

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE: 2022-2023

THESE 2022TOU32140

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Par

RIPOLL Clément

Née le 20 octobre 1994 à CARCASSONNE

**Utilisation de biothérapies issues du microbiome en oncologie,
étude de cas du développement du *Bifidobacterium pseudolongum***

Le vendredi 9 décembre 2022

Directeur de thèse : Dr. Frédéric ELUSTONDO

JURY

Président : Dr. Mathieu BERGE
1^{er} assesseur : Dr. Baptiste DUDES
2^{ème} assesseur : Dr. Frédéric ELUSTONDO

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé
au 4 avril 2022

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A.	Pharmacie Galénique
(*)	Pharmacognosie
Mme VANSTEELANDT M.	Mathématiques
Mme WHITE-KONING M. (*)	

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme LARGEAUD L	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme AMRANE Dyhia	Chimie Thérapeutique
------------------	----------------------

REMERCIEMENTS

À **Frédéric**, pour ton temps, ton investissement dans ce travail et tes précieux conseils tout au long de notre expérience commune.

À **Dr. Bergé et Dr Dudes**, pour me faire l'honneur d'être dans ce jury.

À **Marion**, pour m'avoir donné la chance d'intégrer YSOPIA, pour ton partage et ta confiance.

À **toute l'équipe d'YSOPIA**, pour votre confiance et votre positivité.

À **Toto, Jojo, Micha, Roasted**, pour avoir rendu les années PACES très agréable.

À **Jo**, pour ta bonne humeur et ton soutien constant tout au long de nos études.

À **Emma**, pour ton écoute, ta simplicité et ta bienveillance.

À **Thomas Maurin**, binôme de choc.

Aux BATS, ça serait mentir que de vous remercier pour ma réussite scolaire, mais merci d'être là et de ne pas changer au fil des années.

À **Batou, Bress, Nathan, Nath, Nico, Pimpim et Santac**, écrire ces mots sur le chemin d'un rassemblement culturel tous ensemble en Sancerre, prouve que l'on a réussi plus que nos études. Pourvu que ça dure.

À **ma grand-mère**, pour ton implication et ta gentillesse tout au long de ma vie.

Grosses pensées à Mami Paqui, Papi Pierre et Papi Jojo.

À **Lulu**, pour ta patience, ta bonne humeur, ton soutien indéfectible et pour être mon petit rayon de soleil.

À **Maxime**, pour ta patience, ta gentillesse, ton humour et j'en passe... Clin d'œil à **Sana**, avec qui tu partages ta vie pour sa bonne humeur et sa gentillesse !

À **mes Parents**, je me souviens que vous me disiez quand j'étais petit que les études étaient le meilleur moment de la vie et qu'il fallait bien travailler à l'école pour pouvoir en profiter. J'ai bien fait de vous écouter car vous aviez raison.

Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir permis de passer toutes ces merveilleuses années dans des conditions exceptionnelles. Je vous aime.

Clément

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABBREVIATIONS

INTRODUCTION

PARTIE I : Le microbiome et microbiote intestinal

A. Microbiome & microbiote

- a. Définition
- b. Caractérisation
 - 1- ADN 16 S
 - 2- *Next Generation Sequencing* (NGS)
- c. Projets de recherches autour du microbiome
 - 1- *Human Microbiome Project*
 - 2- Projet Européen MetaHIT
 - 3- Le microbiome français ou « *French Gut* »

B. Le Microbiote intestinal

- a. Composition
- b. Répartition
- c. Principaux rôles et fonctions
- d. Facteurs de variations et dysbioses

PARTIE II : B. pseudolongum et les inhibiteurs de checkpoints immunitaires dans le traitement de cancers : preuve de concept préclinique

A. Bifidobacterium pseudolongum

B. Inhibiteurs de checkpoints immunitaires

a. Mécanisme d'action

- 1- Le point de contrôle CTLA-4 : un régulateur global de l'activation des cellules T
- 2- Le point de contrôle PD-1
- 3- Mécanisme d'action des inhibiteurs de point de contrôle

b. Utilisation en oncologie

- 1- Anti-CTLA-4
- 2- Anti PD-1 & PD-L1
- 3- Combinaison d'anti-PD-1 et d'anti-PD-L1 avec d'autres thérapies

C. Potentialiser l'efficacité des inhibiteurs de checkpoints immunitaires par B. pseudolongum : Preuve de concept

a. Introduction

b. Potentialiser l'efficacité des inhibiteurs de checkpoints immunitaires par B. pseudolongum : Preuve de concept

- 1- Identification des bactéries qui favorisent la réponse à l'immunothérapie par ICI
- 2- Études mécanistiques du B. pseudolongum
- 3- Utilisation potentielle

c. Conclusion

PARTIE III : Routes possibles pour le développement de bactéries comme biothérapies

A. Introduction

B. Modalités thérapeutiques

- a. **Thérapies microbiennes issues d'un écosystème – MET**
- b. ***Live Biotherapeutic Product (LBP)***
 - 1- Règlements
 - 2- Les différentes approches

C. Caractéristiques des différentes approches

PARTIE IV : Étude de cas : Développement du *B. pseudolongum*

A. Contexte

- a. **Propriété intellectuelle**

B. De la bactérie au médicament

- a. **Constitution du souche**
- b. **Screening**
- c. **Épidémiologie**
- d. **Préclinique**
 - 1- Étude de toxicité
 - 2- Étude de pharmacocinétique
 - 3- Sélection de la dose
- e. **Fabrication du LBP**
- f. **Dossier réglementaire**
- g. **Protocole et étude clinique**
 - 1- Design de l'étude
 - 2- Critères d'inclusions
- h. **TPP - profil du produit ciblé**

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Évolution chronologique des publications autour du microbiome

Figure 2. Contextes cliniques impliquant le microbiome

Figure 3. Variation de la composition des différents microbiotes

Figure 4. Constitution du microbiome intestinal

Figure 5. Composition de la flore bactérienne dans les différentes parties du tractus gastrointestinal

Figure 6. Évolution de l'incidence des maladies

Figure 7. Évolution de l'équilibre entre l'homme et son microbiote

Figure 8. Activation de CTLA-4

Figure 9. Développement clinique des premiers anticorps anti CTLA-4, anti PD-1 et anti PD-L1, de la première administration à l'homme à l'autorisation de mise sur le marché par la FDA

Figure 10. Bactéries cultivées à partir de tumeurs homogénéisées en conditions anaérobies provenant d'animaux traités par anti-PD-L1 ou anti-CTLA-4

Figure 11. Schéma du dispositif expérimental

Figure 12. Efficacité du traitement par anti CTLA-4 chez des souris monocolonisées

Figure 13. Quantification des cellules T intra tumorales chez des souris porteuses de tumeurs MC38 et monoconisées

Figure 14. Efficacité sur le poids tumoral du traitement par anti PD-L1 chez des souris monocolonisées

Figure 15. Intensité de l'inosine (AUC) dans les sérums de souris monocolonisées.

Figure 16. Quantification du poids tumoral chez les souris porteuses de tumeurs MC38, monocolonisées avec *B. pseudolongum* en présence (WT) ou non (A2AR KO) de récepteurs A2AR et traitées et traitées avec un anti CTLA-4

Figure 17. Aperçu schématique du montage expérimental et évaluation de l'effet de l'inosine sur l'immunité anti-tumorale par la quantification du poids tumoral.

Figure 18. Mécanisme d'action présumé de la souche de *B. pseudolongum*.

Figure 19. Analyse du poids tumoral à la suite du montage expérimental pour évaluer l'effet de l'inosine dans un modèle de CRC dit à haut statut MSI

Figure 20. Poids de la tumeur du dispositif expérimental afin d'évaluer l'effet de l'inosine sur un modèle de cancer de la vessie

Figure 21. *B. pseudolongum* renforce l'efficacité de la thérapie anti-PD-L1

Figure 22. Cycle de vie d'un médicament.

Figure 23. Aires thérapeutiques ciblées par les MMP

Figure 24. Domaines d'applications des MMP

Figure 25. Stratégies de conception des MET

Figure 26. Répartition des différents modalités thérapeutiques des LBPs

Figure 27. La place du microbiome dans les produits en développement

Figure 28. Marché global des biothérapies basées sur le microbiome (\$M)

Figure 29. Étapes de développement d'une biothérapie issue du microbiome : de la preuve de concept scientifique à l'entrée en phase clinique.

Figure 30. Étapes de sélection du candidat médicament

Figure 31. Design de l'étude clinique de phase 1b/2a

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Normes et caractéristiques réglementaires des souches

Tableau 2. Analyse du produit pharmaceutique et du principe actif

Tableau 3. Probabilité d'observer au moins un événement indésirable (EI) compte tenu d'un taux d'incidence réel.

Tableau 4. TPP du candidat médicament

LISTE DES ABREVIATIONS

A2AR	Récepteur de l'adénosine 2A
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
API	Substance pharmaceutique active
BGI	Beijing Genome Institute
CDMO	Organisation de développement et de fabrication sous contrat
CFU	Unité formatrice de colonie
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CRC	Carcinome colo-rectal
CTLA-4	Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques
EDQM	European Directorate for Quality of Medicines
EI	Effets indésirables
EMA	European Medicines Agency – Agence Européenne du Médicament
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDA	Food and Drug Administration
GALT	Tissu lymphoïde associé au tube digestif
GMP	Bonne manière de préparation
IBD	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
ICH	Conseil international d'harmonisation
ICI	Immune Checkpoints Inhibitors - Inhibiteurs de points de contrôle immunitaires
IHMS	International Human Microbiome Standard
LBP	Live Biotherapeutic Product
LPS	Lipopolysaccharides microbiens
MAMP	Motifs moléculaires associés aux microbes ou aux agents pathogènes
MET	Thérapies microbiennes issues d'un écosystème
MMHP	Million Microbiome of Humans Project
MMP	Microbiotic Medecinal Product
MMR	MisMatch Repair – Système de réparation des mésappariements
MSI	Instabilité des microsatellites
NSCLC	Cancer du poumon non à petites cellules
NGS	Next Generation Sequencing
NIH	National Institutes of Health
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PD-1	Protéine de mort cellulaire programmée 1
PRE-IND	Pre-Investigational New Drug Application
PRR	Récepteurs de reconnaissance des formes
SHIME	Simulateur de l'Écosystème Microbien de l'Intestin Humain
TCR	Complexe du récepteur des cellules T
TGF- β	Facteur de croissance beta
TGI	Tractus gastrointestinal
TH1	Cellule T helper 1
Tregs	Lymphocytes T régulateurs

INTRODUCTION

Chacun de nous interagit en permanence avec des milliards de bactéries et bien d'autres microorganismes qui coordonnent la santé et le bien-être.

Ils jouent un rôle essentiel dans notre immunité, notre confort digestif et bien plus encore. A l'inverse, un déséquilibre du microbiome peut être à l'origine de nombreuses pathologies comme le diabète, l'obésité, le cancer, les maladies intestinales chroniques ou maladies neurologiques.

Comme on peut le voir sur la figure ci-dessous, la recherche internationale se passionne depuis peu pour le microbiome en forme de véritable exploration d'un écosystème encore peu connu.

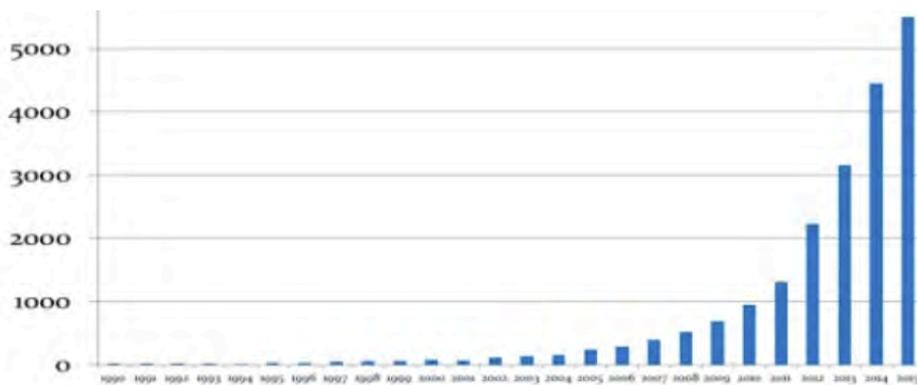


Figure 1. Évolution chronologique du nombre de publications autour du microbiome (1)

Dans le sillage des travaux des laboratoires de recherches, le microbiome est déjà un levier d'action pour l'innovation en santé, notamment à travers la relation hôte microbes pouvant servir pour l'identification de nouvelles cibles et bioactifs.

Le traitement des maladies par le biais d'une intervention sur le microbiome est désormais du domaine du possible, et plusieurs biothérapies basées sur le microbiome sont actuellement en développement à cette fin. Ces biothérapies issues du microbiome sont regroupées sous le terme de MMP, « *Microbiotic Medecinal*

Product » auquel appartiennent différentes modalités thérapeutiques dont les LBP, « *Live Biotherapeutic Product* » qui vont nous intéresser dans cette thèse.

Il est communément admis que le microbiome intestinal influence les maladies gastro-intestinales telles que les diarrhées infectieuses ou l'infection à *C. difficile*. Cependant, les bactéries intestinales peuvent également avoir un impact sur des maladies situées à des endroits éloignés de l'organisme, en modulant le système immunitaire humain, le métabolisme et même la fonction neurologique. Il ne s'agit pas d'un simple effet écosystémique, mais d'une fonctionnalité évoluée qui permet aux bactéries d'interagir avec les systèmes de l'organisme et de les moduler.

La compréhension et l'exploitation de cette fonctionnalité précise offre une nouvelle approche de traitement pour un large éventail de maladies.

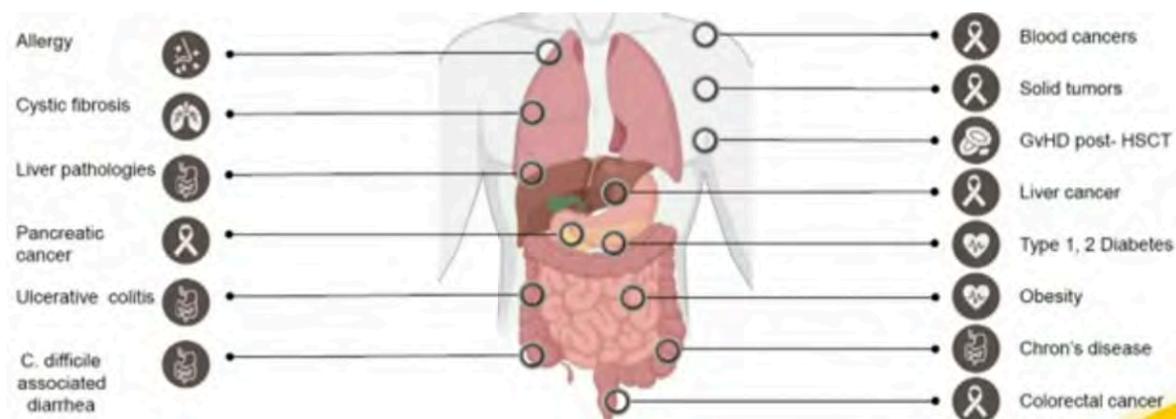


Figure 2. Contextes cliniques impliquant le microbiome (2)

Dans un très grand nombre de contexte clinique (2), l'altération du microbiote est également un biomarqueur ayant un potentiel diagnostique important et dont le clinicien pourrait devoir se servir dans sa pratique, dans sa prise de décisions, et la prise en charge des malades.

De récentes études précliniques et quelques études cliniques portant sur plusieurs types de cancer soutiennent fortement le rôle clé des bactéries intestinales dans la modulation de la réponse de l'hôte à l'immunothérapie suggérant que les

microbes intestinaux jouent un rôle significatif dans la réponse en modulant l'efficacité des médicaments et que le traitement avec des bactéries pourrait aider à surmonter la résistance primaire aux thérapies ICI ou inhibiteurs de points de contrôle immunitaires.

Nous nous intéresserons dans ce travail aux résultats de l'équipe canadienne du laboratoire de Calgary qui ont identifié une nouvelle voie microbienne métabolite-immune activée par l'immunothérapie et à l'exploitation de celle-ci pour développer des thérapies adjuvantes issues du microbiome. Nous proposerons un plan de développement clinique de la souche de *B. pseudolongum* et les étapes nécessaires et spécifiques aux LBP pour que cette recherche prometteuse puisse progresser vers une preuve de concept clinique.

PARTIE I : Le microbiome et microbiote intestinal

A. Microbiome & microbiote

a. Définitions

Le microbiote humain définit un ensemble de micro-organismes vivants dans un écosystème particulier appelé le microbiome. Le terme microbiote comprend les bactéries, virus, champignons, levures, archées et autres micro-organismes peuplant différentes zones du corps propices au développement d'un tel écosystème.

Le microbiome est l'expression des conditions écologiques de ces milieux (températures, PH, teneurs hormonales, en graisses, en protéines, exposition aux UV, type de muqueuse...) conditions auxquelles vont répondre les composants du microbiote, individuellement et/ou collectivement.

Le terme microbiome comprend également les gènes codant pour les composants du microbiote.

L'humain est constitué de plusieurs microbiotes distincts suivant le site anatomique concerné, ces microbiotes correspondant ainsi à des niches écologiques différentes. Chacun de ces écosystèmes est caractérisé par ses propres consortiums microbiens, sa dynamique communautaire et son interaction avec le tissu hôte.

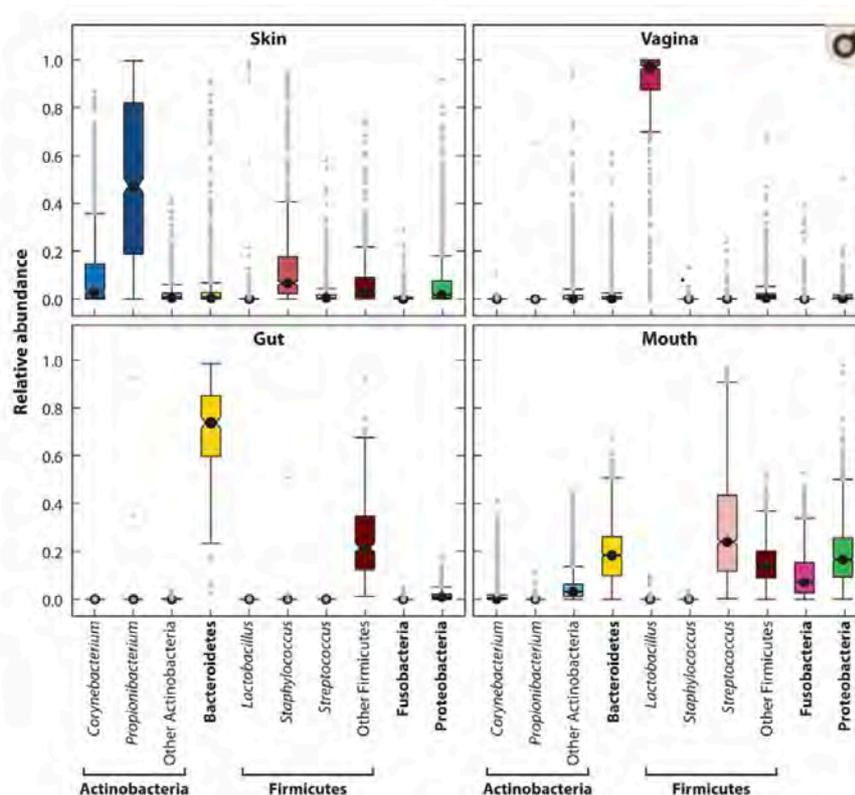


Figure 3. Variation de la composition des différents microbiotes (8)

Nous hébergeons des microorganismes au niveau de la peau constituant le microbiote cutané, d'autres au niveau du vagin contribuant au microbiote vaginal et également au niveau de la bouche et de la cavité orale représentant le microbiote bucco-dentaire.

Nous concevons aisément avoir des bactéries dans les zones de contact avec l'extérieur. Néanmoins l'intestin humain contient le plus grand écosystème d'espèces microbiennes possédant des réseaux interactifs complexes hôte-microbiome qui contribuent à notre physiologie.

Comme nous le pouvons le voir sur la figure 3 ci-dessus, la variabilité interindividuelle pour chaque site est très importante. Nous pouvons y voir que chacun des microbiotes abritent des taxons dominants. En effet, Les *Actinobactéries* (*Corynebacterium* et *Propionibacterium*), les *Firmicutes* (*Staphylococcus*, *Streptococcus* et autres) et les *Proteobacteria* prédominent sur la peau tandis que les

Lactobacillus prédominant dans le vagin. Enfin, les *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* et *Proteobacteria* prédominent dans la bouche. (3)

b. Caractérisation

Pour comprendre et exploiter l'impact du microbiome intestinal sur la santé et le bien-être de l'homme, il est nécessaire d'en déchiffrer le contenu, la diversité et le fonctionnement de la communauté microbienne intestinale.

Traditionnellement, on utilisait des méthodes de culture. Avec cet outil, il a été possible de progresser dans le phénotypage des isolats sur la base de leurs profils de fermentation et sur leurs exigences de croissance in vitro.

Bien que cette identification par culture soit peu coûteuse, elle demandait beaucoup de temps, de main d'œuvre et ne prenait en compte qu'une partie du microbiote intestinal.

Depuis les années 1990, des méthodes indépendantes de la culture bactérienne ont été développées et utilisées pour évaluer la diversité du microbiote et ainsi qualifier les espèces composant le microbiote. Elles ont ainsi permis de révéler une plus grande complexité du microbiote intestinal.

1- L'ADN 16 S

L'ADN 16 S est un ADN ultra conservé car la protéine 16S ribosomale est essentielle à la survie de la cellule, donc si cette protéine est trop mutée la cellule meurt, ainsi on retrouve une protéine 16S dans tous les procaryotes. Cet ADN 16S est d'autant plus utile car il n'y en a pas chez les eucaryotes qui eux ont un 18 S.

De ce fait une amplification de l'ADN 16S permet de cibler spécifiquement les procaryotes.

Ensuite sur cet ADN 16S, on retrouve des régions ultra conservées essentielle à la fonction de la protéine, et entre ces régions on retrouve des zones hypervariables qui

ne sont pas importantes pour la fonction, mais au sein desquelles les mutations vont s'accumuler et on va ainsi pouvoir tracer l'évolution des bactéries au cours du temps. Il y'a neuf zones hypervariables que l'on va pouvoir cibler spécifiquement.

Historiquement et pour des contraintes technologiques et économiques, les chercheurs se contentaient de ne cibler qu'une ou deux régions afin de différencier deux espèces.

Aujourd'hui on sait que ce n'est pas suffisant car c'est une toute petite zone et d'autres techniques sont préférées au 16S afin de faire de la phylogénie.

2- Next Generation Sequencing (NGS)

Le développement des techniques de séquençage de nouvelles générations a permis aux chercheurs d'étudier et de mieux comprendre le monde des micro-organismes. En effet les approches de séquençage métagénomiques représentent une puissante alternative au séquençage 16S afin d'analyser des communautés microbiennes complexe et d'avoir une vision plus globale du génome bactérien.

La métagénomique fait référence à l'application de techniques à haut débit qui vont aller lire directement des petits morceaux d'ADN pour séquencer l'ensemble du contenu d'un échantillon, indépendamment de son origine bactérienne.

Par la suite il y a un gros travail de bio-informatique afin d'identifier ces petits morceaux d'ADN, puis les réassembler entre eux pour aboutir à des morceaux un peu plus longs et permettre une identification bactérienne plus performante.

Les données métagénomiques fournissent non seulement une identification taxonomique approfondie du microbiome, mais permettent également de comparer simultanément l'abondance relative de tous les organismes présents dans le microbiome. En outre, la métagénomique fournit également des informations complètes sur l'ensemble du répertoire de gènes, la structure et l'organisation des

génomés, la structure de la communauté microbienne et les relations évolutives présentes dans l'échantillon.

Le principal défi de l'approche métagénomique est la quantité de données de séquences générées et nécessite une bio-informatique de haut niveau.

Néanmoins le génome n'est pas suffisant pour avoir une bonne compréhension de l'ensemble du microbiome. Ces outils de séquençage permettant l'analyse de la composition du microbiome doivent être complétés avec d'autres outils utilisés afin d'étudier les fonctionnalités du microbiome.

On distingue trois approches dites « *multi-omics* », ces technologies permettent de compléter la compréhension du microbiome.

- Les approches métabolomiques permettent l'étude des métabolites issus des microorganismes ou de l'environnement.
- La méta protéomique qui désigne les approches d'études de toutes les protéines des communautés microbiennes.
- Et enfin le méta transcriptomique, qui permet l'analyse de l'ARN codé par un groupe de microorganismes dans un échantillon complexe.

Les technologies d'analyses du microbiome ont un potentiel de croissance important car elles sont nécessaires à l'ensemble de la filière. En effet, la compréhension du microbiome est un prérequis au développement de l'ensemble des technologies et biothérapies liées au microbiome.

Les outils d'analyses présentés précédemment sont et seront indispensables au développement de la filière.

c. Projets de recherches autour du microbiome

Les techniques que nous avons vues précédemment démontrent l'importance d'avoir des bases de données qui soient bien documentées et vérifiées, car en fonction de la qualité de bases de données utilisées les résultats peuvent varier.

