

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
le 30 juin 2017
par

MEILLEROUX Carole

né(e) le 14 juillet 1990, à Châteauroux

**L'ÉVALUATION DES INHIBITEURS DE LA BRUTON TYROSINE
KINASE DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES AUTO-
IMMUNES**

Directrice de thèse : Madame le Docteur Jeanne MOREAU

Co-directrice : Madame le Docteur Alexia BLESIOUS

Examineurs de la thèse :

M^R. le Professeur Nicolas PICARD

M^{me} le Docteur Jeanne Moreau

M^{me} le Docteur Alexia BLESIOUS

M^{me} le Docteur Françoise MARRE-FOURNIER

M^R. le Docteur Bertrand LIAGRE

M^{me} Charlotte Fritz

Président

Directrice

Co-directrice

Juge

Juge

Membre invité





Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
le 30 juin 2017
par

MEILLEROUX Carole

né(e) le 14 juillet 1990 à Châteauroux

**L'ÉVALUATION DES INHIBITEURS DE LA BRUTON TYROSINE
KINASE DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES AUTO-
IMMUNES**

Directrice de thèse : Madame le Docteur Jeanne MOREAU

Co-directrice : Madame le Docteur Alexia BLESIOUS

Examineurs de la thèse :

M^R. le Professeur Nicolas PICARD

M^{me} le Docteur Jeanne MOREAU

M^{me} le Docteur Alexia BLESIOUS

M^{me} le Docteur Françoise MARRE-FOURNIER

M^R. le Docteur Bertrand LIAGRE

M^{me} Charlotte Fritz

Président

Directrice

Co-directrice

Juge

Juge

Membre invité



Liste des enseignants

2 rue du Docteur Marcland
87025 Limoges cedex
T. 05 55 43 58 00
F. 05 55 43 58 01
S. <http://www.unilim.fr>

Faculté de Pharmacie



DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

VICE-DOYEN : Madame le Professeur Catherine **FAGNERE**

ASSESEURS :
Madame le Professeur Sylvie **ROGEZ**
Monsieur le Professeur Serge **BATTU**

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE



ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine HEMATOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine PHARMACOTECHNIE

BILLET Fabrice PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

CLEDAT Dominique CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

COMBY Francis CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

COURTIOUX Bertrand PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSEE Sylvie MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

DEMIOT Claire-Elise PHARMACOLOGIE

FROISSARD Didier BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

GRIMAUD Gaëlle CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT

JAMBUT Anne-Catherine CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

LABROUSSE Pascal BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

LEGER David BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

MARION-THORE Sandrine CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

MARRE-FOURNIER Françoise BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

MERCIER Aurélien PARASITOLOGIE

MILLOT Marion PHARMACOGNOSIE

MOREAU Jeanne MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

MUSUAMBA TSHINANU Flora PHARMACOLOGIE



PASCAUD Patricia

PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX
CERAMIQUES

POUGET Christelle

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

VIGNOLES Philippe

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

FABRE Gabin

(01.09.2016 au 31.08.2017)
CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE

LAVERDET Betty

(1.09.2016 au 31.08.2017)
PHARMACIE GALENIQUE

PHAM Thanh Nhat

(1.09.2016 au 31.08.2017)
CHIMIE ORGANIQUE - BIOCHIMIE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole



Rien n'est jamais perdu tant qu'il reste quelque chose à trouver

Pierre Dac



Remerciements

A mon président de thèse, Monsieur Nicolas PICARD, Professeur de pharmacologie (Faculté de Pharmacie) et Praticien Hospitalier en pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance (CHU de Limoges)

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance. Votre analyse sur le sujet est d'une grande importance, du fait de votre compétence et de votre expertise dans le domaine.

A ma directrice de thèse, Madame Jeanne MOREAU, Maître de Conférence Service de Microbiologie-CRIBL

Je vous remercie d'avoir accepté ce sujet, et d'avoir accepté de diriger ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité et pour le temps que vous m'avez accordé malgré votre planning chargé. Merci, pour votre extrême gentillesse, je garderai un excellent souvenir de votre positivité et du soutien dont vous avez preuve tout au long de la rédaction de cette thèse. Soyez assurée de ma sincère gratitude.

A mon co-directrice de thèse, Madame Alexia Blesius, Docteur en Pharmacie – « International Clinical Project Director chez Institut de Recherche Internationale Servier »

Merci pour avoir accepté de co-diriger ce travail. Je tenais à te remercier pour l'opportunité que tu m'as donné en me prenant comme stagiaire. Ce stage a véritablement confirmé ma volonté de poursuivre une carrière professionnelle dans le domaine du développement clinique. J'ai énormément appris à tes côtés, et découvert un métier que je trouve passionnant. Merci de m'avoir transmis tes connaissances et de m'avoir fait confiance. Merci de m'avoir aidé à tenir les délais et pour tes nombreuses relectures malgré ton « emploi du temps de ministre » et pour tous tes conseils.



Aux membres du jury :

Madame Françoise Marre-Fournier, Maître de Conférence en Biochimie et
Biologie Moléculaire

Pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance. Soyez assurée de toute ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

Monsieur Bertrand LIAGRE, Professeur des Universités Biochimie et Biologie
Moléculaire Fédération de Recherche 3503 GEIST

Pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, merci d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail. Votre analyse sur le sujet sera très intéressante, au vu de votre expertise sur les voies de signalisation.

Madame Charlotte Fritz, Associate Manager chez NovoNordisk

Je te remercie d'avoir accepté de faire parti de ce jury. Merci pour ton aide précieuse et ton sens de la rigueur, que tu as su me transmettre lorsque j'étais ta stagiaire. Grâce à toi, j'ai pu découvrir le milieu de l'industrie pharmaceutique et me rendre compte que c'était la voie qui était faite pour moi... J'ai réussi à prendre un peu plus confiance en moi. Et surtout, merci de m'avoir soutenu dans ces moments de doutes.



Je dédie cette thèse

à ma famille :

À ma grande sœur Julie, celle dont je suis le plus fier. Mon modèle, qui, indépendamment de ta volonté, m'a parfois donné de gros complexes. C'est vrai tu m'avais dit tu verras les remerciements sont difficiles à écrire, et tu avais bien raison. Je n'ai pas assez de mots pour te remercier et te dire la chance que j'ai que tu sois ma grande sœur et comme je t'aime. Même si, des fois, j'ai un peu l'impression d'être l'aînée (en tant que coach sportif, et conseillère vestimentaire...) Toi, qui t'es tant inquiété pour moi, et qui ne savais pas comment m'aider, sache que c'est grâce à toi, si j'en suis arrivé là.

À mes parents, qui ont toujours été à mes côtés et ont su me soutenir dans mes choix (pas toujours simple). Pour m'avoir encouragée sans cesse sur cette voie qui aboutit ce jour. Pour m'avoir permis de faire des études, vous avez une grande part dans leurs réussites. Un immense merci pour votre amour inlassable.

Toi ma maman, comment te remercier pour toutes ces heures de révisions de cours (je suis sûre que tu te rappelles encore de la botanique de P1), pour toutes les relectures de mémoire, lettres, élaboration d'herbier (où tu étais beaucoup plus enjouée que moi) et tous les documents que j'ai pu rédiger avec mon français « parlé ». Pardon, pour tout le stress que je t'ai donné au cours de toutes ces années de pharmacie (du stress du résultat de P1, en passant par l'internat, c'est vrai que je ne t'ai pas ménagé). Merci, de nous avoir donné à Julie et à moi des valeurs et une éducation qui nous ont permis de faire plutôt des bons choix.

Toi mon papa, moi « ton Titi » ou comme le dit Julie « le fils que tu n'as pas eu » (avec nos dimanches sportifs...), merci pour tout ton soutien, et tes encouragements dans cette voie malgré tous les doutes que j'ai pu avoir, tu as toujours cru en moi et me reconforter. Merci aussi pour toutes ces heures de révisions (de la physiopathologie à l'anglais ...eh oui qui aurait cru que tu me ferais réviser de l'anglais ;)) Merci, de m'avoir supporté et pour votre grande patience face à mon caractère changeant lors des révisions d'examens. Merci, je vous aime et j'espère que vous êtes fier de votre petite dernière.

À mes grand-mères, toi **mamie Éliane**, merci de nous avoir gardé Julie et moi quand nous étions petites, et pardon aussi pour tout le stress que je t'ai causé quand tu me disais « Non Carole ne cours pas avec le « petit Louis » tu vas tomber, ou encore le vélo dans les

orties... Toi **mamie Janine**, « la légende de Toulx », merci pour toutes ces vacances à Barcarès avec tes 5 petites filles, et tous ces longs trajets où tu as dû nous supporter Julie et moi avec nos chansons. Merci, aussi pour toutes ces répliques, dont certaines resteront cultes « Les filles il faut y aller, « les caténares » viennent de passer ^^)

À mes grands-pères, Papy « Dédé » et papy Louis, qui nous ont quitté trop tôt, j'aurais tant aimé que vous puissiez participer à cette thèse et être fière de votre petite fille.

À tonton Alain et Martine, merci pour l'accueil parisien et toutes ces visites que l'on a pu faire à la capitale. Merci aussi pour le coup de pouce pour les entretiens qui m'ont permis de mettre un pied dans le monde professionnel. Et Martine, merci encore pour ton soutien et tes remarques réconfortantes.

À Philippe et Jocelyne, toujours présent dans les moments importants (anniversaire, thèse, visites surprises au ski, ou pour un semi-marathon (même en tant que supporters ☺, t'inquiète on se rattrape l'an prochain ;))

À Isabelle et Christophe, ma marraine avec qui je partage beaucoup de points communs et à qui j'ai promis qu'on irait faire du jet ski ;)

À Alix et Pierre, Pierre mon parrain, avec qui je partage désormais certains points communs aussi ☺ Alix, ma tata qui m'a tellement fait rire pendant nos vacances à Barcarès (le hanneton ☺)

À Florence et Patrick, mes parents adoptifs. Merci pour tous ces bons moments partagés au ski, n'est ce pas « mon Pumba » maintenant l'élève à dépasser le maître sur toutes les pistes et hors pistes, mais merci de nous avoir transmis tes compétences sauf peut-être « la conversion » ☺ Florence merci de m'accueillir pendant les week ends en Normandie.

À mes cousines, Laure, Claire et Camille, avec qui j'ai partagée tellement de bons moments. Nos vacances à Barcarès ou en Creuse. Laure, merci pour ton écoute et ton réconfort pendant mes moments de doutes. Camille, merci pour ton accueil à Bordeaux et nos petites discussions. Et Claire, merci d'avoir fait parti du binôme des deux « casse-coups » de mamie ^^ Un jour peut-être on sera ensemble à Toulouse.

Les deux petites dernière de la famille Sarah (prête pour des week end couz à Royan) et Jenna la petite sudiste.

À mes cousins, Simon et Lucas, les deux « beaux goss » de la famille. Simon « mon plus grand fan » tellement de chansons, d'imitations et de blagues on pourrait se reconvertir dans « stand-up » je pense. Luca « tastrope », l'artiste de la famille dans tous les domaines ^.
Hâte de faire des week couz avec vous.

À mes amis,

À mes amies d'enfance, mes sœurs d'adoption Maud et Mathilde. Math la petite casse coup du ski, tu as vu à force de persévérance on a réussi à le mettre dans le vent le « Dudu » ! Je compte sur toi pour des futurs soirées parisiennes, et notre futur équipe de Hockey ^^.

Ma Maudou, ma « sœur de lait », grand parents proche, parent proche... On fera durer la tradition j'espère ;) comment te dire à quel point tu comptes pour moi tellement de moments partagés des vacances au ski, à Hossegor et aucune dispute une amitié toujours aussi forte. Je sais que je peux compter sur toi et inversement <3

À ma Doudou, ma Chloé déjà 9 ans d'amitié. Qui aurait cru que pendant cette première semaine à Formaplust on construirait une amitié comme ça. Un lien tellement fort, qui nous a valu quelques surnoms ^^ (les ..de P1, Roundup & Fertiligène, Mérédith et Cristina). Même si maintenant il y a la distance, mon amitié pour toi reste indemne.

À ma Marlène, ma jumelle de saison. Une année de sauveteuse en ta compagnie et hop voilà mon double trouvée, merci pour toutes ces soirées, tous ces bons moments partagés, et cette si belle amitié trouvée.

À mes amis du Berry, Ma Sarmuch merci pour toutes ces belles années de basket qui me manque tellement (« Les filles ont ne jouent pas le domaine » mais qui nous ont permis de construire une amitié sincère et qui compte beaucoup pour moi. Mathilde et Juliette, merci pour ces bons moments partagés surtout le fameux trajet en « voiture avec coffre de toi, et compilation au vol 32^^) Hâte de partagés de folles soirées parisienne avec vous tous Jérôme, Thomas, David...

À mes amis de fac, Laura et Clara, même si nous avons pris des parcours différents, et que la distance nous a éloigné, merci pour toutes ces belles soirées limougeaudes. J'espère vraiment qu'on en partagera d'autres. Alex, merci pour ton soutien durant la période difficile de l'internat. Pour toutes ces longues heures de révisions à Bordeaux, merci pour ton soutien et si j'en suis là c'est aussi grâce à toi.

À mes collègues de Novo, Clara mon acolyte rashboard, Marine et Karine merci pour toutes ces petites pauses en votre compagnie, Tiphaine merci pour m'avoir fait partagé toute ton expertise Qualité, et bien sur Charlotte mon ancienne Chef, tu as vraiment été au top et j'espère pouvoir un jour avoir tes qualités de manager ☺

*À mes amis Limougeaude*s, JC & Thibault j'attends toujours le tour en planeur ^^, tous les gars de la SNSM : Axel, Papy Joël, Grillon, chinois, Grouss, Donovan, Damien, Florian et tous les autres...Merci de m'avoir fait découvrir cette super association, qui m'a tellement apporté (je ne parle pas que des soirées ^^) et m'a permis de me construire et devenir une sauveteuse en mer ;)

À mes amis Normands, Thibault, Maurice, Simon, Bichon, Cécé, Paul, Thomas..., merci pour ces super vacances à Hossegor qui m'ont permis de vous rencontrer et avec qui

Liste des Abréviations

Ag Antigène

ADDC Antibody dependent cell mediated Cytotoxicity

AICD Activation Induced Cell Death

Akt Ak mouse strain thymoma

AMM Autorisation de Mise sur le Marché

ASC Aire Sous la Courbe

APC Antibody-producing cell

AutoAc auto-anticorps

ATP Adénosine triphosphate

BAFF B cell activating factor

BCAP B cell adapter for PI3K

BCR B cell receptor

BIM BCL-2 interacting mediator of cell death

BH BTK Homology Region

Blk B-lymphocyte kinase

BMX Bone marrow-expressed kinase

BTK Bruton's tyrosine kinase

c-Kit c-Jun N-terminal Kinase

c-Src Rous sarcoma oncogene cellular homologue

CD : Cluster Differentiation

CI complexe immun

CIA Collagen-induced arthritis

CLP progéniteur lymphocytaire commun

Cmax concentration maximale

CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA Cellule Présentatrice d'Antigène
CSH Cellule Souche Hematopoïétique
CTLA4 Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4
Cys cystéine
DAG Diacylglycerol
DN Doubles Négatives
DP Doubles Positives
ECG Electrocardiogramme
ER Endoplasmic reticulum kinase
ErbB érythroblastosis oncogene B
EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
ERK Extracellular signal-regulated
FA Fibrillation Auriculaire
FDA Food and Drug Administration
FGFR Fibroblast Growth Factor Receptor
Foxp3 Forkhead box P3
HER Human Epidermal Growth Factor
GA glatiramer Acétate
GITR Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis factor like receptor
GLT Germline transcripts
GRB2 Growth factor receptor-bound 2
GPVI glycoprotéine de récepteur de collagène VI
IFN Interferon
Ig Immunoglobulin
IKK α/β Inhibitor of kappa-B kinase subunit α/β
IL-7 Interleukin-7
IP3 Inositol 1,4,5-trisphosphate

IPEX Immune Dysregulation Polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
ITAM Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITK Inducible T cell kinase
iTreg inductible Treg
JAK Janus Kinase
LLC Leucémie Lymphoïde Chronique
LCM Lymphome des Cellules du manteau
LES Lupus Erythémateux Systémique
LMC Leucémie Myéloïde Chronique
LNH Lymphome Non Hodgkinien
LYN Lck/Yes novel tyrosine kinase
MAI Maladie Auto-Immune
MAPK Mitogen-activated protein kinase
MBP protéine basique de la myéline
MEK Mitogen activated protein kinase
NFAT Nuclear factor of activated T cells
NF κ B Nuclear factor of kappa B
NK Natural Killer
nTreg natural T reg
ORR Objective Response Rate
P-gp glycoprotéine P
PDGFR Platelet Derived Growth Factor Receptor
PI3K Phosphoinositide 3-kinase
PIP₂ Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP₃ Phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate
PH Pleckstrin Homology
PKC β Protein kinase C β

PLC γ Phospholipase C γ
PRR Pattern Recognition Receptors
PTEN Phosphatase and tensin homologue
PTK Protéines Tyrosine Kinase
PR Polyarthrite Rhumatoïde
RAG Recombination Activating Gene
RCP Résumé Caractéristique du Produit
RLK Resting lymphocyte kinase
SCF Stem Cell Factor
SEP Sclérose En Plaque
SH2 domain Src homology 2 domain
SH3 domain Src homology 3 domain
SHIP1 SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase-1
SLC Surrogate light chain
SLP65 SH2 domain leukocyte protein of 65 kD
SYK Spleen tyrosine kinase
TAK TGF- β activated kinase
TCR T Cell Receptor
TEC Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma
TH domain TEC homology domain
TLR Toll-like receptor
VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vwF facteur de von Willebrand
WASP Wiskott–Aldrich syndrome protein
WT Wild type
Xid X-linked immunodeficiency
XLA X-linked agammaglobulinemi

Table des matières

Liste des enseignants	4
Remerciements.....	8
Liste des Abréviations	14
Table des illustrations	20
Table des tableaux.....	21
Introduction	22
1. Le système immunitaire et les pathologies auto-immunes.....	25
1.1 Généralités sur le système immunitaire	25
1.1.1 L'immunité innée.....	25
1.1.2 L'immunité adaptative	26
1.2 L'ontogénie des lymphocytes	29
1.2.1 La maturation lymphocytaire.....	29
1.2.2 Activation des lymphocytes : exemple des lymphocytes B.....	37
1.2.3 Transduction du signal BCR.....	41
1.3 La tolérance immunitaire	43
1.3.1 La tolérance des lymphocytes T.....	45
1.3.2 La tolérance des lymphocytes B	48
1.4 Un système immunitaire pathologique : les maladies auto-immunes	51
1.4.1 Critères de classification des pathologies auto-immunes	52
1.4.2 Les mécanismes lésionnels des effecteurs auto-immuns : les autoanticorps.....	52
1.4.3 Le rôle des autoantigènes.....	53
1.4.4 Des traitements immunosuppresseurs aux nouvelles thérapies	54
2. La Tyrosine kinase de Bruton : (BTK).....	58
2.1 Structure de la BTK.....	59
2.2 Régulation de l'expression.....	61
2.3 Le rôle de BTK dans les cellules B.....	63
2.3.1 BTK et le BCR.....	64
2.3.2 BTK et les autres voies	65



3 Les inhibiteurs de la BTK utilisés en oncologie, vers une utilisation en immunologie	66
3.1 Le premier inhibiteur de BTK en oncologie : l'Ibrutinib	67
3.2 Les limites de son utilisation	69
3.2.1 Les effets indésirables	69
3.2.2 Les interactions médicamenteuses	71
3.2.3 Les problèmes de résistances	73
3.3 Le développement d'inhibiteurs de BTK de seconde génération	74
4 Le développement des inhibiteurs de la BTK dans les MAI	77
4.1 Critères d'évaluation d'un laboratoire pour le développement des inhibiteurs de BTK pour des indications immunologiques	82
4.1.1 L'efficacité de l'inhibiteur vis-à-vis de la cible BTK	82
4.1.2 Tests de pharmacologie et modèles animaux : <i>in vivo</i>	86
4.1.3 Critères de jugement : notion de sécurité des études non cliniques	88
4.2 Exemples de résultats cliniques	94
5 Discussion	97
5.1 L'évaluation de l'efficacité	97
5.1.1 Démonstration pharmacologique <i>in vitro</i>	97
5.1.2 Démonstration pharmacologique <i>in vivo</i>	98
5.2 L'évaluation de la sécurité	100
5.3 L'évaluation de la sélectivité et de la réversibilité	101
6 Conclusion	104
Références bibliographiques	107
Serment de Galien	118

Table des illustrations

Figure 1 : Grandes lignes de branches humorales et cellulaire du système immunitaire.....	27
Figure 2 : Rôle des CMH de classe I (a) et de classe II (b).....	28
Figure 3 : Coopération entre l'immunité innée et adaptative.....	29
Figure 4 : Développement des lymphocytes T au niveau thymique	32
Figure 5 : Le développement complexe des lymphocytes B.....	36
Figure 6 : Les récepteurs des lymphocytes B et T requièrent des molécules accessoires et des co-récepteurs pour la transduction du signal.....	38
Figure 7 : Schéma représentant les principes de la signalisation lymphocytaire	40
Figure 8 : Transduction du signal BCR.....	42
Figure 9 : Mécanisme de tolérance des lymphocytes T et B.....	45
Figure 10 : Exemple des mécanismes lésionnels auto anticorps dépendants.....	53
Figure 11 : Les différents domaines de la protéine de la BTK.....	60
Figure 12 : Regroupement des molécules de transduction du signal suite à l'engagement du BCR	62
Figure 13 : voie de régulation de la BTK et les inhibiteurs de kinase	63
Figure 14 : Arbre phylogénétique représentant les relations phylogénétiques entre les domaines de kinases	82
Figure 15 : Image radiologique d'une patte de souris non traitées versus traitées par un inhibiteur de la BTK.....	87

Table des tableaux

Tableau 1 : Les inhibiteurs de protéines kinases approuvés par la FDA (au cours des années 2000).....	66
Tableau 2 : Les inhibiteurs de BTK en développement (et leur stade de développement en juillet 2016)	77
Tableau 3 : Laboratoires pharmaceutiques ayant arrêté le développement d'inhibiteurs de la BTK dans les MAI	79
Tableau 4 : Inhibiteurs irréversibles en développement dans les MAI	80
Tableau 6 : Valeurs des IC50 de certains inhibiteurs de BTK en développement dans les MAI	84
Tableau 7 : Test d'efficacité cellulaire d'un inhibiteur de la BTK	86
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des études non-cliniques nécessaires avant toute première administration chez l'Homme, et leurs objectifs.....	89
Tableau 9 : Durée recommandée des études de toxicité en doses répétées, adapté de l'ICH (2009) M3 (R2)	92

Introduction

Les maladies auto-immunes (MAI) surviennent lorsqu'il y a rupture de la tolérance du soi, et sont associées à une réaction immunitaire vis à vis des constituants du soi provoquant des lésions cellulaires et/ou tissulaires induites par les lymphocytes T et/ou B produisant des auto-anticorps spécifiques d'auto- antigènes.

Les thérapies actuellement utilisées pour le traitement des MAI, sont les traitements anti-inflammatoires, immunosuppresseurs non sélectifs, ou cytotoxiques associés à une efficacité clinique limitée et à des effets secondaires significatifs [1,2]. La recherche thérapeutique s'est donc orientée vers des thérapies ciblées utilisant des agents biologiques. Les premières cibles ayant montré des résultats significatifs ont été les cibles extracellulaires, comme les anti-TNF- α (l'étanercept Enbrel ®, l'infliximab: Remicade ® et Adalimumab : Humira ®) et les anti-CD20 (rituximab) inhibant/limitant la prolifération des cellules B pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (PR), par exemple ou encore le mycophénolate mofétil CellCept ®, un immunosuppresseur, utilisé en traitement de référence pour le lupus érythémateux systémique (LES).

Cependant, les agents biologiques ne sont pas efficaces chez tous les patients, et n'entraînent parfois qu'une réponse partielle des patients répondeurs. Un besoin médical important non couvert à ce jour existe encore pour le traitement des patients atteints de MAI et les recherches actuelles explorent notamment des voies de signalisation intracellulaire.

La phosphorylation des protéines par les kinases représente un mécanisme fondamental de la signalisation cellulaire [3,4]. Les analyses biochimiques et les expériences de ciblage génétique *in vivo* ont impliqué les tyrosine kinases en tant que régulateurs clés de la différenciation, de la prolifération, de la survie et de la migration cellulaire dans le développement et la fonction des cellules B [5].

Le gène de l'une d'entre elles, la tyrosine kinase de Bruton (BTK), est muté dans l'immunodéficiences primaire de l'agamma-globulinémie liée au X (XLA) chez l'homme et l'immunodéficiences liée au X (Xid) chez la souris [6,7]. Le défaut de base de XLA est une incapacité du patient à produire des anticorps dû à l'absence d'immunoglobulines (Ig) causée

par un défaut de maturation des précurseurs des lymphocytes B. La BTK est impliquée dans la signalisation du récepteur des cellules B (BCR, *B cell receptor*) des cellules B matures (la stimulation du BCR induit la phosphorylation de la BTK [8]), et joue également un rôle fondamental dans la lymphopoïèse B, organisant le développement ordonné et la différenciation des cellules B immatures en formes matures : stimulation du cycle cellulaire, des facteurs de différenciation, contrôle de la prolifération et de la survie des cellules B [9-11].

Quelques années après l'identification de BTK, le premier inhibiteur de BTK, l'ibrutinib, a été développé et a montré une activité anti tumorale *in vitro* sur des cellules leucémiques [13,14]. Son développement clinique a conduit à l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) par l'agence européenne du médicament (EMA) pour le traitement du lymphome du manteau (LCM) en novembre 2013 et de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en février 2014. Il est aujourd'hui indiqué dans le traitement des adultes atteints d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) ayant reçu au moins un traitement antérieur, ou en première ligne en cas de délétion 17p ou de mutation *TP53* chez les patients pour lesquels une immuno-chimiothérapie est inadaptée ainsi que dans le traitement des adultes atteints d'un lymphome à cellules du manteau (LCM) en rechute ou réfractaire. Il représente aujourd'hui une avancée majeure dans le traitement de ces maladies [15].

L'expression cellulaire et la fonction de ces kinases ne sont pas seulement intéressantes dans le traitement des hémopathies malignes, des produits inhibiteurs de la BTK mais auraient aussi une efficacité potentielle dans le traitement des MAI [12], telles que le lupus érythémateux systémique (LES), la sclérodermie ou le syndrome de Gougerot Sjögren.

Le rôle du BCR et de la signalisation des cellules B dans les MAI, suggère que les inhibiteurs de la BTK pourraient également être utiles dans le traitement de ces pathologies [16].

Plusieurs études précliniques ont étudié l'efficacité de l'inhibition de BTK sur des modèles animaux de maladie inflammatoire comme l'arthrite : modèle CIA, (Collagen Induce Arthritis). L'ibrutinib a considérablement diminué la gravité des symptômes, de façon dose-dépendante [17].

L'objectif de ce travail de thèse a été de faire l'inventaire des produits inhibiteurs de BTK actuellement en développement dans des MAI et de comparer leurs caractéristiques. Le présent document fait un rappel sur **1)** les MAI, **2)** la structure, le rôle et les mécanismes de régulation de la BTK, **3)** les inhibiteurs de BTK en oncologie en mettant l'accent sur l'ibrutinib, premier médicament de cette classe pharmacologique, développé dans le traitement de certains cancers.

Nous présenterons par la suite, les résultats d'études qui ont été menées, avec l'ibrutinib et d'autres inhibiteurs de BTK, pour le traitement de MAI. Et nous comparerons les inhibiteurs de BTK actuellement en développement préclinique et clinique dans des MAI par d'autres laboratoires pharmaceutiques selon **1)** leur profil pharmacologique *in vitro/vivo*, **2)** leurs caractéristiques pharmacocinétique et toxicologique et **3)** les résultats obtenus à ce jour en clinique (volontaires sains et/ou patients).

1. Le système immunitaire et les pathologies auto-immunes

L'immunologie est la science qui étudie les aspects de défense de l'hôte contre une agression. Le terme latin *immunis*, qui signifie « dispensé de, exempté de » est à l'origine du mot immunité qui indique un état de protection contre telle ou telle maladie infectieuse. Le système immunitaire est un système biologique constitué d'un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance et de défense qui discrimine le soi du non soi.

1.1 Généralités sur le système immunitaire

Bien que l'on fasse référence « au système immunitaire » il existe en réalité deux systèmes interconnectés d'immunités : l'innée et l'adaptative. Ces deux systèmes collaborent pour protéger l'organisme contre les envahisseurs étrangers [18].

1.1.1 L'immunité innée

Contrairement aux réponses immunitaires adaptatives qui prennent des jours à se mettre en place, les mécanismes de défense de l'immunité innée interviennent immédiatement après l'invasion par un pathogène (virus, bactérie, champignons ou parasites). Ceux-ci incluent des barrières physiques et chimiques contre l'infection, de même que les récepteurs qui reconnaissent les structures chimiques de nombreux pathogènes, regroupés sous le terme de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ou récepteurs de reconnaissance de signatures (PRR *Pattern Recognition Receptors*). Quand les PRR détectent ces structures chimiques, une cascade d'événements désigne le pathogène comme la cible à détruire. L'immunité innée comprend aussi une série de protéines sériques préexistantes, regroupées sous le terme de complément, qui se lient à des structures communément associées aux pathogènes et initient une cascade de détection puis de destruction.

Ces lignes de défense précoce sont très efficaces et permettent la plupart du temps d'empêcher la majorité des pathogènes de prendre le contrôle de l'organisme, ou permettent l'élimination des agents infectieux dans les heures qui suivent la rencontre. Les éléments de reconnaissance du système immunitaire innée sont rapides, certains agissent dans les secondes suivant la rupture de barrière, mais ne sont pas très spécifiques, et sont par conséquent incapables de distinguer les petites différences de pathogènes.

1.1.2 L'immunité adaptative

Une seconde forme d'immunité, l'immunité adaptative est bien mieux adaptée aux petites différences moléculaires. Cette partie du système, met beaucoup plus de temps à se mettre en place, mais est bien plus spécifique de l'antigène. Elle nécessite la reconnaissance spécifique d'un antigène du non soi par le processus de présentation à l'antigène, pour les lymphocytes T. Typiquement une réponse immunitaire adaptative contre un pathogène donné a lieu 5 à 6 jours suivant la rupture de barrière et l'exposition initiale, et est suivie par une résolution progressive de l'infection.

L'immunité adaptative est plus lente en partie parce que nettement moins de cellules possèdent les récepteurs adéquats pour le travail. Elle est aussi plus lente car elle repose sur une rencontre préalable et une « catégorisation » de l'antigène assurée par les processus innés. La capacité à mettre en place ces réponses adaptées est maintenue par des cellules mémoires.

Les cellules du système immunitaire adaptatif sont des leucocytes spécifiques, appelés lymphocytes. Les cellules T et B sont les lymphocytes majeurs, les lymphocytes T (cellules T), dérivé du thymus sont impliqués dans l'immunité cellulaire. Les lymphocytes B (cellules B) sont impliqués dans l'immunité humorale et ont pour site de développement la moelle osseuse. Les cellules T reconnaissent le non soi seulement qu'après un antigène, par exemple un fragment du pathogène, ait été reconnu par combinaison avec un récepteur du soi du complexe majeur d'histocompatibilité. Au contraire, le récepteur antigénique des cellules B est une molécule d'anticorps à la surface des cellules B qui reconnaît l'ensemble des pathogènes sans avoir besoin d'une reconnaissance de l'antigène. (Figure 1 : [18]). Le fonctionnement de ces cellules est lié et dépendant du complexe majeur d'histocompatibilité.

