformation de la chromatine qui peut accroître la susceptibilité de l'ADN à l'action des agents génotoxiques. Ce mécanisme se traduit par une augmentation de l'incidence des lésions de l'ADN ; (ii) conséquence classique de l'irradiation, l'altération de la progression du cycle cellulaire peut modifier la sensibilité aux drogues antitumorales. Ce phénomène est connu sous le nom de coopération cytotocinique et s'exerce plutôt au sein du bloc en phase G2 consécutif à l'irradiation ; (iii) l'altération de la régulation métabolique post-irradiation, notamment par la voie de NF- κ B, peut conduire à une coopération avec les antimétabolites (méthotrexate, 5-fluorouracile) ou les médiateurs de l'inflammation (cytokines).

D'une manière générale, le destin des cellules post-irradiation est scellé par la persistance d'aberrations chromosomiques. Les aberrations les moins sévères peuvent être tolérées et conduire à des cancers iatrogènes.

La survie à ces agents génotoxiques dépend de la qualité de la réparation des lésions de l'ADN. Ainsi, le défaut de réparation d'une seule cassure double-brin suffit à induire la mort cellulaire. En ACRC, la survie cellulaire peut être affectée par deux mécanismes distincts que nous illustrerons par des exemples.

Modification de l'incidence des lésions radio-induites

La cytotoxicité de l'étoposide, poison de topoisomérase II¹ de la famille des épipodophylotoxines, est liée à la formation de cassures double-brin de l'ADN [8]. Une interaction supra-additive avec les radiations ionisantes a été démontrée en exposition concomitante et au sein du bloc en G2 radio-induit, c'est-à-dire plusieurs heures après l'irradiation [9]. Cette supra-additivité différée dans le temps va de pair avec une augmentation de l'incidence des lésions induites par la drogue et paraît corrélée à des remaniements de la conformation de la chromatine produits par les mécanismes de réparation des lésions radio-induites [9].

Inhibition de la réparation des lésions radio-induites

La réparation des cassures double-brin de l'ADN se fait par deux mécanismes, la recombinaison homologue et la suture non homologue (« non-homologous end-joining », NHEJ). Quoique peu fidèle, cette seconde voie est prépondérante dans les cellules de mammifères. La protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) est l'enzyme clé de cette voie de réparation. Comme d'autres kinases impliquées dans la reconnaissance et la signalisation des lésions de l'ADN (ATM, ATR), DNA-PK possède un site catalytique présentant une forte homologie avec celui de la phosphatidylinositol 3-kinase. C'est pourquoi les inhibiteurs de phosphatidylinositol 3-kinase, telle la wortmannine, une toxine fongique, produisent un effet radiosensibilisateur prononcé.

Il en est de même de tous les agents qui inhibent la réparation des lésions radio-induites, indépendamment de leur mécanisme d'action. C'est le cas des inhibiteurs du métabolisme des nucléosides et des nucléotides² comme les fluoropyrimidines (5-fluorouracile, fludarabine, gemcitabine), les analogues de thymidine et l'hydroxyurée.

Mécanismes d'interaction : facteurs liés au cycle cellulaire et à la mort cellulaire

Coopération cytotocinique

On sait depuis longtemps que la radiosensibilité dépend des phases du cycle cellulaire³. La phase S est la plus radorésistante dans toutes les lignées cellulaires [10]. Il s'ensuit qu'une drogue tuant spécifiquement les cellules engagées dans la phase S produit une augmentation apparente de la radiosensibilité du simple fait que les cellules qui ont survécu à l'action de la drogue sont plus radiosensibles que les cellules en phase S. C'est le cas avec la camptothécine, un poison de topoisomérase I.

Synchronisation cellulaire

La radiothérapie est classiquement délivrée par fractions de 2 Gy par jour pendant plusieurs semaines. Ce protocole peut induire en quelques jours une synchronisation des cellules tumorales. On pourrait imaginer d'utiliser cet effet pour obtenir une coopération cytotinétique comparable à celle obtenue avec la camptothécine (figure 3). On sait que l'effet existe et contribue au succès des ACRC, mais en pratique l'hétérogénéité des tumeurs ne permet pas de prévoir l'instant où il se produit [11].

Le cas des taxanes donne un autre exemple de la difficulté de prévoir sur des bases rationnelles l'issue des traitements combinés. Les premières études de l'interaction des taxanes et du rayonnement *in vitro* avaient fait état d'une radiosensibilisation par accumulation des cellules au stade pré-mitotique, considéré comme le compartiment le plus radiosensible du cycle cellulaire [12-13]. Les études ultérieures n'ont pas confirmé le caractère universel de ce modèle, démontrant même l'existence d'un effet radioprotecteur dans certaines lignées cellulaires. En revanche, les essais *in vivo* ont mis en évidence une augmentation de la réponse à la radiothérapie par les taxanes en rapport avec un mécanisme de réoxygénation tumorale (voir § ci-après « réoxygénation et réponse à la radiothérapie »).

Apoptose radio-induite

La mort des cellules irradiées peut se produire par des mécanismes faisant (apoptose, sénescence) ou non (mort immédiate, mort mitotique, mort différée) l'objet d'un programme génétique, et s'accompagnant (apoptose) ou non d'une lyse cellulaire rapide.

La proportion des différents modes de mort cellulaire dans un tissu irradié est fonction de la dose de rayonnement et de l'expression d'un certain nombre de gènes. Elle dépend au premier chef de l'intégrité de la protéine p53 qui tient un rôle décisif dans l'induction de l'apoptose radio-induite. Cependant, il n'y a pas de corrélation absolue entre la radiosensibilité intrinsèque et le statut de la protéine p53, et on ne croit plus à une relation directe entre l'aptitude à entrer en apoptose et la radiocurabilité des tumeurs [14].

Il faut d'ailleurs noter que l'apoptose tient un rôle assez mineur dans la mort des cellules tumorales après chimiothérapie cytotoxique [15]. Il en est de même dans les ACRC. De fait, la mort mitotique est le mécanisme de mort cellulaire prépondérant dans la plupart des lignées tumorales épithéliales. Lié à la formation d'aberrations chromosomiques et à des défauts des voies de signalisation qui contrôlent le passage en mitose, ce mode de mort cellulaire est encore peu étudié. Cette situation est appelée à changer dans les prochaines années, parallèlement au développement des recherches sur la signalisation et le contrôle de la mitose.

Mécanismes d'interaction : facteurs tissulaires

Les traitements anticancéreux cherchent à cibler la tumeur en épargnant le tissu sain environnant. La radiothérapie y parvient en conformant les faisceaux aux tumeurs, et en tirant parti du différentiel de réparation entre tissus sains et tissus tumoraux. Ceci étant, l'efficacité des ACRC dépend

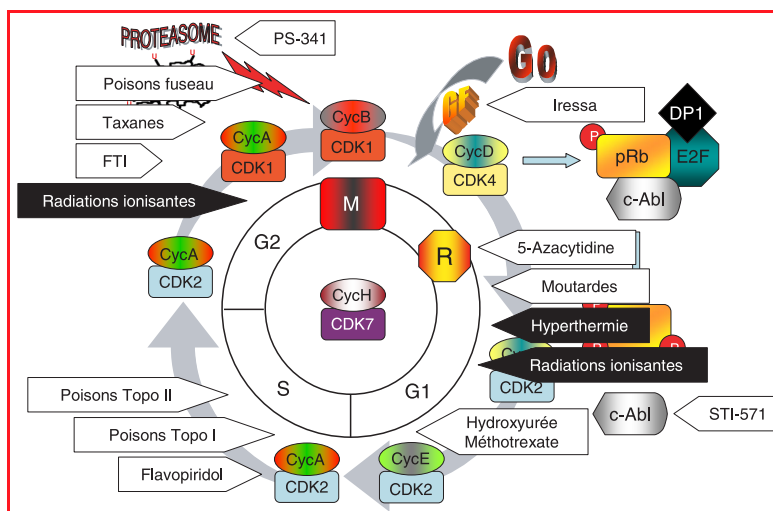


Figure 3 - Spécificité de divers agents antitumoraux envers les phases du cycle cellulaire.

Le schéma indique les phases du cycle cellulaire et/ou les éléments de régulation qui présentent la plus grande susceptibilité aux agents considérés. Ainsi, les cellules humaines montrent un pic de radiosensibilité en phase G1 et un pic de radiorésistance en phase S. M : mitose ; GF : facteurs de croissance ; R : point de restriction ; Cyc : cyclines ; CDK : kinases dépendantes des cyclines ; c-Abl : tyrosine kinase c-Abl ; FTI : inhibiteurs de farnésyl transférase.

de plusieurs facteurs liés au métabolisme tissulaire, dont les principaux sont l'hypoxie tumorale, la prolifération tumorale et la néo-angiogenèse.

Réoxygénation et réponse à la radiothérapie

L'oxygène est le plus puissant radiosensibilisateur connu. C'est pourquoi l'hypoxie tumorale constitue un facteur de radiorésistance majeur. Or, la réduction du volume tumoral survenant en cours de traitement s'accompagne généralement d'une réoxygénation de la tumeur, partant d'une augmentation de la radiosensibilité. Une augmentation parallèle de la pression partielle d'oxygène intratumorale et de la radiocurabilité a ainsi été démontrée sur des xénogreffes⁴ *in vivo* dans des ACRC mettant en œuvre le paclitaxel [16] ou la gemcitabine [17].

Inhibition de la prolifération tumorale

La repopulation tumorale en cours de traitement est fréquemment invoquée pour expliquer les échecs de la radiothérapie [18]. Ce mécanisme n'est pas bien compris, mais on soupçonne les facteurs de croissance d'y tenir un rôle déterminant. Les études en cours diront si l'inactivation des récepteurs des facteurs de croissance par des agents qui inhibent leur activité tyrosine kinase, par exemple le gefitinib (Iressa), est en mesure ou non d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

Inhibition de la néo-angiogenèse

La néo-angiogenèse, c'est-à-dire le recrutement de vaisseaux néo-formés par les tumeurs, est indispensable à leur croissance. Cette caractéristique des tumeurs solides a fait naître un nouveau domaine de recherche, et un grand nombre d'inhibiteurs de néo-angiogenèse (angiostatine, combrétastatine, flavones, inhibiteurs de kinases) sont en cours d'évaluation *in vitro* et *in vivo*.

Mauceri et coll. [19] ont décrit une synergie prononcée de l'angiostatine et de la radiothérapie dans un modèle de xénogreffe. Cet effet est paradoxal puisque l'efficacité de la radiothérapie requiert une bonne oxygénation des tumeurs. Un effet cytotoxique sur les cellules endothéliales, ou l'induction d'une apoptose liée à l'hypoxie, pourraient rendre compte de ces observations.