Depuis une dizaine d'année de nombreux projets ont vu le jour afin de fournir une ressource de données normalisées à la communauté scientifique et aux industriels.

1- Human Microbiome Project

Aux États-Unis, la première initiative de grande envergure en relation avec le microbiome humain a été lancée en 2007 sous l'impulsion des « *National Institutes of Health* » (NIH).

Le « *Human Microbiome Project* » s'est étendu sur dix ans et avait pour objectifs la caractérisation complète du microbiome humain ainsi que l'étude des relations entre modifications du microbiome humain et pathologie(s).

La première phase s'est déroulée entre 2007 et 2012, et avait pour but le développement de nouveaux outils pour l'étude du microbiome.

La deuxième phase a démarré en 2013 et s'est poursuivie jusqu'à la fin de l'année 2017 et portait sur le profilage du microbiome et de l'hôte humain chez :

- Des femmes enceintes.
- Des personnes présentant un début de diabète de type II ou un début de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (IBD).

Au total, le « *Human Microbiome Project* » représente un investissement de \$215M.
(4)

2- Projet Européen MetaHIT

En 2010, les chercheurs du projet européen MetaHIT qui regroupait entre autres collaborateurs des équipes de l'INRA, du CNRS ont publié le premier séquençage de l'ensemble des gènes des bactéries composant le tube digestif humain.

Ce projet regroupait 14 partenaires, équipes de recherche et industriels issus de huit pays.

3- Le microbiome français ou « French Gut »

Mené par un consortium piloté par l'INRAE et MetaGenoPolis le « *French Gut* » est un projet de contribution nationale citoyenne sur le microbiote avec l'ambition de cartographier et mieux comprendre l'hétérogénéité des microbiotes intestinaux sains français, les facteurs environnementaux et des modes de vie les impactant, ainsi que leurs déviations dans les maladies chroniques.

Une grande étude va être lancée début 2022 auprès de 100.000 français afin de recueillir le maximum de données et établir ainsi une cartographie du « microbiome français ».

Ce « French Gut » s'inscrit dans un grand projet international nommé Million Microbiome of Humans Project (MMHP), dirigé par le Beijing Genome Institute (BGI) en Chine, visant à constituer la plus grande base de données du monde du microbiote humain.

Le domaine du microbiome a connu une révolution plus que fascinante avec l'avènement de nouvelles méthodes d'études et les potentiels d'innovation qu'ils apportent sont à la fois encore balbutiants et cependant immenses.

Les nouvelles modalités thérapeutiques découlant de ces récentes sont à même de changer la nutrition et la médecine de demain pour la prévention et la santé de l'humain.

B. Le microbiote intestinal

Aujourd'hui, l'INSERM définit le microbiote intestinal comme : « *un ensemble de micro-organismes [...] principalement localisé dans l'intestin grêle et le colon (l'acidité gastrique rendant la paroi intestinale quasi stérile). Il est réparti entre la lumière du tube digestif et le biofilm protecteur que forme le mucus intestinal sur sa paroi intérieure (l'épithélium intestinal)* » (5)

a) Composition

La composante la plus riche et diversifiée en micro-organismes du corps humain est le microbiote intestinal. Chaque individu possède des bactéries relativement proches en termes d'espèces, mais la composition exacte du microbiote est spécifique à l'hôte.

Le microbiote intestinal humain apparaît comme un écosystème diversifié, complexe et spécifique à chaque être.

On considère que le microbiote d'un individu est aussi unique que ses empreintes digitales. Pour se rendre compte de l'immensité de cet écosystème, le tube digestif n'abrite pas moins de 10^{12} à 10^{14} micro-organismes, soit 2 à 10 fois plus que le nombre de cellules qui constituent notre corps, et peut peser jusqu'à 2kg. La diversité microbienne est estimée à l'heure actuelle entre 300 à 500 espèces de bactéries différentes et près de 600 000 gènes bactériens par individu. (6)

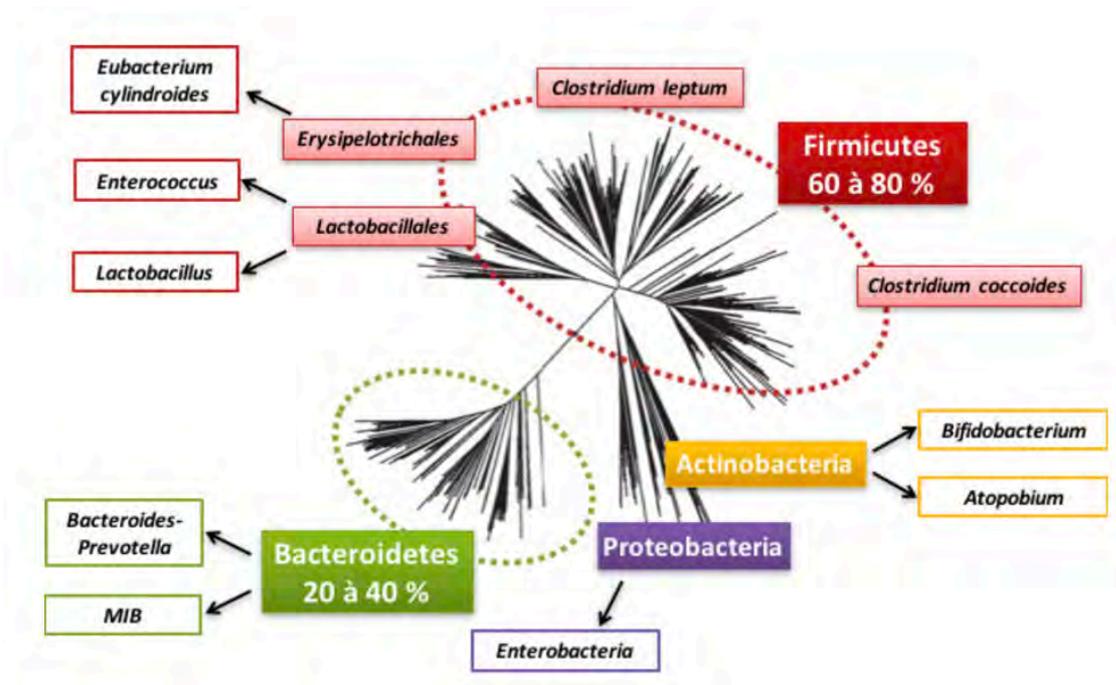


Figure 4. Constitution du microbiome intestinal. (7)

Comme on peut le savoir sur la figure 4 ci-dessus (7), les espèces sont divisées principalement en deux groupes bactériens (ou phyla) qui représentent à eux deux près de 90% des composants du microbiote intestinal : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*.

Chaque phylum est subdivisé en classe, ordre, famille, genre et espèce.

- Le phylum des *Firmicutes* est souvent le plus représenté, il comporte ainsi plus de 200 genres dont notamment les staphylocoques, lactobacilles, mycoplasmes et clostridies qui sont les plus connus.
- Le second phylum majoritaire est celui des *Bacteroidetes* représenté majoritairement par les *Bacteroides*. Ils sont toujours présents et relativement dominants.

Les *Proteobacteria*, les *Actinobacteria*, les *Verrucomicrobia* et les *Fusobacteria* sont présents également mais en minorité.

Bien que majoritairement constitué de bactéries on retrouve dans le microbiote intestinal également d'autres constituants :

- Une composante fongique, essentiellement des champignons et des levures ainsi que des archées. Ces derniers sont des micro-organismes unicellulaires procaryotes. Elles ont longtemps été considérées comme des bactéries mais l'évolution des méthodes d'analyses et les méthodes de classification phylogénétiques ont permis de justifier la création d'un groupe à part entière. Elles sont en grande majorité productrices de méthane.
- On retrouve également des virus. Ils utilisent le métabolisme et les constituants de son hôte pour se répliquer.
- On retrouve une importante quantité de virus bactériophages, archaeophages ou prophages, insérée dans certains génomes bactériens. Les phages, du fait de leurs activités de lyses bactériennes, sont particulièrement impliqués dans le maintien de la diversité des espèces microbiennes.

b) Répartition

Le tractus gastro-intestinal est un système compartimenté qui contient plusieurs régions anatomiquement distinctes allant de l'estomac au rectum. Celui-ci est divisé en trois parties : l'estomac, l'intestin grêle comprenant le duodénum, le jéjunum et l'iléum et le gros intestin aussi appelé colon comprenant les colons ascendant, transverse et descendant, et le rectum.

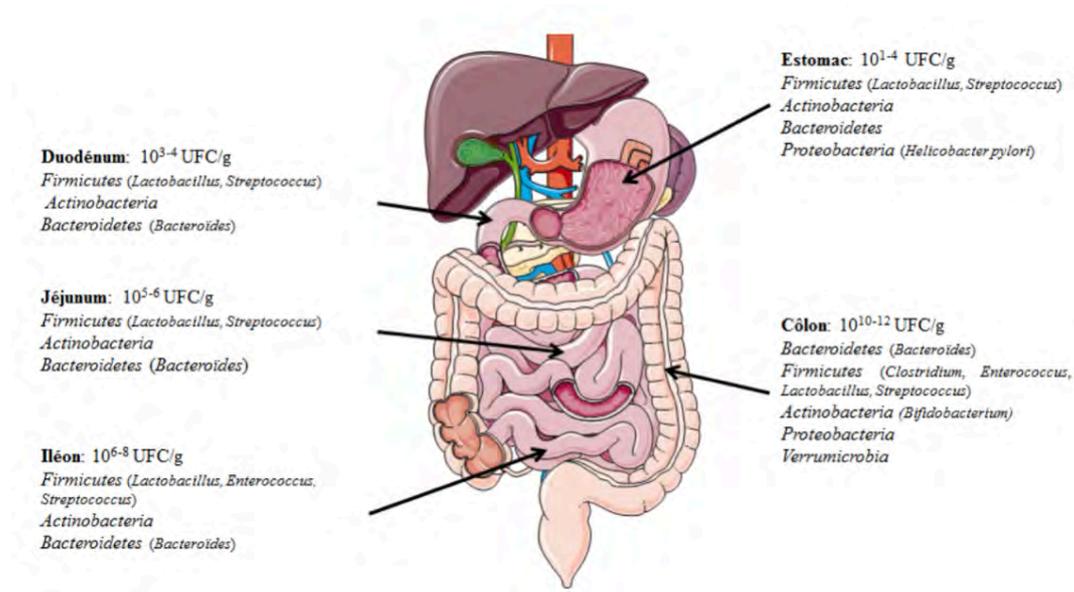


Figure 5. Composition de la flore bactérienne dans les différentes parties du tractus gastrointestinal. (8)

Chacune de ces sections possède des caractéristiques physico-chimiques et physiologiques qui lui sont propres permettant ainsi de développer un microbiome identifiable et caractéristique. (8)

L'acidité gastrique rendant la paroi de l'estomac quasi stérile, la majorité du microbiote intestinal se situe dans l'intestin grêle et le côlon.

c) Principaux rôles et fonctions

Dans un premier temps, le microbiote intestinal joue un rôle de « barrière » afin d'éviter les agressions extérieures en maintenant une ligne de défense. Les jonctions serrées sont une structure critique pour limiter la perméabilité transépithéliale.

De nombreux mécanismes (9) sont employés pour réaliser la compartimentation du microbiote. Une couche de mucus dense sépare l'épithélium intestinal des microbes résidents. La barrière de mucus est organisée autour de la mucine hyperglycosylée MUC2. Cependant, la MUC2 n'offre pas seulement une protection, mais elle limite

également l'immunogénicité des antigènes intestinaux en imprimant aux cellules dendritiques entériques (CD) un état anti-inflammatoire.

Les effecteurs présents au niveau de l'intestin permettent la tolérance du microbiote et son développement tout en limitant l'invasion de l'épithélium afin d'éviter une inflammation exagérée.

- Les immunoglobulines A sécrétées (IgA) jouent un rôle important dans l'homéostasie intestinale en limitant l'attachement du microbiote aux cellules épithéliales, sans pour autant provoquer une inflammation.
- Les Th17 et les ILC3 jouent un rôle important pour la production d'IL-22 entraînant une augmentation de la production de peptides antimicrobiens et de mucus et induisant ainsi la réparation de la barrière épithéliale.
- Au niveau intestinal, le microbiote amène des signaux de dangers MAMPs reconnus par les cellules dendritiques qui vont se mettre à sécréter de nombreuses cytokines dont : IL-33, TSLP, IL-25, TGF- β . La sécrétion de ces cytokines va permettre aux cellules dendritiques d'avoir un caractère tolérogène.

Quand les cellules dendritiques sont engagées dans la réponse du système, elles vont favoriser le développement des Treg et la commutation de classe vers l'isotype IgA. Le microbiote intestinal possède ainsi un rôle immunologique en régulant de manière significative le développement et la fonction du système immunitaire inné et adaptatif.

L'attribut de la mémoire immunologique a longtemps été lié uniquement à l'immunité adaptative. Des données récentes indiquent que la mémoire est également présente dans les cellules immunitaires innées telles que les monocytes/macrophages et les cellules tueuses naturelles (10,11,12). Ces cellules possèdent des récepteurs de reconnaissance des formes (PRR) qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux microbes ou aux agents pathogènes (MAMP) exprimés par les microbes.

La barrière intestinale possède donc de multiples lignes de défense, dont les bactéries commensales, qui inhibent de manière compétitive la colonisation des bactéries pathogènes et la production de composés métaboliquement protecteurs. (13)

Parmi ces lignes protectrices, on retrouve des sites inducteurs de la réponse immunologique comme les plaques de Peyer ou les follicules lymphoïdes qui à notre naissance, sont pratiquement inexistantes et ne se développent que lorsqu'on est colonisé par le microbiote. Le microbiome joue ainsi un rôle essentiel dans la formation et le développement des principaux composants du système immunitaire inné et adaptatif de l'hôte, tandis que le système immunitaire orchestre le maintien des caractéristiques clés de la symbiose hôte-microbe.

Les interactions entre le microbiote intestinal et l'immunité de l'hôte sont complexes, dynamiques et dépendantes du contexte. L'exigence d'un microbiote intestinal sain pour une homéostasie normale place le système immunitaire de la muqueuse intestinale dans une situation difficile, car il doit être tolérant envers les commensaux bénéfiques tout en empêchant la prolifération des agents pathogènes résidents.

Le microbiote intestinal entretient ainsi une relation symbiotique avec la muqueuse intestinale et exerce également une importante fonction régulatrice vis à vis de nos fonctions métaboliques, neurovégétatives.

d) Facteurs de variations et dysbioses

Un microbiome sain présente une série de caractéristiques communes qui peuvent être distinguées des individus non sains. La compréhension des propriétés différentielles du microbiome peut donc contribuer à la détection et à l'identification du microbiome associé à une maladie.

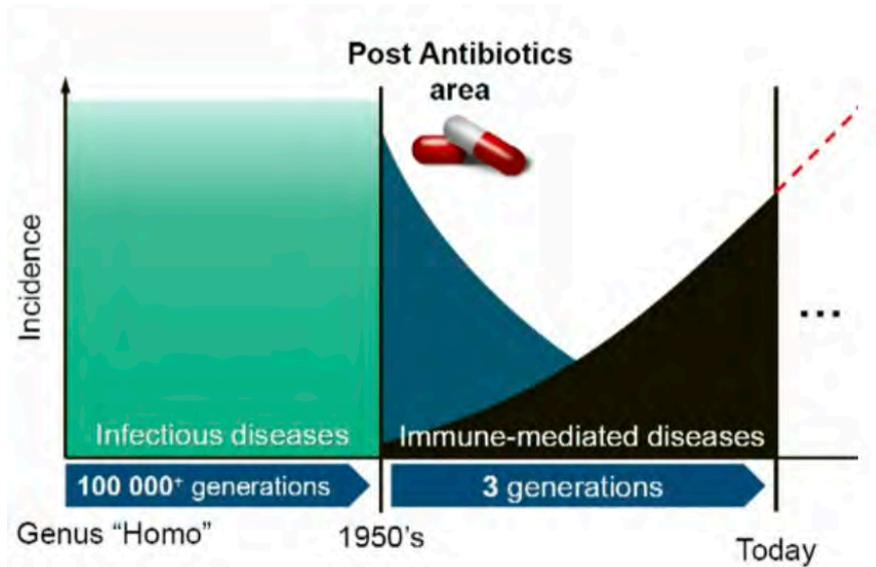


Figure 6. Évolution de l'incidence des maladies. (2)

L'humain a co-évolué avec ses microbiotes qui l'ont précédé sur la planète et qui ont constitué pendant 100 000 générations une menace d'infection, étant la cause principale des mortalités. (2)

Les choses ont radicalement changé depuis trois générations alors que la médecine avait fait des progrès vertigineux avec l'hygiène, la vaccination, les antibiotiques conduisant dans certains cas à l'éradication complète de pathogènes. Par la suite, l'augmentation des maladies chroniques a été observé à la faveur de changements de mode de vie, d'alimentations, d'expositions à la chimie environnementale ou de modifications de tout ce qui entoure la naissance.

Les maladies immunes, que l'on appelle parfois maladie non transmissible, sont devenus aujourd'hui le problème majeur de santé publique. Les épidémies d'obésité, de diabètes, de maladies cardiovasculaires, hépatiques et neurologiques représentent une menace vis à vis de la santé et la longévité de l'humain.

Pour un grand nombre de maladies de société moderne l'incidence illustrée dans la figure 6 ci-dessus est constante, parfois exponentielle est toujours non contrôlée aujourd'hui.

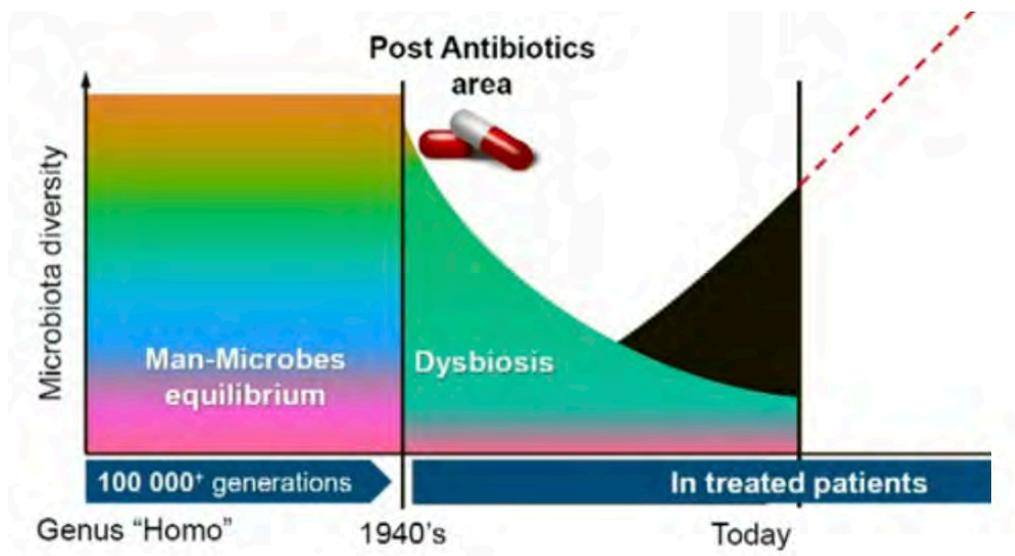


Figure 7. Évolution de l'équilibre entre l'homme et son microbiote. (2)

L'altération du microbiote accompagne cette évolution avec aujourd'hui 25 % (2) de la population occidentale qui présente un microbiote intestinal altéré, très souvent réduit en diversité. La perte de richesse est un des marqueurs de dysbiose et également un marqueur de l'altération de la relation entre l'hôte et ses microbes.

La dysbiose est une perte de bactéries normalement dominantes chez le sujet sain appelées symbiotes et une prolifération des bactéries « nocives » dites pathobiontes qui s'accompagne d'une perte de fonction conduisant à un écosystème avec une symbiose défailante.

Les fonctions de barrières, métaboliques, immunitaires vont être dégradées ainsi que la protection contre la prolifération des microbes de l'environnement.

La symbiose défailante peut par ailleurs s'auto-entretenir par le biais de boucles de rétroactions qui relient le microbiote au système immunitaire.

Cette situation peut rendre compte de ce qu'on observe aujourd'hui dans un grand nombre de maladies chroniques que l'on va considérer comme incurable tant la symbiose microbiote-hôte semble un élément clé de l'état de santé.

PARTIE II : *Bifidobacterium pseudolongum* et les inhibiteurs de checkpoints immunitaires dans le traitement de cancers : preuve de concept préclinique

A. *Bifidobacterium pseudolongum*

Les membres du genre *Bifidobacterium* sont répandus et parfois très abondants parmi les centaines d'espèces bactériennes qui peuplent l'intestin des humains et des autres mammifères.

Les bifidobactéries sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et non mobiles, appartenant au phylum des actinobactéries, elles représentent l'un des principaux colonisateurs microbiens de l'intestin humain et animal (14). Ces bactéries sont constituées de bacilles de forme irrégulière, présentant un test négatif pour la catalase et sont anaérobies stricts. Sa croissance nécessite une assez forte teneur en dioxyde de carbone CO₂. Toutefois quelques espèces tolèrent O₂ mais uniquement en présence de CO₂. Les bifidobactéries appartiennent à la famille des bactéries lactiques.

Récemment, Milani et al. ont décrit des populations de bifidobactéries présentes chez un large éventail de 291 animaux adultes, dévoilant ainsi leur large distribution à travers le royaume des mammifères (15). Actuellement, 72 sous-espèces distinctes de bifidobactéries sont reconnues, principalement isolées du tractus gastro-intestinal de divers animaux, de l'intestin et de la cavité buccale de l'homme, et de l'intestin postérieur des insectes.

Dans ce contexte, il a été démontré que *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium pseudolongum* sont les espèces prédominantes de bifidobactéries présentes dans l'intestin des mammifères (16). À ce jour, des analyses génomiques comparatives complètes de ces taxons bifidobactériens ont été réalisées, à l'exception notable de l'espèce *B. pseudolongum*, pour laquelle il existe actuellement peu d'informations concernant sa caractérisation génomique.

L'espèce *B. pseudolongum* se compose de deux sous-espèces, *B. pseudolongum subsp. pseudolongum* et *B. pseudolongum subsp. globosum*, dont *B. pseudolongum subsp. pseudolongum* a été identifié et classé en 1969 à partir de fèces de porcs (16). La même année, Scardovi et al. ont isolé du rumen de bovins une souche qu'ils ont nommée *Bifidobacterium globosum*, qui a été classée en 1992 comme une sous-espèce de l'espèce *B. pseudolongum*, c'est-à-dire *B. pseudolongum subsp. globosum* (17).

Les analyses génomiques indiquent clairement que les bifidobactéries ont développé un nombre varié de stratégies génétiques pour s'adapter à leurs niches écologiques spécifiques. En outre, les espèces de *B. pseudolongum* sont largement distribuées dans l'intestin des mammifères, avec de nombreuses souches différentes présentant une diversité génomique et des capacités métaboliques différentielles, ce qui suggère des fonctions dépendant de la souche (18).

B. Les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires

L'immunothérapie du cancer a connu un grand succès dans la lutte contre toute une série de tumeurs malignes hématologiques et solides métastatiques. Les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires ou checkpoint immunitaires (ICI) sont une thérapie efficace pour certaines tumeurs en exploitant le potentiel thérapeutique du système immunitaire. En ciblant l'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4), la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) ou son ligand (PD-L1), les inhibiteurs de checkpoint immunitaire (ICI) ont révolutionné le traitement de certains cancers, comme le mélanome, le carcinome rénal et le cancer du poumon à non petites cellules pour ne citer qu'eux.

Néanmoins de nombreux cancers présentent une résistance primaire à l'immunothérapie et les taux de réponses restent faibles. De plus, leur utilisation est entravée par l'incapacité à prédire la réponse d'un patient à l'autre même dans les cancers pour lesquels les ICI ont apporté un bénéfice.

Face à l'hétérogénéité de ces réponses, de grands efforts ont été consacrés à l'identification des paramètres qui modulent l'immunité anticancéreuse nécessaire pour déclencher l'efficacité de ces thérapeutiques anticancéreuses.

Parmi les facteurs décrivant l'efficacité clinique des ICI, les preuves accumulées au cours de la dernière décennie ont mis en évidence le rôle du microbiote intestinal dans la détermination de l'efficacité des anticancéreux dans des modèles précliniques de tumeurs.

Cette section portera une attention particulière aux voies CTLA-4 et PD-1, car ce sont les deux points de contrôle dont l'inhibition a révolutionné l'immunothérapie clinique du cancer et sont ceux utilisés aujourd'hui avec des biothérapies candidates issues du microbiome.

a. Mécanisme action des inhibiteurs de contrôle immunitaire

Afin de comprendre les modes d'action des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, il est important de comprendre l'interaction dynamique entre les cancers et le système immunitaire au cours de la maladie.

Les cellules cancéreuses sont génétiquement instables, ce qui contribue à leur prolifération incontrôlée et à l'expression d'antigènes qui peuvent être reconnus par le système immunitaire. Ces antigènes comprennent des protéines normales surexprimées par les cellules cancéreuses et de nouvelles protéines générées par des mutations et des réarrangements génétiques.