La réponse cellulaire implique différentes sous populations de lymphocytes T assurant de nombreuses fonctions, dont la sécrétion de messagers solubles qui aident à diriger les autres cellules du système immunitaire et la mise à mort directe des cellules infectées. La réponse humorale implique l'interaction des lymphocytes B et des lymphocytes T avec des antigènes, et leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps. Ces derniers se lient aux protéines étrangères ou aux agents infectieux pour favoriser leur élimination.

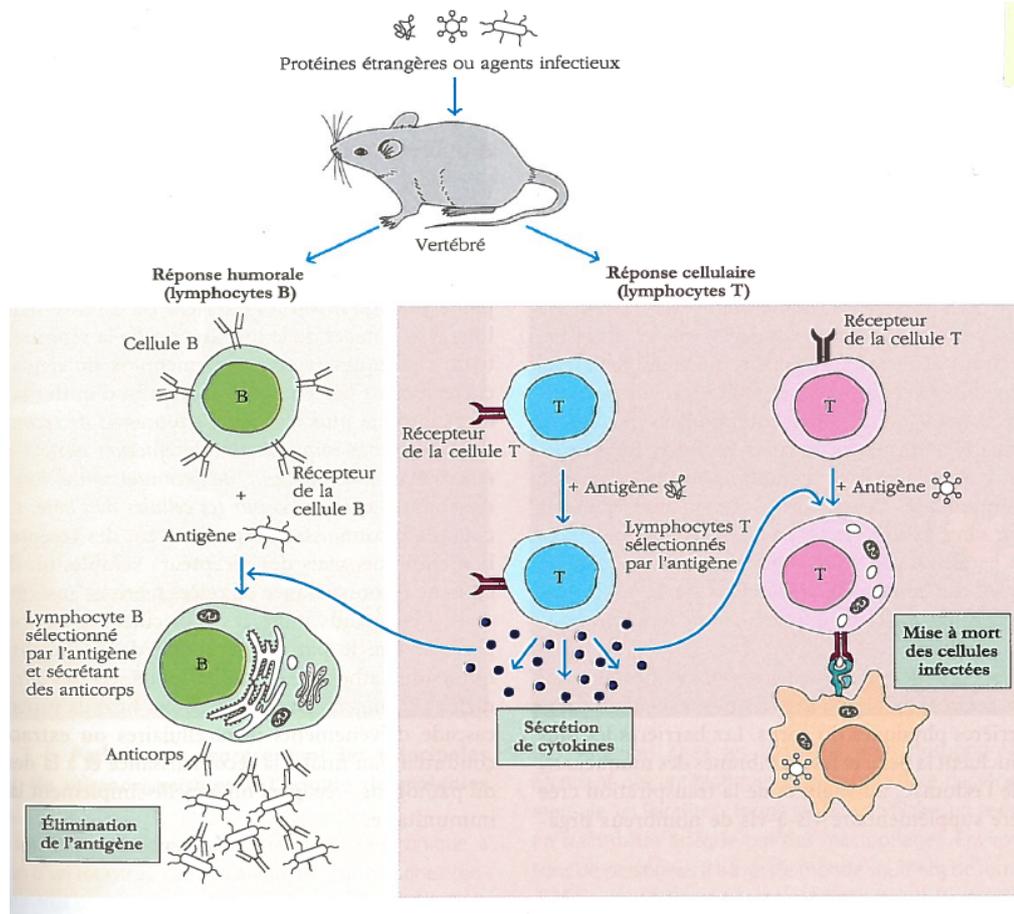


Figure 1 : Grandes lignes de branches humorales et cellulaire du système immunitaire

a) Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Le complexe majeur d'histocompatibilité est, un système de reconnaissance du soi. Les molécules du CMH sont situées à la surface des cellules présentatrices de l'antigène qui permettent de présenter l'antigène aux lymphocytes T afin de pouvoir les activer. Il existe deux types de molécules de CMH ; de classe I et II [19]. Il s'agit d'un ensemble complexe de gènes, appelé le complexe HLA (Human Leukocyte Antigen) chez l'homme, qui est différent chez deux individus, excepté les vrais jumeaux. Ces gènes sont très polymorphiques et chacune de ces allèles s'exprime en co-dominance, ce qui permet à chaque individu de disposer d'une grande variété de configurations, et augmente les chances de reconnaître un marqueur étranger. D'un point de vue moléculaire, cette information génétique est exprimée en protéines de surface. Ainsi les molécules de CMH de classe I sont présentes sur toutes les cellules nucléées, à l'exception des glandes salivaires, des neurones et de certains tissus de la cornée. Elles permettent de présenter aux lymphocytes cytotoxiques (T CD8) l'antigène et servent de marqueur de soi pour les lymphocytes Natural Killer (NK). Les molécules du CMH de classe II permettent aux macrophages et cellules dendritiques de présenter les parties des

corps intrus pour déclencher une réponse immunitaire, par l'intermédiaire des lymphocytes T CD4. (Figure 2 : [20]). Ces molécules participent aux réponses immunitaires, mais peuvent également dans de rares cas, devenir à leur tour responsables de maladies auto-immunes indépendamment de l'immunité cellulaire.

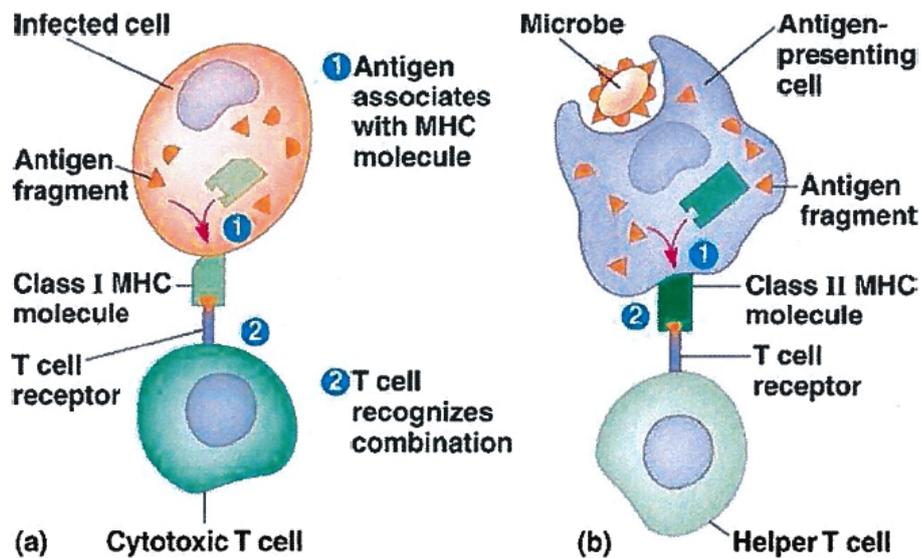


Figure 2 : Rôle des CMH de classe I (a) et de classe II (b)

b) Les cellules présentatrices d'antigènes

Le processus de présentation de l'antigène est réalisé par des cellules qui portent un antigène étranger couplé à leur CMH à leur surface, appelées cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Elles sont considérées comme des messagers entre le système immunitaire inné et adaptatif. Ces cellules sont capables d'internaliser les antigènes soit par des processus d'endocytose liée aux récepteurs, soit par phagocytose. Les lymphocytes peuvent alors reconnaître et interagir avec les molécules du CMH liées à l'antigène. Puis elles expriment un ensemble de molécules de costimulation requis pour l'activation des lymphocytes T. En effet, ces dernières ne peuvent identifier un antigène par leur TCR (T Cell Receptor) que si celui-ci est présenté par une autre cellule. Ces CPAs expriment les molécules de CMH des deux classes et peuvent stimuler les cellules T auxiliaires (T helper) et T CD8+ cytotoxiques. Il existe trois catégories de CPAs professionnelles : les cellules dendritiques, les macrophages et certains lymphocytes B très spécifiques.

Après la rencontre avec l'antigène, les lymphocytes T et B prolifèrent. Bien que lentes à se mettre en place, une fois que ces cellules T et B ont été sélectionnées et ont affiné leur stratégie d'attaque, elles deviennent des combattants redoutables pour mettre fin à l'infection. Les réponses adaptatives impliquent un système interconnecté de cellules et de signaux chimiques qui agissent ensemble pour terminer le travail entamé au cours de la réponse innée (Figure 3 : [18]).

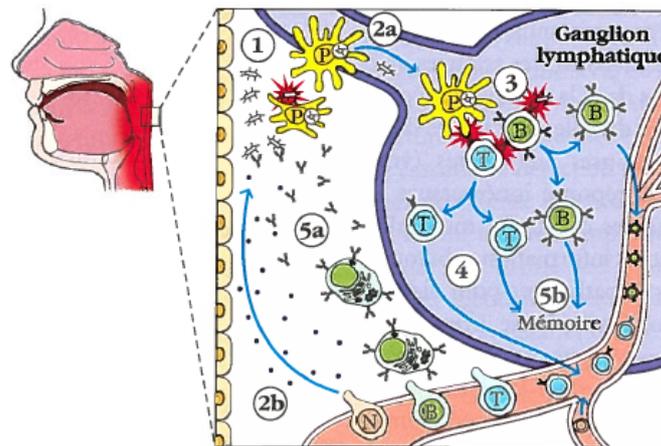


Figure 3 : Coopération entre l'immunité innée et adaptative

1. Les pathogènes sont introduits par la surface des muqueuses et sont attrapés par les cellules phagocytaires : c'est l'immunité innée. 2a. La cellule phagocytaire subit des modifications et amène des morceaux du pathogène à un ganglion lymphatique local pour aider à activer l'immunité adaptative. 2b. Les phagocytes résidant sur le site de l'infection sécrètent des cytokines et des chemokines qui entraînent un afflux de sang et aident à recruter d'autres cellules du système immunitaire (inflammation). 3. Dans les ganglions les cellules T et B, ayant le récepteur avec la bonne spécificité, sont sélectionnées clonalement lorsque leur récepteur se lie à l'antigène ; c'est l'immunité adaptative. 4. Les cellules T et B coopèrent, et la rencontre avec l'antigène conduit à la prolifération et la différenciation des lymphocytes, pour générer des cellules qui peuvent identifier et éradiquer le pathogène. 5a. Les cellules B sécrètent des anticorps spécifiques de l'antigène qui vont aider à détruire le pathogène. 5b. En plus des cellules T et B mémoires sont générées lors de la réponse primaire, et seront disponibles lors de l'initiation d'une réponse secondaire, qui sera alors plus rapide et spécifique de l'antigène.

1.2 L'ontogénie des lymphocytes

1.2.1 La maturation lymphocytaire

Comme nous l'avons vu précédemment, une réponse immunitaire efficace dépend de nombreuses interactions précisément orchestrées et fait intervenir différents types de cellules : des cellules du système immunitaire inné formant une première ligne de défense, des CPA qui coordonnent la réponse adaptative et induisent la génération de lymphocytes mémoires pour empêcher les infections futures. La grande diversité de reconnaissance des antigènes et

des anticorps permet aux lymphocytes T et B de réagir contre la majorité des pathogènes. Cette grande diversité englobe la possibilité de réagir contre les antigènes du soi. Conséquemment, le système immunitaire élimine par un principe de sélection, les lymphocytes réagissant trop fortement ou trop faiblement contre les antigènes du soi. Les lymphocytes sélectionnés positivement permettent la défense contre les antigènes étrangers reconnus par le contexte CMH, tandis que la sélection négative est essentielle pour éviter des réactions auto-immunitaires [18]

Le système immunitaire est composé de deux grands groupes anatomiques : les organes lymphoïdes primaires, permettant le développement des lymphocytes à partir de précurseur immature, la moelle osseuse pour les cellules B et le thymus pour les cellules T. Les organes lymphoïdes secondaires coordonnent la rencontre avec l'antigène et les lymphocytes qui lui sont spécifiques. Ces organes incluent la rate, les ganglions lymphatiques, certains sites spécialisés de l'intestin et d'autres tissus associés aux muqueuses. Ces organes sont connectés par des vaisseaux sanguins et le système lymphatique.

Toutes les cellules sanguines matures et spécialisées dans une fonction, dérivent d'un même type cellulaire, la cellule souche hématopoïétique (CSH). Le processus par lequel les CSH se différencient en cellules matures est appelé hématopoïèse. Chez les mammifères, les deux organes lymphoïdes primaires permettent le développement des CSH immunitaires matures : la moelle osseuse où les CSH résident et donnent naissance à tous les types cellulaires ; et le thymus. Tous les lymphocytes sont créés par ce processus à partir d'un type d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP) avant d'être différenciés. La formation des lymphocytes est appelé lymphopoïèse, au cours de ce processus les cellules T migrent dans le thymus afin de maturer. Une fois leur maturation terminée, les lymphocytes entrent dans la circulation sanguine et vont se loger dans les organes lymphoïdes secondaires.

a) Principe de la sélection thymique

Les lymphocytes T immatures migrent de la moelle osseuse vers le thymus. La migration débute vers le 11^e jour chez la souris et entre le 8^e et 9^e semaine de gestation chez l'homme. Le thymus continue à se développer durant les 3^e et 4^e semaines après la naissance chez la souris alors qu'il est complètement formé à la naissance chez l'être humain. Après, la puberté, le thymus commence à diminuer de taille, dû à une production diminuée de nouveaux

lymphocytes T. Le thymus se compose de plusieurs lobules avec une région corticale externe, appelée le cortex thymique, et une région interne appelée médulla [21].

Le thymus est un environnement spécialisé où les cellules T génèrent des récepteurs uniques aux antigènes (récepteurs de cellules T ou TCR) qui sont ensuite sélectionnés sur la base de leur réactivité vis-à-vis des complexes CMH-peptides du soi exprimé à la surface des cellules stromales thymiques. Ces cellules T dont les TCR se lient aux complexe-CMH-peptides du soi avec une forte affinité sont amenées à mourir : c'est la sélection négative, alors que les thymocytes qui se lient au complexe-CMH-peptides du soi avec une affinité intermédiaire subissent une sélection positive permettant leur survie, leur maturation et leur migration vers la médulla thymique. La majorité des cellules meurent en raison d'une trop faible affinité pour les combinaisons CMH-antigènes du soi qu'elles rencontrent à la surface des cellules épithéliales thymiques et ne parviennent pas à passer l'étape de la sélection positive.

A leur arrivée au thymus, les progéniteurs lymphoïdes n'expriment pas de molécules de surface caractéristiques aux lymphocytes. Les précurseurs des cellules T entrent dans le thymus par les vaisseaux sanguins situés à la jonction cortico-médullaire. Cette étape va leur permettre d'acquérir certaines molécules de surfaces spécifiques des lymphocytes T, dont le Thy-1 (Figure 4 : [21]). A ce stade, les cellules T immatures, appelées thymocytes (cellules thymiques) en raison de leur site de maturation, n'expriment pas encore le complexe CD3/TCR et le co-récepteur CD4 ou CD8 (qui sont des marqueurs des cellules T matures) Elles sont donc appelées cellules Doubles Négatives (DN). Ces cellules migrent tout d'abord vers la région sous la capsule du thymus, appelé cortex sous capsulaire, où elles prolifèrent et commencent à générer des récepteurs de cellules T. Les DN sont subdivisés selon leur expression des molécules CD25 (récepteurs IL-2), CD44 (molécule d'adhésion) et c-kit (récepteur du stem cell factor). Lorsque les thymocytes expriment CD44 et CD25, les gènes codant pour la chaîne β du TCR se réarrangent pour être exprimés. Celles qui ne parviennent

pas à réaliser ce réarrangement meurent et celles qui réussissent à exprimer des TCR, survivent et perdent l'expression de CD25. La chaîne β s'assemble avec une chaîne α substitut pour former le pré-TCR, accompagné de CD3. L'assemblage CD3/pré-TCR engendre la prolifération et l'expression des molécules CD4 et CD8, devenant ainsi des thymocytes Doubles Positives (DP). Lorsque que la prolifération s'arrête, les gènes codant pour la chaîne α se réarrangent, puis est exprimé avec la chaîne β , formant ainsi un TCR fonctionnel.

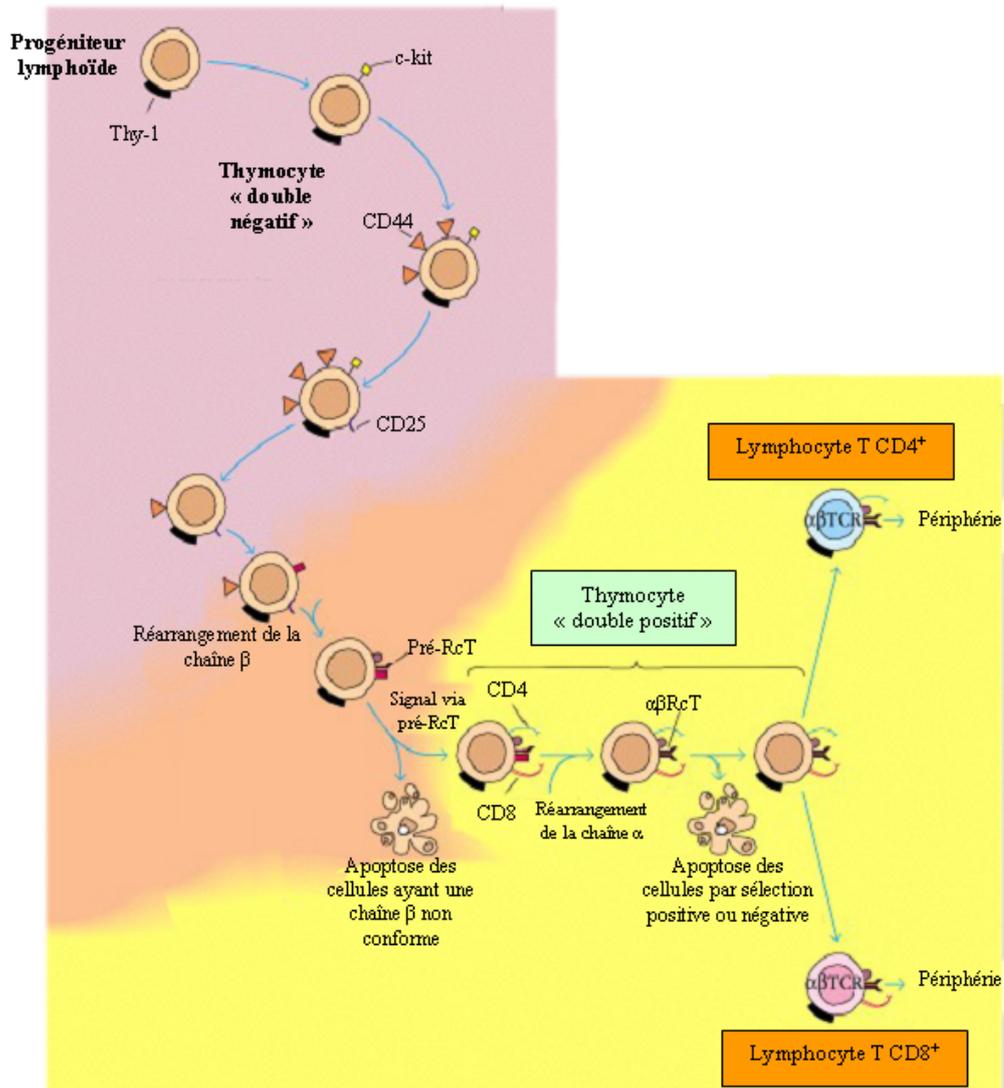


Figure 4 : Développement des lymphocytes T au niveau thymique

1. La sélection positive

La sélection positive permet la survie des thymocytes qui possèdent une bonne affinité avec les CMH de classe I et II exprimés (présentant un peptide du soi) sur les cellules épithéliales du cortex thymique. Cette sélection est nécessaire pour induire une réponse immunitaire restreinte aux molécules du CMH. Ainsi les thymocytes DP interagissent avec les CMH I et II par leur TCR et les molécules CD4 et CD8. Les thymocytes qui ne se lieront pas aux CMH mourront par apoptose dans les jours suivants. La sélection positive permet aussi de différencier les lymphocytes en CD4+ ou CD8+. Suite à leur sélection, les lymphocytes n'expriment qu'une seule de ces deux molécules. Cette discrimination dépendra du type de CMH avec lequel le thymocyte aura le plus d'affinité. Une meilleure affinité pour le CMH I produira des lymphocytes T CD8+, tandis qu'une meilleure affinité pour le CMH II engendrera des lymphocytes T CD4+. La plupart des lymphocytes (> 95%) ne survivent pas à cette sélection positive. Les thymocytes sélectionnés vont migrer ensuite vers la médulla, où ils subiront un processus de sélection négative.

2. La sélection négative

Les affinités entre les TCR et les CMH peuvent varier de faible à forte. La sélection négative permet la discrimination entre les différentes affinités et permet ainsi d'éliminer les thymocytes qui réagissent trop fortement aux interactions entre le CMH présentant les peptides du soi. Cette sélection est importante pour développer une tolérance au soi (cf chapitre suivant). La médulla est composée de différents types cellulaires dont les cellules dendritiques et les macrophages dérivés de la moelle osseuse. Ces cellules exposent leur CMH de classe I et II et interagissent avec les thymocytes. Les mécanismes de sélection négative ne sont pas encore connus, mais les cellules meurent par un processus d'apoptose. Une fois ces deux sélections terminées, les lymphocytes T sont de petites de taille et dans un état de repos. Ils se retrouveront dans le système immunitaire périphérique et migreront dans les organes lymphoïdes secondaires où ils pourront effectuer leur tâche de reconnaissance d'antigène.

b) Principe de sélection des lymphocytes B

Comme nous l'avons expliqué ci-dessus, le développement des lymphocytes B se fera au niveau de la moelle osseuse à partir des CSH. Ces dernières formeront les progéniteurs lymphocytaires communs (CLP) dont une partie migrera vers le thymus pour la formation des lymphocytes T et l'autre restera dans la moelle pour former les lymphocytes B, on parlera de cellules pro-B. Au niveau de la moelle osseuse. L'ontogénie des lymphocytes B dépend d'un contact étroit entre ces dernières et les cellules stromales constituant la moelle. Elles permettent l'expression de facteurs indispensables à leur maturation.

La maturation des lymphocytes B et l'acquisition de la tolérance au soi sont différentes des lymphocytes T. En effet, les cellules B n'ont qu'une seule destinée, en dehors des cellules mémoires et les plasmocytes ; il n'y a donc pas d'étapes d'acquisition des clusters de différenciation CD4 et CD8. En revanche, la maturation des lymphocytes B doit faire face aux réarrangements des gènes des différentes classes de BCR.

On distingue différentes étapes dont chacune est caractérisée par les stades de l'évolution des lymphocytes B (Figure 5 : [23].)

- Au stade « pro-B précoce » (progénitrices) appelé aussi pré-pro B : ces cellules expriment un marqueur spécifique de la lignée B, le CD45R (connu aussi sous le nom de B220), une tyrosine phosphatase membranaire ainsi que le facteur de transcription ERBF-1. Ce dernier se lie au gène d'immunoglobuline et facilite le réarrangement D-J de la chaîne lourde sur les chromosomes.
- Au stade « pro-B tardif » se réalise le réarrangement V-DJ. Après une prolifération au niveau de la moelle osseuse, une différenciation subséquente en cellules pré-B (précurseurs) nécessite une interaction avec les cellules stromales. Ces cellules assurent alors deux rôles fondamentaux : l'interaction directe avec les pro-B et les pré-B, et la sécrétion de cytokines, telles que IL-7, nécessaires au processus de développement.

Les cellules pro-B interagissent avec des molécules d'adhésion, comme VLA-4 et VCAM-1, présents sur la cellule pro-B et la cellule stromale. Après ce contact, s'exprime alors un récepteur sur la pro-B, le c-Kit. Ce dernier, interagit avec son ligand « stem cell factor » (SCF). C-Kit étant une tyrosine kinase, son activation engendre la prolifération et

la différenciation des pro-B en pré-B. Cela induit un processus de divisions cellulaires menant au réarrangement génétique des chaînes légères des Ig.

- Dans les cellules pré-B, le réarrangement de la chaîne lourde est terminé, permettant de cette manière l'expression associée à une pseudo-chaîne légère constituée de deux protéines la $V_{\text{préB}}$ et $\lambda 5$. La chaîne lourde et la pseudo chaîne légère constitueront le pré-BCR. Une fois ce dernier exprimé la cellule sera soumise à une première sélection, la sélection positive. Cette dernière permettra à la cellule pré-B, dans le cas où l'expression est productive, de recevoir un signal de survie afin de poursuivre sa maturation en lymphocyte B immature, dans le cas contraire la cellule mourra.
- Au stade « B immature », si le réarrangement de la chaîne légère a été productif, la cellule exprimera l'immunoglobuline IgM complète à sa surface. La cellule sera ainsi soumise à la deuxième sélection, la sélection négative, qui permettra l'acquisition de la tolérance au soi en purgeant les lymphocytes B autoréactifs (cf chapitre suivant). Cette sélection est possible par la présence, au niveau de la moelle osseuse, de cellules stromales qui expriment à leur surface les peptides du soi associées à des molécules de CMH, de la même manière que les cellules dendritiques au niveau du thymus. Il y aura alors trois possibilités :
 - Soit la cellule B immature est capable de reconnaître le peptide présenté par les molécules du CMH avec une faible affinité, elle sera alors considérée comme acceptable et poursuivra sa différenciation
 - Soit la cellule B immature est capable de reconnaître le peptide présenté par les molécules du CMH avec une forte affinité, elle sera alors considérée comme délétère pour le soi et sera sélectionnée négativement en recevant un signal de mort
 - Soit la cellule B immature n'interagit pas, alors elle recevra un signal de mort

Les cellules B qui survivront à cette sélection se retrouveront dans les organes lymphoïdes secondaires, où elles deviendront des lymphocytes B matures, exprimant en plus une IgD à leur surface et pouvant être activées par des antigènes exogènes [22].

- Une fois le lymphocyte B mature, il y aura une co-expression de l'IgM et l'IgD par épissage alternatif. Le lymphocyte B mature naïf est le stade ultime de développement dans la moelle. Ces cellules vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, au niveau desquels elles rencontreront l'antigène qui induira l'hypermutation somatique et la commutation de classe.

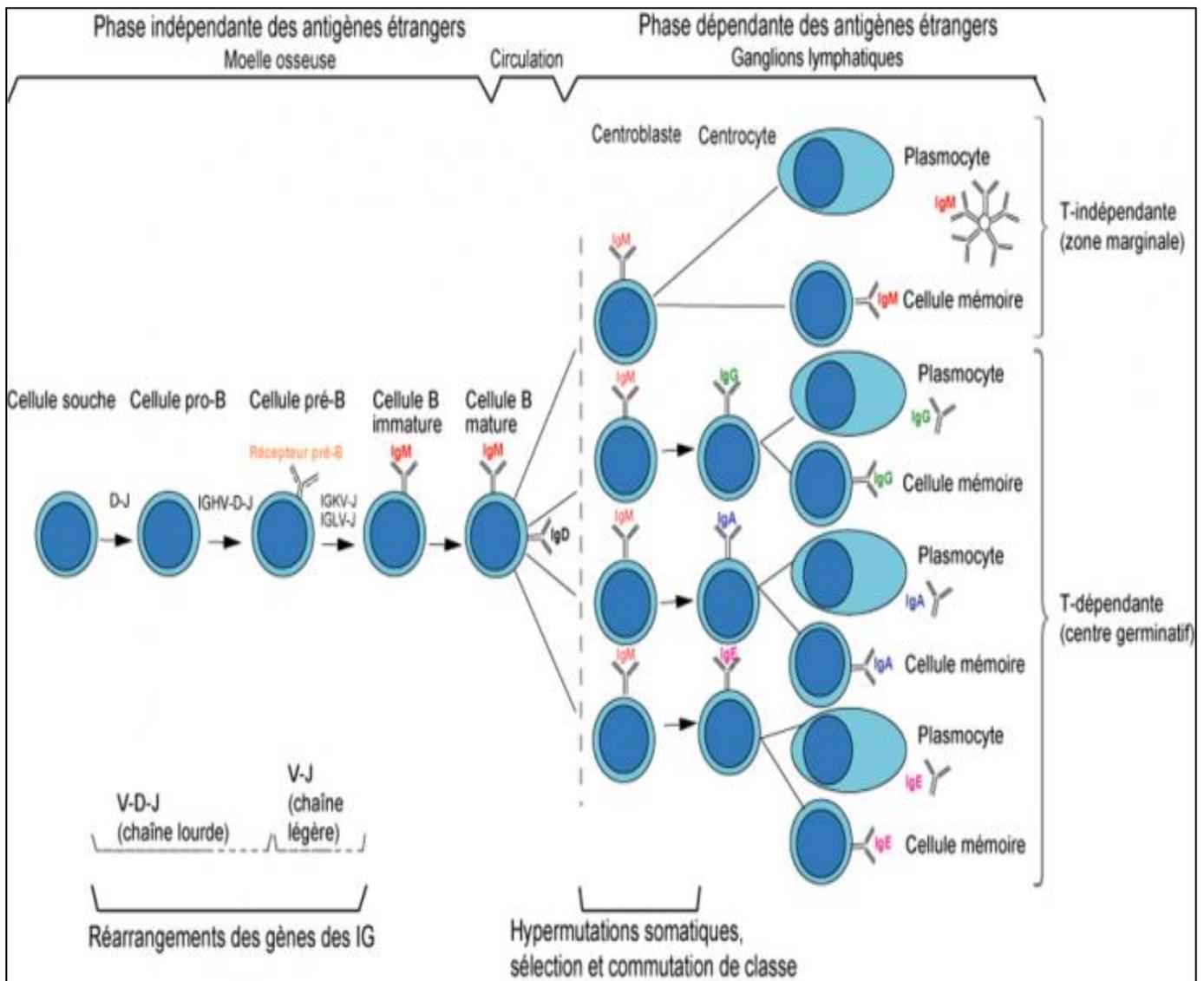


Figure 5 : Le développement complexe des lymphocytes B

1.2.2 Activation des lymphocytes : exemple des lymphocytes B

Une des premières étapes nécessaires à la transduction du signal est l'induction, par fixation du ligand, d'un changement physique ou chimique du récepteur lui-même ou bien de ses molécules associées. Certains récepteurs subissent des changements conformationnels suite à la liaison du ligand qui aboutissent à un degré de polymérisation bien plus élevé. Les récepteurs des lymphocytes B sont des formes membranaires de molécules d'anticorps. Il existe deux types de récepteurs à la surface des lymphocytes B naïfs, nommés immunoglobuline IgM et IgD. La fixation du ligand induit un changement conformationnel dans une partie de la molécule qui ne se lie pas, ce qui facilite l'agrégation multimérique du récepteur [18].

L'activation lymphocytaire est un processus complexe et très régulé. Plusieurs voies intracellulaires complexes et reliées entre elles sont nécessaires pour activer un lymphocyte. Lorsqu'un TCR et les molécules CD4 ou CD8 s'engagent avec un CMH présentant un peptide étranger, le complexe CD3 transduit trois types de signaux activateurs, qui sont reliés entre eux et nécessaires pour stimuler le lymphocyte :

- La phosphorylation de protéines membranaires et cytoplasmiques
- L'hydrolyse de la phospholipide inositol de la membrane plasmique
- L'augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique

Tous ces signaux stimulent la synthèse protéique ou la transcription de gènes par des cascades complexes. Ces signaux intracellulaires peuvent induire plusieurs conséquences : la prolifération, la différenciation, l'activation, l'apoptose ou l'anergie. La signalisation du TCR ou d'un BCR est similaire et s'applique aux deux types de lymphocytes.

La signalisation intracellulaire, causée par la dimérisation et l'oligomérisation du récepteur, est initialement induite par activation des protéines tyrosines kinases (PTK) cytoplasmiques non-associées aux récepteurs.

