

# Les biothérapies ( moléculaires, cellulaires, immunosuppresseurs et anti-inflammatoires )

## Introduction

Les biothérapies sont l'ensemble des thérapeutiques basées sur l'emploi d'organismes vivants (cellules, tissus) ou de substances prélevées sur des organismes (hormones, extraits d'organes ou de tissus).

Ces biothérapies englobent :

- Les thérapies utilisant des **médicaments copiant des molécules naturelles du corps humain**, tels que des hormones, des anticorps ou des protéines bioactives (facteurs de croissance)
- **Les thérapies cellulaires** (manipulation de cellules souches ou différenciées)
- **Les thérapies tissulaires** (différentes greffes de tissus vivants)
- **Les thérapies géniques** (transfert de gènes, intervention sur les gènes)

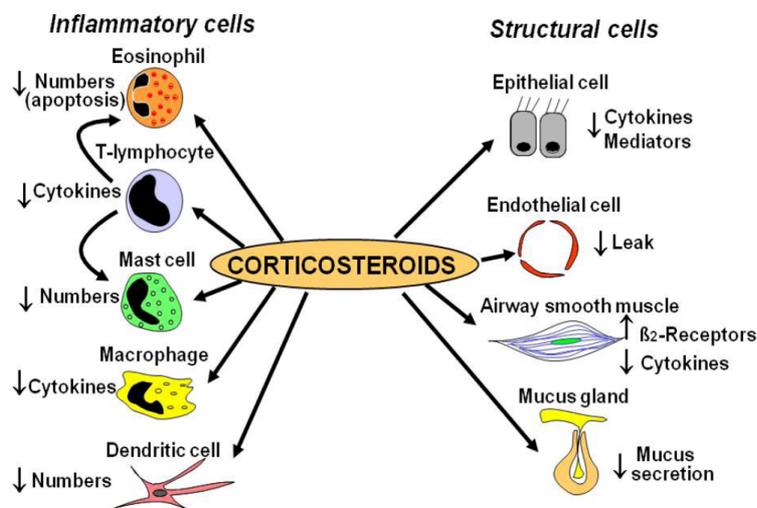
## I- Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des anti-inflammatoires et des immuno-modulateurs naturels puissants qui participent au maintien de la réponse immunitaire.

*En France, l'autorisation de mise sur le marché de la prednisonne ( ex : Cortancyl ) date de 1995 et cette autorisation concerne actuellement plus d'une centaines de maladies.*

### A - Action sur le système immunitaire

Les glucocorticoïdes ont des **cellules cibles**, ils touchent toutes les cellules de l'immunité, des plus complexes ( lymphocytes ) aux plus simples ( polynucléaires neutrophiles, mastocytes, cellules dendritiques, monocytes/macrophages, cellules endothéliales )



Ces corticostéroïdes agissent sur les différentes phases de la **réponse inflammatoire** :

- **Phase vasculaire** ( douleur, rougeur, chaleur, oedeme )  
Au cours de cette phase précoce, la libération des prostaglandines entraîne une vasodilatation ce qui favorise l'arrivée des cellules immunitaires et provoque une fuite protéique extra-vasculaire.  
→ Les glucocorticoïdes sont capables d'inhiber la synthèse des prostaglandines.
- **Phase cellulaire**  
→ Les glucocorticoïdes diminuent l'action des polynucléaires en inhibant l'adhésion des PN à l'endothélium, le passage trans-endothéliale, et la migration vers le tissu agressé.
- **Phase résolutive**  
→ Les glucocorticoïdes inhibent la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires et au contraire favorisent la production de médiateurs anti-inflammatoires comme IL-10 ou encore l'antagoniste de l'IL-1.

**Au cours de l'immunité acquise**, les glucocorticoïdes agissent principalement sur les interactions entre les cellules présentatrices d'antigènes ( CPA ), les cellules dendritiques et les lymphocytes T.

En effet, **sur les CPA**, les glucocorticoïdes diminuent l'expression des antigènes HLA de classe II et des molécules de co-stimulation ( CD80, CD86 ), ce qui rend les CPA tolérogènes donc incapables d'activer les LT.

Ils agissent également en réorientant la synthèse de cytokines par les CPA.