Les cellules T CD8+ cytotoxiques sont des cellules immunitaires particulièrement efficaces dans la médiation des réponses immunitaires antitumorales. Ces cellules peuvent apprendre à reconnaître les antigènes spécifiques de la tumeur présentés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et ainsi effectuer une destruction ciblée des cellules tumorales. Les cellules T CD8+ deviennent des cellules effectrices autorisées après une stimulation appropriée par des cellules présentatrices d'antigènes qui ont recueilli des antigènes sur le site de la tumeur.

Les cellules présentatrices d'antigènes doivent fournir des signaux de costimulation par le biais de récepteurs de surface (tels que CD28) et de cytokines [telles que l'interleukine (IL)-12] pour une stimulation efficace des lymphocytes T.

Les cellules tumorales adoptent une variété de mécanismes pour éviter la reconnaissance immunitaire et la destruction immunomédiée (19). Elles peuvent échapper aux réponses immunitaires en prenant le dessus sur les mécanismes de rétrocontrôle négatif que l'organisme a mis au point pour prévenir les pathologies immunes. Nous allons nous intéresser dans cette thèse aux récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 et CTLA-4.

Les points de contrôle du système immunitaire sont des récepteurs qui interviennent dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires afin de limiter la durée et l'intensité de la réaction immune. Il existe à la surface d'une même cellule des récepteurs coactivateurs (qui renforcent l'activation) et des récepteurs co-inhibiteurs (qui diminuent l'activation). C'est l'équilibre complexe entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs qui détermine si une cellule immunitaire peut s'activer.

Ces récepteurs inhibiteurs, également appelés points de contrôle immunitaire, et leurs ligands se trouvent sur un large éventail de types de cellules. Ils sont essentiels à la tolérance centrale et périphérique en ce qu'ils s'opposent à la signalisation d'activation simultanée par des molécules de costimulation. Les récepteurs inhibiteurs peuvent agir à la fois pendant l'activation immunitaire et pendant les réponses immunitaires en cours. Au cours d'une inflammation chronique en particulier, les lymphocytes T s'épuisent et régulent à la hausse les récepteurs inhibiteurs, tels que PD-1, CTLA-4, qui vont limiter leur efficacité. C'est également le cas dans le cancer, la persistance d'une charge antigénique élevée conduit les lymphocytes T à réguler à la hausse les récepteurs inhibiteurs, dont la signalisation conduit ensuite à une perte progressive du potentiel prolifératif et des fonctions effectrices et, dans certains cas, à leur suppression (20).

Cet épuisement des lymphocytes T est donc à la fois un mécanisme physiologique destiné à limiter l'immunopathologie lors d'une infection persistante et également un obstacle majeur pour les réponses immunitaires antitumorales.

1- Le point de contrôle CTLA-4 : un régulateur global de l'activation des cellules T

Le récepteur CTLA-4 est un membre de la famille B7/CD28 qui inhibe les fonctions des lymphocytes T. Il est exprimé au niveau des lymphocytes T cytotoxiques CD8+, des T auxiliaires CD4+ et enfin au niveau des lymphocytes T régulateurs dans lesquels il est exprimé de manière constitutive.

Nous pouvons voir dans la figure 8 (20) ci-dessous que dans les cellules T au repos, CTLA-4 est une protéine intracellulaire ; toutefois, après l'engagement du récepteur des cellules T et un signal co-stimulateur par l'intermédiaire de CD28, CTLA-4 se déplace vers la surface cellulaire des lymphocytes T, où il supprime CD28 pour la liaison aux molécules co-stimulatrices critiques (CD80, CD86) puis transmet un signal inhibiteur dans la cellule T, entraînant l'arrêt de la prolifération et de l'activation.

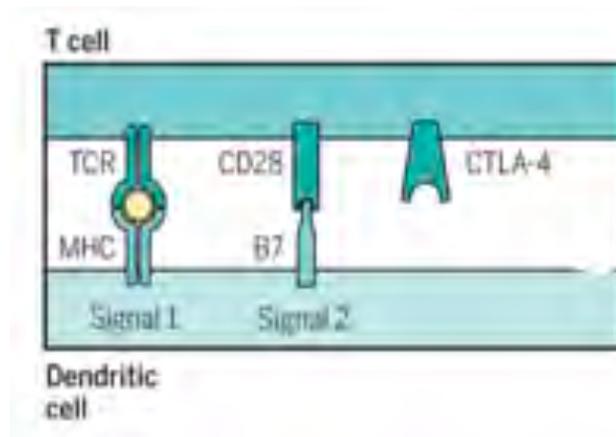


Figure 8. Activation de CTLA-4. (20)

CTLA-4 agit ainsi comme médiateur de l'immunosuppression en diminuant indirectement la signalisation par le récepteur co-stimulateur CD28. Bien que les deux récepteurs se lient à CD80 et CD86, CTLA-4 le fait avec une affinité beaucoup plus grande, supplantant efficacement CD28. CTLA-4 peut également éliminer CD80 et CD86 des surfaces cellulaires des CPA (cellules présentatrices d'antigènes) par trans-endocytose, réduisant ainsi la disponibilité de ces récepteurs stimulants pour d'autres cellules T exprimant CD28.

Ce processus est un mécanisme important par lequel les Tregs exercent une immunosuppression sur les cellules adjacentes et notamment les lymphocyte T. En limitant la signalisation médiée par CD28 pendant la présélection de l'antigène, CTLA-4 intervient précocement dans l'activation du lymphocyte T dans les organes lymphoïdes secondaires, lors de la présentation de l'antigène tumoral par la CPA au lymphocyte T naïf. Il augmente ainsi le seuil d'activation des cellules T, réduisant ainsi

les réponses immunitaires aux antigènes faibles tels que les antigènes propres et tumoraux, pour finalement inhiber l'activation du lymphocyte en T effecteur.

Preuve de son importance, les souris knock-out CTLA-4 meurent en trois semaines de la destruction immunitaire de plusieurs organes, ce qui atteste de son rôle critique en tant que régulateur inhibiteur des réponses immunitaires dépendantes des lymphocytes T (21).

2- Le point de contrôle PD-1 :

Le point de contrôle PD-1 est principalement impliqué dans la signalisation immunitaire inhibitrice et est un régulateur essentiel des réponses immunitaires adaptatives. Chez l'homme comme chez la souris, certaines populations de lymphocytes T expriment de manière constitutive PD-1. Celles qui ne l'expriment pas de manière constitutive peuvent l'exprimer à la suite d'une stimulation par le biais du complexe du récepteur des cellules T (TCR) ou par l'exposition à des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15, l'IL-21 et le facteur de croissance (TGF)- β .

Le récepteur PD-1 possède deux ligands : PD-L1 et PD-L2. Tous deux se trouvent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes.

Dans les cellules T, l'engagement de PD-1 entraîne la phosphorylation des résidus tyrosine, ce qui déclenche une cascade de signalisation intracellulaire qui entraîne la déphosphorylation des composants de signalisation du TCR. En présence d'une stimulation du TCR, CD28 fournit des signaux critiques qui sont importants pour l'activation des cellules T.

En interférant avec la signalisation précoce TCR/CD28 et le rétrocontrôle positif dépendant de l'IL-2 associée, la signalisation PD-1 entraîne donc une diminution de la production de cytokines (comme l'IL-2, l'IFN- γ et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α), de la progression du cycle cellulaire, ainsi qu'une réduction de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans les fonctions effectrices comme T-bet.

L'activité de PD-1 n'est donc pertinente que lors de l'activation simultanée des cellules T.

Les cellules T infiltrant la tumeur et exprimant PD-1 peuvent être désactivées par la présence de PD-L1, qui n'est autre que son ligand, à la surface des cellules tumorales ou d'autres cellules immunitaires infiltrées. On pense donc que les anticorps bloquants ciblant la signalisation de PD-1 affectent principalement la phase effectrice de la réponse immunitaire.

Globalement, PD-1 est crucial pour le maintien de la tolérance périphérique et pour contenir les réponses immunitaires afin d'éviter les pathologies immunes.

Dans les cellules cancéreuses, PD-1 peut être régulé à la hausse de façon transitoire pendant la stimulation et de façon constitutive pendant l'activation immunitaire chronique. Le récepteur inhibiteur a été détecté à la fois sur les cellules T circulantes spécifiques des tumeurs et sur les lymphocytes infiltrant les tumeurs, où il a été associé à une diminution de la fonction des cellules T chez l'homme et la souris (22).

Les récepteurs de points de contrôles immunitaires sont essentiels dans le processus d'activation des cellules immunitaires. Les points de contrôle du système immunitaires sont des récepteurs qui interviennent dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires afin de limiter la durée et l'intensité de la réaction immune.

3- Mécanisme d'action des inhibiteurs de point de contrôle (ICI) :

Les immunothérapies inhibitrices des points de contrôles immunitaires sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les points de contrôle du système immunitaire. Actuellement, ces inhibiteurs qui sont utilisés en cancérologie et ciblent des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des lymphocytes (CTLA4, PD1) ou leur ligands (PD-L1, ligand de PD1).

Les anti-checkpoints permettent de renverser l'immunosuppression induite par la tumeur. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les récepteurs inhibiteurs (anti-CTLA4,

anti-PD1) ou leurs ligands (anti-PD-L1) va permettre de bloquer le fonctionnement de ces récepteurs et ainsi les empêcher d'inhiber la réponse immunitaire.

L'administration d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaires déclenche des réponses immunitaires médiées par les lymphocytes T en supprimant l'interaction des récepteurs inhibiteurs des cellules T avec leurs ligands correspondants sur les cellules tumorales ou stromales.

En levant les freins du système immunitaire, on réactive une réponse immunitaire antitumorale qui était jusque-là endormie.

b. Utilisation en oncologie

Il est essentiel de noter que les progrès cliniques apparemment rapides signalés ces dernières années sont le résultat de décennies d'investissement dans la science fondamentale dans de nombreux domaines. Sans les connaissances mécanistes de base en biologie moléculaire, en virologie, en immunologie, en biologie cellulaire et en biologie structurale, les progrès cliniques de l'immunothérapie du cancer n'auraient jamais été réalisés. Il est également important de considérer la longue histoire des efforts visant à utiliser la puissance du système immunitaire comme modalité thérapeutique contre le cancer.

Les anti-PD-1, anti PD-L1 et anti-CTLA-4 sont plus efficaces dans les tumeurs qui sont infiltrées par des cellules T. Ces tumeurs, ont des taux de mutation élevés et sont donc plus immunogènes avant le traitement. On dit de ces tumeurs que ce sont des tumeurs dites chaudes. Il s'agit de tumeurs présentant une instabilité des microsatellites (MSI), dites à haut statut MSI, c'est-à-dire porteuses de mutations sur les gènes du système MMR (MisMatch Repair) impliqués dans la réparation des erreurs de réplifications de l'ADN.

1- Anti-CTLA-4

Dans un premier temps, deux anticorps entièrement humains bloquant CTLA-4, Ipilimumab et Tremelimumab, ont fait l'objet d'essais cliniques chez des patients atteints d'un cancer avancé au début des années 2000. Il est rapidement apparu que des régressions tumorales durables pouvaient se produire, bien qu'elles fussent relativement peu fréquentes et accompagnées d'une série d'effets indésirables liés au mécanisme d'action. Les plus courantes de ces toxicités étaient l'entérocolite, l'hépatite inflammatoire et la dermatite.

L'activité clinique du blocage de CTLA-4 était la plus apparente chez les patients atteints d'un mélanome métastatique avancé, avec un taux de 15 % de réponse objective qui a été durable chez certains patients pendant plus de 10 ans après l'arrêt du traitement.

Étant donné le taux de réponse relativement faible et la toxicité fréquente associés au blocage de CTLA-4, l'identification de biomarqueurs prédictifs et pharmacodynamiques est devenue une priorité de recherche.

L'analyse des tumeurs de patients répondeurs au traitement anti-CTLA-4 montre qu'une charge mutationnelle tumorale plus élevée (patients à haut statut MSI) est associée à une plus grande probabilité de réponse.

2- Anti PD-1 & PD-L1

Les antis PD-1 et son ligand PD-L1 sont les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire les plus utilisés en pratique clinique et ont montré un spectre d'activité très large par rapport aux traitements conventionnels du cancer.

Le récepteur de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) est apparu comme un régulateur négatif dominant de la fonction effectrice des cellules T antitumorales lorsqu'il est engagé par son ligand, le ligand de mort cellulaire programmée 1 (PD-L1), exprimé à la surface des cellules d'une tumeur.

L'expression de PD-L1 induite par l'inflammation dans le micro-environnement tumoral entraîne l'épuisement des cellules T médiées par PD-1, ce qui inhibe la réponse des cellules T cytotoxiques antitumorales

Ainsi, le blocage de la voie PD-1 a un effet plus spécifique sur les lymphocytes T antitumoraux, peut-être en raison de leur état de stimulation chronique, ce qui entraîne une activité thérapeutique accrue et une toxicité plus limitée par rapport au blocage de CTLA-4. La biologie sous-jacente et les taux de réponse durable chez les patients atteints de plusieurs types de cancer indiquent que le blocage thérapeutique de la voie PD-1 est sans doute l'une des avancées les plus importantes de l'histoire du traitement du cancer.

Le nivolumab, un anti PD-1, a été administré pour la première fois à un patient en octobre 2006 dans le cadre d'un essai de phase 1 à dose progressive en perfusion unique et représente la première utilisation des anti-PD-1 chez l'homme. Parmi les 16 premiers patients qui ont reçu du nivolumab toutes les 2 semaines, six (37,5 %) ont présenté des réponses tumorales objectives, notamment des patients atteints de mélanome, de carcinome rénal et de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) (25). Les premières preuves d'une activité antitumorale dans cet essai de phase 1 ont été accompagnées d'une toxicité limitée.

Le développement clinique du pembrolizumab, un autre anti-PD-1 s'est concentré sur les patients atteints de mélanome métastatique et de NSCLC, ce qui a donné lieu à l'essai de phase 1 le plus important jamais réalisé en oncologie, qui a finalement recruté 1235 patients (24).

Comme nous pouvons le voir sur la figure 9 (26) ci-dessous, les premières approbations par la FDA d'anticorps bloquant le PD-1 ont été pour le pembrolizumab et le nivolumab pour le traitement des patients atteints de mélanome réfractaire en 2014 et, en 2015, pour les patients atteints de NSCLC avancé.

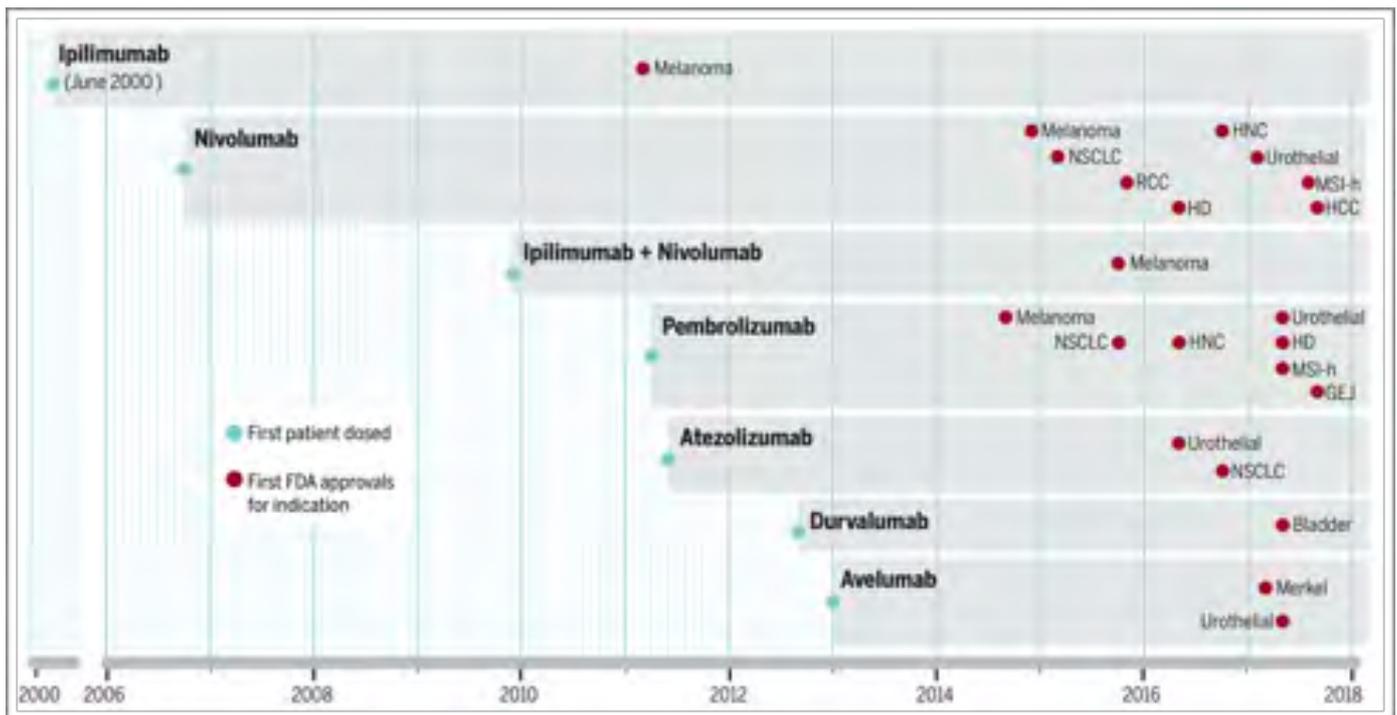


Figure 9. Développement clinique des premiers anticorps anti CTLA-4, anti PD-1 et anti PD-L1, de la première administration à l’homme à l’autorisation de mise sur le marché par la FDA (25).

Ce développement rapide de médicaments et le large éventail d'autorisations reposent sur une série de caractéristiques de l'activité clinique des anticorps bloquant la voie PD-1. L'activité antitumorale du blocage de la voie PD-1 a été observée chez un sous-ensemble de patients dans un large éventail de cancers et notamment pour le traitement des cancers instables à microsatellites ou haut statut MSI.

Un deuxième groupe de cancers présentant des taux de réponse relativement élevés est celui des cancers induits par des agents cancérigènes, tels que les variantes les plus courantes du mélanome survenant sur une peau exposée de façon intermittente, pour lesquelles les taux de réponse initiale sont actuellement de l'ordre de 35 à 40 %, et une série de cancers associés aux effets cancérigènes du tabagisme, tels que le NSCLC et les cancers de la tête et du cou, les cancers gastro-œsophagiens, les cancers de la vessie et les cancers urothéliaux, pour lesquels les taux de réponse sont de l'ordre de 15 à 25 %.

Le premier anticorps anti-PD-L1 approuvé a été l'Atezolizumab pour les cancers urothéliaux en 2016, suivi de l'Avelumab pour le carcinome à cellules de Merkel en 2017.

Depuis le premier essai clinique visant à tester un anticorps monoclonal ciblant PD1 en 2006, six anticorps monoclonaux ciblant soit PD1 soit son ligand PD-L1 ont été approuvés par la FDA pour traiter 14 types de cancers. Entre-temps, l'augmentation du nombre d'essais cliniques actifs testant les agents anti-PD1/PDL1 a été spectaculaire, passant d'un seul en 2006 à près de 2000 en septembre 2018.

L'immunothérapie du cancer est un domaine en plein essor comme en atteste le nombre d'essais cliniques concernant les anticorps bloquant les points de contrôle immunitaire qui font l'objet de recherches actives. Parmi ces essais cliniques, nombreux sont ceux qui testent des régimes combinant des agents anti-PD1/PDL1 avec d'autres thérapies contre le cancer.

3- Combinaison d'anti-PD-1 et d'anti-PD-L1 avec d'autres thérapies

Bien que seulement deux thérapies combinant les anti-PD1 avec d'autres agents ont été approuvés par la FDA, de nombreuses combinaisons d'agents anti-PD1/PDL1 avec des thérapies contre des cibles différentes sont en cours d'évaluation.

La première à avoir été approuvée par la FDA est la combinaison du nivolumab et de l'ipilimumab (27). En décembre 2009, le premier patient a été traité par un blocage combiné des points de contrôle en utilisant l'ipilimumab pour bloquer CTLA-4 et le nivolumab pour bloquer PD-1. Ce traitement a été conçu sur la base des rôles co-inhibiteurs non redondants des deux voies, après que des études précliniques aient montré une synergie dans des modèles de souris. En outre, les micro-environnements immunitaires distincts dans lesquels le blocage des voies CTLA-4 et PD-1 pourrait agir ont fourni une justification mécaniste supplémentaire.

L'essai initial de phase 1 sur le dosage de l'ipilimumab et du nivolumab a été mené chez des patients atteints de mélanome métastatique et a démontré un taux de

réponse objective > 50 %. L'analyse la plus récente a montré que les patients initialement randomisés pour l'association avaient une survie à 3 ans légèrement supérieure à celle des patients recevant initialement le nivolumab en monothérapie.

Parmi les cinq cancers les plus étudiés avec des anti PD-1 & anti PD-L1 ou en combinaison on retrouve le cancer du poumon, le mélanome, le cancer du sein les lymphoïdes et le cancer de la tête et du cou.

L'une des caractéristiques de l'immunothérapie est la durabilité des réponses, très probablement due à la mémoire du système immunitaire adaptatif, ce qui se traduit par une survie à long terme pour un sous-ensemble de patients. Contrairement aux thérapies oncogéniques ciblées, dans lesquelles la plupart des réponses tumorales durent jusqu'à ce que le cancer se développe, dans les immunothérapies du cancer, le taux de rechute est plus faible.

Malgré les taux de réponse durable sans précédent observés avec les immunothérapies anticancéreuses, la majorité des patients ne tirent pas ne bénéficient pas du traitement (résistance primaire), et certains répondeurs rechutent après une période de réponse (résistance acquise). Plusieurs types de cancers courants ont montré une très faible fréquence de réponse (cancers du sein, de la prostate et du côlon), et des réponses hétérogènes ont été observées même entre tumeurs distinctes chez un même patient.

Un des buts de la recherche est d'augmenter le nombre de patients susceptibles de bénéficier de ce type de thérapies. La description des mécanismes cellulaires et moléculaires de la résistance primaire et acquise au traitement par blocage des points de contrôle permet de concevoir des approches d'immunothérapie combinée pour surmonter ces mécanismes de résistance.

Il est ainsi important de souligner que de nombreux autres points de contrôle représentent des cibles prometteuses pour le blocage thérapeutique sur la base d'expériences précliniques et que des inhibiteurs de nombre d'entre eux sont en cours de développement actif.

Cependant, en examinant les mécanismes de résistance aux thérapies immunologiques, il est important de se rappeler que la réponse immunitaire est dynamique et évolue constamment chez chaque patient soit en raison de facteurs environnementaux et génétiques propres au patient ou à la suite d'interventions thérapeutiques, notamment la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'immunothérapie.

Des stratégies émergentes visant à améliorer les réponses à l'immunothérapie sont en cours d'élaboration sur la base de nouvelles connaissances sur les cellules T et la fonction immunitaire globale. On sait depuis un certain temps que la constitution génétique des individus peut influencer sur leur réaction à un médicament, ce qui a donné naissance à l'idée de médecine de précision. Une dimension supplémentaire a été ajoutée avec la proposition selon laquelle les variations du microbiote intestinal d'une personne pouvaient influencer les effets d'un traitement. En effet les inhibiteurs de points de contrôle, qui ne sont efficaces que chez 35 à 40 % des patients, pourraient être affectés par le microbiote.

Les données suggérant l'importance du microbiote commensal dans l'efficacité clinique de l'immunothérapie du cancer ont peut-être été obtenues par le séquençage d'échantillons de selles de base provenant de patients traités avec des thérapies à base d'anticorps ou de PD-1.

Gopalakrishnan *et al*, 2018 (28) ont montré qu'au sein d'une cohorte de cent-douze patients traités par immunothérapie, des différences significatives entre répondeurs et non répondeurs étaient observées dans la diversité et la composition microbiote intestinal. Ils ont constaté une plus grande abondance de bactéries définies dans l'intestin des patients ayant répondu au traitement. Les patients qui n'ont pas répondu présentaient un déséquilibre dans la composition de la flore intestinale, ce qui était en corrélation avec une activité réduite des cellules immunitaires.

Ainsi, la modulation de la flore intestinale pourrait permettre d'améliorer les taux de réponse et ainsi aider les patients à combattre le cancer.

C. Potentialiser l'efficacité des inhibiteurs de checkpoints immunitaires par *B. pseudolongum* : Preuve de concept

a. Introduction

En plus de ses propriétés pro-oncogéniques, Il a été démontré que le microbiome intestinal participe à la résistance à un large éventail de traitements anticancéreux. L'accumulation de preuves (29) confirme le rôle positif des bactéries dans la lutte contre les cancers situés à des endroits éloignés de l'intestin, grâce à la potentialisation des réponses immunitaires antitumorales de l'hôte. Des études épidémiologiques étayées par des expériences sur des rongeurs suggèrent une association dose-dépendante entre l'utilisation d'antibiotiques et le risque de cancer. Prises ensemble, ces études ont établi le cadre théorique permettant d'identifier les microbes susceptibles de conférer des activités anticancéreuses et ainsi le microbiote intestinal est soupçonné d'affecter l'efficacité positivement l'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques, comme la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie.

