

# Nouvelle molécule triple action : une piste pour le traitement de la maladie d'Alzheimer ?

*Patricia Melnyk est professeure à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lille<sup>1</sup> où elle dirige l'équipe « Brain Biology&Chemistry » du Centre de Recherches « Lille Neurosciences & Cognition ».*

## 1 La maladie d'Alzheimer

### 1.1. La quatrième cause de mortalité

La maladie d'Alzheimer est dans les pays occidentaux la

quatrième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires, les cancers et les accidents vasculaires cérébraux. Sont ainsi touchés environ un million de cas en France et 36 millions dans le monde.

La maladie d'Alzheimer est une « démence », désignation clinique des maladies

1. <http://pharmacie.univ-lille.fr/faculte-de-pharmacie-de-lille.html>



**Figure 1**

Le neuropsychiatre allemand Alois Alzheimer avait décrit en 1906 la maladie qui porte maintenant son nom, à l'aide de l'analyse post mortem du cerveau d'une patiente décédée à l'âge de 54 ans.

neurodégénératives qui affectent trois fonctions cognitives dont la mémoire à court terme. Elle représente 70 % des démences neurodégénératives. C'est une maladie neurodégénérative liée à l'âge mais très différente du vieillissement cérébral classique. Elle touche essentiellement nos aînés avec une probabilité proche d'une personne sur trois à partir de l'âge de 80 ans et environ cinq femmes pour quatre hommes. Avec le vieillissement de la population et l'absence de traitement à ce jour, le nombre de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer pourra dépasser 110 millions d'ici une trentaine d'années.

Cette pathologie doit son nom à Alois Alzheimer (**Figure 1**), le neuropsychiatre allemand qui l'a décrite il y a un peu plus d'un siècle lorsqu'il a observé au microscope les lésions du cerveau d'une patiente décédée à l'âge de 54 ans.

### 1.2. Une maladie multifactorielle

La maladie d'Alzheimer a de nombreuses causes possibles qui peuvent agir en synergie (**Figure 2**). Il peut s'agir de

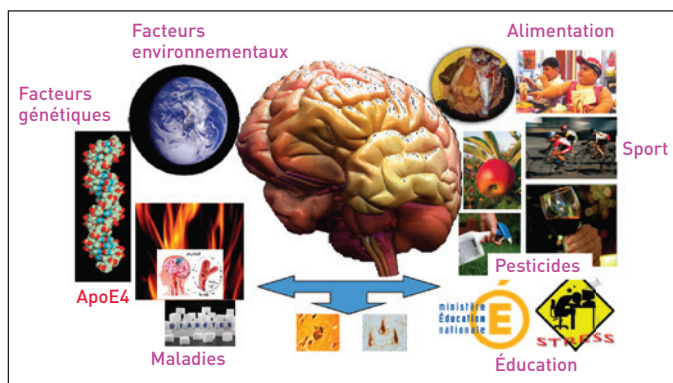
facteurs génétiques, comme la présence de « l'allèle epsilon 4 du gène de la lipoprotéine E4 », de facteurs environnementaux, de la présence de certains facteurs co-morbides associés comme le diabète, plus généralement la façon de vivre, de se nourrir, l'activité physique, les toxines environnementales telles les pesticides, qui sont tous des facteurs contribuant à augmenter le risque de développer une maladie d'Alzheimer. À l'inverse, plus on favorise l'activité de son cerveau, mieux on sera protégé contre le développement de la maladie. Il s'agit véritablement d'une maladie multifactorielle.

### 1.3. Les deux mécanismes de la maladie

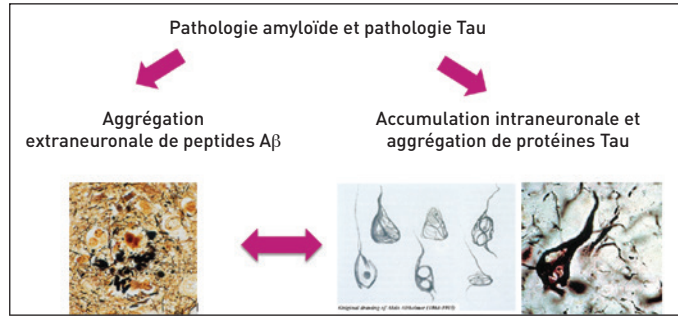
De façon surprenante, le diagnostic définitif de la maladie repose sur l'observation dans le cerveau des patients décédés des mêmes lésions que celles déjà dessinées en 1907 par Alois Alzheimer. C'est d'ailleurs bien la singularité de la maladie puisqu'elle regroupe deux lésions que sont les plaques « séniles » et les dégénérescences neurofibrillaires.

**Figure 2**

La maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle. De nombreux facteurs peuvent favoriser le développement de la maladie : facteurs génétiques, environnementaux...



La première est formée de dépôts sphériques d'un peptide<sup>2</sup> appelé peptide amyloïde et constituant la pathologie amyloïde. La seconde se retrouve dans des grands neurones de forme pyramidale, et l'accumulation d'enchevêtrements fibrillaires de nature protéique qui la constitue s'appelle pathologie Tau, du nom de la protéine constitutive des fibrilles. Il est compréhensible, dès lors, de mesurer toute la complexité de cette maladie dont nous n'avons pour l'heure pas toutes les explications (**Figure 3**). Ces deux mécanismes pathophysiologiques<sup>3</sup> déclenchent la neuro-inflammation<sup>4</sup>, la mort neuronale et un déficit dans certains neurotransmetteurs<sup>5</sup> tels que l'acétylcholine<sup>6</sup> (ACh). Il faut des années pour que ces lésions envahissent invariablement toujours les mêmes régions du cerveau et suivent un cheminement qui est



**Figure 3**

La maladie d'Alzheimer se caractérise par deux mécanismes pathophysiologiques : l'aggrégation extraneuronale de peptides amyloïdes Aβ et la pathologie Tau, issue de l'accumulation de protéines Tau à l'intérieur des neurones.

toujours identique pour finalement aboutir à l'émergence de la démence.

#### 1.4. L'évolution clinique

La **Figure 4** résume le développement de la normalité à la pathologie en considérant les biomarqueurs (Aβ et Tau) et des signes cliniques de la maladie. On voit d'abord se développer les plaques, qu'on appelle les plaques séniles, les plaques amyloïdes, dans le cerveau. S'ensuit le dépôt de protéines Tau. Toute cette

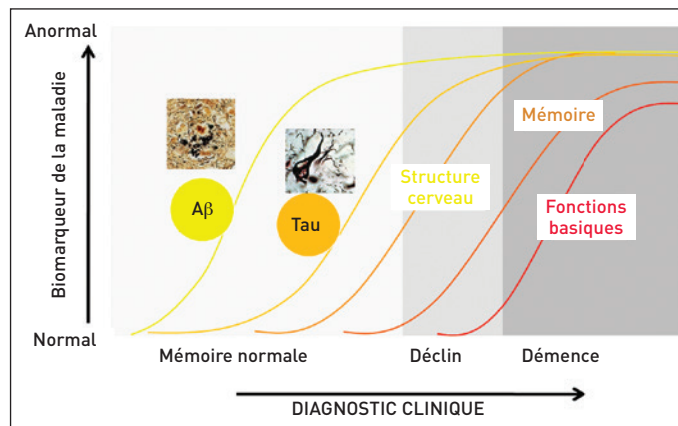
2. Peptide : chaîne d'acides aminés de petite taille (plus courte qu'une protéine).

3. Pathophysiologie : atteinte aux conditions physiologiques de fonctionnement normal des cellules.

4. Neuro-inflammation : inflammation des tissus nerveux.

5. Neurotransmetteur : peptide ou petite molécule ayant une affinité avec les récepteurs membranaires de cellules du système nerveux et provoquant un effet dans la cellule cible. La liaison de ces molécules aux récepteurs entraîne des chaînes de réactions (réactions chimiques/physiques) dans les cellules.