Les CPA produisent moins d'IL-12 ( ce qui diminue les réponses Th1 ) mais produisent plus d'IL-10 et de TGF- $\beta$  ( ce qui favorise la polarisation des LT en lymphocytes régulateurs ).

De plus, **au niveau des LT**, les glucocorticoïdes diminuent la migration tissulaire des LT, ils diminuent également, via l'inhibition de la synthèse d'IL-2, l'activation des LT et leur repolarisation en lymphocytes Th-1

## **B - Mécanisme d'action des glucocorticoïdes**

**Ils ont une action pléiotrope** car ils agissent sur le cœur, le foie, les muscles striés périphériques, le tissu adipeux, les os et les cellules du système immunitaire.

Les glucocorticoïdes naturels et synthétiques sont transportés dans le sang sous forme de complexes réversibles avec des protéines de transport ( albumine et la transcortine ). Seuls les formes libres ( 10% ) sont biologiquement actives.

Les glucocorticoïdes sont des substances lipophiles qui ont la possibilité de diffuser passivement à travers la membrane plasmique de la cellule, **ils ont une action cellulaire**.

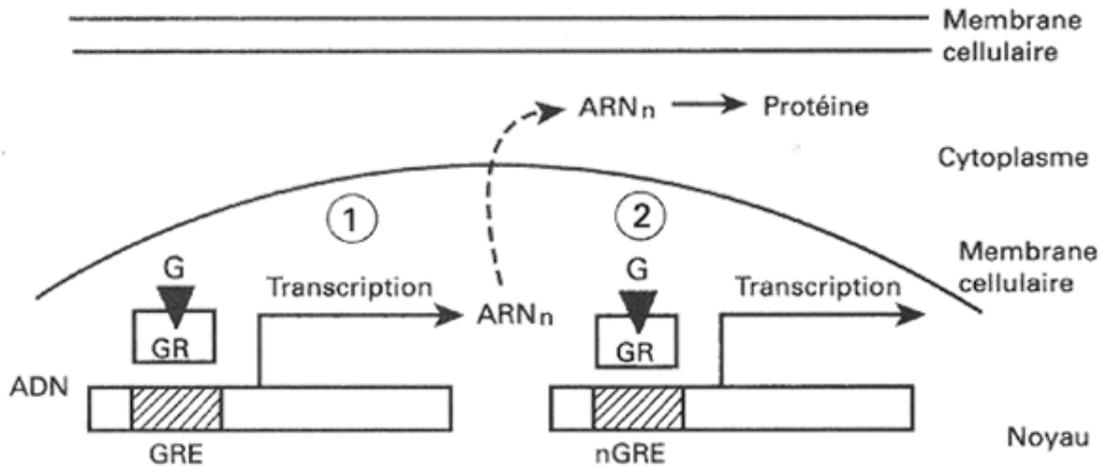
Dans la cellule il existe un récepteur spécifique, le récepteur des glucocorticoïdes est présent dans pratiquement toutes les cellules de l'organisme.

En l'absence de glucocorticoïdes, le récepteur des glucocorticoïdes est inactif et cytoplasmique, associé à des protéines inhibitrices ( immunophilines ou HSP ).

Ensuite, la fixation des glucocorticoïdes sur le GR entraîne la libération des immunophilines ainsi que la relocalisation nucléaire du complexe glucocorticoïdes/récepteur.

Dans le noyau, le complexe va s'associer ) des séquences d'ADN particulières appelées Glucocorticoi Response Element ( GRE ) qui sont situées dans les régions promotrices de certains gènes.

Ces corticostéroïdes ont également une **action sur les gènes**, ils augmentent la transcription des protéines immuno-suppressives et répriment la transcription des protéines inflammatoires au niveau des cellules du système immunitaire.



Les glucocorticoïdes **augmentent la transcription** de diverses molécules parmi lesquelles on peut citer :

- **L'annexine-1** qui inhibe la synthèse d'acide arachidonique, précurseur des prostaglandines et des leucotriènes ( réponse inflammatoire )
- **La protéine IκB** qui inhibe le facteur de transcription NF-κB.  
→ NF-κB est un facteur de transcription qui contrôle la synthèse de nombreuses protéines pro-inflammatoires telles que les cytokines et les molécules adhésives leuco-endothéliales.
- **L'IL-10** qui elle-même, régule négativement la transcription des gènes des cytokines inflammatoires et diminue les fonctions lymphocytaires.