Ici, nous discuterons de l'impact du microbiome bactérien sur la relation entre le cancer et le système immunitaire, et de l'utilité thérapeutique potentielle de la manipulation directe du microbiote commensal comme approche pour améliorer l'efficacité de l'immunothérapie du cancer.

Parmi les pionniers, l'étude de Paulos et al. (30), en 2007, a apporté un premier indice suggérant un effet immunothérapeutique du microbiome après l'irradiation totale du corps des souris et la translocation d'un produit bactérien, le lipopolysaccharide du récepteur 4L, de la lumière intestinale aux organes lymphoïdes secondaires, les ganglions lymphatiques mésentériques. La libération de lipopolysaccharides microbiens (LPS) induite par cette irradiation a activé la réponse immunitaire innée par la stimulation de la voie TLR4 et a ensuite stimulé les cellules T CD8+ anti-tumorales, tandis que le traitement antibiotique ou la neutralisation des LPS (avec la polymyxine B) ont été associés à une diminution de la réponse anti-tumorale.

De récentes études précliniques et quelques études cliniques portant sur plusieurs types de cancer soutiennent fortement le rôle clé des bactéries intestinales dans la modulation de la réponse de l'hôte à l'immunothérapie suggérant que les microbes intestinaux jouent un rôle significatif dans la réponse en modulant l'efficacité des médicaments et que le traitement avec des bactéries pourrait aider à surmonter la résistance primaire aux thérapies ICI.

Il est intéressant de noter que les premières études sur les ICI et l'effet positif du microbiome ont été décrits pour le cancer colorectal, mais aussi pour d'autres types de malignités développées à distance de l'intestin, comme le mélanome, les cancers des ovaires et des poumons, l'adénocarcinome du canal pancréatique et le sarcome. Bien que les mécanismes ne soient pas bien compris, ces études confirment le rôle central de la modulation des cellules lymphoïdes et myéloïdes à distance par le microbiote intestinal.

L'une de ces études (31) a montré que les souris sans microbiote ou les souris traitées aux antibiotiques n'étaient pas capables de répondre aux anti CTLA-4. Lors de cette étude certaines bactéries du genre bactéroïdes ont été isolés et associés à une réponse efficace aux anti-CTLA-4.

Le rétablissement de l'efficacité des anti CTLA-4 après l'alimentation orale par des bactéries du genre *Bactéroïdes* de souris initialement sans microbiome ont été associés à une augmentation des cellules Th1 et des cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes, ce qui a conduit à une augmentation de la réponse anti-CTLA-4.

Cette réponse d'immunothérapie médiée par le microbiote pourrait également être soutenue par le recrutement de cellules dendritiques matures dans le microenvironnement tumoral.

Également chez les patients atteints de mélanome métastatique traités avec l'ipilimumab, l'abondance des *Bacteroides spp.* a été montré comme inversement corrélée à la gravité de la colite chez la souris ouvrant ainsi sur une potentielle

utilisation pour à la fois augmenter l'efficacité des anti CTLA-4 et limiter les effets indésirables.

De tel résultats ont été obtenus par différentes équipes et dans chaque cas, l'efficacité thérapeutique a été réduite lorsque le microbiote intestinal était absent ou manipulé. Les mécanismes fins qui expliquent la contribution du microbiome aux réponses immunitaires anticancéreuses induites par la thérapie diffèrent pour chaque modalité de traitements issues du microbiome.

Nous nous intéresserons par la suite aux résultats de l'équipe canadienne du laboratoire de Calgary qui ont identifié une nouvelle voie microbienne métabolite-immune activée par l'immunothérapie et qui peut être exploitée pour développer des thérapies adjuvantes issues du microbiome.

b. Potentialiser l'efficacité des inhibiteurs de checkpoints immunitaires par *B. pseudolongum* : Preuve de concept scientifique

Intéressons-nous maintenant aux résultats de l'étude canadienne de Calgary (32) qui a mis en évidence le potentiel d'une souche de *Bifidobacterium pseudolongum* utilisée en association avec des ICI afin de potentialiser leur effet dans différents modèles de tumeurs chez la souris. Cette preuve de concept scientifique est à la base du programme de développement, mené par YSOPIA Bioscience, et auquel nous allons nous intéresser dans la Partie IV de ce travail de thèse.

1- Identification des bactéries qui favorisent la réponse à l'immunothérapie par ICI

Tout d'abord, les chercheurs ont étudié l'efficacité de l'immunothérapie par ICI dans un modèle de souris où des tumeurs coliques ont été induites puis ils ont administré un traitement avec des anticorps anti-CTLA-4 ou anti-PD-L1 qui a permis de réduire considérablement le nombre et la taille des tumeurs.

Ensuite, ils ont utilisé ce même modèle pour rechercher des bactéries potentiellement bénéfiques associées à la réactivité des ICI. Ils ont procédé à une culture anaérobie de tumeurs homogénéisées des deux groupes et ont pu cultiver et identifier vingt et un isolats bactériens distincts puis ont réalisé une culture anaérobie de tumeurs homogénéisées afin d'y cultiver et identifier 21 isolats bactériens distincts.

Tumor invading bacteria (Culture)

Bacteria isolated	% of tumors		p Value
	ICB (n= 19)	Iso (n=14)	
<i>B. pseudolongum</i>	31.6	0	0.027
<i>L. johnsonii</i>	68.4	42.9	0.173
<i>Olsenella sp.</i>	15.8	0	0.244
<i>Prevotella sp.</i>	10.5	0	0.496
<i>Colidextribacter sp.</i>	10.5	0	0.496
<i>Bacillus sp.</i>	10.5	0	0.496
<i>B. acidifaciens</i>	15.8	7.1	0.620
<i>A. muciniphila</i>	5.3	0	1.000
<i>L. reuteri</i>	5.3	0	1.000
<i>E. faecalis</i>	52.6	50.0	1.000
<i>S. xylosum</i>	5.3	7.1	1.000
<i>P. excrementihominis</i>	10.5	14.3	1.000
<i>Bacteroides sp.</i>	0	7.1	1.000
<i>C. cocleatum</i>	0	7.1	1.000
<i>Bacteroides sp.</i>	0	7.1	1.000
<i>Collinsella sp.</i>	0	7.1	1.000
<i>Muribaculum sp.</i>	42.1	50.0	0.733
<i>A. equolifaciens</i>	5.3	14.3	0.561
<i>P. goldsteinii</i>	15.8	28.6	0.422
<i>Faecalibaculum sp.</i>	15.8	28.6	0.422
<i>B. faecis</i>	47.4	71.4	0.286

Figure 10. Bactéries cultivées à partir de tumeurs homogénéisées en conditions anaérobies provenant d'animaux traités par anti-PD-L1 ou anti-CTLA-4. (32)

Les bactéries isolées uniquement des tumeurs traitées par ICI sont représentées en vert, et les bactéries isolées des tumeurs traitées par ICI et par isotype sont représentées en jaune ; les bactéries isolées uniquement des tumeurs traitées par isotype sont représentées en orange

Le séquençage des communautés bactériennes associées aux tumeurs a révélé des différences dans la diversité bactérienne et des différences dans l'abondance des genres bactériens dans les tumeurs traitées par ICI. Sept espèces bactériennes ont été cultivées uniquement à partir des tumeurs traitées par l'ICI, alors que quatre n'ont été trouvées que dans le groupe témoin. *Bifidobacterium pseudolongum* était l'un des isolats cultivés uniquement à partir de tumeurs traitées par ICI et a été identifié comme différentiellement abondant par séquençage.

Il est intéressant de noter qu'*Akkermansia muciniphila*, qui a récemment été identifiée pour renforcer l'efficacité des traitements anti-PD-L1 et anti-PD-1 dans les cancers du poumon et du rein (33), était également l'une des sept bactéries cultivées uniquement à partir de tumeurs traitées par ICI.

Ensuite, ils ont tenté de déterminer si l'efficacité de la thérapie ICI dans le cancer colorectal dépendait du microbiote, comme cela a été démontré avec d'autres types de tumeurs, dans un modèle *in vivo* de cancer colorectal où des cellules cancéreuses colorectales MC38 ont été implantées dans le flanc de souris sans germes (GF) ou sans pathogènes spécifiques (SPF), suivies d'une thérapie ICI une fois les tumeurs palpables.

Pour évaluer si les bactéries isolées qui étaient enrichies dans les tumeurs des souris traitées par ICI étaient capables de renforcer l'efficacité de la thérapie ICI, des souris sans germes (GF) ont été monocolonisées avec cinq espèces bactériennes isolées différentes. Par la suite des cellules tumorales de cancer colo-rectal, MC38, ont été injectées de façon à des souris monocolonisées ou GF en sous cutané (s.c). Enfin sept jours plus tard, lorsque les tumeurs étaient palpables, les souris ont été traitées avec des anti-CTLA-4 en intra péritonéal (i.p). Les tumeurs ont été analysées trois jours après la dernière injection d'anti-CTLA-4.

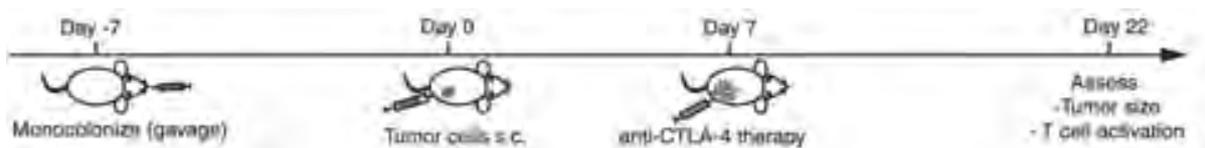


Figure 11. Schéma du dispositif expérimental (32)

Comme le montre la figure ci-dessous parmi les cinq espèces bactériennes testées, la monocolonisation avec les espèces *B. pseudolongum*, *Lactobacillus johnsonii* et *Olsenella* a significativement amélioré l'efficacité du traitement anti-CTLA-4 par rapport aux souris GF ou aux souris monocolonisées avec les espèces *Colidextribacter* ou *Prevotella*.

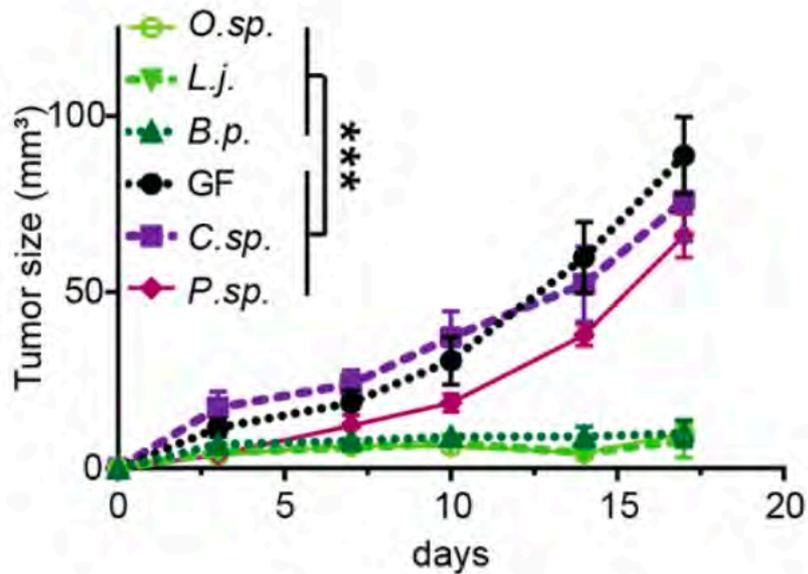


Figure 12. Efficacité du traitement par anti CTLA-4 chez des souris monocolonisées. (32)

Le poids des tumeurs est indiqué chez les souris porteuses de tumeurs MC38 sans germe (GF) ou monocolonisées (B. pseudolongum, Colidextribacter species, L. johnsonii ou Olsenella species) et traitées avec des anti-CTLA-4

En outre, nous pouvons observer dans la figure ci-dessous que l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ a considérablement augmenté chez les souris monoconolisées avec les espèces *B. pseudolongum*, *Lactobacillus johnsonii* et *Olsenella*.

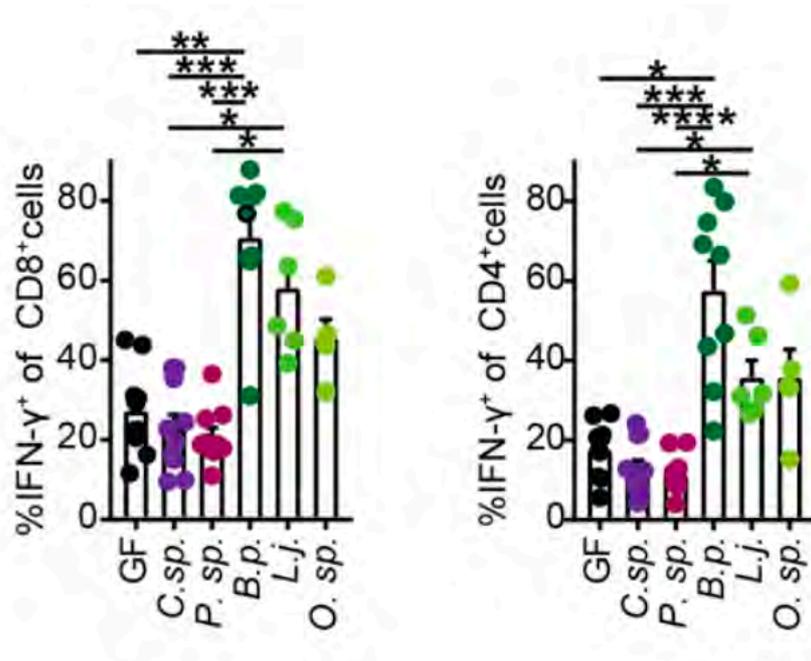


Figure 13. Quantification des cellules T intra tumorales chez des souris porteuses de tumeurs MC38 et monoconisées. (32)

La quantification des cellules T intratumorales $IFN-g+CD8+$ et $IFN-g+CD4+$ est présentée chez des souris porteuses de tumeurs MC38 GF ou monocolonisées (*B. pseudolongum*, *Colidextribacter species*, *L. johnsonii*, *Olsenella species* ou *Prevotella species*)

En addition de ces résultats prometteurs avec des anti CTLA-4, des données d'efficacité complémentaire ont été obtenu en associant la souche isolée de *B. pseudolongum* et un traitement par anti-PD-L1 dans le modèle tumoral MC38. Les tumeurs ont été analysées trois jours après la dernière injection d'anti PD-L1. On y voit clairement une forte réduction du poids de la tumeur chez les souris monocolonisées avec *B. pseudolongum* et traitées avec un anti-PD-L1 par rapport à des souris monocolonisées par des souches de l'espèce *Colidextribacter*.

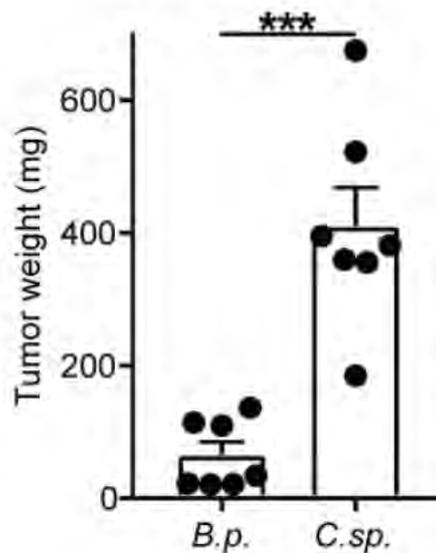


Figure 14. Efficacité sur le poids tumoral du traitement par anti PD-L1 chez des souris monocolonisées. (32)

*Les souris GF ont été monocolonisées avec des espèces de *B. pseudolongum* ou de *Colidextribacter*. Puis sept jours plus tard, des cellules MC38 ont été injectées s.c. et encore sept jours plus tard, lorsque les tumeurs étaient palpables, les souris ont été traitées avec 100µg anti-PD-L1 i.p.*

Étant donné que la souche de *B. pseudolongum* a produit l'effet de promotion des ICI le plus robuste sur différents modèles, il a été sélectionné pour des études mécanistiques supplémentaires. Il convient de noter que d'autres espèces de *Bifidobacterium*, telles que *B. breve* et *B. longum*, ont précédemment été trouvées pour promouvoir l'immunité antitumorale et améliorer l'efficacité anti-PD-L1 dans un modèle murin de mélanome (34). Chez l'homme, il a été rapporté que *B. longum* est enrichi en répondeurs anti-PD-1 (35).

2- Études mécanistiques du *B. pseudolongum*

Il a été démontré qu'en l'absence de co-administration d'ICI, la monocolonisation avec la souche *B. pseudolongum* n'a pas permis de réduire la croissance tumorale. On constate ainsi que l'immunité anti-tumorale dépend de la présence de l'immunothérapie ICI. Bien que *B. pseudolongum* n'ait pas induit d'immunité antitumorale en l'absence de thérapie ICI, la souche de *B. pseudolongum* a induit une augmentation significative de l'expression du facteur de transcription de la cellule T helper 1 (TH1) sans augmenter l'activation de la fonction effectrice de la cellule TH1. Ainsi, en l'absence de tumeurs et de thérapie ICI, *B. pseudolongum* a favorisé la différenciation transcriptionnelle de TH1 dans le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT) sans augmenter la fonction effectrice dans l'intestin et les ganglions lymphatiques drainants. Il est donc possible de conclure à une complémentarité entre la souche de *B. pseudolongum*, induisant la différenciation TH1, et de l'anti-CTLA-4, activant les cellules T effectrices TH1.

De plus, malgré le fait que *B. pseudolongum* ait été initialement isolé de tumeurs intestinales, la présence de bactéries dans les tumeurs n'était pas requise pour l'amélioration de la thérapie ICI, ce qui suggère l'implication potentielle de facteurs solubles. La translocation des métabolites pourrait donc être responsable de l'effet systémique de *B. pseudolongum* lors de la thérapie par ICI.

Pour répondre à cette hypothèse, le sérum recueilli à partir de souris monocolonisées porteuses de tumeurs GF, *B. pseudolongum* ou *Colidextribacter spp*, puis stimulées par un anti CTLA-4, a été transféré en même temps que l'anti-CTLA-4 dans des souris porteuses de tumeurs GF MC38.

De manière inattendue, le sérum de souris monocolonisées par la souche de *B. pseudolongum* et traitées par anti CTLA-4, contrairement au sérum de souris monocolonisées GF ou par *Colidextribacter* traitées par anti-CTLA-4, était suffisant pour réduire la croissance tumorale et susciter une forte immunité anti-tumorale dans la tumeur.

La métabolomique non ciblée des échantillons de sérum a révélé des niveaux accrus de plusieurs métabolites dans les sérums de *B. pseudolongum* par rapport aux souris *C. sp.* monocolonisées et GF.

Notamment, le métabolite purine inosine était le seul métabolite qui était significativement plus abondant (8 à 9 fois). Il convient de noter que la xanthine et l'hypoxanthine, produits de dégradation de l'inosine, ont également été élevées dans les sérums de souris monocolonisées par *B. pseudolongum*. L'analyse du surnageant de culture bactérienne a révélé que *B. pseudolongum* produisaient des quantités d'inosine nettement plus élevées que les espèces de *Colidextribacter* dans les mêmes conditions de culture révélant que l'inosine est un métabolite bactérien produit par la souche *B. pseudolongum*.

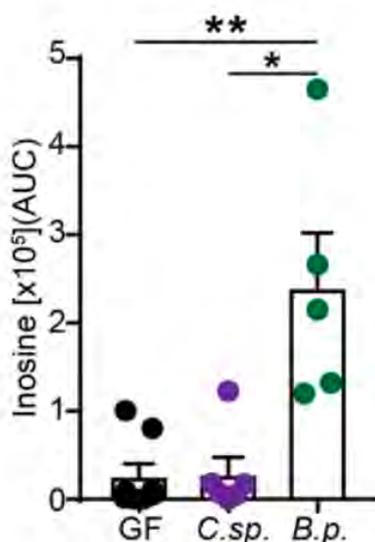


Figure 15. Intensité de l'inosine (AUC, aire sous la courbe) dans les sérums de souris monocolonisées. (32)

L'identification de l'inosine a d'abord été surprenante car l'inosine se lie au récepteur de l'adénosine 2A (A2AR), dont il a été démontré (36) qu'il avait un effet

inhibiteur sur la différenciation Th1 in vitro et sur l'immunité anti-tumorale in vivo. En effet, les données soutenant le rôle immunosuppresseur de l'adénosine et de la signalisation A2AR ont conduit au développement de nouvelles cibles d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, tels que les anticorps monoclonaux ciblant CD73, CD39 et CD38, et des antagonistes pharmacologiques d'A2AR, dont beaucoup sont actuellement en essais cliniques. Cependant, un petit nombre de publications ont démontré que les analogues de l'inosine peuvent être pro-inflammatoires et que la signalisation A2AR peut soutenir l'immunité Th1/anti-tumorale chez les souris (37).

Sur la base de ces résultats contradictoires, les chercheurs ont cherché à savoir si l'inosine pouvait renforcer la différenciation des cellules TH1 in vitro. Il est intéressant de noter que l'effet de l'inosine en termes d'induction ou d'inhibition de la différenciation des cellules T CD4⁺ Th1 s'est avéré dépendant du contexte. Plus précisément, en présence d'IFN- γ exogène, l'inosine a fortement stimulé la différenciation Th1 des cellules T naïves, alors qu'en l'absence d'IFN- γ , l'inosine a inhibé la différenciation Th1.

Il a ensuite été déterminé si la capacité de *B. pseudolongum* à renforcer l'ICI nécessitait l'expression d'A2AR spécifiquement sur les cellules, comme on peut le voir ci-dessous, en l'absence d'expression des A2AR sur les cellules T (A2AR KO), l'effet promoteur de l'ICI de la souche *B. pseudolongum* a été réduit. On peut donc déduire à ce stade que la liaison de l'inosine à son récepteur A2AR est nécessaire à la promotion de l'effet anti tumoral.

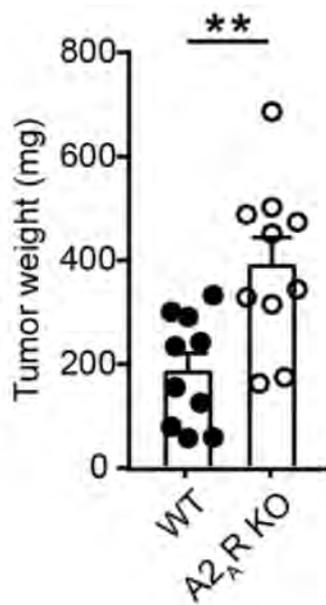


Figure 16. Quantification du poids tumoral chez les souris porteuses de tumeurs MC38, monoclonisées avec *B. pseudolongum* en présence (WT) ou non (A2AR KO) de récepteurs A2AR et traitées et traitées avec un anti CTLA-4 (32)

Comme on peut le voir dans la figure ci-dessous, afin de déterminer si l'inosine pourrait favoriser l'immunité anti-tumorale induite par l'anti-CTLA-4 en l'absence de *B. pseudolongum*. Les souris GF ont été confrontées à des cellules tumorales MC38 et, lors de l'apparition de tumeurs palpables, de l'inosine ou une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) a été administrée par voie orale ou systémique en association avec un traitement anti-CTLA-4 et du CpG comme costimulus. Les oligonucléotides CpG étant des activateurs des cellules dendritiques.

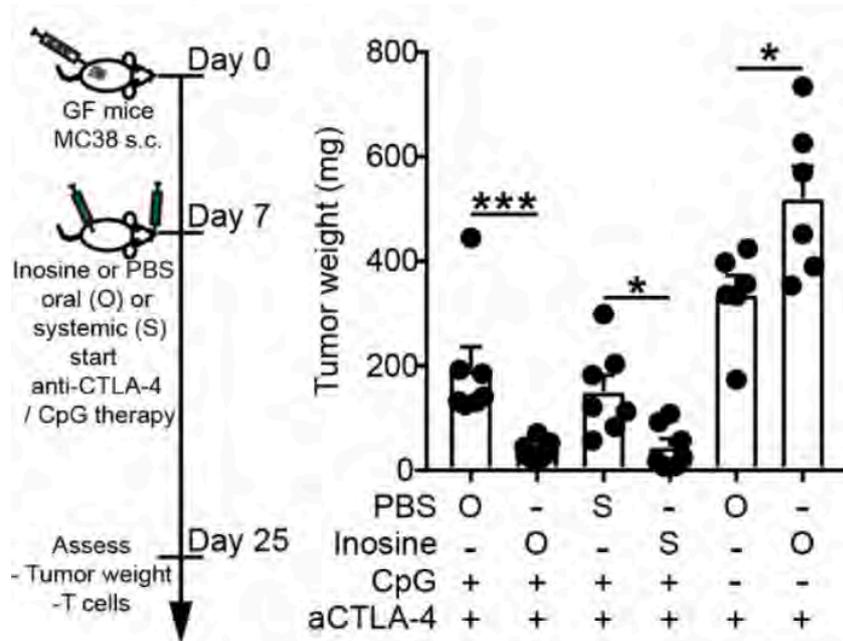


Figure 17. Aperçu schématique du montage expérimental et évaluation de l'effet de l'inosine sur l'immunité anti-tumorale par la quantification du poids tumoral. (32)

Une fois les tumeurs palpables, les souris ont été traitées avec 100 µg anti-CTLA-4 i.p. et, dans certains groupes, 20 µg CpG i.p. En outre, de l'inosine ou du PBS ont été administrés quotidiennement par voie orale (O) par gavage ou par voie systémique (S) par injection i.p.