Contrairement aux récepteurs de croissance qui ont une activité enzymatique intrinsèque portée par la molécule de récepteur elle-même, les récepteurs des lymphocytes B et T ont un domaine cytoplasmique court, et de fait nécessitent l'aide de chaînes associées pour transmettre le signal. L'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79 α,β) dans les cellules B, ou le complexe

héxamérique du CD3 dans les cellules T, sont intimement associés à leur récepteurs respectifs et sont responsables de la transmission du signal à l'intérieur de la cellule suite à l'engagement de leurs ligands (Figure 6 : [18]).

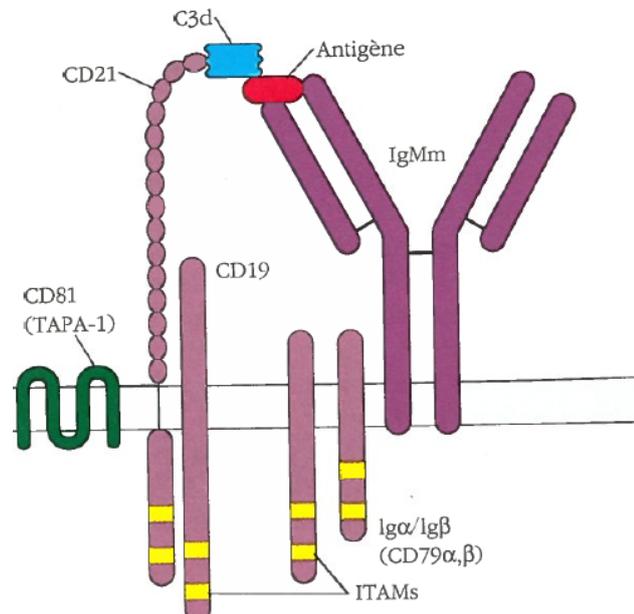


Figure 6 : Les récepteurs des lymphocytes B et T requièrent des molécules accessoires et des co-récepteurs pour la transduction du signal

Chacun de ces complexes possède deux longues chaînes intracytoplasmiques qui contiennent des copies répétées de motifs d'activation à tyrosine des récepteurs immuns : ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Ce sont des séquences répétitives contenues dans de nombreuses molécules de signalisation du système immunitaire, qui contiennent des tyrosines phosphorylées suite à la transduction du signal induite par les chaînes associées.

D'autres molécules associées aux récepteurs d'antigène des lymphocytes B et T peuvent interagir avec l'antigène ou avec d'autres molécules de la surface du pathogène. Par exemple, chez les lymphocytes B, le co-récepteur CD21, qui est associé au CD19, se fixe sur le composant C3d du complément qui est lié de façon covalente à l'antigène. L'interaction entre le CD21 sur la cellule B, et le C3d associé à l'antigène, maintient le contact entre l'antigène et le récepteur d'antigène, même si la liaison est relativement faible. La phosphorylation des résidus tyrosines des ITAM permet le recrutement des molécules adaptatrices en aval et

facilite la transduction du signal. Le CD19 et les chaînes Ig α /Ig β possèdent ces ITAM intracytoplasmiques et, avec CD81 (TAPA-1), ils participent aux signaux proximaux en aval.

La fixation du ligand sur le récepteur d'une cellule induit toute une gamme d'événements en aval, qui, pour la plupart, conduisent à l'activation de facteurs de transcription. La liaison du récepteur à son ligand induit l'agrégation du récepteur et d'autres molécules de signalisation dans des zones de la membrane, nommé radeaux lipidiques. Cette liaison peut s'accompagner de la liaison de co-récepteurs sur leurs propres ligands, ce qui induit l'activation de tyrosines kinases associées aux récepteurs, qui phosphorylent des protéines associées aux récepteurs. La fixation de protéines adaptatrices sur le groupement phosphate d'autres molécules adaptatrices en aval, crée une plateforme moléculaire au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme favorise l'activation de nombreuses enzymes comme la phospholipase C γ (PLC γ), la PI3 kinase, ainsi que d'autres tyrosines kinases.

Le phospholipide phosphatidyl inositol bis-phosphate (PIP2) est un composant de la face interne de la membrane plasmique des eucaryotes. Cependant PIP2 participe activement à la signalisation cellulaire. L'enzyme nommée phosphatidyl inositol-3-kinase PI3 kinase, qui est activée au cours de la signalisation induite via de nombreux récepteurs immuns, phosphoryle PIP2 pour produire du phosphatidyl inositol tris-phosphate PIP3. Cette dernière sert de domaine d'interaction pour les protéines qui contiennent un domaine d'homologie pleckstrin (PH). Ainsi cette phosphorylation permet le mouvement de protéines du cytosol vers la membrane en prodiguant un site de liaison sur la face interne de la membrane cellulaire. La localisation des protéines à la membrane les amène au contact d'autres membres de la cascade de signalisation, permettant aux enzymes d'accéder à de nouveaux substrats, ce qui rend possible la modification des protéines adaptatrices nécessaires à l'assemblage des complexes de signalisation.

En plus d'être phosphorylée par la PI3 kinase, PIP2 peut également subir un second type de modification biochimique suite au signal cellulaire. Une seconde enzyme, la phospholipase C (PLC) est également activée suite à la signalisation antigénique dans les lymphocytes. La PLC- γ joue un rôle crucial dans l'amplification du signal. Il existe plusieurs isoformes de l'enzyme : PLC γ 1 est utilisée par les lymphocytes T et la PLC γ 2 est utilisée par les lymphocytes B. Cette enzyme sous forme active scinde les molécules de la membrane

phospholipide PIP2 en deux parties, en dissociant le sucre inositol triphosphate IP3 de la structure de base diacylglycérol (DAG). L'IP3 est relargué dans le cytoplasme où il interagit avec des récepteurs spécifiques présents à la surface des vésicules du réticulum endoplasmique, provoquant la libération des stocks d'ions calcium (Ca^{2+}) dans le cytoplasme. L'augmentation du calcium intracellulaire active la calmoduline et la calcineurine qui vont déphosphoryler le facteur de transcription des lymphocytes T activés : NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) [22]. Ce dernier peut ainsi rentrer dans le noyau.

Le DAG quant à lui reste associé à la surface interne de la membrane plasmique. Le DAG active les membres de la famille des protéines kinases C (PKC). La PKC phosphoryle et active d'autres enzymes qui vont finalement détruire l'inhibiteur du facteur de transcription NFκB. Libéré de son inhibiteur, NF-κB entre dans le noyau et active toute une série de gènes importants pour le système immunitaire. (Figure 7 : [18]).

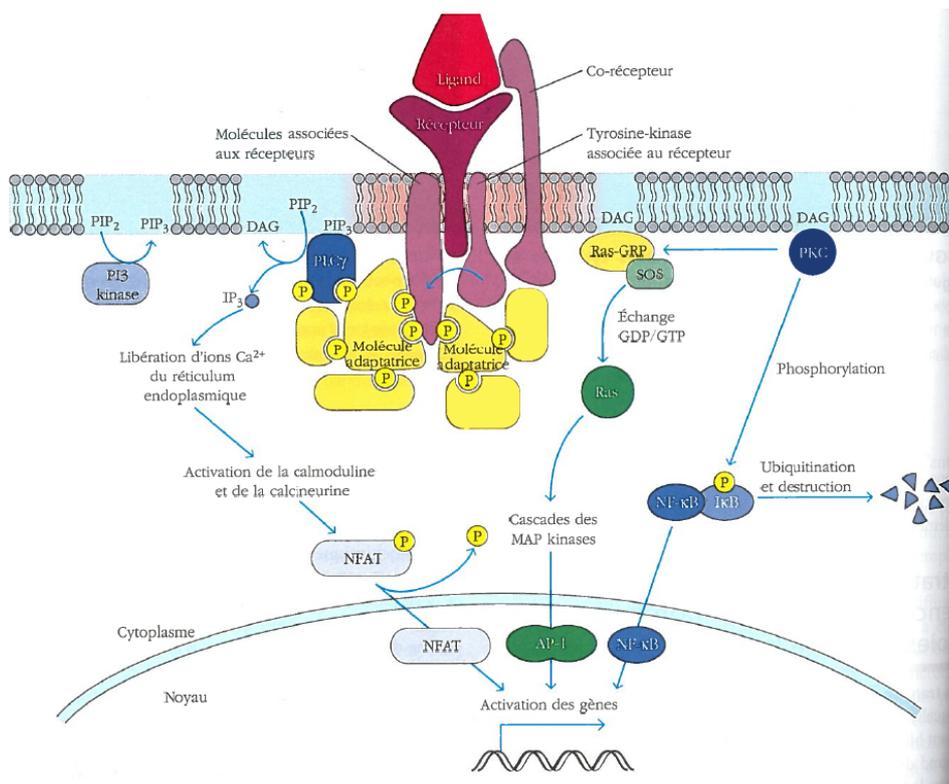


Figure 7 : Schéma représentant les principes de la signalisation lymphocytaire

1.2.3 Transduction du signal BCR

Les cellules B expriment de manière clonale une forme membranaire des anticorps appelée récepteur des cellules B (BCR : B Cell Receptor). Sous l'effet d'une stimulation antigénique, les plasmocytes dérivés des cellules B sécrètent en grande quantité des anticorps identiques au BCR du clone dont ils dérivent, mais dépourvus de leur région transmembranaire.

La structure du BCR est identique à l'anticorps que la cellule va sécréter après avoir été stimulée par l'antigène, à l'exception de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde. Cette extrémité est modifiée afin de permettre l'ancrage du récepteur au niveau de la membrane plasmique du lymphocyte B. Avant leur rencontre avec l'antigène, les cellules B matures qui résident dans les organes lymphoïdes secondaires expriment les formes membranaires IgM et IgD [18].

Comme nous l'avons vu précédemment, chaque molécule de BCR est associée de façon non covalente à un hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$, responsable de la transduction du signal vers l'intérieur de la cellule. Les chaînes $Ig\alpha/Ig\beta$ contiennent des ITAM, contenant des tyrosines qui deviennent phosphorylées suite à l'activation du récepteur, et servent de résidus d'ancrage pour les autres constituants de la signalisation en aval. De ce fait, le BCR est divisé de façon structurelle et fonctionnelle en deux composantes : une structure de reconnaissance (le récepteur d'immunoglobuline) et une structure de transduction de signal ($Ig\alpha/Ig\beta$).

La liaison de l'antigène induit une altération de conformation du BCR qui conduit à l'exposition du domaine C4 présent sur la chaîne lourde du récepteur. De fait, les récepteurs voisins vont interagir via ce domaine, ce qui conduit à leur oligomérisation (formation de petits clusters de complexe antigène-récepteur) et à leur migration vers des régions spécialisées présentes au niveau de la membrane des cellules B, les radeaux lipidiques. Là, les résidus ITAM de $Ig\alpha/Ig\beta$ sont amenés à proximité des kinases de la famille des Src, Lyn, Fyn et Blk. La phosphorylation des tyrosines des résidus ITAM de $Ig\alpha/Ig\beta$ par les kinases de la famille Src, et en particulier Lyn, fournit des sites d'interactions pour la molécule adaptatrice Blk, et pour une tyrosine kinase additionnelle, Syk, qui à son tour est activée et phosphorylée. La molécule adaptatrice BCAP et CD19, le corécepteur des cellules B, sont aussi phosphorylés par ces kinases, recrutant par ce biais l'enzyme PI3 kinase au niveau de la

membrane plasmique conduisant à la formation de PIP3 et la localisation subséquente de PKD1 et Akt au niveau de la membrane. Les signaux de phosphorylation dépendant d'Akt augmentent la survie cellulaire et conduisent à l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B (Figure 8 : [18]).

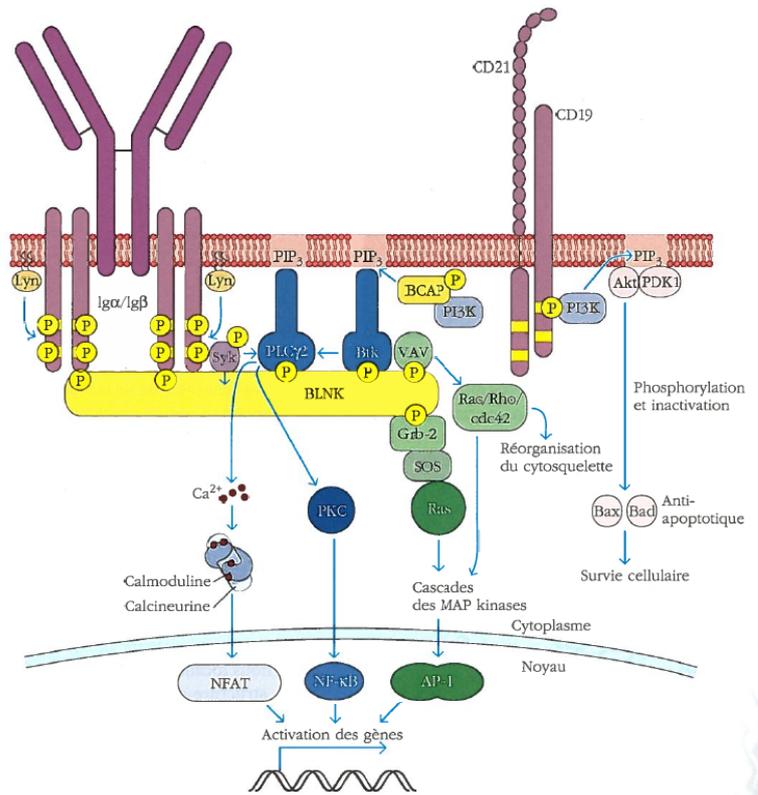


Figure 8 : Transduction du signal BCR

En conclusion, la fixation de l'antigène au BCR conduit à de multiples changements dans l'activité transcriptionnelle, ainsi que dans la localisation et la mobilité des cellules B, ce qui a pour conséquence la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, et éventuellement la sécrétion d'anticorps. Comme nous le décrivons dans le chapitre suivant, nous verrons que des anomalies dans les protéines impliquées dans la signalisation du BCR peuvent conduire à des déficits immunitaires comme par exemple l'agammaglobulinémie liée à l'X : XLA.

1.3 La tolérance immunitaire

Tout au long de leur développement, les lymphocytes doivent également passer par un processus d'adaptation leur permettant de différencier le soi du non soi afin d'éviter de confondre le corps lui-même et les pathogènes. La tolérance immunitaire est l'absence ou l'inhibition spécifique centrale ou périphérique, totale ou partielle de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène donné ou de certains de ses épitopes, consécutive à un contact (la présentation d'un antigène) préalable du système immunitaire avec celui-ci, contre lequel il aurait pu développer une réponse immunitaire [24]. Le terme de tolérance s'applique aux nombreux niveaux de protection imposée au système immunitaire pour prévenir les réactions de ses cellules et anticorps contre les composants de l'hôte. Des individus sains ne devraient pas réagir de façon agressive contre leurs propres antigènes, alors qu'ils réagiront contre des agents pathogènes ou même des cellules d'un autre individu. L'état de tolérance est aussi spécifique d'un antigène que l'est la réponse immunitaire. Sa fonction principale est de préserver l'individu de l'auto-réactivité immunologique vis-à-vis des antigènes du soi.

Dans les années soixante, les chercheurs ont cru que tous les lymphocytes réactifs étaient éliminés au cours de leur développement dans la moelle osseuse et le thymus et qu'un défaut de leur élimination conduisait donc à une auto-immunité. Des preuves expérimentales plus récentes ont contredit cette théorie. Ainsi, il a été démontré que des individus sains possèdent des lymphocytes autoréactifs matures circulants. Puisque la présence de ces lymphocytes en périphérie ne conduit pas à des réactions auto-immunes, leur activité doit être régulée chez les individus normaux par d'autres mécanismes.

Au cours de l'ontogenèse des lymphocytes B et T, se met en place un répertoire dotant le système immunitaire d'un arsenal de récepteurs capables de reconnaître tous les antigènes, et donc de déclencher des réponses immunes appropriées pour les neutraliser. Cela suppose de développer conjointement des mécanismes de régulation des réponses vis-à-vis des antigènes du soi, c'est-à-dire considérés comme inappropriés. Dans des circonstances normales, la rencontre de lymphocytes matures avec un antigène conduit à la stimulation du système immunitaire. Cependant, la présentation de l'antigène sous une forme différente, à un autre moment ou à un autre emplacement peut conduire à la tolérance. Les antigènes conduisant à la tolérance sont appelés tolérogènes plutôt qu'immunogènes. Un même composé chimique peut en effet être à la fois immunogène et tolérogène, en fonction de comment et où il est

présenté au système immunitaire. Par exemple, un antigène présenté aux cellules T sans costimulation appropriée conduira à une forme de tolérance appelée anergie (absence de réponse à tous stimuli antigéniques), alors que le même antigène présenté en association avec des molécules de costimulation peut devenir un puissant immunogène.

Les récepteurs pour l'Ag sont générés par hasard par le processus de recombinaison des différents segments géniques V, D et J codant pour les domaines variables de ces molécules. Entre 20 et 50% des TCR et BCR ont une affinité potentiellement dangereuse pour les Ag du soi. De plus les clones B autoréactifs peuvent aussi être générés par hypermutation somatique lors de leur différenciation dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes périphériques. L'élimination des clones autoréactifs implique donc des mécanismes de tolérance souvent communs aux lymphocytes T et B. Ces mécanismes se scindent en deux selon leur localisation anatomique l'une centrale survenant dans le thymus et la moelle osseuse, l'autre périphérique prenant place dans les organes lymphoïdes secondaires. La tolérance peut être acquise selon quatre mécanismes (Figure 9 : [20]) :

- La délétion clonale par apoptose : qui correspond à l'élimination des cellules autoréactives, qui intervient dans les organes lymphoïdes centraux précocement au cours de leur différenciation.
- Les activités régulatrices qui se traduisent
 - par la ré-édition de leur récepteur qui permet la génération de nouveaux récepteurs ayant perdu leur auto-réactivité.
 - par l'immunorégulation des cellules autoréactives par des cellules à activité suppressive ou par d'autres facteurs tels que des facteurs de croissance ou des médiateurs pro-inflammatoires.
- L'anergie clonale correspondant à la neutralisation fonctionnelle, qui se traduit par l'inaptitude des cellules à répondre à une stimulation par l'Ag.
- L'ignorance ou indifférence lymphocytaire qui se traduit par une régulation extrinsèque des cellules T.

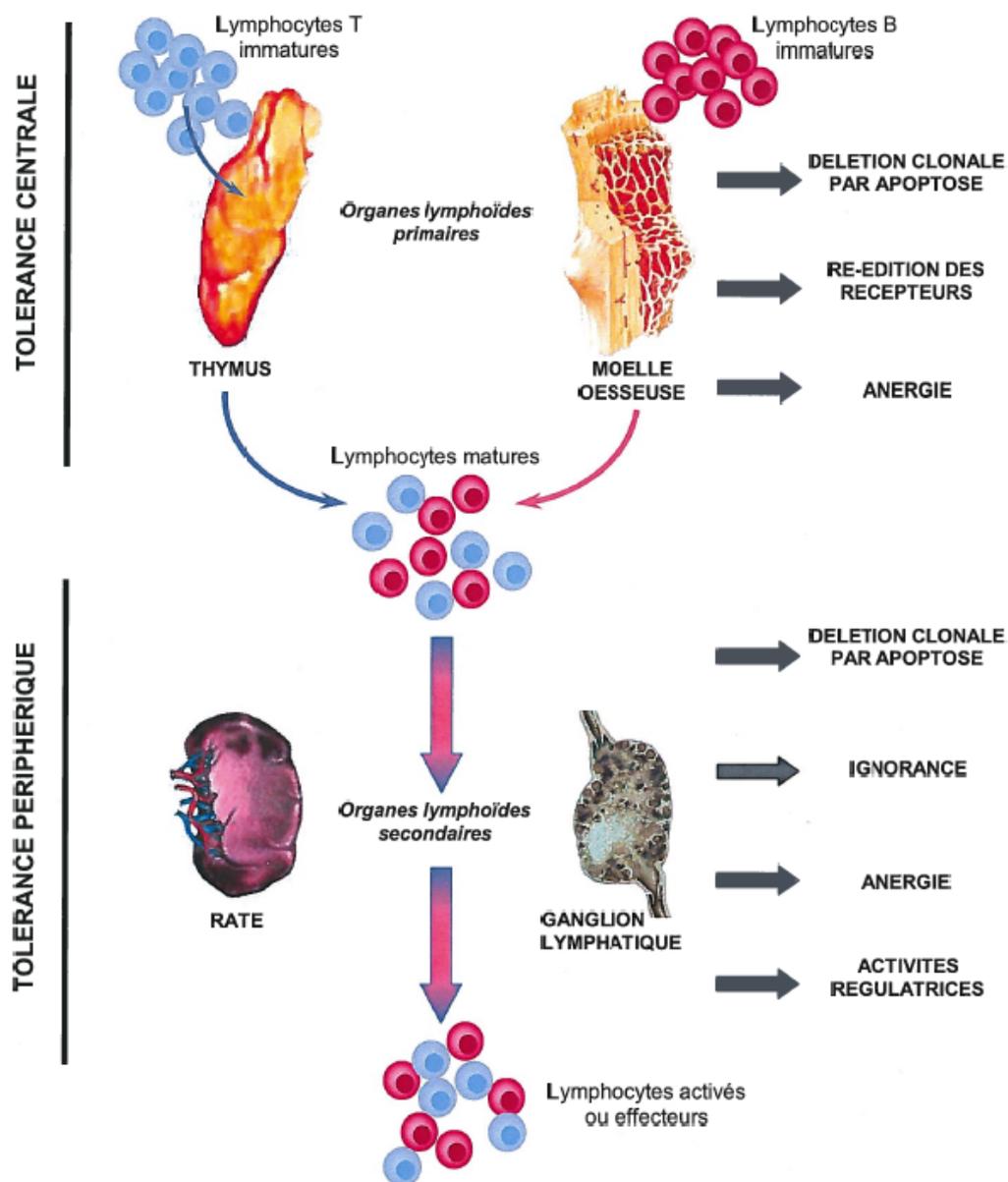


Figure 9 : Mécanisme de tolérance des lymphocytes T et B

1.3.1 La tolérance des lymphocytes T

a) La tolérance centrale

Comme nous l'avons expliqué plus haut, le répertoire des lymphocytes T exprimé en périphérie résulte des mécanismes de sélection positive et négative qui ont eu lieu dans le thymus. Les cellules non sélectionnées meurent rapidement par apoptose. La mort cellulaire

joue un rôle important dans le maintien de la tolérance via les molécules pro-apoptotiques *BCL-2-interacting mediator of cell death* (BIM) et Fas. Ceci est mis en évidence chez la souris par le développement de maladies auto-immunes systémiques lors de mutation dans des récepteurs de mort cellulaire, Fas ou *Fas Ligand* (FasL). Les cellules T, ainsi que les cellules B, qui engagent leurs molécules Fas avec FasL induisent leur mort rapide par apoptose, connue sous le nom de mort cellulaire induite après activation (AICD Activation Induced Cell Death). Les souris portant des mutations inactivant Fas (*lpr/lpr*) ou FasL (*gld/gld*) ne sont pas capables d'engager la voie de l'AICD et développent précocement une maladie auto-immune au cours de leur vie [25].

La déletion clonale des lymphocytes T autoréactifs est une étape très importante dans les processus de tolérance et se traduit par l'élimination de 90% des thymocytes en différenciation. Ces derniers ont également la possibilité de ré-éditer leur TCR ayant une forte affinité pour un Ag du soi. Ainsi, l'expression du TCR est diminuée et grâce aux recombinaisons RAG (*recombination-activating gene*) qui permettent le réarrangement des locus codant pour les chaînes α et β . Ce second mécanisme permet in fine, la perte de la spécificité anti-soi [26].

Le thymus intervient donc dans les processus de tolérance par la délétion et l'anergie des cellules T autoréactives, ainsi que par les processus de sélection positive des lymphocytes T régulateurs (Tregs). Cette notion a été associée à l'expression de la molécule CD25, dans la mesure où les cellules CD4⁺ CD25⁺ se sont révélées être les seules capables de moduler les réactions auto-immunes, mais également réguler l'immunité contre le non soi. Les Tregs peuvent se scinder en grandes sous populations : les Tregs naturels (nTregs) et les Treg induits (iTregs). Les nTregs se développent dans le thymus au cours du processus normal de l'ontogenèse des lymphocytes T, ils possèdent un répertoire polyclonal de récepteur à l'antigène TCR et sont capables de reconnaître les antigènes du soi. Les iTregs se développent en réponse à une stimulation antigénique à partir des lymphocytes T matures. Ils possèdent un répertoire diversifié de TCR leur permettant de contrôler les réponses auto-immunes inflammatoires pathologiques déclenchés en réponse à des microbes ou des tissus implantés.

Un autre mécanisme de tolérance prenant place dans le thymus est l'anergie selon laquelle l'interaction TCR avec le complexe peptide/CMH conduit à l'inactivation intrinsèque du lymphocyte T [27].

b) La tolérance périphérique

Comme nous l'avons dit précédemment il existe quatre mécanismes de tolérance périphérique susceptibles d'être exercés sur les lymphocytes T et B. L'anergie consiste en une altération fonctionnelle des cellules T auto réactives qui se traduit par une incapacité à être activées et à proliférer en réponse à une stimulation antigénique. Ce mécanisme de régulation intrinsèque des lymphocytes T peut résulter de modifications biochimiques diverses. Celles-ci consistent en la diminution de l'expression des TCR et l'augmentation du seuil d'activation de la cellule par recrutement, de molécules impliquées dans le contrôle négatif de la voie de signalisation du TCR comme CD5 ou CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*). Ces molécules ont donc un rôle crucial dans le maintien de l'anergie périphérique de lymphocytes T autoréactifs.

La tolérance périphérique fait également intervenir un autre processus qui est celui de l'indifférence lymphocytaire. Il s'agit d'une régulation extrinsèque du lymphocyte T par limitation des *stimuli* immunogéniques. Parmi ceux susceptibles d'induire cette levée d'indifférence, l'interaction de la molécule CD28 exprimée par les cellules T avec les protéines B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) à la surface des CPA. De façon générale les CPA, en particulier les cellules dendritiques et leur activation par l'intermédiaire des récepteur Toll-like (TLR), participent étroitement à l'activation des cellules T autoréactives et donc au contrôle de la tolérance T périphérique [28].

Le dernier mécanisme de tolérance, est l'immunorégulation. Ce processus correspond à la suppression de clones T autoréactifs par d'autres populations lymphocytaires T. L'autoréactivité physiologique et, de façon plus générale, l'ensemble des réponses immunitaires est placé sous le contrôle de plusieurs populations de cellules T régulatrices, appelées cellules T suppressives. Cette immunorégulation joue un rôle crucial dans la tolérance périphérique. Cependant son rôle est très complexe et encore mal défini. Elle fait intervenir à la fois des cellules régulatrices naturelles (cellules T CD4+ CD25^{high}, et aussi des cellules NKT et γ/δ) dont la présence n'est pas secondaire à des stimulations exogènes ou

endogènes et des cellules régulatrices adaptatives (comme les cellules Th2, CD4+CD62L+ et Tr1) dont la différenciation est secondaire à la stimulation par un autoAg.

Les expériences *in vitro* ont montré que les cellules T CD4+ CD25^{high} sont capables d'inhiber la prolifération et les fonctions effectrices de lymphocytes T CD4+ CD25⁻. Bien que ces cellules régulatrices aient une spécificité pour l'autoAg, il n'est pas établi que leur action suppressive soit spécifique de l'autoAg reconnu. En revanche, leur action suppressive semble nécessiter un contact direct avec les cellules cibles et ne semble pas dépendante de la sécrétion de cytokines. Cependant, le rôle de l'IL-10 et surtout du TGFβ (*transforming growth factor-β*) a été évoqué, de même que l'intervention de molécule membranaire notamment celle de la molécule CTLA4 et du GITR (*glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor like receptor*). De plus, le facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box P3*) constituerait un marqueur spécifique des lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25^{high}. Des mutations du gène Foxp3, situé sur le chromosome X, sont responsables chez l'homme de troubles dysimmunitaires complexes, tel que l'IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*). Ce syndrome touche principalement les enfants de sexe masculin qui présentent une sensibilité aux maladies auto immunes et allergiques. Une étude menée sur des souris a permis de mettre en évidence le rôle important du Foxp3 dans l'orientation et le développement thymique des cellules T régulatrices [29].

1.3.2 La tolérance des lymphocytes B

a) La tolérance centrale

La sélection négative des lymphocytes B se déroule dans la moelle osseuse, au stade immature. Lorsque la signalisation intracellulaire et l'affinité du BCR pour l'Ag excèdent un certain seuil, les cellules B internalisent leurs BCR et stoppent leur programme de maturation. Il en résulte alors trois possibilités :

- Les récepteurs « homing », comme le CD62, nécessaire à l'entrée des cellules B dans les ganglions lymphatiques, ne sont pas exprimés
- Les récepteurs pour le B-cell activating factor (BAFF), une cytokine requise pour la survie des lymphocytes B, ne sont pas induits
- Les recombinaisons RAG-1 et RAG-2 sont exprimées

Les cellules B immatures exprimant un BCR anti-soi de forte affinité ont la possibilité de ré-éditer leur récepteur (comme pour les lymphocytes T). Si le récepteur des cellules auto-réactives n'est pas réédité, les cellules meurent après 1 à 2 jours. Cette délétion clonale implique l'induction du facteur BIM ainsi que la répression des récepteurs de la molécule BAFF.

L'anergie des clones lymphocytaires B dirigée contre l'antigène du soi peut également être induite au niveau de la moelle osseuse. Les lymphocytes B présentent alors une diminution soit des signaux d'activation de la voie de signalisation positive, soit de l'expression du BCR.

b) La tolérance périphérique

La tolérance périphérique des lymphocytes B peut se manifester par différents processus. La prolifération et la différenciation des cellules B en plasmocytes nécessitent que celles-ci reçoivent différents signaux, l'un de l'Ag se liant au BCR et l'autre des cellules T auxiliaires, qui ont également reconnu l'Ag. Le lymphocyte T peut délivrer son message par le ligand CD40 exprimé à leur surface et la sécrétion de cytokines d'IL-2, IL-4, IL-5 et IL-21. L'absence de ce second signal arrête la différenciation et conduit à la mort cellulaire [30].

Un second processus de tolérance fait intervenir les cellules B régulatrices : les Breg. [31]. Les effets des B regs sur la modulation des réponses immunitaires ont été progressivement caractérisés. Tout d'abord, ils se sont révélés capable de contrôler la différenciation des Th1/Th2 des lymphocytes T. La différenciation Th1 est le résultat d'une augmentation de production d'IL-12, elle-même dépendante de la présence d'IL-10. L'effet des Breg est donc le résultat d'une production importante d'IL-10.

La propriété régulatrice de ces Breg ne semble pas innée. Un signal activateur est nécessaire pour induire cette fonction dans les lymphocytes B. Le signal CD40 apparaît prépondérant puisque son blocage, dans des modèles d'arthrite induite par le collagène, d'arthrite spontanée et dans celui du lupus, empêche l'effet régulateur d'opérer. Il est intéressant de noter qu'une déficience de la voie de signalisation CD40 chez les patients atteints de lupus rend les Breg inopérants, ce qui suggère que le CD40 serait aussi impliqué dans leur mécanisme d'action [32]. Ce défaut de signalisation est dû à une altération de l'expression du facteur de transcription STAT3 qui est impliqué dans la production d'IL-10.

En réponse à la stimulation CD40, le taux de phosphorylation de STAT3 est plus faible que chez les témoins. Les Breg de ces patients produisent moins d'IL-10 et ont une fonction suppressive altérée qui pourrait avoir un impact sur la réponse immunitaire effectrice au cours du lupus.

