

THESE D'EXERCICE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 22 Octobre 2019

Par Alexis Pruvost

**NOUVELLES APPROCHES DE MODULATION DES
POINTS DE CONTROLE DE L'IMMUNITE PAR LES
PETITES MOLECULES EN ONCO-IMMUNOLOGIE**

Membres du jury :

Président : Pr. Rébecca Deprez-Poulain

Assesseur : Dr. Christophe Carnoy

Membre extérieur : Dr. Sophie Duquesnoy

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie

Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie

M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie

M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse – B.P. 83 LILLE CEDEX

Tél : 03.21.96.40.40 – Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu l'ensemble des enseignants, présents ou non ce jour, qui ont éclairé mon parcours et contribué à l'aboutissement de mon projet professionnel, de cette passion pour la pharmacie. J'ai également une pensée particulière pour le professeur Rébecca Deprez-Poulain qui a su éveillé en moi l'esprit scientifique, l'amour pour le médicament et l'envie de comprendre jusqu'au moindre détail l'interaction étroite entre chimie et biologie. Pour ce suivi assidu et pour l'estime que vous m'avez porté durant trois ans, un grand merci !

Je remercie par ailleurs, les autres membres de mon jury, merci Dr. Christophe Carnoy et Dr. Sophie Duquesnoy d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci également au professeur Benoit Deprez qui m'accueilli de nombreuses fois au sein du laboratoire U1177 que ce soit pour les stages ou encore pour de simples discussions.

Merci à toute l'équipe de ce même laboratoire, qui m'a connu trois années consécutives et m'a toujours accueilli comme un membre à part entière. Je garderai à jamais le souvenir de chacun d'entre-vous.

Des remerciements tout à fait particuliers pour Lucile Brier, une très grande amie désormais. Nous nous sommes rencontrés par hasard il y a trois ans et depuis une grande complicité scolaire mais aussi amicale est née ! Merci d'avoir été là pour les travaux de groupe, les quatre mois en Suède et tout ce que nous avons partagé ensemble au labo et en amphi.

Pour toute la fierté que vous avez montré au fil de l'avancement de mes études merci à mes grand-parents, mes grands-mères présents ce

jour mais également mes grands pères et arrières grands mères qui n'ont pas eu l'opportunité d'assister à cette soutenance de thèse d'exercice de Pharmacie. Votre soutien des ma première année à été la base de tout le travail accompli, sans vous rien n'aurait été possible.

Je tiens à remercier celui qui, toujours a été présent, et avec qui j'ai partagé beaucoup de choses qui ont confirmé mon envie de donner le meilleur. Merci Théo, mon meilleur ami, notre histoire commune a constitué une source inépuisable de motivation.

Depuis trois ans, tu as partagé et as épaulé toutes mes périodes de révisions, l'absence de vacances et la faible disponibilité imputée à mes études. Je te remercie romain, mon copain que j'aime !

Pour toute l'attention que vous m'avez porté durant ces six années, mais également depuis vingt quatre ans aujourd'hui, je tiens à remercier mes parents. Personnes sans qui, je n'aurais jamais pu accomplir la moitié de ce que j'ai fait aujourd'hui. Vous avez supporté mes études d'un point de vue moral, financière et avez entretenu ma motivation. Maman, tu m'as appris une rigueur de travail, une organisation sans faille afin de toujours fournir le meilleur sans jamais être débordé. Je te remercie de tout mon cœur, tu as contribué à faire de moi l'homme que je suis et le professionnel que je serai ! Ton professionnalisme me fait remarquer chaque jour que se contenter du minimum n'est absolument pas suffisant et qu'il faut s'améliorer en continue. Papa, depuis mon plus jeune âge, tu m'as fait sans le vouloir le plus beau des cadeaux. Tu m'as transmis ta passion pour l'aide envers l'autre, pour la santé, pour la pharmacie. Je sais que je n'ai pas toujours été clément envers toi et que je t'ai violemment répondu un jour que « je ne vendrai jamais des boîtes comme toi ! ». Mais cet abus d'orgueil n'était qu'une manière de ne pas te montrer que tu reste aujourd'hui mon modèle.

Abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PD-1 : Programmed cell death protein 1

PD-L1/2 : Programmed cell death protein ligand 1/2

ADN : Acide Désoxyribonucléique

UV : Ultra-violet

V600E : Mutation du triplet de nucléotide codant pour la valine 600 par un triplet codant pour un acide glutamique.

GnRh : Gonadotropin Releasing Hormone

SMKI : Small molecule kinase inhibitors, petites molécules inhibitrices de kinases

ARN : Acide Ribonucléique

LT CD8⁺/CD4⁺ : Lymphocyte T CD8⁺/CD4⁺

NKT : Natural killer T lymphocyte

CMH I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I

CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

TCR : *T-cell receptor* ou Récepteur des lymphocytes T

Ig X : Immunoglobuline d'isotype X

CDCC : Complement-dependent cellular cytotoxicity

l'ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

CDC : Complement-dependent cytotoxicity

CTAL-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4

CD80-86 : cluster de différenciation 80-86

ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

SHP-1/2 : Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1/2

ITSM : Immunoreceptor tyrosine-based switch motif

INF I et II: Interférons de type I et II

TNF- α : tumor necrosis factor α

VEGF : Vascular growth factor

IL-4 : Interleukine 4

Val : Valine

Ile : Isoleucine

Leu : Leucine

Ala : Alanine

Tyr : Tyrosine

Met : Méthionine

Gln : Glutamine

Asp : Acide aspartique

Arg : Arginine

PPIIs : protein-protein interaction inhibitors ou inhibiteurs d'interaction protéine-protéine

N^t : Extrémité N terminale d'un peptide ou d'une protéine

IrAEs : Immun related adverse effects

Plan de thèse

I]	Introduction : le cancer, une préoccupation toujours actuelle.....	18
A]	Processus d'oncogenèse : d'une cellule mère à l'apparition d'une tumeur	18
B]	Aperçu de la thérapeutique actuelle concernant les petites molécules.....	20
1]	Les agents cytotoxiques	21
2]	L'hormonothérapie : un pas vers une thérapeutique ciblée du cancer	22
3]	L'étude du phénotype de la tumeur : les thérapies ciblées.....	23
II]	Interaction immunité versus cancer : les points de contrôle de l'immunité	24
A]	Réponse antitumorale physiologique	25
B]	Tolérance et échappement tumorale ^{5,7,8,21}	28
C]	Découverte des points de contrôle de l'immunité.....	29
III]	PD-1/PD-L1-2: cibles thérapeutiques prometteuses.....	32
A]	Rôle physiologique du complexe PD-1/PD-L1.2	32
B]	Preuve de concept : vers une réactivation du système immunitaire.....	34
C]	Structures protéiques et interactions au sein du complexe PD-1/PD-L1.2.....	35
1]	Structure de la protéine PD-1.....	35
2]	Structure des ligands de PD-1 : PD-L1 et 2.....	37
3]	Interaction au sein du complexe PD-1/PD-L1	38
IV]	Des Anticorps monoclonaux aux petites molécules organiques de synthèse	41
A]	Les anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1 : mode d'action, avantages et limites	41
1]	Bases structurales d'interaction des anticorps monoclonaux avec PD-1 et PD-L1	41
a]	Mode de liaison des anti-PD-1	42
a.1]	Liaison du pembrolizumab avec PD-1	42
a.2]	Liaison du nivolumab avec PD-1.....	44
b]	Mode de liaison des anti-PD-L1.....	45
2]	Utilisation en clinique des anticorps monoclonaux : avantages et limites	46
B]	Recherche d'inhibiteurs peptidiques et pseudo-peptidiques.....	48
C]	Vers un contrôle plus fin de la pharmacocinétique : les petites molécules organiques.....	48
1]	Avantages des petites molécules de synthèse organique.....	48
2]	Premier inhibiteurs du complexe PD-1/PD-L1 décrit dans la littérature	49
V]	Conclusion et perspectives de recherche.....	53
	Bibliographie	55

Table des figures

Figure 1. Hypothèse admise quant au processus d'oncogénèse ³	19
Figure 2. Historique de découverte et de mise sur le marché des inhibiteurs de kinases spécifiques comme thérapies ciblées du cancer. (a) Nombre d'approbation d'inhibiteurs de kinases depuis 1950. (b) Inhibiteurs de kinases classés par date de mise sur le marché et par type de kinase inhibée. (c) Proportion des inhibiteurs de kinases découverts en fonction des laboratoires pharmaceutiques. SMKI = small molecule kinase inhibitors ou petites molécules inhibitrices de kinases.	23
Figure 3. Etablissement, propagation et expansion de la réponse immunitaire antitumorale. (1) Les antigènes les plus immunogènes de la tumeur sont captés et présentés sur le CMH des cellules présentatrices d'antigènes CPA. (2) Après migration dans les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, thymus, rate...), (3) les CPAs vont être responsables de l'activation du clone de Lymphocyte T (LT) spécifique de la tumeur. (4-5) Après migration vers le foyer tumoral les LT, notamment CD8 ⁺ , (6) vont activer leurs capacités cytotoxiques (interaction FAS/ FAS-Lg, Granzyme-Perforine) et détruire les cellules tumorales après reconnaissance de leur antigène spécifique, présenté sur le CMH de classe II. Certains Lymphocytes B (LB) seront à l'origine de la sécrétion d'anticorps tumeur-spécifique (après différenciation en plasmocyte). Ceux-ci permettront l'activation du complément afin d'accroître le phénomène de lyse tumorale. Les antigènes issus de la lyse de ces cellules vont permettre l'amplification de ce cycle ⁶	25
Figure 4. A] Structure d'un anticorps (immunoglobuline d'isotype G (IgG)). Les IgG sont constituées de deux chaînes protéiques présentant en C terminal une partie constante, conservée entre tous les anticorps et une partie variable responsable de la spécificité de reconnaissance de l'antigène en N terminale. B] Cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC). Et cytotoxicité cellulaire médiée par l'activation du complément grâce aux anticorps (CDC) ^{19,20}	26
Figure 5. Différentes isoformes d'immunoglobulines ainsi que leur structure quaternaire ¹⁹	27
Figure 6. Activation d'un lymphocyte T CD8 ⁺ par une cellule présentatrice d'antigène (à gauche). L'antigène présenté par la cellule dendritique (en vert) sur son complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) est reconnu par le TCR (T cell receptor) du lymphocyte T CD8 ⁺ . Cette reconnaissance constitue le premier signal d'activation de la synapse immunologique. Le second signal activateur de la réponse immunologique repose sur l'interaction entre les protéines de co-stimulation (CD28/CD80-86 par exemple). Après migration vers le site tumoral (à droite), le microenvironnement inflammatoire de la tumeur va promouvoir le recrutement des ligands de la protéine « programmed cell death 1) 1 et 2 (PDL1/2). Cette reconnaissance provoque ainsi une inhibition de la réponse immunitaire conduisant à l'échappement tumoral. ²²	29
Figure 7. Historique de découverte des premiers anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle de l'immunité jusqu'en 2012 ⁵	30
Figure 8. Induction de l'anergie des lymphocytes T CD8 ⁺ via l'interaction PD-1/PD-L1 et ciblage par des anticorps monoclonaux. IgC, constant immunoglobulin domain; IgV, variable immunoglobulin domain; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; ITSM, immunoreceptor tyrosine-based switch motif; MHC, major histocompatibility complex; PD-1, programmed cell death-1; PD-L, programmed cell death ligand; SHP, Src homology region 2 domain-containing phosphatase; TCR, T cell receptor; Treg, regulatory T lymphocytes ⁵	33
Figure 9. Imagerie IRM de la régression d'une tumeur rénale chez le patient 4033 dans l'essai de phase 1 du nivolumab. Une réponse partielle est visible au 22 avril 2008. Au 22 juillet 2008 la taille de la tumeur a été divisée par deux ³⁷	35

Figure 10. Interaction PD-1/PD-L1 inhibant la cascade de kinases des voies PI3K-Akt-mTOR et Ras-MEK-ERK. L'expression de PD-L1, induit par différentes mutation au sein de la cellule cancéreuse, conduit à une tolérance immunologique vis-à-vis du cancer (à gauche). Séquence d'acides aminés de la protéine PD-1 accompagné de la structure annoté par domaine ⁴⁰	36
Figure 11. A) Structure de la partie extracellulaire de la protéine PD-L1 humaine ⁴² . B) Profil de reconnaissance de PD-L1 et PD-L2 ⁴⁰	38
Figure 12. Structure annotée par feuillets de la protéine PD-1 interagissant avec son ligand PD-L1. L'organisation en sandwich des feuillets des deux protéines est indiquée par des pointillés (en A). Les chaînes latérales des acides aminés clés de l'interaction sont présentées (en B).	39
Figure 13. interface d'interaction entre la protéine PD-1 et PD-L1 ^{39,43,44}	40
Figure 14. Exemple d'interactions hotspots entre PD-1 et PD-L1. Deux liaisons hydrogènes sont visibles entre les résidus D122 (Asp122), Y123 (Tyr123) de PD-L1 et Y68 (Tyr68) et E136 (Glu 136) de PD-1. Une interaction de type pi-pi est également visible entre les tyrosines 123 et 68 des deux protéines. Images obtenues avec le logiciel Pymol® (code PDB : 3RRQ).....	40
Figure 15. Illustrations des différentes spécialités sur le marché en 2019 ciblant le complexe PD-1/PD-L1. Image obtenues sur les différents sites web des laboratoires pharmaceutiques exploitants : BMS, MSD, Genentech (Roche), Pfizer et AstraZeneca.	41
Figure 16. a) Superposition de PD-1 (représenté en surface grise) avec le nivolumab (en vert) et le pembrolizumab (en magenta). b) Surface de liaison de PD-1 avec le nivolumab (en vert) et le pembrolizumab (en magenta) ²⁷ . c) Superposition du fragment Fab du pembrolizumab avec le PD-L1, liant la protéine PD-1 humaine ⁴⁴	42
Figure 17. Vue des deux sous surface d'interaction entre PD-1 et la partie variable du Fab du Pembrolizumab. PD-1 est représenté en bleu, les domaines L1 et L3 des chaînes légères du pembrolizumab sont représentés en orange clair et le domaine H3 de la chaîne lourde du pembrolizumab est représenté en vert clair ⁴⁴	43
Figure 18. Vue de l'interaction entre les boucles N-terminale et BC de PD-1 avec les domaines variables du nivolumab (à gauche). Vue de l'interaction entre la boucle FG de PD-1 et les domaines variables du pembrolizumab (à droite) ²⁷ . CDR =Complementary determinig regions ou région hypervariable responsable de l'affinité entre paratope et épitope.	44
Figure 19. Structure co-cristallisé montrant l'interaction entre l'atezolizumab (anticorps monoclonal humanisé ciblant la protéine PD-L1) et PD-L1. Les résidus de l'atezolimumab sont représentés en couleurs (violet, jaune, orange) et les résidus de PD-L1 sont représentés en gris. Les acides aminés clés de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 sont entourés par des cercles pointillés rouges ⁴⁶	46
Figure 20. Structures accompagnées des activités (IC ₅₀) des composés du laboratoire BMS possédant une activité inhibitrice sur PD-L1. La famille du (2-Méthyl-3-biphenylyl)méthanol est encadrée en rouge et représenté par le composé BMS-202. La famille du [3-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2-méthylphényl]méthanol est encadrée en bleu et représentée par les composés BMS-200, 1001 et 1166. Les IC ₅₀ ont été obtenues à l'aide d'un test d'affinité mesuré par fluorescence avec la technique d' HTRF (homogenous time-resolved fluorescence). Image adaptée de Yang et Hu ³⁹ , et obtenue à l'aide du logiciel Biovia draw®.....	50
Figure 21. A) Interaction des composés BMS-200 et BMS-202 au sein du dimer PD-L1 _A /PD-L1 _B formé. B) Modification de conformation de la tyrosine 56 (encadré en rouge) de PD-L1 _A induite par le composé BMS-200. C) Liaison du composé BMS-202 au sien du dimer de PD-L1. D) Liaison du composé BMS-200 au sein du dimer de PD-L1. Image adapté de Guzik et al. ⁵⁵	51

Figure 22. Sites d'interactions disponibles pour l'accueil de petites molécules inhibitrices de la reconnaissance PD-1/PD-L1³⁹ 52

I] Introduction : le cancer, une préoccupation toujours actuelle

« Malgré les avancées de la recherche, la France (...) comptent toujours, chaque année, de nouveaux cas de cancer. La mobilisation reste plus que jamais d'actualité. » D'après un article de la ligue contre le cancer (2019).