Par rapport au PBS, l'administration orale et systémique d'inosine a entraîné une réduction du poids des tumeurs et une augmentation de l'immunité antitumorale lorsqu'elle était administrée en même temps que des anti-CTLA-4 et des CpG. En revanche, en l'absence de CpG, l'inosine a augmenté le poids des tumeurs et réduit l'immunité antitumorale, validant de précédents résultats qui démontraient que l'effet de l'inosine dépendait du contexte et de la présence ou de l'absence de costimulation des cellules dendritiques. Sans costimulation CpG, l'inosine est inefficace.

L'immunité antitumorale induite par l'inosine dépendait également de la signalisation A2AR dans les cellules T, car une supplémentation orale en inosine n'a pas réussi à induire une immunité antitumorale. Ces données ont indiqué que l'effet de promotion de l'ICI de *B. pseudolongum* était médié par l'inosine et dépendait de la signalisation A2AR spécifiquement dans les cellules T.

En plus de la stimulation directe des cellules T, l'inosine pourrait potentiellement affecter directement les cellules tumorales en modifiant la survie des cellules tumorales ou la susceptibilité à la destruction médiée par les cellules T. Cependant, l'exposition directe in vitro des cellules tumorales MC38 à l'inosine n'a pas modulé la viabilité des cellules tumorales, ce qui permet de conclure que l'effet antitumoral de l'inosine est principalement médié par les cellules T.

Ces données indiquent que l'effet de l'inosine sur les cellules T nécessite une co-stimulation suffisante probablement par les cellules dendritiques. Par conséquent, la déplétion des cellules dendritiques a fortement entravé la capacité de la réponse ICI induite par les bactéries à réduire les tumeurs établies, ce qui indique la nécessité d'une présentation continue de l'antigène et d'une co-stimulation des cellules T par les cellules dendritiques pour une thérapie ICI efficace.

Ainsi, comme le présente la figure ci-dessous (38), nous pouvons mettre en évidence un mécanisme d'action, *B. pseudolongum* va sécréter dans un premier temps l'inosine qui exerce son effet, à savoir en se liant au récepteur A2a sur les cellules T. L'effet de l'inosine nécessite d'avoir une co-stimulation, restant à identifier, des cellules dendritiques qui va conduire à la différenciation Th1 et stimulent l'activité des cellules T contre les cellules cancéreuses.

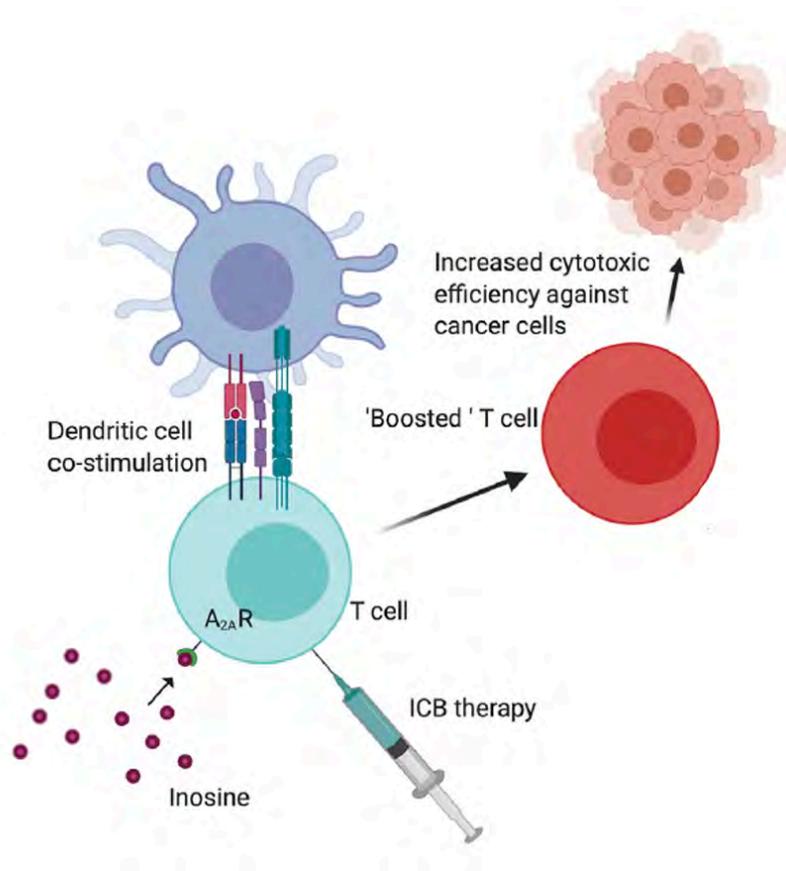


Figure 18. Mécanisme d'action présumé de la souche de *B. pseudolongum*. (38)

3- Utilisation potentielle

L'amélioration de l'immunité Th1 étant généralement considérée comme bénéfique pour la plupart des réponses anti-tumorales, les chercheurs ont ensuite déterminé si la colonisation intestinale avec les bactéries isolées favorisant les ICI ou le traitement à l'inosine pourrait être aussi efficaces dans d'autres modèles tumoraux.

Tout d'abord, il a été testé l'effet promoteur de *B. pseudolongum* sur un modèle d'animaux qui développent des adénocarcinomes dans l'intestin grêle et qui présentent une inactivation conditionnelle de Msh2 (un gène de réparation des erreurs d'ADN). Ce modèle permet d'attester de l'effet de potentielles biothérapies sur des cancers à haute variabilité génétique dits à haut statut MSI, décrivant les cellules

cancéreuses qui présentent un nombre élevé de mutations au sein des microsatellites. L'administration orale d'inosine associée à un traitement anti-CTLA-4 et CpG a entraîné une réduction significative du poids des tumeurs.

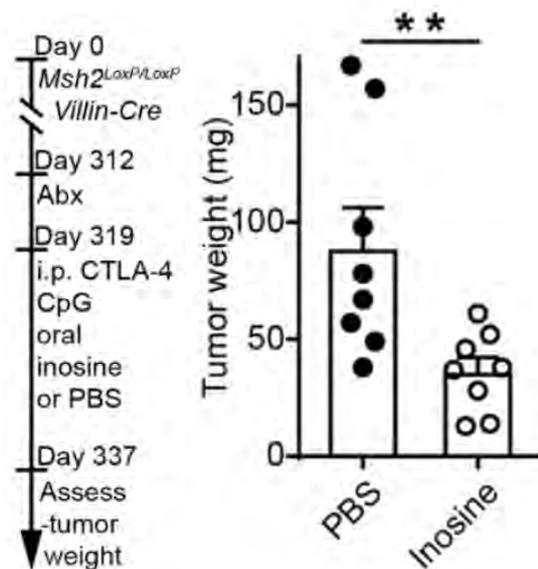


Figure 19. Analyse du poids tumoral à la suite du montage expérimental pour évaluer l'effet de l'inosine dans un modèle de CRC dit à haut statut MSI. (32)

Les souris ont reçu le modèle Msh2LoxP dit de Villin-cre à J0. Le jour 312, les souris ont reçu des antibiotiques par voie orale jusqu'à la fin de l'expérience et le jour 319, les souris ont reçu des anti-CTLA-4 par voie i.p., 20 µg de CpG par voie i.p et du PBS ou de l'inosine par voie orale par gavage quotidiennement.

Également, et afin d'ouvrir des possibilités de développement clinique vers d'autres indications, les chercheurs ont testé l'inosine associée au CpG (mimant la costimulation des cellules dendritiques) dans d'autres modèles de cancer murins et s'est également avérée efficace pour promouvoir l'efficacité des anti-CTLA-4.

Des premiers résultats encourageants ont été obtenus dans un modèle de lignée cellulaire de carcinome vésical de souris, MB49, qui est largement utilisée comme modèle in vitro et in vivo du cancer de la vessie. Plus précisément, l'administration

d'inosine plus du CpG à des souris GF a permis d'améliorer significativement la capacité d'anti-CTLA-4 à réduire le poids des tumeurs et à augmenter la proportion de cellules T IFN- γ +CD4+ et IFN- γ +CD8+ infiltrant les tumeurs.

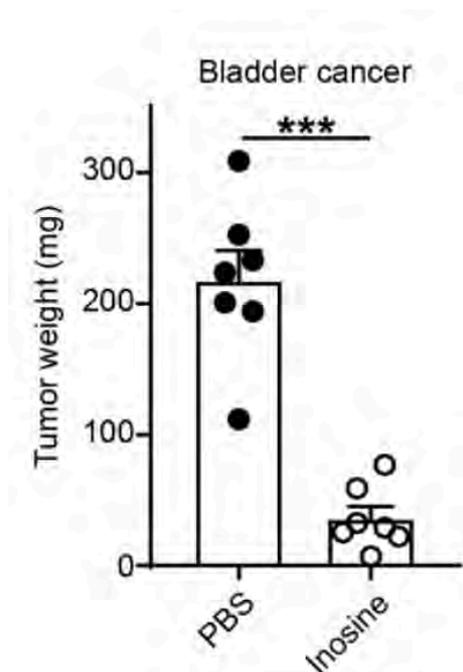


Figure 20. Poids de la tumeur du dispositif expérimental afin d'évaluer l'effet de l'inosine sur le modèle de cancer de la vessie MB49. (32)

De même, et avec pour objectif de générer de nouvelles données dans différents modèles pour pouvoir prétendre à une utilisation future plus large, les chercheurs ont par la suite testé d'augmenter la capacité des anti-CTLA-4 à médier l'immunité antitumorale par l'inosine plus la CpG dans un autre modèle murin de mélanome, B16-F10 étant une lignée cellulaire isolée à partir du tissu cutané d'une souris atteinte de mélanome.

Nous avons vu que de nouvelles données dans de nouveaux modèles de cancer permettant ainsi d'envisager une utilisation plus large ont été obtenues précédemment avec des ICI et notamment anti-CTLA-4. Toujours dans un souci d'élargir le scope d'utilisation de cette future biothérapie, les chercheurs ont généré

de nouvelles données prometteuses avec des anti-PD-L1 et PD-1 permettant d'envisager la possibilité de confirmer le potentiel clinique de l'association *B. pseudolongum* avec des anti-PD-L1 et anti-PD-1.

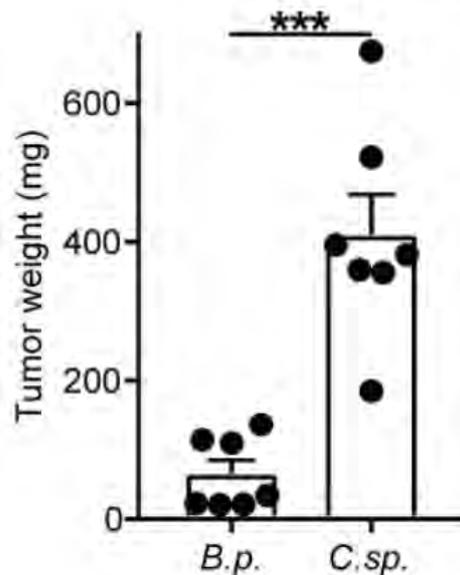


Figure 21. *B. pseudolongum* renforce l'efficacité de la thérapie anti-PD-L1. (32)

Analyse de la taille tumorale trois jours après la dernière injection d'anti-PD-L1. Les souris GF ont été monocolonisées avec des espèces de B. pseudolongum ou de Colidextribacter. Sept jours plus tard, 1x10⁶ cellules MC38 ont été injectées s.c. et sept jours plus tard, lorsque les tumeurs étaient palpables, les souris ont été traitées par anti-PD-L1 i.p.

c. Conclusion

Les résultats de cette étude identifient une souche de *B. pseudolongum* isolée à partir de tumeurs du CRC traitées par ICI comme une espèce bactérienne intestinale commensale clé, capable de stimuler un circuit de cellules TH1 dépendant des cellules dendritiques pour améliorer considérablement l'effet des thérapies ICI dans

des modèles murins de tumeurs intestinales et épithéliales. Ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle la modification du microbiote ou les thérapies bactériennes ciblées peuvent constituer une thérapie adjuvante prometteuse aux ICI dans le CRC et d'autres cancers.

Ces résultats prometteurs soutiennent fortement l'inclusion du ciblage microbien dans les stratégies d'immunothérapie antitumorale afin d'améliorer leur efficacité, comme le montre déjà certains essais cliniques. Toutefois, la traduction clinique des effets du microbiome sur l'immunothérapie est limitée par le fait que la plupart des études précliniques ont été menées sur des souris porteuses d'une tumeur syngénique ectopique qui ont déjà subi un processus d'édition immunitaire avant d'être transférées sur leur nouvel hôte. Ces modèles ne peuvent pas tenir compte des interactions en constante évolution entre le système immunitaire et les tumeurs pendant les phases d'élimination, d'équilibre et d'échappement du cancer. Une compréhension plus approfondie des mécanismes moléculaires sous-jacents est nécessaire

Une étude récente fournit un catalogue de plus de 200 000 gènes de référence collectifs provenant de l'intestin humain uniquement, représentant plus de 4 600 espèces distinctes, et compte de manière conservatrice plus de 70 millions de protéines prévues sans correspondance connue avec des bases de données ou avec des fonctions inconnues (39). L'augmentation thérapeutique du microbiome humain et la complémentation de sa fonction par des suppléments produits par voie microbienne est une approche riche en cibles pour l'identification de nouvelles thérapies et d'adjuvants dans les maladies humaines.

PARTIE III : Routes possibles pour le développement de bactéries comme biothérapies

A. Introduction

En France et dans l'Union Européenne, le code de la santé publique et la directive 2001/83/CE définissent le médicament comme étant : « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » (40,41)

Tout produit s'inscrivant dans cette définition doit obéir à une réglementation contraignante et s'inscrit dans un circuit de fabrication et de mise à disposition des professionnels de santé et des patients très encadré et strictement surveillé. De manière générale, de la recherche jusqu'à sa mise sur le marché, le développement d'un médicament représente 10000 molécules criblées pour lesquelles 10 feront l'objet d'un dépôt de brevet et 1 qui parviendra à passer toutes les étapes de tests et d'essais cliniques pour devenir un médicament.

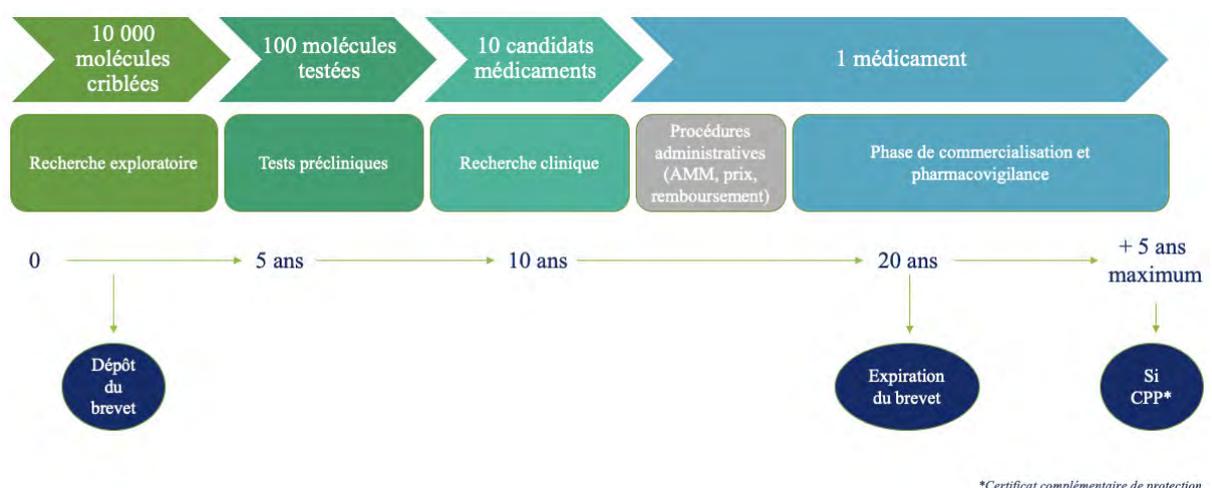


Figure 22. Cycle de vie d'un médicament. (40)

Le développement des médicaments est harmonisé depuis 1990 par le biais du Conseil international d'harmonisation des exigences techniques relatives aux produits pharmaceutiques à usage humain (ICH), qui fournit des lignes directrices sur les attentes communes des autorités réglementaires et de l'industrie pharmaceutique concernant l'enregistrement des médicaments.

Bien que les lignes directrices de l'ICH ne soient pas "contraignantes", elles contiennent des recommandations très importantes, reconnues par presque toutes les autorités pharmaceutiques du monde. Elles doivent être prises en compte pour le développement et l'enregistrement de nouveaux médicaments, car elles abordent des concepts très importants en termes de la sécurité, l'efficacité et la qualité des médicaments dans le monde entier.

Le développement des méthodes moléculaires au cours des dernières décennies a permis la détection de micro-organismes dans différents environnements, y compris les écosystèmes humains et animaux, et a fait évoluer la perception selon laquelle la plupart des micro-organismes sont menaçants, vers une meilleure compréhension de l'importance d'écosystèmes microbiens équilibrés pour la santé humaine et animale. En conséquence, de nouvelles approches thérapeutiques ont émergé, visant à rétablir l'équilibre nécessaire entre le microbiome et son hôte dans plusieurs pathologies. Lorsque ces interventions sont destinées à prévenir ou à traiter des maladies, elles relèvent, dans l'Union européenne (UE), de la définition d'un médicament selon la directive 2001/83/CE.

B. Modalités thérapeutiques

La prise en charge de nombreuses maladies en intervenant sur le microbiome est aujourd'hui une réalité. L'ensemble de ses modalités thérapeutiques est regroupé sous le terme MMP. Les *Microbiotic Medecinal Products*, ou MMP, ne sont pas encore clairement définis sur le plan règlementaire mais se présentent aujourd'hui comme étant des produits pharmaceutiques contenant un ou des composants du microbiome qu'ils soient vivants, morts ou en fragments ayant pour but de prévenir ou traiter des maladies humaines à travers des modes actions, pharmacologiques, microbiologiques, neurologiques, immunologiques ou métaboliques, ainsi que d'établir un diagnostic médical.

Ces nouvelles modalités thérapeutiques sont aujourd'hui développées dans différentes aires thérapeutiques (42) : majoritairement dans des pathologies infectieuses (24%), suivi par les maladies gastro-intestinales (20%) et l'oncologie (15%).

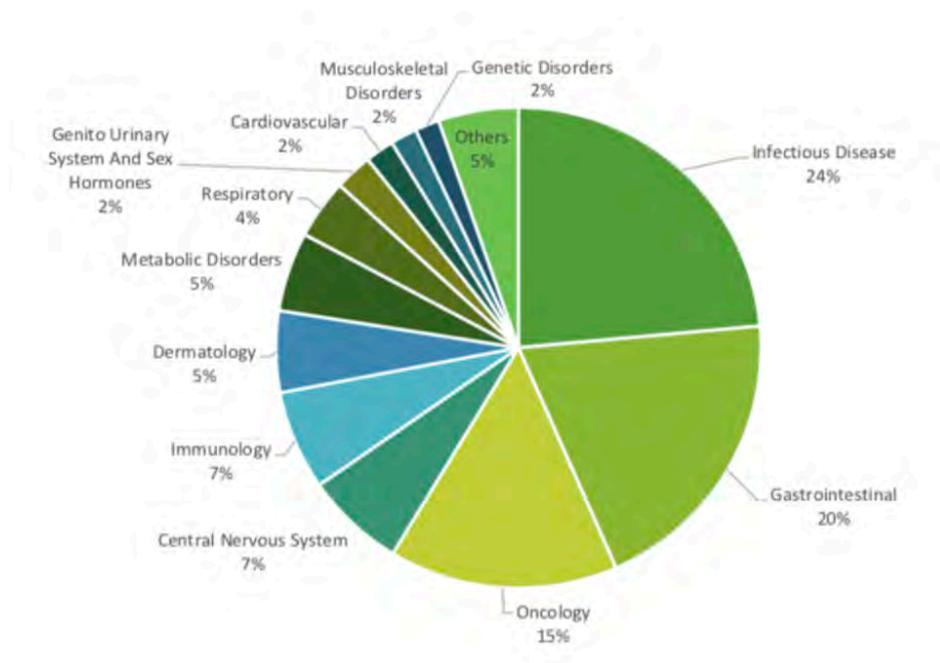


Figure 23. Aires thérapeutiques ciblées par les MMP.(42)

Trois grands domaines d'applications sont concevables au sein de ces MMP et déjà investis par des aventures industrielles françaises et internationales.

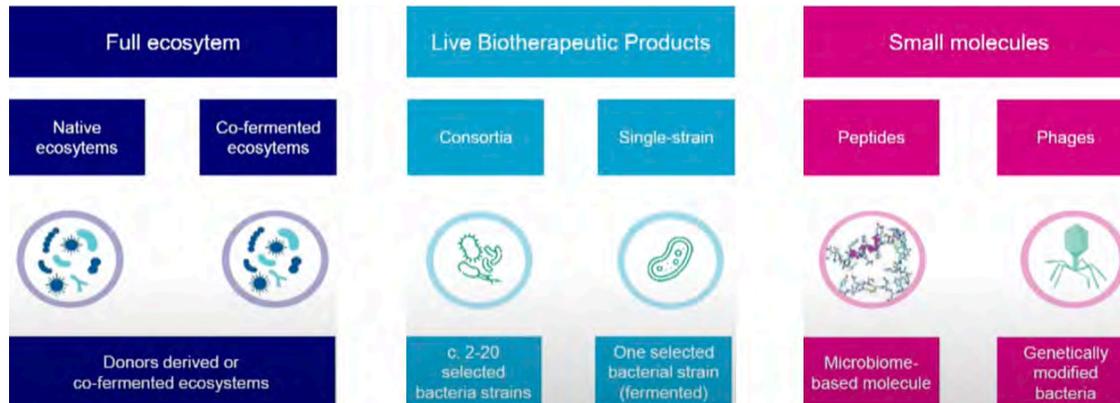


Figure 24. Domaines d'applications des MMP. (42)

Nous verrons dans un premier temps le domaine des écosystèmes complets ou thérapies microbiennes issues d'un écosystème (MET), puis celui des Live Biotherapeutics Products (LBPs). Dans cette thèse, nous ne nous intéresserons pas au domaine des petites molécules dérivées ou issues du microbiome.

La France se positionne en troisième position mondiale en nombre de projets en développement derrière les États-Unis, leaders du domaine, et la Corée. La France est la première nation Européenne suivie de près par le Royaume-Uni.

Il est important de mentionner ici que la France est le leader mondial de la recherche sur le microbiome dans le nombre de publications produites. En effet parmi les six plus grands organismes aux mondes publiant des recherches sur le microbiome, trois sont français, à savoir l'INRAE, l'INSERM et le CNRS.

a. Thérapies microbiennes issues d'un écosystème - MET

La MET est une nouvelle approche thérapeutique développée comme alternative à la transplantation fécale. Contrairement aux selles du donneur utilisées dans les transplantations fécales, qui sont des communautés complexes incomplètement caractérisées de microbes et de métabolites associés, la MET consiste en un mélange défini de cultures vivantes pures de bactéries intestinales isolées à partir d'un échantillon de selle d'un donneur sain.

Conformément au concept d'un « core microbiome » englobant les fonctions clés nécessaires à l'homéostasie intestinale normale, la MET consiste à remplacer un écosystème dysfonctionnel et endommagé par un écosystème sain et pleinement développé de bactéries intestinales saines dites "natives".

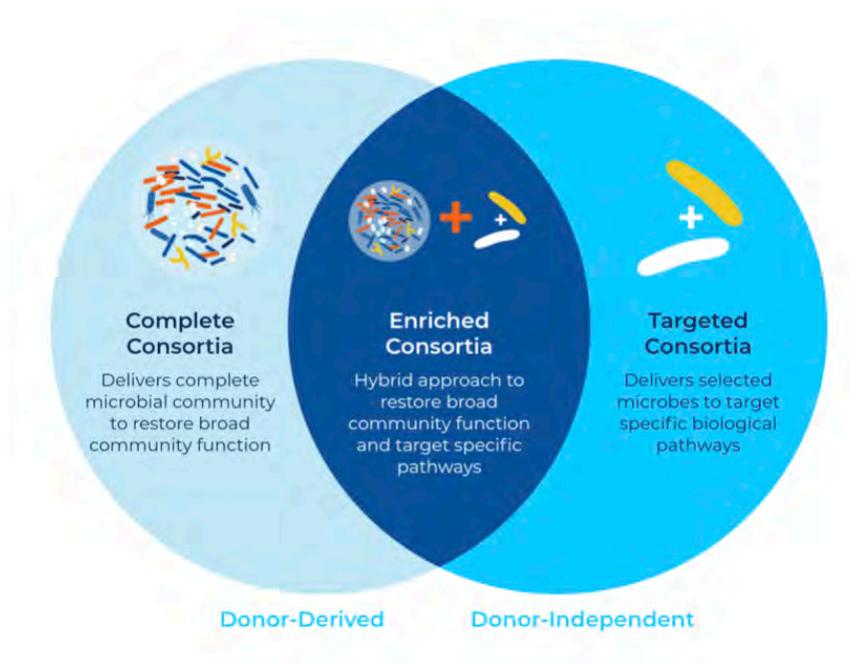


Figure 25. Stratégies de conception des MET. (42)

Comme on peut le voir sur la figure ci-dessus (43), le développement de candidats médicaments peuvent ainsi contenir :

- Une gamme complète de bactéries, riche en diversité, issues de donneurs sains afin de restaurer la fonction de la communauté dans son ensemble.
- Des candidats contenant des bactéries spécifiques, sélectionnées, ciblant des voies et des fonctions spécifiques (sécrétion de métabolites anti-inflammatoires par exemple), cultivées de manière indépendante du donneur.
- La combinaison de ces deux approches, la MET enrichie, permet de restaurer la communauté dans son ensemble tout en ciblant certaines voies fonctionnelles.