Le BCR est également une voie de signalisation majeure dans le développement des Bregs. Une modification du seuil d'activation du BCR entraîne une variation de la fonction régulatrice. Ainsi, une déficience d'expression de CD19, co-récepteur positif du BCR, dans un modèle murin d'hypersensibilité, provoque une aggravation de la maladie associée à une diminution de la production d'IL-10 et l'augmentation de la sécrétion d'IFN γ [33].

Une troisième voie de stimulation des lymphocytes B participe au développement des Bregs. Les TLR (*Toll-like Receptor*) sont en première ligne dans la réponse immunitaire innée. Leur activation par des ligands bactériens ou viraux induit une réponse immunitaire non spécifique polyclonale. Leur activation participe à la mise en jeu des Breg. La démonstration en a été apportée par un modèle murin de lupus. Une stimulation des lymphocytes B de la zone marginale par du CpG-ODN ligand du TLR9, provoque la sécrétion d'IL-10, capable de réguler la réponse immune [34]. En effet, la stimulation du TLR-9 déclenche la production d'IL-10 par les lymphocytes B qui vient inhiber la sécrétion d'IL-12, permettant le contrôle de la réponse immune Th1. Les lymphocytes B exprimant CD5 peuvent eux aussi exercer une activité régulatrice en réponse à une stimulation de leurs TLR.

Plusieurs éléments de la littérature suggèrent qu'un dialogue entre les Treg et les Bregs est essentiel pour qu'une réponse immunitaire soit efficacement contrôlée. Comme décrit précédemment les Breg peuvent agir en produisant l'IL-10 et du TGF β , or ces cytokines sont connues pour favoriser l'expansion des iTreg Tr1 et Th3. Des lymphocytes B, activés par leur antigène, favorisent donc la mise en jeu des Tregs. Non seulement ils activent la fonction cytotoxique des iTregs mais ils produisent des chemokines, dont CCL4, qui attirent les nTregs (capable de reconnaître les antigènes du soi). Ces dernières peuvent influencer directement la réponse humorale en provoquant l'apoptose des lymphocytes B autoréactifs grâce à l'interaction de leur molécule PD1 ligand (Programmed death 1) avec la PD1 des lymphocytes B [35]. Ils peuvent également agir de manière indirecte en supprimant l'action des T folliculaires helpers indispensable à la différenciation terminale

des lymphocytes B. Le contrôle de la production d'auto-anticorps par les nTregs peut également se faire par l'induction d'un état d'anergie des lymphocytes B autoréactifs [36]. Des observations indirectes renforcent l'importance des interactions Bregs/Tregs dans le contrôle des réponses immunes. Ainsi, chez des patients lupiques traités par Rituximab, la déplétion des lymphocytes B entraîne l'expansion de la population de Tregs CD4+ CD25+ Foxp3+ [37] le taux de transcrit Foxp3 semble rester stable chez les patients en rémission, alors qu'il chute chez les patients qui se retrouvent avec une maladie active [38]. Ces observations cliniques confirment le lien essentiel qu'il existe entre les différentes populations régulatrices et consolide l'hypothèse selon laquelle le contrôle des réponses auto-immunes par les Tregs est lui-même sous la dépendance des Bregs.

1.4 Un système immunitaire pathologique : les maladies auto-immunes

Au début du vingtième siècle, Paul Ehrlich a réalisé que le système immunitaire pouvait présenter des dysfonctionnements [18]. Au lieu de réagir uniquement contre les antigènes étrangers, il pouvait s'attaquer au Soi. Cet état, qu'il a appelé « horror autotoxicus » correspond à un syndrome clinique appelé de manière générique auto-immunité. Cette réponse inappropriée du système immunitaire, dirigeant son activité humorale et/ou son activité cellulaire, par l'intermédiaire des cellules T, contre des composants du Soi est la cause des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR ou Rheumatoid Arthritis RA), la sclérose en plaque (SEP), le lupus érythémateux systémique (LES ou lupus), et certains types de diabète.

D'une manière générale, une maladie auto-immune (MAI) est provoquée par une défaillance au niveau des mécanismes d'induction de tolérance centrale et/ou périphérique conduisant à l'émergence des lymphocytes autoréactifs. Ces maladies résultent de la destruction de protéines, de cellules et d'organes du soi par des auto-anticorps ou des cellules T autoréactives. Un exemple bien connu est la polyarthrite rhumatoïde (PR), dans laquelle les cellules T autoréactives attaquent les tissus dans les articulations, ce qui provoque une réponse inflammatoire se traduisant par un gonflement et une destruction tissulaire et osseuse. Cependant, la plupart des MAI sont multifactorielles et résultent non pas d'un seul facteur génétique mais de l'action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux.

1.4.1 Critères de classification des pathologies auto-immunes

Ces maladies sont souvent classées en deux catégories :

- soit spécifique d'organes, comme le diabète de type I, la myasthénie, les thyroïdites et les pemphigus
- soit systémiques, caractérisées par une réponse auto-immune dirigée contre des Ag exprimés spécifiquement par l'organe cible comme LES, PR ou SEP. Ces pathologies sont caractérisées par des manifestations plus étendues. La rupture de tolérance concerne des autoAg ubiquitaires, qui sont exprimés par un grand nombre de tissus.

Une autre méthode de classement consiste à utiliser la composante immunitaire responsable des principaux dommages. Les mécanismes effecteurs de l'auto-immunité peuvent faire intervenir l'immunité cellulaire ou humorale. Les autoAc, les cellules T cytotoxiques et d'autres effecteurs cellulaires ou moléculaires recrutés par les cellules auto-immunes constituent des mécanismes lésionnels au cours des MAI.

1.4.2 Les mécanismes lésionnels des effecteurs auto-immuns : les autoanticorps

Le caractère pathogène des autoAc est leur capacité à transférer la maladie par le sérum des malades atteints d'une MAI. Les mécanismes par lesquels les autoAc induisent des lésions cellulaires ou tissulaires sont divers et l'on peut en distinguer quatre : (Figure 10 : [20])

- La cytolysse directe soit complément dépendante (comme dans le LES) ou cellulaire dépendante des Ac (ADCC) (myocardite)
- La stimulation fonctionnelle soit d'un récepteur (myasthénie) soit d'une activité enzymatique (pemphigus, LES)
- Le blocage fonctionnel d'une molécule circulante ou d'une molécule membranaire
- Un mécanisme inflammatoire par la formation de complexes immuns (LES)

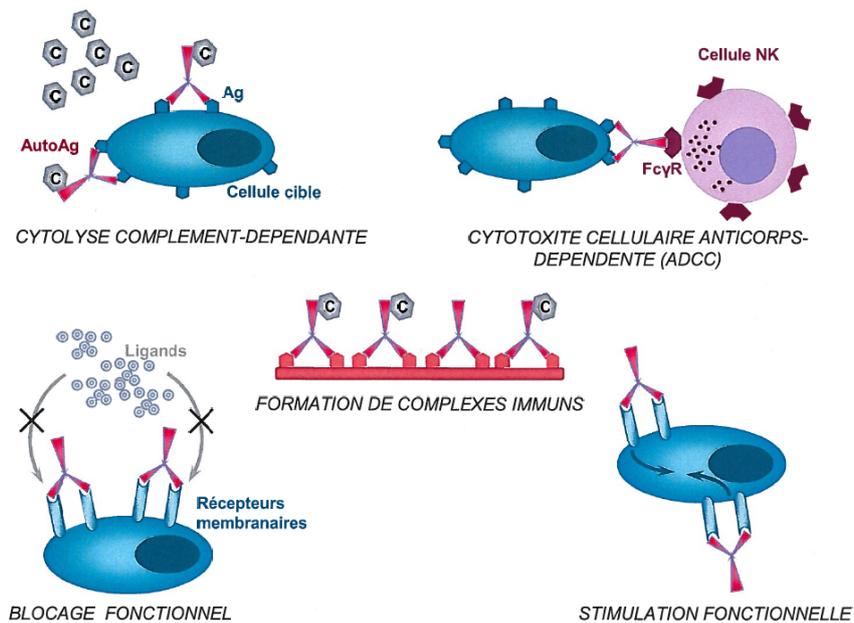


Figure 10 : Exemple des mécanismes lésionnels auto anticorps dépendants

Dans le cas des complexes immuns (CI) ceux-ci peuvent se former soit dans la circulation puis se déposer au niveau des tissus, soit in situ, l'Ag se déposant en premier avant d'être reconnu par les autoAc circulants. Ces mécanismes de formation de dépôts des CI conduisent à l'activation du complément, à la libération d'anaphylatoxines, au recrutement et à l'activation des polynucléaires neutrophiles qui participent aux lésions inflammatoires. Les autoAc sont également capables de pénétrer l'intérieur d'une cellule vivante, d'atteindre leur Ag par exemple nucléaire et, ainsi de modifier les fonctions cellulaires.

1.4.3 Le rôle des autoantigènes

Le rôle de l'autoAg dans l'initiation de la réponse auto-immune est issu de modèles animaux au cours desquels l'ablation de l'organe cible prévient la mise en jeu de la réponse auto-immune. Chez l'homme, certaines observations suggèrent que la suppression de l'autoAg s'accompagne de la diminution d'une réponse auto-immune établie. Au vu du rôle de l'autoAg dans la survenue du processus auto-immuns, il semblerait que des variations de sa localisation, son niveau et ses modalités d'expression soient indispensables dans sa capacité à activer les lymphocytes T et B autoréactifs.

Il semblerait que certains Ag reconnus au cours du LES subissent des modifications de concentration, de distribution et de structure au cours de l'apoptose. La vésicule et son contenu constituent la source des immunogènes majeurs au cours du LES à l'origine de la réponse autoAc. De plus, il semblerait que certaines autoAg soient des substrats d'enzymes protéolytiques mis en jeu dans les processus d'apoptose. A cet égard il a été montré au cours du LES, que les autoAc ciblent fréquemment des protéines phosphorylées durant l'apoptose par des sérine/thréonine-kinases et qui correspondent soit à des Ag déjà identifiés soit à des nouvelles protéines [39]. Ces protéines pourraient constituer des néo-épitopes vis-à-vis desquels les cellules T ne sont pas tolérées et donc contribueraient à l'activation des lymphocytes B spécifiques de ces Ag. De plus les cellules apoptotiques peuvent exercer selon la CPA, un effet positif ou négatif sur le système immunitaire.

1.4.4 Des traitements immunosuppresseurs aux nouvelles thérapies

Idéalement, le traitement des maladies auto-immunes devrait diminuer uniquement la réponse auto-immune. Leur objectif est alors de contrôler et réduire la réponse immunitaire et l'inflammation. Les thérapies actuelles sont classées en différentes catégories : les traitements immunosuppresseurs à large spectre, les thérapies ciblant le processus inflammatoires, l'immunothérapie spécifique d'antigène et les mécanismes plus récents ou stratégiques d'un type cellulaire.

a) Des thérapies à large spectre

La plupart des thérapies de première génération ne sont pas curatives mais plutôt palliatives, réduisant les symptômes pour offrir aux patients une qualité de vie acceptable. Par exemple, la plupart des traitements immunosuppresseurs généraux (corticoïdes, azathioprine, le méthotrexate, la ciclosporine et cyclophosphamide) sont de puissants anti-inflammatoires qui suppriment les lymphocytes en inhibant leur prolifération ou en tuant ces cellules se divisant rapidement. Les effets secondaires de ces médicaments incluent une cytotoxicité générale, un risque accru d'infections incontrôlées, et un développement possible de cancer. Dans certaines MAI, l'élimination d'un organe particulier ou d'un ensemble de composés toxiques peut alléger les symptômes. Par exemple, les patients souffrant de myasthénie grave ont souvent des anomalies au niveau du thymus (hyperplasie thymique ou thymomes), auquel cas la thymectomie peut augmenter les chances de rémission. La plasmaphérèse peut aussi offrir un bénéfice significatif, bien que temporaire, pour les maladies impliquant des

complexes antigènes-anticorps (myasthénie grave, LES, PR). Cette technique consiste à filtrer le sang, de sorte à retenir une fraction riche en immunoglobulines et à réinjecter les globules blancs et rouges. Cependant, cette stratégie n'a qu'un effet partiel et transitoire. L'utilisation d'immunoglobulines intraveineuses peut également être utile dans certaines situations. Un mélange d'immunoglobulines constitué à partir du sang d'environ 1 000 donneurs sains permet d'obtenir un produit aux propriétés immunorégulatrices efficaces, susceptible de neutraliser les anticorps pathogènes ou de réguler la production d'auto-anticorps. Cependant, cette approche n'est pas toujours efficace.

De nombreuses thérapies actuelles utilisent des biomédicaments pour traiter certaines maladies auto-immunes. On parle de biomédicaments car leur principe de fabrication repose sur la biologie et non sur la chimie. Il s'agit de molécules (anticorps monoclonaux ou analogues de récepteurs solubles) qui ciblent des substances impliquées dans le processus pathologique. Ces médicaments ont parfois une efficacité spectaculaire. L'ensemble de ces traitements limitent l'activation du système immunitaire mais augmentent le risque d'infection et nécessitent en conséquence un suivi régulier.

b) Des thérapies bloquant le processus inflammatoire

Puisque l'inflammation chronique est une caractéristique des maladies auto-immunes invalidantes, les étapes du processus inflammatoire sont des cibles potentielles. Les médicaments bloquant le TNF- α , l'un des médiateurs précoces du processus inflammatoire, sont largement utilisés pour traiter la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou la maladie de Crohn. Un antagoniste du récepteur de l'IL-1 est également autorisé dans la PR, de même que des anticorps dirigés contre le récepteur d'IL-6 ou de l'IL-15. D'autres traitements expérimentaux basés sur des cytokines incluent le ciblage du récepteur de l'IL-2 (CD25 et CD122), de l'IL-1 et les interférons (IFN) [40]. Les composés bloquant les signaux des chimiokines ou des molécules d'adhésion contrôlant les mouvements de lymphocytes dans les sites inflammatoires peuvent aussi contrecarrer le processus auto-immun. L'inhibiteur le plus connu est le FTY720. Il s'agit d'un analogue de la sphingosine-1-phosphate (S1P), impliquée dans la migration des lymphocytes dans le sang et la lymphe [41]. En agissant en antagoniste du récepteur, il bloque la sortie de toutes les populations de lymphocytes T, ce qui aboutit à une diminution allant jusqu'à 85% des lymphocytes circulants dans le sang. Le FTY720 est efficace dans le traitement de la SEP, mais aussi capable d'inhiber les cellules T_H1 et T_H17 et d'augmenter l'activité des T_{REG}

c) Des thérapies interférant avec la costimulation

Les lymphocytes T ont besoin de recevoir la stimulation antigénique via le TCR (signal 1) et la costimulation (signal 2) pour être entièrement activés. Sans cela, les cellules T entrent en apoptose, deviennent anergiques, ou sont induites à devenir des cellules inhibitrices. Un moyen de contrôler l'activation T est donc de réguler cette costimulation. Une protéine de fusion a donc été développée, consistant en la combinaison entre le domaine extracellulaire de CTLA-4 et la région constante des Ig1 humaines. CTLA-4 se lie à son partenaire CD80/86 avec une affinité 20 fois plus importante que le CD28. Cette protéine de fusion appelée abatacept (Orencia ®), et autorisée pour le traitement de la PR, a aussi été utilisée mais avec un succès limité dans la SEP, le LES. Ce médicament bloque les molécules CD80/86 sur les CPA et les empêche donc de contacter le CD28 sur les lymphocytes T.

d) L'immunothérapie spécifique d'antigène

La meilleure thérapie pour traiter une maladie auto-immune serait une stratégie visant à cibler spécifiquement les cellules autoréactives, épargnant tous les autres leucocytes. Malgré tout, même dans le cas où l'auto-antigène est connu, comme dans le diabète ou la SEP, il existe un fort risque d'aggraver la pathologie en introduisant un tolérogène. Néanmoins la glatiramer acétate (GA), un polymère de quatre acides aminés basiques trouvés communément dans la protéine basique de la myéline (MBP) et autorisé pour le traitement de la SEP, augmente sélectivement le nombre de T_{REG} et module la fonction des CPA, suggérant que cette stratégie puisse être efficace pour le traitement d'autres désordres auto-immuns [42]. Ce médicament est le seul traitement spécifique d'antigène approuvé par les autorités américaines pour une MAI, même si d'autres sont en cours de développement. Les chercheurs tentent également d'identifier de nouveaux biomarqueurs, le plus souvent des auto-anticorps spécifiques d'une maladie, pour améliorer le diagnostic de ces pathologies et mieux évaluer l'efficacité des traitements.

e) Des thérapies cellulaires spécifiques

Des équipes travaillent également sur une autre stratégie thérapeutique : la thérapie ciblant des types cellulaires spécifiques. La plupart des composés spécifiques de cellules utilisés ciblent les lymphocytes T ou leurs produits vu que les cellules sont soit directement pathogènes ou fournissent une aide aux lymphocytes B auto réactifs. Le premier anticorps

anti-lymphocyte T utilisé ciblait la molécule CD3 et était conçu pour dépléter les lymphocytes T sans les activer. Bien que partiellement efficace, cette méthode induisait quand même une immunosuppression à large spectre. Des anticorps anti-CD4 ont été en mesure de guérir des animaux atteints de SEP mais n'ont pas montré d'efficacité lors des tests cliniques [18]. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les anticorps anti-CD4 peuvent interférer avec l'activité des lymphocytes T régulateurs, qui jouent un rôle clé dans la tolérance.

Lorsque des anticorps et/ou des complexes immuns sont fortement impliqués dans une pathologie auto-immune, les stratégies ciblées sur les lymphocytes B peuvent améliorer les symptômes cliniques. En effet, les cellules B jouent un rôle clé dans la pathogenèse de la PR et d'autres MAI. Un certain nombre d'agents biologiques qui ciblent les cellules B ont été testés. Ces agents épuisent les cellules B en ciblant les antigènes de surface tels que le CD20, ou la fonction de bloc cellulaire, par exemple en inhibant l'activité des facteurs de survie des cellules B tels que BLys. Le traitement spécifique des lymphocytes B le plus connu est le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique contre l'antigène spécifique des lymphocytes B CD20. Ce dernier déplète les lymphocytes B et offre un bénéfice à court terme pour la PR.

Les rôles pathogènes multiples des cellules B auto-immunes sont également renforcés par leur capacité à s'auto-perpétuer. Les anticorps reconnaissant un antigène étranger devraient fournir des signaux de survie à la cellule B, tandis que les anticorps reconnaissant le soi devraient fournir des signaux de mort. Par conséquent, une cellule B portant un anticorps inutile ou dangereux devrait normalement mourir. Cependant, dans l'auto-immunité, l'anticorps-soit en tant que récepteur de cellule B (BCR) et/ou sous forme soluble-interagit avec l'antigène de manière à subvertir des signaux de survie normaux dépendant d'anticorps. Récemment, on montre une attention croissante pour les transducteurs de signaux fonctionnant en aval du BCR, qui régulent de multiples processus incluant le développement et la survie des lymphocytes B. La Tyrosine kinase de Bruton (BTK) est positionnée dans une position apicale à l'intérieur de la cascade de signalisation BCR, présentant ainsi une cible attractive pour l'inhibition sélective des lymphocytes B [43].

2. La Tyrosine kinase de Bruton : (BTK)

Des analyses biochimiques et des expériences de ciblage de gènes *in vivo* ont permis d'identifier les tyrosines kinases comme régulateurs clés de la différenciation, la prolifération, la survie et la migration dans le développement et la fonction des lymphocytes B. L'une d'entre elles, la tyrosine de Bruton Kinase (BTK) a été identifiée comme le gène défectueux dans l'immunodéficience primaire agammaglobulinémie liée à l'X (XLA) chez l'homme et l'immunodéficience liée à l'X (*Xid*) chez la souris [44].

Décrite par Ogden Bruton en 1952, l'agammaglobulinémie congénitale (XLA) est le premier déficit immunitaire identifié [45]. La maladie se caractérise par une défaillance des précurseurs de lymphocytes B et du réarrangement des chaînes lourdes d'immunoglobulines (Ig) conduisant à l'absence de production d'Ig. Le défaut de base de XLA est une incapacité du patient à produire des anticorps. Chez ces patients, le défaut de maturation des lymphocytes B se situe au stade pré-B1 de la lymphogénèse B [46], ces patients ont donc une population pro-B normale mais un défaut des autres populations.

Les patients atteints de XLA ont des mutations dans un gène qui est nécessaire au développement normal des lymphocytes B. Ce gène, découvert en 1993, est celui de la Tyrosine Kinase de Bruton (BTK) et est situé sur le chromosome X. Puisque XLA est un trouble lié à l'X, seuls les garçons sont touchés. Les patients atteints d'XLA sont enclins à développer des infections car ils manquent d'anticorps. Les infections se produisent fréquemment près des surfaces des muqueuses, telles que l'oreille moyenne (otite), les sinus (sinusite) et les poumons (pneumonie ou bronchite), mais dans certains cas, les infections peuvent également envahir le flux sanguin et se propager aux organes internes. Les infections chez les patients XLA sont généralement causées par des microorganismes qui sont tués ou inactivés de manière très efficace par des anticorps chez des personnes normales. Les bactéries les plus fréquentes causant ces infections sont le pneumocoque, le streptocoque, et le staphylocoque. Certains types spécifiques de virus, comme *l'Hemophilus influenzae*, et de parasites, comme le Giardia, peuvent également causer des infections graves chez ces patients.

Chez ces patients XLA, le défaut des cellules B est présent à la naissance et les infections peuvent commencer à tout âge. Cependant, la fréquence d'apparition de ces infections n'est pas inhabituelle jusqu'aux âges de 6 à 18 mois, les nourrissons étant alors encore protégés par les anticorps acquis pendant la grossesse [47].

L'identification de mutations du gène codant pour BTK comme cause de XLA chez 85% des enfants atteints d'agammaglobulinémie et de cellules B absentes, a permis de montrer le rôle indispensable de la BTK dans la lymphogenèse B chez l'homme [46]. Peu de temps, après sa découverte, il a été montré que BTK était cruciallement impliqué dans la signalisation du récepteur B (BCR) des cellules B matures [48].

Le rôle central de la BTK est moins marqué dans les modèles murins (*Xid*). Les souris *XID* ont une mutation inactivatrice de BTK et possèdent une population de lymphocytes B diminuée seulement de moitié par rapport aux souris sauvages (Wild-type, *Wt*). Une hypothèse selon laquelle un remplacement de la fonction de BTK par la protéine tyrosine kinase TEC serait possible chez la souris, alors que chez l'homme la présence de cette kinase ne permettrait pas de restaurer cette fonction [49].

2.1 Structure de la BTK

BTK est une protéine tyrosine kinase non réceptrice, cytoplasmique de la famille des tyrosines kinases TEC [50]. Il s'agit de tyrosine kinase non réceptrice, qui comprend, en plus de BTK, quatre membres supplémentaires : la tyrosine kinase hépatocellulaire (TEC tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma), la kinase de lymphocyte T inductible (ITK IL-2 inductible T-cell kinase), RLK : Resting lymphocyte kinase, et la kinase exprimée par la moelle osseuse (BMX bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X) [51]. Ces protéines sont exprimées principalement par les cellules hématopoïétiques et interviennent dans les voies de signalisation intracellulaire soit en réponse aux récepteurs cytokiniques, soit en réponse aux récepteurs lymphocytaires TCR et BCR [52]. Dans la lignée lymphoïde, l'expression de BTK est limitée aux cellules B et ne se retrouve pas dans les lymphocytes T ou les cellules Natural Killeur (NK). En revanche, elle est également exprimée par d'autres lignées comme les cellules spécifiques de la lignée myéloïde (monocytes et macrophages) [53].

La protéine BTK comporte 659 acides aminés et contient cinq domaines de signalisation (Figure 11 : [5]).

- Les kinases de la famille TEC sont caractérisées par un domaine d'homologie de la pleckstrin N-terminale (PH) capable de se lier aux phospholipides membranaires (permettant le recrutement des membranes) ainsi qu'aux protéines comme les protéines G hétérodimères, les isoformes PKC, Stat3, F-actine et Fas [54]. Ce domaine est essentiel pour la localisation de la membrane BTK.
- Une région d'homologie Tec ou Tec Homology (TH) qui regroupe les régions BH (BTK Homology Region) et PRR (Poly Proline Region) impliquée dans l'autorégulation de Tec-kinases.
- Des structures assez similaires à celle des kinases de la famille des SRC, avec des régions SH3 et SH2, riches en proline impliqué dans les interactions protéines-protéines ou pour la liaison à des séquences hébergeant des résidus tyrosines phosphorylés. SH3 et SH2 contiennent le site de phosphorylation tyrosine 223, nécessaire au mécanisme de régulation de BTK.
- Un domaine de kinase C-terminale SH1, comportant le domaine tyrosine kinase. Le SH1 a une fonction catalytique et contient le site de phosphorylation tyrosine 551.

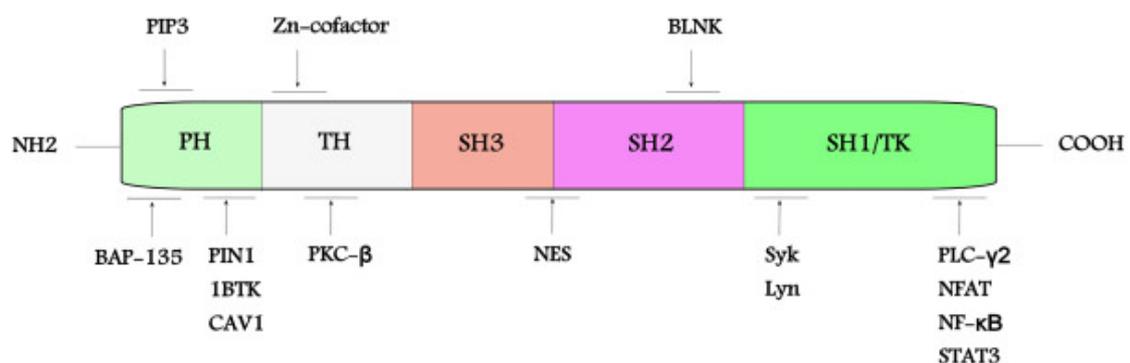


Figure 11 : Les différents domaines de la protéine de la BTK

Contrairement aux kinases de la famille SRC qui sont constitutivement associées à la membrane cellulaire, BTK est cytoplasmique et seulement transitoirement recrutée sur la membrane plasmique. Par conséquent, sous sa forme non phosphorylée, la protéine BTK se localise dans le cytoplasme à proximité du noyau cellulaire. Sa stabilité nécessite la présence de zinc se fixant au niveau du domaine TH de la protéine ; des mutations dans la région de fixation au zinc amènent à la génération d'une protéine BTK très instable et rapidement dégradée [55]. Grâce à ces différents domaines, la protéine BTK pourra être activée par phosphorylation et interagir avec de nombreuses protéines intervenant dans le processus complexe de transduction du signal.

2.2 Régulation de l'expression

L'activation de BTK en réponse à l'engagement BCR par des antigènes induit une gamme d'interactions entre protéines et le recrutement de molécules de signalisation, permettant la survie des cellules B, la prolifération, la différenciation et la production d'anticorps. BTK est présente sous sa forme inactive dans le cytoplasme à proximité du noyau cellulaire. L'activation du BCR soit par fixation antigénique soit par maturation va permettre le recrutement à la membrane cellulaire des kinases en amont de la famille des Src : Blk, Lyn et Fyl [56].

L'une des premières étapes après l'engagement du BCR est le regroupement des molécules de transduction de signal Ig (CD79a et CD79b) et la phosphorylation dans les queues cytoplasmiques de leurs motifs d'activation ITAM. Cette phosphorylation est médiée par des tyrosines kinases non réceptrices telles que Lyn. Par la suite une tyrosine kinase splénique Syk se lie aux ITAM, dans laquelle elle sera activée, et va à son tour phosphoryler BTK et CD19, ce qui conduit à l'activation de la protéine phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K). Une fois PI3K activé elle va pouvoir phosphoryler le phospholipide phosphatidyl inositol bis-phosphate (PIP2) en phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3). (Figure 12 : [57]).

La deuxième étape clé dans la régulation de l'activation de BTK est la modification spatiale de BTK. Après stimulation cellulaire *via* la voie TLR ou BCR, la BTK se déplace vers la surface cellulaire et sera phosphorylée au niveau de la tyrosine 551 du domaine SH1

par Lyn. Cette phosphorylation entrainera l'auto-phosphorylation au niveau de la tyrosine 223 du domaine SH3.

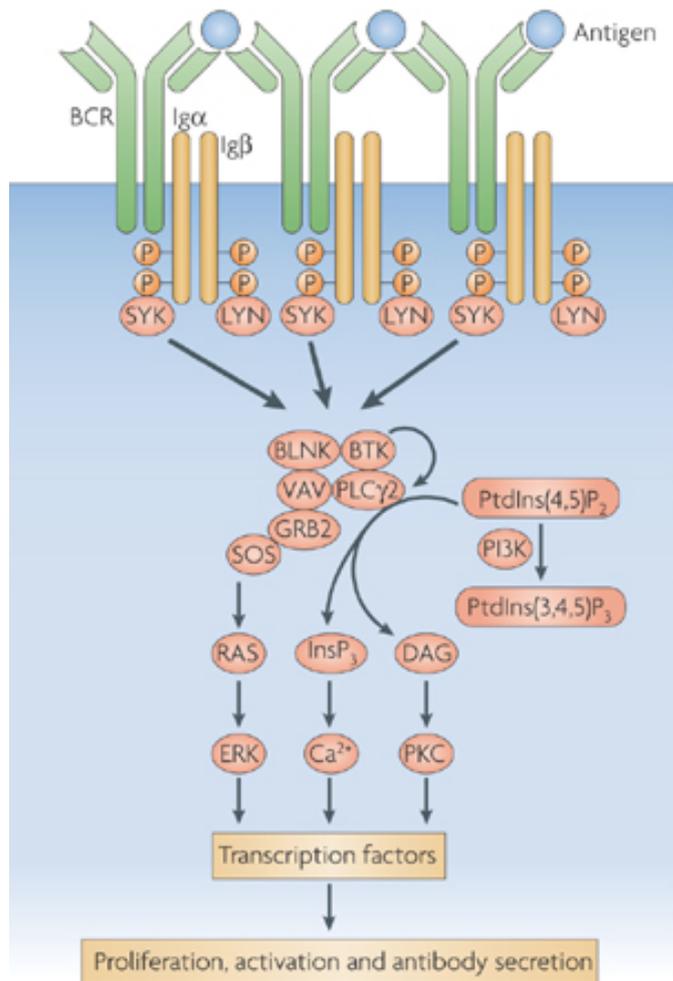


Figure 12 : Regroupement des molécules de transduction du signal suite à l'engagement du BCR

Ces phosphorylations permettront à BTK d'adopter une conformation tridimensionnelle favorable à l'exposition de son domaine PH et à l'interaction avec PIP3 entrainant la phosphorylation de la phospholipase C ou PLCγ recrutant la protéine kinase PKC. Une fois la phosphorylation effectuée, PLCγ déclenche la conversion de PIP2 dans les molécules inositol 1,4,5-triphosphate et diacylglycérol (DAG), induisant une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium (Ca²⁺). PKC, quant à elle, intervient à deux niveaux de la voie de

signalisation : en levant l'inhibition d'I κ B sur NF- κ B, et en entrainant l'activation de la protéine phosphatase CaN et l'activation du facteur de transcription NFAT (Figure 13 : [58]).