D'après les chiffres de l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est responsable de 8,8 millions de décès en 2015. Près d'un décès sur six est dû directement ou indirectement au cancer¹. Le cancer se manifeste la plus part du temps au niveau du poumon, du foie, du colon/rectum, de l'estomac ou encore du sein. Bien qu'ayant fait de nombreuses découvertes depuis la compréhension plus fine des mécanismes physiopathologiques du cancer, cette pathologie liée au vieillissement, au mode de vie et à l'exposition au monde extérieure reste préoccupante. Dans cette thèse, l'objectif sera de décrire brièvement le processus par lequel l'organisme autorise la prolifération du cancer. Les avancées effectuées en recherche ont permis de démontrer une interaction forte entre cancer et immunité. Plus récemment, la mise au point et l'utilisation des anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle de l'immunité, notamment PD-1 et ses ligands (PD-L1 et PD-L2), en clinique ont constitué une révolution dans le traitement du cancer. Ces traitements montrent aujourd'hui quelques limites. Celles-ci peuvent être résolues par le retour aux petites molécules de synthèse organique. Les premiers inhibiteurs puissants du système PD-1/PD-L1 ont été reportés dans la littérature et découverts grâce aux données structurales obtenues *via* l'utilisation des anticorps monoclonaux.

A] Processus d'oncogenèse : d'une cellule mère à l'apparition d'une tumeur

Le cancer se définit par une prolifération incontrôlée des cellules de l'organisme impliquant une sortie du cycle cellulaire^{2,3}. L'apparition de l'état cancer d'une cellule est issu d'une suite de mutation de proto-oncogènes en oncogènes ou de la désactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les proto-oncogènes sont des gènes naturellement présents dans le noyau des cellules. Ils codent pour la synthèse de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (pour la réplication de l'ADN, la division cellulaire...). Des mutations peuvent apparaitre de manière aléatoire formant ainsi des oncogènes. Ces mutations peuvent être d'origine chimique (molécules

toxiques comme le benzène par exemple), d'origine physique (comme les radiations ionisantes, les UVs...), ou épigénétique/environnementale (c'est-à-dire la manière dont l'organisme active ou non certains gènes par rapport aux autres).

Les protéines mutées issues de l'expression de ces gènes ont alors une fonction perturbée. Il est possible de prendre la kinase Raf, mutée dans le mélanome pour exemple. Cette kinase est responsable de la phosphorylation d'une autre kinase MEK, toutes deux impliquées dans l'entrée en réplication des cellules humaines. Dans le cadre du mélanome, un cancer de la peau, une mutation se produit chez certains patients en position 600 de la protéine. Une valine est alors remplacée par un acide glutamique (V600E)⁴. Ce remplacement d'acides aminés dans la séquence de la protéine provoque un changement de conformation qui rend la protéine constitutivement active et engendre une prolifération incontrôlée des mélanocytes au niveau de l'épiderme^{4,5}.

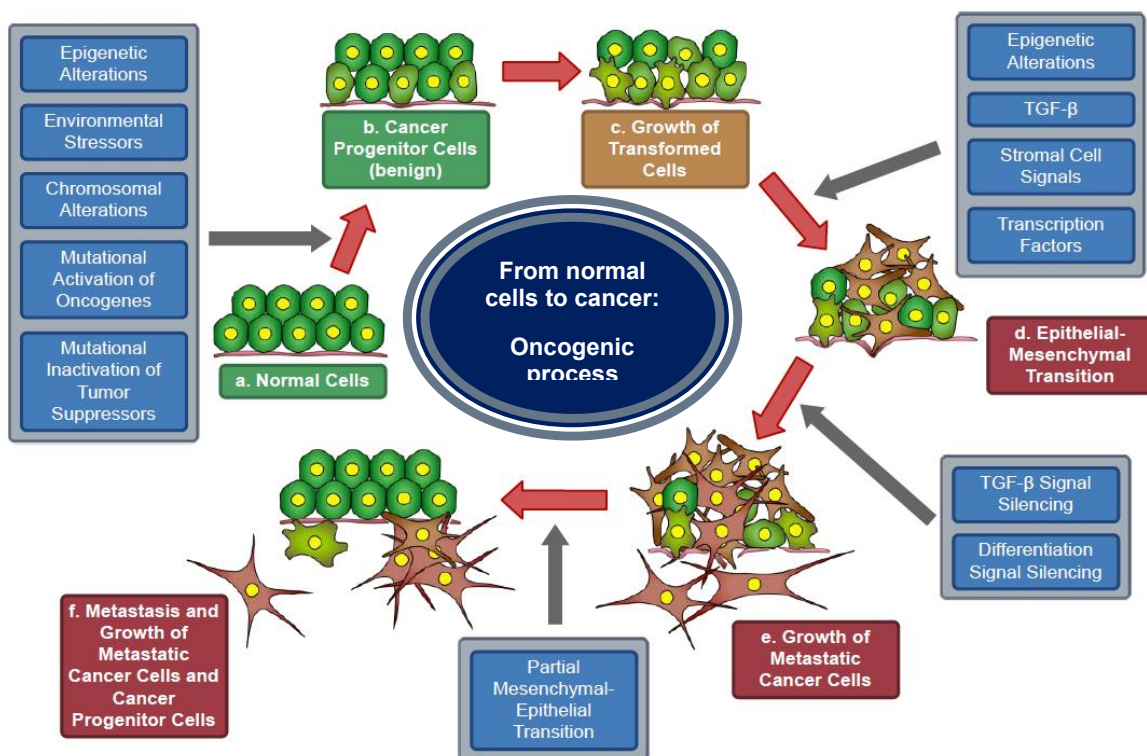


Figure 1. Hypothèse admise quant au processus d'oncogénèse³.

Plusieurs décennies de recherche sur le processus d'oncogénèse ont conduit à valider le caractère multi-étape de celui-ci. Le processus d'apparition du cancer repose sur quatre/cinq étapes définies^{1-3,6}.

- (1) Des altérations d'ordre épigénétique, environnementale, des altérations de chromosomes, ou encore l'apparition de mutations (activation d'oncogènes ou inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs) constituent la première étape de transformation des cellules saines en progéniteurs tumoraux [Figure 1a-b].
- (2) Les progéniteurs tumoraux vont ensuite se multiplier et accumuler d'autres mutations dans divers endroits du génome pour conduire à l'apparition de cellules transformées [Figure 1b-c].
- (3) La production de cytokines va entraîner une modification d'expression des profils de gènes, au sein des cellules transformées. Certaines d'entre-elles vont alors passer à un état de transition en cellules mésenchymateuses. Les cellules mésenchymateuses sont des cellules ayant récupérées des capacités de prolifération proche de celles des cellules souches multipotentes [Figure 1c-d].
- (4) Ces cellules vont ensuite proliférer dans le microenvironnement tumoral. Certaines vont perdre leurs adhérences et quitter le site de la tumeur. On parle de métastases [Figure 1d-e].
- (5) Après migration de ces cellules cancéreuses, *via* le système sanguin ou lymphatique, les métastases peuvent coloniser d'autres organes et induire des modifications dans le comportement normal des cellules colonisées. Le cancer va alors s'étendre jusqu'à épuiser l'organisme [Figure 1e-f].

Le processus d'oncogénèse est un processus complexe constitué de plusieurs étapes successives. Ce processus aboutit à des altérations à différents niveaux au sein des cellules transformées : génétique, épigénétique, transcriptomique, protéomique, métabolique et enfin phénotypique^{2,3,5-8}. La compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'apparition du cancer a permis le développement de nombreuses classes de médicaments à visée anticancéreuse.

B] Aperçu de la thérapeutique actuelle concernant les petites molécules

Le traitement du cancer a connu plusieurs révolutions au cours du temps et de l'avancée des connaissances relatives à la physiopathologie du cancer. Dans le cas de tumeurs solides ou localisées les premiers traitements consistaient en l'exérèse de la tumeur par chirurgie⁹. Plutôt invasive, cette technique reste maintenant utilisée en dernier recours pour des tumeurs résistantes aux traitements médicamenteux.

Elle reste néanmoins la technique ayant le plus grand taux de réussite depuis ses débuts dans les années 20. En effet, dans le cas de tumeurs localisées, la résection permet d'éradiquer 100% des cellules tumorales après drainage lymphatique afin d'éviter les rechutes.

Vers le début des années 40, la radiothérapie est venue en complément ou en substitution à la chirurgie. Non sans effets indésirables, elle n'est adaptée que pour les cancers localisés et non métastatiques comme la chirurgie⁹.

L'arrivée des premières chimiothérapies, a permis, en complément des deux techniques précédentes, de diminuer le nombre de rechute et d'atteindre les cellules ayant quittées l'environnement proche de la tumeur. Différentes classes de molécules ont été développées à partir des années 40. Parmi elles, on trouve tout d'abord les agents cytotoxiques capables de détruire les cellules à haut niveau de réplication. Peu sélectives ces molécules ont laissé place à des thérapies plus spécifiques de la tumeur concernée. De l'hormonothérapie aux anticorps monoclonaux, en passant par la découverte des traitements ciblés (inhibiteurs de kinases mutées) et la mise en évidence du rôle clé de l'immunité, le paysage de la thérapie anticancéreuse a beaucoup évolué. La classification Vidal offre un panorama des différentes classes disponibles actuellement ou dans le passé^{10,11}.

1] Les agents cytotoxiques

Les agents alkylants de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et apparentés ont pour fonction d'alkyler les base de l'ADN afin de déstructurer le repliement de la double hélice au sein du noyau. On trouve comme principaux représentants : le cisplatine (dérivé du platine), le cyclophosphamide (Endoxan[®]), le melphalan (Alkeran[®]) (moutardes à l'azote) ou encore la carmustine (Bicnu[®]) (nitroso-urée).

Les poisons du fuseau mitotique permettent d'empêcher la division cellulaire au sein de cellules en anaphase. Les médicaments de cette famille sont pour la plus part de molécules issues des plantes. On trouve la vincristine, la vinblastine et dérivés d'hémisynthèses découverts dans la petite pervenche de Madagascar. D'autres molécules comme les taxanes (docetaxel (Taxotere[®]), paclitaxel (Abraxane[®]) et dérivés d'hémisynthèses) ont été découverts dans l'écorce d'ifs du pacifique. Ces derniers stabilisent les fuseaux de microtubules afin d'empêcher la cellule de ramener les chromosomes aux pôles de la cellule en division.

La réplication de l'ADN est nécessaire à la division cellulaire et donc à la prolifération du cancer. Les antimétabolites viennent perturber le métabolisme de réplication de l'ADN afin de bloquer le cycle des cellules en division. Cette famille d'agents anticancéreux est composée des anti-foliques (methotrexate (Novatrex[®]), pémétréxed (Alimta[®])) qui bloque principalement la réduction de l'acide folique, nécessaire à la formation des bases de l'ADN. La seconde sous-classe renferme les antipuriques comme la mercaptopurine, et les antypyrimidiques comme l'azathioprine (Imurel[®]) responsable principalement de l'insertion de thionucléotides au sein de l'ADN et de l'ARN (acide ribonucléique). Enfin la troisième sous-classe comporte les inhibiteurs du protéasome comme le bortezomib (Velcade[®]) ou encore la carfilzomib (Kyprolis[®]). Ces molécules sont des inhibiteurs covalents du protéasome qui empêche la cellule cancéreuse de dégrader les protéines mal conformées ou oxydées. L'accumulation d'agrégats de protéines conduira à la mort de la cellule. Des coupures de l'ADN peuvent apparaître plus fréquemment dans les cellules cancéreuses suite à des divisions répétées et trop rapides⁹. En conditions physiologiques les topo-isomérases sont des enzymes capables de cliver les brins d'ADN afin de permettre une réparation et une diminution des contraintes de torsion de la double hélice d'ADN. Des inhibiteurs de topo-isomérase ont donc été développés comme agents anticancéreux. Les dérivés de la camptotécine (irinotecan (Campto[®]) ou topotécan (Hycamtin[®])) inhibent la topo-isomérase de type I alors que les anthracyclines (daunorubicine (Cerubudine[®]), doxorubicines (Adriblastine[®])...), ou les dérivés de la podophylotoxine (étoposide) inhibent préférentiellement la topo-isomérase de type II.

2] L'hormonothérapie : un pas vers une thérapeutique ciblée du cancer

Par la suite, la découverte du caractère hormonodépendant de certains cancers a permis de développer des molécules antagonistes de la prolifération des cellules cancéreuses⁹. Ces traitements ont été bénéfiques notamment dans le traitement du cancer du sein, de la prostate ou encore de pathologies frontière comme le fibrome utérin¹².

Les antagonistes de la GnRh (*Gonadotropin Releasing Hormone*) comme le dégarelix (Firmagon[®]) ont pour rôle de bloquer le signal hormonal, au niveau hypophysaire, responsable de la multiplication incontrôlée des cellules cancéreuses. Au niveau local les anti-androgènes comme l'abirantérone (Zitiga[®]) permettent également de contenir la population de cellules cancéreuses. De manière similaire des

anti-oestrogènes ont été développés comme le tamoxifène (Nolvadex[®]) ou le fulvestrant (Faslodex[®]) par exemple, pour avoir la même action mais en bloquant les récepteurs aux œstrogènes. D'autres molécules ont pour rôle de neutraliser la production d'hormones comme le létrozole (Femara[®]) (inhibiteur d'aromatase bloquant la formation des œstrogènes).

3] L'étude du phénotype de la tumeur : les thérapies ciblées

Vers la fin des années 90 et début des années 2000, les nouvelles connaissances sur différents types de cancers ont montré une variabilité importante quant aux protéines impliquées dans la prolifération du cancer^{9,13,14}. L'analyse des voies métaboliques et des cascades de kinases a permis l'arrivée sur le marché en 2001 de l'imatinib (Glivec[®]) comme inhibiteur spécifique de la kinase Bcr-Abl dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique à chromosome Philadelphie^{13,15} [Figure 2]. D'autres thérapies ciblées vers la protéine BRaf V600E ont vu le jour comme discuté précédemment, avec la mise sur le marché du vémurafénib (Zelboraf[®])^{4,5}.

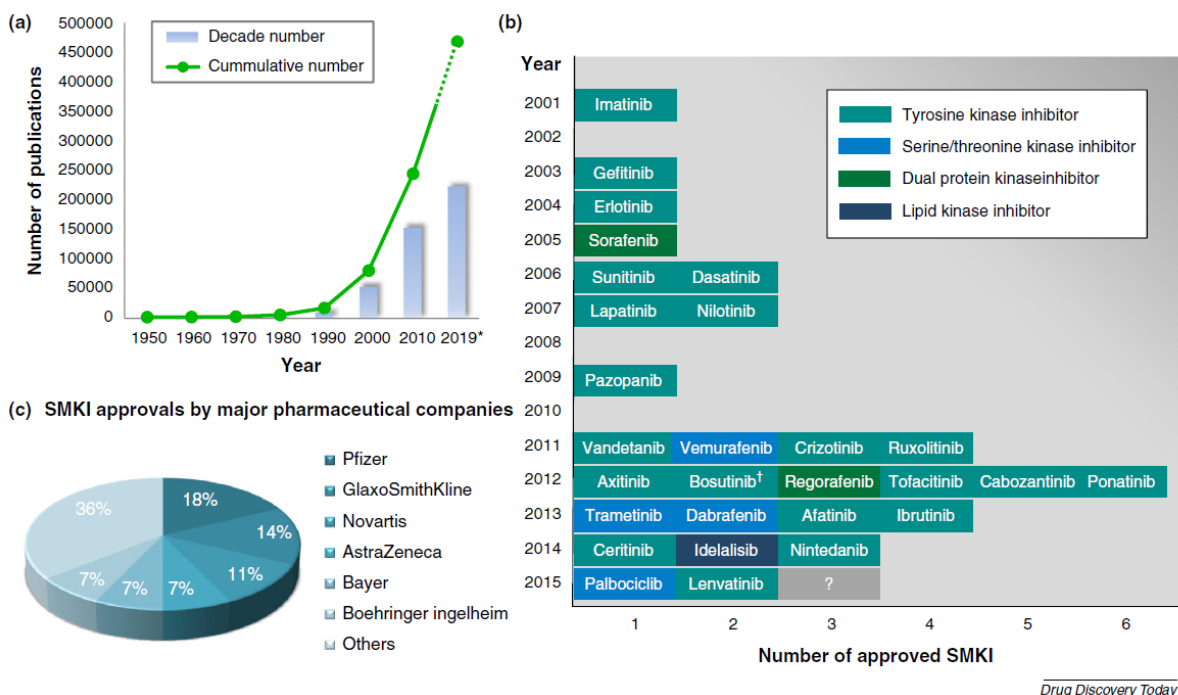


Figure 2. Historique de découverte et de mise sur le marché des inhibiteurs de kinases spécifiques comme thérapies ciblées du cancer. (a) Nombre d'approbation d'inhibiteurs de kinases depuis 1950. (b) Inhibiteurs de kinases classés par date de mise sur le marché et par type de kinase inhibée. (c) Proportion des inhibiteurs de kinases découverts en fonction des laboratoires pharmaceutiques. SMKI = small molecule kinase inhibitors ou petites molécules inhibitrices de kinases¹³.

De la même manière les études effectuées sur l'interaction entre cancer et immunité ont permis de mettre en lumière un rôle majeur du système immunitaire⁶.