Ces biothérapies sont des candidats-médicaments à haute diversité et spécifique à une indication, dont le but est d'exploiter toute la diversité fonctionnelle d'un écosystème microbien afin de rétablir la symbiose hôte/microbiome dans des indications pour lesquelles les patients présentent une dysbiose sévère.

Dans cette approche, l'apport de la bio-informatique et des dernières techniques d'études du microbiome chez les sujets sains donneurs sont indispensables à la caractérisation de réseaux fonctionnels afin d'adresser les indications d'intérêt.

La MET représente aujourd'hui 6% de l'ensemble des biothérapies basées sur le microbiome en développement.

b. Live Biotherapeutic Product – LBP

1- Réglementation autour du LBP (en Europe et aux États-Unis)

Durant la dernière décennie de nouvelles thérapies contenant des microorganismes vivants comme substance(s) active ont émergé.

L'agence américaine, la Food and Drug Administration (FDA), ainsi que l'agence européenne concernée, l'EDQM ont nommés ces biothérapies : Live Biotherapeutic Product ou LBP.

La FDA définit un LBP comme une nouvelle classe de médicaments qui (44) :

- Contient des organismes vivants
- Qui est applicable à la prévention, le traitement ou la guérison d'une maladie ou condition de l'être humain
- Qui n'est pas un vaccin

Aujourd'hui, il existe une confusion entre le développement d'un médicament issu du microbiome (dans cette thèse nous parlerons des LBPs) et celui d'un complément alimentaire issu du microbiome, communément appelé probiotique.

Les probiotiques ont été définis en 2001 par une consultation d'experts composée de scientifiques internationaux travaillant pour la FAO et l'OMS comme « *des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte* ». (45)

Depuis lors, cette définition est devenue la version la plus largement adoptée et acceptée dans le monde.

L'avènement des nouvelles techniques d'études du microbiome ont permis d'accroître les connaissances autour du microbiote intestinal et ont facilité les recherches portant sur les microorganismes anaérobies qui peuplent l'intestin. Ainsi, il a été constaté que certains micro-organismes non caractérisés étaient plus

abondants chez les individus en bonne santé, ce qui a permis d'établir un lien entre les microbes et un phénotype sain. Ces micro-organismes sont utilisés comme produits biothérapeutiques si les preuves cliniques sont suffisantes pour les envisager comme de potentiels nouveaux traitements ou de nouvelles options préventives.

Le mode d'action des LBP réside dans le rétablissement de l'équilibre du microbiome intestinal conduisant à atténuer de nombreuses maladies affectant l'ensemble du corps. Bien que l'agent actif des LBP soit similaire à celui des probiotiques, les deux produits diffèrent du fait de leurs utilisations, leurs préparations et leurs développements. En effet, le probiotique est un complément alimentaire qui a pour visée de conférer un avantage potentiel à la santé tandis que le LBP est une substance visant à prévenir ou traiter une pathologie.

2- Les différentes approches de LBP

Le développement des LBP offre un nouveau moyen de créer des traitements sûrs, pratiques et efficaces pour les patients. En effet, la toxicité est un obstacle important dans le développement de nouveaux médicaments. Les effets secondaires associés aux médicaments existants préoccupent à la fois les patients et les cliniciens, et sont souvent la raison de l'arrêt du développement d'un nouveau médicament.

Les LBP ont des compositions définies produites à partir de bactéries commensales humaines, isolées à l'origine de donneurs sains puis cultivées et clonées à partir de banques de cellules puis encapsulées pour être administrées par voie orale permettant ainsi une sécurité et un profil de tolérance intrinsèquement favorable et réduisant de manière significative l'un des principaux risques de développement clinique précoce pour tout nouveau médicament.

En effet, cet aspect de sécurité est un des avantages des LBP contrairement aux médicaments traditionnels où un passage par la phase I afin d'attester de la sécurité chez les sujets sains est indispensable et risqué.

Dans le cas des LBP, les sociétés ont tendance à aller directement chez les patients afin d'étudier l'efficacité parallèlement aux études de sécurité et de toxicité, à travers

une Phase Ib/IIa. Ainsi les coûts et les temps de développement des LBP sont réduits.

Les LBP peuvent être distingués en deux groupes, ceux constitués d'une souche bactérienne unique et ceux constitués d'un consortium de bactéries. Ils sont administrés par voie orale et délivrés sélectivement dans l'intestin où les bactéries exercent leurs effets thérapeutiques afin d'avoir une action locale ou systémique.

Aujourd'hui, on recense plus de 200 programmes (42) en cours de développement dans le monde dont une majorité qui ne sont pas encore à des stades cliniques de développements. Les LBP représentent aujourd'hui la majorité des modalités thérapeutiques issues du microbiome.

Enfin comme le montre la figure ci-dessous (42), on retrouve une dominante de LBP à souches uniques (single strain).

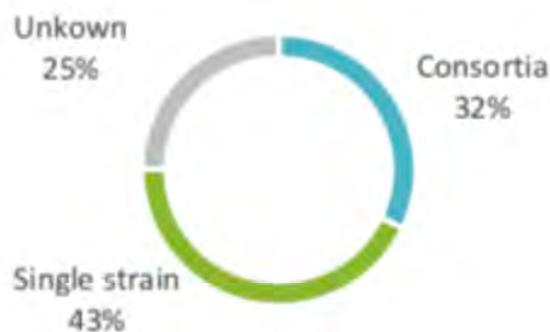


Figure 26. Répartition des différents modalités thérapeutiques des LBP. (42)

C. Caractéristiques des différentes approches

Nous avons vu précédemment qu'un médicament issu de bactéries peut se distinguer, sans prendre en compte d'autres approches alternative telles que les bactéries pouvant être génétiquement modifiées par exemple, en trois approches.

- De nombreuses biothérapies sont aujourd'hui en développement afin de remplacer le microbiome dysfonctionnel de patients souffrant d'infection à *Clostridium Difficile*. L'approche MET consistant à remplacer un écosystème endommagé par un écosystème sain et pleinement développé de bactéries intestinales saines est en bonne position pour devenir la première biothérapie à être autorisée.

Issus de donneurs en bonne santé et pouvant être complémenté en bactéries, l'écosystème que va recevoir le patient par voie orale ou par lavement est pleinement fonctionnel et déjà équilibré dans un environnement qui lui convient.

Cet aspect écosystémique complet présente également des limites, en effet malgré l'essor des nouvelles technologies d'analyse du microbiome, il reste difficile d'avoir une caractérisation complète des mécanismes sous-jacents et du lien complexe entre toutes les bactéries de cet écosystème.

- L'approche consortia permet de limiter ce manque de caractérisation en combinant entre elles des bactéries connues pour avoir des effets positifs dans certaines maladies. Il reste néanmoins nécessaire de comprendre les interactions entre ces espèces afin d'étudier la mécanistique de notre candidat-médicament et de construire un écosystème qui puisse se développer indépendamment et s'inclure dans l'écosystème déjà en place du patient.

Le fait de combiner différentes bactéries reconnues comme un ensemble de biothérapie unique rend le développement d'une telle approche complexe et couteuse et en fait un challenge au niveau de la propriété intellectuelle, de la fabrication et du réglementaire.

- L'approche de la souche unique permet une meilleure connaissance de ses caractéristiques, de sa mécanistique ainsi qu'un développement simplifié et moins couteux.

Cependant cette souche unique va être confronté seule après administration par voie orale à un écosystème déjà établi. Afin d'avoir l'efficacité voulu sur le patient, un travail sur la dose ainsi que des études pharmacocinétiques sont nécessaires.

De plus bien qu'il existe une variabilité au sein d'une même espèce bactérienne, des compagnons diagnostics pourraient être effectués chez le patient avant toute administration d'une biothérapie.

Chaque approche présente ainsi ses propres caractéristiques et sont envisageables en fonction de la situation thérapeutique que l'on souhaite traiter, des caractéristiques de la souche ou des souches à développer, et de l'état de l'écosystème microbien du patient.

D. Conclusion

On dénombre actuellement près de 110 sociétés développant des modalités thérapeutiques issues du microbiome. La moitié des sociétés sont aujourd'hui situées aux USA, l'Europe en représente 34%, les 17% restant sont situées notamment en Corée du sud. La France se positionne aujourd'hui comme le leader européen dans le domaine du microbiome.

On recense aujourd'hui près de 450 solutions thérapeutiques issues du microbiome en cours de développement dans le monde. Comme on peut le voir ci-dessous, ces développements ne représentent que moins de 1% de l'ensemble des développements thérapeutiques actuels dans le monde pharmaceutique.



Figure 27. La place du microbiome dans les produits en développement. (42)

Bien qu'en plein essor, le microbiome reste aujourd'hui un marché de niche. Ce secteur est constitué de jeunes sociétés très spécialisées ayant pour la plupart moins de dix ans d'existence et dont les premiers programmes commencent à arriver à maturation et se rapprochent de l'entrée sur le marché.

Le marché mondial du microbiome humain n'en étant qu'à ses débuts, un grand nombre d'acteurs entrent régulièrement sur ce marché, ce qui devrait intensifier la concurrence sur ce marché dans les années à venir.

L'industrie du microbiome est sur une trajectoire de croissance rapide, avec un réel élan et un potentiel de croissance très important comme on peut le voir ci-dessous (42).



Figure 28. Marché global des biothérapies basées sur le microbiome (\$M). (42)

Avec l'arrivée des premières biothérapies sur le marché, ce secteur devrait enregistrer une croissance significative au cours des prochaines années que ce soit aux USA ou dans le reste du monde. Malgré ces prévisions positives et à l'image d'un marché global affaibli en 2022, certaines compagnies du microbiome ont subies des difficultés.

PARTIE IV : Étude de cas : Développement du *B. pseudolongum*

A. Contexte

Dans cette dernière partie, nous allons proposer un plan de développement clinique d'une souche de *B. pseudolongum*. Notre but est de mettre en avant toutes les étapes nécessaires et spécifiques aux LBP pour que cette recherche prometteuse puisse progresser vers une preuve de concept clinique.

Ce travail a été initié lors de mon expérience au sein d'YSOPIA bioscience, une biotech de stade clinique spécialisée dans le développement de LBP à souche unique.

Nous avons vu précédemment les données montrant le potentiel thérapeutique engendré par l'amélioration des effets des ICI qu'une souche de *B. pseudolongum*, étudié par l'équipe de Calgary, pourrait avoir sur les patients atteints de certains cancers métastatiques (Partie II.C). Bien que précoce les données issues de l'utilisation de modèles de cancers, utilisant la souris comme hôte, indiquent un bénéfice potentiel significatif de l'association de cette bactérie avec des ICI. Le mécanisme d'action partiellement connu consolide l'importance de la présence de *B. pseudolongum* vivant dans l'organisme afin d'entraîner la sécrétion de l'inosine et du second co-stimulant permettant l'activation du système immunitaire.

Nous avons vu également les différentes routes possibles pour développer une biothérapie issue du microbiome (Partie III).

Dans cette étude de cas, le développement choisi pour la biothérapie basée sur la recherche autour *B. pseudolongum* est un **LBP à souche unique**. La particularité et la force de ce projet est la connaissance du mécanisme d'action. Ainsi, les études de Calgary ont montré que nous n'avons pas besoin que la souche s'intègre au microbiome de l'hôte (i.e. FMT) et le mécanisme proposé n'a besoin de l'intervention d'autres bactéries (i.e. consortia). Le développement comme un LBP à souche unique

permet d'accélérer le développement et limiter les coûts de production. De plus, fort de son réseau en Europe ainsi que pour des raisons de simplification du processus des phases cliniques auprès des agences réglementaires, YSOPIA a fait le choix de développer cette future biothérapie en Europe.

L'objectif pour une telle biotech est de réussir la translation de cette recherche en développant un candidat médicament qui permettra de soigner des patients en échec thérapeutique. La génération de données cliniques positives génèrera un retour sur investissement, à la biotech et aux chercheurs, lors de la potentielle vente du programme de développement à un acteur de l'industrie pharmaceutique ainsi lorsque de la mise sur le marché de la biothérapie.

a. Propriété intellectuelle

Afin de pouvoir **exploiter et valoriser** le potentiel d'une telle recherche à des fins commerciales, la propriété intellectuelle ou brevet est un enjeu important lors du développement d'un candidat-médicament.

Un brevet est un droit exclusif accordé par un État pour une invention qui est un produit ou un procédé (46). Le produit ou le procédé doit apporter, en général, une solution technique nouvelle à un problème dans n'importe quel domaine. Les droits exclusifs sont territoriaux et la protection par brevet est accordée pour une période limitée, généralement 20 ans.

Il existe des conditions de brevetabilité :

- Doit être nouveau, non anticipé par l'art antérieur
- Activité inventive (non évidente, qui ne peut être facilement déduite par une personne ayant une connaissance moyenne du domaine technique).

- Applicable industriellement - L'invention doit être utile/avoir une utilité

Il est important de noter qu'une découverte, une théorie scientifique ou une méthode mathématique est exclue de la brevetabilité, mais son application ou son utilisation peut être brevetable.

Dans notre étude, l'enjeu est bel et bien l'**utilisation** que pourrait avoir les recherches de Calgary, et plus précisément dans quelle(s) indication(s) et avec quel(s) ICI pourrait -on développer cette nouvelle biothérapie.

En effet la description du brevet (déposé par l'université de Calgary) fournit l'utilisation d'une bactérie isolée de la souche *Bifidobacterium pseudolongum* déposée sous un numéro de dépôt, avec un ICI choisi parmi un anti PD-L1 et un anti-CTLA-4 dans l'utilisation suivante : carcinome colorectal (CRC).

L'ensemble des données montre une activité dans deux modèles de souris de CRC. Le premier, MC38 est utilisé dans un contexte hétérotopique, c'est-à-dire dans une position qui n'est pas anatomiquement correcte. L'impact de *B. pseudolongum* est systémique plutôt que localisé au côlon où il réside normalement.

Le second modèle est un système génétiquement modifié dans lequel la souris est susceptible de développer un type de cancer colorectal que l'on trouve chez l'homme en raison d'un défaut de réparation de l'ADN connu sous le nom d'instabilité des microsatellites (MSI) et de réparation défectueuse des mésappariements (dMMR).

Il est intéressant de noter que la lignée MC38 a récemment été caractérisée puis étudiée en tant que représentante du CRC à haut statut MSI (47). Ceci est significatif car il lie plus étroitement les données de ces deux modèles et renforce la pensée que *B. pseudolongum* pourrait être développé en tant que composant d'une thérapie dans les cancers à haut statut MSI.

En supposant que le *B. pseudolongum* combiné à un ICI s'avère efficace contre les tumeurs dont la réparation de l'ADN est défectueuse, d'autres indications de cancer seront des cibles logiques. Néanmoins, pour pouvoir utiliser notre biothérapie dans

ces autres cancers, des résultats complémentaires d'efficacité dans les modèles de cancer ciblés, non décrits à ce jour, devront être apportés pour démontrer que la souche de *B. pseudo* avec un ICI présente une efficacité.

Dans ce cas alors une extension du brevet actuel permettrait d'avoir une portée plus large. Cette extension est susceptible d'être délivrée sous réserve de l'acceptation de tels résultats par les offices.

La communication du groupe de Calgary sur les essais sur le mélanome et le cancer de la vessie vont dans ce sens.

Dans ce contexte, il est également important de rappeler que *B. pseudolongum* ne semble pas avoir d'effet anticancéreux en l'absence d'un médicament immunomodulateur. Toute revendication actuelle dépendra de l'utilisation conjointe d'un médicament immunomodulateur. Il est concevable que la combinaison puisse augmenter l'efficacité et/ ou augmenter le taux de répondeurs à ces traitements ainsi que de réduire la sévérité des effets secondaires observés avec certaines des immunothérapies existantes.

Actuellement (après la chirurgie), les régimes chimio thérapeutiques pour le CRC sont nombreux pour le traitement de première ligne. Récemment (48), le pembrolizumab, un anti PD-1 a reçu l'approbation de la FDA américaine pour le traitement de première ligne des patients atteints de CRC avec un statut MSI élevé et une condition associée (dMMR).

Il pourrait donc être considéré comme le principal agent compétitif ou, plus probablement, comme le meilleur agent à essayer en combinaison avec *B. pseudolongum*.

Pour conclure et afin de consolider la propriété intellectuelle et le potentiel d'utilisation de notre future biothérapie, il sera nécessaire d'apporter des résultats complémentaires d'efficacité dans de nouveaux modèles de cancer à haut statut MSI en parallèle du développement clinique.

B. De la bactérie au médicament

Nous allons maintenant nous intéresser aux différentes étapes de développement nécessaires afin d'amener cette recherche prometteuse autour de la souche de *B. pseudolongum* à un candidat médicament.

Nous pouvons voir dans la figure ci-dessous le parcours de développement nécessaire pour initier un essai clinique en partant de la preuve de concept scientifique jusqu'à l'entrée en phase 1 d'étude clinique.

Comme on peut le voir dans la figure ci-dessous, il est nécessaire de sélectionner une souche bactérienne qui deviendra le candidat médicament et qui sera développé par la suite. En parallèle, nous avons vu précédemment les enjeux concernant la propriété intellectuelle et l'utilisation future, il est important de valider nos hypothèses dans la « vie réelle » afin d'aboutir à une (ou plusieurs) indication(s) dans laquelle va être développé cette future biothérapie.

Par la suite, un travail de développement, préclinique, réglementaire, de formulation et de production sera mené jusqu'à l'entrée en phase 1.

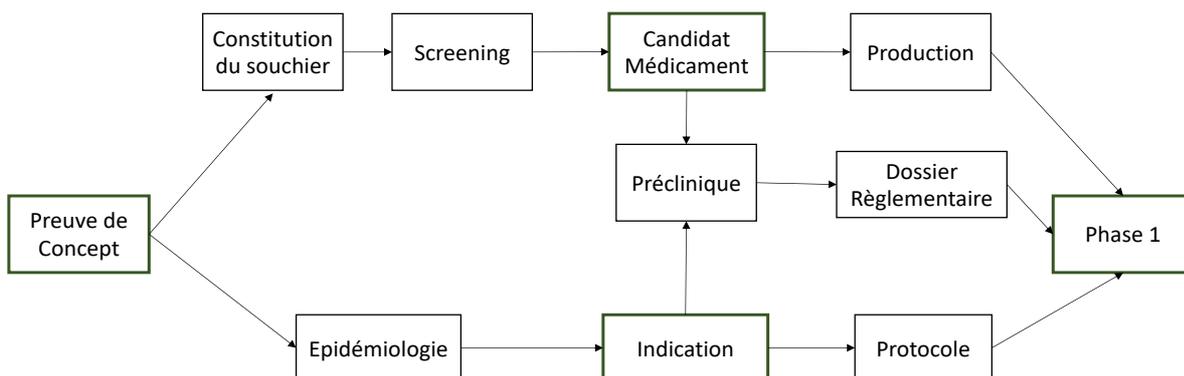


Figure 29. Étapes de développement d'une biothérapie issue du microbiome : de la preuve de concept scientifique à l'entrée en phase clinique.

a. Constitution du soucier

Bien qu'issues de la même espèce et très proches génétiquement et métaboliquement, il existe une forte variabilité entre différentes souches de *B. pseudolongum*. Ces différences difficiles, voire impossible, à évaluer peuvent entraîner une modulation des effets identifiés par le groupe de Calgary. Il est donc important de constituer une librairie de souches ou soucier, afin de sélectionner et développer celle avec la meilleure efficacité.

Différentes stratégies sont envisageables afin de générer une librairie :

- Un **processus d'isolation de souches** peut être mis en place à travers une collecte de selles conforme aux procédures de l'International Human Microbiome Standard (IHMS) puis la caractérisation des souches récoltées. Ce processus de collection interne est long, très règlementé (protocole de Kyoto) et coûteux.
- Il est également possible **d'acheter des souches déjà caractérisées** à une structure privée ou publique afin de gagner du temps.
Certaines informations sont nécessaires lors de l'achat de souches, à savoir l'origine de la souche, l'âge du donneur, l'état de santé global. L'acheteur doit aussi s'assurer que le vendeur opère dans la réglementation en vigueur.

Dans notre cas, nous proposons d'acquérir des souches afin de constituer notre librairie pour gagner du temps sur le développement. Néanmoins un important travail de caractérisation est nécessaire à la suite de l'acquisition de ces souches.

En effet pour qu'une souche soit développable chez l'homme, il existe certaines normes règlementaires concernant les caractéristiques de la souche détaillées dans le tableau ci-dessous.

Objectif		Test
Origine & Identification	Nom biologique et nomination de la souche	
	Origine de la souche	
	Historique de culture de la souche	
	Informations sur les donneurs	
Morphologie et identité génétique	Phénotype et génotype de la souche	16s génotype
	Identification morphologique	Microscopie & Macroscopie
	Caractéristiques de croissance, taille, forme, coloration GRAM	Analyse de la cinétique de croissance
	Mobilité & Sporulation	Wirtz-Conklin méthode
Caractérisation biochimique	Résistance aux antibiotiques, endotoxines bactérienne, résistances aux acides biliaires, activités enzymatiques, pH tolérance, aéroto­lérance.	pH tolérance, aéroto­lérance, API20A anaérobique test, ID32A, API ZYM, oxydase activité
Pureté	Présence de phages	Phage induction test
	Informations bio-informatique	Séquençage

Tableau 1. Normes et caractéristiques règlementaires des souches.

b. Screening

Une fois la librairie de souches constituée, l'étape de « screening » ou de sélection permet d'aboutir à un candidat médicament. Une des difficultés à prendre en compte en amont du screening est le milieu aérobie du laboratoire alors que notre souche nécessite des conditions anaérobiques pour exister. Les manipulations devront donc se faire en milieu clos pour limiter l'impact de l'oxygène sur nos souches. Le challenge ici est d'effectuer ce screening dans des conditions anaérobies, il sera mené soit en interne, soit nous identifierons un partenaire ayant accès à des modèles d'intérêt et la capacité d'action.

Dans un premier temps, il est nécessaire de **retirer les souches non développables** (présence de phages, antibiorésistances, gènes de pathogénités) en amont du screening.

Puis les éléments développables du souchier vont être étudiés dans différents modèles et classés en fonction de l'efficacité afin de sélectionner la souche avec la meilleure efficacité qui deviendra donc le candidat médicament.

Nous pouvons voir ci-dessous une figure décrivant le process de screening du candidat.

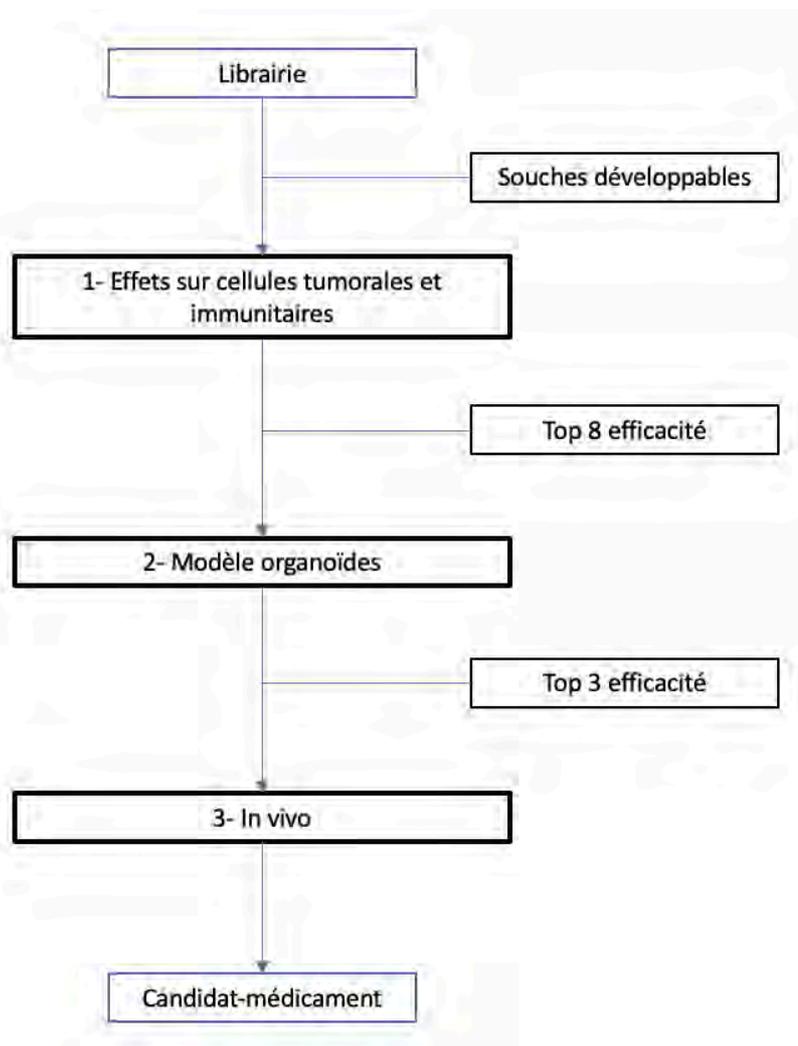


Figure 30. Étapes de sélection du candidat médicament.