Conclusion

Les essais cliniques randomisés réalisés au cours des dix dernières années ont montré que les associations chimio-radiothérapeutiques concomitantes pouvaient améliorer à la fois le contrôle local de diverses tumeurs solides (cancers des voies aéro-digestives supérieures, cancers bronchiques, du col utérin et de l'œsophage) et le taux de survie globale [1, 20]. Les ACRC présentent également un intérêt pour la préservation d'organes ou pour le conditionnement à une chirurgie. En revanche, les résultats des associations adjuvantes ou néo-adjuvantes se sont montrés décevants. Les essais cliniques doivent se poursuivre en vue d'augmenter l'index thérapeutique des associations et de mieux cerner l'effet des protocoles, des doses et du fractionnement [20]. On sait maintenant que l'efficacité des ACRC dépend au premier chef du facteur temps, c'est-à-dire de la chronologie d'administration (concomitante, différée ou séquentielle) des drogues et du rayonnement, ce qui renvoie à plusieurs des aspects que nous avons développés dans cet article. Toutefois, la connaissance des mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires qui déterminent l'interaction des drogues et du rayonnement n'est pas assez avancée pour permettre de prédire l'issue des traitements, et l'expérience a montré que toute nouvelle drogue représente un cas particulier. La compréhension des mécanismes de la réponse tissulaire sera indispensable pour progresser. On peut aussi espérer que la connaissance des voies de signalisation des lésions radio-induites, qui se développe actuellement, permettra de trouver de nouvelles drogues et de mieux adapter les traitements aux besoins et aux réactions de chaque patient.

Notes

¹La réplication et la transcription de l'ADN s'accompagnent de contraintes topologiques liées au surenroulement de l'ADN. L'accumulation de ces contraintes bloque la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Leur relaxation est effectuée par des enzymes appelées topoisomérases, dont il existe deux types, I et II. Le cycle catalytique de ces enzymes comprend une incision de l'ADN qui est normalement rescellé sans erreur. Les poisons de topoisomérases bloquent cette étape de religation.

²Les nucléosides sont les briques élémentaires de l'ARN et de l'ADN. Ils se composent d'un pentose cyclique (ribose ou désoxyribose) et d'une base purique (adénine ou guanine) ou pyrimidique (cytosine, thymine ou uracile) réunis par une liaison C-N. Estérifiés par un groupe phosphate en position 3' ou 5' du pentose, ils constituent les nucléotides.

³On distingue classiquement quatre phases consécutives dans le cycle cellulaire : (i) la phase G1 (gap 1) est une phase de croissance et d'accumulation de réserves faisant suite à la mitose ou la sortie de quiescence sous l'effet de stimulations mitogènes, et au terme de laquelle la cellule doit prendre la décision de poursuivre un cycle de division ou de revenir en quiescence ; (ii) la phase S est celle où la cellule synthétise l'ADN, dupliquant la totalité de son génome et doublant le nombre de ses chromosomes ; (iii) la phase G2 (gap 2) est une phase de réorganisation et de contrôle de l'intégrité du génome avant le passage en mitose ; (iv) la phase M (mitose) mène de la condensation et de la ségrégation des chromosomes à leur migration sur le fuseau mitotique, et s'achève à la cytodivision, c'est-à-dire à la libération de deux cellules filles.

⁴Une xénogreffe, ou hétérogreffe, est le résultat de la transplantation d'un tissu, d'un organe ou de cellules entre individus d'espèces différentes. En

recherche antitumorale, il s'agit le plus souvent de la greffe de cellules tumorales humaines dans des lignées de souris immunodéprimées (nude).

⁵La mitose est la phase du cycle cellulaire où le noyau se désagrège et où les chromosomes sont condensés et distribués symétriquement entre deux cellules filles. On y distingue quatre étapes (prophase, métaphase, anaphase et télophase). Dans la prophase (condensation) et la métaphase (ségrégation), chaque chromosome apparaît sous forme de deux chromatides sœurs soudées au niveau d'une striction plus ou moins centrale, le centromère, par lequel chaque chromosome s'attache aux microtubules qui vont former le « fuseau mitotique ». Le fuseau est organisé à partir de deux organites situés à ses pôles, les centrosomes. Les chromatides sœurs s'étant séparées de manière symétrique, chaque paire de chromosomes homologues est halée (anaphase) le long du fuseau vers l'un des pôles. En fin de migration, les chromosomes se décondensent (télophase) et la membrane nucléaire se reconstitue de manière à ségréger le matériel génomique. La cytoténèse ou cytodivision qui se produit ensuite est l'étape par laquelle la cellule subit une striction centrale qui permet de partager le cytoplasme et d'isoler chaque noyau pour former deux cellules filles.

Références

- [1] Hennequin C., Favaudon V., *Eur. J. Cancer*, **2002**, *38*, p. 223.
- [2] Steel G.G., *Radiother. Oncol.*, **1988**, *11*, p. 31.
- [3] Tannock I.F., *Radiother. Oncol.*, **1989**, *16*, p. 83.
- [4] Vokes E.E., Weichselbaum R.R., *J. Clin. Oncol.*, **1990**, *8*, p. 911.
- [5] Chou T.C., The median effect principle and the combination index or quantitation of synergism and antagonism, *Synergism and antagonism in chemotherapy*, T.C. Chou, D.C. Rideout (eds), Academic Press, San Diego, **1991**, p. 61.
- [6] Loewe S., *Arzneimittelforsch.*, **1953**, *3*, p. 285.
- [7] Steel G.G., Peckham M.J., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1979**, *5*, p. 85.
- [8] Liu L.F., *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, *58*, p. 351.
- [9] Yu Y.Q., Giocanti N., Averbeck D., Favaudon V., *Int. J. Radiat. Biol.*, **2000**, *76*, p. 901.
- [10] Terasima T., Tolmach L.J., *Biophys. J.*, **1963**, *3*, p. 11.
- [11] Steel G.G., *Radiother. Oncol.*, **1994**, *32*, p. 95.
- [12] Tishler R.B., Geard C.R., Hall E.J., Schiff P.B., *Cancer Res.*, **1992**, *52*, p. 3495.
- [13] Choy H., Rodriguez F.F., Wilcox B., Koester S.K., Degen D., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, **1992**, *33*, p. 500.
- [14] Hendry J.H., West C.M.L., *Int. J. Radiat. Biol.*, **1997**, *71*, p. 709.
- [15] Tannock I.F., Lee C., *Br. J. Cancer*, **2001**, *84*, p. 100.
- [16] Milas L., Hunter N.R., Mason K.A., Milross C.G., Saito Y., Peters L.J., *Cancer Res.*, **1995**, *55*, p. 3564.
- [17] Mason K.A., Milas L., Hunter N.R., Elshaikh M., Buchmiller L., Kishi K., Hittelman K., Ang K.K., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1999**, *44*, p. 1125.
- [18] Fowler J.F., Lindstrom M.J., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1992**, *23*, p. 457.
- [19] Mauceri H.J., Hanna N.N., Beckett M.A., Gorski D.H., Staba M.J., Stellato K.A., Bigelow K., Heimann R., Gatley S., Dhanabal M., Soff G.A., Sukhatme V.P., Kufe D.W., Weichselbaum R.R., *Nature*, **1998**, *394*, p. 287.
- [20] Noël G., Mazon J.J., Favaudon V., *Bull. Cancer*, **2003**, *90*, p. 85.
- [21] Giocanti N., Hennequin C., Balosso J., Mahler M., Favaudon F., *Cancer Res.*, **1993**, *53*, p. 2105.



V. Favaudon

Vincent Favaudon

est directeur de recherche Inserm à l'Institut Curie-Recherche au Centre universitaire d'Orsay*.

Christophe Hennequin

est professeur des universités et praticien hospitalier (APHF) au service de radiothérapie-oncologie de l'Hôpital Saint-Louis**.



C. Hennequin

* Unité 350 Inserm, Institut Curie-Recherche, Bâtiments 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex.

Tél. : 01 69 86 31 88. Fax : 01 69 86 31 87

Courriel : vincent.favaudon@curie.u-psud.fr

** Service de radiothérapie-oncologie, Hôpital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris.

Tél. : 01 42 49 90 24.

Courriel : christophe.hennequin@sls.ap-hop-paris.fr

Les éthers de glycol

Une toxicité variable selon les composés

Jeanne Etienne

Abstract

Glycol ethers: a variable toxicity depending of their compounds

Largely used since the years 1970, not very volatile and not very odorous, glycol ethers are remarkable solvents allowing to mix between them non-miscible substances. They present multiple industrial uses and are present in a broad line of goods usually employed by the consumer (painting, varnishes, household goods). The majority of glycol ethers currently marketed were tested for their toxic properties (genotoxicity, effect on the reproduction and the development). The glycol ethers having a toxicity on the reproduction are classified in category 2 or 3 of the poisons for the reproduction. These products, in particular ethylene glycol methyl ether (EGME) and ethylene glycol ethyl ether (EGEE) and their acetates, were the subject of European directives limiting their use and their market. They disappeared today from the products of domestic use. Thus, the industrialists gradually replaced glycol ethers of the ethylenic series by glycol ethers of the propylenic series less toxic.

Mots-clés Key-words

Éthers de glycol, génotoxicité, effets sur la reproduction, effets sur le développement.

Glycol ethers, solvent, genotoxicity, effect on the reproduction, effect on the development.

Les éthers de glycol sont des solvants à la fois hydrophiles (solubles dans l'eau) et lipophiles (solubles dans les graisses). Du fait de ce caractère amphiphile, ils entrent dans la composition de nombreux produits à usage industriel ou domestique. Plus d'une trentaine d'éthers de glycol sont produits aujourd'hui par l'industrie chimique. Jusqu'en 1980, les dérivés de l'éthylène glycol étaient les principaux éthers de glycol commercialisés, probablement parce que l'oxyde d'éthylène nécessaire à leur synthèse est un important sous-produit de l'industrie pétrolière. La publication de travaux expérimentaux montrant la toxicité de deux éthers de glycol de cette série (l'éthylène glycol méthyl éther EGME et l'éthylène glycol éthyl éther EGEE) et de leurs acétates a eu pour conséquence d'amorcer leur remplacement par des dérivés propyléniques. En 1997, le marché européen de l'ensemble des éthers de glycol était de 350 000 tonnes. De nombreux secteurs professionnels utilisent des éthers de glycol ; ceux-ci sont présents dans différentes catégories de produits industriels ou domestiques largement diffusés.

Synthèse et propriétés des éthers de glycol

La synthèse des éthers de glycol s'effectue principalement par l'action d'un alcool sur l'oxyde d'éthylène ou de propylène. On obtient alors un éther monoalkylé (méthyl, éthyl, propyl, butyl...) qui, par réaction avec un acide organique, donnera un éther-ester (acétate d'éther de glycol). Deux séries d'éthers de glycol peuvent ainsi être différenciées : les dérivés de l'éthylène glycol et les dérivés du propylène glycol (*tableau I*).