En effet, celui-ci est en charge de maintenir l'homéostasie immunitaire vis-à-vis de menaces extérieures ou intérieures. Ainsi l'utilisation d'anticorps monoclonaux comme le rituximab (Rituxan[®]) ciblant spécifiquement les cellules au niveau de la protéine CD20 s'est inscrit dans les thérapeutiques comme nouvelle arme contre le cancer et a ouvert la porte au développement d'autres biothérapies. L'influence et le rôle du système immunitaire dans le cycle du cancer a bénéficié de nouvelles avancées et nous permet aujourd'hui d'envisager de nouveaux modes d'actions pour les médicaments de demain. Les anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle de l'immunité ont constitué une révolution dans le traitement des cancers surexprimant ces types de protéines. Les points de contrôle de l'immunité sont un pilier de l'interaction immunité-cancer.

II] Interaction immunité versus cancer : les points de contrôle de l'immunité

Du fait de leur cohabitation dans l'environnement, les êtres vivants sont exposés en permanence à des agents du soi (ensemble des cellules et antigènes de notre corps) ainsi qu'à des agents du non-soi (l'ensemble des antigènes issus de bactéries, virus, parasites ou encore de cellules transformées) capables de les infecter et de compromettre leur survie¹⁶. Les mammifères ont donc dû développer, au fil de l'évolution, un système de surveillance ingénieux capable de garantir l'homéostasie immunologique du corps : le Système Immunitaire. Cet équilibre immunologique est permis grâce à la coopération étroite des cellules de l'immunité innée (Monocytes, Macrophages, polynucléaires...) et celle de l'immunité adaptatives (Lymphocytes B, T et NKT)¹⁷.

Dans des conditions physiologiques, le système immunitaire est alors en mesure de détecter et d'éliminer les cellules transformées ainsi que les agresseurs microbiologiques potentiels tout en épargnant les cellules saines de notre corps. La présentation ou reconnaissance antigénique est un principe fondamental de l'immunité. Au sein du corps humain, un grand nombre de cellules sont capables de capter des peptides antigéniques et de les associer à des protéines de présentation, au niveau de la surface cellulaire^{8,18}. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité ou CMH remplit cette fonction par l'intermédiaire de deux sous types : le CMH de classe I (CMH I) et de classe II (CMH II).

A] Réponse anti-tumorale physiologique

L'ensemble des mutations acquises lors du processus d'oncogenèse, au sein de la cellule tumorale est responsable d'une modification de son métabolisme et donc de modifications dans le peptidome de surface. Ces modifications rendent les cellules cancéreuses plus immunogènes et donc plus visibles par le système immunitaire. Les cellules immunitaires de l'hôte sont capables de capter et d'internaliser des antigènes tumoraux et de les présenter associées aux molécules du CMH II. Les cellules présentatrices d'antigènes ou CPA (Cellules dendritiques, Macrophages, Lymphocyte B périphériques activés...) naïves vont alors migrer dans les ganglions lymphatiques et autres organes lymphoïdes (thymus, rate) afin d'initier un processus de coopération cellulaire^{5,6}. Durant cette migration les protéines du CMH ainsi que les protéines de co-stimulation (CD80 par exemple) vont être surexprimées. A ce niveau, les CPAs vont faire interagir leur complexe CMH-antigène avec le TCR (T-cell receptor) des Lymphocytes T¹⁶. La sélection du clone de LT spécifique de l'antigène présenté, conduira à l'activation de celui-ci. Une fois activés, les LT spécifiques de la tumeur vont rejoindre le foyer tumoral afin de détruire les cellules les plus immunogènes par le biais de leurs capacités cytotoxiques (interaction FAS/FAS-Ligand, Granzyme-Perforine...)¹⁹. La destruction des premières cellules de la tumeur va conduire à la libération de nouveaux antigènes tumoraux. Captés par les CPAs, ceux-ci vont permettre d'alimenter et d'entretenir l'activation de T Cell et l'expansion de la réponse immunitaire adaptative et spécifique de la tumeur [Figure 3]^{5,6}.

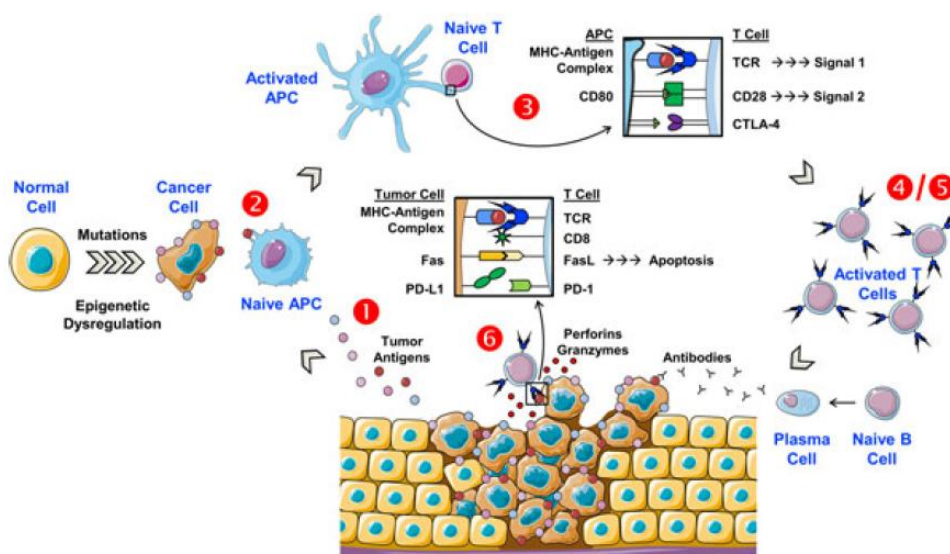


Figure 3. Etablissement, propagation et expansion de la réponse immunitaire anti tumorale. (1) Les antigènes les plus immunogènes de la tumeur sont captés et présentés sur le CMH des cellules présentatrices d'antigènes

CPA. (2) Après migration dans les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, thymus, rate...), (3) les CPAs vont être responsables de l'activation du clone de Lymphocyte T (LT) spécifique de la tumeur. (4-5) Après migration vers le foyer tumorale les LT, notamment CD8⁺, (6) vont activer leurs capacités cytotoxiques (interaction FAS/ FAS-Lg, Granzyme-Perforine) et détruire les cellules tumorales après reconnaissance de leur antigène spécifique, présenté sur le CMH de classe II. Certains Lymphocytes B (LB) seront à l'origine de la sécrétion d'anticorps tumeur-spécifique (après différenciation en plasmocyte). Ceux-ci permettront l'activation du complément afin d'accroître le phénomène de lyse tumorale. Les antigènes issus de la lyse de ces cellules vont permettre l'amplification de ce cycle⁶.

En parallèle de l'activation des LT CD8⁺ ou cytotoxiques, les CPAs vont sélectionner une population de lymphocytes T CD4⁺ ou auxiliaires orientant le profil de la réponse immunitaire. La sécrétion d'un panel de cytokines et de chimiokines, par ces mêmes cellules, sera responsable de la création d'une mémoire immunitaire et de la multiplication des cellules activées⁶. Cette mémoire sera alors en mesure de répondre plus rapidement et plus fortement lors d'un contact ultérieur avec l'antigène tumoral. Des lymphocytes B seront également activés. Certains choisiront une voie de différenciation en cellules mémoires, d'autre évolueront en plasmocytes. Les plasmocytes sont les cellules compétentes pour la synthèse d'anticorps.

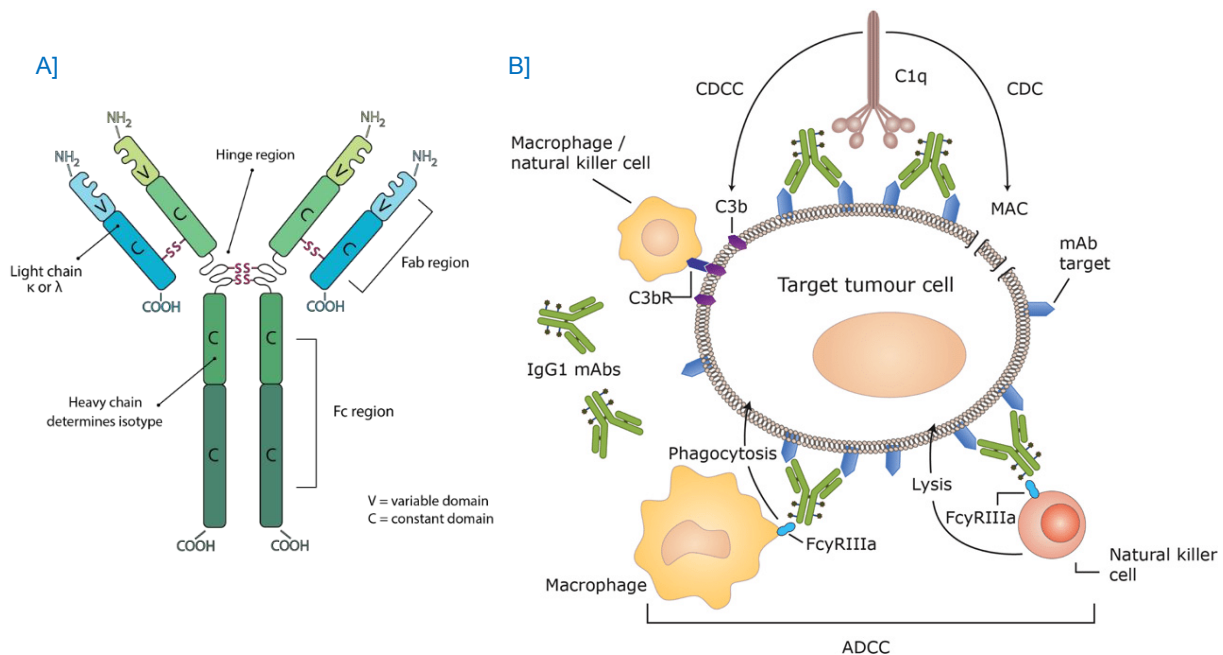


Figure 4. A] Structure d'un anticorps (immunoglobuline d'isotype G (IgG)). Les IgG sont constituées de deux chaînes protéiques présentant en C terminal une partie constante, conservé entre tous les anticorps et une partie variable responsable de la spécificité de reconnaissance de l'antigène en N terminale. B] Cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC). Et cytotoxicité cellulaire médiée par l'activation du complément grâce aux anticorps (CDC)^{19,20}.

Il existe différents type d'anticorps produit par les plasmocytes : les IgG, les IgA (dimérique), les IgD, les IgM (pentamérique), et les IgE (présent à la surface des mastocytes fixés au récepteurs FcεRI et II)¹⁹. Les anticorps de types IgG constituent la majeure partie des immunoglobulines produites dans l'organisme. Ils sont issus de

l'assemblage de deux chaînes protéiques : une chaîne légère et une chaîne lourde reliées par quatre ponts disulfures [Figure 4]. De l'extrémité C terminale (C^T) vers le N terminale (N^T) on trouve les domaines CH3-CH2-CH1-VH (pour la chaîne lourde « heavy chain») et CL-VL (pour la chaîne légère « light chain »). Les régions constantes (CH et CL) sont conservées entre toutes les IgG, alors que la région variable (VH et VL) donne la spécificité de reconnaissance épitope-paratope. L'interaction anticorps-antigène est l'une des interactions possédant naturellement le plus d'affinité.

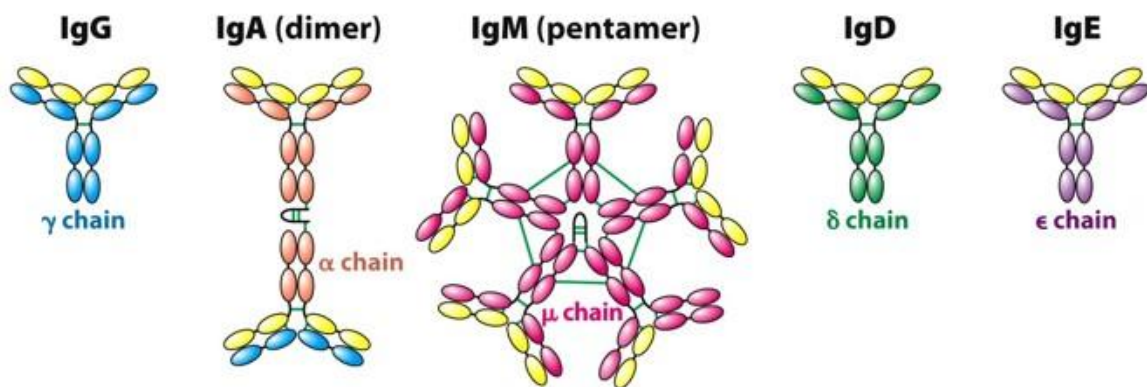


Figure 5. Différentes isoformes d'immunoglobulines ainsi que leur structure quaternaire¹⁹.

En parallèle de l'action de neutralisation, les anticorps participent à l'élimination des cibles reconnues. Ils assistent les phénomènes de cytotoxicités médiés par les lymphocytes T, cellules NK ou les autres phagocytes. Le fragment Fc en partie C^T peut être reconnu par les récepteurs Fc γ R à la surface des cellules immunitaires. Après reconnaissance à la fois de l'antigène spécifique et du Fc γ R, la proximité entre cellule immunitaire et cellule tumorale va aboutir à la destruction de la cible par le mécanisme de l'ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) [Figure 4]. Les anticorps jouent enfin un dernier rôle dans la clairance des cellules tumorales. De manière indépendante des cellules immunitaires, deux IgG adjacentes fixés sur leurs antigènes tumoraux vont pouvoir activer la voie du complément ou CDC (Complement-dependent cytotoxicity). Le complément est une série de protéases solubles dont le rôle est de créer des pores dans la membrane des cellules à détruire. Durant l'activation du complément la C3 convertase (complexe du C2a et C4b) libère la protéine C3b. Celle-ci va pouvoir s'insérer dans la membrane de la cellule tumorale et être reconnu par le récepteur C3bR à la surface des macrophages. A l'issue de cette

reconnaissance les macrophages pourront également participer à la réponse antitumorale par CDCC (Complement-dependent cellular cytotoxicity)²⁰.

Les cellules cancéreuses sont des cellules à haut niveau métabolique présentant un taux de mutation élevé. Ainsi de multiples antigènes vont être créés et libérés perpétuant la réponse anti-tumorale jusqu'à sélection des cellules les moins immunogènes⁵.

B] Tolérance et échappement tumorale^{5,7,8,21}

En oncologie, la reconnaissance de peptides antigéniques spécifiques de la cellule cancéreuse est à l'origine de la destruction du foyer tumoral au sein d'un organisme non malade⁸. En cas de modification de l'immunopeptidome de surface, ou de surexpression de protéines inhibitrices de la réponse immunitaire, une non-reconnaissance de cellules transformées, infectées ou cancéreuses peut perturber l'homéostasie vis-à-vis du cancer. Le cycle immunitaire du cancer est constitué de trois étapes majeures :

- L'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire grâce à la clairance des cellules tumorales après reconnaissance des peptides présentés sur le CMH I (pCMH I) par le TCR (T-cell receptor) des LT.
- Une phase d'équilibre où cohabitent des cellules cancéreuses non détruites mais dont la prolifération est contrôlée par l'immunité. Ainsi lors des phases d'élimination et d'équilibre, les cellules immunitaires parviennent à détruire et contrôler la progression de la tumeur. Cependant, certaines cellules ont acquis des mutations leur conférant une immunogénicité amoindrie. Il se produit alors un phénomène de sélection des cellules les moins immunogènes.
- Et enfin l'étape d'échappement ou tolérance immunologique. Suite à la sélection immunitaire, certaines cellules tumorales ont développé des mécanismes permettant d'inhiber la réponse immunitaire. Certaines d'entre-elles sont par exemple capables, de reproduire le phénomène d'anergie ou d'induire l'apoptose des cellules immunitaires. Ce processus est souvent dû à l'expression en surface des cellules cancéreuses, de signaux inhibiteurs de l'immunité (PD1-PD1L et CTLA4-CD80/86). Ainsi, la balance entre signaux inhibiteurs et activateurs de la réponse immunitaire penche fortement en faveur de l'inhibition des cellules immunitaires et

donc de la prolifération des cellules tumorales. D'autres cellules quant à elles, exposent un immunopeptidome modifié ne présentant pas de peptides caractéristiques de cellules transformées. Elles ne peuvent donc pas être reconnues par les LT et échappent au contrôle immunitaire.