6. Acétylcholine : neurotransmetteur jouant un rôle important au niveau central (mémoire, apprentissage), mais aussi périphérique (contraction musculaire par exemple lorsque le muscle est relâché par les neurones au niveau des synapses neuromusculaires).



**Figure 4**

L'évolution clinique de la maladie d'Alzheimer commence par la modification de la structure du cerveau, avant apparition des problèmes mnésiques. Enfin, les fonctions basiques de l'individu se dégradent. Il faut noter que les biomarqueurs de la maladie sont présents lors d'une phase pré-symptomatique, pendant laquelle aucun problème clinique n'est à signaler.

phase est pré-symptomatique puisqu'il n'y a absolument aucun symptôme associé, les malades ne se rendent pas compte que ces dépôts sont en train de se former dans le cerveau.

À la suite de ces dépôts de protéines agrégées, on commence à observer des perturbations, des modifications de la structure du cerveau puis des problèmes mnésiques, et enfin des problèmes comportementaux majeurs ; les fonctions basiques de l'individu se dégradent de manière très importante.

### 1.5. Les médicaments actuels

Quatre médicaments symptomatiques existent sur le marché pour traiter cette maladie. Trois sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, l'enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine ; le quatrième, la Mémantine, approuvée en 2003, est un antagoniste d'un récepteur au glutamate<sup>7</sup>.

7. Glutamate : forme ionisée de l'acide aminé acide glutamique, avec le rôle de neurotransmetteur exciteur le plus répandu du système nerveux central.

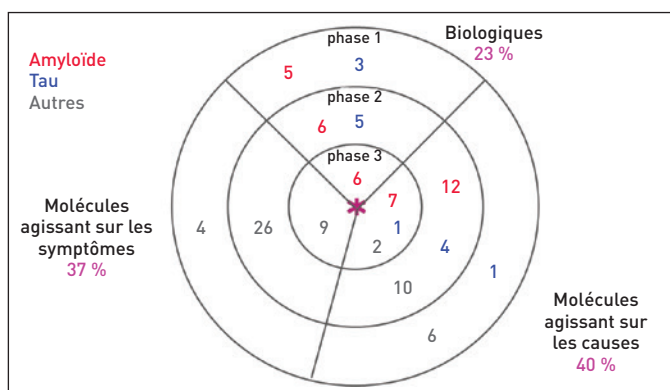
Depuis 2003, aucune nouvelle molécule n'est arrivée sur le marché pour cette maladie. La **Figure 5** donne le « pipeline », à savoir la liste des molécules en développement et inscrites dans les programmes d'essais cliniques. L'étoile rose du milieu correspond à ces quatre médicaments sur le marché ; leur faible efficacité a conduit les autorités de santé en France à en arrêter le remboursement depuis août 2018.

Si on regarde les molécules en phase 1, phase 2, puis phase 3 de développement (au cœur du camembert), environ 40 % des molécules agissent sur les marqueurs biologiques, c'est-à-dire essentiellement la pathologie amyloïde et la pathologie Tau. Environ 37 % sont des petites molécules organiques jouant sur les symptômes. Un gros quart des molécules envisagées ou utilisées sont des « molécules biologiques » : anticorps monoclonaux<sup>8</sup> (voir le **Chapitre**

8. Anticorps monoclonaux : molécules naturellement produites par le système immunitaire en vue de déclencher une attaque ciblée sur un danger déjà rencontré. Bien manipulés, ces derniers peuvent être utilisés pour des thérapies.

**Figure 5**

*Pipeline représentant l'état des molécules en développement clinique : 40 % sont des molécules agissant sur les causes (pathologie amyloïde et pathologie Tau), 37 % des molécules (souvent des petites molécules organiques) agissent sur les symptômes. Enfin, 23 % sont des molécules biologiques. Le nombre de molécules agissant sur les symptômes est en train d'augmenter, ce qui pourrait améliorer la qualité de vie de ces patients âgés.*



de M.-P. Brun dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020), oligo-antisens<sup>9</sup>, etc.

Les voies d'action des molécules sont indiquées sur la **Figure 5** : celles qui visent la pathologie amyloïde, celles qui visent la pathologie Tau, qui est une stratégie thérapeutique développée après la pathologie amyloïde.

Parmi les molécules en développement, beaucoup sont des « molécules symptomatiques ». Faute d'avoir sur le marché des molécules qui traitent véritablement les causes de la maladie, les laboratoires étudient et essaient de développer ces molécules, susceptibles d'améliorer le bien-être des malades, leur pourcentage est en train d'augmenter. La **Figure 5** correspond au pipeline de 2018 ; en 2016, il n'y en avait que 25 %. Aujourd'hui, de plus en plus de composés ciblant les voies des neurotransmetteurs sont à l'étude.

La mauvaise nouvelle, c'est qu'entre 2018 et 2019, presque tous les anticorps monoclonaux ont été arrêtés en phase 3 en raison de leur inefficacité.

## 2 Les mécanismes des deux pathologies de la maladie d'Alzheimer

### 2.1. La pathologie Tau

Une des activités de la protéine Tau est la stabilisation des

9. Oligo-antisens : petits brins d'ARN (polynucléotides) pouvant se lier à un ou plusieurs motifs d'ARN messenger pour en moduler la traduction (par exemple la répression de la traduction).

microtubules<sup>10</sup>. La **Figure 6** la représente dans son état normal et dans des états pathologiques. On voit le neurone en pleine santé avec le microtubule constitué de tubuline<sup>11</sup> (**Figure 6**) et la protéine Tau liant le microtubule et le stabilisant. En condition pathologique,

10. Microtubule : assemblage de protéines formant des tubes arrangés autour d'un centriole. Ces structures servent de « rails » pour les déplacements des organites/vésicule dans la cellule. Il s'agit des fibres du cytosquelette.  
11. Tubuline : protéine tubulaire, « brique » assemblée/dissociée de manière dynamique pour former les microtubules.

**Figure 6**

*En condition pathologique, la protéine Tau subit à la fois de l'hyperphosphorylation et des phosphorylations anormales. Cela entraîne le détachement de la protéine du microtubule du neurone et provoque la dissociation du microtubule, menant à la mort du neurone. DNF : dégénérescence neurofibrillaire ; ENF : enchevêtrement neurofibrillaire.*

Source : d'après Brunden et coll. (2009). *Nature Reviews Drug Discovery*, 783.