Dans la préparation des dérivés de l'oxyde de propylène, le procédé de synthèse conduit à l'apparition d'isomères minoritaires (inférieurs à 10 %) dérivés du 1 propylène glycol. Les éthers de glycol ont comme principale propriété d'être solubles dans l'eau et dans divers solvants organiques

(alcools, esters, hydrocarbures aromatiques...) : ils sont amphiphiles. Ces propriétés en font d'excellents co-solvants eau-huile, mais aussi des solvants de bonne qualité (*encadré*).

Retrouvés dans tous les produits dits « à l'eau » (peintures...), ils interviennent également dans la composition de nombreuses préparations à usage industriel (encres, vernis, produits à usage métallurgique et

Glossaire

Acidose métabolique

Rupture de l'équilibre acido-basique du plasma dans le sens de l'acidité due à une production excessive de métabolites acides.

Amphiphile

Propriété d'être à la fois hydrophile (soluble dans l'eau) et lipophile (soluble dans les corps gras).

Cytochromes P450

Situés dans les mitochondries, les cytochromes P450 participent à la fixation de l'oxygène sur certains substrats et xénobiotiques (substances étrangères à l'Homme).

Dermite ou dermatite

Inflammation de la peau.

Génome

Ensemble des gènes des chromosomes.

Génotoxicité

Toxicité qui altère la structure du génome.

Métabolisme

Ensemble des modifications chimiques qui ont lieu dans l'organisme.

Néphropathie tubulaire

Néphrite caractérisée sur le plan clinique par une oligo-anurie et sur le plan anatomique par des lésions rénales situées soit sur le segment proximal, soit sur le segment distal des tubules.

Photolyse

Décomposition chimique par la lumière.

Produits phytosanitaires

Produits relatifs aux soins à donner aux végétaux.

Tableau I - Nomenclature et abréviations des éthers de glycol.

| Dérivés de l'éthylène glycol | | Dérivés du propylène glycol | |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|---|
| EGME | éthylène glycol méthyl éther | 2PG1ME | 2-propylène glycol 1-méthyl éther |
| EGMEA | éthylène glycol méthyl éther Ac | 2PG1MEA | 2-propylène glycol 1-méthyl éther 2-acétate |
| EGDME | éthylène glycol diméthyl éther | PGDME | propylène glycol diméthyl éther |
| DEGME | diéthylène glycol méthyl éther | DPGME | dipropylène glycol méthyl éther |
| DEGDME | diéthylène glycol diméthyl éther | DPGMEA | dipropylène glycol méthyl éther acétate |
| TEGME | triéthylène glycol méthyl éther | DPGDME | dipropylène glycol diméthyl éther |
| TEGDME | triéthylène glycol diméthyl éther | TPGME | tripropylène glycol méthyl éther |
| EGEE | éthylène glycol éthyl éther | 1PG2ME | 1-propylène glycol 2-méthyl éther |
| EGEEA | éthylène glycol éthyl éther Ac | 1PG2MEA | 1-propylène glycol 2-méthyl éther 1-acétate |
| EGDEE | éthylène glycol diéthyl éther | 2PG1EE | 2-propylène glycol 1-éthyl éther |
| DEGEE | diéthylène glycol éthyl éther | 2PG1EEA | 2-propylène glycol 1-éthyl éther 2-acétate |
| DEGEEA | diéthylène glycol éthyl éther Ac | DPGEE | dipropylène glycol éthyl éther |
| DEGDDEE | diéthylène glycol diéthyl éther | 2PG1PhE | 2-propylène glycol 1-phényl éther |
| TEGEE | triéthylène glycol éthyl éther | 2PG1BE | 2-propylène glycol 1-n-butyl éther |
| EGnPE | éthylène glycol n-propyl éther | DPGBE | dipropylène glycol butyl éther |
| EGnPEA | éthylène glycol n-propyl éther Ac | TPGBE | tripropylène glycol butyl éther |
| EGiPE | éthylène glycol iso-propyl éther | PGMtBE | propylène glycol mono-tert-butylque éther |
| EGiPEA | éthylène glycol iso-propyl éther Ac | | |
| EGPhE | éthylène glycol phényl éther | | |
| EGBE | éthylène glycol n-butyl éther | | |
| EGBEA | éthylène glycol n-butyl éther Ac | | |
| DEGBE | diéthylène glycol butyl éther | | |
| DEGBEA | diéthylène glycol butyl éther Ac | | |
| TEGBE | triéthylène glycol n-butyl éther | | |
| EGHE | éthylène glycol n-hexyl éther | | |
| DEGHE | diéthylène glycol n-hexyl éther | | |

Les industries qui fabriquent, transforment et utilisent les éthers de glycol peuvent en émettre dans l'air, en libérer dans les eaux de surface et les eaux souterraines. Les données récentes suggèrent une répartition à 96 % dans le compartiment aquatique, près de 2 % dans le compartiment sol-sédiments et moins de 0,1 % dans l'air. D'après leurs propriétés physico-chimiques, les éthers de glycol peuvent être considérés comme des polluants mobiles dans les sols et donc susceptibles de contaminer les aquifères. L'ensemble des travaux suggère que les éthers de glycol et leurs acétates ne s'accumulent pas dans l'environnement puisqu'ils sont dégradés par photolyse et biodégradables en milieu aérobie. Leur durée de vie dans l'air ne dépasse pas 24 heures. Dans l'eau et les sols, elle peut varier de 1 à 4 semaines.

Métabolisme des éthers de glycol dans l'organisme humain

Les différents éthers dérivés de l'éthylène glycol sont facilement absorbés par voie orale, cutanée ou pulmonaire. L'absorption est

mécanique...) ou domestique (cosmétiques, produits d'entretien...).

Utilisation industrielle et secteur d'activités

L'utilisation des éthers de glycol remonte aux années 1930, mais s'est surtout développée à partir des années 1960 avec l'apparition des peintures polyuréthanes, époxydiques, vinyliques et acryliques. Vers le milieu des années 1980, en raison de la mise en évidence expérimentale des propriétés toxiques de certains dérivés éthyléniques, des dérivés propyléniques sont apparus sur le marché. Au début des années 1990, les trois quarts des éthers de glycol commercialisés appartenaient à la série éthylénique. En 1997, le rapport s'est inversé. En dehors des peintures, une part importante de ces dérivés de la série éthylénique entre dans la composition de produits phytosanitaires et de produits ménagers et d'entretien (tableau II).

En leur qualité de bons solvants, les éthers de glycol sont présents dans de nombreux produits employés dans différents secteurs industriels (tableau III). La concentration en éthers de glycol dans ces produits est très variable : de moins de 1 % à 100 %. Cependant, l'usage d'éthers de glycol purs est peu fréquent. Il existe toutefois un cas particulier avec l'utilisation d'EGEEA comme solvant de nettoyage en sérigraphie.

favorisée par dilution des composés dans l'eau, les alcools ou les solvants organiques, c'est-à-dire dans les conditions standard d'utilisation des éthers de glycol. Les fonctions esters (acétate en général) sont aisément hydrolysées et libèrent *in situ* les différents éthers de glycol.

Le métabolisme des éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol s'effectue majoritairement *via* l'alcool déshydrogénase et l'aldéhyde déshydrogénase, avec production d'aldéhyde et d'acide alkoxyacétique (tableau IV). La voie des cytochromes P450 à activité monooxygénase et désalkylase,

Principales caractéristiques des éthers de glycol

Les éthers de glycol peuvent être regroupés en deux grandes familles : les éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol et ceux dérivés du propylène glycol. Ils résultent de l'action d'un alcool sur l'oxyde d'éthylène ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$) ou de propylène ($\text{CH}_2\text{-O-CH-CH}_3$). Parmi ces deux familles, on distingue les dérivés à chaînes courtes (méthyl ou éthyl éther) et les dérivés à chaînes longues (di ou tri éthylène ou propylène glycol) qui ont des propriétés différentes.

Propriétés

- Stabilité à long terme des formulations (pas d'hydrolyse),
- Bonnes performances techniques : de petites quantités suffisent (ex : peintures à l'eau),
- Évaporation lente,
- Pas d'odeur résiduelle.

Tableau II - Principaux produits susceptibles de contenir des éthers de glycol (données INRS, FIPEC, et SICO, Fédération des industries de la parfumerie).

| Produits | Éthers de glycol |
|--|---|
| Peintures, encres, vernis, teintures, colles et adhésifs | EGME, EGEE(A), EGBE(A), DEGME, DEGBE(A), DEGEE, 2PG1ME(A), 2PG1EE(A), DPGME |
| Produits d'entretien | EGBE, DEGBE, 2PG1ME(A), 2PG1BE, DPGME, EGEE(A), DEGME, DEGEE |
| Cosmétiques | 2PG1ME, EGBE, DEGEE, DEGBE, EGPhE, TPGME, DPGME |
| Fluides de coupe | EGBE, EGEE, DEGBE, DEGEE, |
| Phytoprotecteurs | EGBE, DEGDME, DEGBE, DPGME, EGME |
| Carburant aéronautique | EGME, DEGME |

Tableau III - Secteurs d'activité concernés par l'utilisation des éthers de glycol.

| Secteurs d'activité/emplois | Principaux éthers de glycol |
|--|--|
| Vernissage métallique, fabrication d'emballages métalliques, peintures sur matières plastiques | EGME, EGEE(A), EGBE(A), DEGME, DEGBE(A), DEGEE, 2PG1ME(A), 2PG1EE(A), DPGME... |
| Industrie automobile : cataphorèse, peintures de finition, peintres-carrossiers | |
| Industrie aéronautique | |
| Industrie navale | |
| Industrie du bâtiment : peintures de charpentes métalliques, peintures en bâtiment | |
| Imprimerie : sérigraphie, offset, tampographie | |
| Industrie du meuble | |
| Fabrication de circuits imprimés | |
| Industrie textile et teinturerie | |
| Ponts et chaussées : bitumineux | |
| Bâtiment | |
| Emballage/Transformation | |
| Maroquinerie/Chaussures | |
| Femmes de ménage, laveurs de voitures | EGBE, DEGBE, 2PG1ME(A), 2PG1BE, DPGME, EGEE(A), DEGME, DEGEE... |
| Coiffure, parfumerie | 2PG1ME, EGBE, DEGEE, DEGBE, EGPhE, TPGME, DPGME... |
| Industries métallurgiques et mécaniques (fraisage, tournage, rabotage) | EGBE, EGEE, DEGEE, DEGBE... |
| Agriculture | EGME, EGBE, DEGDME... |
| Aéronautique | EGME, DEGME... |
| Photographie | DEGBEA... |

seront donc moins importantes dans le cas d'éthers à longue chaîne.