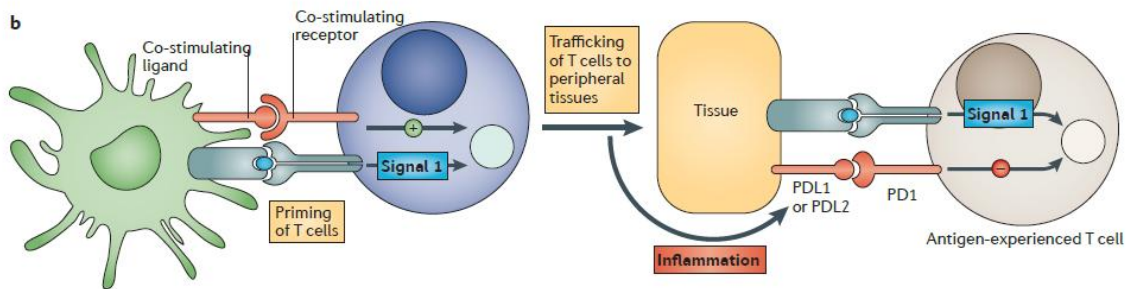


Figure 6. Activation d'un lymphocyte T CD8+ par une cellule présentatrice d'antigène (à gauche). L'antigène présenté par la cellule dendritique (en vert) sur son complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) est reconnu par le TCR (T cell receptor) du lymphocyte T CD8+. Cette reconnaissance constitue le premier signal d'activation de la synapse immunologique. Le second signal activateur de la réponse immunologique repose sur l'interaction entre les protéines de co-stimulation (CD20/CD80-86 par exemple). Après migration vers le site tumorale (à droite), le microenvironnement inflammatoire de la tumeur va promouvoir le recrutement des ligands de la protéine « programmed cell death 1 » 1 et 2 (PDL1/2). Cette reconnaissance provoque ainsi une inhibition de la réponse immunitaire conduisant à l'échappement tumoral²².

La tolérance immunitaire naturelle ou induite en reconnaissance des antigènes du soi ou du non-soi est essentielle au maintien d'une réponse immunitaire physiologique. Cela permet de répondre efficacement aux antigènes non-soi tout en évitant les phénomènes d'auto-immunité. L'apprentissage de cette tolérance immunitaire intervient au stade primaire de développement des lymphocytes dans le thymus (pour les lymphocytes T) est dans la moelle osseuse (pour les lymphocytes B) c'est ce que l'on appelle la tolérance centrale²²⁻²⁴. L'ensemble des lymphocytes de la moelle osseuse ou du thymus sont mis en contact avec des antigènes du soi. Ceux présentant une trop grande affinité (auto-réactivité) seront alors éliminés. De cette manière, l'organisme est en mesure de ne libérer dans la circulation que les lymphocytes qui ne seront pas auto-réactifs. Ce système n'étant pas parfait, il arrive que certaines cellules auto-réactives sortent de la moelle osseuse ou du thymus, et se voient impliquées dans des phénomènes auto-inflammatoires. Pour pallier à cela, le système immunitaire est doté de lymphocytes T régulateur, capables d'induire des phénomènes d'apoptose ou d'anergie.

C] Découverte des points de contrôle de l'immunité

C'est au 19^{ème} siècle que William Coley testa l'hypothèse d'une interaction entre cancer et immunité. Coley montra que l'utilisation d'une toxine bactérienne connue sous le nom de toxine de Coley à l'époque pouvait induire une rémission spontanée et de longue durée, chez des patients atteints de sarcomes inopérables⁵. Suite à ces expériences, le rôle de la réponse immunitaire fut mis en lumière dans la destruction des cellules tumorales. Le mécanisme inflammatoire induit par l'injection de cette toxine, inconnu à l'époque, a conduit pendant les années suivantes à la mise à l'écart de cette approche innovante utilisant le système immunitaire pour éradiquer les tumeurs. Ainsi d'autres traitements de chimiothérapies conventionnels ont vu le jour (Alkylants de l'ADN, poison du fuseau, intercalant de l'ADN, inhibiteur du protéasome...) accompagnés par la suite de la radiothérapie et de la chirurgie¹¹. Après plusieurs décennies de recherche, l'accumulation de nouvelles connaissances sur la physiopathologie du cancer et sur le fonctionnement du système immunitaire ont remis au goût du jour les travaux de Coley [Figure 7].

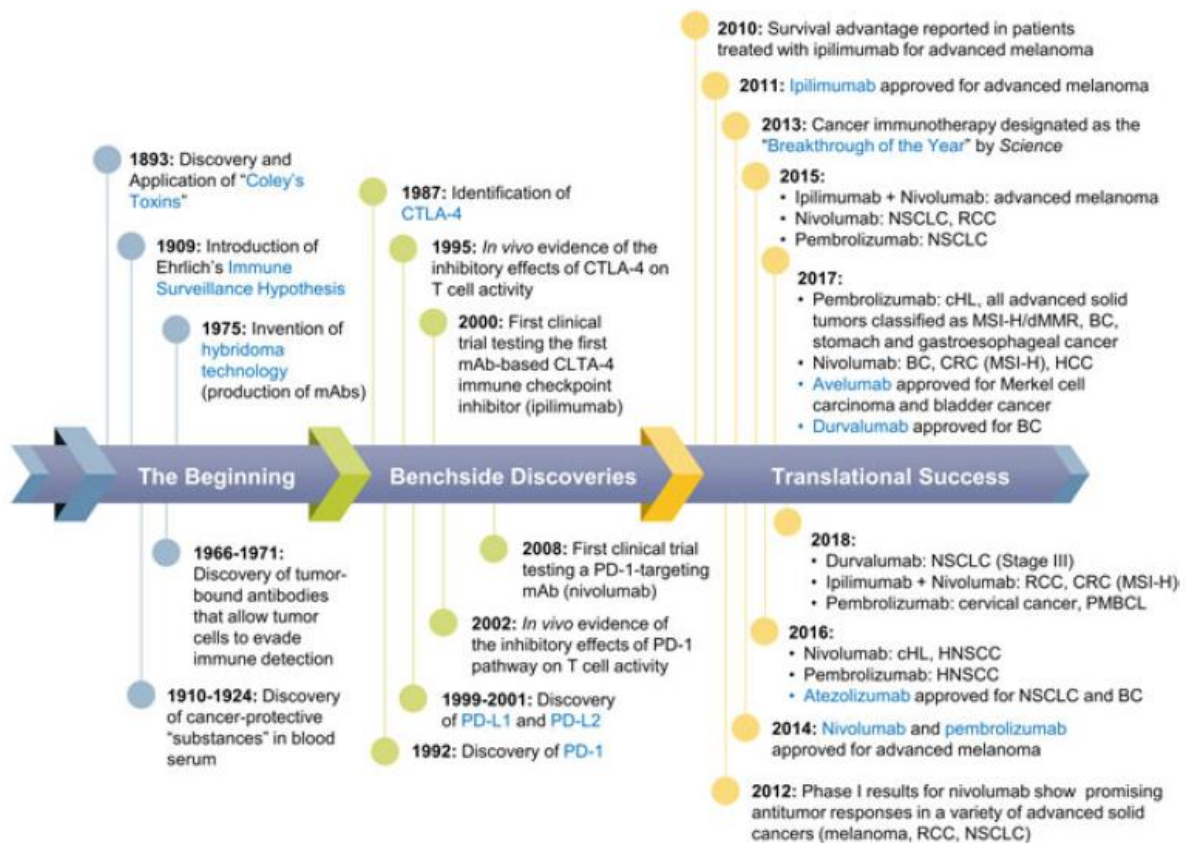


Figure 7. Historique de découverte des premiers anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle de l'immunité jusqu'en 2012⁵.

Avant l'arrivée des premières thérapies, ciblant les points de contrôle de l'immunité, cœur de cette thèse, le traitement du fond du cancer consistait en l'injection

d'interleukin-2 ou d'agents cytotoxiques non spécifiques utilisés dans les chimiothérapies⁵. Le profil de toxicité de ces molécules, accompagné d'une faible amélioration de la survie chez les patients ont poussé la recherche à développer de nouvelles thérapies ciblées (notamment les premiers inhibiteurs des kinases BRAF et MEK : le vémurafénib et le tramétinib (Mekinist[®]) dans le traitement du mélanome). Dans l'essai clinique brim 3 par exemple, plus de la moitié des patients ont montré une réponse au vémurafénib, deux d'entre eux ont montré une réponse complète et 104 une réponse partielle. A l'inverse, dans le groupe traité par chimiothérapie conventionnelle à base de dacarbazine et de paclitaxel seulement 5% de réponse au traitement a été constaté²⁵.

Malheureusement le ciblage direct des protéines mutées au sein des tumeurs montre de plus en plus, un épuisement de la réponse thérapeutique après 6 à 7 mois de traitement. C'est finalement dans les débuts du 21^{ème} siècle que la découverte des points de régulation de l'immunité a permis le développement de nouveaux régulateurs de ces protéines.

C'est en 2011, que le premier anticorps monoclonal ciblant un des points de contrôle de l'immunité a été approuvé pour les patients atteints de mélanome. L'ipilimumab, premier anticorps monoclonal ciblant la protéine CTLA-4. Très rapidement, la mise sur le marché du nivolumab et du pembrolizumab (en 2014), tous deux ciblant la protéine PD-1, est venue compléter l'arsenal thérapeutique dans le traitement du mélanome [Figure 7]. En comparaison aux chimiothérapies conventionnelles, les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité ne montrent pas seulement une augmentation de la survie sans progression mais également une réponse durable avec un effet de plateau au cours du temps. L'intérêt pour les inhibiteurs des points contrôle de l'immunité est alors désormais grandissant. Ainsi en 2013, le journal scientifique *Science* a dénommé l'immunothérapie du cancer comme la révolution de l'année²⁶. Par la suite en 2015, de nombreux anticorps monoclonaux ont obtenu des extensions d'indication pour le traitement de cancers hématologiques. Plus récemment sont également été mis sur le marché en 2016 l'atezolimumab et en 2017 l'avelumab et le darvalumab ciblant l'interaction PD-1/PD-L1.

Au regard de ces avancées ciblant les points de contrôle de l'immunité dans le traitement du cancer, peu de conception rationnelle de petites molécules inhibitrices, de ces mêmes protéines, ont été effectués durant les 10 à 20 dernières années. L'im-

portance biologique des points de régulation de l'immunité n'est plus à démontrer à l'heure actuelle. Les limitations observées lors de traitement par les anticorps monoclonaux ciblant ces protéines nous conduisent à penser que le développement de petites molécules organiques ciblant ces protéines pourrait venir compléter l'arsenal thérapeutique déjà disponible en oncologie. Par ailleurs, les avancées dans l'étude fonctionnelle et structurale de ces protéines de contrôle de l'immunité permettent actuellement de déterminer des *hotspots* d'interaction pouvant être ciblés par de petites molécules organiques⁵.

III] PD-1/PD-L1-2: cibles thérapeutiques prometteuses

Le développement de petites molécules inhibitrices, par conception rationnelle, requière une compréhension fine de la structure des protéines ciblées ainsi que du mode d'interaction mise en jeu. Les études effectuées sur les protéines PD-1/PD-L1.2 (*programmed cell death protein 1/ programmed cell death protein ligand 1.2*) et CTLA-4/CD80-86 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4/ cluster de différenciation 80-86*) ont permis d'élucider les acides aminés essentiels responsables de l'interaction inhibitrice du système immunitaire²⁷.

A] Rôle physiologique du complexe PD-1/PD-L1.2

Depuis la fin des années 90 [Figure 7], le complexe PD-1/PD-L1 a été identifié comme une voie majeure entraînant l'anergie et l'apoptose des cellules immunitaires. A l'inverse du complexe CTLA-4/B7, affectant les lymphocytes T à leur stade primaire de développement, l'expression de PD-1 intervient en périphérie au niveau du microenvironnement tumorale. Il se produit alors une diminution de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ au sein de la tumeur qui est responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire à médiation cellulaire par les LT CD8⁺ pré-activés²⁸.

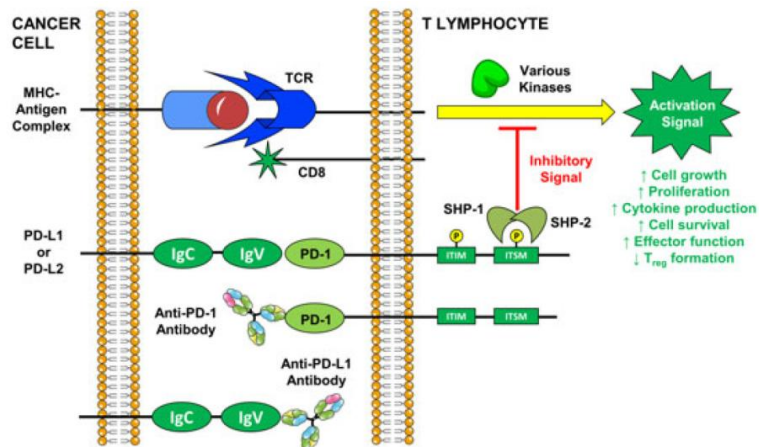


Figure 8. Induction de l'anergie des lymphocytes T CD8⁺ via l'interaction PD-1/PD-L1 et ciblage par des anticorps monoclonaux. IgC, constant immunoglobulin domain; IgV, variable immunoglobulin domain; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; ITSM, immunoreceptor tyrosine-based switch motif; MHC, major histocompatibility complex; PD-1, programmed cell death-1; PD-L, programmed cell death ligand; SHP, *Scr homology region 2 domain-containing phosphatase*; TCR, T cell receptor; Treg, regulatory T lymphocytes⁵.

En conditions physiologiques, l'interaction entre le pCMH I, d'une cellule cancéreuse, et le TCR d'un LT aboutie à l'activation d'une cascade de kinase intracellulaire. Une vive réponse cytotoxique avec destruction de la cellule tumorale permet ensuite d'éliminer les cellules malades. En parallèle, l'activation des cellules immunitaires permet aussi d'accroître la prolifération, la survie, la production de cytokine et diminue l'orientation en profil T régulateur des lymphocytes T CD4⁺. L'interaction PD1-PD-L1 est également responsable de l'induction de la tolérance immunologique du soi. En effet, l'activation de ce point de contrôle de l'immunité permet de diminuer l'occurrence et l'intensité des réactions inflammatoires indésirables, comme celles responsables des poussées inflammatoires en cas de maladies auto-immunes. Ainsi, des déficits de signalisation PD-1/PD-L1 ont été mis en évidence comme responsable de l'apparition de différentes maladies dysimmunitaires : glomérulonéphrite de type lupique²⁹, arthrite²⁹, cardiomyopathie auto-immune³⁰, diabète³¹, colite inflammatoire³² ou encore sclérose en plaque³³ dans divers modèle animaux.

L'exposition en surface, par les cellules cancéreuses, des ligands de la protéine PD-1 (PD-L1 ou 2) sera responsable de l'activation de phosphatases SHP-1/2 (*Scr homology region 2 domain-containing phosphatase 1/2*), au niveau de domaine ITIM (immunoreceptor tyrosine - based inhibitory motif) [Figure 8]⁵. Ces phosphatases pourront venir inhiber le signal activateur de la réponse immunitaire afin de provoquer l'anergie ou l'apoptose du lymphocyte T. Le développement de molécules anti PD-1 ou anti PD-L1/2 est alors un moyen efficace pour briser la tolérance immu-

nologique induite par certaines tumeurs et ainsi retrouver l'homéostasie vis-à-vis du cancer [Figure 8]^{5,26,28}.

Le complexe PD-1/PD-L1 joue également un rôle très important dans la réponse immunitaire à divers pathogènes. Par exemple, chez les patients atteints d'une tuberculose active, l'expression de PD-1 est augmentée. Cela conduit à une augmentation du pool de lymphocyte T anergique d'activité amoindrie. Par ailleurs, des essais de neutralisation utilisant des antagonistes de PD-1 ou de ces ligands ont permis de mettre en évidence un éveil du système immunitaire accompagné de la prolifération des lymphocytes T spécifique du pathogène et d'un contrôle de la maladie³⁴.

B) Preuve de concept : vers une réactivation du système immunitaire

Exprimé plus tardivement à la membrane des lymphocytes T activés, la protéine PD-1 est induite de manière forte dans le microenvironnement tumoral⁵. Ainsi la proportion de lymphocytes surexprimant PD-1 est plus forte dans le cas de tumeurs solides.

A l'inverse, les ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2 sont exprimés dans divers cancers qu'ils soient solides ou non. L'expression de PD-L2 en grande quantité est également corrélée à de meilleurs pronostics que celle de PD-L1³⁵. En effet, l'expression du ligand PD-L1 reste très faible voire absente dans les tissus sains. Elle n'augmente qu'en conditions inflammatoires, sous l'effet des interférons, afin d'éviter la destruction d'un trop grand nombre de cellules normales^{5,34,35}. Cependant, comme décrit précédemment, l'expression de cette protéine par des cellules cancéreuses (colonniques, ovariennes, pulmonaires ou encore dans le mélanome) peut conduire à une tolérance vis à vis du cancer par les cellules immunitaires³⁶.