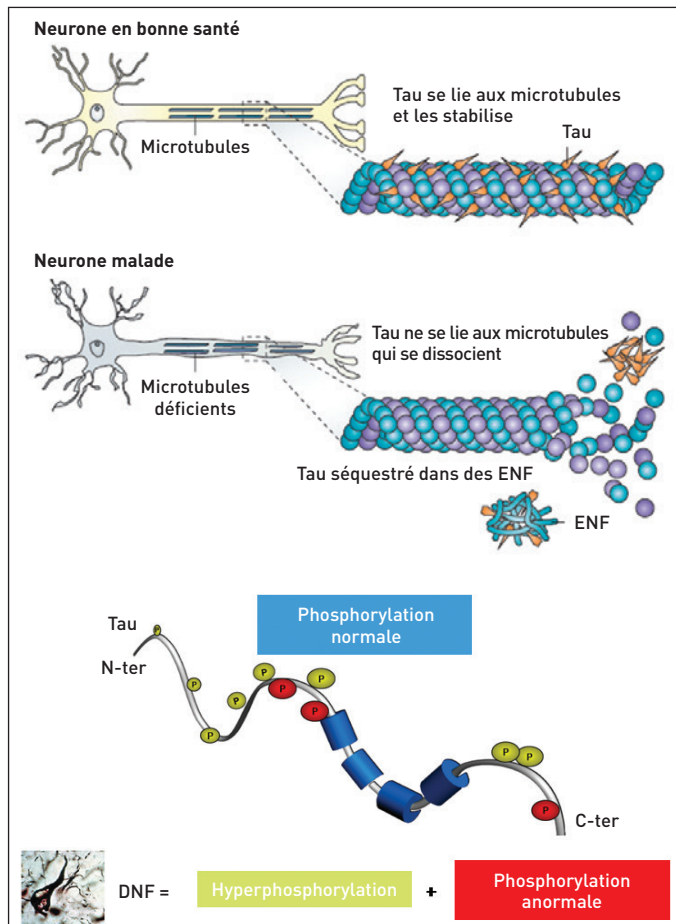


Figure 7

A) Dans la voie amyloïdogénique, les peptides A $\beta$  sont issus d'une protéine APP (protéine précurseur de l'amyloïde). L'enzyme BACE 1, aussi appelée  $\beta$ -secrétase, coupe au-dessus de la structure du peptide A $\beta$ . La  $\gamma$ -secrétase libère ensuite les peptides formant les plaques amyloïdes. B) L'une des pistes pour diminuer la formation des plaques amyloïdes est d'inhiber les enzymes les unes après les autres. Cette piste s'est avérée peu efficace au vu des performances des molécules en cours de développement. L'exaltation de la voie non amyloïdogénique est une piste de réflexion intéressante puisqu'elle produit des fragments neuroprotecteurs.

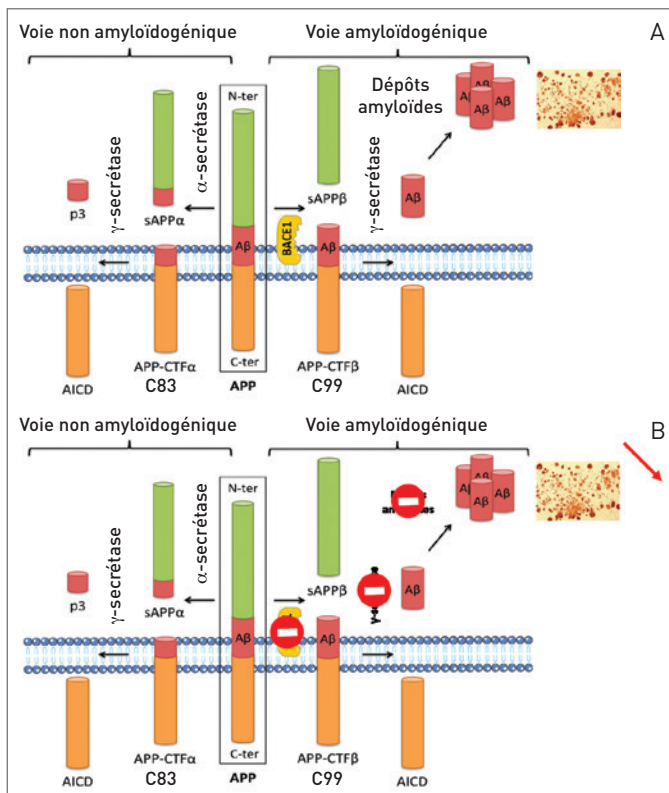
la protéine Tau est hyperphosphorylée<sup>12</sup>. Les conséquences de l'ajout d'excédent de groupements phosphates de la protéine, qui s'acidifie. Ce changement de chargement favorise le détachement de la protéine Tau des microtubules. Se retrouvant ainsi libre, elle s'auto-assemble en structures formées d'un petit nombre de molécules formant ainsi les premières structures fibrillaires qui, en s'accumulant, aboutissent à la dégénérescence neurofibrillaire (DNF). Les microtubules, qui sont les rails de transport de l'information chimique – les neurotransmetteurs –, se désorganisent

12. Phosphoryllé : qui possède un groupement phosphate ( $[-PO_4^{3-}]$ ).

et l'information véhiculée est perturbée pour finalement aboutir à la mort du neurone.

## 2.2. La pathologie amyloïde

La pathologie amyloïde fait intervenir des plaques constituées d'agrégats de peptides A $\beta$  à l'extérieur des neurones. Ce peptide A $\beta$  qui s'agrège, comme schématisé sur la **Figure 7A**, est issu d'une protéine APP (« *Amyloïde Precursor Protein* », protéine précurseur de l'amyloïde). Cette protéine transmembranaire peut être métabolisée selon deux voies représentées sur la **Figure 7**. La voie amyloïdogénique est celle qui conduit à la formation du peptide  $\beta$ -amyloïde, l'unité de constitution des plaques amyloïdes. Elle commence par une enzyme BACE 1, la  $\beta$ -secrétase, qui coupe la séquence protéique de l'APP juste au démarrage de la séquence du peptide A $\beta$ . Elle se poursuit par un autre clivage par la  $\gamma$ -secrétase, qui coupe à la fin de la séquence de peptide A $\beta$  et permet donc sa libération. Normalement, cette dernière enzyme continue à grignoter le peptide pour le raccourcir et ainsi favoriser son élimination. Dans la maladie d'Alzheimer, des peptides longs sont en majorité produits, et plus ces peptides A $\beta$  sont longs, plus ils sont toxiques et plus ils s'agrègent. Ainsi, pour éviter la formation de ces plaques amyloïdes, on peut appliquer une stratégie qui consiste à diminuer la quantité des peptides A $\beta$  produits en inhibant les enzymes du processus les unes après les autres (**Figure 7B**).



Un travail important a été mené sur des inhibiteurs de  $\beta$ -secrétase, des inhibiteurs ou des modulateurs de  $\gamma$ -secrétase, ou sur des molécules qui empêchent l'agrégation du peptide A $\beta$ . À ce jour, il y a encore dans le camembert de la **Figure 5** quelques composés agissant sur cette voie.

### 3 Stratégie thérapeutique

La stratégie que nous avons utilisée au laboratoire pour diminuer la pathologie amyloïdogénique consiste à favoriser la voie non amyloïdogénique. Celle-ci commence par l'action d'une  $\alpha$ -secrétase, qui coupe l'APP au milieu de la séquence du peptide A $\beta$ , et en empêche donc l'émission. Cela est d'autant plus intéressant que les fragments issus de cette voie non amyloïdogénique, c'est-à-dire le fragment soluble APP $\alpha$  ou les fragments carboxyterminaux<sup>13</sup> (CTFa), sont neuroprotecteurs<sup>14</sup> et neurotrophiques<sup>15</sup>. En favorisant cette voie, on pourrait donc augmenter la production des facteurs protecteurs, diminuer la formation des peptides A $\beta$ , et donc des plaques amyloïdes.

Cette stratégie, qui implique les fragments carboxyterminaux de l'APP, a été proposée il y a plus de quinze ans par l'équipe d'André Delacourte,

13. Fragments carboxyterminaux : fragments de la protéine APP du côté C-terminal de la protéine.

14. Neuroprotecteur : qui a un rôle de protection pour les cellules du système nerveux.

15. Neurotrophique : qui a un rôle de nutrition pour les cellules du système nerveux.

neurobiologiste à Lille. Au fur et à mesure du développement clinique de la pathologie Alzheimer, c'est-à-dire le développement de la pathologie Tau, cette équipe a montré que les fragments carboxyterminaux diminuent en nombre. Ce résultat a été obtenu par des analyses biochimiques de cerveaux issus de la cérébrothèque de l'hôpital.

Ces travaux ont ensuite montré que l'accumulation et la quantité des fragments carboxyterminaux dans la cellule étaient régulées par le pH. En fait, ces fragments sont dégradés à pH acide dans des organelles<sup>16</sup> (endosomes<sup>17</sup>, lysosomes<sup>18</sup>). Pour lutter contre ce mécanisme, on pourrait utiliser des molécules basiques, qui vont modifier le pH de ces endosomes et empêcher la dégradation et la disparition de ces fragments.