La présence d'une concentration cellulaire d'aldéhyde et d'acide suffisante pour provoquer des effets nocifs résulte de l'équilibre entre leur vitesse de formation par des enzymes aisément saturables (alcool et aldéhyde déshydrogénases) et leur vitesse d'élimination. En ralentissant ou annulant certaines étapes du métabolisme, les polymorphismes génétiques décrits pour les deux déshydrogénases, ainsi que l'absence ou la sous-représentation de divers isozymes, constituent un facteur de variabilité interindividuelle de production des métabolites actifs. Par ailleurs, un certain nombre d'enzymes impliquées dans ces métabolismes sont inductibles, et voient donc leur activité augmentée lors de traitements réitérés par des éthers de glycol. Tous ces facteurs de risque pourraient conduire à l'apparition de manifestations plus toxiques dans des groupes de population particuliers.

Le meilleur moyen d'évaluer l'exposition individuelle en milieu professionnel aux éthers de glycol de la série éthylénique est le dosage des métabolites urinaires pour lesquels des valeurs seuils ont été établies.

aboutissant à la formation de CO₂, reste minoritaire. Suivant la nature de l'acide alkoxyacétique formé, les éthers de glycol peuvent être rassemblés en « familles ». A l'intérieur de chaque famille, la quantité d'acide alkoxyacétique produite va en déclinant des monoéthers aux di- puis aux tri-éthers. Certains éthers de glycol (EGHE, DEGHE...) ne peuvent encore être classés du fait de l'absence de données sur leur métabolisme.

Les éthers dérivés du propylène glycol sont quant à eux dégradés en propylène glycol et en alcool, puis finalement en gaz carbonique éliminé par la respiration. Toutefois, certains composés minoritaires (isomères) présents dans les préparations de dérivés du propylène glycol sont métabolisés en aldéhydes et acides comme les dérivés éthyléniques. Les acides formés sont éliminés sous forme libre ou conjuguée. La vitesse d'élimination augmente avec la longueur de la chaîne éther (butyl > éthyl > méthyl) pour des quantités absorbées équivalentes. Les concentrations tissulaires d'aldéhyde et d'acide formés

Données expérimentales sur la toxicité

Les éthers de glycol exercent leur toxicité par l'intermédiaire des métabolites acides et plus encore aldéhydes. Ceux-ci sont capables de pénétrer dans le noyau des cellules et d'altérer la structure et le fonctionnement du génome régissant la croissance et le développement cellulaire. Certains éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol

Tableau IV - Métabolite de l'acide formé ou supposé être formé selon la molécule d'éther de glycol.

| Acide alkoxyacétique | Éther de glycol |
|---------------------------------|---|
| Acide méthoxyacétique (MAA) | EGME, EGDME, DEGME, DEGDME, TEGME, TEGDME |
| Acide éthoxyacétique (EAA) | EGEE, EGDEE, DEGEE, DEGDEE, TEGEE |
| Acide butoxyacétique (BAA) | EGBE, DEGBE, TEGBE |
| Acide isopropoxyacétique (iPAA) | EGiPE |
| Acide propoxyacétique (PAA) | EGnPE |
| Acide phénoxyacétique (PhAA) | EGPhE |
| Acide méthoxypropionique (MPA) | 1PG2ME |

induisent des effets génotoxiques *in vitro* (EGBE, EGEE, EGME) ou *in vivo* (EGME, DEGME), et un éther de glycol (EGBE) présente des potentialités cancérigènes chez l'animal. Les résultats disponibles pour les dérivés du propylène ne montrent pas d'effets génotoxiques.

Chez l'animal (*figure 1*), certains éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol présentent la propriété de détruire les globules rouges (hémolyse). Cet effet est réversible dans le temps. Les globules rouges humains semblent beaucoup moins sensibles. Pour d'autres éthers de glycol de la même série, une atteinte des cellules de la moelle osseuse accompagnée d'une diminution du nombre de globules blancs a été observée. De plus, certains de ces éthers de glycol provoquent une déplétion en lymphocytes, responsable d'immunodépression. Chez l'animal, l'EGME est un toxique testiculaire unanimement reconnu qui induit une baisse de la production des spermatozoïdes, et par conséquent de la fertilité. La toxicité de l'EGEE est également démontrée. Elle est probable pour certains autres dérivés de l'éthylène glycol, en particulier les dérivés méthylés. Chez la femelle, une toxicité sur les ovaires a parfois été observée.

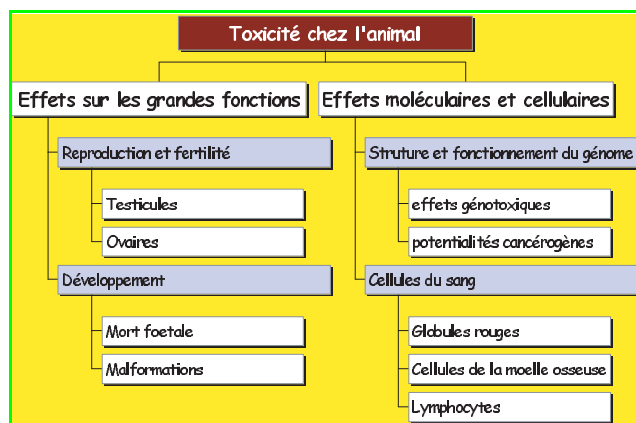


Figure 1 - Toxicité des éthers de glycol chez l'animal.

Il faut souligner que l'espèce humaine présente un potentiel de fertilité beaucoup plus faible et fragile que les animaux de laboratoire généralement sélectionnés sur leur « bonne » fonction de reproduction. Cela doit être pris en considération pour l'extrapolation des données de l'animal à l'Homme, lors des évaluations de risque.

La plupart des éthers de glycol commercialisés ont fait l'objet de recherches chez l'animal pour leur toxicité sur le développement. Les effets peuvent se manifester par une mort foetale (foetotoxicité) ou par l'apparition de malformations (tératogénicité). Ces deux effets sont clairement démontrés avec l'EGME et l'EGEE. Ils sont également probables pour d'autres éthers de glycol de la série éthylénique, en particulier les dérivés méthylés. La plupart des travaux menés avec les dérivés du propylène ne mettent pas en évidence d'effet sur le développement, à l'exception de l'isomère 1PG2ME, que l'on sait être métabolisé en aldéhyde et acide comme les dérivés de la série éthylénique.

Toxicité chez l'Homme

Plusieurs études ont permis d'associer une exposition aux éthers de glycol chez l'Homme à quelques effets toxiques (*figure 2*). Les éthers de glycol peuvent être responsables de

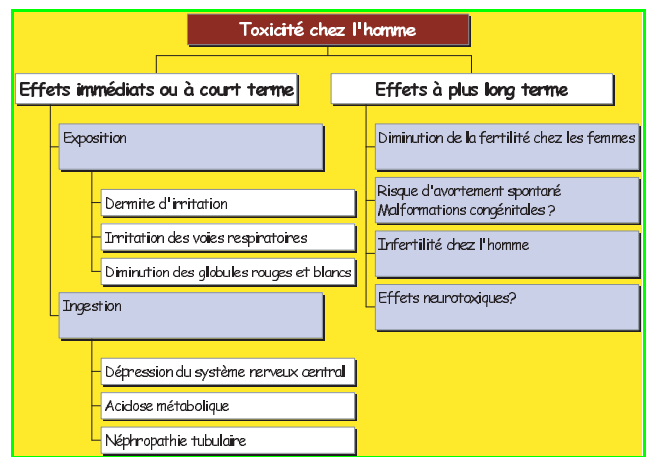


Figure 2 - Toxicité des éthers de glycol chez l'Homme.

dermite d'irritation en cas de contact répété et certains d'entre eux sont fortement irritants en cas de contact cutané prolongé. Le faible pouvoir irritant des éthers de glycol en cas de contact bref explique qu'ils soient fréquemment employés pour le nettoyage des mains en milieu professionnel, lorsque les travailleurs ne sont pas informés du risque toxique résultant de leur forte absorption percutanée. A forte concentration, les vapeurs ou les aérosols d'éthers de glycol sont également irritants pour les voies respiratoires. En pratique, en raison de la faible volatilité de ces solvants, les expositions à de fortes concentrations atmosphériques sont inhabituelles.

Les cas publiés d'intoxication aiguë par des éthers de glycol sont très peu nombreux et ne concernent que l'EGME, l'EGEE et l'EGBE. L'intoxication aiguë systémique fait généralement suite à une ingestion. Elle se traduit par une dépression du système nerveux central, une acidose métabolique et une néphropathie tubulaire.

Chez les personnes exposées en milieu professionnel aux éthers de glycol (EGME, EGEE et leurs acétates), plusieurs travaux ont rapporté une diminution du nombre de globules blancs et des anémies traduisant un effet sur la moelle osseuse. Ce phénomène disparaît généralement à l'arrêt de l'exposition. Une surveillance hématologique régulière des travailleurs exposés à ces deux éthers de glycols et à leurs acétates est donc recommandée.

Les résultats des études épidémiologiques suggèrent un lien entre l'infertilité masculine et l'exposition professionnelle à l'EGME et l'EGEE.

Une diminution de la fertilité a été rapportée chez les femmes travaillant dans les secteurs les plus exposés aux éthers de glycol. D'après deux grandes études menées aux États-Unis à la fin des années 1980 dans l'industrie des semi-conducteurs, une exposition professionnelle à certains éthers de glycol augmenterait le risque d'avortement spontané. Les études sur les malformations congénitales sont encore trop peu nombreuses pour pouvoir conclure à un risque lié à l'exposition de ces produits.

Les quelques études épidémiologiques concernant la relation entre exposition aux éthers de glycol et cancer chez l'Homme n'apportent pas aujourd'hui de résultats convaincants sur un effet cancérigène de ces solvants. Cependant, compte tenu des résultats obtenus chez la souris avec l'EGBE, il est important de poursuivre les recherches expérimentales, cliniques et épidémiologiques sur les effets à long terme des éthers de glycol.

Enfin, quelques publications de cas rapportent des effets neurotoxiques pour deux éthers de l'éthylène glycol, l'EGME et l'EGPhE, qui ont induit des troubles mentaux organiques chez des individus exposés. Il n'y a pas d'observation publiée avec les autres éthers de glycol et les données expérimentales concernant la neurotoxicité de ces solvants sont encore très peu nombreuses.

Mesures de protection du consommateur

Des restrictions appliquées en Europe (directive 76/769) concernent l'usage et le marché des deux éthers de glycol, EGME et EGEE, et de leurs acétates, considérés comme présentant une toxicité pour la reproduction (classe 2). En France, trois décrets ont interdit leur utilisation dans les produits à usage domestique, ainsi que dans les cosmétiques et les médicaments.

Selon une enquête récente de la Direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF), les deux éthers de glycol interdits ne sont pas retrouvés dans les produits d'usage courant susceptibles de contenir des éthers de glycol. Les produits utilisés par le consommateur et pouvant contenir des éthers de glycol sont, en dehors des peintures, les produits d'entretien ménager (EGBE, DEGBE), les produits cosmétiques (EGBE, DEGBE et 2PG1ME principalement dans les produits de coloration capillaire et DEGEE dans les crèmes pour le corps) et quelques spécialités pharmaceutiques (EGPhE, DEGEE).