Des tests effectués chez des souris immunodéficientes afin de prouver que le blocage du système PD-1/PD-L1 pouvait permettre de réactiver le système immunitaire et de rétablir une réponse anticancéreuse physiologique. Des souris de type RAG-1^{-/-}, immunodéficientes, ont été inoculées en intra péritonéale, par des cellules de mastocytome P815 présentant (B7-H1/P815) ou non (P815) une surexpression de PD-L1 (B7-H1). L'injection de lymphocytes T CD8⁺ activés pour le groupe de souris P815 (cellules tumorales de mastocytome ne surexprimant pas le ligand de PD-1) a conduit à une diminution du nombre de cellules tumorales. A l'inverse, cette même injection dans le groupe de souris B7-H1/P815 (cellules tumorales de mastocytome

surexprimant le ligand de PD-1) a conduit à un phénomène d'apoptose des lymphocytes T activés et à une augmentation de la charge tumorale³⁵.

Par ailleurs, d'autres essais ont été effectués chez des souris immunodéficientes, xénogreffées par des cellules C38 de cancer colorectal. Il a été montré que l'absence de la protéine PD-1 sur les lymphocytes T, provoquait une destruction de la tumeur³⁶.

Au-delà des essais effectués chez l'animal, les résultats obtenus lors de la phase 1 d'escalade de dose du nivolumab en 2008, ont permis de fonder des bases solides quant au bénéfice de l'utilisation des agents interférents avec le système PD-1/PD-L1. Dès la phase initiale des essais clinique, les premiers signes d'une réponse partielle ont été montrés. En effet, les données reportées pour le patient 4033, atteint d'un carcinome rénal, ont laissé observer une diminution de la taille de la tumeur après trois doses de nivolumab³⁷ [Figure 9].



Figure 9. Imagerie IRM de la régression d'une tumeur rénale chez le patient 4033 dans l'essai de phase 1 du nivolumab. Une réponse partielle est visible au 22 avril 2008. Au 22 juillet 2008 la taille de la tumeur a été divisée par deux³⁷.

Devant la révolution observée en usage clinique des inhibiteurs du complexe PD-1/PD-L1, la recherche s'est progressivement tournée vers l'analyse structurale plus fine de ces protéines.

C] Structures protéiques et interactions au sein du complexe PD-1/PD-L1.2

1] Structure de la protéine PD-1

La découverte et l'utilisation des anticorps monoclonaux ciblant l'un ou l'autre des interactants, PD-1 ou PD-L1/2, a permis d'élucider plus en détail la structure protéique du complexe. Ainsi, la détermination de *hotspots* permet d'envisager, à l'heure actuelle, le développement de nouvelles entités chimiques (petites molécules ou

pseudo-peptides) ayant une affinité comparable aux anticorps monoclonaux afin de remédier à leurs inconvénients.

Le récepteur PD-1 est une protéine codée sur le chromosome 2, bras long (2.q37)³⁸. Il s'agit d'une protéine membranaire de type I constituée de trois domaines principaux. Le domaine N-terminal, extracellulaire, comporte une séquence signal, un domaine *immunoglobuline-like* à partie variable (IgV), utile pour la reconnaissance des ligands ainsi qu'une région *stalk* suivant le motif transmembranaire [Figure 8 et Figure 10]. Ce domaine comporte plusieurs sites de glycosylation. Le domaine transmembranaire repose sur une hélice alpha hydrophobe unique. Enfin le domaine intracellulaire est responsable de l'initiation du signal inhibiteur de la réponse immunitaire. Il est pourvu de deux motifs structuraux riches en tyrosine : ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) et ITSM (*immunoreceptor tyrosine - based switch motif*)^{5,38,39}. Après reconnaissance du ligand, les résidus tyrosine subissent une phosphorylation. Celle-ci permet alors d'obtenir une conformation capable de recruter les phosphatases SHP 1 et/ou 2 (Scr homology region 2 domain-containing phosphatase 1-2) et de les activer. Une fois activé, SHP 1 et/ou 2 seront capables d'atténuer le signal activateur de la réponse immunitaire en déphosphorylant les kinases induites par la reconnaissance p-CMH I-TCR (cascade PI3K-AKT-mTorc et RAS-MEK-ERK) [Figure 10]^{39,40}.

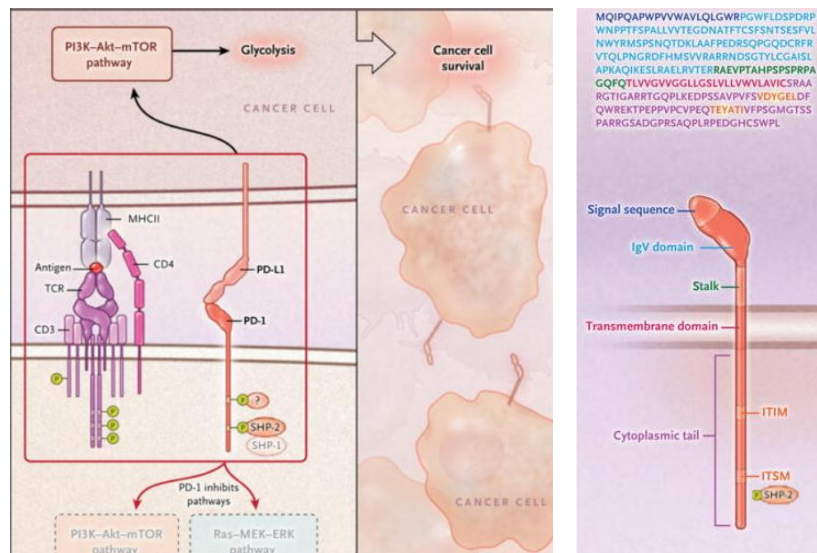


Figure 10. Interaction PD-1/PD-L1 inhibant la cascade de kinases des voies PI3K-Akt-mTOR et Ras-MEK-ERK. L'expression de PD-L1, induit par différentes mutation au sein de la cellule cancéreuse, conduit à une tolérance immunologique vis-à-vis du cancer (à gauche). Séquence d'acides aminés de la protéine PD-1 accompagné de la structure annoté par domaine⁴⁰.

2] Structure des ligands de PD-1 : PD-L1 et 2

Pour être activée et inhiber la réponse immunitaire, la protéine PD-1 possède deux ligands PD-L1 et PD-L2 appartenant à la même famille protéique que les récepteurs CTLA-4/B7/CD28⁴¹. Ces protéines transmembranaires sont codées sur le chromosome 9, bras court (9.p24)³⁹.

D'un point de vue structural, PD-L1 et PD-L2 sont des protéines transmembranaires de type I présentant, comme leur récepteur PD-1, un seul et unique domaine transmembranaire. Le domaine extracellulaire responsable de la liaison avec PD-1 présente deux sous-parties relié par un *linker* de petite taille. Les domaines de liaison de PD-L1 et PD-L2 sont des domaines *immunoglobulin-like* comme ceux de PD-1⁴². Le domaine N-terminal est responsable de la reconnaissance avec PD-1 alors que la fonction du domaine C-terminal reste encore indéfinie. Il est supposé que ce domaine serait nécessaire pour élonger la protéine de la membrane cellulaire afin d'être disponible pour lier son récepteur.

PD-L1 et PD-L2 présente un profil d'expression différent. En effet, PD-L1 est constitutivement exprimé à bas niveau sur les cellules présentatrices d'antigènes activées ou quiescentes (cellules dendritiques, macrophages...), tout comme sur les cellules de l'endothélium vasculaire, les ilots pancréatiques, ou encore sur des sites privilégiés de l'immunité (placenta, testicules, yeux...)^{39,40,42}. L'expression de PD-L1 est induite suite à l'exposition à des signaux pro-inflammatoires tels que les interférons (INF I et II), le *tumor necrosis factor* α (TNF- α), ou le *vascular endothelial growth factor* (VEGF). L'expression de PD-L2 est principalement augmentée en présence de cytokines comme les interleukines (IL-4) mais répond également aux mêmes stimuli que celle de PD-L1. PD-L2 est exprimé à la surface des cellules dendritiques et macrophages activées.

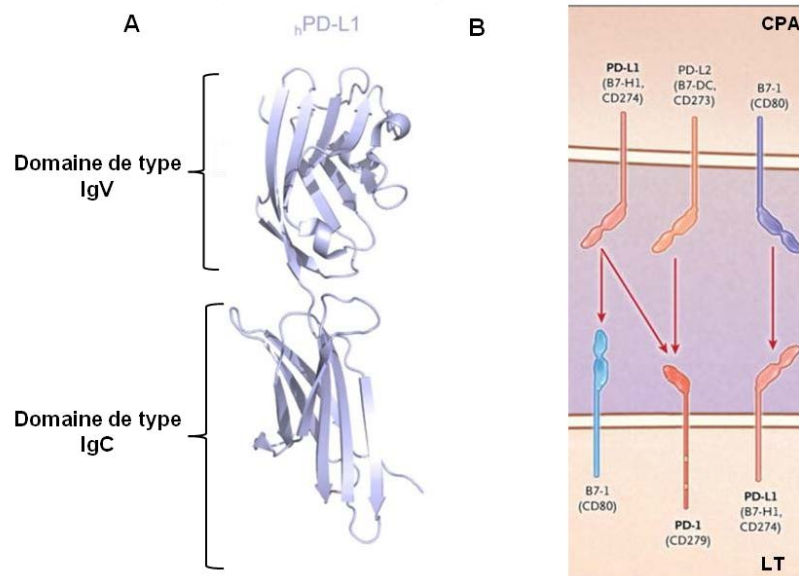


Figure 11. A) Structure de la partie extracellulaire de la protéine PD-L1 humaine⁴². B) Profil de reconnaissance de PD-L1 et PD-L2⁴⁰.

Bien qu'étant reconnu par PD-1, ces deux ligands sont aussi capables de reconnaître d'autres récepteurs membranaires impliqués dans l'immunité. PD-L1 peut reconnaître le récepteur B7-1, exprimé comme PD-1 sur les lymphocytes T activés. Cette reconnaissance produit aussi un signal inhibiteur de la réponse immunitaire [Figure 11].

3] Interaction au sein du complexe PD-1/PD-L1

L'interaction PD-1 murin avec PD-L1 humain a été décrite en 2008. Plus récemment, la structure du complexe PD-1/PD-L1 humain a été reporté Krzysztof M. Zak *et al* en 2015 (code PDB : 3RRQ)⁴³. Les données obtenues ont permis de distinguer les acides aminés responsables de l'interaction entre les deux protéines [Figure 13]. Les protéines PD-1 et PD-L1 sont constituées d'un assemblage de 9 feuillets β (ABCC'C''DEFG) parallèles. Un pont disulfure, entre les feuillets B et F, permet ensuite d'obtenir une organisation en forme de sandwich. La première face étant constituée des feuillets ABED et l'autre des feuillets GFCC' [Figure 12].

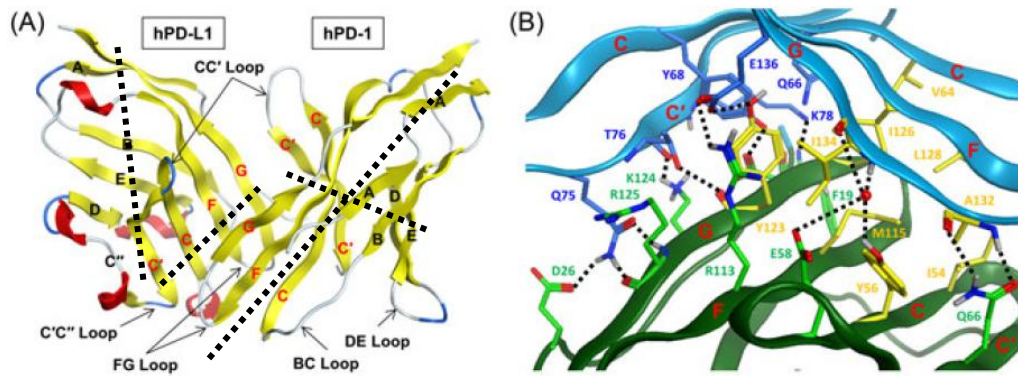


Figure 12. Structure annotée par feuillets de la protéine PD-1 interagissant avec son ligand PD-L1. L'organisation en sandwich des feuillets des deux protéines est indiquée par des pointillés (en A). Les chaînes latérales des acides aminés clés de l'interaction sont présentées (en B) ⁴³.

L'ensemble de la surface d'interaction représente environ 1900 Å². Elle résulte de la connexion entre les structures en feuillet β GFCC' disposé de façon antiparallèle. S'établit alors trois niveaux d'interaction entre les deux protéines^{5,43} :

- Un cœur central composé essentiellement de résidus hydrophobes.
- Un second cercle d'interaction composé d'une alternance de résidus hydrophobes et polaire.
- Et d'une troisième sphère d'interaction constituée de résidus plus polaire utilisant le solvant pour créer des liaisons hydrogènes entre les chaînes principales des protéines.

L'interface d'interaction de ces deux protéines est donc composé à la fois de résidus hydrophobes et de résidus polaires entourant une séquence apolaire de cinq acides aminés. Il s'agit respectivement des acides aminés : Val64, Ile126, Leu128, Ala132 et Ile134 pour PD-1 et Ile54, Tyr56, Met115, Ala121 et de la Tyr123 pour PD-L1 humain^{5,43} [Figure 13].

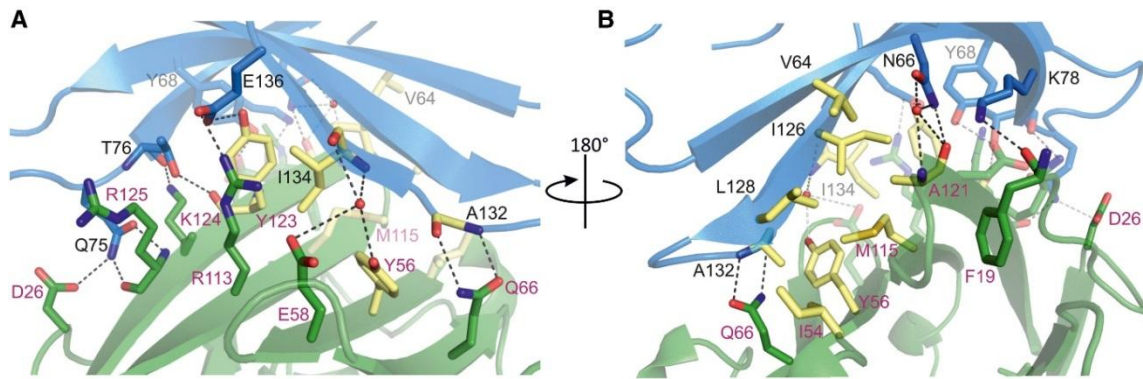


Figure 13. interface d'interaction entre la protéine PD-1 et PD-L1^{39,43,44}.

Un réseau complexe de liaison hydrogènes s'établit alors entre les deux partenaires. Des études de mutagenèses dirigées utilisant la technique de l'Alascan virtuel ont conduit à la détermination de plusieurs résidus clés, ou *hotspots*, responsables de l'affinité entre PD-1 et PD-L1. Cette technique consiste à remplacer chacun des résidus par une alanine, un à un, et de mesurer de la force d'interaction entre les protéines après perte de l'acide aminé remplacé. Sur PD-L1 se trouve les *hotspots* suivants : Tyr56, Gln66, Met115, Asp122, Tyr123 et Arg125. Ceux-ci sont à l'origine de liaisons hydrogènes intermoléculaires entre les chaînes latérales de résidus inclus dans une architecture anti parallèle entre les deux interactants [Figure 14].

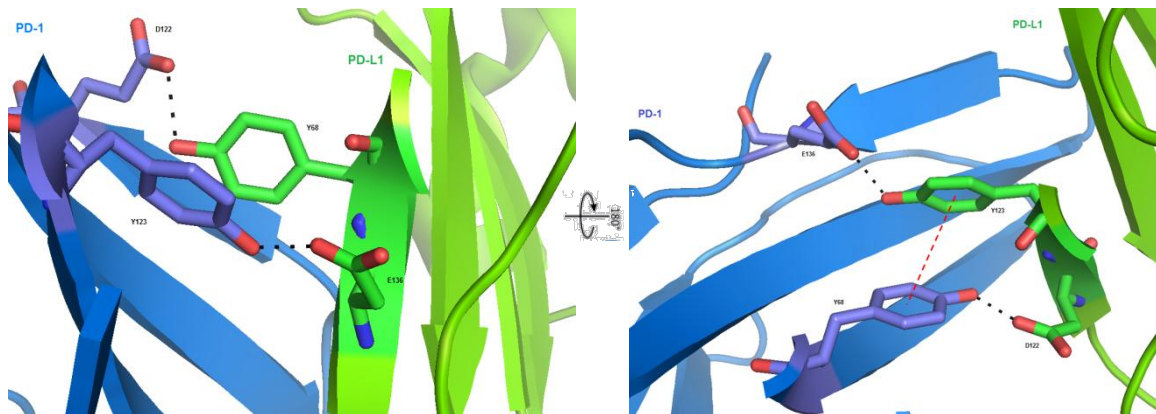


Figure 14. Exemple d'interactions hotspots entre PD-1 et PD-L1. Deux liaisons hydrogènes sont visibles entre les résidus D122 (Asp122), Y123 (Tyr123) de PD-L1 et Y68 (Tyr68) et E136 (Glu 136) de PD-1. Une interaction de type pi-pi est également visible entre les tyrosines 123 et 68 des deux protéines. Images obtenues avec le logiciel Pymol® (code PDB : 3RRQ).