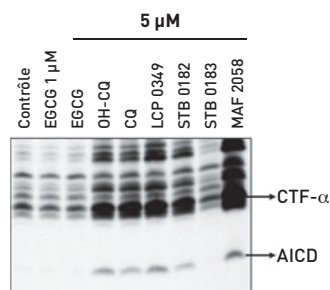
#### 3.1. Repositionnement d'une molécule antipaludique et d'analogues

La première molécule qui a démontré cet effet est la chloroquine, une molécule antipaludique qui a été développée au moment de la seconde Guerre mondiale et n'est maintenant

16. Organelle : compartiment intracellulaire ayant un rôle spécifique (détoxification de la cellule pour le lysosome, création d'ATP pour la mitochondrie, protection de l'ADN pour le noyau).

17. Endosome : organelle sur laquelle les vésicules d'endocytose s'accrochent et fusionnent pour relarguer leur contenu.

18. Lysosome : organelle à pH très acide qui permettent de détoxifier la cellule par la destruction de molécules/protéines non actives.



**Figure 8**

Après criblage de notre chimiothèque d'analogues de la chloroquine, les différents candidats-médicaments ont été testés en observant le taux de fragments carboxyterminaux de l'APP : certaines molécules s'avèrent être actives.

plus administrée car les parasites lui sont devenus résistants. Cette petite molécule, simple à synthétiser, est une molécule pléiotrope<sup>19</sup>, testée dans de nombreuses pathologies et modèles biologiques. Elle est active sur un grand nombre de pathologies : des maladies parasitaires autres que le paludisme, des maladies virales, des maladies auto-immunes<sup>20</sup> telles que le lupus érythémateux ou la polyarthrite rhumatoïde, certains cancers, des maladies neuro-dégénératives...

Afin d'identifier des analogues de la chloroquine qui auraient des effets plus puissants, un criblage a été réalisé parmi tous les analogues de la chloroquine de notre chimiothèque en utilisant un modèle cellulaire qui surexprime l'APP humain. Les composés actifs sont ceux qui permettent de diminuer l'Aβ et d'augmenter

les fragments carboxyterminaux de l'APP.

Par rapport aux conditions contrôle, on voit que la chloroquine (CQ) ou l'hydroxychloroquine (OH-CQ) augmentent bien les fragments carboxyterminaux CTFα et AICD ; on voit aussi des molécules beaucoup plus actives que la chloroquine (LCP0349 ou MAF2058), et d'autres qui ne fonctionnent pas comme STB0183 (**Figure 8**). Notons qu'une comparaison a aussi été effectuée avec l'épigallocatechine gallate (EGCG), qui est le constituant majeur du thé vert, connu comme activateur de l'α-sécrétase, donc de la voie non amyloïdogénique.

Ces analogues de la chloroquine donnent de bons résultats sur la voie non amyloïdogénique mais permettent aussi de diminuer la quantité de peptides Aβ. C'est notamment le cas sur l'Aβ<sub>1-42</sub>, qui est plus long, plus agrégant et plus toxique (**Figure 9**).

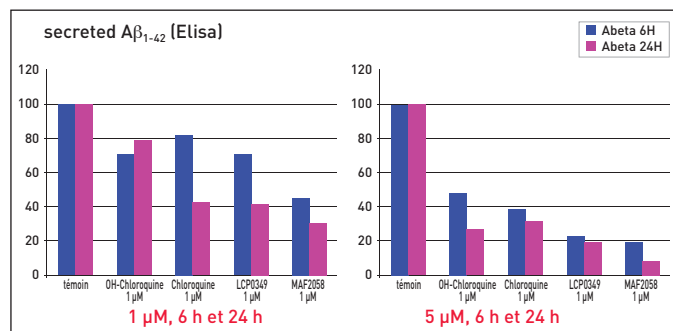
La stratégie chimique a donc été la suivante : nous sommes partis de la chloroquine et nous l'avons modifiée pour favoriser l'accumulation des molécules dans les organelles acides, exactement comme nous l'avons fait pour augmenter l'accumulation des molécules

19. Molécule pléiotrope : molécule présentant plusieurs actions.

20. Maladie auto-immune : maladie se caractérisant par la production d'anticorps dirigés vers les antigènes propres au malade. Cette maladie entraîne une réaction immunitaire des cellules endogènes et, à terme, un dysfonctionnement généralisé des organes et tissus dans tout le corps.

**Figure 9**

Sur ces mêmes molécules candidates, une diminution de la sécrétion des peptides Aβ est également observée (ici le peptide Aβ<sub>1-42</sub>).





dans la vacuole digestive<sup>21</sup> du parasite. Cela a été réalisé en ajoutant des fonctions amine. Dans un deuxième temps, nous avons joué sur la structure de la molécule (**Figure 10**) : la fonction 4-aminoquinoline, qui est la signature des molécules antipaludiques de cette famille, a été remplacée par d'autres hétérocycles pour obtenir une famille de molécules qu'on appelle les MSBD (ces lettres sont les initiales des quatre inventeurs du brevet déposé).

La meilleure molécule de cette famille MSBD est celle où l'on a un benzimidazole à la place de la sous-structure 4-chloroquinoline. Cette molécule, sous le nom d'AZP2006, est développée par AlzProtect ; elle est en phase 2 des essais cliniques pour le traitement de la Paralyse Supranucléaire Progressive (PSP<sup>22</sup>), une Tauopathie orpheline apparentée à la maladie d'Alzheimer.

21. Vacuole digestive : organelle des micro-organismes permettant la digestion.

22. Paralyse supranucléaire progressive : maladie neurodégénérative due à la destruction progressive des neurones de différentes régions du cerveau : le striatum, la formation réticulée du tronc cérébral, le locus...

### 3.2. Recherche de nouvelles voies

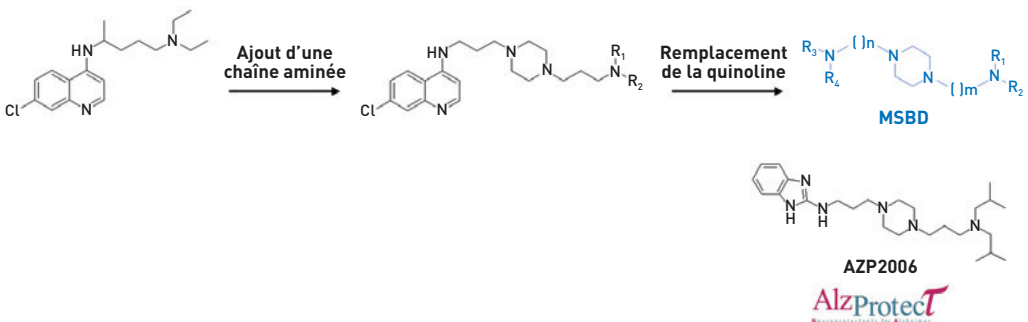
Les travaux qui viennent d'être décrits ont débuté en 2003. On a découvert que nos molécules avaient une activité sur la pathologie amyloïde ; un brevet a été déposé, puis la société AlzProtecta été créée en 2007 (**Figure 11**). Le criblage de toutes nos molécules a été repris pour être sûr de bien identifier dans les mêmes conditions la meilleure molécule, et c'est bien cette molécule AZP2006 qui a été confirmée.

Citons une deuxième découverte, particulièrement intéressante pour nous : non seulement cette molécule est active sur la voie amyloïde, mais elle l'est aussi sur le deuxième mécanisme, la pathologie Tau. En 2013, elle est rentrée en essai préclinique et, en 2015, en phase 1. Elle a obtenu le statut de médicament orphelin<sup>23</sup> pour la PSP ; en 2019, elle vient d'obtenir l'autorisation de phase 2.