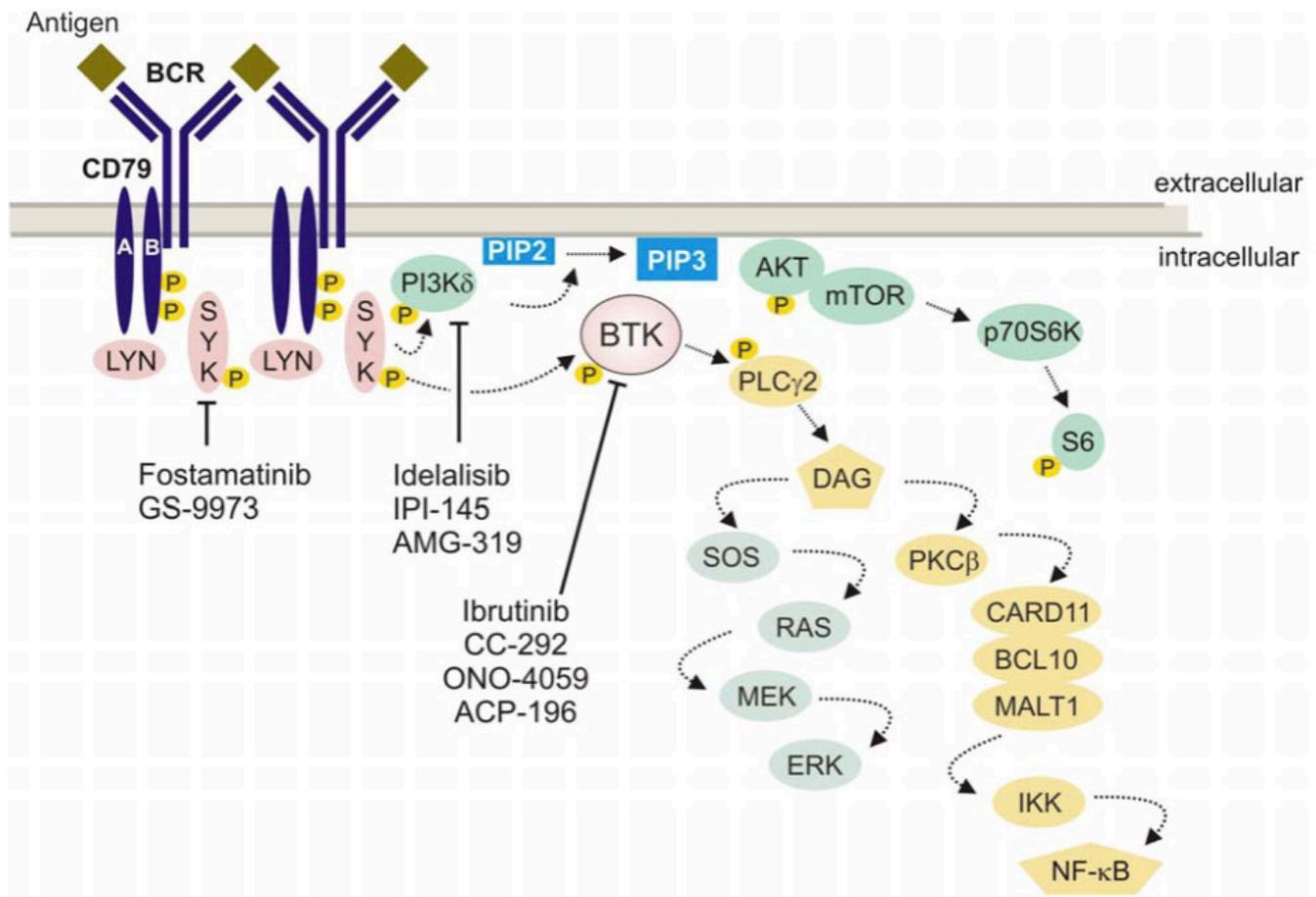


Figure 13 : voie de régulation de la BTK et les inhibiteurs de kinase

2.3 Le rôle de BTK dans les cellules B

Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe précédent, l'activation de BTK permet le recrutement de deux facteurs de transcription majeurs NF- κ B et NFAT, régulant la synthèse de nombreuses protéines intervenant dans la prolifération, la maturation et la survie cellulaire. Les lymphocytes B déficientes pour la protéine BTK ont une activité NF- κ B nettement diminuée, montrant l'importance de cette interaction. La contribution principale, mais non exclusive, du NF- κ B au développement des lymphocytes est d'assurer la survie cellulaire [59]. Les fonctions anti-apoptotiques de NF- κ B sont cruciales pour la santé des lymphocytes, même après leur maturité. Malheureusement, ces fonctions aident également à la tumorigénèse lorsque NF- κ B est dérégulée [60].

Avec la découverte de XLA, des modèles souris *Xid* de cette pathologie ont été développés et ont permis d'étudier le rôle de BTK *in vivo*. Les analyses des différents modèles de souris générés montrent que BTK est exprimée dans le développement de cellules B et que les cascades de signalisation activées par BTK sont critiques à plusieurs points de contrôle tout au long de la différenciation des cellules B. En l'absence de BTK, et plus encore dans le cas d'une activation constitutive, le développement des cellules B est altéré. Les mécanismes moléculaires, par lesquels BTK sert à la médiation du développement des cellules B, de l'activation cellulaire et de la mort cellulaire, doivent encore être élucidés et attendent une caractérisation détaillée des cibles et des voies de signalisation en aval. Très probablement, les protéines qui interagissent avec les différents domaines de BTK varient entre les étapes individuelles du développement des cellules B [61].

2.3.1 BTK et le BCR

La signalisation à travers le BCR transmet non seulement des signaux pour des réponses immunitaires adaptatives, après contact avec un antigène spécifique, mais elle joue également un rôle fondamental dans le développement de lymphocytes B en favorisant la maturation des cellules B indépendantes de l'antigène, aboutissant à la présence de cellules B matures dans le sang périphérique. BTK joue un rôle important dans la signalisation BCR induite par l'antigène.

En l'absence de BTK, la signalisation BCR est insuffisante pour induire les lymphocytes B matures. Les cellules déficientes en BTK sont défectueuses dans leur réponse à la signalisation BCR, entraînant un défaut de mobilisation du Ca^{2+} conduisant à une réponse fonctionnelle inadaptée, dont la prolifération cellulaire, l'expression des marqueurs d'activation, la production de cytokines et d'anticorps. De manière intéressante, la surexpression de BTK dans les cellules B entraîne la formation spontanée de centres germinatifs, l'augmentation du nombre de cellules plasmatiques et la production d'auto-anticorps antinucléaires tel qu'observé dans une MAI de type Lupus Erythémateux Systémique (LES) [61].

2.3.2 BTK et les autres voies

La prolifération et la survie des lymphocytes B dépendent également d'autres voies de signalisation, comme celle du récepteur BAFF-R. Il s'agit d'un récepteur de la famille des TNF α , qui est exprimé par tous les lymphocytes B à l'exception des plasmocytes de la moelle osseuse.

La BTK joue également un rôle dans la signalisation d'une grande variété de molécules de cellules B telles que les récepteurs de cytokines (CD19, CD38, CD40), les récepteurs de facteur de nécrose tumorale et les TLRs. Ces dernières sont des protéines transmembranaires. Il existe 10 TLRs fonctionnels qui ont été identifiés chez l'homme. Les récepteurs TLR présentent un caractère ubiquitaire au niveau des cellules immunitaires acquises et innées. Le rôle de BTK dans cette régulation sera impliqué à la fois aux lymphocytes B et aux monocytes, polynucléaires et macrophages. De nombreuses études ont permis de montrer le rôle de BTK dans la réponse aux TLR3 et TLR4 [62] ainsi que son rôle dans la réponse aux TLR8 [63] et TLR9 [64]. L'activation de BTK induite par TLR9 semble provoquer une production excessive d'auto-anticorps et donc une auto-immunité [65].

De nombreux rapports ont décrit l'effet de la BTK dans le développement d'autres types cellulaires, comme les plaquettes, les macrophages [66] et les ostéoclastes [66]. Aujourd'hui des approches thérapeutiques visent à agir sur ces voies de régulation. En bloquant la BTK, on agit sur le BCR et donc sur les lymphocytes B impliqués dans de nombreuses pathologies.

3 Les inhibiteurs de la BTK utilisés en oncologie, vers une utilisation en immunologie

Plus de 400 maladies sont associées directement ou indirectement avec des protéines kinases. Elles sont donc considérées aujourd'hui comme l'un des groupes de pathologies les plus important dans le développement de médicaments. Ces kinases peuvent être ciblées par des petits composés, capables d'inhiber la phosphorylation des protéines, ce qui empêche leur activation. Ces inhibiteurs peuvent interférer avec l'activité de la kinase soit (1) en bloquant la liaison à l'ATP, soit (2) interférant avec les interactions kinases-protéines ou (3) en régulant la kinase par l'utilisation d'ARN stratégie de brouillage.

Les premiers travaux visant à inhiber l'effet des tyrosines kinases remontent au début des années 1980, la découverte de médicaments inhibiteurs est relativement récente. Un certain nombre d'inhibiteurs de la kinase ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour une utilisation thérapeutique dans des indications oncologiques et constituent un ajout important à l'arsenal thérapeutique pour combattre le cancer (Tableau 1).

Dénomination	Année d'approbation par la FDA	laboratoires	indications	Kinase cible
Imatinib GLIVEC®	2001	Novartis	Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)	Abl, c-Kit, PDGFR α/β
Dasatinib SPRYCEL®	2006	Bristol-Myers-Squibb (BMS)	LMC	Abl, c-Kit, PDGFR, Src
Nilotinib TASIGNA®	2007	Novartis	LMC	Abl, c-Kit, PDGFR, Src
Vemurafinib ZELBORAF®	2011	Roche, Plexxicon	LMC	Abl, c-Kit, PDGFR, Src, ephrin

Tableau 1 : Les inhibiteurs de protéines kinases approuvés par la FDA (au cours des années 2000)

De nombreuses cibles ont abouti au développement d'inhibiteurs de la tyrosine kinase. De plus, certains de ces médicaments frappent à la fois la kinase cible et une ou plusieurs kinases hors cible. C'est le cas de l'Imatinib qui atteint également la kinase réceptrice du (PDGF) et le c-kit, ou encore le Dasatinib, l'inhibiteur de la kinase le plus récemment approuvé, qui marque BCR-ABL, mais inhibe également de façon importante la c-Src et la BTK.

Le rôle crucial de BTK dans la signalisation BCR contribue également à plusieurs cas de malignité des cellules B, telles que la leucémie lymphocytaire chronique (LLC), le lymphome de la cellule du manteau (LCM) [67]. Cependant, jusqu'à récemment, les thérapies qui ciblent les cellules B ont entraîné l'épuisement du répertoire des cellules B, tandis que les stratégies thérapeutiques qui réduisent l'activité BCR sont relativement nouvelles pour le traitement de ces maladies. La connaissance des détails structuraux et fonctionnels de la molécule BTK a conduit à la conception d'inhibiteurs efficaces avec une large gamme de profils de sélectivité de kinase [5]. Des niveaux accrus de protéine BTK ont été détectés dans des cellules de la LLC [68]. Or la BTK dans les LLC peut être activée par déclenchement de BCR et CD40 [68]. L'inhibition de BTK en utilisant l'inhibiteur de BTK permettrait de diminuer la synthèse d'ADN et le signal de survie des cellules stromales.

La connaissance des détails structuraux et fonctionnels de la molécule de BTK a conduit à la conception d'inhibiteurs efficaces avec une large gamme de profils de sélectivité de kinases [5]. Les inhibiteurs de kinase peuvent fonctionner comme des agents compétitifs d'adénosine triphosphate réversibles (ATP) qui ciblent le site de liaison d'ATP des protéines kinases. Les inhibiteurs de kinase irréversibles qui se lient de façon covalente à leur cible, sont très sélectifs, et puissants avec un effet pharmacodynamique prolongé limitant la compétition endogène de l'ATP [69-71].

3.1 Le premier inhibiteur de BTK en oncologie : l'Ibrutinib

Le premier inhibiteur de BTK à être entré en développement clinique fut l'Ibrutinib (IMBRUVICA® = PCI-32765) par Pharmacyclics. Il s'agit d'un inhibiteur sélectif très puissant administré par voie orale avec une activité inhibitrice (IC_{50}), de 0,5 nM contre BTK. Il se lie de façon irréversible au résidu Cys-481 dans le segment inhibiteur allostérique de BTK (domaine TK / SH1) et bloque son activité enzymatique [72-74]. Seul un petit sous-ensemble de tyrosines kinases (une dizaine) dans le génome humain contient un résidu

cystéine homologue à Cys-481. Les kinases contenant des Cys comprennent EGFR, HER2, HER4, ITK, BMX, JAK3, TEC et BLK. L'inhibition d'une ou plusieurs de ces kinases alternatives pourrait aussi contribuer à l'efficacité et/ou à la toxicité de l'ibrutinib.

Pour la LLC, l'ibrutinib est administré par voie orale une fois par jour (420 mg) sur un programme continu jusqu'à une amélioration de la pathologie ou jusqu'à l'apparition d'effets secondaires. L'ibrutinib est rapidement absorbé et rapidement éliminé après administration orale. Sa demi-vie effective après administration orale chez l'homme est de 2 à 3 heures (et la pharmacocinétique est similaire chez les patients atteints de LLC et de LCM. L'ibrutinib est presque exclusivement métabolisé par le CYP3A4/5, en métabolite dihydrodiol (PCI-45227), qui est également dosé chez les patients inclus dans les études cliniques [14].

Les résultats prometteurs de l'ibrutinib ont conduit les chercheurs à explorer leur efficacité synergique en combinaison avec des schémas de chimio-immunothérapie établis dans le but d'améliorer et d'obtenir des réponses durables. L'une des premières études cliniques dans cet objectif but était une étude de phase II qui a montré l'efficacité d'ibrutinib en association avec le rituximab (IR) (Objective Response Rate ORR = 85 %) et raccourcit la durée de la distribution de lymphocytose chez les patients atteints de LLC présentant des caractéristiques à haut risque [74]. L'ajout d'ibrutinib à BR (bendamustine et rituximab) semble produire une meilleure réponse clinique (ORR = 93%) que l'association IR chez les patients récurrents / réfractaires LLC [74]. Dans un rapport récent d'une autre étude de phase Ib / II, l'administration d'ibrutinib en association avec ofatumumab a démontré une activité anti-leucémique puissante et un profil de toxicité acceptable chez des patients à LLC réfractaires [73]. Des expériences précliniques et des essais cliniques supplémentaires ont été menés pour approfondir cette stratégie dans d'autres troubles des cellules B [NCT01829568, NCT01569750, NCT01479842].

Compte tenu des données actuelles, l'ibrutinib semble être l'un des agents les plus actifs dans le traitement de la LLC et la LCM. Il est aujourd'hui indiqué dans le traitement de la LLC chez les patients qui ont reçu au moins un traitement antérieur, ou dans le traitement de première intention de la LLC en présence d'une délétion 17p et une AMM conditionnelle (en attendant les résultats d'études confirmatoires) dans le traitement du LCM en rechute ou réfractaire.

3.2 Les limites de son utilisation

Dans un contexte de prise en charge de pathologies graves menaçant le pronostic vital des patients telles que le cancer, l'ibrutinib est considéré comme globalement bien toléré par les patients et dépourvu d'effets secondaires sévères tels que l'immunosuppression et un risque infectieux faible. Cependant, malgré ce profil de toxicité favorable, certaines particularités doivent être soulignées.

3.2.1 Les effets indésirables

L'innocuité de l'ibrutinib a été évaluée dans une population regroupant 504 patients traités par l'ibrutinib [69-75]. Une étude clinique contrôlée, randomisée (étude PCYC-1112-CA) qui incluait 195 patients atteints de LLC, a été réalisée. Les patients recevaient 420mg d'ibrutinib par jour et avaient reçu au moins un traitement antérieur. Dans cette étude les effets indésirables les plus fréquents (survenus chez > 20% des patients) ont été la diarrhée, les douleurs musculo-squelettiques, les nausées, les éruptions cutanées, la pyrexie, l'anémie, la neutropénie et les ecchymoses. Environ 4% des patients recevant l'ibrutinib dans cette étude PCYC-1112-CA ont abandonné le traitement en raison d'événements indésirables qui comprenaient des infections, de la diarrhée, une fibrillation auriculaire (FA) et des hématomes sous-duraux. Chez environ 4% des patients, la survenue d'événements indésirables a donné lieu à une réduction de dose [69-75].

Une autre étude clinique, en ouvert (étude PCYC-1104-CA) a été réalisée chez 111 patients atteints de LCM en rechute ou réfractaires. Le même type d'événements indésirables a été rapporté. 14% des patients ont dû subir une réduction de dose et 10% des patients ont arrêté le traitement en raison des effets, le plus souvent l'hématome sous-dural (1,8%) [69-75].

Étant donné que les études cliniques sont menées dans des conditions particulières, le taux d'effets indésirables observés peut ne pas refléter les taux observés dans la pratique courante. Dans le paragraphe suivant, nous présenterons les effets indésirables considérés comme étant raisonnablement associés à l'utilisation de l'ibrutinib à la suite d'une évaluation exhaustive des données disponibles sur les événements indésirables. Une relation de cause à effet avec l'ibrutinib ne peut cependant pas être établie de façon fiable dans tous les cas [69-75].

➤ La diarrhée et les troubles cutanées liés à l'EGFR

La diarrhée est l'un des événements indésirables les plus courants liés à l'ibrutinib. Il est considéré comme un effet hors cible, résultant du blocage d'autres tyrosine kinases, tels que EGFR. La diarrhée a été enregistrée chez la majorité des patients dans toutes les études. Cet événement avait généralement lieu durant les 4 premières semaines de traitement, et était de gravité légère (grade ≤ 2 , soit ≤ 6 selles par jour). De plus l'inhibition de l'EGFR est également décrite dans la littérature peut-être responsable de troubles cutanées sévères.

➤ Les troubles musculo-squelettiques

Bien qu'il ait été démontré que l'ibrutinib améliore les symptômes de l'arthrite auto-immune (que nous détaillerons dans le paragraphe suivant) [75], des arthralgies (avec ou sans gonflement des articulations) sont fréquentes chez les patients traités par cet agent. Elle peut être associée à une gêne importante et, dans certains cas, entraîner l'arrêt du traitement.

➤ Les événements hémorragiques

L'apparition d'événements hémorragiques a été rapportée chez un sous-groupe de patients traités par ibrutinib [76]. La plupart des événements étaient de grade 1 à 2 (ecchymoses spontanées ou pétéchies), mais chez 5% des patients, ils étaient de grade 3, y compris des hématomes sous duraux, des saignements gastro-intestinaux, des hématuries, des hémorragies post-interventions. Bien que la BTK soit exprimée dans les plaquettes, les mécanismes des événements hémorragiques demeurent mal compris. Cependant, certaines hypothèses ont été émises, notamment d'un point de vue de la sélectivité de la cible [69-75].

Les plaquettes sont les cellules sanguines les plus importantes pour prévenir des saignements après une lésion vasculaire. Or deux kinases de la famille des TEC, BTK et Tec participent à l'activation des plaquettes en aval de la glycoprotéine de récepteur de collagène VI (GPVI) par phosphorylation et activation de la PLC γ 2. Dans un modèle de souris, BTK a montré un rôle dans l'activation plaquettaire induite par le facteur de von Willebrand (vwF) et GPIb-IX-V. En plus de BTK, l'ibrutinib inhibe Tec ce qui suggère que l'inhibition de ces 2 kinases importantes en aval des récepteurs plaquettaires peut-être responsable de l'effet observé. D'après des données *in vitro*, l'association d'un inhibiteur de la BTK à un inhibiteur de la P2 γ 12 comme le Plavix® n'est pas recommandé [77].

➤ La fibrillation auriculaire

Des cas de fibrillation auriculaire (FA) (y compris des événements de grade >3) et de flutter auriculaire ont été signalés chez des patients traités par l'ibrutinib, notamment chez ceux présentant des facteurs de risque cardiaque, des infections aiguës ou des antécédents de FA. Dans le cadre de l'étude clinique randomisée PCYC-1112-CA, des cas de FA ont été rapportés à une fréquence supérieure chez les patients atteints de LLC traités par l'ibrutinib à 420mg par jour (5% ; grade 3 et 3% de grade 4) que dans le groupe témoin (1% grade 3 et 0% grade 4) [75]. Dans l'essai RESONATE, l'apparition de FA était plus fréquente chez les patients traités par ibrutinib que par l'ofatumumab ARZERRA® (un anticorps monoclonal humain anti-CD20) [69-75]. D'après Mc Mullen *et al.* [78], la FA induite par ibrutinib pourrait être due à l'inhibition de la BTK et des kinases apparentées telles que Tec dont les transcrits sont plus élevés dans le tissu auriculaire dans des conditions de FA qu'en rythme sinusal. En effet, BTK et Tec régulent la voie PI3K (p100 α)/Akt et maintiennent le rythme sinusal. En cas de diminution de cette voie de protection, le risque de AC/FA et de cardiomyopathie augmente. Un suivi clinique périodique de tous les patients doit être fait afin de déceler une FA. En cas d'apparition de symptômes d'arythmie (palpitations, sensation de tête légère) ou de survenu de dyspnée, les patients doivent faire l'objet d'une évaluation clinique et subir un ECG. En présence de FA persistante, il faut tenir compte de la balance bénéfique/risque et suivre les directives relatives à l'ajustement posologique.

En conclusion, il semble que la plupart des événements indésirables observés lors d'un traitement par l'ibrutinib soient liés à un effet hors-cible du traitement. Le manque de spécificité de l'inhibiteur sur sa cible, BTK, et par conséquent l'inhibition d'autres kinases semble être à l'origine des troubles observés.

3.2.2 Les interactions médicamenteuses

L'ibrutinib est métabolisé principalement par l'enzyme 3A du cytochrome P450. C'est un inhibiteur de la glycoprotéine P (P-gp) et de la protéine BCRP (une protéine de résistance du cancer du sein). Certains agents sont donc susceptibles d'augmenter, de diminuer ou de modifier le niveau des concentrations plasmatiques de l'ibrutinib.

➤ Les agents pouvant augmenter les concentrations plasmatiques de l'ibrutinib

L'administration concomitante de kétoconazole, un inhibiteur puissant de CYP3A4, a entraîné une augmentation de la concentration de l'ibrutinib, soit une concentration

plasmatique maximale (C_{max}) et une aire sous la courbe (ASC), 29 à 26 fois supérieure. En conclusion, la co-administration d'inhibiteurs puissants du CYP3A4 (*e.g.*, le kétoconazole, l'indinavir, le nelfinavir, le ritonavir, le saquinavir, la clarithromycine, l'itraconazole...) et d'inhibiteurs modérés (*e.g.*, voriconazole, l'erythromycine, l'apépritant, l'atazinavir, la ciprofloxacine, le diltiazem, le fluconazole, le fosamprenavir, l'imatinib, le vérapamil et le pamplemousse...) avec l'ibrutinib doit suivre les recommandations suivantes :

- i) Si la prise d'inhibiteur puissant est nécessaire, le traitement par ibrutinib doit être interrompu temporairement pendant la durée du traitement.
- ii) Dans le cas d'inhibiteurs modérés, la dose d'ibrutinib doit être diminuée à 140mg pendant toute la durée du traitement.
- iii) Dans tous les cas, les patients doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin de déceler tout signe de toxicité [69-75].

➤ Les agents pouvant diminuer les concentrations plasmatiques de l'ibrutinib

À l'inverse, l'administration d'inducteurs puissants du CYP3A4 (*e.g.*, la rifampicine, la carbamazépine, la phénytoïne et le millepertuis...) réduit l'ASC de l'ibrutinib d'environ 10 fois. Il est recommandé d'envisager des agents dont l'effet inducteur sur le CYP3A est moins important afin d'éviter un échappement thérapeutique [69-75].

➤ Les agents pouvant modifier les concentrations plasmatiques de l'ibrutinib

L'ibrutinib, étant un inhibiteur de la P-gp *in vitro*, il est susceptible de modifier l'absorption de médicaments substrats de la P-gp (*e.g.*, l'aliskirène, la digoxine, la fénofénadine...). Cependant, aucune donnée clinique d'interaction n'existe (RCP). De la même façon, l'ibrutinib inhibe la BCRP (intestinale et hépatique), donc tous les médicaments qui sont des substrats de la BCRP (*e.g.*, le méthotrexate, le topotécan, l'imatinib...) peuvent voir leur exposition plasmatique (ASC) augmenter. Afin d'éviter toute interaction possible dans le tractus gastro-intestinal avec la prise d'ibrutinib, tout substrat de la P-gp et/ou de la BCRP à marge thérapeutique étroite doit être pris au moins 6 heures avant ou après l'ibrutinib [69-75].

➤ Autres interactions à prendre en considération

Comme nous l'avons vu précédemment, des événements hémorragiques peuvent survenir lors de la prise d'ibrutinib. Par conséquent, l'ibrutinib ne doit pas être co-administré avec de la warfarine ou d'autres antagonistes de la vitamine K. L'utilisation d'ibrutinib chez les patients ayant besoin de prendre d'autres anticoagulants ou des inhibiteurs de la fonction plaquettaire peut augmenter le risque de saignement.

3.2.3 Les problèmes de résistances

La résistance aux médicaments est un problème courant pendant le traitement du cancer. Or, bien que l'ibrutinib soit reconnu comme extrêmement efficace dans la LLC en rechute, certaines formes de résistances à ce nouveau médicament ont été décrites.

Woyach et al [79] ont tenté de décrypter les anomalies génétiques en cause dans ces résistantes. Les auteurs ont séquencé l'ADN des cellules de six patients présentant une résistance acquise à l'ibrutinib, en comparaison avec de l'ADN prélevé avant traitement. Ils ont ensuite réalisé des études *in vitro* pour approcher les mécanismes impliqués dans cette résistance. Le séquençage complet de l'exome chez les 6 patients a alors été étudié. Dans 5 cas, il s'agissait de la même mutation consistant en un remplacement d'une cystéine par une sérine en position 481 de BTK (C481S), modifiant le site de fixation de l'ibrutinib. La mutation C481S de BTK entraîne une diminution de l'affinité de l'ibrutinib pour le BTK ce qui le rend moins efficace pour bloquer l'autophosphorylation du BCR. Dans un cas, il s'agissait d'une mutation en position 665 d'une arginine par le tryptophane (R665W) de la PLC γ 2, qui agit en aval du BCR pour la transmission du signal d'activation.

Une autre étude s'est également intéressée aux autres variations BTK pouvant causer une résistance à l'ibrutinib, en évaluant toutes les substitutions possibles d'acides aminés résultant de l'événement mutationnel le plus fréquent, à savoir les changements de nucléotides uniques au codon C481 dans BTK. Au vu de la similarité structurelle fonctionnelle de la thréonine à la sérine, le remplacement de C481 par la thréonine a également été évoqué [80].

3.3 Le développement d'inhibiteurs de BTK de seconde génération

En conclusion, le développement des inhibiteurs de BTK a permis d'améliorer de façon considérable la qualité de vie des patients atteints de malignités de cellules B. Même si la LLC reste incurable à ce jour, de plus en plus d'options de traitement apportent des avantages cliniques aux patients ayant une plus longue durée de la réponse et moins d'effets indésirables qu'observés avec des agents chimio-thérapeutiques classiques [5].

Le premier inhibiteur de cette classe pharmacologique, l'ibrutinib, a été utilisé en clinique pour le traitement de la LLC, le LCM et la maladie de Waldenström [69-75]. Cependant, l'ibrutinib a des effets indésirables, tels que des saignements, des éruptions cutanées, et la fibrillation auriculaire, qui pourraient être dû en partie à un manque de sélectivité pour la cible BTK [10,13,15,17,18]. Par conséquent, des inhibiteurs de BTK plus sélectifs dits de « seconde génération », tels que ACP-196, ONO / GS-4059, BGB-3111 et CC-292, sont actuellement à l'étude [86].

➤ L'ACP-196 : l'Acalabrutinib

L'Acalabrutinib, également connu sous ACP-196, est un inhibiteur irréversible BTK de seconde génération qui a été rationnellement conçu pour être plus puissant et sélectif que l'ibrutinib [81-85]. Les données précliniques ont confirmé que l'acalabrutinib est un inhibiteur hautement sélectif de la BTK. Il n'inhibe pas la kinase TEC et l'agrégation plaquettaire qui serait un avantage préféré par rapport à l'ibrutinib et aurait réduit le risque de saignement. L'acalabrutinib n'inhibe pas l'EGFR, donc pourrait réduire les événements indésirables sur l'éruption cutanée et la diarrhée sévère. Les maux de tête transitoires ont été signalés comme un événement indésirable fréquent de l'acalabrutinib et semblaient être plus fréquemment observés que chez les patients traités par ibrutinib à partir de données historiques. Un plus grand nombre de patients et un suivi plus long de l'étude clinique de phase I / II en cours sont nécessaires pour déterminer ces avantages potentiels. Il sera également intéressant de voir si les mécanismes de résistance seront différents de ceux de l'ibrutinib.

Enfin, les inhibiteurs sélectifs supplémentaires BTK, à savoir, ONO / GS-4059 et BGB-3111, sont en cours de développement clinique actif [87-89]. Plus d'options de traitement peuvent être disponibles pour les tumeurs malignes B.

➤ ONO / GS-4059

ONO PHARMACEUTICAL et Gilead Sciences ont annoncé la signature d'un accord de licence exclusif pour le développement et la commercialisation de l'ONO-4059, inhibiteur oral de BTK d'ONO destiné au traitement des hémopathies malignes B. L'ONO-4059 est un inhibiteur sélectif de BTK, un traitement oral en 1 prise par jour. ONO a présenté au cours de plusieurs conférences scientifiques des données préliminaires de phase 1 qui montrent l'activité clinique du produit chez les patients présentant une LLC et un LNH [86].

Jusqu'à récemment, la prise en charge thérapeutique de la LLC reposait sur une chimiothérapie intensive. Les patients pouvaient la recevoir, avec des alkylants ou des analogues de la purine, associés à un anti-CD20, ou sur une chimiothérapie classique, moins agressive, avec chlorambucil. Pour les patients en rechute, le traitement est la bendamustine associée au rituximab. Dernièrement, de nombreux anti-CD20 sont venus s'ajouter à l'arsenal disponible (ofatumumab et obinutuzumab). Récemment des petites molécules inhibitrices de kinases, administrables par voie orale, en particulier l'ibrutinib se sont ajoutés à cet arsenal thérapeutique. En effet, bien que l'ibrutinib présente de nombreux effets secondaires, l'évaluation du ratio bénéfice/risque de l'ibrutinib a montré que les résultats obtenus sur les hémopathies malignes permettaient de donner un avis favorable de l'EMA pour son AMM en 2014 dans la LLC. Aujourd'hui malgré le développement d'inhibiteurs de seconde génération, plus sélectifs envers BTK, l'ibrutinib est le seul des inhibiteurs de BTK à avoir aujourd'hui une AMM en oncologie. Malgré tout, au vu des résultats très encourageants des inhibiteurs de la BTK en oncologie et surtout au vu du rôle de BTK dans la signalisation d'une grande variété de molécules de cellules B, les laboratoires pharmaceutiques se sont lancés dans le développement d'inhibiteurs de BTK dans d'autres pathologies en particulier les MAI.

La connaissance des détails structuraux et fonctionnels de la molécule de BTK a conduit à la conception d'inhibiteurs efficaces avec une large gamme de profils de sélectivité [90]. Les inhibiteurs de kinase peuvent fonctionner comme des agents compétitifs d'ATP réversibles qui ciblent le site de liaison d'ATP des protéines kinases. L'avantage de ces inhibiteurs réversibles est l'absence de modification irréversible de protéines hors cible, mais une mauvaise sélectivité et une faible compétition du site de liaison restent des défis majeurs pour cette classe d'inhibiteurs.