A la suite de l'expertise collective Inserm publiée en 1999*, un plan d'action a été lancé afin de renforcer la réglementation protégeant les travailleurs à l'égard de tous les agents toxiques pour la reproduction et de protéger les femmes enceintes et les enfants à naître. Ce plan d'action propose également de faire réviser la classification européenne de certains éthers de glycol. D'ores et déjà, le ministère de la Santé souhaite interdire, en plus de l'EGME et l'EGEE (et leurs acétates), les éthers de glycol EGDME, DEGDME et TEGDME (actuellement autorisés à une concentration inférieure à 0,5 %) dans les préparations destinées aux consommateurs et dont l'usage occasionne des expositions importantes, notamment dans les peintures et vernis. L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) interdira également ces trois

éthers de glycol dans les produits de santé et les produits cosmétiques.

Note et bibliographie

- * A la demande du ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement et du ministère de l'Emploi et de la Solidarité, l'Inserm a réalisé en 1999 une expertise collective « *Éthers de glycol, quels risques pour la santé ?* ». Le groupe d'experts était composé de Martin Catala (groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris), Sylvaine Cordier (Inserm U 435, Rennes), Marcel Delaforge (CEA Saclay, Gif-sur-Yvette), Pierre Fenaux (hématologie, Hôpital Beaujon, Clichy), Robert Garnier (centre anti-poison, Hôpital Fernand Widal, Paris), Luc Multigner (Inserm U 435), Isabelle Rico-Lattes (CNRS UMR 5623, Toulouse), Paule Vasseur (Centre des Sciences de l'Environnement, Metz). La coordination scientifique a été assurée par le Centre d'expertise collective (SC14) de l'Inserm.
- Expertise collective Inserm. Éthers de glycol, quels risques pour la santé ?*, éditions Inserm, 1999.
- Cordier S., Bergeret A., Goujard J., Ha M.C., Ayme S., Congenital malformation and maternal occupational exposure to glycol ethers. Occupational Exposure and Congenital Malformations Working Group, *Epidemiology*, 1997, 8, p. 35.
 - Cordier S., Szabova E., Fevotte J., Bergeret A., Plackova S., Mandereau L., Congenital malformations and maternal exposure to glycol ethers in the Slovak Republic, *Epidemiology*, 2001, 12, p. 592.
 - ECETOC Working Group, Technical report, The toxicology of glycol ethers and its relevance to man, *Eur. Centre Ecotoxicol Toxicol. of Chemicals*, 1995, 64, p. 1.
 - Huel G., Mergler D., Bowler R., Evidence for adverse reproductive outcomes among women microelectronic assembly workers, *Br. J. Ind. Med.*, 1990, 47, p. 400.
 - Lorente C., Cordier S., Bergeret A., de Walle H.E., Goujard J., Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group, *Scand. J. Work. Environ Health*, 2000, 26, p. 137.
 - Glycols and glycol ethers/synthetic polymers/organic sulfur compounds/organic phosphates, *Patty's Toxicology*, vol. 7, E. Bingham, B. Cohrssen, C.H. Powell (eds), Wiley, 2001.
 - Vincent R., Cicoletta A., Poirot P., Dosage des éthers de glycol dans les atmosphères de travail, *Analysis*, 1990, 18, p. 591.



Jeanne Etienne

est directeur de recherche à l'Inserm et directeur du Centre d'expertise collective de l'Inserm*.

* Centre d'expertise collective Inserm SC14, Faculté de médecine Xavier Bichat, 16 rue

Henri Huchart, BP 416, 75870 Paris Cedex 18.

Tél. : 01 44 85 61 65. Fax : 01 44 85 61 68.

Courriel : etienne@bichat.inserm.fr

Nouvelles cibles moléculaires dans les traitements des cancers

Fabien Calvo et Heriberto Bruzzoni-Giovanelli

Abstract

New molecular targets in cancer treatment

Our knowledge of cancer biology has considerably increased these last two decades, especially in tumour cell biology and cellular microenvironment. The identification of the molecular effectors and regulators involved in these regulations allowed to recently develop new pharmacological approaches targeting tumour growth factors (such as VEGF), their receptors (EGFR, HER2, VEGFR...), their enzymatic activities, signal transduction pathway molecules, transforming neo-proteins (fused or altered proteins), or normal proteins involved in deregulated tumour-normal microenvironment interactions. Some of these new drugs have brought a real therapeutic benefit, mainly in association with classical cytotoxic drugs. These targeted agents have a low to major therapeutic index often needing to precisely define the cancer patients who should benefit from their use. Therefore, it exists an important space for the development of new cytotoxic drugs, active against tumours multiresistant to classical therapies, with more acceptable administration modalities, such as oral formulations, and with reduced toxicities.

Mots-clés

Anticancéreux, agents cytotoxiques, oncogènes, angiogenèse, apoptose.

Key-words

Anticancer agents, cytotoxic drugs, oncogenes, angiogenesis, apoptosis.

Les traitements du cancer se sont développés depuis un demi-siècle et ont vécu plusieurs révolutions. La première, empirique, qui débute en 1950, voit l'obtention des premières rémissions complètes dans des leucémies aiguës de l'enfant par l'utilisation des glucocorticoïdes associés à des antimétabolites comme le Méthotrexate ou le Mercaptopurine. Très rapidement se mettent en place les tests biologiques qui vont permettre de tester l'efficacité de nouveaux

Tableau I - Modèles de tumeurs murines syngéniques les plus couramment utilisés.

| | |
|---------|-----------------------|
| B16 | mélanome |
| Co 38 | cancer du colon |
| Dunning | cancer de la prostate |
| Lewis | carcinome |
| L1210 | leucémie |
| P388 | leucémie |

médicaments, essentiellement des lignées cellulaires transplantables dérivées de tumeurs expérimentales spontanées ou chimio-induites chez la souris (voir *tableau I*). Ces tumeurs sont injectées en intra-péritonéal ou par voie intraveineuse chez des souris syngéniques, elles ont une cinétique de croissance extrêmement rapide, tuant

les animaux en quelques jours ou semaines. L'efficacité des nouvelles drogues est testée essentiellement sur la survie des animaux (« increased life span », ILS).

Ces tests, encore très largement utilisés, ont permis la sélection de nombreux médicaments cytotoxiques (voir *tableau II*) largement utilisés jusqu'à ce jour et très efficaces chez l'Homme. Leur inconvénient majeur est d'identifier des médicaments actifs sur des tumeurs à temps de doublement rapide, très différentes ainsi de la grande majorité des tumeurs humaines dont la composante proliférative est en équilibre partiel avec une composante différenciée dont la destinée est l'apoptose. De plus, ces traitements n'ont pas de spécificité vis-à-vis des cellules humaines.

Au début des années 70, un réel effort international a été engagé visant à identifier les bases biologiques du cancer et

ainsi, des cibles moléculaires plus spécifiques aux cellules humaines. A partir de travaux menés sur des rétrovirus transformants animaux, cet effort allait aboutir en deux décennies à l'identification des oncogènes cellulaires humains, à leur caractérisation biologique et fonctionnelle, et à la définition de nouvelles approches thérapeutiques ciblées à la fin des années 90. Dans le même temps, des travaux fondamentaux utilisant des systèmes modèles comme la levure ou la drosophile permettaient le démantèlement progressif des étapes du cycle cellulaire et de la mort cellulaire programmée (ou apoptose) et de leur régulation.

En parallèle, les années 70 à 80 voient se développer de nouvelles manières d'évaluer l'efficacité des médicaments anticancéreux en utilisant des techniques de clonogénicité (croissance des cellules tumorales en agar mou évaluant leurs potentialités d'auto-renouvellement) et par la croissance de tumeurs humaines (lignées cellulaires ou tumeurs fraîches) *in vitro* (panel de lignées du National Cancer Institute, voir *tableau III*); et *in vivo*, après transplantation chez la souris immunologiquement tolérante (souris nude ou souris Scid). L'évaluation des médicaments

Glossaire

Angiogenèse

Processus assurant la vascularisation d'un tissu à partir de bourgeonnement d'un vaisseau préexistant.

Mitochondrie

Organite intracellulaire contenant de l'ADN de l'ARN et des protéines impliquées dans la production énergétique de la cellule et la régulation de l'apoptose.

Néoangiogenèse tumorale

Formation de nouveaux vaisseaux sanguins permettant les échanges en oxygène et nutriments dans la tumeur, indispensable au-delà d'une taille de 100 microns.

Tumeurs murines syngéniques

Tumeurs survenant chez des rongeurs de même fond génétique.

Tableau II - Principaux médicaments anticancéreux utilisés en thérapeutique humaine.

| Alcaloïdes et agents antimicrotubuline |
|--|
| Inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline : Vincristine, Vinblastine, Navelbine Inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline : Paclitaxel, Docetaxel |
| Agents antimétabolites |
| Antifolates : Méthotrexate, Trimetrexate et Raltitrexed Antipyrimidines : Fluorouracile, Capecitabine, Eniluracile Cytosine-arabinoside, Gemcitabine 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, Fludarabine, cladribine |
| Agents alkylants et apparentés |
| Moutardes azotées : Cyclophosphamide, Ifosfamide, Melphalan, Chlorambucil Aziridines : Thiotepa, Mitomycine C Alkyls sulfonates: Busulphan Nitrosourées : BCNU, CCNU, MéthylCCNU Hydrazines et triazines : Procarbazine, Dacarbazine et Temozolomide Dérivés du platine : Cis Platine, Carboplatine et Oxaliplatine |
| Agents interagissant avec les topoisomérases |
| Epipodophyllotoxines : Etoposide, Téniposide Analogues de la Camptothécine : Camptothécine, Irinotecan, Topotecan Anthracyclines et composés voisins : Doxorubicine, Epirubicine, Idarubicine, Mitoxantrone, Actinomycine D |
| Autres molécules |
| Bléomycine, Hydroxyurée, L-Asparaginase |

Tableau III - Crible des lignées cellulaires humaines du National Cancer Institute (NCI-USA).

| Leucémies | Cancers bronchiques non à petites cellules | Cancers à petites cellules bronchiques | Cancers du colon | Cancers du système nerveux central | Mélanomes | Cancers de l'ovaire | Cancers du rein | Cancers de la prostate | Cancers du sein |
|------------|--|--|------------------|------------------------------------|-----------|---------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| CCRF-CEM | A549/ATCC | DMS 114 | COLO 205 | SF-268 | LOX IMVI | IGROV1 | 786-0 | PC3 | MCF7 |
| HI-60 (TB) | EKVX | DMS 273 | DLD-1 | SF-295 | MALME-3M | OVCAR-3 | A498 | DU-145 | MCF7/ADR-RES |
| K.562 | HOP-18 | | HCC-2998 | SF-539 | M14 | OVCAR-4 | ACHN | | MDA-MB231/ATCC |
| OLT-4 | HOP-92 | | HCT-116 | SNB-19 | M19-MEL | OVCAR-5 | CAKI-1 | | MDA-N |
| RPMI-8226 | NCI-H226 | | HCT-15 | SNB-75 | SK-MEL.2 | OVCAR-8 | RXF-393 | | BT 549 |
| SR | NCI-H23 | | HT29 | SNB-78 | SK-MEL.28 | SK-OV.3 | RXF-631 | | T470 |
| | NCI-H322M | | KM12 | U251 | SK-MEL.5 | | SN12C | | |
| | NCI-H460 | | KM201-2 | XF 498 | UACC-257 | | TK-10 | | |
| | NCI-H522 | | SW-620 | | UACC-62 | | UO-31 | | |

se fait alors sur des tumeurs à temps de doublement plus long, voisin de celui des tumeurs humaines *in situ*. Des techniques plus sophistiquées ont été plus récemment développées chez ces souris modèles, permettant d'évaluer l'effet des traitements sur l'histoire naturelle des cancers par l'implantation orthotopique (dans le tissu d'origine) de tumeurs humaines et l'observation de leur évolution métastatique dans un micro-environnement tissulaire et vasculaire proche de la physiopathologie humaine.