23. Médicament orphelin : médicament destiné au traitement de maladies si rares que les promoteurs sont peu disposés à les développer dans les conditions de commercialisation habituelles.

**Figure 10**

En partant de la chloroquine, la famille MSBD a été développée en ajoutant plusieurs fonctions chimiques. La molécule la plus efficace, AZP2006, comporte un groupement benzimidazole.



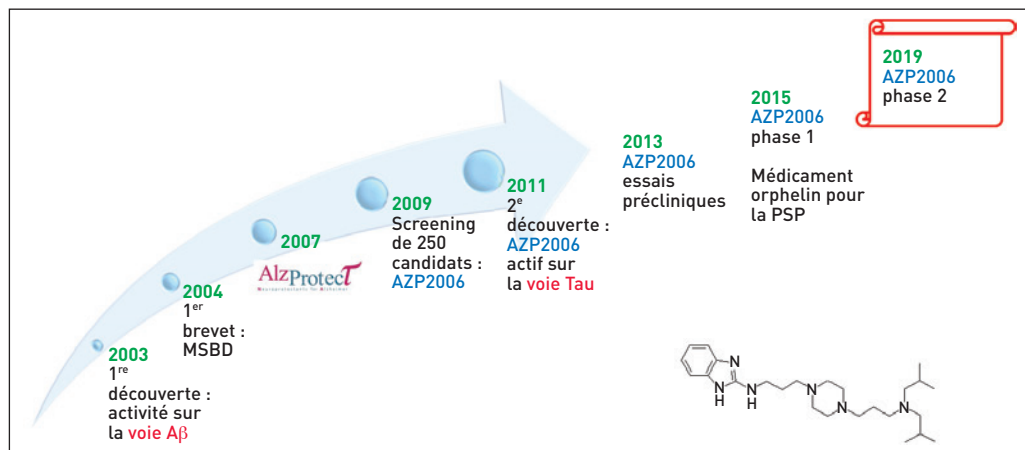


Figure 11

Le développement de l’AZP2006 a commencé en 2003. La société AlzProtect a été créée en 2007 afin de réaliser des tests cliniques et de refaire un criblage complet. En 2011, une deuxième activité de la molécule a été découverte sur la pathologie Tau. Actuellement, la molécule est en phase 2.

Les maladies neurodégénératives ont un certain nombre de caractéristiques communes sur lesquelles les médicaments doivent agir : le stress oxydant<sup>24</sup>, l’autophagie altérée<sup>25</sup>, toute la voie endosome/

lysosome citée plus haut, la mort cellulaire, des agrégations de protéines, des phénomènes de cognition ou encore de locomotion altérés (Figure 12).

L’AZP2006 affecte de manière très positive tous ces marqueurs, à la fois *in vitro* et *in vivo*, mais elle ne joue pas sur les déficits cholinergiques<sup>26</sup>, elle n’a pas d’activité sur l’acétylcholinestérase<sup>27</sup>.

24. Stress oxydant : stress cellulaire empêchant l’élimination efficace des radicaux libres dans la cellule. Les radicaux libres peuvent entraîner des mutations de l’ADN et la formation de cellules cancéreuses.

25. Autophagie altérée : processus biologique d’auto-cannibalisme qui conduit à la dégradation par le lysosome de constituants cellulaires (agrégats protéiques, organites endommagés ou surnuméraires).

26. Déficit cholinergique : manque du neurotransmetteur acétylcholine.

27. Acétylcholinestérase : enzyme responsable de la dégradation de l’acétylcholine (voir note 6).

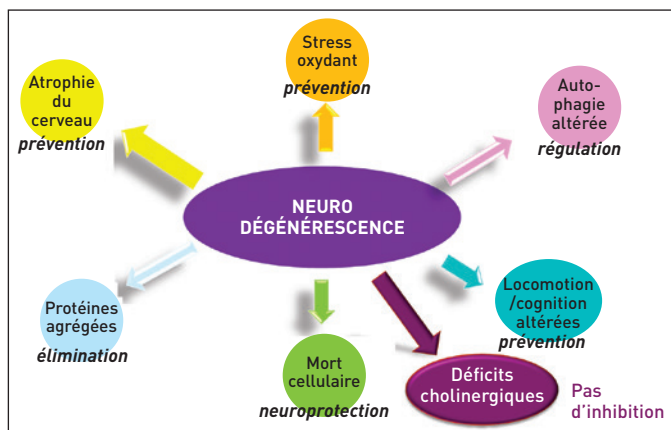


Figure 12

Les marqueurs des maladies neurodégénératives.

Au laboratoire, nous nous sommes proposé de rajouter à la structure de l'AZP2006 un composant inhibiteur d'acétylcholinestérase. On avait là une molécule qui jouait sur A $\beta$  et Tau, donc on voulait une action supplémentaire pour jouer non seulement sur les causes de la maladie mais aussi apporter un effet symptomatique.

L'étude de l'évolution de la maladie montre l'intérêt qu'il pourrait y avoir à agir sur la maladie sur plusieurs plans (Figure 13). Sans traitement, l'état du patient va s'aggraver. Si on utilise une molécule qui agit sur les causes, on va avoir une évolution lente de l'état clinique du patient. Si on utilise un composé qui joue sur les symptômes sans jouer sur les causes de la maladie, on va déclencher une petite amélioration dans un premier temps, booster un peu la mémoire par exemple, mais la maladie va continuer à se développer avec une évolution qui va être parallèle à celle qu'elle pourrait avoir en absence de traitement. En cumulant les deux activités, activité symptomatique et activité sur les causes, on devrait obtenir de meilleures performances. C'est ce qu'on a essayé avec une molécule mixte entre les MSBD cités plus haut et les inhibiteurs d'acétylcholinestérase.

Pour faire un traitement à double effet, il existe plusieurs stratégies :

- on peut tout simplement prendre deux médicaments : c'est ce que font les thérapeutes classiquement ;
- on peut concevoir une formulation combinée (Figure 14A).

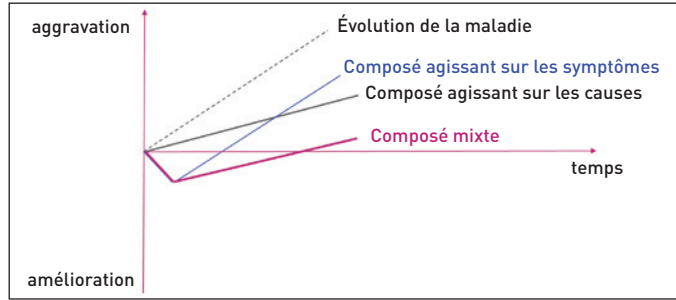


Figure 13

La représentation de l'aggravation de la maladie en fonction du temps montre qu'un composé agissant uniquement sur les symptômes ne permet qu'une aggravation plus lente de la maladie. Un composé agissant uniquement sur les causes permettra éventuellement un développement plus lent de la maladie. Un composé mixte peut apparaître comme le meilleur moyen de combattre la maladie.