Nous allons détailler dans la dernière partie de cette thèse, la comparaison des inhibiteurs de BTK actuellement en développement préclinique ou clinique par différents laboratoires pharmaceutiques dans le traitement de pathologies auto-immunes. Plus particulièrement, nous verrons quels sont les différents critères et le cahier des charges à respecter en termes de sécurité.

4 Le développement des inhibiteurs de la BTK dans les MAI

Le rôle majeur de la BTK dans la signalisation des cellules B met en évidence le potentiel des inhibiteurs de BTK dans le traitement des maladies à médiation par cellules B. Un intérêt particulier s'est concentré sur leur potentiel dans le traitement des tumeurs malignes des cellules B [91]. Cependant, ces nouvelles thérapies ne sont pas seulement intéressantes dans le traitement de cancers. Le rôle des récepteurs des cellules B et de la signalisation des cellules B dans une MAI suggère que les inhibiteurs BTK peuvent également être utiles dans le traitement de ces pathologies [92], comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), [93] le lupus (LES) [94] et plus particulièrement la glomérulonéphrite lupique [95].

Les études cliniques utilisant le rituximab (un anticorps anti-CD20) pour appauvrir les lymphocytes B ont mis en évidence le rôle des lymphocytes B dans la pathogenèse des MAI comme celles citées précédemment. L'utilisation d'une molécule agissant sur les cellules B, comme la BTK via la voie BCR, semble être une voie thérapeutique intéressante [96] dans le traitement d'une MAI. De nombreux laboratoires pharmaceutiques ont donc développé des inhibiteurs de la BTK dans des indications telles que la PR, le LES... Actuellement, il y a 52 BTK inhibiteurs recensés dans les bases de données ADIT, Pharmaprojects (Tableau 2 : [97])

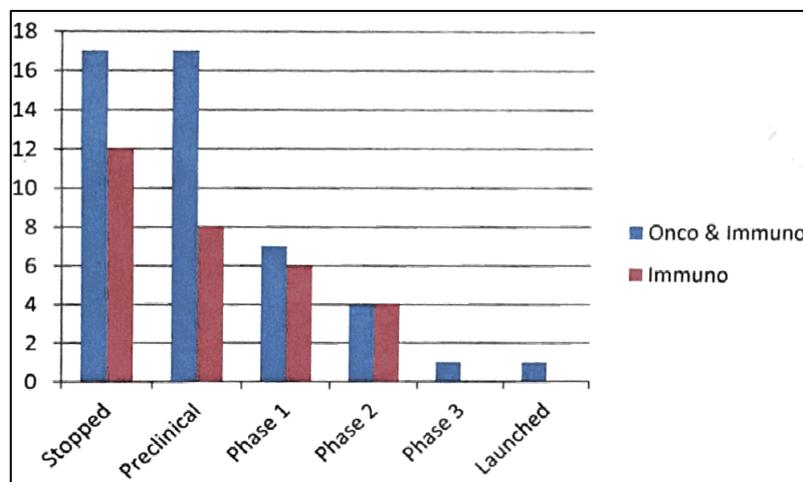


Tableau 2 : Les inhibiteurs de BTK en développement (et leur stade de développement en juillet 2016)

Parmi ces 52 inhibiteurs, certains ont montré une efficacité préclinique mais de nombreux laboratoires pharmaceutiques ont dû stopper leur développement suite à l'apparition de certains problèmes. On retrouve parmi eux, le laboratoire Pharnacyclics

(racheté par Abbvie) qui a montré que l'ibrutinib (PCI-32765) était actif dans un modèle d'arthrite avant que son développement ne soit axé sur des indications oncologiques.

Le laboratoire Genentech avait développé deux inhibiteurs le RN-486 et le de GDC-0834 qui ont dû arrêter leur développement:

- Le GDC-0834 est un inhibiteur irréversible de la BTK. Bien qu'il ait progressé vers des études de phase I précoces, le laboratoire a interrompu le développement du GDC-0834 en raison d'une instabilité métabolique [99].
- Le RN-486 est un puissant inhibiteur de la BTK et possède un mode de liaison réversible avec une bonne sélectivité pour la BTK par rapport aux autres kinases de la famille des TEC. Ce produit a montré une activité à la fois chez la souris CIA et la glomérulonéphrite dans un modèle lupique. Cependant, bien que le RN-486 ait montré une efficacité préclinique il n'a pas progressé dans le développement clinique. Aujourd'hui Genentech est en partenariat avec Roche, et développe un inhibiteur de BTK le GDC-0853 (une version amélioré du GDC-0834).

En 2006, Genentech était en partenariat avec CGI Pharmaceutical, et la collaboration a pris fin en 2010, après l'acquisition par Gilead en 2010. Cependant, ce partenariat a permis d'identifier plusieurs inhibiteurs de BTK, tels que CGI-1746, un puissant inhibiteur de la BTK ($IC_{50} = 1,9 \text{ nM}$) qui s'est révélé avoir un nouveau mode de liaison et pouvait inhiber à la fois les étapes d'auto et de transphosphorylation [100]. Aujourd'hui le CGI-1746 n'est pas en développement, malgré tout Gilead possède un BTK inhibiteur dans son portefeuille : le GS-4059.

Nous avons résumé les différents inhibiteurs de BTK ayant arrêté leur développement, dans le tableau suivant. Et nous avons indiqué si les laboratoires ont poursuivi leur développement. (Tableau 3).

<u>Sociétés</u>	<u>Indications</u>	<u>Composés</u>	<u>Status</u>	<u>Autres composés en développement</u>
Genentech	PR	GNE-309/GNE-504	Arrêt du développement	OUI : GDC-0853 (co-développement Roche)
Gilead Sciences	PR, Lupus	CGI-1746	Arrêt du développement	OUI : GS-4059 (co-développement Gilead)
Roche	Lupus	RN-486	Arrêt du développement	OUI : GDC-0853 (co développement Roche)
Pharmacyclics (racheté par Abbvie)	PR, Lupus	PCI-45261/PCI-45292	Arrêt du développement	NON
Taiho	PR	TAS-5315	Arrêt du développement	Récent brevet WO2016121953
Roche	PR	GDC-0834	Arrêt du développement (hydrolyse de la molécule)	OUI : GDC-0853 (co développement Roche)
Carna Bioscience	MAI	AS-550	Arrêt du développement	NON

Tableau 3 : Laboratoires pharmaceutiques ayant arrêté le développement d'inhibiteurs de la BTK dans les MAI

Le développement de thérapie dans des maladies chroniques telles que les MAI nécessite un niveau de sécurité plus important. En particulier, l'émergence d'effets secondaires hors cibles a poussé le développement d'inhibiteurs de BTK de seconde génération, avec des critères de sélectivité plus accrue pour la BTK. L'autre axe d'amélioration potentielle serait de développer des inhibiteurs de BTK se liant de façon

réversible et non irréversible (comme c'est le cas de l'ibrutinib) à la cible BTK. A l'heure actuelle, certains laboratoires pharmaceutiques ont axé leur développement sur des inhibiteurs de la BTK ayant un mode de liaison irréversible, tandis que d'autres ont cherché à développer des inhibiteurs réversibles.

- **Des inhibiteurs de BTK irréversibles**

Parmi les plus avancés dans leur développement, nous en avons identifié 3 : Le Spebrutinib (CC-292) développé par Celgene, le ACP-196 développé par Acerta Pharma et l'Olumitinib (HM-71224) développé par Hanmi/Eli Lilly. Nous avons indiqué dans le tableau suivant (Tableau 4), les trois laboratoires pharmaceutiques développant ces inhibiteurs irréversibles pour des indications immunologiques. Nous avons indiqué, leur stade de développement et l'estimation de la fin de l'étude, grâce au site clinicaltrials.gov, ainsi que leur IC₅₀. De cette façon, nous avons une première idée de leur puissance inhibitrice et de leur sélectivité.

<u>Sociétés</u>	<u>Composés</u>	<u>Stade de développement</u>	<u>Estimation de la date de fin d'études</u>	<u>BTK IC50 (nM)</u>
Celgene	CC-292	Ph2a PR (n=47, 4S)	Echoué (ACR 2016)	≈ 6
Acerta	ACP-196	Ph2a PR (n=31, 4S)	Juin 2016	≈ 5
Hanmi/ Lilly	HM-71224	Ph1 (volontaires sains, n=62, 2S) Ph2a PR (n=182, 12S)	Bonnes données de sécurité Juin 2018	≈ 2

Tableau 4 : Inhibiteurs irréversibles en développement dans les MAI

D'après les données fournies par le site clinicaltrials.gov, l'un des inhibiteurs irréversibles le CC-292 n'a pas montré de résultats positifs lors de son étude de phase 2 dans la PR, et donc l'étude a dû s'arrêter. Il ne reste donc aujourd'hui que deux inhibiteurs irréversibles en développement pour des indications immunologiques. En effet, les autres laboratoires se sont concentrés sur le développement d'inhibiteurs avec un mode de liaison réversible afin de se

différencier de l'ibrutinib et assurer une plus grande sécurité des produits pour des indications immunologiques.

- **Des inhibiteurs de BTK réversibles**

Parmi les laboratoires pharmaceutiques développant des inhibiteurs de la BTK ayant un mode de liaison réversible, nous en avons identifié 4 en phase de développement clinique : le GS-4059 développé par Gilead, le GDC-0853 de Genentech, le BMS-986142 de Bristol-Myers-Squibb et le M-2951 développé par Merck. Nous avons réalisé le même tableau que précédemment, ce qui nous a permis de comparer les inhibiteurs de BTK (Tableau 5).

<u>Sociétés</u>	<u>Composés</u>	<u>Stade de développement</u>	<u>Estimation de la date de fin d'études</u>	<u>BTK IC₅₀ (nM)</u>
Redex Pharma	REDX-05194	préclinique	/	≈ 3,7
KBP Biosciences	KBP-7536	préclinique	/	?
Boehringer Ingelheim	BIBTK-1	préclinique	/	≈ 13
Takeda	TAK-020	Ph1 (volontaires sains, n=128)	Mai 2017	≈ 2
Gilead Sciences	GS-4059	Ph1 (volontaires sains, n=42)	Septembre 2016	≈ 2.2
Genentech/Roche	GDC-0853	Ph1 (volontaires sains, n=111, 2S) Ph2a PR (n=408, 12S) Ph2 LES (n=241, 48S)	Bonnes données de sécurité Juillet 2018 Juin 2019	≈ 3
Bristol-Myers Squibb	BMS-986142	Ph1 (volontaires sains, n=80, 2S) Ph2 PR (n=580, 12S) POC SEP (n=80, 12S)	Bonnes données de sécurité Septembre 2018 Janvier 2024	≈ 0.5
Merck	M-2951	Ph1b LES (n=24, 4S) Ph2a PR (n=64, 12S) Ph2a SEP (n=250, 24S) Ph2a LES (n=432, 52S)	Complétée en octobre 2016 Septembre 2017 Décembre 2018 Décembre 2019	≈ 0.27

Tableau 5 : Inhibiteurs réversibles en développement dans les MAI

Ce tableau, permet de mettre en évidence un premier critère de comparaison entre les inhibiteurs réversibles et irréversibles. En effet, les IC_{50} des inhibiteurs réversibles sont beaucoup plus faibles que ceux des inhibiteurs irréversibles. Outre leur réversibilité, ces inhibiteurs semblent être plus puissants vis-à-vis de la cible BTK et donc plus intéressant pour un développement dans des MAI.

4.1 Critères d'évaluation d'un laboratoire pour le développement des inhibiteurs de BTK pour des indications immunologiques

4.1.1 L'efficacité de l'inhibiteur vis-à-vis de la cible BTK

Les premiers critères analysés et comparés sont leur mode de liaison à la cible, et leur test de sélectivité.

a) La notion de sélectivité

Le kinôme humain compte près de 518 protéines kinases. Ainsi, la famille des kinases représente environ 1,7% du génome humain. De manière générale, les relations entre protéines kinases sont représentées par un arbre phylogénétique, rendu célèbre par les travaux de Manning et al. (Figure 14 [101]).

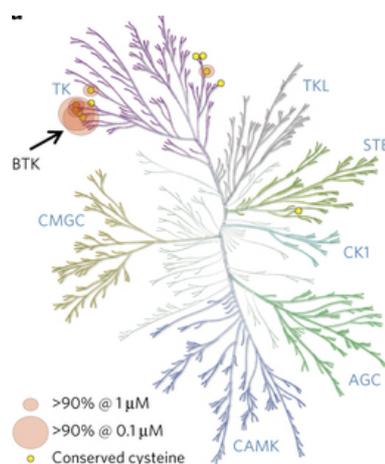


Figure 14 : Arbre phylogénétique représentant les relations phylogénétiques entre les domaines de kinases

Cependant, bien que le kinôme contienne 518 kinases, la majorité des sociétés développant des inhibiteurs de kinases n'ont testé leur sélectivité que sur un panel d'environ 200 kinases et plus particulièrement, celles qui étaient concernées par un résidu cystéine.

Les molécules candidates sont soumises à des tests permettant d'évaluer successivement deux critères principaux, leur efficacité et leur sélectivité. L'efficacité s'effectue par un dosage d'activité kinase *in vitro* en présence de concentrations croissantes de la molécule candidate (1 et 10 μM). Dans ce test, l'enzyme purifiée (native ou recombinante) est incubée en présence de son substrat et d'ATP radio-marqué. L'activité de l'enzyme est évaluée en mesurant la quantité de phosphate radioactif incorporé dans le substrat. L'addition de concentrations croissantes de la molécule à tester permet d'obtenir une courbe dose-réponse et de déterminer l' IC_{50} de la molécule, c'est à dire la concentration de molécules qui inhibe 50% de l'activité maximale de l'enzyme. Cette IC_{50} permet d'évaluer la puissance du composé. Plus l' IC_{50} est faible plus le produit est puissant et la sélectivité élevée. Un composé ayant une IC_{50} élevée aura de fortes chances d'être moins sélectif et donc de pouvoir inhiber d'autres kinases. Cependant, il convient de rester prudent lors de la comparaison des IC_{50} d'un composé à l'autre. En effet, cette valeur dépend de la concentration en ATP utilisée dans le dosage et cette concentration peut varier selon les études.

La sélectivité d'un composé mesure sa capacité ou non à inhiber d'autres kinases que celles sur lesquelles il a été initialement identifié. Le plus souvent elle se mesure en testant l'efficacité du composé sur un panel de kinases purifiées. Un composé est dit non sélectif s'il inhibe un grand nombre de kinases sans montrer de préférence particulière pour une famille plutôt qu'une autre. En revanche, un composé est dit sélectif s'il est capable d'inhiber plus efficacement une famille de kinases plutôt qu'une autre ou même au sein d'une famille, un membre plutôt qu'un autre. A la différence de l'efficacité, la sélectivité ne se mesure pas de manière stricte et son appréciation est soumise à de grandes variations selon l'importance des moyens mis en œuvre pour l'évaluer (nombre de kinases testées et éloignement de ces kinases de la cible initiale). En d'autres termes, plus on teste le composé sur des kinases différentes, plus l'évaluation de sa sélectivité sera complète.

Ces différents tests *in vitro* biochimiques et cellulaires ont donc permis de tester le profil de sélectivité du produit vis-à-vis des autres kinases du kinôme. Nous avons ainsi pu comparer les IC_{50} et nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux kinases dont l' IC_{50} était plus basse que celle de BTK.

Nous l'avons donc utilisé comme critère de sélection et nous avons comparé, grâce aux données trouvées dans la littérature [102-104], les IC₅₀ des concurrents vis-à-vis des autres kinases. (Tableau 6 : [67, 106-109]).

Tec family	kinase	CC-292 IC ₅₀ (nM)	BMS-986142 IC ₅₀ (nM)	M-2951 IC ₅₀ (nM)	TAK-020 IC ₅₀ (nM)	RN-486 IC ₅₀ (nM)	GDC-0853 IC ₅₀ (nM)	ACP-196 IC ₅₀ (nM)	HM-71224 IC ₅₀ (nM)
TEC	BTK	5,9	8,0	0,27	2	3,1	3	5,1	1,95
	Bmx	0,7	37	28	36	ND	14	46	0,64
	Itk	36	52	ND	320	240	ND	>1000	103
	Tec	6,2	14	167	57	64	230	93	4,57
	Txk	8,9	55	49	ND	ND	ND	38	4,69
No TEC	EGFR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>1000	4,96
	JAK3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>1000	14,6

Tableau 6 : Valeurs des IC₅₀ de certains inhibiteurs de BTK en développement dans les MAI

On constate d'après le tableau 5, que bien que le ciblage de ce résidu offre une sélectivité sur de nombreuses kinases, le spebrutinib CC-292 est un inhibiteur puissant de toutes les kinases de la famille Tec, comme indiqué dans le tableau 5. En outre, il inhibe également les kinases Blk, JAK3 et Aurora A. L'acalabrutinib ACP-196 a été décrit comme présentant une sélectivité supérieure et une puissance *in vivo* par rapport à ibrutinib. Il se lie au résidu Cys-481 de la kinase BTK mais, contrairement à ibrutinib, il n'inhibe pas Itk ou Txk kinases. [111]

Il est important de connaître les IC₅₀ des autres kinases, comme EGFR et TEC (reconnu pour être responsable des effets hors-cible de l'ibrutinib). Si les IC₅₀ des inhibiteurs sont inférieurs vis-à-vis de TEC ou EGFR par rapport à BTK une action sur ces cibles peut-être envisageable. Cependant la sélectivité *in vivo* reste une question ouverte, même si l'inhibiteur montre une grande sélectivité enzymatique *in vitro*.

b) La notion de réversibilité

La liaison entre la cible et l'inhibiteur peut conduire à l'établissement d'un lien entre elles. Ce lien peut être fort, généralement irréversible, de type liaison covalente ou plus faible, transitoire, mettant en jeu des interactions de faible énergie, c'est la liaison réversible. Les médicaments avec une action prolongée sur la cible, dû à un mode de liaison irréversible montrent souvent une efficacité supérieure. Comme nous l'avons vu, précédemment trois laboratoires ont développé des inhibiteurs de BTK avec un mode de liaison irréversible identique à l'ibrutinib. C'est le cas notamment du spébrutinib (CC-292) développé par Celgène, l'acalabrutinib (ACP-196) développé par Acerta et l'olmutinib HM-71224 développé par Hanmi. Cependant, ce type de liaison peut également provoquer des effets indésirables ou des phénomènes de résistances. Ainsi des stratégies pour l'optimisation du mode de liaison ont été développées. Nous avons identifié des inhibiteurs puissants et sélectifs BTK qui démontrent une occupation de la cible allant de quelques minutes à 7 jours. [112] comme par exemple le BMS-986142, le PRN-1008 ou M-2951. De plus leur puissance inhibitrice est supérieure à celle des inhibiteurs irréversibles.

D'autres tests cellulaires peuvent être réalisés en vue de déterminer la liaison du candidat à BTK. Comme par exemple pour un candidat inhibiteur de la BTK où la liaison de BTK a été évaluée dans des cellules B de Ramos, des PBMC humaines et des splénocytes de rat (pour des études pharmacocinétiques/pharmacodynamies PK / PD) en utilisant un dosage d'occupation basé sur la sonde fluorescente (Tableau 7 : [112]). Les effets de l'inhibiteur sur la fonction des lymphocytes B étaient généralement évalués par l'expression de CD69 de cellules B (marqueur d'activation des cellules B) dans le sang total humain (HWB) et la prolifération de cellules B primaires humaines purifiées induites par anti-IgM. De la même façon en comparant les IC_{50} des inhibiteurs vis-à-vis de CD69, il est possible de déterminer celui qui a le meilleur effet inhibiteur vis-à-vis des cellules B.

Cellular efficacy assays	
B cell activation in HWB (IC ₅₀) ¹	123 ± 38 nM
Occupancy of BTK in PBMC (HWB) (IC ₅₀) ²	233 ± 75 nM
Basophil activation in HWB (IC ₅₀) ³	490 ± 130 nM
Human primary B cell proliferation (IC ₅₀) ⁴	5 ± 2.4 nM
Human Ramos B cell occupancy (IC ₅₀) ²	8 ± 2 nM

¹Anti-IgM-induced CD69 expression on CD20+ cells after 18h following 1h incubation with cmpd.

²Occupancy was measured by binding of an irreversible fluorescent probe to unbound BTK.

³Anti-IgE-induced degranulation of basophils by CD63 expression.

⁴Anti-IgM-induced proliferation of purified human B cells after 48 h in culture.

Tableau 7 : Test d'efficacité cellulaire d'un inhibiteur de la BTK

4.1.2 Tests de pharmacologie et modèles animaux : *in vivo*

Pour la réalisation des tests pharmacologiques, différents systèmes d'essais peuvent être utilisés. Les systèmes *ex vivo* et *in vitro* peuvent comprendre les organes et tissus isolés, les cultures cellulaires, les fragments cellulaires, les récepteurs et canaux ioniques, enzymes... [113]. Quelle que soit la molécule, une partie des essais pourra être réalisée *in vitro*, mais le recours à l'animal, « système intégré », reste nécessaire pour certaines étapes. Afin de mettre en évidence l'efficacité des inhibiteurs, des tests *in vivo* ont été réalisés en utilisant des modèles animaux pertinents. Plusieurs modèles de MAI induites ont été développés chez l'animal, dans différentes espèces, en leur injectant des extraits d'organe ou des auto-Ag purifiés en présence d'adjuvant.

Le modèle le plus étudié est l'arthrite induite par le collagène de type II (Collagen Induced Arthritis CIA). Chez la souris, l'administration de collagène hétérologue (administré par voie intraveineuse) entraîne une seule poussée très destructrice, alors que l'administration de collagène autologue provoque une atteinte articulaire moins importante, mais chronique avec possibilité de poussées. Les lésions articulaires ont les mêmes caractéristiques histologiques que la polyarthrite rhumatoïde. Le modèle CIA permet de décrire plusieurs possibilités thérapeutiques dans les pathologies auto-immunes. Il est donc très souvent employé. Pour cela ils ont testé certaines souris ont été testées avec un témoin contrôle et d'autres avec les inhibiteurs de la BTK à différentes doses. Les chercheurs ont ensuite, à l'aide d'images radiologiques (Figure 15 : [112]) ou en mesurant le score clinique, pu montrer une différence significative entre les souris CIA non traitées et les souris traitées.

Joint damage prevented by treatment with PRN1008



Figure 15 : Image radiologique d'une patte de souris non traitées versus traitées par un inhibiteur de la BTK

Par exemple le composé de chez Roche GDC-0834 a été testé dans les modèles de rat de l'arthrite induite par le collagène (CIA), le traitement par voie orale GDC-0834 administré à 30-100 mg / kg a démontré un effet anti-arthrite robuste caractérisé par une réduction dose-dépendante significative de l'enflure de la cheville et accompagné d'une forte inhibition de l'autophosphorylation de BTK [114].

Pour tester l'effet de l'ibrutinib *in vivo*, les chercheurs se sont concentrés initialement sur deux modèles auto-immuns dans lesquels BTK été impliqué. Un modèle CIA : Collagene Induced Arthritis et un modèle MRL-Fas (lpr) lupus [17], [116] et [117]. Bien que des résultats ont pu être observés avec des modèles animaux de MAI, ces expériences génétiques ne permettent pas de distinguer le rôle de développement de BTK, de son rôle dans la fonction des lymphocytes B matures responsable de la production d'auto-immunité. Le traitement par ibrutinib a entraîné une diminution dose-dépendante de la manifestation de la maladie dans des modèles CIA et de lupus MRL-Fas (lpr).

Le composé RN-486 a été testé dans deux modèles murins de PR. Le composé démontre de puissants effets anti-inflammatoires, caractérisés par une réduction de la formation de pannus, des lésions du cartilage et de la résorption osseuse [118]. Il abroge également les réponses d'hypersensibilité de type I et de type III chez les rats. RN-486 supprime la sécrétion d'IgG anti-dsDNA, bloque l'expression de CD69 en réponse à la

réticulation de BCR et inhibe complètement la progression de la néphrite glomérulaire dans les modèles de souris NZB / W preneuses de lupus érythémateux systémique (SLE) [119].

Dans les modèles de souris CIA établis, le traitement avec CC-292 administré à 3, 10 et 30 mg / kg a produit une résolution dose-dépendante des signes cliniques et des caractéristiques histopathologiques de la maladie inflammatoire articulaire, y compris la réduction des gonflements et des rougeurs, et la régression de la formation de pannus [120].

Pour l'olmutinib HM-71224, l'activité antiarthritique a été démontrée dans des modèles CIA utilisant des souris DBA1 et des rats Lewis donnant une valeur ED90 calculée de 6 mg / kg / jour. [121] On a également constaté que l'olmutinib inhibait les dommages rénaux et l'infiltration des lymphocytes dans un modèle murin de SLE en utilisant des souris MRL / lpr avec la mutation de lymphoprolifération ou la souche NZB / W F1 [122].

4.1.3 Critères de jugement : notion de sécurité des études non cliniques

Avant qu'un candidat-médicament puisse être administré à l'Homme dans un essai clinique, usuellement en priorité chez des sujets volontaires sains (*i.e.*, étude de phase 1), il doit subir des tests rigoureux d'efficacité et d'innocuité dans des études non cliniques, *in vivo* chez l'animal et *in vitro*. La conférence Internationale sur l'Harmonisation (ICH) a énoncé les exigences qui doivent être satisfaites par le programme non clinique avant qu'un composé puisse être administré chez l'Homme.

Le module 3 ICH décrit plusieurs études à mener:

- des études de pharmacologie dans des modèles animaux *in vivo* ou des modèles *in vitro* de l'indication visée, légitimant ainsi l'utilisation du produit dans cette indication,
- de pharmacologie de sécurité à des doses proches des doses pharmacologiques (*i.e.*, potentiellement efficaces dans un modèle pertinent de la pathologie visée),
- de toxicologie générale utilisant des doses élevées du produit, en administration unique ou répétées selon la voie d'administration envisagée plus tard chez l'Homme (Tableau 8).

Lors de ces études, les concentrations circulantes du produit (et de ses métabolites, le cas échéant) dans le plasma des animaux est toujours mesuré ; permettant ainsi de définir les profils pharmacocinétiques et toxicocinétiques du produit (et de ses métabolites) selon que le dosage est fait dans des études de pharmacologie ou de toxicologie.

<i>Types d'études</i>	<i>Objectifs de l'étude</i>
Pharmacologie de sécurité : Etudes principales d'innocuité à des doses pharmacologiques	Evaluation des effets sur le système cardiovasculaire, l'appareil respiratoire ou le système nerveux
Pharmacologie : Etudes de pharmacodynamiques primaires	Etudes <i>in vivo</i> et/ou <i>in vitro</i> qui évaluent le mode d'action/les effets du composé candidat sur la cible
Etudes pharmacocinétiques et toxicocinétiques	Les données recueillies au cours des études <i>in vitro</i> sur le métabolisme et les données de liaison des protéines du sang pour les animaux et les humains. Données d'exposition systémiques provenant d'études de toxicologie et de pharmacologie
Etudes de toxicité aiguë	Etudes de toxicité en dose unique chez deux espèces de mammifères, mais qui peuvent être complétées en cours d'études et qui définissent une dose maximale tolérée dans les espèces étudiées pour les essais de toxicité
Etudes de toxicité en doses répétées	Varié en longueur, en fonction de la durée, de l'indication thérapeutique et du champ d'application du programme clinique. Durée minimale de 2 semaines chez deux espèces (dont l'une n'est pas un rongeur)
Autre études mise en place au cas par cas	Par exemple, étude de photo-toxicité (provoquant une réaction de la peau), lorsque celle-ci est exposée à la lumière

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des études non-cliniques nécessaires avant toute première administration chez l'Homme, et leurs objectifs

a) Les études pharmacologiques

Les études non cliniques telles que la pharmacologie de sécurité sont réalisées selon la norme de qualité la plus élevée et répondent aux exigences réglementaires internationales requises (EMA, FDA, OCDE, ICH), selon la norme ICH S7A. En revanche les études pharmacologiques/pharmacodynamiques qui permettent de mettre en évidence l'effet du produit dans un modèle de pathologie cible ne sont pas toujours réalisées conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL), car ces modèles n'existent et doivent être développés. Le plus important pour les laboratoires est de pouvoir garantir la qualité et la fiabilité des études non cliniques d'innocuité.

Afin de prédire l'effet du produit sur les différents organes, il est important de connaître l'action de sa liaison sur les récepteurs physiologiques tels que les récepteurs cholinergiques, muscariniques... Des tests sont alors réalisés en utilisant différentes méthodes comme par exemple la méthode de « binding » *in vitro*. Ce test est réalisé sur des préparations subcellulaires (par ex. les membranes). Le principe est d'alors de marquer les récepteurs par un ligand radioactif et étudier la cinétique de la réaction ligand - récepteur en suivant la quantité de ligand radioactif fixé. Ces tests permettent d'étudier la sélectivité des composés pour leur cible et s'ils ne se lieraient pas également à d'autres cibles/recepteurs pouvant engendrer ainsi des effets dits « hors-cible » qui pourraient être délétères, par exemple.

Ensuite, une batterie de tests d'évaluation pharmacologique de sécurité *in vivo* est réalisée. Son but est d'étudier les effets de la substance sur les fonctions vitales. On considère que les systèmes organiques vitaux comprennent l'évaluation des effets sur le système cardiovasculaire, le système nerveux central et les voies respiratoires. Ces tests doivent généralement être effectués avant toute administration à l'Homme, conformément aux normes ICH S7A et S7B.

- Étude du système nerveux central: l'activité motrice, les modifications du comportement, la coordination, les réactions réflexes sensori-motrices et la température corporelle. On peut, par exemple, utiliser une batterie d'observation fonctionnelles (BOF) [120], le test modifié d'Irwin [121] ou d'autres tests appropriés [122].
- Étude du système cardiovasculaire : le débit cardiaque, la contractilité ventriculaire, la résistance vasculaire, etc. sont évalués chez des animaux conscients ou anesthésiés. Il existe également des tests *in vitro* de la fonction cardiovasculaire comme le test de hERG et sur cellules de Purkinje.
- Étude de la fonction respiratoire: la résistance des voies aériennes, la pression artérielle pulmonaire, les gaz du sang, le pH sanguin [123] sont mesurés chez les animaux.

b) Les études de pharmacocinétique (PK)

Des études *in vitro* sont réalisées afin de connaître les paramètres pharmacocinétiques du composé candidat, en particulier les paramètres ADME (Absorption, Distribution,

Métabolisme, Elimination). On procède souvent à l'évaluation des principaux métabolites dans le cadre d'étude du composé d'origine chez les animaux. En effet, le métabolisme est un paramètre indispensable pour la sécurité et l'efficacité du produit surtout en ce qui concerne, le cytochrome P450 3A4. En effet, l'ibrutinib est métabolisé par le CYP3A4, or cette voie peut-être inhibée ou induite par d'autres médicaments, et modifier la concentration de l'inhibiteur. De plus, dans les MAI où le patient prend souvent plusieurs médicaments, le risque d'interactions médicamenteuses en donc largement augmenté. Ainsi ce métabolisme pourrait représenter un véritable frein au développement pour une indication en immunologie.

c) Les études de toxicité générale

Les informations concernant la toxicité aiguë sont obtenues à partir d'études de toxicité à dose unique chez deux espèces de mammifères (rongeurs : rats, souris ; et non-rongeurs : chien ou singe) en utilisant la voie d'administration parentérale. Il s'agit d'études qualitatives et quantitatives des phénomènes toxiques qui se manifestent pendant une période donnée. L'étude consiste en une administration puis une observation périodique de l'animal (consommation alimentaire, hydrique, perte de poids (1^e indice de toxicité), comportement, symptomatologie, date de la mort)) pendant 14 jours. Cette durée est variable selon l'animal, il existe des études de 4, 13, 26 et 39 semaines. Le but est de prévoir la symptomatologie après une exposition massive chez l'homme, la dose létale DL_{50} , afin de prévoir la conduite à tenir en cas d'intoxication. On réalise par la suite une autopsie afin d'effectuer des examens macroscopiques et anatomo-pathologiques des organes. Pour les produits chimiques on utilise la méthode de la dose fixée. Celle-ci nécessite une étude préliminaire avec 4 doses pré fixées, où l'on recherche la dose qui n'entraîne pas la mort mais une toxicité manifeste.