A l'inverse, le complexe glucocorticoïdes/récepteur peut **supprimer la transcription** d'autres protéines telles que :

- La **cyclo-oxygénase de type 2** qui permet la synthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique.
- Les cytokines qui orchestrent la réaction inflammatoire ( **IL-1, le TNFα et l'IL-6** ) et les chemokines qui permettent le recrutement des leucocytes dans les tissus inflammatoires ( **GM-CSF, l'IL-5, l'IL-2, l'IFNγ et l'IL-4** ).
- Les molécules adhésives leuco-endothéliales telles que **la E-sélectine ( CD62E, l'ICAM-1 et la VCAM-1 )** qui permettent l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium au cours de la phase cellulaire de la réaction inflammatoire ou le recrutement des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires.

## **C - Les effets secondaires des glucocorticoïdes**

Un des effets secondaires qui peut apparaître est l'insuffisance surrénalienne aiguë en cas d'arrêt brutal et intempestif du traitement.

Pour les traitements au long terme, les glucocorticoïdes peuvent entraîner différents effets secondaires :

- répartition anormale des graisses
- prise de poids
- hypertension artérielle
- saignements digestifs
- diabète de type 2
- ostéoporose accélérée

Afin d'éviter ces effets secondaires, il est conseillé :

- De favoriser les traitements de courte durée, sinon de diminuer la durée et les doses cumulatives des traitements.
- De favoriser les voies d'administrations locales comme les topiques ou l'utilisation de corticoïdes inhalés.
- D'accompagner chaque prescription de mesures préventives pour diminuer notamment les risques de saignements digestifs ou d'ostéoporose.

## **II – Les immuno-suppresseurs**

### **A – Mécanisme d'action des immuno-suppresseurs**

#### 1- Inhibition de la prolifération lymphocytaire

Ils ont la capacité de bloquer un des 3 principaux signaux de l'activation lymphocytaire

→ **Premier signal**, déclenché par la stimulation du récepteur T ( TCR ). Le signal du TCR entraîne des phosphorylations intra-cellulaires de kinases, l'augmentation du calcium intra-cellulaire, l'activation de la calcineurine ( permet la déphosphorylation d'un facteur de transcription cytoplasmique : le NF-AT ).

NF-AT déphosphorylé est capable de migrer dans le noyau et d'y induire la synthèse de cytokines.

= **Inhibiteurs de transcription de cytokines** ( cyclosporine A, FK506 ) qui en se fixant avec l'immunophiline HSP-56 forment un complexe avec la calcineurine pour inhiber son activité phosphatase, ce qui entraîne l'inhibition du facteur de transcription NF-AT.

→ **Deuxième signal**, déclenché par la liaison de molécules de co-stimulation ( CD40-CD40L et CD80/CD86-CD28 ) active des MAP kinases ( Erk et JNK ) qui régulent l'expression nucléaire de fos et jun qui vont former le complexe AP-1. En parallèle, le facteur de transcription NF-kB est également activé.

= **Inhibiteurs de la co-stimulation.**

→ **Troisième signal**, lié à la progression du cycle cellulaire de la phase G1 vers la phase S. Ce troisième signal implique l'activation des Janus kinases ( Jak3 / Stat5 ), activées par les cytokines, ce signal active aussi la protéine mTor.

= **Inhibiteurs de l'action des cytokines.**

## 2 – Action sur le cycle cellulaire

La progression dans le cycle conduit à la division cellulaire et à la prolifération clonale des LT. La mitose nécessite une duplication et une **synthèse d'acides nucléiques à partir de bases puriques et pyrimidiques**. Les molécules qui inhibent cette synthèse d'acides nucléiques sont des anti-prolifératifs et constituent le quatrième niveau d'action des immuno-suppresseurs.

## 3 – Action anti-lymphocytaire

La réponse immunitaire étant orchestrée par les lymphocytes, une façon drastique mais extrêmement efficace de bloquer cette réponse est de détruire et/ou d'inhiber les LT et/ou les LB sanguins par des anticorps anti-lymphocytaires.