Enfin, des facteurs liés à l'hôte, comme l'immunité, ou plus récemment le rôle du micro-environnement tumoral dont la vascularisation des tumeurs, sont des axes de recherche médicamenteuse car ils sont théoriquement moins susceptibles de dérives génétiques sous la pression thérapeutique. Ces cibles sont devenues essentielles dans les stratégies de développement des laboratoires pharmaceutiques.

Globalement, les cibles moléculaires jusqu'en 1990 étaient essentiellement les nucléotides, l'ADN, l'ARN, la réplication

et la transcription, le développement des quinze dernières années se faisant vers le ciblage des protéines nucléaires, cytoplasmiques ou membranaires impliquées dans les cascades de la transduction des signaux, des récepteurs membranaires aux protéines de régulation du cycle cellulaire.

Les cibles classiques des médicaments anticancéreux

Ce champ de recherche est encore très productif, avec le développement de nombreux analogues de médicaments anciens (*figure 1*) dont le bénéfice est lié :

- à la modalité d'administration, la voie orale supplante la voie parentérale (Capecitabine orale, prodrogue du fluorouracile injectable) [1],
- à une efficacité et à une toxicité différentes par rapport au médicament référent (Oxaliplatine actif sur les tumeurs digestives et sans toxicité rénale, différent du Cis Platine) [2],

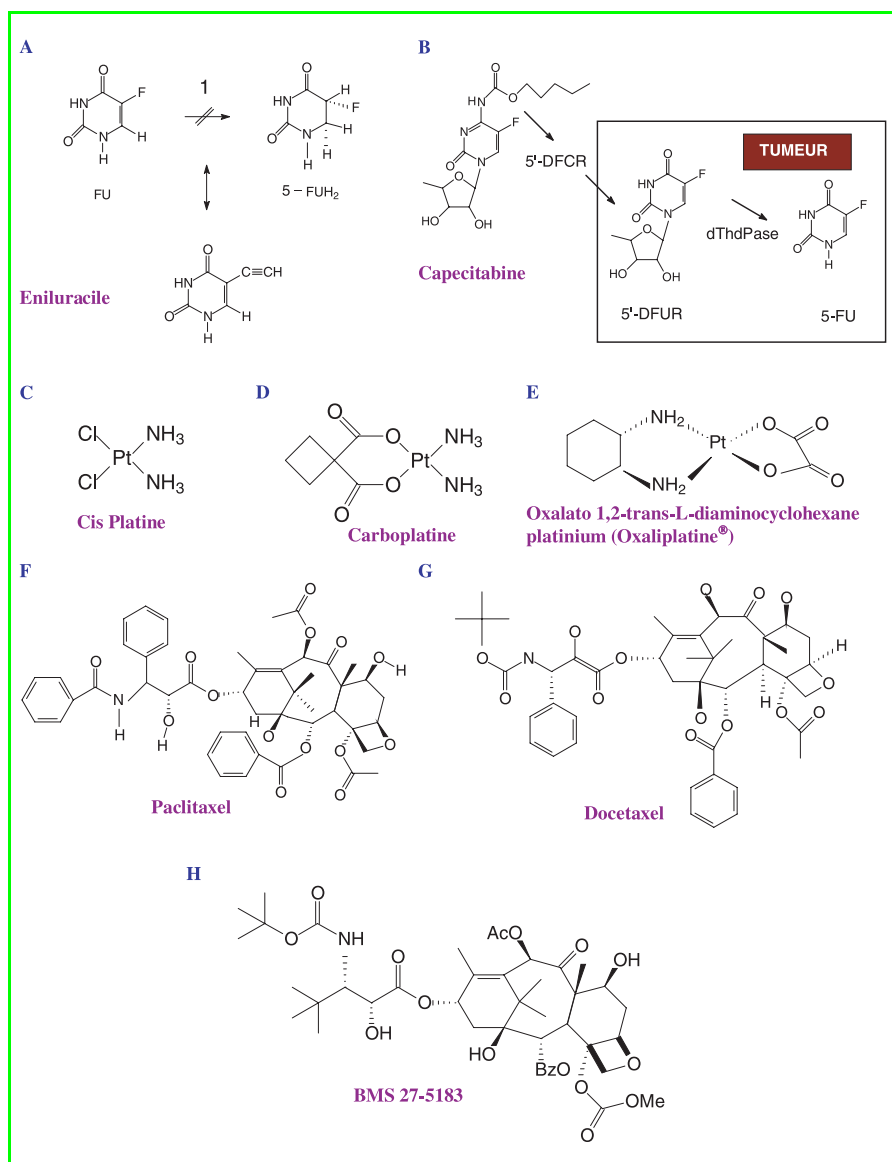


Figure 1 - Nouveaux analogues de produits anciens.

A : le fluorouracile (FU), normalement dégradé au niveau du tube digestif, peut être administré par voie orale en utilisant un inhibiteur de la dihydropyrimidine déhydrogénase (l'Eniluracile), empêchant ainsi son catabolisme. **B :** la capecitabine est un prodrug du fluorouracile qui s'administre par voie orale.

C : le cisplatine est un agent responsable d'adduits de l'ADN ayant une spécificité marquée pour les tumeurs embryonnaires et les cancers de l'ovaire et une toxicité rénale importante. Ses analogues, le carboplatine (**D**) et l'oxaliplatine (**E**) ont des spécificités tumorales et des toxicités différentes.

F et G : les deux premières taxanes, docétaxel et paclitaxel, ont été un apport majeur dans la chimiothérapie anticancéreuse. Leur toxicité après administration intraveineuse a fait développer de nombreuses formes orales en expérimentation clinique dont le BMS 27-5183 (**H**).

- à de nouveaux antimétabolites ayant une activité thérapeutique originale (Gemcitabine), à de nouveaux agents antimicrotubules à activité majeure (nouvelles taxanes et épithilones [3-4], Navelbine et dérivés), à de nouveaux alkylants (Acronycine et dérivés), à de nouvelles antitopoisomérases...

Les médicaments ciblant les protéines du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est sous le contrôle de nombreuses protéines dont la fonction est de permettre la division des cellules, dont les cyclines, les activateurs de ces cyclines, les kinases dépendantes des cyclines (CDK), et leurs inhibiteurs. A chaque étape du cycle cellulaire, il existe des

points de contrôle de leur bon déroulement qui sont dérégulés dans les proliférations tumorales, ainsi que l'expression de certaines cyclines. Une attention particulière a été portée ces dernières années au ciblage moléculaire de ces régulateurs, plus particulièrement aux inhibiteurs de CDK qui agissent pour l'essentiel en bloquant le site ATP par compétition [5-6]. Plusieurs composés dont le Flavopiridol et la Roscovitine (CYC202 qui co-cristallise avec la CDK2) sont en cours d'essai clinique (figure 2). Dans un cadre voisin, la protéine p53 est une des protéines les plus fréquemment mutées dans les cancers humains. La forme sauvage non mutée de p53 est induite dans le cas de lésions de l'ADN et s'accompagne de l'arrêt du cycle cellulaire suivi de sa reprise en cas de réparation, et sinon, de l'induction de la mort cellulaire. Les mutants de p53 n'ont pas d'arrêt du cycle cellulaire et semblent responsables de l'accumulation de lésions non réparées et d'une mutagenicité accrue. Des tentatives thérapeutiques visent soit à réintroduire dans les cellules tumorales une protéine p53 sauvage ou des peptidomimétiques, soit à rétablir une conformation sauvage dans la protéine mutée, ou encore à augmenter la concentration de la protéine sauvage intracellulaire en inhibant son interaction avec la protéine mdm-2 responsable de sa dégradation [7-9]. Enfin, le premier médicament inhibant le protéasome (complexe de dégradation des protéines) est actuellement en cours d'essai clinique (Velcade®).

Les médicaments inducteurs de l'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui fait intervenir des régulations complexes membranaires et cytoplasmiques aboutissant à la perméabilisation de la mitochondrie. L'espace membranaire de la mitochondrie contient des molécules solubles dont la libération vers le noyau ou le cytoplasme aboutit à la mort cellulaire [10]. La perméabilité de la mitochondrie est régulée par un équilibre fin des protéines de la famille bcl-2 à activité pro-(protéines BH3 et bax) ou anti-apoptotiques (bcl-2 et bcl-Xl). De nombreux agents anticancéreux classiques agissent sur la mitochondrie comme les épipodophylotoxines (VP-16), les taxanes et les analogues nucléosidiques. Plus récemment, de nouvelles drogues ont démontré leur impact mitochondrial comme le trioxyde d'arsenic (actif dans la leucémie promyélocytaire), des activateurs du récepteur gamma de l'acide rétinolique, certains dérivés de la vitamine E, des inhibiteurs de la céramide synthétase, ainsi que l'acide nitrique (NO). Le démantèlement des mécanismes associés à ces régulations a conduit au développement de molécules destinées à restituer ou induire la sensibilité à l'apoptose des cellules cancéreuses. C'est le cas

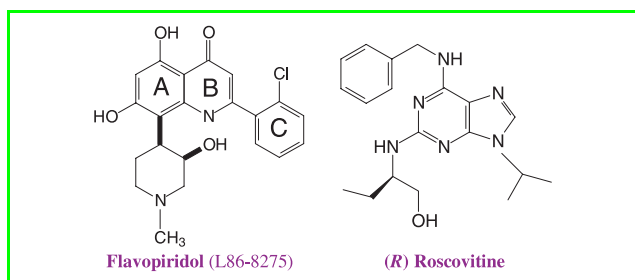


Figure 2 - Flavopiridol et Roscovitine, deux médicaments en cours d'essai thérapeutique inhibant les kinases cycline-dépendantes (CDK).

d'oligonucléotides antisens de bcl-2 (Genasense ou Oblimersen) actuellement en essai clinique de phase 3 et dont les résultats en phase 2 sont encourageants [11]. D'autres molécules sont en développement, incluant des peptides-bloquants mimant les domaines BH3, des petites molécules ciblant le récepteur mitochondrial des benzodiazépines (PK11195) ou d'autres protéines déstabilisant spécifiquement la mitochondrie des cellules tumorales. Enfin, des anticorps monoclonaux ciblant des molécules de membrane, comme la molécule CD20 et actifs dans les proliférations tumorales B (Rituximab), agiraient partiellement en induisant l'apoptose *via* la voie des céramides.