Les études en administrations répétées permettent de mimer une exposition dans le temps et donc de définir une toxicité sub-aiguë (<1 mois) ou chronique (>3mois). Ces études animales doivent avoir une durée supérieure à celle des essais cliniques chez l'humain. Les recommandations pour la durée des études de toxicité en doses répétées nécessaire pour la conduite d'un essai clinique chez l'Homme sont représentées dans le tableau 9 [124].

Durée de traitement indiqué	Rongeurs (mois)	Non-rongeurs (mois)
Jusqu'à 2 semaines	1	1
Plus de 2 semaines à 1 mois	3	3
Plus d'1 mois à 3 mois	6	6
Plus de 3 mois	6	9

Tableau 9 : Durée recommandée des études de toxicité en doses répétées, adapté de l'ICH (2009) M3 (R2)

Ces études permettent de déterminer la limite d'innocuité expérimentale que l'on appelle la NOAEL = No Observe Adverse Effect Level ou DES Dose sans Effet qui correspond à la valeur toxicologique de référence. Plus précisément, elle correspond à la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe pas d'augmentation statistiquement (ou biologiquement) significative en fréquence ou en sévérité d'un effet nocif, dans un groupe exposé à la substance par rapport à un groupe non exposé.

L'étude nécessite au moins 2 espèces (dont 1 n'est pas un rongeur : chien ou primate). Il faut au moins 3 doses (faible : concentration plasmatique, intermédiaire : moyenne, et une forte : dose maximum tolérée) plus 1 lot témoin (excipient). Une fois la NOAEL et sa zone sous la courbe AUC défini pour les deux espèces, on se réfère à l'échelle en utilisant une allométrie simple sur la base de la surface corporelle pour obtenir la «dose équivalente chez l'homme» (HED) (USA FDA 2005). Ceci permettra ainsi de définir la marge de sécurité thérapeutique du composé.

d) La génotoxicité

Un test de mutation génétique est généralement considéré comme suffisant pour soutenir un essai de développement clinique. Le but de ces tests est alors de prédire la cancérogenèse et les atteintes de l'ADN. Ce sont des tests *in vitro* et *in vivo* parmi lesquels on trouve: le test d'Ames et le test du micronoyau. Le test d'Ames est un test biologique permettant de déterminer le potentiel mutagène d'un composé. Il consiste à examiner si le composé est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de bactéries (*Salmonella typhimurium* modifiées). Les souches utilisées dans le test sont des souches porteuses d'une mutation (His+). Cette mutation rend les souches incapables de pousser dans un milieu sans histidine.

Ces différentes études doivent impérativement être réalisées avant de pouvoir être testées chez l'Homme. Une fois ce dossier non clinique complété et si les résultats obtenus sont compatibles avec une première administration chez l'Homme en contrôlant les risques potentiels, le développement clinique s'effectue en plusieurs phases :

- La phase I : permet de définir la tolérance du produit. Elle est réalisée dans des petits effectifs de sujets sains (sauf dans le cas où le produit ne peut être administré chez l'homme sain, comme par exemple en oncologie). L'accent est mis tout d'abord sur les études de l'homme avec :
 - une dose ascendante unique et une dose croissante multiple identifiant la tolérance, y compris la dose maximale tolérée (MTD) et la sécurité.
 - ainsi que les propriétés pharmacocinétiques (PK) du composé testé. Les études initiales sont souvent suivies par d'autres études de PK telles que la biodisponibilité, la bioéquivalence, la formulation ou les études ADME radiomarquées
- La phase II : définit la relation dose-effet. Elle se réalise sur un petit groupe de patients très sélectionnés afin d'éviter la variabilité de la réponse pour chaque dose étudiée. En revanche celle-ci est plus longue que la phase I, et peut durer 2 ans, selon les indications visées. On parle également de phase IIa ou d'étude de preuve de concept (PoC)
- La phase III : étude pivot, permet une démonstration d'efficacité et de tolérance dans la population cible afin de déterminer le ratio bénéfice/risque du médicament. Il s'agit d'une étude à grande échelle sur la population cible, qui effectue une comparaison du produit versus placebo ou du traitement de référence. A l'issue de cette phase, il y aura une la demande d'AMM
- Des études de phase IV post-AMM : pouvant avoir différents objectifs, principalement la réévaluation régulière du ratio bénéfice/risque (i.e., suivi des effets secondaires survenus en dehors d'essais cliniques et maintien de l'efficacité).

4.2 Exemples de résultats cliniques

Six inhibiteurs BTK sont actuellement en développement clinique dans la PR, un septième est actuellement en développement dans les troubles immunitaires. Ceux-ci englobent à la fois des inhibiteurs irréversibles et réversibles comme le montre le tableau 10. Les plus avancés de ces six inhibiteurs progressent uniquement dans les études de phase IIa. Des études courtes avec spebrutinib (CC-292) et acalabrutinib (ACP-196) ont commencé en octobre 2013 et avril 2015, respectivement, alors qu'une étude similaire avec M-2951 a débuté au premier semestre de 2016, d'après le site clinicaltrials.gov (Tableau 10 : [124]). En conséquence, il n'existe aucune donnée d'efficacité clinique disponible pour l'un de ces inhibiteurs dans la PR.

Drug	Developer(s)	Action	Status	Clinical trial
Spebrutinib	Celgene	Irreversible	Phase IIa	NCT01975610
Acalabrutinib	Acerta	Irreversible	Phase IIa	NCT02387762
M-2951	Merck KgAa	Not reported	Phase IIa (2016)	NCT02537028
Olmutinib	Hanmi, Eli Lilly	Irreversible	Phase I	NCT01765478
PRN-1008	Principia	Reversible	Phase I	Not listed
TAK-020	Takeda	Reversible?	Phase I	NCT02413255
BMS-#	Bristol-Myers Squibb	Reversible	Phase I	Not listed

Tableau 10 : Les inhibiteurs de BTK en développement clinique pour le traitement de la PR

- Le Spebrutinib : CC-292

Le spebrutinib est un inhibiteur de BTK irréversible à l'origine développé par Avila Therapeutics et c'était le médicament le plus avancé dans le pipeline de l'entreprise lorsque Avila a été acquis par Celgene en 2012. Spebrutinib a été le premier inhibiteur de BTK à progresser dans une étude de phase II dans la polyarthrite rhumatoïde. Une étude de phase IIa de 80 patients et 4 semaines a débuté en octobre 2013 chez des patients stables traités par méthotrexate. Cette étude administre spebrutinib deux fois par jour, avec 250 mg administré le matin et 125 mg dans la soirée. En plus de cette étude, quatre études de phase précoce sont en cours de lymphome et une étude initiale de phase I a été achevée.

- L'acalabrutinib : ACP-196

L'acalabrutinib est un inhibiteur de BTK irréversible de deuxième génération conçu par Acerta Pharma qui est principalement développé pour les indications d'oncologie. À partir de janvier 2016, vingt études cliniques sur les indications oncologiques sont listées pour ce médicament à partir des données clinical.gov. La seule étude sur l'arthrite rhumatoïde a

débuté en avril 2015, chez 70 patients traité par méthotrexate. L'étude a comparé une dose unique d'acalabrutinib au placebo et s'est terminée en janvier 2017. Aucune donnée préclinique n'a été rapportée sur les effets de l'acalabrutinib dans les modèles de polyarthrite rhumatoïde ou d'autres maladies auto-immunes.

- M-2951

Merck KgAa développe deux inhibiteurs BTK. M-2951 (MSC2364447C) est le plus avancé pour les indications auto-immunes, avec un composé différencié, M-7583, développé pour les indications d'oncologie. En octobre 2015, la société a indiqué que les études initiales de phase I, de M-2951, avaient été complétées. Une étude de phase Ib lupus érythémateux systémique (SLE) a commencé en octobre 2015 avec une étude de phase IIa dans la polyarthrite rhumatoïde commencée au premier semestre de 2016. Les seules données publiées à ce jour par Merck sur cet inhibiteur proviennent d'une présentation corporative de 2014 [126]. Ces données ont montré que le M-2951 avait une sélectivité kinase beaucoup plus élevée qu'un composé concurrent sans nom (probablement ibrutinib) et qu'il produisait une inhibition des symptômes associée à la dose, à des doses de 0,1-30 mg / kg, dans des modèles murins de polyarthrite rhumatoïde et lupus. Le M-2951 a également montré une sélectivité pour les effets sur des cellules B et T en utilisant le système de profilage BioMAP

- L'olmutinib : HM-71224

Hanmi développe l'inhibiteur BTK olmutinib pour le traitement des troubles auto-immuns. En mars 2015, Hanmi a signé un accord de codéveloppement avec Eli Lilly avec cette dernière autorisant les droits de tous les marchés en dehors de l'Extrême-Orient. Une étude de phase I avait été achevée en novembre 2014. Les études de phase II dans la PR ont été décrites comme imminentes en juin 2015 mais doivent encore être annoncées. Les études de phase I ont montré que l'olmutinib est bien toléré lorsqu'il est administré une ou deux fois par jour sur 14 jours (10-120 mg q.d. ou 5-60 mg b.i.d.) avec des effets indésirables seulement à des doses ≥ 80 mg q.d. Olmutinib a montré une bonne absorption et a produit $> 90\%$ d'occupation de BTK à 20 mg b.i.d. [127].

- Le PRN-1008

Le PRN-1008 de Principia est un inhibiteur BTK covalent, mais réversible, qui a complété avec succès une étude de phase I en 2015. En janvier 2016, la société a annoncé qu'elle initiait une étude de phase II de 3 mois dans la maladie orpheline pemphigus vulgaris. Elle a également indiqué son intention de développer le PRN-1008 pour d'autres maladies auto-immunes. Ceux-ci incluent probablement la PR puisque la société a signalé des données *in vivo* avec PRN-1008 dans des modèles animaux d'arthrite. Les études de phase I ont montré que 90% de couverture cible étaient atteintes avec des doses ≥ 300 mg. [128] PRN-1008 a été bien toléré à des doses allant jusqu'à 600 mg q.d. ou 450 mg b.i.d.

- Le TAK-020

Le TAK-020 de Takeda a commencé une étude de phase I de 88 cas en avril 2015, avec une date d'achèvement programmée en février 2016. Takeda a indiqué que la PR est l'indication préférée mais n'a encore révélé aucune autre information sur le TAK-020. Les données disponibles sont celles qui figurent dans deux demandes de brevet et deux présentations de réunion.

- BMS-986142

Bristol-Myers Squibb poursuit l'identification d'inhibiteurs de BTK réversibles pour le traitement des MAI et décrit une série de composés à base d'un scénario de purines, suite à des dépôts de brevets par d'autres revendiquant des dérivés d'imidazo [1,2-a] pyrazine. [14] En décembre 2014, un inhibiteur de BTK non identifié avait débuté des études de phase I pour une indication non précisée.

5 Discussion

L'objectif de cette évaluation était de comparer les résultats obtenus avec différents inhibiteurs de la BTK développés par différents laboratoires pharmaceutiques. La première étape de ce travail fut d'évaluer l'intérêt potentiel du développement d'inhibiteurs de BTK dans le traitement de maladies auto-immunes. L'analyse des données non-cliniques et cliniques des inhibiteurs de BTK actuellement en développement, ont mis en évidence la difficulté qu'il existe pour développer des traitements pour des maladies chroniques par opposition aux états aigus engageant un pronostic vital tels que les cancers. En effet l'estimation de la balance bénéfice-risque est totalement différente.

En langue anglaise, on trouve parfois l'expression "harm-benefit balancing" [129]. Elle peut être traduite par "comparaison des inconvénients et des avantages", ce qui est plus pondéré que l'expression "balance bénéfices-risques"; en français, un "bénéfice" est considéré *a priori* comme réel et avéré, alors qu'un "risque" est ressenti comme virtuel et hypothétique (128). L'une des étapes dans la détermination de la balance bénéfices-risques consiste à évaluer l'efficacité de la molécule dans des essais cliniques bien conduits.

5.1 L'évaluation de l'efficacité

La balance bénéfice-risque est évaluée chez l'homme. Le bénéfice regroupe tous les critères primaires et secondaires définis dans les essais cliniques permettant de conclure à un bénéfice du produit pour le traitement de la pathologie visée. [131-133].

5.1.1 Démonstration pharmacologique *in vitro*

Dans les données reportées, la majorité des laboratoires pharmaceutiques développant des inhibiteurs de BTK ont démontré l'efficacité de leur candidat dans un premier temps sur des modèles *in vitro*. Par exemple, des tests cellulaires ont été réalisés en vue de déterminer la liaison du candidat à BTK, comme par exemple pour le PRN-1008 où la liaison de BTK a été évaluée dans des cellules B de Ramos, des PBMC humaines et des splénocytes de rat. Tous les candidats ont déterminé leur IC_{50} , pour démontrer celui qui avait le meilleur effet inhibiteur. La plupart des IC_{50} des candidats sont compris entre 2 et 8nM, seul un candidat, le M-2951 de Merck révèle une puissance plus importante avec une IC_{50} de 0,27nM.

Au terme de ces résultats un premier classement positionnait le M-2951, comme celui qui avait l' IC_{50} la plus faible et donc l'inhibition de BTK la plus forte. Cependant, de telles

mesures ne sont pas suffisantes pour établir la puissance de ces inhibiteurs car ils dépendent de la durée d'incubation entre la protéine et l'inhibiteur. Par conséquent, la plus grande prudence est de rigueur lorsque l'on compare les IC₅₀ des différents inhibiteurs.

5.1.2 Démonstration pharmacologique *in vivo*

L'autre preuve, utilisé par les laboratoires pour démontrer l'efficacité de leurs molécules était de montrer leur bénéfice sur des modèles CIA. Que ce soit, l'ibrutinib, le GDC-0834, le CC-292, M-2951 ou HM-71224, tous ont pu montrer un effet anti-arthrite robuste caractérisé par une réduction dose-dépendante significative de l'enflure de la cheville et accompagné d'une forte inhibition de l'autophosphorylation de BTK.

Les modèles animaux d'arthrite auto-immune se sont révélés être des outils de recherche précieux pour l'étude des mécanismes pathogènes de cette maladie ainsi que pour tester de nouvelles thérapies. Chez la souris, les symptômes de la CIA commencent vers le jour 21 après la vaccination, les articulations affectées ont des conséquences dévastatrices. La synoviale normalement hypocellulaire devient infiltrée avec des cellules immunitaires (cellules T, cellules B, macrophages et neutrophiles). Cela conduit à la formation d'un pannus, une membrane hyperplasique de synoviocytes qui présente un caractère invasif en tissu, ciblant l'os et le cartilage. Beaucoup d'auteurs considèrent le modèle CIA comme une maladie auto-immune spécifique à l'antigène (principalement) dans laquelle les auto-anticorps et / ou les lymphocytes T jouent un rôle prédominant [134]. Les modèles variant à l'aide de l'adjuvant de Freund nous ont appris qu'en fait, ces effets systémiques de l'adjuvant, en particulier la myélopoïèse accrue, revêtent une importance cruciale pour provoquer des changements inflammatoires destructifs dans les articulations. Une partie de la réaction systémique est provoquée par des signaux «dangereux» présents dans l'adjuvant, de sorte que dans sa phase initiale, la CIA pourrait être considérée comme une maladie auto-inflammatoire plutôt que auto-immune. [135]. Par conséquent, les bénéfices démontrés dans ce type de modèles animaux ne sont pas toujours pertinents pour des pathologies auto-immunes, comme le LES, la sclérodermie, ou le syndrome de Gougerot Sjögren.

En ce qui concerne l'auto-immunité, on a récemment signalé que BTK contrôle le phénotype autoréactif des cellules B chez la souris, que sa surexpression *in vivo* conduit à une auto-immunité systémique et qu'aucun anticorps anti-ADN double (anti-ADND) n'est présent chez les souris déficients en BTK [136], ce qui rend la BTK une cible attrayante pour le

traitement de la néphrite lupique. Certains groupes pharmaceutiques ont alors cherché à montrer leur efficacité sur des modèles auto-immuns. On pense actuellement que la pathogénie du LES chez l'homme et chez la souris implique la génération d'auto-anticorps qui forment des complexes immuns qui se déposent dans les tissus et provoquent l'inflammation et les dommages aux organes [137,138].

Une étude a analysé l'effet thérapeutique du RN486, un inhibiteur hautement sélectif de BTK, sur la progression de la maladie dans un modèle murin NZB / NZW, un syndrome du lupus semblable au LES humain. Les souris NZB / NZW ont des défauts de cellules B intrinsèques et un nombre accru de cellules sécrétrices d'anticorps, accompagnée d'une diminution de la migration des cellules plasmatisques vers la moelle osseuse [139, 140]. Le traitement avec un agent appauvrissant les cellules B le RN-486, prolonge la survie et retarde l'apparition de la protéinurie dans ce modèle [141]. Cependant, au niveau rénal (notamment l'infiltration et l'activité des cellules mononucléaires), l'étude révèle des résultats médiocres chez l'homme et la souris [142-144] et donc remet en question la possibilité d'être affecté par l'inhibition de BTK.

Bien que le blocage de BTK n'ait pas encore été testé dans le lupus humain, son effet bénéfique dans le modèle de lupus MRL de souris a déjà été rapporté en particulier avec l'ibrutinib [24], même si le mécanisme d'action n'a pas été exploré en détail.

Enfin, le candidat qui semble le plus puissant est le candidat de Merck, car il a réussi à déterminer l'efficacité thérapeutique de son candidat sur deux modèles de lupus de souris. Chez les souris BXSB-Yaa lupus, l'inhibition de BTK a réduit les auto-anticorps, la néphrite lupique ainsi que la mortalité. Dans un autre modèle de lupus pristane-DBA/1 l'inhibition de BTK a permis de supprimer l'arthrite mais le taux d'auto-anticorps n'a pas été significativement affecté. [145]. Étant donné l'hétérogénéité des symptômes du lupus et de sa pathogénèse, ces modèles précliniques ne représentent pas tous les sous-groupes de patients lupiques, il y a donc un manque de connaissance sur la façon dont l'inhibition de la BTK peut affecter la maladie.

En pratique, déterminer l'efficacité d'un traitement à l'aide d'un critère intermédiaire ne garantit pas son utilité pour les patients. Par exemple, des essais cliniques ont montré que

chez les patients diabétiques de type 2, les gliptines diminuent la glycémie plus qu'un placebo [139]. Mais en 2014, rien ne prouve que ces médicaments diminuent les risques de complications graves du diabète, ni qu'ils allongent la durée de vie. En somme, rien ne prouve qu'ils apportent un réel bénéfice pour les patients diabétiques [139,140]. Ainsi, la simple preuve de diminution du gonflement de l'articulation de la patte des souris ne permet pas de montrer le réel bénéfice que pourrait apporter les inhibiteurs de BTK, sur des patients atteints de PR par exemple.

Pour conclure, bien que les démonstrations pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux aient démontré leur efficacité sur certains modèles, la relevance de ces modèles pour des pathologies auto-immunes n'est pas parfaite. Mais parfois, les critères d'évaluation intermédiaires sont à prendre en compte, faute de mieux, et à condition que des éléments concordants aillent dans le sens d'un lien entre ces critères et des bénéfices cliniques concrets [136]. Mais la démonstration d'une efficacité sur un critère clinique pertinent vaut toujours mieux qu'une démonstration d'efficacité sur des critères intermédiaires.

5.2 L'évaluation de la sécurité

Les critères de jugement, en particulier l'évaluation des effets indésirables et des interactions médicamenteuses est une autre étape clé dans la détermination de la balance bénéfices-risques pour le développement d'un médicament [18]. On utilise plutôt l'expression « balance » au lieu de « rapport » car le mot “rapport” évoque une donnée mathématique, scientifique, tandis que le mot “balance” souligne concrètement qu'il s'agit de peser le pour et le contre, les avantages et les inconvénients pour chaque patient, sans préjuger du résultat.

En ce qui concerne le risque d'interaction, il est important de connaître le profil ADME des candidats. En effet, on sait d'après le RCP de l'ibrutinib que cet inhibiteur présente un métabolisme de type CYP3A4. On sait qu'il existe un grand nombre de médicaments interagissant avec ce type de métabolisme. Or les maladies chroniques nécessitent souvent une polymédication, augmentant ce risque d'interactions. Il est donc préférable de développer des inhibiteurs ne possédant pas ce type de métabolisme ou ayant au moins une voie alternative avec par exemple un métabolisme de type CYP2C8. Ce type d'informations n'était pas fourni par les données de la littérature, pour nos différents candidats, il était donc difficile de juger sur leur profil de sécurité.

L'autre préoccupation, concerne l'étude de toxicité et plus particulièrement la détermination des NOAEL lors des études de toxicologie chez l'animal afin de pouvoir déterminer des doses chez l'Homme conduisant à une efficacité thérapeutique combinée à des marges de sécurité acceptables pour les patients.. Une fois encore, ne disposant pas des données des études de toxicologie pour ces produits, aucune information n'a pu être rapportée sur ce sujet, il est donc difficile de comparer les différents candidats en utilisant ce critère.

5.3 L'évaluation de la sélectivité et de la réversibilité

Le développement des inhibiteurs de BTK dans les MAI nécessite des exigences beaucoup plus strictes, en particulier, d'un point de vue de la sélectivité à la cible afin d'éviter des effets délétères « hors-cible ». En effet, les effets secondaires considérés comme acceptables avec un inhibiteur d'une même cible pharmacologique pour le traitement d'un cancer, le seraient beaucoup moins pour le traitement chronique d'une MAI. La sélectivité et la réversibilité d'un inhibiteur de BTK peuvent conditionner son profil de sécurité. Ainsi, comme de nombreux inhibiteurs de la BTK en cours de développement sont des inhibiteurs irréversibles, la sélectivité peut-être une cause importante de préoccupation. Les maladies telles que la PR et le LES nécessitent habituellement un dosage chronique et une marge de sécurité élevée, favorisant des médicaments hautement sélectifs avec des effets hors cible minimes. Or, de nombreux inhibiteurs de BTK ciblent le même résidu de cystéine que d'autres kinases, il est donc très difficile d'obtenir une sélectivité limitant les effets hors cible.

Tout comme pour l'engagement de la cible, la sélectivité des différents inhibiteurs est démontrée par leur IC_{50} envers les autres kinases. Le plus grand défi est de concevoir de nouvelles stratégies pour améliorer la sélectivité des inhibiteurs. La manière la plus évidente pour atteindre cet objectif est d'améliorer la puissance de l'inhibiteur grâce à l'optimisation de la liaison réversible (K_i) et de l'efficacité de la formation de la liaison covalente (k_{inact}). La plus grande prudence est de rigueur lorsque l'on compare les IC_{50} des différents inhibiteurs. La méthode la plus appropriée pour évaluer l'inhibition est la « spécificité constante » k_{inact}/K_i . plus cette valeur est élevée, plus l'inhibition sera efficace [102].

En plus d'inhiber la BTK et les kinases liées à la famille Tec, l'ibrutinib cible des kinases plus éloignées, y compris EGFR, MKK7, ITK et JAK3, qui ont une cystéine équivalente à BTK. En utilisant, l'ibrutinib comme référence, les différents laboratoires ont développé des inhibiteurs de BTK ayant le moins d'action sur les autres kinases, comme Tec ou EGFR

[21]. D'après les données de la littérature, le candidat le plus sélectif était l'ACP-196, un inhibiteur de BTK de deuxième génération irréversible. Il a une spécificité cible améliorée et une puissance accrue pour BTK grâce à une IC_{50} plus faible que l'ibrutinib. De plus il s'est montré plus intéressant que ce dernier en raison de l'activité réduite hors cible sur EGFR, TEC. Cependant, ces résultats n'étaient que des résultats *in vitro*, et une sélectivité *in vivo* aurait été préférable [102].

En outre, il est intéressant de savoir si la haute sélectivité de ces inhibiteurs est réellement un atout et si le fait que l'inhibiteur soit capable d'agir sur plusieurs kinases n'est pas en lien avec son efficacité sur la cellule B. Aujourd'hui certains laboratoires développent des inhibiteurs ciblant deux kinases comme par exemple BTK et JAK [147].

L'autre incertitude, est de savoir si la réversibilité est un point clé pour le développement de médicaments destinés aux MAI. La modification irréversible des cystéines hors cible peut être particulièrement problématique dans les tissus exposés à des concentrations élevées après administration orale, comme le tractus gastro-intestinal et le foie. En éliminant la possibilité d'une liaison irréversible aux protéines hors cible, une molécule covalente réversible peut réduire le risque de réactions pharmacologiques idiosyncratiques et peut donc être plus sûre qu'un inhibiteur irréversible analogue [102]. Cependant, une étude a montré que les inhibiteurs covalents réversibles se liant au résidu cystéine de la BTK, pouvaient avoir des temps de séjour de quelques minutes à plusieurs jours. Pour le cas où l'on souhaite un temps de séjour prolongé sur une cible, les inhibiteurs covalents réversibles peuvent imiter l'activité à long terme d'inhibiteurs irréversibles, avec des taux de dissociations *in vivo* qui se rapprochent du taux de dégradation de la cible et de re-synthèse [102]. Il est donc essentiel de savoir, quel est le taux de renouvellement de la kinase et dans quelle mesure le risque de résistance peut apparaître pour savoir si la réversibilité est véritablement un avantage pour le développement d'inhibiteurs de BTK à visée immunologique.

On s'attend à ce que, parallèlement aux résultats chez la souris, et également chez l'homme, l'expression de la protéine BTK varie lors de l'activation des cellules B. Cependant, à l'heure actuelle, on ne sait pas si la protéine BTK est exprimée différemment dans les diverses sous-populations de cellules B du sang périphérique ou si son expression ou son

activité est augmentée dans les cellules B présentes dans les tissus enflammés dans le contexte de l'auto-immunité [51].

L'estimation de la balance bénéfico-risque dans le développement d'un médicament est un élément central de la décision médicale. Elle n'est pas immuable. Dans chaque situation clinique, de nouveaux éléments scientifiques apparaissent au fil du temps. Ces éléments concernent l'efficacité ou les effets indésirables. Il est donc indispensable de réévaluer en permanence la balance bénéfico-risque des médicaments en développement, au vu des nouvelles données d'efficacité et de sécurité du produit (PK et risque d'interactions médicamenteuses, données précliniques et cliniques) afin de confirmer régulièrement que ce ratio reste positif.

Il faut donc retenir que quel que soit le candidat médicament, l'évaluation se fait toujours selon un cahier des charges précis et plus ou moins standard. L'évaluation du ratio bénéfico-risque reste déterminante et se base sur l'ensemble des données disponibles au cours du développement et après la mise sur le marché. Par exemple, certains critères peuvent être considérés comme des problèmes de sécurité en préclinique, mais ces données peuvent être suivies en clinique, ou encore le risque d'interaction peut être grand mais la marge de sécurité suffisante.

Pour conclure sur notre travail d'évaluation, on a pu montrer que les différents candidats, qu'ils soient irréversibles (comme l'ACP-196, ou HM-71224) ou réversibles (M-2951) ont montré leur efficacité sur des modèles plus inflammatoires qu'immunitaire. Le composé de Merck M-2951 est celui qui présente la sélectivité la plus forte, mais comme nous l'avons dit seules les données cliniques comptent. Or pour l'instant ce composé n'est qu'en phase 2, et ces résultats sont attendus pour septembre. Il faut donc attendre les résultats de la clinique afin de voir si les problèmes de sécurité rencontrés avec d'autres inhibiteurs comme, le CYP3A4, ou des NOAEL et des données non-cliniques peu rassurantes permettent d'aboutir à une balance.

6 Conclusion

L'arrivée de thérapie plus ciblée a modifié la prise en charge de certaines MAI, comme les anti-TNF (rituximab) dans le traitement de la PR, ou le mycophénolate mofétil CellCept[®], utilisé en traitement dans le LES. Cependant, tous ces agents nécessitent une administration par injections périodiques contraignantes pour le patient et un besoin médical non couvert à ce jour demeure pour les patients atteints de MAI. Le développement d'inhibiteurs de kinases, petites molécules administrées par voie orale, élargirait l'arsenal thérapeutique potentiel pour les patients et offrirait l'opportunité d'un traitement plus commode.

L'activation des lymphocytes B est un processus complexe impliquant une transduction de signal dépendante de BTK, initié par la stimulation de BCR. Les inhibiteurs de BTK se présentent comme une approche thérapeutique très intéressante, du fait de leur capacité à cibler les cellules B, responsable de production d'auto-anticorps, ainsi que les cellules myéloïdes médiatrices de l'inflammation. Le développement du premier inhibiteur de la BTK en oncologie, l'ibrutinib a permis de révolutionner le traitement de la LLC, le LCM et les lymphomes à cellules B. Il a été montré que l'ibrutinib était un inhibiteur de BTK puissant, sélectif et irréversible qui bloque la signalisation en aval du BCR dans les cellules B humaines. Malgré sa grande efficacité, la recherche s'oriente aujourd'hui vers des inhibiteurs de seconde génération, comme l'acalabrutinib (ACP-196) visant à améliorer le profil de sécurité et donc le nombre d'effets indésirables. Cependant, aucun résultat clinique n'a démontré leur supériorité dans le traitement des tumeurs malignes. L'ibrutinib, reste donc aujourd'hui, le seul inhibiteur de BTK ayant une AMM dans ces indications. L'ibrutinib a également montré des données très prometteuses dans des modèles animaux d'arthrite avec des modèles CIA rongeurs mais aussi sur des modèles lupiques BXSB-Yaa et pristane DBA/1. Ces études confirment donc que la régulation pharmacologique de la BTK peut constituer une nouvelle stratégie thérapeutique efficace dans le traitement des maladies auto-immunes telles que la PR et le LES.

Un grand nombre de laboratoires pharmaceutiques se sont donc lancés dans le développement d'inhibiteurs de BTK à visée immunologique. Bien que la plupart sont en développement clinique dans la PR, certains ont été signalés comme étant actuellement en développement clinique pour d'autres troubles immunitaires. L'olmutinib (HM-71224),

développé par Hanmi, est actuellement en phase 2 dans la PR. Le composé de Roche/Genentech, GDC-0853 est en phase 2 dans la PR et dans le LES. Bristol Myers Squibb effectue une étude de phase 2 pour son inhibiteur BMS-986142 dans la PR. Merck a terminé une étude phase 1b dans le LES avec M-2951 et réalise également une étude de phase 2a dans la PR. La société Principia a annoncé en janvier 2016 qu'elle entreprenait une étude de phase 2 de 3 mois sur la maladie orpheline Pemphigus vulgaris et a indiqué son intention de développer son inhibiteur PRN-1008 dans d'autres MAI.

Cependant les développements d'inhibiteurs de BTK dans les MAI, est beaucoup plus exigeant que pour un développement en oncologie. En effet, la balance bénéfice-risque nécessite un cahier des charges précis basé principalement sur les données d'efficacité et de sécurité du produit. Ainsi, les différents composés ont tous tenté de montrer leur efficacité sur des données *in vitro* et *in vivo* en utilisant des modèles animaux. La sécurité du produit à quant à elle était démontrée en misant sur la sélectivité de leur inhibiteur vis-à-vis de la cible BTK. Un produit plus sélectif, réduirait le risque d'effet hors cible et donc les effets indésirables causés par ces cibles. Certains laboratoires ont également cherché à se différencier de l'ibrutinib, en misant sur un mode de liaison réversible plutôt qu'irréversible. Les effets observés semblent comparables entre un inhibiteur réversible ou irréversible.