- 1- Évaluation de l'effet de bactéries commensales humaines sur le phénotype malin des cellules tumorales (colon, pancréas, poumons) et sur les cellules immunitaires (Cellules mononuclées du sang périphérique PBMC et cellules T).

8 souches bactériennes seront sélectionnées.

Dans cette étude l'effet de différentes souches de *B. pseudolongum* candidates sera d'abord évalué sur la prolifération, l'apoptose, et l'invasion des cellules cancéreuses du colon, du pancréas et des poumons. La souche bactérienne décrite dans de l'université de Calgary sera utilisée comme souche contrôle/référence dans l'ensemble des expériences proposés dans cette étude. Ainsi l'effet du milieu de culture conditionné par les souches de bactéries ou les bactéries directement ajoutées aux cultures de cellules tumorales sera examiné.

- 2- Étude de l'impact des bactéries sur le développement et l'environnement tumoral. Dans cette étude des modèles de culture 3D (organoïdes) seront utilisés seuls ou en coculture avec des cellules immunitaires.

3 souches bactériennes les plus efficaces seront sélectionnées

- 3- Analyse de l'impact des bactéries sur le développement et l'environnement tumoral in vivo dans un modèle préclinique et dosage de l'inosine.

Criblage des 3 souches bactériennes les plus efficaces identifiées en 2.

À la fin de cette étape de screening, nous aurons donc identifié un candidat-médicament à souche unique de *B. pseudolongum* présentant la meilleure efficacité. La souche sélectionnée va par la suite être produite et étudiée en préclinique.

c. Épidémiologie

Lors de l'introduction de cette dernière partie, nous avons également abordé le sujet de la future utilisation de la souche et notamment l'indication pour laquelle va être développé notre bactérie en association avec les ICI. Afin de renforcer, invalider ou

ouvrir sur d'autres utilisations potentielles, un travail de recherche épidémiologique est bienvenu et pourrait être effectué en parallèle des deux étapes vues précédemment. L'identification d'un partenaire capable de mener ce type d'études et d'avoir ces cohortes à disposition est un challenge.

Dans un premier temps, notre **objectif à court terme** est de consolider notre hypothèse d'utilisation avec des données dites de « vie réelle » concernant l'indication dans laquelle va être développé cette future biothérapie, à savoir le CRC.

Afin de valider le potentiel de notre souche et de son mécanisme d'action, nous avons identifié une cohorte de patients traités par immunothérapies pour des cancers localement avancé/non résecable et/ou métastatique afin d'analyser des marqueurs prédictifs clinique permettant d'identifier une population de patients répondeurs.

Le microenvironnement immunitaire est complexe, dynamique et spatialement hétérogène. Il est important de comprendre le paysage immunologique et métabolique des tumeurs solides, car ces informations pourraient révéler les mécanismes de réponse et de résistance à des agents immunomodulateurs spécifiques et contribuer au développement futur d'approches combinées plus efficaces. Un profilage immunologique complet peut permettre d'identifier des paramètres robustes pour déterminer la candidature à des traitements immunomodulateurs spécifiques, et certaines approches ont été utilisées pour définir les composants du microenvironnement immunitaire de tumeurs, dans le but de développer des biomarqueurs.

Notre objectif est d'identifier dans cette cohorte une population de patients de cancer métastatiques à haut statut MSI répondeurs aux ICI afin d'évaluer, dans un premier temps, la présence d'inosine chez les répondeurs et consolider ainsi notre mécanisme d'action et valider l'utilisation future de notre biothérapie.

À cette fin et étant donné l'importance du métabolisme dans le microenvironnement immunitaire des tumeurs, nous effectuerons une étude métabolomique du plasma, afin de déterminer si l'inosine pourrait être corrélée avec un bénéfice de l'immunothérapie.

Dans un second temps, un projet de collaboration de recherche utilisant les échantillons de selles de cette même cohorte de patients nous permettrait de corrélérer la présence de *B. pseudolongum* et la réponse à l'immunothérapie.

De ces données de vie réelle, **l'objectif à moyen terme** est d'identifier des cancers où le taux d'inosine ainsi que la quantité de *B. pseudo* chez les répondeurs à l'immunothérapie est importante afin d'orienter la génération de nouvelles données vers ces cancers et pouvoir prétendre à une extension du brevet pour pouvoir ainsi développer notre candidat-médicament dans de nouvelles indications. Ce travail de recherche épidémiologique est un travail qui continuera après la phase 1

d. Préclinique

Il s'agit de tests réalisés in vitro (sur des tissus organiques) et in vivo sur l'animal. Les résultats permettent de garantir dans un premier temps la sécurité avant d'envisager le passage à une expérimentation sur l'homme, en s'assurant de la probité des effets toxicologiques (toxicité aiguë et chronique). En effet, il n'est pas envisageable d'administrer un nouveau composé à l'homme sain ou malade compte tenu des risques non connus susceptibles d'apparaître. L'expérimentation animale est donc utilisée de manière rationnelle et selon des bonnes pratiques qui garantissent un traitement éthique de l'animal. Nous ne développerons pas de modèles d'efficacité ici.

Il est important de noter que les études précliniques des LBP et, de manière plus large, des biothérapies issues du microbiome sont spécifiques. Des discussions approfondies avec les agences réglementaires sont nécessaires afin de mettre en place le dossier réglementaire.

1- Étude de toxicité

▪ **Étude de translocation**

Pour démontrer que notre candidat, lorsqu'il est administré à la dose de travail, ne **présente aucun risque d'infection bactérienne** induite par le traitement, il est important de mener une étude afin d'évaluer le potentiel de translocation de notre candidat.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les capacités de translocation de la souche hors de l'intestin lorsqu'elle est inoculée per os. Après un gavage quotidien de souris pendant 7 jours consécutifs, la présence de la souche viable en dehors du tractus gastro-intestinal doit être évalué par approche visuelle et génétique.

▪ **Étude de tolérance d'une dose aiguë**

Afin d'évaluer **l'impact d'une exposition aiguë** à la plus forte concentration techniquement réalisable chez des animaux sains il est important d'évaluer, dans un premier temps, tout effet toxique associé à notre souche induit après une exposition à haute dose. Par la suite, une deuxième partie de l'étude aura pour but d'évaluer la persistance de notre souche dans les fèces après une dose aiguë journalière dans des échantillons de selles de souris pendant 3 semaines.

Étant donné que notre souche est commensale et très bien étudiée nous n'anticipons aucun problème de tolérance à ce stade.

Notons ici que notre objectif est de développer un co-traitement avec les ICI. Des discussions avec les agences devront être mis en place concernant les études de toxicités à mener lors d'une utilisation conjointe, notamment étudier l'impact d'un traitement ICI sur la translocation de notre bactérie et candidat.

2- Étude de pharmacocinétique

Les études traditionnelles de pharmacocinétique et de distribution ne peuvent pas être réalisées pour un LBP. Étant donné que notre candidat est composé d'un organisme vivant et capable de se reproduire chez l'hôte que l'on trouve en quantités variables chez les individus sains, les études pharmacocinétiques traditionnelles ne sont pas appropriées.

Pour évaluer la pharmacocinétique de notre candidat, un groupe de souris devra être maintenu sous un régime alimentaire normal et leurs fèces collectées à différents moments pendant 3 semaines après le traitement afin d'évaluer la survie de notre produit dans les fèces.

Par la suite, il est intéressant de mener une étude en utilisant le modèle validé du Simulateur de l'Écosystème Microbien de l'Intestin Humain (SHIME®) pour étudier la bio distribution et l'efficacité in vitro de notre candidat.

L'objectif principal de l'étude est d'étudier **l'interaction à long terme** in vitro entre la souche et le microbiome après des doses répétées et attesté de la sécrétion d'inosine et du co-stimulant dans un environnement complexe.

Le modèle SHIME est un modèle in vitro validé qui simule la complexité du tractus gastro-intestinal. Par rapport aux alternatives in vivo, SHIME utilise le microbiote intestinal humain fraîchement extrait de donneurs et ne présente pas de facteurs extrinsèques, tels que le système immunitaire de l'animal hôte, de réaction contre le produit testé après administration. SHIME est bien adapté aux études à long terme et permet un échantillonnage facile de tous les compartiments pour une analyse en aval et une reproduction précise du microbiote intestinal. Des inoculums fécaux représentatifs de différents donneurs peuvent être sélectionnés pour optimiser la représentativité. Le SHIME ne simule pas seulement le microbiome luminal, mais recrée également l'environnement muqueux, permettant une greffe préférentielle des micro-organismes pertinents.

Trois populations de microbiome intestinal seront isolées à partir des selles de donneurs. Chaque microbiome intestinal individuel sera injecté dans un système SHIME distinct, de sorte qu'il y ait un seul SHIME par donneur de microbiome. La configuration typique des réacteurs du SHIME consiste en une succession de cinq réacteurs simulant les différentes parties du tractus gastro-intestinal humain. Le temps de rétention et le pH des différents réacteurs sont choisis de manière à ressembler aux conditions in vivo dans les différentes parties du côlon.

3- Sélection de la dose

Après avoir pris connaissance de l'activité et du comportement du candidat médicament dans des organisme vivant et non vivant, on estime les doses à administrer à l'homme au cours des essais cliniques en appliquant des marges de sécurité de manière à réduire au maximum les risques liés aux premières expositions humaines. De ces travaux, les agences réglementaires mettent en place des guidelines permettant aux développeurs de maîtriser les attendus de leurs produits. Si le développement est complexe avec des produits "normés", il l'est d'autant plus avec des produits innovants où les guidelines ne s'appliquent que partiellement.

En effet, par rapport à d'autres classes de médicaments, **il n'existe pas d'approche spécifique pour déterminer la dose humaine** d'un produit biothérapeutique vivant (LBP) sur la base de son développement préclinique. La FDA propose dans la directive "*Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*" plusieurs approches pour convertir les doses des modèles animaux précliniques en essais cliniques humains (49). Cependant, ces indices de conversion sont basés sur des médicaments standard(s) et ne s'appliquent pas à la spécificité du mode d'action des bactéries et à leur capacité inhérente à se reproduire dans l'hôte. De plus, la méthode générique prend en considération la distribution corporelle et ne tient pas compte de la compartimentation restreinte d'un LBP dans le tractus gastro intestinal (TGI).

Basé sur les développements précédent d'YSOPIA, nous proposons une approche alternative pour estimer la dose équivalente humaine de notre candidat médicament. Les produits thérapeutiques administrés dans des compartiments anatomiques qui ont peu de distribution ultérieure en dehors du compartiment peuvent être normalisés entre les espèces en fonction de la taille du volume du compartiment et des concentrations du produit thérapeutique.

Nous suivrons cette ligne directrice en utilisant une portion pertinente du TGI et proposons d'utiliser la surface des organes comme référence. Nous prendrons également comme référence la quantité moyenne de *B. pseudolongum* chez des individus sains afin de valider notre proposition de dose.

Par la suite, il est important de démontrer dans un modèle de CRC s'il existe ou pas une dose réponse lors de l'administration de *B. pseudo* en association avec des ICI. Dans le cas où il n'existe pas d'effet dose, une seule dose pourra être poursuivie en clinique. Dans le cas contraire, il sera nécessaire d'utiliser plusieurs doses en cliniques.

e. Fabrication du LBP

La fabrication de médicament est particulièrement bien régulée et en général ne pose pas de problématique spécifique au produit mais plutôt juste de développement de processus de fabrication.

Dans le cas d'un LBP ce n'est pas le cas. En effet, si le processus de fabrication est un challenge en soit accentué dans notre cas par le fait que la souche nécessite un milieu anaérobique strict pour proliférer, la réglementation sur les LBP est limité avec seulement les États-Unis et la FDA qui ont partagé des recommandations (50). En Europe, où le produit sera développé, les agences réglementaires nationales et l'EMA n'ont rien publié de précis hormis 2 mises à jour de méthode analytique (51).

YSOPIA devra donc proposer un package complet sans recommandation spécifique. La stratégie réglementaire sera présentée dans la section suivante. Dans

le cadre de la fabrication du candidat médicament, il y a deux aspects distincts à considérer, la production en elle-même et l'analyse associée.

Il est essentiel lors de la fabrication du candidat que :

- Le produit pharmaceutique soit sous forme orale et idéalement une taille simple à ingérer (taille 0)
- Le produit pharmaceutique suive les norme GMP en cours.
- Le processus de production soit robuste et consistant.
- La bactérie soit produite dans des conditions permettant d'obtenir l'activité souhaité et particulièrement la capacité de production d'inosine et du co-stimulant.
- Les concentrations obtenus (UCF/g) permette de formuler l'API dans les doses nécessaires au développement clinique.
- La bactérie soit délivrée vivante au site d'action. Dans le cas de *B. pseudologum*, une formulation permettant la protection gastrique sera essentielle.
- La bactérie soit stable dans des températures acceptables (idéalement 25°C ; néanmoins une conservation à des températures allant de 2-5°C serait acceptable) pour permette une prise chronique et pendant une période de 2 ans.

Comme la plupart, des acteurs du développement dans le microbiome, YSOPIA n'a pas de capacité de production GMP nécessaire. YSOPIA devra donc s'entourer de CDMO capable de remplir les conditions listées précédemment.

De plus, lors de ce processus, YSOPIA devra s'assurer qu'il n'y ait pas de perte d'activité de la bactérie avec le processus de fabrication utilisé et des études in vivo devront avoir lieu pour valider les lots cliniques produits.

Enfin, la méthode de formulation permettant de protéger les bactéries de l'estomac est l'encapsulation. YSOPIA devra s'assurer que la formulation assure une bonne protection aux bactéries mais que la libération du principal actif soit fait

rapidement afin d'assurer l'effet thérapeutique au bon endroit. Des modèles d'estomac artificiel capable de modéliser le passage d'une capsule devront être mis en place ainsi que des modèles permettant d'estimer dans quelle zone du GI, le principe actif sera libéré. Des partenaires capables de répondre à ces questions devront être identifiés rapidement.

Le deuxième aspect central lors de la fabrication est l'analyse du produit pharmaceutique et du principe actif. Les produits étant vivants ils devront être caractérisés en conséquence. YSOPIA a déjà de l'expérience dans le développement de produit vivant et utilisera les analyses présentées dans le tableau ci-dessous :

Test	Objectif
Densité optique à 600 nm	Établir le profil de croissance des micro-organismes dans le fermenteur et s'assurer qu'ils se développent comme prévu afin de produire une quantité suffisante de produit.
Morphologie cellulaire par microscopie	Identifier les micro-organismes par leur morphologie cellulaire et vérifier leur pureté.
CFU	Déterminer le nombre d'organismes cultivables dans un échantillon/produit.
TCC /VCC	Déterminer le nombre total de cellule et le nombre total de cellule viable dans un échantillon/produit.
Teneur en eau par test de Karl Fisher	Déterminer si la teneur en humidité est conforme aux spécifications du produit.
Production d'inosine	Déterminer la quantité d'inosine produit par les bactéries produites.
Coloration Gram	Identifier les micro-organismes par la morphologie cellulaire et la coloration et vérifier la pureté.
16 S séquençage	Identifier les micro-organismes et tout contaminant éventuel dans l'échantillon en analysant les séquences d'ARN 16S bactérien.
NGS	Identifier les micro-organismes et les éventuels contaminants de l'échantillon en analysant tout le matériel ADN de l'échantillon.
Bactériophage	Identifier la présence (ou l'absence) de bactériophages dans une banque de cellules, en s'assurant que tous les produits dérivés de la banque de cellules sont exempts de bactériophages, par un test d'induction à la mitomycine C.
Charge microbienne	Déterminer si le produit est contaminé par des micro-organismes autres que le micro-organisme cible, qui peuvent être nuisibles à la santé humaine (micro-organismes

	nuisibles). Pour déterminer si la formulation se désintègre en solution.
Désintégration de la capsule	Pour déterminer si la formulation se désintègre en solution.

Tableau 2. Analyse du produit pharmaceutique et du principe actif

Notons que le domaine des LBP est niche, de ce fait l'identification de partenaires capable de réaliser ces analyses dans les conditions permettant l'entrée dans les demandes réglementaires est un challenge et les contrats associés coûteux. Cependant, ces travaux sont essentiels afin de satisfaire les agences réglementaires mais également s'assurer que le produit n'apportera pas de risques de toxicité pour les patients qui les utiliseront et qui sont déjà atteints de cancer.

f. Dossier réglementaire

Nous avons vu précédemment (Partie III.B.b.1) que la réglementation concernant les LBP est assez récente et malgré l'émergence de lignes directrices un certain nombre de lacunes restent à combler pour soutenir le développement de ces nouveaux principes actifs en particulier en ce qui concerne la manière dont les exigences réglementaires des médicaments doivent être traitées dans la pratique.

En effet, les LBP sont confrontés à des défis spécifiques inhérents à leurs caractéristiques biologiques et à leurs modes d'action et, en tant que tels, ils nécessitent des considérations particulières en matière de documentation sur la qualité, la sécurité et l'efficacité avant d'être utilisés chez l'homme. De plus la réglementation autour des LBP n'est pas encore harmonisée notamment pour un développement visant les marchés mondiaux. Il est nécessaire d'engager des discussions avec les instances européennes (l'EMA) et américaines (FDA) afin d'adapter notre stratégie de développement à la suite de leur évaluations et commentaires.

La stratégie de la société YSOPIA, forte de son développement de LBP précédent, visant à fournir les preuves, vues précédemment, de qualité, d'innocuité

et d'efficacité du candidat LBP a donc été encouragée par l'échange constant avec les instances et les commentaires de l'EMA et de la FDA.

Pour cela, les interactions avec plusieurs autorités réglementaires seront engagées le plus rapidement possible et en continue afin d'anticiper d'éventuelles évolutions réglementaires.

- EMA : Conseil scientifique une fois le développement préclinique finalisé afin d'appréhender les attentes réglementaires européens (52) avant la soumission de l'IMPD (53)
- ANSM (France) : Soumission au Guichet des innovations afin d'avoir un retour rapide sur le développement de notre produit et les attentes des autorités françaises (54).
- FDA : Par le dossier INTERACT, il est possible d'avoir un retour rapide et spécifique sur nos interrogations concernant le développement précoce de notre produit avant la soumission à un PRE-IND.

Notre choix actuel est un développement en Europe (et en particulier en France) mais il est important d'obtenir un retour de la FDA en cas de blocage en Europe. En effet, l'EMA est connu pour ne pas être particulièrement bienveillante et compréhensive face aux innovations et il existe un risque de délai ou de blocage. De même, il sera probablement nécessaire d'envisager d'autres pays européens pour l'étude clinique et un premier contact avec leurs agences réglementaires est nécessaire pour s'assurer d'une progression sans délai.

g. Protocole et étude clinique

Nous proposons de mener une étude clinique interventionnelle de phase 1b/2a sur l'association de notre candidat médicament et du Pembrolizumab (anti PD-1) chez des patients atteints d'un cancer colorectal, d'un cancer de la vessie ou d'un

mélanome avancé ou métastatique, à haut statut MSI, réfractaires (dont la tumeur a progressé) à un traitement anti-PD-1/PD-L1 antérieur *B. pseudolongum* étant une bactérie commensale, nous n'anticipons pas de problème de sécurité.

Le choix d'inclure des patients de ces trois types de cancers à haut statut MSI nous permettra un recrutement de patients plus facile tout d'abord. De plus, si des réponses positives (partielles ou complètes) sont observées dans cet essai, alors l'expansion des indications de cancer *B. pseudolongum* et un ICI pourront être justifiés. Bien que l'évaluation clinique soit sur plusieurs sous type de cancer le recrutement sera en enjeu central et afin de réduire la durée de l'étude plusieurs centres seront nécessaires. Si celui-ci s'avère insuffisant, nous envisageons d'étendre nos recrutements à plusieurs centres européens durant l'extension à la Phase 2a.

Il est important de noter que le recrutement devra prendre en compte des paramètres liés au microbiome. Pour le moment nous ne sommes pas capables de comprendre comment les caractéristiques individuelles du microbiome impacte l'efficacité thérapeutique de la combinaison. Afin d'évaluer cette corrélation réponse thérapeutique/microbiome, nous devons mettre en place des actions afin d'être capable d'évaluer l'interconnexion dans les futures phases.

1- Design et objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude clinique est **d'évaluer la sécurité de la combinaison de *B. pseudolongum* et d'un ICI** dans un premier temps. Puis dans un second temps, d'évaluer si cette combinaison apporte un **bénéfice clinique** à des patients en situation d'échec thérapeutique. Pour ces raisons, cet essai sera mené en ouvert ou « open label » et non randomisé.

Cette étude sera effectuée en deux parties, une première partie, initiale de sécurité ayant pour **objectif primaire** l'évaluation des toxicités lors de cycles de traitements

de trois semaines, et une seconde partie, évaluant la survenue d'effets indésirables et l'efficacité.

- Partie 1b : **Une phase initiale de sécurité** évaluant les **toxicités**. L'objectif de cette première partie est d'évaluer la sécurité et la tolérance du notre candidat en association avec le pembrolizumab par le recueil des événements indésirables (EI).

Dans cette première partie, 20 patients seront recrutés pour être traités avec une capsule de *B. pseudolongum* et 200 mg de pembrolizumab pendant 35 cycles (environ 2 ans) ou jusqu'à la progression de la maladie.

Au bout de 21 jours, un comité d'examen de la sécurité se réunira pour évaluer le passage à la deuxième partie. Nous n'anticipons pas de problème de sécurité à ce stade.

- Partie 2a : La deuxième partie de l'étude a pour objectif primaire d'évaluer la sécurité et la tolérance de notre biothérapie en combinaison avec le pembrolizumab par le biais de la collecte des événements indésirables et **d'évaluer le bénéfice clinique** du candidat en combinaison avec le pembrolizumab.

Nous proposons de mettre en place un seul bras. Les sujets recevront une perfusion IV de pembrolizumab une fois toutes les 3 semaines jusqu'à la progression de la maladie, des EI inacceptables ou le retrait du consentement jusqu'à un maximum de 35 cycles (environ 2 ans).

Le pembrolizumab est un puissant anticorps monoclonal humanisé qui se lie de manière très spécifique au récepteur de la mort cellulaire programmée 1 (PD1), inhibant ainsi son interaction avec le ligand de la mort cellulaire programmée 1 (PD-L1).

Le schéma posologique de l'étude est de 200 mg (deux flacons de 4 ml de solution de 25 mg/ml) pour une perfusion IV une fois toutes les trois semaines.

À partir du jour de la première dose de pembrolizumab, les sujets prendront une capsule de notre biothérapie deux fois par jour jusqu'à la fin de la période de traitement. Le schéma posologique de l'étude est d'une capsule deux fois par jour pendant toute la durée du traitement.

Les **critères de succès** pour cette étude seront basés sur les objectifs primaires :

- Aucun patient ne quitte l'étude à cause d'effet secondaire lié au produit
- Aucun SAE lié au produit
- 20% des patient ont une rémission partielle ou totale

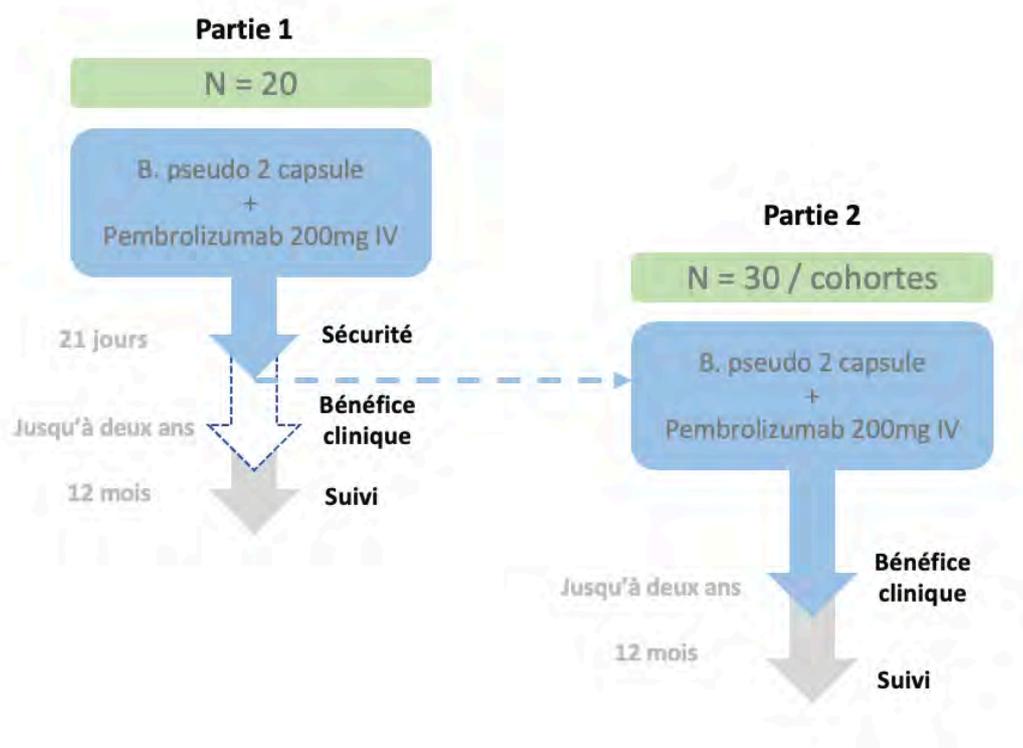


Figure 31. Design de l'étude clinique de phase 1b/2a.