Les agents bloquant la transduction des signaux des récepteurs membranaires à leurs cibles nucléaires

Ce domaine est la retombée la plus précoce des travaux engagés depuis près de trente ans sur les oncogènes cellulaires. Les premiers oncogènes identifiés ont été des récepteurs membranaires dont l'activation par mutation ou par surexpression ont été la cible dans un premier temps d'anticorps monoclonaux murins, puis humanisés et prochainement humains. La première cible a été le proto-oncogène cellulaire HER2/Neu, une molécule de la famille des hérogulines (« human epidermal growth factor receptor family ») [12]. Ce récepteur membranaire à activité tyrosine kinase est amplifié dans environ 20-30 % des cancers du sein et joue un rôle dans leur prolifération, l'immunité locale et l'angiogenèse tumorale. Son ciblage par l'anticorps Herceptin[®] (Roche) dans les tumeurs qui surexpriment HER2 a une efficacité surtout mise en évidence en association avec des cytotoxiques [13]. D'autres anticorps ont été développés depuis, ciblant le récepteur de l'EGF (récepteur du facteur de croissance épithélial, HER1), ou même des anticorps hybrides ciblant HER1 et 2, ou encore les différents récepteurs des VEGF (« vascular endothelial growth factor receptor »), les récepteurs du PDGF (« platelet derived growth factor receptor ») et les récepteurs de l'IGF (« insulin like growth factor receptor ») [14-16]. Leur évaluation dans une grande variété de tumeurs épithéliales est actuellement en cours. Parallèlement aux approches immunologiques par anticorps s'est développé le ciblage des activités tyrosine kinase de ces différents récepteurs de facteurs de croissance. Ces médicaments interagissent avec les sites ATP des kinases et ont une spécificité variable. La meilleure traduction thérapeutique est l'imatinib (Glivec[®]) (figure 3), qui cible la kinase intracellulaire de la protéine de fusion bcr-abl, née de la translocation 9-22

(chromosome Philadelphie) dans la leucémie myéloïde chronique. L'inhibition de l'activité kinase aboutit à la mort des cellules ayant la kinase bcr-abl et à des rémissions complètes cytogénétiques et moléculaires de la maladie [17]. D'autres kinases sont ciblées en thérapeutiques, incluant c-kit, VEGFR, PDGFR, et surtout l'EGFR (Iressa[®]), avec des résultats cliniques prometteurs [14, 18] (figure 3). La transduction des signaux a été également bien évaluée sous l'aspect pharmacologique avec le développement de nombreuses molécules inhibant la farnésylation de la protéine ras (qui permet l'encrage de cette protéine à la membrane) et bloquant ainsi l'activation des signaux de phosphorylation aboutissant à la multiplication cellulaire [19]. Plus en aval, des travaux sont menés sur des molécules susceptibles de bloquer des activités transcriptionnelles de c-jun, NFκB, STAT, ou en modifiant la méthylation de gènes dont l'expression est altérée dans les cancers.

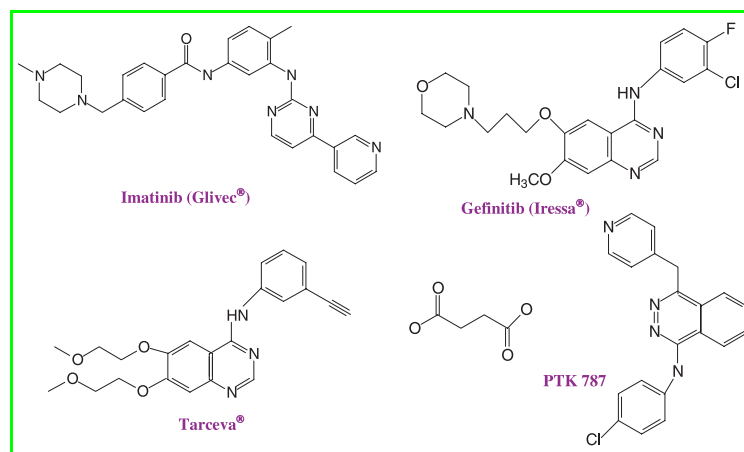


Figure 3 - Quatre inhibiteurs de tyrosine kinases.

Imatinib est le premier à avoir induit des rémissions complètes moléculaires dans la leucémie myéloïde chronique en inhibant la kinase bcr-abl. Gefitinib et Tarceva[®] sont des inhibiteurs spécifiques de la kinase du récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR) et PTK-787 est un inhibiteur spécifique du récepteur du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGFR).

Les cibles vasculaires et l'inhibition de la formation des métastases

Cet aspect de la thérapeutique est logiquement celui qui porte les plus grands espoirs, l'invasion et la métastase étant les paramètres les plus péjoratifs de la maladie cancéreuse [20]. La cellule endothéliale maligne n'ayant pas le caractère « transformé », sa résistance à un effet thérapeutique devrait être moindre. Les phénomènes de néo-angiogenèse tumorale passent par la transcription et la sécrétion par les cellules tumorales sous l'effet de l'hypoxie, de facteurs angiogéniques tels le VEGF-A. Ces facteurs vont altérer la perméabilité des vaisseaux environnants et permettre la libération de protéases matricielles, la prolifération endothéliale, la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Celles-ci forment progressivement des néo-vaisseaux pénétrant la tumeur, lui apportant les nutriments nécessaires à sa croissance et permettant aux cellules les plus invasives de passer dans la circulation et de coloniser d'autres sites. La connaissance de ces phénomènes a amené au développement de molécules destinées à inhiber chacune de ces étapes :

- la **synthèse du VEGF** par des inhibiteurs du facteur de transcription HIF1 (« hypoxia inducible growth factor-1 »)

[21], par des inhibiteurs du récepteur de l'EGF, du récepteur HER2, du récepteur de l'IGF, des ribozymes (ARN catalytiques du messager de VEGF), des inhibiteurs de cyclooxygénase de type 2 [22] ;

- **la sécrétion du VEGF** par des petites molécules (naturelles ou de synthèse) ou ses **effets sur la perméabilité vasculaire** (angiopoiétine 1 antagoniste des effets de VEGF) [23] ;

- **son action** par des anticorps monoclonaux (Bevacizumab®) [24], anti VEGF-A, ou par des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur du VEGF, ou encore des inhibiteurs spécifiques de la kinase du VEGFR (figure 3) ;

- **ses effets indirects médiés par les inhibiteurs des métalloprotéases matricielles (MMPi)** qui jouent un rôle crucial dans le remodelage périvasculaire permettant la migration des cellules endothéliales [25]. Ces cibles jugées très intéressantes au cours des expérimentations animales se sont révélées décevantes jusqu'alors chez l'Homme, très vraisemblablement en raison d'objectifs cliniques mal évalués et trop ambitieux. Une réévaluation de ces MMPi est sûrement nécessaire avec une méthodologie plus élaborée (identification de paramètres angiogéniques préalables, cliniques biologiques et fonctionnels par IRM et TEP-Scan). Ces effets indirects impliquent également **l'activation de l'intégrine alpha v-bêta 3** qui est une cible critique d'anticorps monoclonaux et des petites molécules, bloquant ainsi chez l'animal l'angiogenèse et la diffusion métastatique. De nombreux inhibiteurs naturels de l'angiogenèse comme l'angiotastine et l'endostatine semblent être actifs sur le récepteur de l'intégrine alpha v-bêta 3 et sont donc pharmacologiquement très intéressants.

Téломérase et inhibiteurs des téломérases

Les télomères sont des séquences répétitives d'ADN (TTAGGG) situées à l'extrémité des chromosomes. Ces séquences jouent un rôle important dans l'intégrité des chromosomes en empêchant les phénomènes de fusion-recombinaisons chromosomiques et dans le vieillissement cellulaire, la perte progressive de ces séquences étant associée à la sénescence des cellules. L'intégrité des télomères est assurée par une enzyme complexe, la téломérase, responsable de la synthèse des séquences répétitives. L'activité téломérase est conservée au cours de l'immortalisation des cellules *in vitro* et dans la très grande majorité des tissus cancéreux ; elle fait donc considérer l'inhibition de cette enzyme comme une stratégie thérapeutique. Des dérivés de porphyrines cationiques et des oligonucléotides interagissant avec des G quadruplets des téломérases sont actuellement testés en préclinique [26-27].

Conclusion

Le développement de nouveaux médicaments ciblant des phénomènes biologiques identifiés et spécifiques des cancers est en pleine expansion. Il s'agit du domaine le plus actif dans l'industrie pharmaceutique et le monde académique. Ses retombées prévisibles portent sur de nombreux domaines thérapeutiques comme l'angiogenèse, le diabète, l'athérome, la cicatrisation, la régénération

tissulaire... L'un des principaux obstacles à contourner réside dans l'identification préalable au traitement des populations de patients susceptibles de bénéficier thérapeutique, afin de ne pas diluer leurs effets spécifiques.