Au delà des aspects de sécurité qui sont pris en compte lors du développement d'un produit dès le stade préclinique, seules les données cliniques permettent de définir si le produit présente une balance bénéfice-risque positive. Or, à ce jour, aucune preuve clinique n'a encore été apportée pour démontrer l'efficacité de l'inhibition de la BTK chez des patients atteints de MAI. Bien que son efficacité soit reconnue pour les patients atteints d'hémopathies à cellules B, il est important de souligner que le comportement de cellules B leucémiques et celui des cellules B dans les pathologies auto-immunes est différent. Il est donc difficile de transposer l'efficacité de cette thérapie pour des pathologies aussi complexes que les MAI, étant donné l'hétérogénéité des symptômes et de la pathogenèse.

En l'absence de données cliniques positives avec un inhibiteur de BTK, il n'est pas possible de dire si ces nouvelles thérapies sont en mesure de concurrencer les thérapies actuelles. Au vu de l'état de développement actuel des inhibiteurs de la BTK, il est peu probable que nous soyons en mesure de répondre à ces questions avant fin 2017. Malgré tout, le nombre d'inhibiteurs ainsi évalués et leur diversité augmentent les chances d'obtenir des

réponses claires. De plus l'évaluation de l'inhibition de BTK dans les différentes études précliniques a apporté de nouvelles informations sur les mécanismes de la pathogenèse et en outre ces résultats ont permis une caractérisation accrue des modèles CIA ou lupiques qui peuvent faciliter leur utilisation dans les futures études thérapeutiques.

Cette étude a permis de mettre en évidence, que bien que l'inhibition de la BTK soit une cible très intéressante dans les pathologies à cellules B, il est essentiel de garder à l'esprit qu'il est très difficile de développer des médicaments dans des MAI. Ces pathologies, bien qu'handicapantes, ne mettent pas en jeu le pronostic vital immédiat des patients, contrairement à certains cancers. Le risque encouru doit donc être beaucoup plus faible, la sécurité du médicament doit être maximale, et le bénéfice doit être supérieur aux thérapies actuelles. Les inhibiteurs de BTK n'ont pas encore démontrés cette efficacité clinique chez des patients atteints de MAI. Une nouvelle piste pourrait être envisagée quant à la sélectivité des inhibiteurs. L'efficacité des inhibiteurs de BTK dans les MAI, devraient-ils uniquement agir sur les cellules B et épargner les cellules T ? Le composé de Merck M-2951, a montré une sélectivité pour les effets des cellules B et T [146]. Cela a conduit un intérêt considérable pour le développement d'inhibiteurs ciblant plusieurs kinases en plus de BTK, avec par exemple des associations avec JAK [147, 148].

Références bibliographiques

- [1] Balagué C, Kunkel SL, Godessart N et al. «Understanding autoimmune disease : new targets for drug discovery » *Drug Discov Today*. (2009); 926-934.
- [2] Steinman L, Merrill JT, McInnes IB et al. « Optimization of current and future therapy for autoimmune diseases » *Nature Med* (2012); 59–65
- [3] Grant SK «Therapeutic protein kinase inhibitors » *Cell Mol Life Sci*. (2009); 1163-1177
- [4] Dar AC and Shoka KM « The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling » *Annu Rev Biochem*. (2011); 769–795
- [5] Akinleye A, Chen Y, Mukhi N et al. « Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development » *J Hematol Oncol*. (2013);59.
- [6] Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ et al. « Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia » *Cell*. (1993); 279-290
- [7] Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P et al. « The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. 1993 » *J. Immunol* (2012) ; 2948-2955
- [8] Aoki Y, Isselbacher K.J, Pillai S et al. « Bruton tyrosine kinase is tyrosine phosphorylated and activated in pre-B lymphocytes and receptor-ligated B cells » *Proc. Natl. Acad Sci* (1994);10606– 10609.
- [9] Kawakami Y, Kitaura J, Hata D et al. « Functions of Bruton’s tyrosine kinase in mast and B cells ». *J Leukoc Biol*. (1999); 286–290
- [10] Satterthwaite AB, Li Z, Witte ON et al. « Btk function in B cell development and response ». *Semin Immunol*. (1998) ; 309–316
- [11] Uckun FM. « Bruton’s tyrosine kinase (BTK) as a dual-function regulator of apoptosis » *Biochem Pharmacol*. (1998) ; 683–691
- [12] Aalipour A and Advani RH « Bruton’s tyrosine kinase inhibitors and their clinical potential in the treatment of B-cell malignancies : focus on ibrutinib » *Ther Adv Hematol* (2014) ; 121-133
- [13] Mahajan S, Ghosh S, Sudbeck EA et al. « Rational Design and Synthesis of a Novel Anti-leukemic Agent Targeting Bruton’s Tyrosine Kinase (BTK), LFM-A13 [α -Cyano- β -Hydroxy- β -Methyl-N-(2,5-Dibromophenyl)Propenamide] ». *J Biol Chem* (1999)

- [14] Pan Z, Scheerens H, Li SJ et al. « Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase ». *Chem Med Chem.* (2007) ; 58-61
- [15] Kutsch N, Marks R, Ratei R et al. « Role of tyrosine kinase inhibitors in indolent and other mature B-cell neoplasms » *Biomark Insights* (2015) ; 15-23
- [16] Puri KD, Di Paolo JA, Gold MR et al. « B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies » *Int Rev Immunol* (2013): 397- 427
- [17] Honigberd LA, Smith AM, Sirisawad M et al. “The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy” *Proc Natl Acad* (2010) ; 13075-13080
- [18] Strandford S, Owen J, Punt J et al. “Immunologie -7e edition: Le cours de Janis Kuby. » (2014); 1-536
- [19] Steinmetz, M. and L. Hood “Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man » *Science* (1983) ; 727-33.
- [20] Mouquet H, Berrih-Aknin S, Bismuth J et al. «Expression of pemphigus-autoantigen desmoglein 1 in human thymus » *tissue Antigens* (2008) ; 464-470
- [21] Goldsby RA “Immunologie” le cours de Janis Kuby, Dunold ed. (2000)
- [22] Charles A and Janeway “Immunobiology-the immune system in health and disease” 6th edition, Garland Science Publisher (2005)
- [23] <https://www.univ-rennes1.fr/actualites/etude-epigenetique-des-lymphocytes-b-eclairer-lorigine-des-lymphomes>
- [24] Pullen A.M., Marrack P, Kappler JW et al. “The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens”. *Nat Immunol* (1988) 796-801
- [25] Shigekazu N and Takashi S « Fas and Fas ligand : lpr and gld mutations » *Nat Immunol* (1995); 39-43
- [26] Maureen A, McGargill, Jens M et al. “Receptor editing in developing T cell” *Nat Immunol* (2000) 336-341
- [27] Hogquist, KA, Baldwin TA, Jameson Sc et al.”Central tolerance: learning selfcontrol in the thymus”. *Nat Rev Immunol*, (2005); 772-82.
- [28] Turley EA, Noble PW, Bourguignon L et al. “Signaling properties of hyaluronan receptors” *J Biol Chem* (2002) ; 4589-4592

- [29] Karube K, Oshima K, Tsuchiya T et al. «Expression of FoxP3, a key molecule in CD4+, CD25+, regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells » *Br J Haematol* (2004); 81–84
- [30] Goodnow CC, Sprent J, Fassekas B et al. « Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity » *Nature* (2005); 590–597.
- [31] Bouaziz JD, De Masson A, Le Buanec H et al. “Lymphocyte B regulateur: état des connaissances” *Med Sci* (2014) ; 721-50
- [32] Blair PA, Norena Y, Eherenstein MR et al. « Regulatory B cells in autoimmune diseases » *Cell& Mol Immunol* (2013) 122–132
- [33] Watnabe R, Fujimoto M, Yazawa N et al. « CD19 expression of contact hypersensitivity. “Am J Pathol (2007); 560-70
- [34] Lenert P, Brummel R, Field EH et al. “TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production”. *J Clin Immunol* (2005);29-40
- [35] Gotot J, Gottschalk C, Leopold S, et al. “Regulatory T cells use programmed death ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo.” *Proc Natl Acad Sci USA* (2012);10468-10473
- [36] Seo SJ, Fields ML, Buckler JL, et al. “The impact of T helper and T regulatory cells on the regulation of anti-double-stranded DNA B cells.” *Immunity* (2002);535-546
- [37] Vallerskog T, Gunnarsson I, van Vollenhoven R et al. “Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE.” *Clin Immunol* (2007); 62-74
- [38] Sfrikakis PP, Souliotis VL, Theofilopoulos AN et al. “Increased expression of the Foxp3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis.” *Clin Immunol* (2007); 66-73
- [39] Utz, PJ and Anderson P « Posttranslational modifications, apoptosis, and bypass of tolerance to autoantigens » *Arthritis and Rheumatism* (1998) ;1152-1160
- [40] Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ et al. «New insights into the regulation of T cells by γ_c family cytokines » *Nat Rev Immunol* (2009); 480-490
- [41] Cuvillier O « Sphingosine 1-phosphate receptors: From biology to physiopathology » *Med Sci* (2012) 951-957
- [42] Haas J, Korporal M, Balint B et al. « Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD31⁺ T-cells in patients with multiple sclerosis » *J. Neuroimmunol* (2009) ; 113-117

- [43] Adavani RH, Buggy JJ, Sharman et al. « Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies.» *J Clin Oncol.* (2013); 88-94
- [44] Tsukada S, Rawlings DJ, Parolini O et al. « Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. 1993 » *J. Immunol* (2012) ;79-90
- [45] Nomura K, Kanegane H, Karasuyama H et al. « Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B-cell differentiation pathway ». *Blood* 96 (2000); 610–617
- [46] Conley ME, Brown P, Pickard AR et al. « Primary B cell immunodeficiencies : comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* (2004); 199-227
- [47] Howard V, Greene JM, Pahwa S et al. « The health status and quality of life of adults with X-linked agammaglobulinemia. » *Clin Immunol.* (2006) ; 201-208
- [48] <http://www.hemopathies-malignes-b.fr/content/voies-de-signalisation-des-cellules-b>
- [49] Ellmeier W et al. « Severe B cell deficiency in mice lacking the Tec kinase family members Tec and Btk. *J Exp Med* (2000)192(11):1611–1624
- [50] Satterthwaite AB and Witte ON « The role of Bruton tyrosine kinase in B-cell development and function : a genetic perspective.» *Immunol Rev* (2000)120-127
- [51] Corneth OBJ, Wolterink R, Hendriks R et al.. “BTK signaling in B cell differentiation and autoimmunity.” *Curr Top Microbiol Immunol* (2016) 67–105
- [52] Felices M, Falk M, Berg L et al. « Tec Kinases in T Cell and Mast Cell Signaling » *Adv Immunol* (2007) 145-184
- [53] Mohamed AJ, Yu L, Bäckerjö CM et al.”Bruton’s tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain” *Immunol Rev* (2009) 58-73
- [54] Müller B, Wirth T, Brunner C et al.. “Role of Bruton’s tyrosine kinase in innate and adaptative immunity. “Recent Res. Devel. *Experimental Med* (2004); 121-125
- [55] Kang SW, Wahl M, Chu Jet al. « PKC beta modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization. » *EMBO J* (2001); 5692–5702
- [56] Satterthwaite AB, Lowell CA, Khan WN et al. « Independent and opposing roles for Btk and Lyn in B and myeloid signaling pathways ». *J Exp Med* (1998); 833–844
- [57] Cambier JC, Gauld K, Merrell KT et al. « B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? » *Nat Rev Immunol* (2007); 633-643

[58] Wiestner A « Two Drugs Show Efficacy against Common Form of Leukemia » NEJM (2016)

[59] Frenzel L. « Regulation épigénétique et rôle de la protéine BTK dans l'expression du TNF- α par la voie des TLRs » (2013) ; 21-32

[60] Vallabhapurapu S and Karin M « Regulation and function of NF-kB transcription factors in the immune system ». *Annu Rev Immunol* (2009); 693 – 733.

[61] Corneth OBJ, Wolterink RGJ, Hendriks RW et al. « BTK Signaling in B Cell Differentiation and Autoimmunity » *Cur Top Microbiol and Immunol* (2016) 67–105

[62] Ni Gabhann, Spence S, Wynne C et al. « Defects in Acute Responses to TLR4 in Btk-deficient Mice Result in Impaired Dendritic Cell-induced IFN- γ Production by Natural Killer Cells » *Clin Immunol* (2012); 373–382

[63] Sochorova K, Horvath R, Rozkova D et al. « Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF- α production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia » *Blood* (2007); 2553-2556

[64] Hasan M, Lopez-Herrera G, Blomberg EM et al. « Defective Toll-like receptor 9-mediated cytokine production in B cells from Bruton's tyrosine kinase-deficient mice. » *Immunol* (2007); 239-249

[65] Ponader S and Burger JA « Bruton's tyrosine kinase: From X-linked agammaglobulinemia toward targeted therapy for B-cell malignancies.” *J. Clinical Oncol* (2014); 1830-1839

[66] Melcher M, Unger B, Schmidt U et al « Essential roles for the Tec family kinases Tec and Btk in M-CSF receptor signaling pathways that regulate macrophage survival ». *J Immunol* (2008); 8048- 8056

[67] Evans EK, Tester R, Aslanian S et al. « Inhibition of Btk with CC-292 provides early pharmacodynamic assessment of activity in mice and humans. » *J Pharmacol Exp Ther* (2013); 219–228

[68] Herman SE, Gordon AL, Hertlein E et al. « Bruton's tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765“ *Blood* (2011); 6287-6296

[69] Pans Z “ Bruton's tyrosine kinase as a drug discovery target” *Drug News Perspect* 21:(2008); 357-362

[70] Singh J, Petter RC, Kluge AF et al. « Targeted covalent drugs of the kinase family » *Curr Opin Chem Biol* (2010); 475-480

- [71] Brugger JA and Buggy J « Emerging drug profiles : Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765)” Leuk Lymphoma (2013); 2385-2391
- [72] Dubovsky JA, Beckwith KA, Natarajan G et al. « Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving Th1-selective pressure in T lymphocytes » Blood (2012); 2539-2549
- [73] Byrd JC, Brown JR, O’Brien S et al. “Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia.” N Engl J Med. (2014); 213–223.
- [74] Brown J « Ibrutinib In Combination With Bendamustine and Rituximab Is Active and Tolerable In Patients With Relapsed/Refractory CLL/SLL: Final Results Of a Phase 1b Study » Blood (2013); 525
- [75] <http://www.ema.europa.eu> Résumé Caractéristique du Produit « ibrutinib »
- [76] Novero A, Ravella PM, Chen Y et al. « Ibrutinib for B cell malignancies » Exp Hematol Oncol (2014) 1-7
- [77] Levade M, David E, Garcia C et al. “Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions » Blood.(2014); 3991-3995
- [78] McMullen JR, Boey E, Ooi JY et al. « Ibrutinib increases the risk of atrial fibrillation, potentially through inhibition of cardiac PI3K-Akt signaling ». Blood. (2014); 3829-3830.
- [79] Woyach JA, Furman RR, Liu TM et al. “ Resistance Mechanisms for the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib” N Engl J Med. (2014); 2286-2294
- [80] Hamasy A, Wang Q, Blomberg EM .et al. “Substitution scanning identifies a novel, catalytically active ibrutinib-resistant BTK cysteine 481 to threonine (C481T) variant” Leukemia advance (2016) 153
- [81] Byrd JC, Harrington B, O’Brien S, et al. “Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia.” N Engl J Med. (2016); 323–332.
- [82] Gardner HL, Harrington BK, Izumi R et al. « ACP-196: a second generation Btk inhibitor demonstrates biologic activity in a canine model of B-cell non-Hodgkin lymphoma. » Cancer Res. (2014)
- [83] Harrington BK, Gulrajani M, Covey T et al. « ACP-196 is a second generation inhibitor of Bruton tyrosine kinase (BTK) with enhanced target specificity ». Blood. (2015); 2908.
- [84] Lannutti BJ, Gulrajani M, Krantz F et al. « ACP-196, an orally bioavailable covalent selective inhibitor of Btk, modulates the innate tumor microenvironment, exhibits antitumor efficacy and enhances gemcitabine activity in pancreatic cancer ». Cancer Res. (2015);
- [85] Niemann CU, Montraveta A, Herman SE et al. « The novel Bruton’s tyrosine kinase inhibitor ACP-196 shows in vivo efficacy against human chronic lymphocytic leukemia cells xenografted to the NSG mouse model ». Cancer Res. (2014)

- [86] Wu J, Zhang M, Liu D et al. « Acalabrutinib (ACP-196): a selective second- generation BTK inhibitor » *J Hematol Oncol* (2016); 9-21.
- [87] Li N, Sun Z, Guo Y et al. « BGB-3111 is a novel and highly selective Bruton’s tyrosine kinase (BTK) inhibitor » *Cancer Res.* (2015).
- [88] Tam C, Grigg AP, Opat S et al. « The BTK inhibitor, Bgb-3111, is safe, tolerable, and highly active in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies: initial report of a phase 1 first-in- human trial. » *Blood.* (2015) 832.
- [89] Walter HS « A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. » *Blood.* (2016);411–409.
- [90] Barf T and Kaptein A « Irreversible Protein Kinase Inhibitors: Balancing the Benefits and Risks” *J. Med. Chem.* (2012); 6243–6262
- [91] Aalipour A and Advani RH. “Bruton’s tyrosine kinase inhibitors and their clinical potential in the treatment of B-cell malignancies: focus on ibrutinib.” *Ther Adv Hematol.* (2014); 121–133.
- [92] Puri KD, Di Paolo JA, Gold MR et al. “B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies.” *Int Rev Immunol.* (2013); 397–427.
- [93] Whang JA and Chang BY. “Bruton’s tyrosine kinase inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis.” *Drug Discov Today.* (2014); 1200–1204.
- [94] Kyttaris VC, and Tsokos GC. “Targeting lymphocyte signaling pathways as a therapeutic approach to systemic lupus erythematosus.” *Curr Opin Rheumatol.* (2011); 449–453.
- [95] Chen JS, Chang LC, Huang SJ, et al. “Targeting spleen tyrosine kinase-Bruton’s tyrosine kinase axis for immunologically mediated glomerulonephritis.” *Biomed Res Int.* (2014)
- [96] Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, et al. “Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response.” *Arthritis Res Ther.* (2009)
- [97] pharmaintelligence.informa.com/ www.adit.fr
- [98] Young WB, Barbosa J, Biomgren P et al. « Potent and selective Bruton’s tyrosine kinase inhibitor: discovery of GDC-0834 » *Bioorg Med Chem* (2015); 1333-1337
- [99] Sodhi JK, Wong S, Kirkpatrick DS et al. “A novel reaction mediated by human aldehyde oxydase : amide hydrolysis of GDC-0834” *Drug Metab Dispos* (2015); 908-915
- [100] Di Paolo JA, Huang T, Balazs M et al. « BTK inhibition suppress B-cell and myeloid cell-mediated arthritis » *Nat Chem Biol* (2011); 41-50

- [101] Manning G, Whyte DB, Martinez R et al. « The protein kinase complement of the human genome. » *Science* (2002) ; 1912-1934
- [102] Bradshaw JM, McFarland JM, O paavilainen V et al. « Prolonged and tunable residence time using reversible covalent kinase inhibitors » *Nat Chem Biol* (2015); 525-531
- [103] Park JK, Byun JY, Kim YY et al. “ HM71224 a novel Bruton’s tyrosine kinase inhibitor, suppresses B cell and monocyte activation and ameliorates arthritis in a mouse model: a potential drug for rheumatoid arthritis “ *Arthr Res & Ther* (2016) 18-91
- [104] Kim YY, Park KT, Lee KH et al.”A selective Bruton’s Tyrosine kinase inhibitor, ameliorates murine lupus development” *Ann Rheum* (2015); 564
- [105] Shi Q, Tebben A, Dyckman AJ, et al. “Purine derivatives as potent Bruton’s tyrosine kinase (BTK) inhibitors for autoimmune diseases.” *Bioorg Med Chem Lett.* (2014); 2206–2211.
- [106] Liu J, Guiadeen D, Krikorian A, et al. “Discovery of 8-amino-imidazo [1,5-a]pyrazines as reversible BTK inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis.” *ACS Med Chem Lett.* (2016);198–203.
- [107] Smith CR, Dougan DR, Komandla M, et al. “Fragment-based discovery of a small molecule inhibitor of Bruton’s Tyrosine Kinase.”*J Med Chem* (2015); 5437–5444
- [108] Xu D, Kim Y, Postelnek J, et al. “RN486, a selective Bruton’s tyrosine kinase inhibitor, abrogates immune hypersensitivity responses and arthritis in rodents.” *J Pharmacol Exp Ther.* (2012); 90–103.
- [109] Young WB, Barbosa J, Blomgren P, et al. “Discovery of highly potent and selective Bruton’s tyrosine kinase inhibitors: Pyridazinone ana- logs with improved metabolic stability.” *Bioorg Med Chem Lett.* (2016); 575–579.
- [110] Covey T, Barf T, Gulrajani M, et al. “ACP-196: a novel covalent Bruton’s tyrosine kinase (Btk) inhibitor with improved selectivity and in vivo target coverage in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients.” *Cancer Res.* (2015); Abstract 2596.
- [111] Ronald J « Discovery of PRN-1008, a novel reversible covalent BTK inhibitor in clinical development for rheumatoid arthritis » *ACR* (2015)
- [112] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human use (2006) ICH theme S7A
- [113] Liu L, Di Paolo J, Barbosa J et al. “Antiarthritis effect of a novel Bruton’s tyrosine kinase (BTK) inhibitor in rat collagen-induced arthritis and mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling: relationships between inhibition of BTK phosphorylation and efficacy.” *J Pharmacol Exp Ther.* (2011); 154–163.
- [114] Jansson L and Holmdahl R “Gene on the X chromosome affect development of collagen-induced arthritis in mice » *Clin Exp Immunol* (1993); 459-465

- [115] Shlomchick MJ et al. “Le rôle des cellules B dans lpr/lpr autoimmunité induite” *J Exp Med* 1994; 180: 1295-1306
- [116] Mina-Osorio P, Laurant J, Keirstead Net al. “Suppression of glomerulonephritis in lupus prone NZB/W mice by RN486, a selective inhibitor of Bruton’s Tyrosine Kinase.” *Arthritis Rheum* (2013)
- [117] Tester R, Aslanian S, Evans EK. et al. “Inhibition of Btk with CC-292 Provides Early Pharmacodynamic Assessment of Activity in Mice and Humans.” *J Pharmacol Exp Ther.* (2013) 219-228
- [118] Yang SY, Kim YY, Song JY, et al. “HM71224, A novel Btk inhibitor demonstrates potent activities in rodent models of arthritis.” *Ann Rheum Dis.* (2014); 518–519.
- [119] Kim YY, Park KT, Lee KH, et al. “FRI0380 HM71224, A selective Bruton’s Tyrosine Kinase inhibitor, ameliorates murine lupus development.” *Ann Rheum Dis* (2015);
- [120] Mattson JL, Spencer PJ, Albee RR et al.”A performance standard for clinical and Functional Observational Battery examinations of rats” *Toxicol* (1996); 239-254
- [121] Irwin S “Comprehensive observational assessment: A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse” *Psychopharmacol (Berl)* (1991); 222-257
- [122] Haggerty GC “Strategies for and experience with neurotoxicity testing of new pharmaceuticals. *Toxicol* (1991); 677-687
- [123] Murphy DJ “Safety Pharmacology of the Respiratory System: Techniques and Study” *Design. Drug Dev.Res.* (1994); 237-246
- [124] http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2__Guideline.pdf
- [125] Norman P “Investigational Bruton’s tyrosine kinase inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis” *Expert Opinion on Investigational Drugs.* (2016); 891-899
- [126] Parmar H, “Immunology from symptom relief to disease modification”, Merck Serono Investor and Analyst Day
- [127] Lee J, Son J, Sin HJ, et al. « THU0185 Safety, pharmacokinetics and proof-of-mechanism of an oral Bruton’s Tyrosine Kinase inhibitor HM71224 in healthy adult volunteers.” *Ann Rheum Dis.* (2015)
- [128] Smith PF, Krishnarajah J, Nunn PA, et al. “SAT0232 A phase 1 clinical trial of PRN1008, an oral, reversible, covalent BTK inhibitor demonstrates clinical safety and therapeutic levels of BTK occupancy without sustained systemic exposure.” *Ann Rheum Dis.* (2015)

- [129] Loke YK “Assessing the benefit-harm balance at the bedside” *BMJ* (2004); 7-8.
- [130] bénéfique” et “risque”. In : “Le Petit Robert” Dictionnaires le Robert, Paris. Site prbvdep.com
- [131] Gøtzsche PC “Rational diagnosis and treatment - Evidence-based clinical decision-making” 4th ed., John Wiley and sons, Chichester (2007) : 229 pages.
- [132] Prescrire Rédaction “Évaluer les bénéfices d’un traitement : d’abord les critères cliniques utiles aux patients” *Rev Prescrire* (2008) ; 69-70.
- [133] Greenhalgh T “Savoir lire un article médical pour décider” *RanD*, Meudon (2000) : 182 pages.
- [134] Morgan ME, Suttmuller, Witteveen HJ et al. « CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced-arthritis” *Arthritis Rheum* (2003); 1452-1460
- [135] Billiau A and Matthys P « Collagen-induced arthritis and related animal models : how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory ? *Cytokine Growth Factor Rev* (2011); 399-44
- [136] Halcomb KE, Musuka S, Gutierrez T et al. “Btk regulates localization, in vivo activation, and class switching of anti-DNA B cells.” *Mol Immunol* (2008); 233–241.
- [137] Perry D, Sang A, Yin Yet al. “Murine models of systemic lupus erythematosus”. *J Biomed Biotechnol* (2011)
- [138] Berthier CC, Bethunaickan R, Gonzalez-Rivera T et al. “Cross-species transcriptional network analysis defines shared inflammatory responses in murine and human lupus nephritis.” *J Immunol* (2012); 988–1001.
- [139] Hoyer BF, Moser K, Hauser AE et al. “Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice.” *J Exp Med* (2004);1577–1584.
- [140] Reininger L, Winkler TH, Kalberer CP et al. “Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZB x NZW)F1 mice” *J Exp Med* (1996); 853–861.
- [141] Haas KM, Watanabe R, Matsushita T et al. “Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice” *J Immunol* (2010);4789–4800.
- [142] Davidson A and Aranow C.”Lupus nephritis: lessons from murine models” *Nat Rev Rheumatol* (2010); 13–20.
- [143] Iwata Y, Bostrom EA, Menke J et al. “Aberrant macrophages mediate defective kidney repair that triggers nephritis in lupus-susceptible mice” *J Immunol* (2012);4568–4580.

- [144] Bethunaickan R, Sahu R, Liu Z et al. “Anti-tumor necrosis factor ’ treatment of interferon-induced murine lupus nephritis reduces the renal macrophage response but does not alter glomerular immune complex formation” *Arthritis Rheum* (2012); 3399–3408.
- [145] Bender A and Pereira A « Btk inhibition treats TLR7/IFN driven murine lupus » *Clin Immunol* (2016); 65–77
- [146] Olsen NJ and Karp DR “Autoantibodies and SLE: the threshold for disease” *Nat. Rev. Rheumatol.*(2014); 181–186.
- [147] Di Paolo J, and Franci C «Targeting the Btk-JAK axis in preclinical models of rat collagen induced arthritis with GS-4059 in combination with Jak inhibitor » *Biology*, Gilead Sciences 2016 ACR/ARHP Annual Meeting
- [148] Parmar H « Immunology from symptom relief to disease modification » Merck Serono Investor and Analyst
- [149] Cohen S and Fleischmann R.« Kinase inhibitors : a new approach to rheumatoid arthritis treatment » *Curr Open Rheumatol* (2010); 330-335
- [150] Kyttaris VC “Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs” *Drug Des Devel Ther* (2012); 245-250

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

L'ÉVALUATION DES INHIBITEURS DE LA BRUTON TYROSINE KINASE DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES AUTO-IMMUNES

Le système immunitaire est chargé de lutter contre les agressions extérieures et tolère ses propres constituants. L'auto-immunité résulte d'un défaut dans le maintien de la tolérance au soi. Les maladies auto-immunes (MAI) surviennent quand la rupture de la tolérance au soi entraîne des lésions cellulaires ou tissulaires induites par des lymphocytes T et/ou B produisant des auto-anticorps. Depuis quelques années une meilleure connaissance de l'immunopathologie a permis l'émergence de nouvelles thérapies. Des études cliniques ont mis en évidence le rôle des lymphocytes B dans diverses MAI. La tyrosine kinase de Bruton (BTK) est un composant clé de la signalisation des récepteurs des cellules B (BCR) et fonctionne comme un régulateur important de la prolifération et de la survie cellulaire dans diverses tumeurs malignes de la cellule B. C'est une cible évidente pour la thérapie des maladies malignes et auto-immunes à cellules B. L'ibrutinib, un inhibiteur irréversible de la BTK, a déjà été approuvé pour le traitement du lymphome du manteau et de la leucémie lymphocytaire chronique. Le développement d'inhibiteurs avec une spécificité plus grande ou différente pourrait être bénéfique pour des indications auto-immunes. Les inhibiteurs de BTK qui ont progressé vers le développement clinique précoce, et ceux qui démontrent une activité dans les modèles d'arthrite de rongeurs sont examinés. Ceux-ci incluent à la fois des inhibiteurs réversibles et irréversibles de la kinase, dont la plupart ciblent le résidu cystéine-481 de BTK. Cependant, le développement d'inhibiteurs de kinase pour traiter des MAI s'est avéré problématique à la fois sur l'efficacité et la sélectivité. On s'attend à ce que les inhibiteurs de BTK plus sélectifs se révèlent plus utiles, et l'utilisation d'inhibiteurs réversibles une meilleure stratégie dans le traitement des MAI. En fin de compte, seuls les essais sur l'homme nous aideront à comprendre les risques et les avantages potentiels de ces nouvelles thérapies.

Mots-clés : BTK, cellules B, BCR, maladie auto-immune, inhibiteurs de tyrosine kinase

EVALUATION OF BRUTON TYROSINE KINASE INHIBITORS IN THE TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES

The immune system is responsible for fighting against external aggression and tolerating its own constituents. Autoimmunity results from a defect in maintaining self-tolerance. Autoimmune diseases (AID) occur when rupture of self-tolerance results in cellular or tissue damage induced by T and / or B-lymphocytes producing autoantibodies. In recent years a better knowledge of immunopathology has allowed the emergence of new therapies. Clinical studies have demonstrated the role of B lymphocytes in various AID. Bruton tyrosine kinase (BTK) is a key component of B-cell receptor signaling (BCR) and functions as an important regulator of cell proliferation and survival in various malignant B cell tumors. An obvious target for the therapy of malignant and autoimmune B-cell diseases. Ibrutinib, an irreversible inhibitor of BTK, has already been approved for the treatment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. The development of inhibitors with greater or different specificity may be beneficial for autoimmune indications. BTK inhibitors that have progressed to early clinical development, and those that demonstrate activity in rodent arthritis models are examined. These include both reversible and irreversible kinase inhibitors, most of which target the BTK cysteine-481 residue. However, the development of kinase inhibitors to treat AID has proved problematic both on efficacy and selectivity. It is expected that more selective BTK inhibitors will prove to be more useful, and the use of reversible inhibitors a better strategy in the treatment of AID. Ultimately, only human trials will help us understand the risks and potential benefits of these new therapies.

Keywords : BTK, B-cell, BCR, autoimmune diseases, tyrosine kinase inhibitors