## **B – La classification des immuno-suppresseurs**

Mode d'action	Nom	Cible cellulaire
Premier signal (NF-AT)	Cyclosporine A, tacrolimus (FK506)	LT
Deuxième signal (AP1 et NF-KB)	Glucocorticoïdes	Ubiquitaire
Troisième signal (mTOR)	<u>Rapamcyne (Sirolimus)</u>	LT, LB, mastocytes, CE...
Cycle cellulaire		
Inh. bases pyrimidiques	<u>leflunomide</u>	LT, LB
Inh. bases puriques	<u>Azathioprine, (MMF) mycophénolate mofétyl</u>	LTactivés (+LB pour MMF)
Antifoliques	<u>Methotrexate</u>	LT, LB
Alkylants	<u>Cyclophosphamide</u>	LT, LB
Anti-lymphocytaire	Anti-thymocytes polyclonaux ou monoclonaux	LT (LB)

## **C – Les effets secondaires des immuno-suppresseurs**

Ils sont à l'origine de deux types d'effets secondaires :

- un immuno-déficit induit conduisant à la survenue d'effets secondaires que sont les infections et les cancers
- une toxicité propre comme par exemple la néphrotoxicité des anti-calceurines et le risque de stérilité associé au cyclophosphamide

## **III/ Biothérapies basées sur les anticorps**

### **A/ Sérothérapie**

Objectif : neutraliser rapidement un agent soluble grâce à l'injection d'AC.

Historiquement, la sérothérapie représentait un traitement passif des maladies infectieuses (diphthérie, tétanos, peste)

Aujourd'hui, elle présente de rares indications :

- prévention d'une contamination éventuelle par un virus (virus hépatite B, virus de la rage)
- contre l'action de venins

Les préparations proviennent d'individus immunisés (animaux ou humains), les AC des ces préparations sont utilisés sous forme de fragments Fab ou F(ab)'<sub>2</sub> et contiennent des AC de nombreuses spécificités.

Les risques liés à la sérothérapie sont liés à des réactions d'hypersensibilité : soit de type I (anaphylaxie) ou de type III (réaction sérique par formation de complexes immuns)

## **B/ Anticorps polyclonaux**

Les immunoglobulines intraveineuses G (IVIg) sont indiqués dans **les déficits de l'immunité humorale** (inné ou acquis) et pour **l'immunomodulation des maladies auto-immunes**.

Il s'agit d'IgG polyvalentes (>90%) provenant d'un très grand nombre de donneurs, plus de 5000, qui sont obtenus après fractionnement, inactivation et filtration.

Les préparations d'IVIg ont une demi-vie de 3 semaines (comme les IgG) avec une distribution des sous-classes comparable à celle d'un sérum normal.

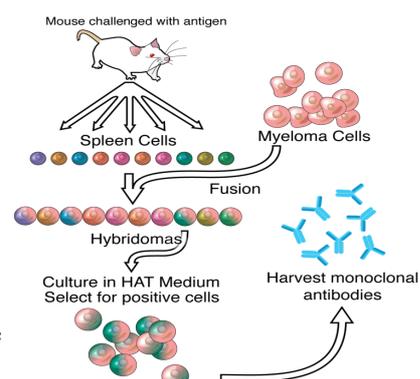
Il existe un risque lié à l'activation du complément par des agrégats lors de la première perfusion pouvant entraîner un choc. Il existe également un risque de choc en cas de déficit complet en IgA (1 personne/1000) d'où l'élimination des IgA des préparations d'IVIg.

Les **mécanismes d'action** des IVIg sont multiples et ils ne sont pas tous connus :

- Interractions avec les récepteurs Fc :
  - saturation du récepteur FcRn, ce qui entraîne l'augmentation du catabolisme des AC et donc des auto Ac
  - stimulation FcGR2B (rôle inhibiteur sur synthèse Ac et CPA). On remarque que l'effet est surtout porté par les IgG fortement sialylées (10% des IVIg)
- Interaction avec la voie classique du complément (fixation C3b et C4b)
- Modulation de l'activation et de la différenciation des LT et LB
- Modulation de la prolifération des LT (activation voie apoptique Fas)
- Modulation de l'effet des cytokines pro-inflammatoires
- Neutralisation des Ac pathogènes