Pour l'Alzheimer, le Namzarica été mis sur le marché en 2014 et comporte du Donépézil et de la Mémantine à l'intérieur de la gélule ;

- on peut aussi créer une molécule unique qui soit multi-cibles (Figure 14B). Si une molécule A joue sur une cible rouge et une molécule B sur une cible bleue, on peut les lier de deux façons. Soit directement avec un bras espaceur (« linker »), qui peut être soit un morceau peptidique soit un morceau de type polyéthylène glycol ou polyamine. C'est la voie que Bernard Meunier (voir

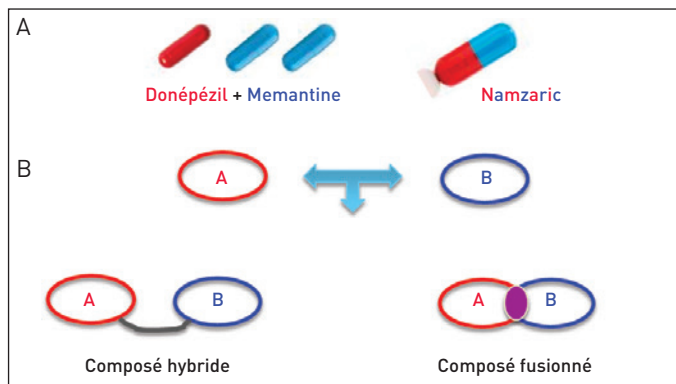


Figure 14

Il existe plusieurs façons de faire des composés mixtes : A) réaliser une thérapie combinée au cours de laquelle deux médicaments distincts sont administrés ; B) réaliser une thérapie multi-cibles dans laquelle le médicament est unique et multifonctionnel. Il est alors possible de développer soit un composé hybride, soit un composé fusionné, en s'appuyant sur les points communs chimiques des deux molécules.

le **Chapitre de B. Meunier** dans *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020) a mise en œuvre avec les trioxa-quinones, dérivées d'artémizine et de chloroquine – c'est une méthode qui fonctionne bien. On peut autrement réaliser un composé fusionné ; on repère ce qui est commun dans la structure de A et dans la structure de B, afin d'obtenir une molécule plus compacte (**Encart : « Fusionner deux principes actifs : la chimie à l'œuvre ! »**).

### 3.3. La Tacrine et la Rivastigmine

La Tacrine et la Rivastigmine (**Figure 16**) ne sont pas les meilleurs inhibiteurs de l'acétylcholine que l'on puisse imaginer. Nous les avons choisis parce qu'ils respectent les relations structure-activité et permettraient de réaliser des molécules multi-actions avec la famille MSBD. On a réalisé un mixte Tacrine (que l'on appellera RPEL par la suite) et Rivastigmine (appelé MAG) – les noms correspondent

#### FUSIONNER DEUX PRINCIPES ACTIFS : LA CHIMIE À L'ŒUVRE !

Cette voie implique de bien connaître les relations structure-activité des molécules (**Figure 15**). Sur l'AZP2006, on a vu qu'il était nécessaire d'avoir trois groupements  $-CH_2$  de part et d'autre du cycle central pipérazine (cycle à six chaînons avec deux atomes d'azote à des sommets opposés). Si on a deux fois trois carbones de manière symétrique, cela fonctionne ; si on rétrécit à deux, si on allonge à quatre, si on crée un système dissymétrique, ce sera moins bon (B). Il faut donc préserver un enchaînement symétrique à deux fois trois carbones.

Sur la partie droite (C), les groupements sont deux chaînes aliphatiques : cela fonctionne bien ; avec un aromatique ou deux aromatiques : on perd l'activité. À gauche (A), sur le  $-NH$ , on peut avoir un petit groupement de type méthyle ( $-CH_3$ ), mais si la chaîne est plus longue, on perd toute l'activité. Ce groupement benzimidazole présent pourrait être remplacé par d'autres hétérocycles : les dérivés de chloroquine ou ceux de type benzylique. Celui-ci a été remplacé par des sous-structures d'inhibiteurs d'acétylcholinestérase connus.

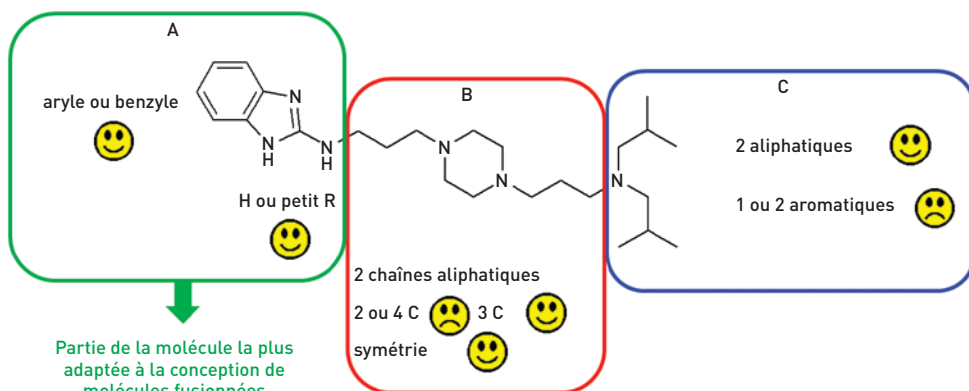


Figure 15

Comprendre les relations structure-activité pour fusionner des activités biologiques.

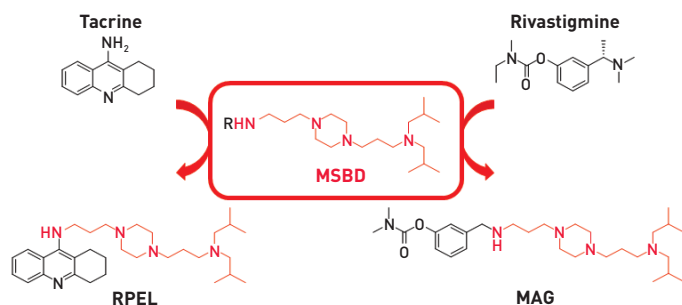


Figure 16

RPEL et MAG sont des molécules mixtes : en rajoutant à une molécule déjà active (MSBD) des sous-structures d'inhibiteur d'acétylcholinestérase, il a été possible d'envisager une molécule triple action.

encore à ceux des chimistes qui ont synthétisé ces molécules ! Ils ont d'abord été testés *in silico*<sup>28</sup>.

## 4 Les résultats

La question de l'efficacité de ces molécules mixtes a été abordée par des expériences de modélisation moléculaire. L'acétylcholinestérase a été cristallisée avec un certain nombre de ses inhibiteurs. On voit sur la **Figure 17** la gorge de l'acétylcholinestérase, avec son site enzymatique<sup>29</sup> dans le fond, cristallisée avec la tacrine en bleu marine, ou le Donépézil en turquoise ; notre molécule mixte RPEL, en marron, se superpose bien avec la Tacrine dans le fond et va interagir avec le site périphérique à l'extérieur (à gauche). Pour la Rivastigmine, il en va de même : on prend l'acétylcholinestérase cristallisée avec la Rivastigmine en bleu, et on

observe que notre molécule mixte (MAG), en marron, se superpose bien au niveau du site actif (à droite).

Il s'agissait d'expériences sur ordinateur (*in silico*) ; tout va bien pour le moment !

Dans une phase expérimentale réelle, l'activité enzymatique a été testée en mesurant l'IC50 (la concentration qui inhibe de 50 % l'activité enzymatique). Plus le chiffre est petit, plus la concentration nécessaire est faible pour avoir l'activité, et donc plus la molécule est active. Il fallait une concentration de 40 nM pour la Tacrine, on est en dessous de

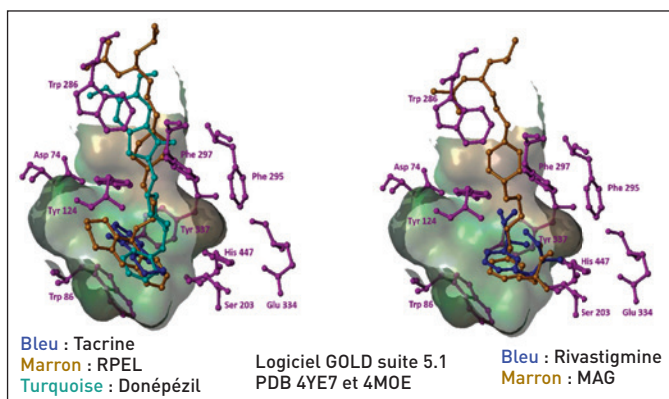


Figure 17

La modélisation moléculaire est une bonne première approche pour cerner l'activité biologique d'un principe actif. Ici, les deux molécules mixtes candidates (en marron) se superposent bien au niveau du site actif avec les molécules de départ (en bleu).