Ces mêmes résidus sont impliqués dans l'interaction entre le PD-L1 et ses anticorps monoclonaux spécifiques [Figure 16 - Figure 19].

IV] Des Anticorps monoclonaux aux petites molécules organiques de synthèse

En 2019, pas moins de cinq anticorps monoclonaux ciblant le complexe PD-1/PD-L1 ont été approuvés depuis la découverte du nivolumab en 2008^{10,37,39,45}. Ciblant PD-1, deux spécialités sont disponibles : le nivolumab (OPDIVO®) commercialisé par le laboratoire Bristol-Myers Squibb (BMS) et le pembrolizumab (KEYTRUDA®) commercialisé par le laboratoire Merck Sharp & Dohme (MSD). Concernant PD-L1 trois spécialités sont disponibles : l'atezolizumab (TECENTRIQ®), l'avelumab (BAVENCIO®), et le durvalumab (IMFINZI®), commercialisés respectivement par Roche, Pfizer, et AstraZeneca [Figure 15].



Figure 15. Illustrations des différentes spécialités sur le marché en 2019 ciblant le complexe PD-1/PD-L1. Image obtenues sur les différents sites web des laboratoires pharmaceutiques exploitants : BMS, MSD, Genentech (Roche), Pfizer et AstraZeneca.

Toujours source d'intérêts pour la santé humaine, ces spécialités font l'objet d'études cliniques visant à connaître leur efficacité seul versus en combinaison avec d'autres stratégies anticancéreuses.

A] Les anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1 : mode d'action, avantages et limites

1] Bases structurales d'interaction des anticorps monoclonaux avec PD-1 et PD-L1

Depuis l'apparition des anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1, de nombreuses structures co-cristallisées ont été reportées dans la littérature scientifique afin de comprendre plus en détail le mode de liaison de ces inhibiteurs d'interaction protéine-protéine (*PPIs* ou protein-protein interaction inhibitors)^{27,39,44,46}

a] Mode de liaison des anti-PD-1

Les données issues de l'analyse des co-cristallographies entre PD-1 et le nivolumab ou pembrolizumab ont permis de mettre en évidence un mode d'interaction similaire à celui effectué par le ligand de PD-1, PD-L1^{27,44} [Figure 16a et Figure 16c].

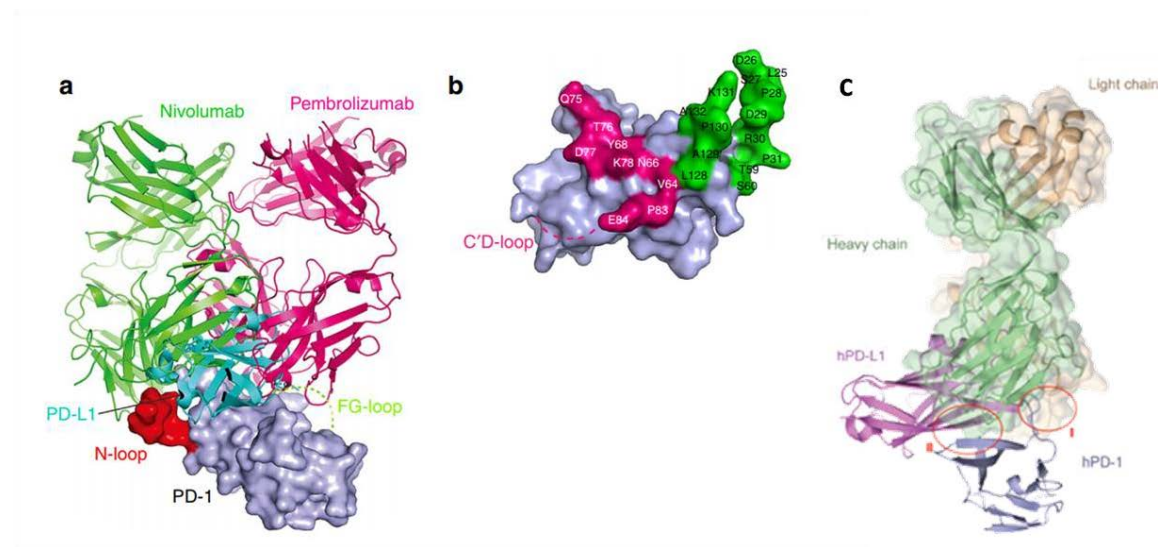


Figure 16. a] Superposition de PD-1 (représenté en surface grise) avec le nivolumab (en vert) et le pembrolizumab (en magenta). b] Surface de liaison de PD-1 avec le nivolumab (en vert) et le pembrolizumab (en magenta)²⁷. c] Superposition du fragment Fab du pembrolizumab avec le PD-L1, liant la protéine PD-1 humaine⁴⁴.

Cependant, le nivolumab et le pembrolizumab vont lier deux parties distinctes de la protéine PD-1 tout en partageant une zone d'interaction commune au niveau des résidus Asp66, Val64, Leu128 et Ala129 [Figure 16b].

a.1] Liaison du pembrolizumab avec PD-1

L'interaction entre le pembrolizumab et la protéine PD-1 représente une surface d'environ 1 774 Å² soit la quasi-totalité de l'interface entre PD-1 et son ligand PD-L1. Elle peut être divisée en deux parties comme représenté en [Figure 16b]⁴⁴ :

- Une première partie de la reconnaissance anticorps/PD-1 s'effectue entre la boucle reliant le feuillet C'D de PD-1 et les domaines L1, L3 et H2 du fragment

variable (Fab) du pembrolizumab. (Par soucis de compréhension les résidus des chaînes variables du pembrolizumab seront labélisés de la lettre L pour la chaîne légère « *light chain* » et de la lettre H pour la chaîne lourde « *heavy chain* »).

Cette première région d'interaction est majoritairement constituée de résidus à chaîne polaire ou hydrophobe. L'asparagine 85 interagit par deux liaisons hydrogènes avec l'arginine H99 du pembrolizumab. La sérine 87 fait elle aussi une interaction hydrogène avec cette arginine mais au niveau de la chaîne principale de l'anticorps. Les chaînes latérales des résidus tyrosine L36, tyrosine H35, asparagine H59 et de la thréonine H58, du pembrolizumab, entrent également en interaction avec les résidus glutamate 84, glutamine 88, et glycine 90 de la protéine PD-1. Enfin deux arginines sont disposés de façon perpendiculaire, « *T-stacking* », en position 86 de PD-1 et L96 sur l'anticorps [Figure 17].

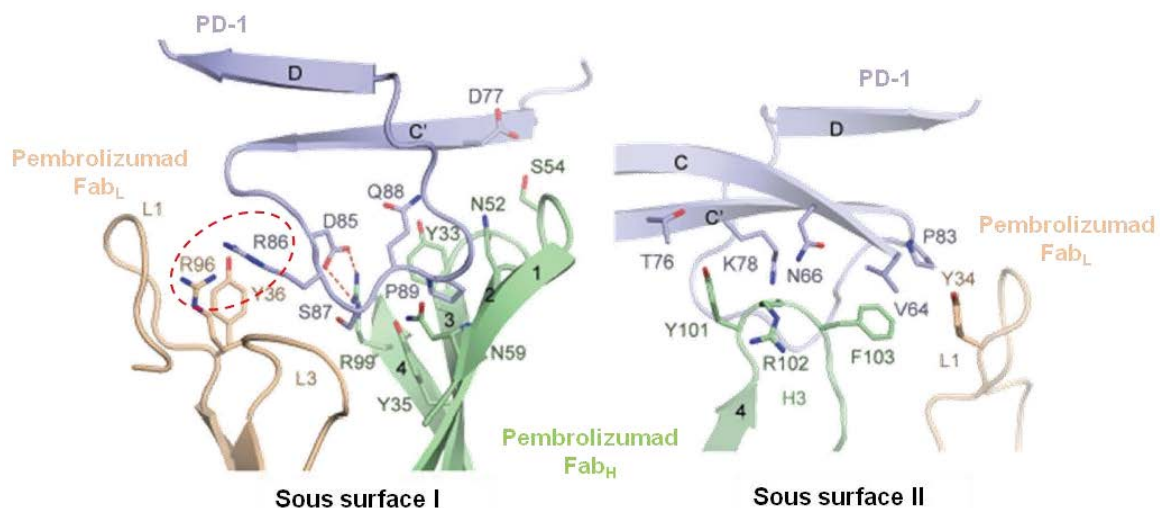


Figure 17. Vue des deux sous surface d'interaction entre PD-1 et la partie variable du Fab du Pembrolizumab. PD-1 est représenté en bleu, les domaines L1 et L3 des chaînes légères du pembrolizumab sont représentés en orange clair et le domaine H3 de la chaîne lourde du pembrolizumab est représenté en vert clair⁴⁴.

- La seconde sous surface d'interaction est majoritairement représentée par des interactions hydrophiles.

L'asparagine 66 de PD-1 lie l'arginine H102 du pembrolizumab par une liaison hydrogène (non représenté sur la figure ci-dessus). Il est également à noter une interaction entre la chaîne latérale de la tyrosine H101 du pembrolizumab avec le grou-

pement hydroxyle de la thréonine 76 de PD-1. Cette même tyrosine H101 effectue une liaison de type hydrogène avec la chaîne latérale de la lysine 78 de PD-1. Enfin, la phénylalanine H103 vient occuper une poche hydrophobe formée par la valine 64, la proline 83 de PD-1 et la tyrosine L34 de la chaîne légère du pembrolizumab [Figure 17].

En tant qu'anticorps, le pembrolizumab possède une très forte affinité pour sa cible PD-1. Cette affinité est expliquée par un nombre important d'interactions synergiques entre la partie variable de l'anticorps et l'épitope de la protéine cible. Par ailleurs le pembrolizumab neutralise, par sa liaison, deux des résidus précédemment identifiés comme *hotspots* d'interaction que sont la valine 64 et l'asparagine 66^{39,43,44}.

a.2] Liaison du nivolumab avec PD-1

Le nivolumab présente également une forte affinité pour sa cible PD-1. Il est aussi capable de lier une partie de PD-1 intervenant dans la reconnaissance du ligand de PD-1, PD-L1^{27,39} [Figure 16].

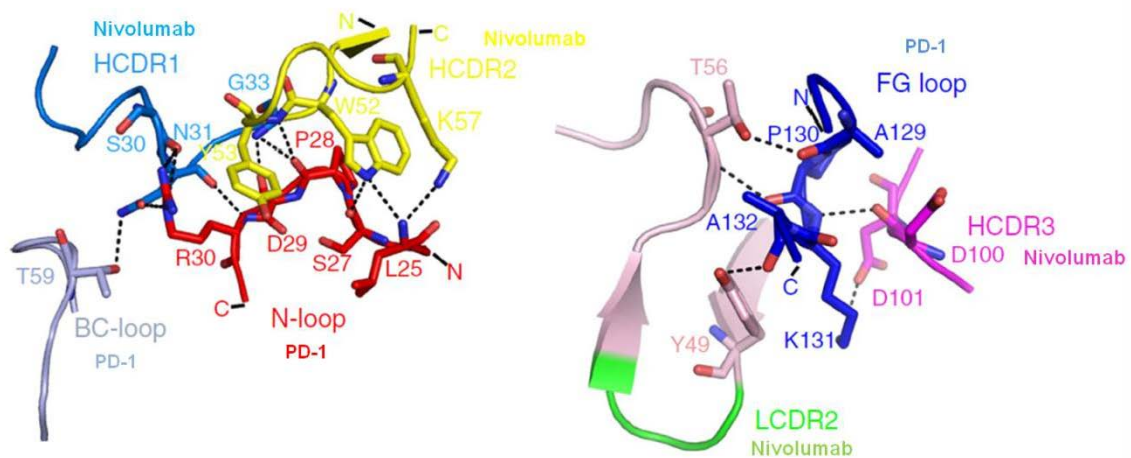


Figure 18. Vue de l'interaction entre les boucles N-terminale et BC de PD-1 avec les domaines variables du nivolumab (à gauche). Vue de l'interaction entre la boucle FG de PD-1 et les domaines variables du pembrolizumab (à droite)²⁷. CDR = Complementary determining regions ou région hypervariable responsable de l'affinité entre paratope et épitope²⁷.

La surface d'interaction entre le nivolumab et la protéine PD-1 est plus importante que celle effectuée avec le pembrolizumab et représente 1 932.5 Å²²⁷. La forte affinité entre cet anticorps et PD-1 s'explique également par une somme d'interaction synergique présente dans deux sous surfaces :

- La première sous surface renferme les interactions entre la boucle N-terminale (N^t), la boucle reliant les feuillets B et C de PD-1 et les domaines H1 (HCDR1) et H2 (HCDR2) du nivolumab.

Longtemps sous-estimé jusqu'au travaux de [Tan et al.](#)²⁷, la boucle N^t de PD-1 est pourtant responsable de dix interactions de type hydrogène sur seize entre l'anticorps et la protéine. Les résidus impliqués dans ces liaisons hydrogène entre chaînes latérales et/ou chaîne principale sont : la lysine 25, la proline 28, l'aspartate 29, l'arginine 30. Ils sont reconnus par la sérine H30, l'asparagine H31 et la chaîne principale de la glycine H33 dans le domaine H1. Au niveau du domaine H2, ceux sont les résidus tryptophane H52, tyrosine H53 et lysine H57 qui forment des liaisons hydrogène avec les acides aminés de PD-1^{5,27}. (Par soucis de simplification et de compréhension les résidus des chaînes variables du nivolumab ont été labélisés de la lettre L pour la chaîne légère « *light chain* » et de la lettre H pour la chaîne lourde « *heavy chain* » comme précédemment pour le pembrolizumab).

La boucle BC de PD-1 ne forme qu'une seule des seize liaisons hydrogènes de la surface d'interaction entre l'anticorps et la protéine cible. Celle-ci s'effectue entre la thréonine 59 de PD-1 et la lysine H31 du domaine H1 de l'anticorps.

- La seconde sous surface d'interaction met en contacte la boucle reliant les feuillets F et G de PD-1 avec les domaines L2 et H3 des chaînes variable du nivolumab. Les cinq interactions restantes (sur les seize au total) sont effectuées entre les résidus alanine 129, proline 130, lysine 131 et alanine 132 de PD-1 et les acides aminés : tyrosine L49, thréonine L56, aspartate H100 et H101 de l'anticorps.

b] Mode de liaison des anti-PD-L1

Après la découverte et l'utilisation révolutionnaire des anticorps anti-PD-1, la recherche s'est intéressée à la découverte d'autres anticorps ciblant désormais l'autre partenaire de cette interaction inhibitrice du système immunitaire : PD-L1 (ligand donnant le moins bon pronostic vital).

Ainsi en 2017, la publication de la structure co-cristallisée du complexe atezolimumab/PD-L1 a permis de confirmer l'importance des résidus « *hotspots* » tel que

la tyrosine 56, la méthionine 115, la tyrosine 123 [Figure 14] et l'arginine 125 par exemple⁴⁶.

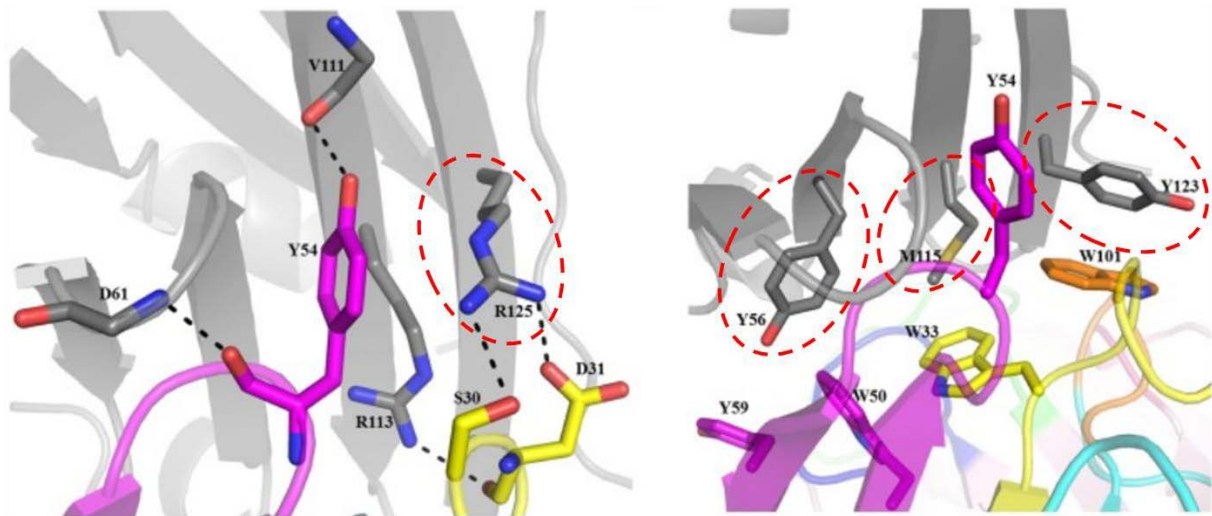


Figure 19. Structure co-cristallisée montrant l'interaction entre l'atezolizumab (anticorps monoclonal humanisé ciblant la protéine PD-L1) et PD-L1. Les résidus de l'atezolizumab sont représentés en couleurs (violet, jaune, orange) et les résidus de PD-L1 sont représentés en gris. Les acides aminés clés de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 sont entourés par des cercles pointillés rouges⁴⁶.