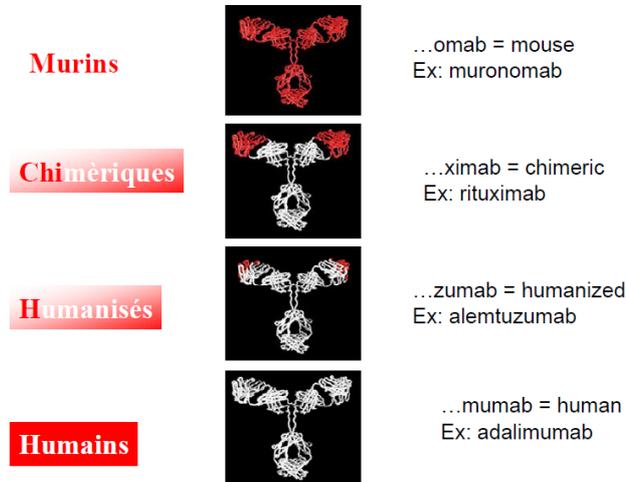
## **C/ Anticorps monoclonaux**

Dans les années 70, Georges Köhler et Cesar Milstein ont découvert la possibilité d'immortaliser et de faire proliférer des clones de cellules B de souris **produisant chacun un seul type d'Ac**. Il s'agit de la technologie des **hybridomes**.

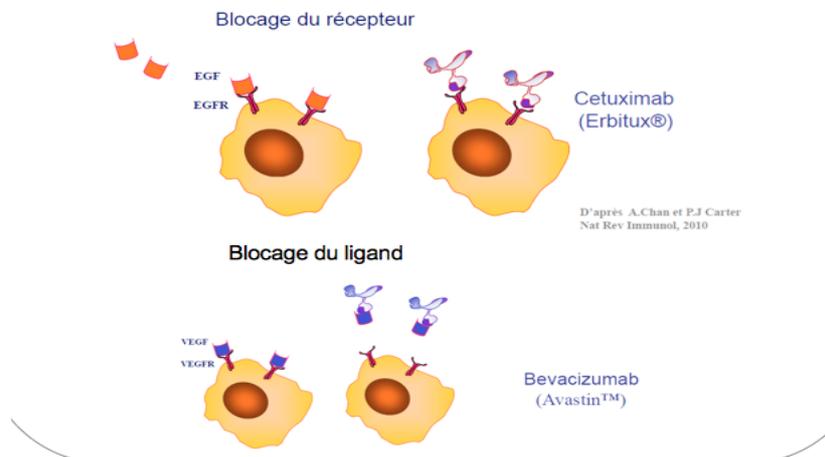
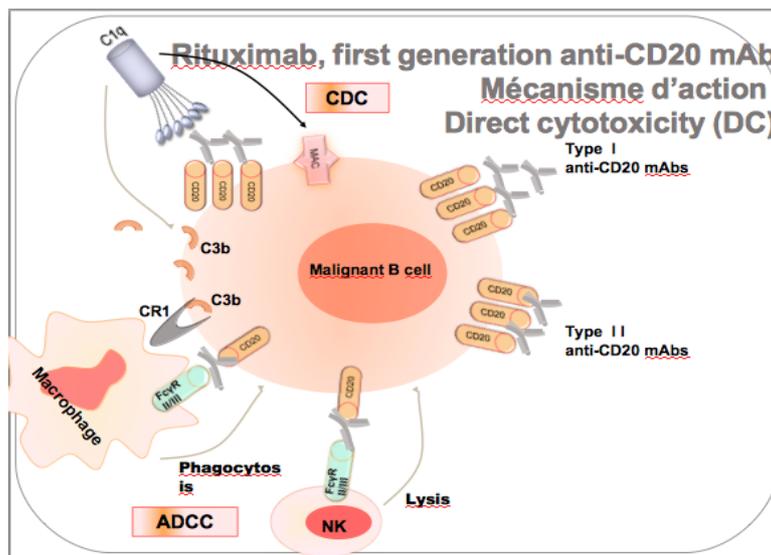


L'étape suivante dans les années 80 a été d'utiliser les Ac monoclonaux d'origine murine en thérapeutique. Cependant, du fait de leurs immunogénicité, ces Ac sont rapidement inactivés et il existe un risque élevé de **réaction sérique**.