28. *In silico* : utilisation d'outils informatiques pour prédire l'activité de molécules.

29. L'activité des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif, qui a la forme d'une cavité ou d'un sillon. C'est le lieu où la molécule se fixe et interagit avec l'enzyme.

## Tableau

Activité enzymatique sur l'acétylcholinestérase humaine. L'IC<sub>50</sub> mesuré pour la RPEL est 500 fois plus faible que pour la Tacrine. Pour MAG, l'IC<sub>50</sub> est 85 fois plus faible. Cela signifie que ces deux molécules sont bien plus efficaces vis-à-vis de l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase. MAG reste tout de même bien moins efficace que RPEL.

Molécule	MAG	Rivastigmine	RPEL	Tacrine	Donépézil
IC <sub>50</sub> hAChE (nM)	398 ± 25	3 030	0,84 ± 0,15	424	4,8 ± 0,6

× 85      × 500

1 pour notre molécule mixte RPEL (**Tableau**), qui est donc 500 fois plus efficace. Pour la Rivastigmine, la molécule mixte MAG est également plus efficace, mais par un facteur plus modeste de 85.

– L'étape suivante, avant celle des tests cellulaires, est de vérifier que la molécule n'est pas cytotoxique<sup>30</sup>. La **Figure 18** montre que jusqu'à des concentrations de 10 µM, on ne prévoit aucun problème de toxicité de ces composés. Les tests ont été conduits sur des cellules de neuroblastome.

L'activité des molécules a ensuite été étudiée dans nos cellules SY5Y (**Figure 19**). Sur la voie non amyloïdogénique, les molécules augmentent bien la production des fragments carboxyterminaux (CTFα et AICD), et la molécule RPEL (le mixte Tacrine) est plus efficace que la molécule MAG. Sur la voie amyloïdogénique, qui joue sur la diminution de la sécrétion du peptide Aβ, on a aussi une bonne activité, la molécule mixte (RPEL) étant encore la plus efficace (**Figure 19**).

Des expériences ont ensuite été conduites sur modèles de

souris transgéniques<sup>31</sup>. Dans un premier modèle qui mime la pathologie amyloïde (modèle APPxPS1), on a administré à des souris, à t0, la molécule dans l'eau de boisson, dans le biberon ; les souris ont été traitées pendant trois mois, puis des tests comportementaux ont été effectués. Les animaux ont ensuite été sacrifiés (**Figure 20**). Le test comportemental est celui du labyrinthe en Y, qui met en évidence la curiosité naturelle de l'animal et sa mémoire spatiale à court terme. On laisse l'animal explorer deux des trois bras pendant cinq minutes, puis on ouvre le troisième bras et l'animal est laissé libre d'explorer l'espace. On observe qu'une souris « *wild type* » (souris normale), qu'elle ait été traitée ou pas, si on lui propose de se promener dans un nouveau bras (N) qu'elle n'a pas encore exploré, passe plus de temps dans le nouveau que dans les anciens bras (O pour « *others* »). En revanche, une souris transgénique (mimant la pathologie amyloïde) passe autant de temps dans le nouveau bras

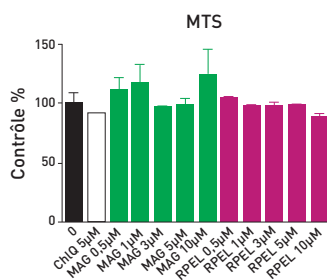


Figure 18

Les deux molécules ne présentent aucun problème de toxicité pour les cellules. Le test MTS est un test colorimétrique montrant la viabilité cellulaire. La condition contrôle (sans molécule) montre 100 % de cellules en vie. Les données sont représentées en pourcentage de cellules viables.

30. Cytotoxicité : propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.

31. Modèle transgénique : animal génétiquement modifié afin d'exprimer une pathologie dans ce cas-ci.

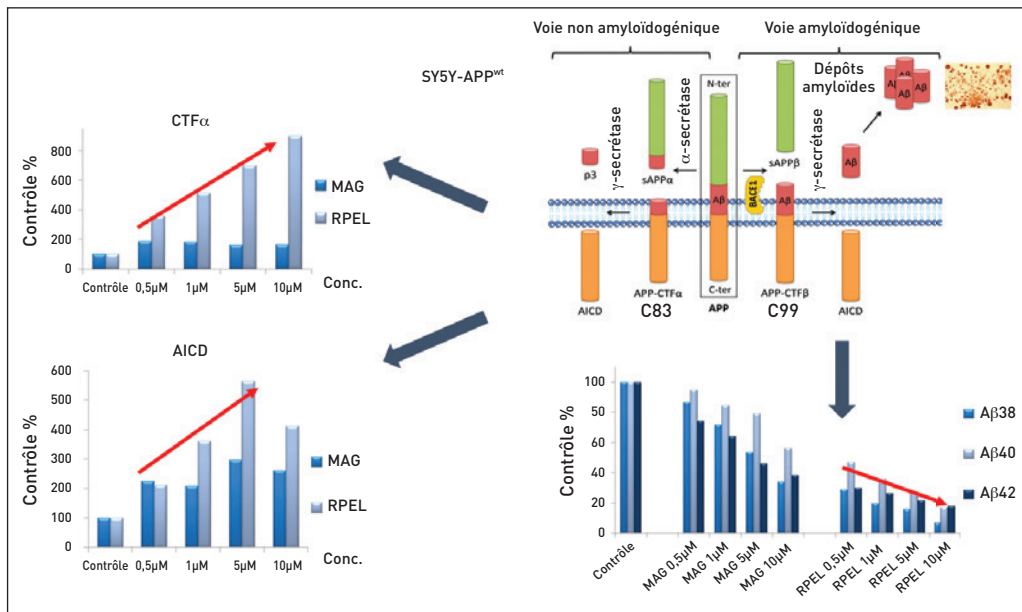


Figure 19

Les fragments carboxyterminaux CTF $\alpha$  et AICD augmentent en présence de RPEL et MAG. La sécrétion du peptide A $\beta$  diminue également. RPEL reste la molécule la plus efficace sur toutes les analyses.