Références

- [1] Blesch K.S., Gieschke R., Tsukamoto Y., Reigner B.G., Burger H.U., Steimer J.L., Clinical pharmacokinetic/pharmacodynamic and physiologically based pharmacokinetic modeling in new drug development: the capecitabine experience, *Invest New Drugs*, **2003**, *21*(2), p. 195.
- [2] O'Dwyer P.J., Johnson S.W., Current status of oxaliplatin in colorectal cancer, *Semin. Oncol.*, **2003**, *30*(3 suppl. 6), p. 78.
- [3] Ferlini C., Ojima I., Distefano M., Gallo D., Riva A., Morazzoni P., Bombardelli E., Mancuso S., Scambia G., Second generation taxanes: from the natural framework to the challenge of drug resistance, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, **2003**, *3*(2), p. 133.
- [4] Lavelle F., New taxanes and epothilone derivatives in clinical trials, *Bull. Cancer*, **2002**, *89*(4), p. 343.
- [5] Knockaert M., Greengard P., Meijer L., Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*(9), p. 417.
- [6] Ruetz S., Fabbro D., Zimmermann J., Meyer T., Gray N., Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors, *Curr. Med. Chem., Anti-Canc. Agents*, **2003**, *3*(1), p. 1.
- [7] Wang H., Nan L., Yu D., Lindsey J.R., Agrawal S., Zhang R., Anti-tumour efficacy of a novel antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligonucleotide in human colon cancer models: p53-dependent and p53-independent mechanisms, *Mol. Med.*, **2002**, *8*(4), p. 185.
- [8] Asher G., Lotem J., Sachs L., Kahana C., Shaul Y., Mdm-2 and ubiquitin-dependent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*(20), p. 13125.
- [9] Shimada H., Liu T.L., Ochiai T., Shimizu T., Haupt Y., Hamada H., Abe T., Oka M., Takiguchi M., Hiwasa T., Facilitation of adenoviral wild-type p53-induced apoptotic cell death by overexpression of p33(ING1) in T.Tn human esophageal carcinoma cells, *Oncogene*, **2002**, *21*(8), p. 1208.
- [10] Zamzami N., Kroemer G., Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization - The (w)hole story?, *Curr. Biol.*, **2003**, *13*(2), p. R71-3.
- [11] Bettaieb A., Dubrez-Daloz L., Launay S., Plenchette S., Rebe C., Cathelin S., Solary E., Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensitisation of tumour cells, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, **2003**, *3*(4), p. 307.
- [12] Witton C.J., Reeves J.R., Going J.J., Cooke T.G., Bartlett J.M., Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer, *J. Pathol.*, **2003**, *200*(3), p. 290.
- [13] Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2, *N. Engl. J. Med.*, **2001**, *344*(11), p. 783.
- [14] Wakeling A.E., Guy S.P., Woodburn J.R., Ashton S.E., Curry B.J., Barker A.J., Gibson K.H., ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signalling with potential for cancer therapy, *Cancer Res.*, **2002**, *62*(20), p. 5749.
- [15] Ferrara N., Gerber H.P., The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis, *Acta Haematol.*, **2001**, *106*(4), p. 148.
- [16] Thomas A.L., Morgan B., Dreves J., Unger C., Wiedenmann B., Vanhoef U., Laurent D., Dugan M., Steward W.P., Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: PTK787/ZK 222584, *Semin. Oncol.*, **2003**, *30*(3 suppl. 6), p. 32.
- [17] O'Brien S.G., Guilhot F., Larson R.A., Gathmann I., Baccarani M., Cervantes F., Cornelissen J.J., Fischer T., Hochhaus A., Hughes T., Lechner K., Nielsen J.L., Rousselot P., Reiffers J., Saglio G., Shepherd J., Simonsson B., Gratwohl A., Goldman J.M., Kantarjian H., Taylor K., Verhoef G., Bolton A.E., Capdeville R., Druker B.J., Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, *348*(11), p. 994.
- [18] Cappuzzo F., Gregorc V., Rossi E., Cancellieri A., Magrini E., Paties C.T., Ceresoli G., Lombardo L., Bartolini S., Calandri C., de Rosa M., Villa E., Crino L., Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLC, *J. Clin. Oncol.*, **2003**, *21*(14), p. 2658.
- [19] Dinsmore C.J., Bell I.M., Inhibitors of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase-I for antitumour therapy: substrate-based design, conformational constraint and biological activity, *Curr. Top Med. Chem.*, **2003**, *3*(10), p. 1075.
- [20] Singh R.P., Agarwal R., Tumour angiogenesis: a potential target in cancer control by phytochemicals, *Curr. Cancer Drug Targets*, **2003**, *3*(3), p. 205.
- [21] Yeo E.J., Chun Y.S., Cho Y.S., Kim J., Lee J.C., Kim M.S., Park J.W., YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2003**, *95*(7), p. 516.
- [22] Kalgutkar A.S., Zhao Z., Discovery and design of selective cyclooxygenase-2 inhibitors as non-ulcerogenic, anti-inflammatory drugs with potential utility as anti-cancer agents, *Curr. Drug Targets*, **2001**, *2*(1), p. 79.

- [23] Koh G.Y., Kim I., Kwak H.J., Yun M.J., Leem J.C., Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin, *Exp. Mol. Med.*, **2002**, 34(1), p. 1.
- [24] Yang J.C., Haworth L., Sherry R.M., Hwu P., Schwartzentruber D.J., Topalian S.L., Steinberg S.M., Chen H.X., Rosenberg S.A., A randomised trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, 349(5), p. 427.
- [25] Singh S., Barrett J., Sakata K., Tozer R.G., Singh G., ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis, *Curr. Drug Targets*, **2002**, 3(5), p. 359.
- [26] Alberti P., Lacroix L., Guittat L., Helene C., Mergny J.L., Nucleic acids as targets for antitelomerase agents, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2003**, 3(1), p. 23.
- [27] Mergny J.-L., Lacroix L., Teulade-Fichou M.-P., Hounsou C., Guittat L., Hoarau M., Arimondo P.B., Vigneron J.-P., Lehn J.-M., Riou J.-F., Garestier T., Helene C., Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98(6), p. 3062.



F. Calvo

Fabien Calvo

est professeur de pharmacologie à l'UFR médicale Lariboisière-Saint-Louis, praticien hospitalier à l'Hôpital Saint-Louis et directeur du Centre d'Investigations Cliniques Inserm/AP-HP 9504 et de l'équipe Inserm EMI 334*.



H. Bruzzoni-Giovanelli

Heriberto Bruzzoni-Giovanelli

est professeur associé de l'Université Paris 7 et médecin-attaché à l'hôpital Saint-Louis, Paris.

* Centre d'Investigations Cliniques (CIC Inserm-AP-HP 9504) et Laboratoire de Pharmacologie (Inserm EMI 334), Hôpital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75465 Paris Cedex 10.

Tél. : 01 42 49 94 94. Fax : 01 49 49 93 97.

Courriel : fabien.calvo@sls.ap-hop-paris.fr

Devenez Hygiéniste du travail et de l'environnement

L'Institut d'Hygiène Industrielle et de l'Environnement (IHIE) du Cnam vous propose une formation multidisciplinaire validée par un diplôme (niveau Bac+5) du Conservatoire national des arts et métiers (Cnam).

C'est une formation professionnalisante de 1363 heures comprenant :

- Des enseignements théoriques et pratiques organisés en 5 modules capitalisables totalisant 663 heures et dispensés par des enseignants universitaires et professionnels,
- Une mission en entreprise (stage pratique) de 700 heures assurant un bon apprentissage de la mise en œuvre des connaissances acquises.

Niveau requis pour accéder à la formation Hyten de l'IHIE :

- Bac + 4 scientifique ou technique minimum, ou
- Bac + 2 scientifique et validation des acquis de l'expérience.

Renseignements et inscriptions :

Cnam - Ihie Nord

Avenue des Facultés
80025 AMIENS cedex 01
Tél. 03 22 33 65 68
dossanto@cnam.fr

Cnam - Ihie Ouest

122 rue de Frémur
BP 50135
49001 ANGERS cedex 01
Tél. 02 41 66 10 60
ihie@cnam-paysdelaloire.fr

Cnam - Ihie Rhône Alpes

181 av. J. Jaurès
BP 7058
69348 LYON cedex 07
Tél. 04 78 61 95 62
Catherine.ygnace@cnam.fr

Cnam - Ihie Paca

Place des Abattoirs,
360 Chemin de la Madrague Ville,
13344 Marseille Cdx 15
Tél. 04 91 60 79 02
cosserat@cnam.fr

Cnam - Ihie Paris

292 rue St-Martin
75141 PARIS Cedex 141
Tél. 01 53 01 80 62
ihie@cnam.fr
<http://www.cnam.fr/instituts/ihie>



La chimie au service du patient

La chimie est au cœur de la vie ; elle est le fondement du fonctionnement du vivant. De tout temps, l'Homme a eu recours à la chimie, à la fois pour accéder à la connaissance et pour réaliser des progrès médicaux. Car, au-delà d'une aide à la compréhension des mécanismes de la vie, la chimie permet aussi de concevoir des outils pour prévenir, diagnostiquer et traiter les pathologies. Tel est le formidable enseignement de cet ouvrage collectif dont les auteurs, experts biologistes, physiciens et chimistes, nous rendent compte de la place charnière de la chimie dans les sciences médicales.

Les atouts de la chimie sont mis à profit pour élucider la structure de molécules biologiques, pour comprendre les fonctions et les mécanismes de régulation des systèmes biologiques, et les dérèglements qui conduisent aux pathologies. Quel biologiste n'a pas eu recours à la chimie pour étudier les organes, les tissus, les cellules, les gènes, les systèmes biologiques et ses pathologies ? Quelle discipline médicale ne fait pas appel aux outils et aux concepts de la chimie pour diagnostiquer et traiter les pathologies ?

L'apport de la chimie permet de plus en plus de mettre des outils et des technologies de pointe à la disposition des médecins et des patients. Elle permet d'élaborer de nouvelles molécules – parfois inexistantes à l'état naturel – et d'optimiser le diagnostic et les soins. Imagerie médicale, rayonnements ionisants, polymères de synthèse, synthèse chimique de molécules thérapeutiques et de matériaux moléculaires, nanotechnologies pour la vectorisation de médicaments... Les exemples ne manquent pas qui témoignent des enjeux considérables de l'apport de la chimie aux sciences médicales. Et toutes les maladies sont concernées, des plus fréquentes – maladies cardiovasculaires, cancers, maladies neurodégénératives, diabète, maladies infectieuses – aux plus rares.

L'Inserm, au cœur du dispositif de la recherche médicale en France, favorise depuis toujours ses interactions avec les chimistes. Que ce soit dans le domaine de la recherche fondamentale ou en recherche clinique et thérapeutique, nombreuses sont les études faisant appel à la chimie. Des

efforts sont réalisés actuellement pour promouvoir l'interface chimie-biologie. En 2003, nous avons mis en place à l'Inserm une structure d'évaluation et d'animation de la recherche dédiée spécifiquement à cet objectif. La collaboration entre nos biologistes et les chimistes du département des sciences chimiques du CNRS, en particulier, se renforce activement. Ainsi, dans le cadre de l'action thématique concertée « Médicaments et vectorisation » de notre institut, nous répertorions l'ensemble des cibles biologiques étudiées dans nos laboratoires en vue de créer une « cibloteque ». L'objectif est de favoriser les rapprochements entre les « détenteurs » de ces systèmes biologiques et les chimistes du CNRS qui disposent de chimiothèques. Parmi les autres initiatives récentes de l'Inserm, citons le lancement d'un appel d'offre pour la mise en œuvre de techniques de criblage rapide de molécules. En parallèle, l'Institut des maladies rares, auquel l'Inserm est associé, propose aux scientifiques une aide au développement de stratégies de criblage ; il favorise leur accès aux banques de molécules et aux plates-formes de criblage existant dans notre pays.

Autant d'initiatives qui devraient se traduire par le développement de nouvelles interactions fructueuses entre chimistes et biologistes, et par l'abolition définitive de la frontière qui sépare les deux communautés. Deux conditions essentielles au développement de la connaissance et à l'essor de l'innovation médicale.



Professeur Christian Bréchet
Directeur général de l'Inserm

Ce texte a été rédigé avec la collaboration de Brigitte Amiranoff, directeur de recherche Inserm.