Possédant une forte affinité pour leur cible, les anticorps monoclonaux ciblant l'une ou l'autre de ces protéines immunomodulatrices ont été une vraie révolution dans la thérapeutique de certains cancers comme le mélanome ou encore le cancer du poumon non à petites cellules^{22,37,47}.

2] Utilisation en clinique des anticorps monoclonaux : avantages et limites

Après quelques années d'utilisation clinique des anti-PD-1/PD-L1, ces biothérapies se sont révélées très avantageuses. Entre autre, il s'agit des premières thérapies permettant d'obtenir une réponse efficace et durable (réduction de la charge tumorale) chez les patients atteints de cancers immunodépendants^{37,39,45}. La survie de patients atteints de cancer à pronostic défavorable a été améliorée d'une durée moyenne de 6 à 21 mois après un cycle de 3 à 5 injections pour le nivolumab par exemple^{37,39}. Par ailleurs, il s'agit également du premier système de thérapie ciblée [à une protéine] permettant une utilisation dans des cancers de topologie différente :

- Pembrolizumab : mélanome de stade avancé non résecable ou métastatique, cancer bronchique non à petites cellules, lymphomes de hodgkin^{10,48}.

- Nivolumab : mélanome de stade avancé non résecable ou métastatique, cancer bronchique non à petites cellules, carcinome à cellules rénales, cancer épidermoïde de la tête et du cou, lymphomes de Hodgkin, carcinome urothéliale^{10,48}.
- Atezolizumab : mélanome de stade avancé non résecable ou métastatique, cancer bronchique non à petites cellules^{10,48}.
- Avelumab : carcinome à cellule de Merkel^{10,48}.
- Durvalumab : cancer du poumon non à petites cellules¹⁰.

Bien qu'ayant montré un intérêt certain et défendu leur place dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux, cette approche nouvelle génération souffre d'ores et déjà de limites poussant de plus en plus la recherche à innover. Les anticorps monoclonaux appartenant à cette famille d'inhibiteur du système PD-1/PD-L1 ont montré une variabilité quant au profil de réponse chez des patients atteints du même type de cancer (localisation identique), notamment pour les cancers de la vessie⁵. D'autres préoccupations existent quant à leurs propriétés intrinsèques et leur mode d'action anticorps spécifique. En effet, la réactivation des lymphocytes T CD4/8⁺ dans d'autres tissus peut être à l'origine de réaction inflammatoires indésirables de type auto-immunes. Ces effets sont communément appelés effets indésirables reliés à l'immunité ou au système immunitaire (*irAEs ou immun related adverse effects en anglais*)⁴⁹⁻⁵². La réactivation trop forte du système immunitaire peut conduire à l'utilisation de corticostéroïdes, la prédnisone (Cortancyl[®]) étant souvent préférée, ou d'immunosuppresseurs afin de diminuer l'agressivité des cellules immunitaires. Cependant, ces adjuvants entrent dans un phénomène d'antagonisme fonctionnel vis-à-vis du mode d'action de nos anticorps immunomodulateurs⁴⁵.

Du fait de leur taille et de leur caractère protéique, les anticorps monoclonaux, en général, peuvent engendrer des réactions d'hypersensibilités comme de l'urticaire, œdèmes, rash cutané jusqu'au choc anaphylactique. De plus, la génération d'anticorps dirigés contre l'anticorps thérapeutique rend l'utilisation du médicament inefficace. L'escalade de dose étant impossible au risque de provoquer des dommages rénaux ou d'augmenter de manière trop importante la viscosité du sang, ce type de biothérapie devient alors risqué.

Un autre désavantage largement décrit dans la littérature scientifique des anticorps monoclonaux reste les problèmes de pharmacocinétique^{5,20,45}. Les anti-PD1/PD-L1 présentent des demi-vies très longue, allant de 6 à 27 jours. Les volumes

de distribution (Vd) de ces macromolécules restent limités et circonscrivent le périmètre d'action de ces médicaments au compartiment vasculaire et quelques organes richement irrigués (cf. utilisation dans les lymphomes hodgkiniens, cancer du rein et du poumon non à petites cellules). La difficulté de diffusion au sein de la tumeur reliée à la taille de ces protéines, aux alentours de 150 kDa, constitue un autre frein à l'obtention d'une efficacité chez les patients de stades avancés^{10,39,45,49-52}.

Enfin, sur le plan médico-économique, l'utilisation de ces anticorps représente un coût non négligeable pour les systèmes de santé des pays où ils sont disponibles. Tout d'abord sur le plan de la fabrication, il est nécessaire de qualifier l'ensemble des lots par des tests pharmacodynamique afin de valider continuellement le mécanisme d'action. Il est également nécessaire de tenir compte de la dérive génétique des systèmes biologiques vivant utilisés pour la production afin d'éviter l'apparition de plusieurs populations d'anticorps^{5,45}. Les conditions de stockage et de transports sont aussi très onéreuses, conservation à -4°C pour la plus part des spécialités qui n'existe pas sous forme prête à l'emploi. Il est alors nécessaire de les reconstituer au sein des unités de préparations aseptiques et de cytotoxiques des établissements de santé. Le coût d'administration reste aussi point noir de la thérapeutique utilisant les anticorps monoclonaux en général. L'administration doit être effectuée en intraveineuse sous surveillance minutieuse du personnel de santé (infirmier et médecins). A cela s'ajoute les frais de transport en ambulance nécessaire tous les 2 à 3 semaines en fonction du protocole de soin et du schéma d'administration de la spécialité concernée³⁹.

B] Recherche d'inhibiteurs peptidiques et pseudo-peptidiques

Au vu de l'efficacité clinique des anticorps anti-PD-1/PD-L1 et des limites quant à leurs usages, discutées dans les parties précédentes, plusieurs équipes de recherche ont décidé d'axer leurs efforts sur la recherche de molécules de plus petite masse moléculaire partageant le même mode d'action.

C] Vers un contrôle plus fin de la pharmacocinétique : les petites molécules organiques

1] Avantages des petites molécules de synthèse organique

Plus en aval des peptides et pseudo-peptides cycliques ou non, plusieurs inhibiteurs prometteurs ciblant PD-1 ou PD-L1/2 sont présentés dans la littérature

comme point de départ pour un programme de découverte de nouveaux médicaments^{53,54}. En effet, certains inconvénients rencontrés lors de l'utilisation de macromolécules, tels que les anticorps monoclonaux, peuvent être totalement ou partiellement résolus grâce au recours à de plus petites molécules issu de la synthèse chimique. Ces petites molécules ont comme premiers avantages d'être mieux absorbées dans l'organisme, permettant même d'obtenir de bon profil pharmacocinétique ainsi qu'une bonne biodisponibilité par voie orale (voie d'administration très souvent plébiscitée par les patients polymédicamentés). Pour le chimiste médicinale, de petites modifications de la structure, au niveau de positions silencieuses de la molécule (c'est-à-dire sur des sites moléculaires ne possédant aucune influence sur l'activité) peuvent permettre par exemple d'augmenter le volume de distribution afin d'atteindre des cibles extravasculaires, de s'accumuler dans le microenvironnement tumorale ou encore de traiter des cancers d'accès difficiles (ostéomes malins, métastases osseuses...)^{39,55}. Les petites molécules peuvent être designées pour avoir des demi-vies de moins d'une journée afin de contrôler l'intensité et l'apparition des effets indésirables relevant d'une hyper-activation du système immunitaire (*irAEs*). D'un point de vue pratique ces médicaments sont aussi plus faciles à formuler et à stocker en comparaison aux anticorps monoclonaux, souvent sensibles. De plus la synthèse chimique de petites molécules est plus reproductible en terme de qualité, de stabilité et d'uniformité des lots fabriqués. Les molécules sont identifiées et caractérisées de manières totales et précises par tout un arsenal d'analyses conventionnelles. Le recours à la spectrométrie de masse (temps de vol – *TOF*), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS), les expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN), l'analyse élémentaire, la mesure du point de fusion, ..., permettent d'obtenir la certitude quant à la structure exacte des composés synthétisés et ceci pour chacun des lots.

Par ailleurs, le coût de production de ces petites entités médicamenteuses reste moindre que se soit pour les patients, les institutions de santé ou les système d'assurance maladie publiques ou privés⁵⁶.

2] Premiers inhibiteurs du complexe PD-1/PD-L1 décrit dans la littérature

Les premières structures reportées dans la littérature sont des molécules issues des travaux du laboratoire pharmaceutique Bristol-Myers Squibb (BMS). Deux

familles de composés biphenyliques possédant des activités intéressantes sur PD-L1 ont fait l'objet de brevets et de publication dans le *Journal of Medicinal Chemistry* en 2017⁵³⁻⁵⁵. Il s'agit de la famille du (2-Méthyl-3-biphenyl)méthanol et de la famille du [3-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2-méthylphényl]méthanol^{39,55} [Figure 20].

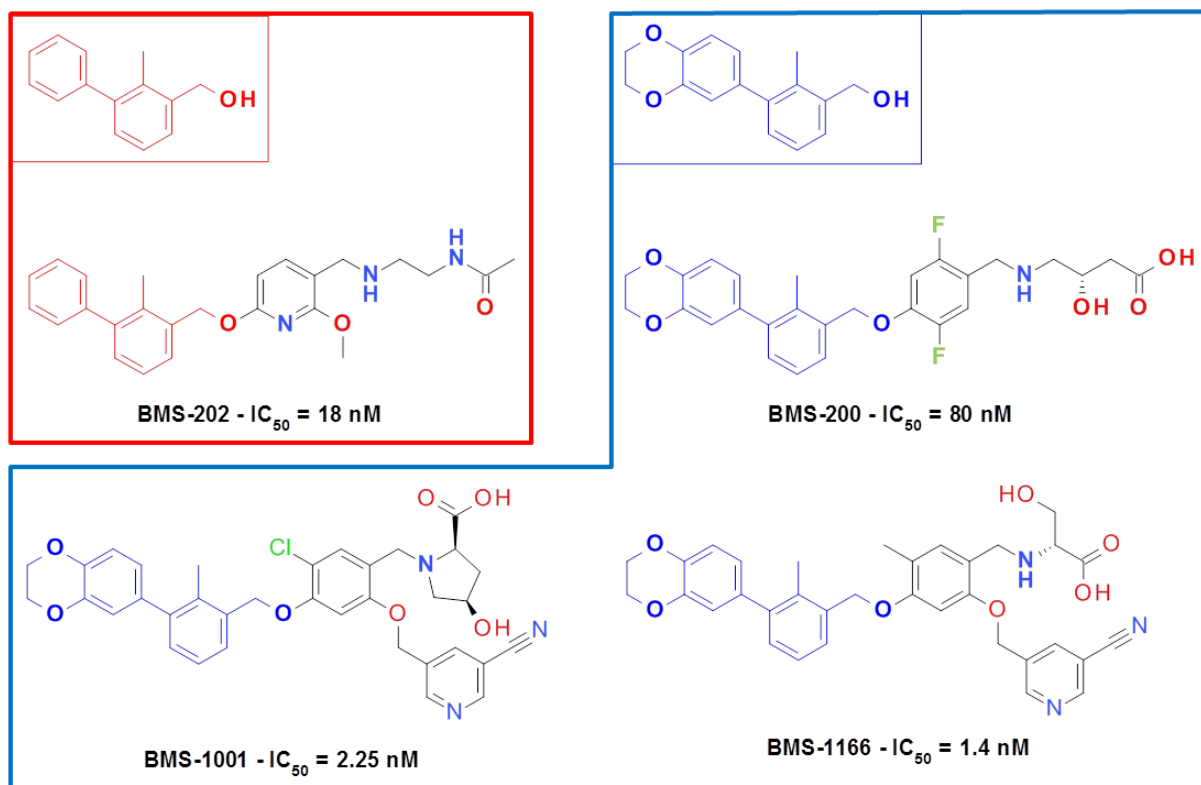


Figure 20. Structures accompagnées des activités (IC_{50}) des composés du laboratoire BMS possédant une activité inhibitrice sur PD-L1. La famille du (2-Méthyl-3-biphenyl)méthanol est encadrée en rouge et représenté par le composé BMS-202. La famille du [3-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2-méthylphényl]méthanol est encadrée en bleu et représentée par les composés BMS-200, 1001 et 1166. Les IC_{50} ont été obtenues à l'aide d'un test d'affinité mesuré par fluorescence avec la technique d' HTRF (homogenous time-resolved fluorescence). Image adaptée de Yang et Hu³⁹, et obtenue à l'aide du logiciel Biovia draw®.

Avec des activités inhibitrices de l'ordre du nanomolaire (de 80 plus la plus faible à 1.4 pour le meilleur produit), les composés biphenyliques développés par BMS peuvent empêcher la reconnaissance de PD-1 avec PD-L1. Ces deux familles de composés sont de puissants inhibiteurs de PD-L1. L'affinité de ces molécules pour le PD-L1 est telle qu'ils sont capables de dimériser deux protéines ligands. Les dimers de PD-L1 ainsi formés, avec les composés de BMS, sont alors incapables d'interagir avec leur récepteur spécifique PD-1⁵⁵. Le composé BMS-202 se lie au sien d'une poche hydrophobe fermée par la tyrosine 56, l'un des *hotspots* d'interaction présent sur PD-L1. Ce site étant également très proche du site d'interaction de PD-1 avec PD-L1. Après interaction avec le composé, la protéine PD-L1 change légèrement de conformation. C'est au niveau des feuillet CC'FG que

la dimérisation va avoir lieu⁵⁵ [Figure 21]. La formation de l'homodimer PD-L1_{A/B} avec l'inhibiteur va masquer le site de reconnaissance de PD-1^{39,55,57}. C'est par ce mécanisme d'action tout à fait inédit que le signal inhibiteur provoquant la tolérance immunologique vis-à-vis du cancer va être empêché.

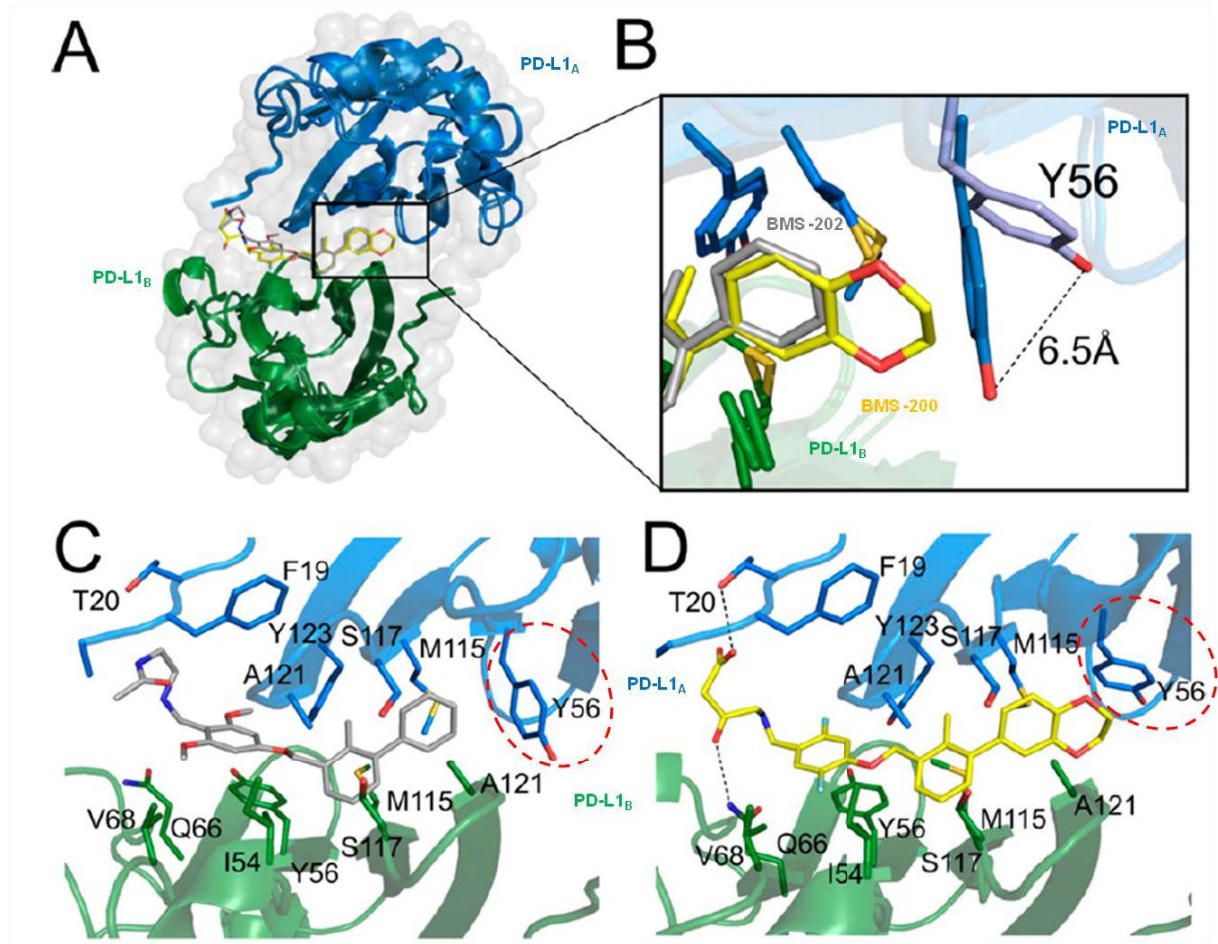


Figure 21. A) Interaction des composés BMS-200 et BMS-202 au sein du dimer PD-L1_A/PD-L1_B formé. B) Modification de conformation de la tyrosine 56 (encadré en rouge) de PD-L1_A induite par le composé BMS-200. C) Liaison du composé BMS-202 au sein du dimer de PD-L1. D) Liaison du composé BMS-200 au sein du dimer de PD-L1. Image adapté de Guzik et al.⁵⁵.