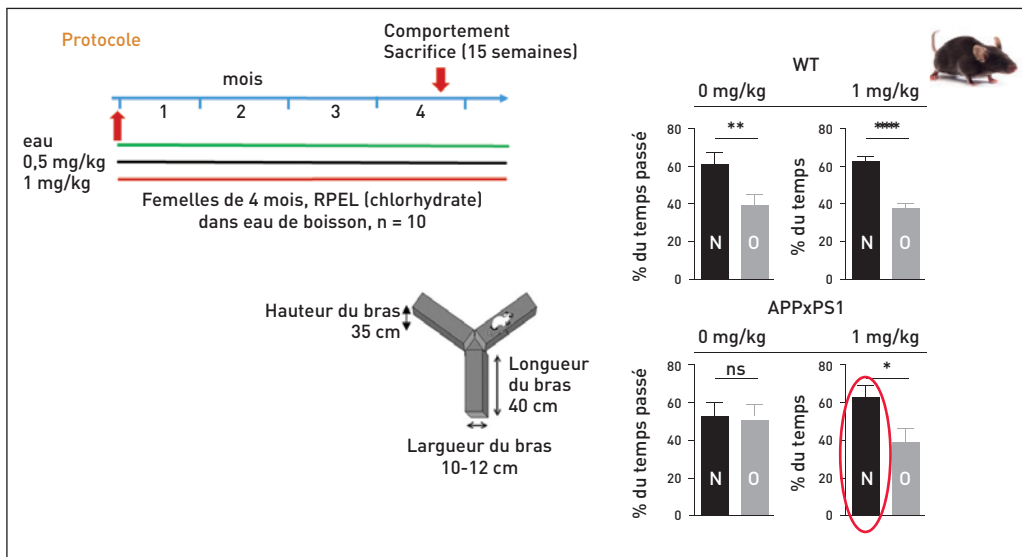
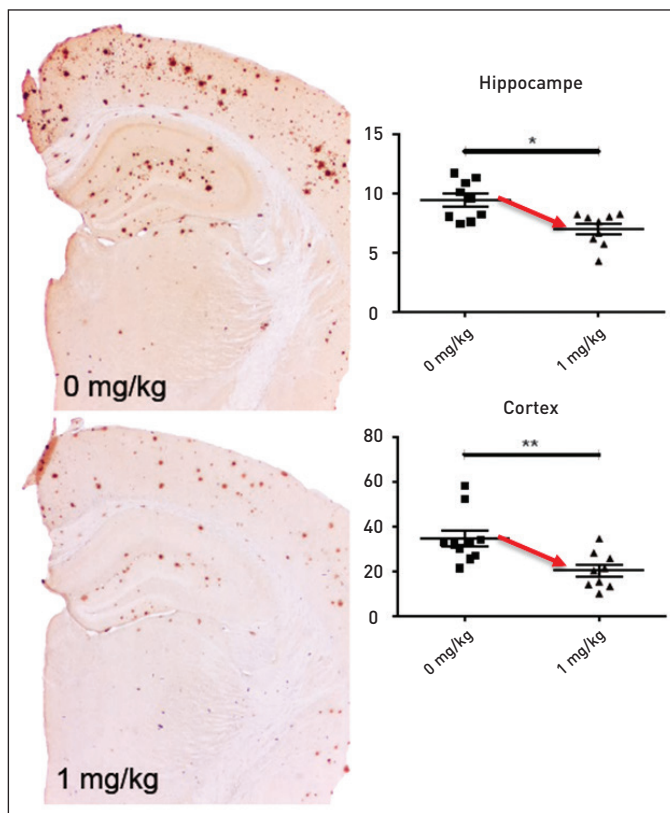


Figure 20

Les tests comportementaux sur les souris montrent l'efficacité de RPEL. Sur un modèle transgénique mimant la pathologie amyloïde, il est possible, grâce au traitement, de restaurer la mémoire spatiale à court terme.

Figure 21

La vérification par immunohistochimie confirme bien la diminution du nombre de plaques amyloïdes dans le cerveau après administration du composé RPEL.



que dans les anciens : elle a oublié qu'elle s'était déjà promenade dans les anciens bras. Lorsqu'elle est traitée trois mois avec le composé RPEL, on retrouve le même comportement que les souris « *wild type* » : la mémoire spatiale à court terme a été restaurée.

Après sacrifice des animaux, on peut vérifier par immunohistochimie<sup>32</sup> et quantification qu'on a bien une diminution

des plaques amyloïdes dans le cerveau (Figure 21).

Dans un deuxième modèle, le modèle Thy-Tau 22, le modèle transgénique qui mime la pathologie Tau, on suit le même type de protocole (durée de traitement, dose...), mais cette fois-ci le test comportemental est celui dit de la piscine de Morris, où les souris, pendant une semaine, apprennent à retrouver une plateforme qu'elles peuvent identifier avec des repères spatiaux externes. Que les souris soient transgéniques ou non, traitées ou non, elles ont la capacité d'apprentissage : elles mettent de moins en moins de temps de la même façon pour retrouver leur plateforme (Figure 22A).

32. Immunohistochimie (IHC) : méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. L'immunohistochimie exploite le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à des antigènes dans les tissus biologiques.



L'expérience est la suivante : on place dans la piscine une souris transgénique, on voit qu'elle cherche sa plateforme. Mais au bout de trois mois de traitement avec la molécule à 0,5 mg/kg, elle la retrouve véritablement très vite, aussi vite qu'une souris « *wild type* ». Elle a retrouvé ses capacités (Figure 22B) !

Après sacrifice et évaluation immunohistochimique, on observe que ces améliorations cognitives sont corrélées avec une diminution avec la pathologie Tau, c'est-à-dire avec la présence ou l'absence des agrégats de protéines.

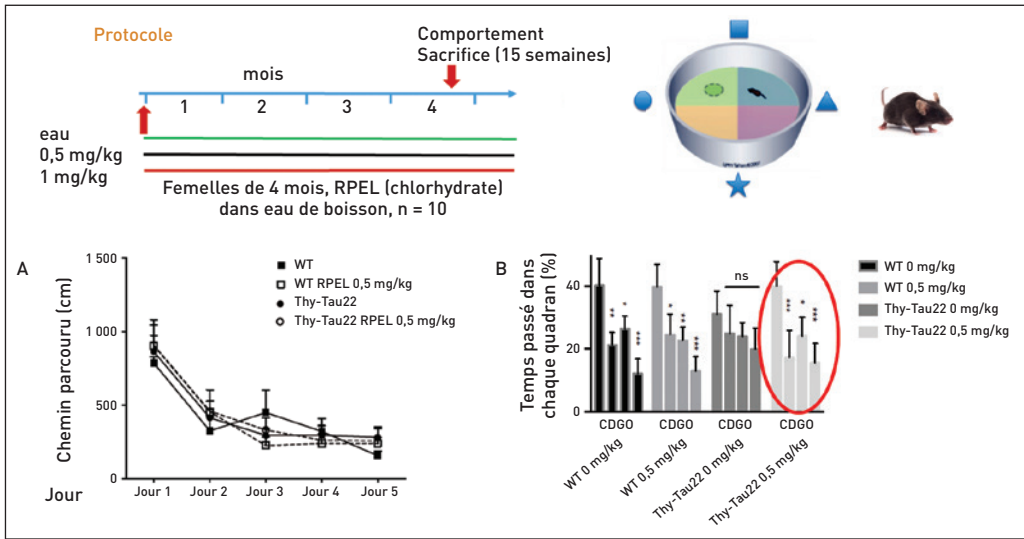


Figure 22

Sur un modèle transgénique mimant la pathologie Tau, il est également possible grâce au traitement de restaurer la mémoire spatiale à court terme. A) Toutes les souris ont la même capacité d'apprentissage ; B) temps passé dans chaque quadrat (C : cible, quadrat où se trouve la plateforme ; D : droite ; G : gauche ; O : opposé).

## **Le repositionnement des médicaments : une vraie stratégie pour des nouvelles indications mais aussi un point de départ pour de nouvelles molécules actives**

Une nouvelle stratégie est apparue ces dernières années : le « repositionnement des médicaments ». Il s'agit de réutiliser un médicament pour une nouvelle activité. Cette stratégie permet d'accélérer la mise sur le marché et la prescription de composés autorisés car les étapes d'innocuité sur l'homme ont déjà été réalisées. C'est le cas des essais sur de nombreux médicaments dans la crise du Covid-19.

Dans notre cas, nous avons démarré par cette stratégie mais avec le souhait de trouver des dérivés plus performants et surtout plus sûrs étant donné l'âge avancé des patients atteints de maladies neurodégénératives. Réévaluer la chloroquine nous a permis d'identifier une nouvelle famille de molécules, les MSBD, dont la tête de série (« *lead* ») est maintenant en phase 2 des essais cliniques.

La preuve de concept « molécule tri-action » a été établie avec notre composé RPEL en ajoutant une activité acétylcholinestérase. La molécule maintient son activité sur les deux aspects de la maladie d'Alzheimer avec les mêmes effets que l'AZP2006, et elle présente en outre une activité acétylcholinestérase.

Suite aux résultats intéressants obtenus, d'autres molécules multi-cibles sont envisagées au laboratoire à partir de cette famille de molécules.