Pour contrer cet écueil, des Ac monoclonaux ont été progressivement rendus humains.



Mécanisme d'action :



## Anticorps Monoclonaux Utilisés en Clinique pour le Traitement de Cancers

Nom	Forme de l'anticorps	Antigène cible	Mécanisme d'action*	Indication clinique**	Date d'utilisation clinique***
➡ Rituximab (Rituxan®) (Mabthera®)	IgG1 Chimérique	CD20	ADCC, CDC, induction directe de l'apoptose.	LNH	26 Nov. 1997
➡ Trastuzumab (Herceptin®)	IgG1 humanisé	HER2	Inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire médiées par HER2.	Cancer du sein métastatique	25 Nov. 1998
➡ Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®)	IgG4 humanisé lié à la calicheamicin	CD33	Délivrance de la calicheamicin, inducteur de cassure des brins d'ADN et apoptose.	LAM	17 Mai 2000
➡ Alemtuzumab (Campath®)	IgG1 humanisé	CD52	ADCC, CDC.	LLC	1er Juil 2001
➡ Tosimumomab (Bexxar®)	IgG2 murin Conjugué à <sup>131</sup> I	CD20	Délivrance de radiation cytotoxique, ADCC, CDC, apoptose.	LNH résistant rituximab	2 Sept 2002
➡ Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin™)	IgG1 murin conjugué à <sup>90</sup> Y et <sup>111</sup> In	CD20	Délivrance de radiation cytotoxique, ADCC, CDC, apoptose	LNH résistant	27 Juin 2003
➡ Cetuximab (Erbix®)	IgG1 chimérique	HER1 (EGFR)	Prévient l'interaction de l'EGF avec son récepteur	Cancer du colon métastatique	12 Fév 2004
➡ Bevacizumab (Avastin™)	IgG1 humanisé	VEGF	Prévient l'interaction du VEGF avec son récepteur.	Cancer du colon métastatique	26 Fév 2004

\* : ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps ; CDC : cytotoxicité dépendante de complément.

\*\* : LNH : lymphome non-hodgkinien ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; LLC : leucémie lymphoïde chronique.

\*\*\* : Date d'approbation aux USA par la FDA ou € par la commission européenne (EMA)

## Anticorps Monoclonaux Utilisés en Clinique pour le Traitement de Cancers (2)

Nom	Forme de l'anticorps	Antigène cible	Mécanisme d'action*	Indication clinique**	Date d'utilisation clinique***
➡ Panitumumab (Vestibix®)	IgG2 Humain	HER1 (EGFR)	Prévient l'interaction de l'EGF avec son récepteur	Cancer du colon Métastatique	27 sept 2006
➡ Catumaxomab (Removab®)	IgG2a de souris et IgG2b de rat	EpCAM et CD3	ADCC	Ascite malin	20 avril 2009
➡ Ofatumumab (Arzerra™)	IgG1 Humain	CD20	ADCC, CDC, induction directe de l'apoptose.	LLC réfractaire à fludarabine et alemtuzumab	26 oct 2009
➡ Ipilimumab Yervoy	IgG1 Humain	CTLA-4	Bloque l'interaction B7/CTLA-4	Mélanome	25 mars 2011
Brentuximab vedotin	IgG1 Chimérique	CD30	ADCC/CDC	Lymphome anaplasique à grandes cellules et Hodgkin lymphoma	19 Aout 2011
➡ Pertuzumab (Omnitarg®) Perjeta™)	IgG1 Humanisé	HER2 (domaine de dimérisation)	Inhibition de l'hétérodimérisation Inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire médiées par HER2	Cancer du sein Métastatique	8 juin 2012
➡ Denosumab (XGEVA®)	IgG2 humain	RANKL	Inhibition de RANKL, médiateur de la destruction osseuse	Métastases osseuses de tumeurs solides	15 juillet 2012 €

### Limitations :

- une pharmacocinétique non maîtrisée
- existence d'une immunogénicité. Ce risque perdure même pour les Ac humains du fait des variations allotypiques (polymorphismes) et idiotypiques rencontrés
- un coût élevé
- variabilité de réponse inter-individuelle (20-30% non répondeurs)

### **IV/ Biothérapie cellulaire : transfusion sanguine**

La transfusion sanguine est une biothérapie substitutive. Les produits sanguins (GR, plaquettes, plasma) proviennent de donneurs compatibles pour les groupes sanguins ABO.