Concernant le mode de liaison des composés de BMS, le changement de conformation induit après liaison du composé BMS-200 permet d'obtenir deux interactions n'existant pas avec le composé BMS-202 [Figure 21 C et D]. Celles-ci sont responsables de la différence d'activité observée entre les deux composés [Figure 20]. L'une d'entre elle s'établie avec la thréonine 20 de PD-L1_A et l'acide carboxylique du BMS-200. La seconde interaction créée est une liaison hydrogène entre l'alcool du composé et la glutamine 66 de PD-L1_B.

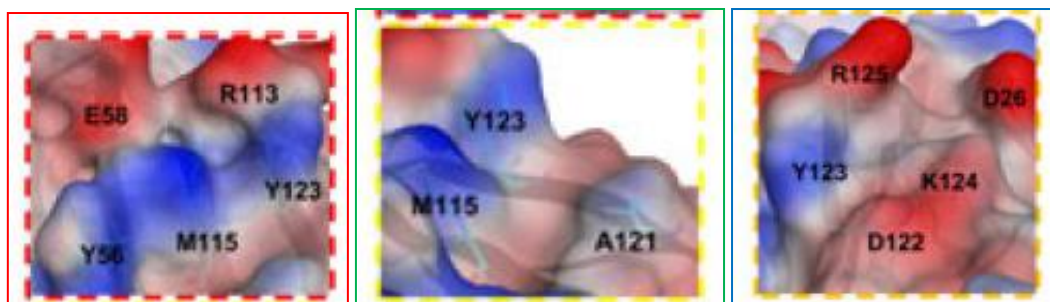


Figure 22. Sites d'interactions disponibles pour l'accueil de petites molécules inhibitrices de la reconnaissance PD-1/PD-L1³⁹.

Suite aux études menées sur la série de composés synthétisés par BMS, trois « pseudo-poches » ou sillons d'interactions ont été mis en évidence afin d'obtenir une bonne activité inhibitrice du système PD-1/PD-L1 [Figure 22] :

- (1) Une première poche se situe entre les chaînes latérales de résidus Tyr56, Glu58, Arg113, Met115 et Tyr123.
- (2) Une seconde cavité potentiellement accessible par un groupement de petite molécule est formée par les résidus Met115, Ala121 et Tyr123.
- (3) Enfin, un troisième sillon est créé entre les résidus Asp122, Tyr123, Lys 124 et Arg125.

Le composé BMS-202 remplit aisément les zones 1 et 3. La partie méthylphényl est alors positionnée non loin de la zone 2.

Bien que prometteur, ces composés ne présentent pas les propriétés physico-chimiques détenues par la majorité des médicaments. Ils ne sont pas « *drug-like* » et ne répondent pas aux règles classiques permettant de prédire une bonne biodisponibilité par voie orale (F) ainsi qu'un bon volume de distribution (Vd) : la règle des 5 de Lipinski, la règle de Weber... Après tests cellulaires, effectués en co-incubant des lymphocytes activés avec des cellules tumorales surexprimant la protéine PD-L1, les composés de BMS ont montré une activité plus faible que les anticorps monoclonaux inscrits dans cette même classe thérapeutique⁵⁷. Cette différence d'activité a ensuite été confirmée par une étude établissant les courbes de dose-réponse. Ces molécules restent néanmoins de bons points de départ ayant permis de preuve de con-

cept quant à la possibilité de bloquer le système PD-1/PD-L1 par de petites molécules.

V] Conclusion et perspectives de recherche

Les efforts déployés ces dernières années afin de cibler les interactions protéines-protéines ont permis de développer des nouveaux médicaments ayant un mécanisme d'action innovant pour des petites molécules organiques.

C'est par exemple le cas du Vénétoclax (Venclyxto[®]), actuellement sur le marché pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) à délétion 17p du gène TP53. Le mode d'action repose sur l'inhibition de l'interaction Bcl-2/Bax au sein des cellules cancéreuses surexprimant des protéines anti-apoptotiques. La structure de ce nouveau principe actif ne répond pas aux règles connues permettant de prédire une bonne biodisponibilité par voie orale (règle des 5, règle de Weber...). Ces observations ainsi que l'utilisation en clinique de cette molécule, ont permis d'ouvrir la voie vers la recherche de nouvelles structures potentiellement actives ne répondant pas aux règles d'antan.

Concernant le système PD-1/PD-L1, l'efficacité des anticorps monoclonaux n'est alors plus à prouver dans le traitement de diverses pathologies d'ordre cancéreuses ou immunologiques. Cependant, les difficultés de contrôle de la pharmacocinétique de ces macromolécules ainsi que les effets indésirables tel que l'auto-immunisation, les réactions d'hypersensibilité (chocs anaphylactiques, urticaire...) ou encore les atteintes spécifiques d'organes (modification de la viscosité du sang, cardiomyopathie, atteintes rénales...), posent la question du retour vers de plus petites entités chimiques issus de la synthèse organique.

A l'instar de la revue publiée par [Yang et Hu](#)³⁹, cette thèse de pharmacie vise à stimuler l'intérêt du ciblage des points de contrôle de l'immunité par de petites molécules organiques. Ces molécules bénéficient de nombreuses années d'études (propriétés physico-chimiques permettant une bonne pharmacocinétique, de la toxicité structure-dépendante...) et présente un coût moindre comparé aux biothérapies. Les contrôles de fabrication, de mise sur le marché et de surveillance sont maintenant bien maîtrisés de l'industrie pharmaceutique et des autorités compétentes.

Pour le moment, seules quelques structures inhibant l'interaction PD-1/PD-L1 ont été publiées dans la littérature scientifique. Les composés de BMS, premiers inhibiteurs décrits, n'ont pas montré une activité suffisante en tests cellulaires en com-

paraison aux anticorps monoclonaux. Cependant, ils constituent un point de départ pour les programmes de *drug discovery* ciblant ces mêmes protéines. La différence d'activité pourrait être directement liée au mode d'action de ces molécules. En effet la dimérisation de PD-L1 nécessite la présence simultanée de deux ligands de PD-1 très proche sur la membrane de la cellule cancéreuse. Par ailleurs, il a été montré que la liaison, seule, des composés de BMS n'était pas suffisante pour bloquer l'interaction des deux protéines transmembranaires^{54,58}.

La recherche de nouvelles structures se poursuit afin de trouver à terme des structures capables de bloquer l'interaction de PD-1 avec PD-L1 sans nécessiter une dimérisation de l'une ou l'autre des protéines.

Bibliographie

1. OMS (Organisation mondiale de la santé). Cancer. <https://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/cancer>.
2. He, M., Rosen, J., Mangiameli, D. & Libutti, S. K. Cancer Development and Progression. in *Microarray Technology and Cancer Gene Profiling* (ed. Mocellin, S.) vol. 593 117–133 (Springer New York, 2007).
3. Sarkar, S. *et al.* Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 21087–21113 (2013).
4. Chapman, P. B. *et al.* Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–2516 (2011).
5. Yang, J. & Hu, L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules: YANG AND HU. *Med. Res. Rev.* **39**, 265–301 (2019).
6. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
7. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321–330 (2017).
8. Stratikos, E., Stamogiannos, A., Zervoudi, E. & Fruci, D. A Role for Naturally Occurring Alleles of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidases in Tumor Immunity and Cancer Pre-Disposition. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
9. Urruticoechea, A. *et al.* Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3–10 (2010).
10. VIDAL - Classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique. <https://www.vidal.fr/classifications/atc/>.
11. VIDAL - Classification Vidal. <https://www.vidal.fr/classifications/vidal/>.
12. Stewart, E. A. *et al.* Uterine fibroids. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16043 (2016).

13. Wu, P., Nielsen, T. E. & Clausen, M. H. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov. Today* **21**, 5–10 (2016).
14. Fruman, D. A. & Rommel, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 140–156 (2014).
15. Roskoski, R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* **103**, 26–48 (2016).
16. De l'immunité innée à l'immunité adaptative & Complexe majeur d'histocompatibilité – Cours Pharmacie. <https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/de-limmunité-innée-a-limmunité-adaptative-et-complexe-majeur-d%E2%80%99histocompatibilité.html>.
17. Cifaldi, L. *et al.* Natural Killer Cells Efficiently Reject Lymphoma Silenced for the Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing. *Cancer Res.* **71**, 1597–1606 (2011).
18. Węglarz-Tomczak, E., Vassiliou, S. & Mucha, A. Discovery of potent and selective inhibitors of human aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 by screening libraries of phosphorus-containing amino acid and dipeptide analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 4122–4126 (2016).
19. Clinical significance of five immunoglobulin tests – Creative Diagnostics Blog. <https://www.creative-diagnostics.com/blog/index.php/clinical-significance-of-five-immunoglobulin-tests/>.
20. Peters, C. & Brown, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Biosci. Rep.* **35**, e00225–e00225 (2015).
21. Corthay, A. Does the Immune System Naturally Protect Against Cancer? *Front. Immunol.* **5**, (2014).
22. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
23. Thomas, K. & Avrion, M. N. Tolerance and Autoimmunity. *Adv. Immunol.* **10** (2001).
24. Romagnani, S. Immunological tolerance and autoimmunity. **2**.

25. Millet, A., Martin, A. R., Ronco, C., Rocchi, S. & Benhida, R. Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges: METASTATIC MELANOMA. *Med. Res. Rev.* **37**, 98–148 (2017).
26. Couzin-Frankel, J. Cancer Immunotherapy. *Science* **342**, 1432–1433 (2013).
27. Tan, S. *et al.* An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. *Nat. Commun.* **8**, 14369 (2017).
28. June, C. H., Warshauer, J. T. & Bluestone, J. A. Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy? *Nat. Med.* **23**, 540–547 (2017).
29. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–151 (1999).
30. Nishimura, H. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. *Science* **291**, 319–322 (2001).
31. Ansari, M. J. I. *et al.* The Programmed Death-1 (PD-1) Pathway Regulates Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic (NOD) Mice. *J. Exp. Med.* **198**, 63–69 (2003).
32. Kanai, T. *et al.* Blockade of B7-H1 Suppresses the Development of Chronic Intestinal Inflammation. *J. Immunol.* **171**, 4156–4163 (2003).
33. Salama, A. D. *et al.* Critical Role of the Programmed Death-1 (PD-1) Pathway in Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **198**, 71–78 (2003).
34. Shen, L. *et al.* PD-1/PD-L pathway inhibits M.tb-specific CD4+ T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis. *Sci. Rep.* **6**, 38362 (2016).
35. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800 (2002).
36. Juneja, V. R. *et al.* PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **214**, 895–904 (2017).

37. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3167–3175 (2010).
38. Shinohara, T., Taniwaki, M., Ishida, Y., Kawaichi, M. & Honjo, T. Structure and Chromosomal Localization of the Human PD-1 Gene (PDCD1). *Genomics* **23**, 704–706 (1994).
39. Yang, J. & Hu, L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules. *Med. Res. Rev.* **39**, 265–301 (2019).
40. Boussiotis, V. A. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1767–1778 (2016).
41. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. THE B7 FAMILY REVISITED. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 515–548 (2005).
42. Zak, K. M. *et al.* Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure* **25**, 1163–1174 (2017).
43. Zak, K. M. *et al.* Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure* **23**, 2341–2348 (2015).
44. Na, Z. *et al.* Structural basis for blocking PD-1-mediated immune suppression by therapeutic antibody pembrolizumab. *Cell Res.* **27**, 147–150 (2017).
45. Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A. & George, A. J. T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 325–338 (2010).
46. Zhang, F. *et al.* Structural basis of the therapeutic anti-PD-L1 antibody atezolizumab. *Oncotarget* **8**, (2017).
47. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–489 (2011).
48. Guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique - Mars 2018. http://moodle.univ-lille2.fr/pluginfile.php/286158/mod_resource/content/14/co/module_Acthera.html.
49. OPDIVO Notice d'utilisation. BMS. (2018).

50. TRECENTRIQ Notice d'utilisation. Genentech. (2018).
51. Bavencio Notice d'utilisation. EMD Serono. (2017).
52. IMFINZI Notice d'utilisation. AstraZeneca. (2018).
53. Chupak L. & Zheng X. COMPOUNDS USEFUL AS IMMUNOMODULATORS, BMS PATENT. (2015).
54. Chupak LS & Ding M. Preparation of substituted 2,4-dihydroxybenzylamines as immunomodulators, BMS patent. (2018).
55. Guzik, K. *et al.* Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. *J. Med. Chem.* **60**, 5857–5867 (2017).
56. Edelman, B. Explaining the cost of biotech therapies. *Biotechnol. Healthc.* **1**, 37–41 (2004).
57. Zak, K. M. *et al.* Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure* **23**, 2341–2348 (2015).
58. Yang, J. & Hu, L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules. *Med. Res. Rev.* **39**, 265–301 (2019).

Université de Lille
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Année Universitaire : 2018/2019

Nom : PRUVOST

Prénom : ALEXIS

Titre de la thèse : Nouvelles approches de modulation des points de contrôle de l'immunité par les petites molécules en onco-immunologie.

Mots-clés : Petites molécules organiques, Immunité, Cancer, Traitement, Nouvelles approches, Modulation de l'immunité, PD-1/PD-L1-2, CTLA4-CD80/86.

Résumé :

Depuis l'apparition des premières thérapies anticancéreuses non ciblées, l'avancé des connaissances sur la physiopathologie du cancer et son interaction avec le système immunitaire a permis de mettre en évidence le rôle clé de celui-ci. Les points de contrôle de l'immunité, souvent surexprimés dans de nombreux cancers (mélanome, carcinome rénal, cancer de la prostate ou encore du colon...) représentent les nouvelles cibles pour une réactivation de la réponse immunitaire anticancéreuse. Les protéines PD-1 et CTLA-4 ainsi que leurs ligands sont déjà la cible de médicaments récents que sont les anticorps monoclonaux inhibiteurs des « *immun checkpoints* » (ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab, darvalumab...). Ces macromolécules bien qu'ayant révolutionnées le traitement du cancer, présentent des inconvénients, principalement sur le plan pharmacocinétique et du coût. L'obtention de nouvelles informations structurales sur l'interaction entre PD-1 et son ligand PD-L1 ouvre désormais la voie pour la synthèse de nouveaux inhibiteurs de faible poids moléculaire issu de la synthèse chimique classique. Plusieurs inhibiteurs puissants du système PD-1/PD-L1 ont déjà été décrits dans la littérature et pose les bases de l'inhibition de cette interaction. Le ciblage des interactions protéine-protéines reste ardu pour les petites molécules mais la découverte et le blocage des *hotspots* d'interaction peut permettre d'obtenir de nouveaux médicaments avec les propriétés pharmacocinétiques contrôlées pour pallier aux limites des anticorps monoclonaux tout en gardant l'efficacité démontrée par ceux-ci.

Membres du jury :

Président : Pr. Rébecca Deprez-Poulain, PU, Faculté de Pharmacie de Lille

Assesseur(s) : Dr. Christophe Carnoy, MCU, Faculté de Lille

Membre(s) extérieur(s) : Dr. Sophie Duquesnoy, Pharmacien d'officine, Pharmacie du Bailliage, Aire sur la lys