Le risque majeur de la transfusion sanguine est la survenue d'une allo-immunisation avec l'apparition d'Ac anti-groupes sanguins érythrocytaires ou anti-plaquettes qui vont induire une destruction rapide des cellules transfusées.

Le risque d'allo-immunisation anti-HLA est diminué en utilisant des préparations déplétées en leucocytes.

### **V/ Greffe de cellule hématopoïétiques**

- **L'autogreffe** est réalisée dans le cadre de traitement anti-tumoraux. Elle comprend une première phase qui consiste à recueillir les progéniteurs hématopoïétiques à partir de la moëlle osseuse ou du sang périphérique préalablement ou non stimulés par des facteurs de croissance hématopoïétiques. Dans la seconde phase, le patient reçoit une thérapie myélotoxique visant à éradiquer les cellules tumorales. Enfin, dans la dernière phase, les cellules hématopoïétiques sont administrées et elles vont se localiser de façon spontanée au niveau des sites de l'hématopoïèse où elles vont régénérer toutes les lignées sanguines (GR, PLA, GB) et donc les cellules immunitaires.

- **L'allogreffe** vise à remplacer un tissu malade produisant des cellules leucémiques par un tissu sain provenant d'un donneur. Les lymphocytes du greffon sont responsables :  
+D'un effet bénéfique anti-leucémique ou G $\gamma$ L pour graft-versus-leukemia  
+D'un effet délétère à l'origine de la maladie du greffon contre l'hôte (ou G $\gamma$ H pour graft-versus-host disease)

### **VI/ Biothérapie génique**

La thérapie génique consiste à introduire des séquences génétiques dans des cellules, des tissus ou des organes avec l'objectif d'induire, de corriger ou de réguler l'expression d'un gène afin d'obtenir un effet thérapeutique.

Trois paramètres sont à prendre en compte pour qu'une thérapie génique soit efficace :

- Le vecteur
- La cellule cible (cellule sexuelle, somatique, sanguine)
- Le gène cible (taille)

**Injection d'ARN/ADN nus** : l'information génétique peut être apportée sous forme d'ADN nu (plasmide ADN contenant les séquences nécessaires pour l'expression de la protéine donnée) au sein de complexes moléculaires non viraux. Ces préparations ont une efficacité relativement modérée.

**Vecteurs (rétro)viraux** : les vecteurs viraux recombinants et défectifs sont dérivés de virus à ADN

(adénovirus, virus adéno associé AAV, herpès simplex, virus de la vaccine) ou ARN (retrovirus).

Le vecteur viral peut être perçu comme étranger par le système immunitaire, comme lors d'une infection par un virus sauvage. Dans ce cadre, les Ac s'opposent à la pénétration du virus et vont empêcher le transfert de gène thérapeutiques. De plus, les Ac produits vont également pouvoir être dirigés contre les cellules génétiquement modifiées aboutissant à une toxicité, voire une destruction tissulaire et à la perte de l'efficacité thérapeutique. Cet effet est surtout retrouvé pour les virus de type adénovirus qui présente de plus l'inconvénient d'avoir une expression de courte durée (15 jours maximum).

Les vecteurs rétroviraux, en s'intégrant au hasard au sein de l'ADN des cellules cibles, présentent un risque oncogénique élevé. De plus, l'efficacité *in vivo* est faible et l'effet est limité aux cellules en division. Les avantages sont une faible immunogénicité et une expression prolongée.

**Modification cellulaire** : la thérapie génique peut également être réalisée en modifiant génétiquement *ex vivo* des cellules qui sont ensuite réinjectées aux patients.

- **cellules autologues**, c'est à dire des cellules présentant l'avantage d'être bien toléré mais le nombre d'applications est limité (Enfants SCID).
- **cellules allogéniques** qui sont faciles à obtenir mais le risque de réaction immunitaire est très élevé.
- **Lignées cellulaires** : très facile à obtenir mais risque oncogénique et de développement de réactions immunitaires
- **Cellules xénogéniques** : facile à obtenir, risque de transmissions virales non conventionnelles et réactions immunitaires (xeno-Ac) non résolus.