Nous avons choisi une **population** de 20 patients pour la partie 1b et une population de 30 patients par cohortes pour la partie 2a, en effet le "taux de réponse" dans le cas de l'essai clinique de phase 1b/2a de notre produit biologique doit être suffisamment robuste et démontrer une efficacité.

Le tableau ci-dessous (tableau 3) indique la probabilité d'observer au moins un événement indésirable dans la partie 1b, la partie 2a et dans l'ensemble de l'étude lorsque l'incidence réelle de l'EI est de 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 % ou 30 %. Avec un total de 50 sujets recevant notre produit (20 dans la partie 1b et 30 dans la partie 2a), des EI ayant une incidence réelle de 10 % seront probablement observés dans cette étude avec une probabilité de 100 % d'en observer au moins un.

	Nombre de patients recevant le traitement		
	Partie 1b	Partie 2a	Parties 1b + 2a
Incidence réelle des EI20		30	50
1%	18%	27%	43%
2,5%	38%	57%	92%
5%	65%	78%	96%
10%	86%	98%	100%
20%	97%	100%	100%
30%	100%	100%	100%

Tableau 3. Probabilité d'observer au moins un événement indésirable (EI) compte tenu d'un taux d'incidence réel.

Pour l'évaluation de la sécurité, le nombre de patient pour chaque partie est adéquate et correspond aux attentes des autorités réglementaires. Concernant l'évaluation de l'efficacité nous manquons de recul pour avoir une évaluation réaliste.

Enfin des mesures exploratoires seront menées, parmi elles, des échantillons de sang seront analysés pour détecter les changements du statut immunitaire et les biomarqueurs de l'effet du traitement, notamment l'inosine. Des biopsies de tissus seront réalisées pour analyser les biomarqueurs tumoraux et des échantillons de fèces seront collectés et analysés pour le microbiote et le métabolome. L'analyse des selles et le suivi des patients est un challenge. En effet, si les tests urinaires et

sanguins sont des tests effectués en routine dans une étude clinique, les tests requérant de la matière fécale le sont moins, *B. pseudolongum*, en tant que biothérapie vivante ne passant pas la barrière intestinale, les échantillons fécaux sont précieux pour suivre la cinétique et en particulier l'élimination de notre produit. De plus, d'autres analyses récentes comme la métagénomique et la métabolomique nécessitent cette même matrice. La matière fécale requiert des conditions strictes de prélèvements et de conservation afin de préserver leur intégrité.

Un des éléments clé de l'étude clinique à venir sera de montrer la causalité entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de notre traitement. Dans le cas d'un LBP, la difficulté de l'échantillonnage ainsi que la complexité de l'intestin et de son écosystème limitent le type d'étude et d'analyses qui pourront être conduites. Nous nous concentrerons sur l'analyse dans les selles à différents points durant l'étude afin d'analyser si la bactérie s'intègre dans le microbiome d'un patient ou pas. En ce sens, il nous semble indispensable que la période de suivi après l'arrêt du traitement soit supérieure à 4 semaines. En effet, il est primordial, d'un point de vue mécanistique et de sécurité, de savoir si une colonisation au microbiome pourrait être temporaire ou définitive.

Un des challenges est le manque d'outils d'analyse de PK/PD adaptés aux LBP dans la compréhension de sa pharmacocinétique. Les effets pharmacologiques varient en fonction des propriétés spécifiques du micro-organisme utilisé comme substance active, chaque espèce ou même souche ayant une biologie unique pouvant impliquer diverses voies mécanistiques. De plus, il est important de noter que les échantillons fécaux ne sont qu'une approximation de la qualité et de la quantité microbienne intestinale et qu'il est donc indispensable de mettre au point de nouvelles méthodes d'échantillonnages.

2- Critères d'inclusions

- Volonté et capacité de fournir un consentement éclairé/assentiment écrit pour l'essai.

- ≥18 ans le jour de la signature du consentement éclairé.
- Preuve histologique ou cytologique d'un CRC avancé et/ou métastatique ou récurrent, d'un cancer de la vessie ou d'un mélanome.
- Non-réponse ou intolérance au traitement standard ou pour lesquels aucun traitement approprié n'est connu pour apporter un bénéfice clinique (selon le jugement de l'investigateur).
- Les sujets doivent avoir progressé sous traitement par un inhibiteur de PD-1/PD-L1 administré soit en monothérapie, soit en association avec d'autres inhibiteurs de points de contrôle ou d'autres thérapies. La progression du traitement par inhibiteur PD-1/PD-L1 est définie par la satisfaction de tous les critères suivants :
 - A reçu au moins 2 doses d'un inhibiteur de PD-1/PD-L1.
 - A démontré une progression de la maladie après un traitement par PD-1/PD-L1
 - La progression de la maladie a été documentée dans les 12 semaines suivant la dernière dose d'un inhibiteur de PD-1/PD-L1.
- Les points critiques liés au produit *B. pseudolongum* :
 - La progression de la maladie a été documentée dans les 12 semaines suivant la dernière dose d'un inhibiteur de PD-1/PD-L1

3- Critères d'exclusions

Au-delà des critères d'exclusions lié à toutes études qui ne sont pas présentés dans ce travail, certains critères liés strictement au produit *B. pseudolongum* seront mis en place :

- Tout antécédent de chirurgie bariatrique
- Prise de compléments alimentaires de type probiotique.
- Traitement concomitant ou antécédents médicaux de traitement (dans les 2 derniers mois précédant l'inscription) avec des agents agissant sur la mobilité gastro-intestinale (laxatifs) indépendamment du mode d'action, antibiotiques (oraux, IM, IV)
- Antécédents médicaux ou personnels de troubles alimentaires

Le but de ces critères est de limiter l'impact de paramètres externe sur le microbiote du patient et de permettre une évaluation la moins biaisée possible. Cela étant, les patients atteints de cancer sont hautement médicalisés et une étude de faisabilité devra être conduite pour évaluer l'impact de ses critères.

4- Arrêt de l'étude

L'étude ou le traitement de l'étude pourrait être interrompu prématurément si un ou plusieurs des critères définis ci-dessous est amené à être rempli.

De même, si le type, la fréquence ou l'intensité des EI devenaient inacceptables, même en l'absence d'un EI de grade ≥ 3 ou d'un EIG, l'IP pourrait contacter le contrôleur médical du promoteur, ou la personne désignée, pour évaluer la poursuite du traitement.

Les critères d'arrêt de l'étude pour cause de sécurité ou de manque de tolérance sont les suivants :

- Un ou plusieurs sujets d'une cohorte de dose ont présenté un EIG qui était possiblement, probablement ou certainement lié à *B. pseudolongum*, selon l'évaluation de l'investigateur.

- Deux sujets ou plus dans une cohorte de dose ont subi des EI de grade 3 (sévères), du même type, qui ont été considérés comme possiblement, probablement ou certainement liés à *B. pseudolongum*.
- Un décès est survenu à tout moment au cours de l'étude et a été considéré par l'investigateur comme étant lié à *B. pseudolongum*.
- Infection clinique par *B. pseudolongum* dans un espace stérile confirmée par qPCR. L'investigateur et le sponsor travailleront avec les médecins pour aider à identifier *B. pseudolongum* dans l'échantillon clinique si une telle infection était suspectée.
- Risque lié à la translocation : Une infection à *B. pseudolongum* arrêterait l'étude en cours. Cependant il n'existe pas de moyen technique en routine permettant d'identifier notre bactérie. Avant le début de la phase clinique, nous devons ainsi mettre en place un protocole d'échantillonnage suffisant rapide afin d'identifier le pathogène responsable en cas d'une éventuelle infection.

h. TPP - Profil du produit ciblé

Pour conclure cette dernière partie, nous allons dresser le TPP de notre produit. Le but d'un TPP est de s'assurer que le processus de développement du médicament du fabricant est efficace et fournit toutes les informations médicales, techniques et scientifiques pertinentes requises pour évaluer le résultat commercial d'un médicament (55).

Dans l'industrie, les TPP internes sont utilisés comme outils de planification qui orientent le développement vers les caractéristiques souhaitées. Il fournit l'intention générale du médicament et indique le statut du médicament à un moment donné du processus de développement.

Description du produit	Premier médicament de sa catégorie issu d'une bactérie <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> en association avec un ICI Bactérie non virulente et commensale - Dosage oral
Indication médicale ciblée	Pour traiter les tumeurs réfractaires aux ICI dont le besoin médical est élevé (cancer colorectal réfractaire à haut statut MSI élevé, vessie métastatique, mélanome avancé)
Environnement concurrentiel	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de LBP sur le marché • Mécanisme d'action définit
Positionnement	En combinaison avec les thérapies ICI Profil de sécurité et de tolérance très élevé
Stratégie clinique	Phase 1b/2a en association avec des ICI chez des patient atteints de CRC métastatique, mélanome avancé, et cancers de la vessie métastatique à haut statut MSI
Stratégie réglementaire	<ul style="list-style-type: none"> - LBP - Premièrement en Europe - EMA
Liberté d'exploitation et situation de la propriété intellectuelle	YSOPIA détient un brevet clé sur l'utilisation de <i>B. pseudolongum</i> en association avec CTLA-4 dans le CRC Il sera important d'élargir la portée de ce brevet (génération de nouvelles données) ou d'acquérir de nouveaux brevets

Tableau 4. TPP du candidat médicament

CONCLUSION

Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI) ont été une révolution dans le traitement du cancer, avec des réponses durables chez les patients. Cependant, l'incapacité à prédire l'efficacité et la réponse des patients empêche une utilisation plus large. Des stratégies émergentes visant à améliorer les réponses à l'immunothérapie sont en cours d'élaboration sur la base de nouvelles connaissances sur les cellules T et la fonction immunitaire globale. On sait depuis un certain temps que la constitution génétique des individus peut influencer sur leur réaction à un médicament, ce qui a donné naissance à l'idée de médecine de précision.

Une dimension supplémentaire a été ajoutée avec la proposition selon laquelle le microbiome intestinal pourrait être impliqué dans la médiation de l'action immunitaire antitumorale. La présence ou l'absence de bactéries spécifiques favorisant l'immunité de l'hôte contre la tumeur et présentant une forte corrélation avec la réponse des patients aux ICI peuvent ainsi potentialiser l'efficacité des immunothérapies contre le cancer. La détection et la poursuite de ces nouvelles cibles dans le cadre de traitements en oncologie pourront conduire à de nouveaux traitements ou à de meilleurs résultats pour les médicaments actuels.

A l'image de l'oncologie, d'autres aires thérapeutiques pourraient bénéficier de ces nouvelles modalités afin de potentialiser l'effet et la réponse aux thérapies déjà existantes. Il a été démontré récemment que l'efficacité de certains traitements, à savoir les GLP-1 dans la prise en charge du diabète, pourrait être impacté par la constitution du microbiome (56).

Le nombre croissant d'études, la percée scientifique et les nouvelles technologies ouvrent la voie à des biothérapies issues du microbiome. Nous avons vu dans ce travail que la mise sur le marché de telles thérapies suit une route de développement et réglementaire classique tout en présentant des spécificités propres aux LBP. Le fait d'être en présence d'une substance active issue du vivant génère son lot de contraintes et de challenges à prendre en compte en amont du développement afin

d'anticiper d'éventuels retards et surcoûts dans le long et coûteux chemin qui mène à l'approbation d'un tel médicament.

Il n'est cependant pas surprenant que le microbiome soit une riche source de métabolites intimement associés à notre propre métabolisme humain. Grâce à des centaines de millions d'années de coévolution, la symbiose eucaryote avec une pharmacopée sous la forme d'un microbiome est une stratégie efficace pour améliorer le métabolisme, la physiologie et l'immunité. La présence de bactéries vivantes dans notre vie quotidienne (probiotiques, produits fermentés etc...) donne l'impression que nous maîtrisons leurs utilisations et enjeux. Néanmoins, il existe un nombre considérable de gènes microbiens dans le microbiome humain qui doivent encore être explorés et caractérisés de manière fonctionnelle en matière de santé, de maladie et de traitement des maladies.

Les futures stratégies de la médecine de précision s'appuieront probablement sur de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques permettant d'identifier les bénéfiques et de corriger les défauts du microbiome modulant l'efficacité thérapeutique de médicaments actuels ou futurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Évolution chronologique des publications autour du microbiome - Seventure Partners
2. BPI BIG - Le microbiote humain, source de découvertes étonnantes et d'innovations pour le bien-être et la santé – 2021
3. Grice, Elizabeth A., et Julia A. Segre. « The Human Microbiome: Our Second Genome ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 13, no 1 (22 septembre 2012): 151-70. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814> .
4. Rapport ambassade de France de Washington - Le microbiome humain état des lieux de la recherche – 2018.
5. Microbiote intestinal (flore intestinale) · Inserm, La science pour la santé.
6. Le microbiote - Santé 2030- Leem.
7. NIH - Human Microbiome Project.
8. Le Lay C, Fernandez B, Hammami R, Ouellette M, Fliss I. On *Lactococcus lactis* UL719 competitiveness and nisin (Nisaplin®) capacity to inhibit *Clostridium difficile* in a model of human colon. *Front Microbiol.* 2015 Sep 25;6:1020. doi: 10.3389/fmicb.2015.01020.
9. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014 Mar 27;157(1):121-41. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011. PMID: 24679531; PMCID: PMC4056765.
10. Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, Chen LS, Grzybek M, Grinenko T, et al. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell.* 11 janv 2018;172(1-2):147-161.e12.
11. McCoy KD, Burkhard R, Geuking MB. The microbiome and immune memory formation. *Immunol Cell Biol.* 2019;97(7):625-35.

12. Quintin J, Saeed S, Martens JHA, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe*. 16 août 2012;12(2):223-32
13. König, Julia, Jerry Wells, Patrice D Cani, Clara L García-Ródenas, Tom MacDonald, Annick Mercenier, Jacqueline Whyte, Freddy Troost, et Robert-Jan Brummer. « Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease ». *Clinical and Translational Gastroenterology* 7, no 10 (octobre 2016): e196. <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54>.
14. Milani C et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017 Nov 8;81(4):e00036-17. doi: 10.1128/MMBR.00036-17. PMID: 29118049; PMCID: PMC5706746.
15. Milani C, Mangifesta M, Mancabelli L, Lugli GA, James K, Duranti S, Turrone F, Ferrario C, Ossiprandi MC, van Sinderen D, Ventura M. 2017. Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. *ISME J* 11:2834–2847. doi: 10.1038/ismej.2017.138.
16. Mitsuoka T. 1969. Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals (including descriptions of *bifidobacterium thermophilum* nov. spec. and *bifidobacterium pseudolongum* nov. spec). *Zentralbl Bakteriol Orig* 210:52–64.
17. Scardovi V, Trovatelli LD, Crociani F, Sgorbati B. 1969. Bifid bacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*: *B. globosum* n.sp. and *B. ruminale* n.sp. *Arch Mikrobiol* 68:278–294. doi: 10.1007/BF00409919.
18. Lugli GA, Duranti S, Albert K, Mancabelli L, Napoli S, Viappiani A, Anzalone R, Longhi G, Milani C, Turrone F, Alessandri G, Sela DA, van Sinderen D, Ventura M. Unveiling Genomic Diversity among Members of the Species *Bifidobacterium pseudolongum*, a Widely Distributed Gut Commensal of the Animal Kingdom. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Apr 4;85(8):e03065-18. doi: 10.1128/AEM.03065-18. PMID: 30737347; PMCID: PMC6450028.
19. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull*. 2017

Sep;7(3):339-348. doi: 10.15171/apb.2017.041. Epub 2017 Sep 25. PMID: 29071215; PMCID: PMC5651054.

20. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol.* 2018 Mar 28;8:86. doi: 10.3389/fonc.2018.00086. PMID: 29644214; PMCID: PMC5883082.
21. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008 Oct 10;322(5899):271-5. doi: 10.1126/science.1160062. PMID: 18845758.
22. Baitsch L, Baumgaertner P, Devêvre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, Wieckowski S, Bouzourene H, Deplancke B, Romero P, Rufer N, Speiser DE. Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6):2350-60. doi: 10.1172/JCI46102. Epub 2011 May 9. PMID: 21555851; PMCID: PMC3104769.
23. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature.* 2001;411:380–384.
24. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, Carcereny E, Ahn MJ, Felip E, Lee JS, Hellmann MD, Hamid O, Goldman JW, Soria JC, Dolled-Filhart M, Rutledge RZ, Zhang J, Luceford JK, Rangwala R, Lubiniecki GM, Roach C, Emancipator K, Gandhi L; KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015 May 21;372(21):2018-28. doi: 10.1056/NEJMoa1501824. Epub 2015 Apr 19. PMID: 25891174.
25. Sznol M, Ferrucci PF, Hogg D, Atkins MB, Wolter P, Guidoboni M, Lebbé C, Kirkwood JM, Schachter J, Daniels GA, Hassel J, Cebon J, Gerritsen W, Atkinson V, Thomas L, McCaffrey J, Power D, Walker D, Bhore R, Jiang J, Hodi FS, Wolchok JD. Pooled Analysis Safety Profile of Nivolumab and Ipilimumab Combination Therapy in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2017 Dec 1;35(34):3815-3822. doi: 10.1200/JCO.2016.72.1167. Epub 2017 Sep 15. PMID: 28915085.
26. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018 Mar 23;359(6382):1350-1355. doi: 10.1126/science.aar4060. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29567705; PMCID: PMC7391259.

27. Wolchok JD et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013 Jul 11;369(2):122-33. doi: 10.1056/NEJMoa1302369. Epub 2013 Jun 2. Erratum in: *N Engl J Med*. 2018 Nov 29;379(22):2185. PMID: 23724867; PMCID: PMC5698004.
28. Gopalakrishnan V. et al, Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018 Jan 5;359(6371):97-103. doi: 10.1126/science.aan4236. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29097493; PMCID: PMC5827966.
29. Scott AJ, Merrifield CA, Younes JA, Pekelharing EP. Pre-, pro- and synbiotics in cancer prevention and treatment-a review of basic and clinical research. *Ecancermedicalsecience*. 2018 Sep 5;12:869. doi: 10.3332/ecancer.2018.869. PMID: 30263060; PMCID: PMC6145522.
30. Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, Hinrichs CS, Chieppa M, Cassard L, Palmer DC, Boni A, Muranski P, Yu Z, Gattinoni L, Antony PA, Rosenberg SA, Restifo NP. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2197-204. doi: 10.1172/JCI32205. Erratum in: *J Clin Invest*. 2007 Oct;117(10):3140. PMID: 17657310; PMCID: PMC1924500.
31. Vétizou M et al., Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):1079-84. doi: 10.1126/science.aad1329. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26541610; PMCID: PMC4721659.
32. Mager LF, Burkhard R, Pett N, Cooke NCA, Brown K, Ramay H, Paik S, Staggs J, Groves RA, Gallo M, Lewis IA, Geuking MB, McCoy KD. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science*. 2020 Sep 18;369(6510):1481-1489. doi: 10.1126/science.abc3421. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32792462.
33. Routy B et al., Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018 Jan 5;359(6371):91-97. doi: 10.1126/science.aan3706. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29097494.
34. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, Benjamin FW, Lei YM, Jabri B, Alegre ML, Chang EB, Gajewski TF. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):1084-9. doi: 10.1126/science.aac4255. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26541606; PMCID: PMC4873287.

35. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, Luke JJ, Gajewski TF. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018 Jan 5;359(6371):104-108. doi: 10.1126/science.aao3290. PMID: 29302014; PMCID: PMC6707353.
36. Haskó G, Kuhel DG, Németh ZH, Mabley JG, Stachlewitz RF, Virág L, Lohinai Z, Southan GJ, Salzman AL, Szabó C. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):1013-9. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.1013. PMID: 10623851.
37. Cekic C, Linden J. Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2014 Dec 15;74(24):7239-49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3581. Epub 2014 Oct 23. PMID: 25341542; PMCID: PMC4459794.
38. Allen-Vercoe E, Coburn B. A Microbiota-Derived Metabolite Augments Cancer Immunotherapy Responses in Mice. *Cancer Cell*. 2020 Oct 12;38(4):452-453. doi: 10.1016/j.ccell.2020.09.005. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32976777.
39. Almeida, A., Nayfach, S., Boland, M. et al. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 39, 105–114 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0603-3>.
40. Article L5111-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 23 mars 2021]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006689867/
41. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal product for human use. *Official Journal of the European Union* nov 6, 2001.
42. Agence pour la promotion du microbiome, APM ; rapport 2022 - confidentiel - 2022.
43. <https://www.finchtherapeutics.com/platform/>
44. Dreher-Lesnicks, Stibitz, et Carlson, Jr., « U.S. Regulatory Considerations for Development of Live Biotherapeutic Products as Drugs ».
45. Food and Agriculture Organization of the United Nations et World Health Organization, Probiotics in Food.

46. Définition brevets ; <https://www.wipo.int/portal/en/index.html>
47. Efremova M, Rieder D, Klepsch V, Charoentong P, Finotello F, Hackl H, Hermann-Kleiter N, Löwer M, Baier G, Krogsdam A, Trajanoski Z. Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and changes the dynamics of tumor evolution. *Nat Commun.* 2018 Jan 2;9(1):32. doi: 10.1038/s41467-017-02424-0. PMID: 29296022; PMCID: PMC5750210.
48. FDA Approves Merck's KEYTRUDA® (pembrolizumab) for First-Line Treatment of Patients With Unresectable or Metastatic MSI-H or dMMR Colorectal Cancer ; <https://www.merck.com/news/fda-approves-mercks-keytruda-pembrolizumab-for-first-line-treatment-of-patients-with-unresectable-or-metastatic-msi-h-or-dmmr-colorectal-cancer/>
49. Research C for DE and. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. FDA; 2018 [cité 10 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers>
50. Food Drug Administration - FDA. Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information; Guidance for Industry. Rockville, MD (2016).
51. The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM. Live biotherapeutic products for human use 3053 monograph. *Europ Pharmacopoeia.* (2019) 9:6522–3).
52. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-advice-protocol-assistance>
53. Requirements to the chemical and pharmaceutical quality documentation concerning investigational medicinal products in clinical trials ;<https://www.ema.europa.eu/en/requirements-chemical-pharmaceutical-quality-documentation-concerning-investigational-medicinal>
54. Le Guichet innovation et orientation ; <https://ansm.sante.fr/vos-demarches/industriel/guichet-innovation-et-orientation-gio>
55. <https://www.who.int/observatories/global-observatory-on-health-research-and-development/analyses-and-syntheses/target-product-profile/who-target-product-profiles>

56. Chih-Yiu Tsai et al., 2022 ; Gut Microbial Signatures for Glycemic Responses of GLP-1 Receptor Agonists in Type 2 Diabetic Patients: A Pilot Study.

Utilisation de biothérapies issues du microbiome en oncologie, étude de cas du développement du Bifidobacterium pseudolongum.

Dans le sillage des travaux des laboratoires de recherches et des nouvelles technologies, le microbiome et la relation hôte microbes est un levier d'action pour l'innovation en santé. La prise en charge de nombreuses maladies en intervenant sur le microbiome est aujourd'hui une réalité. L'ensemble de ses modalités thérapeutiques est regroupé sous le terme MMP.

Une dimension supplémentaire a été ajoutée avec la proposition selon laquelle les variations du microbiote intestinal d'une personne pouvaient influencer les effets de traitements existants tel que l'immunothérapie dans la prise en charge de certains cancers.

Dans ce travail, nous proposons le plan de développement d'une souche bactérienne prometteuse. L'objectif est de mettre en avant les étapes nécessaires et spécifiques pour que cette recherche prometteuse puisse progresser vers une preuve de concept clinique et permettre un bénéfice pour les patients.

Use of microbiome-based biotherapies in oncology, a case study of Bifidobacterium pseudolongum development.

In the wake of the work of research laboratories and new technologies, the microbiome and the host-microbe relationship is a driver for innovation in healthcare. The treatment of many diseases by acting on the microbiome is now a reality. All these therapeutic modalities are grouped under the term MMP.

An additional dimension has been added with the proposal that variations in a person's gut microbiota could influence the effects of existing treatments such as immunotherapy in the management of cancers.

In this work, we propose the development plan of a promising bacterial strain. The objective is to highlight the necessary and specific steps for this promising research to progress towards a clinical proof of concept and allow a benefit for patients.

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

MOTS-CLES : Microbiome, Biothérapie, Oncologie, LBP, Innovation, Immunothérapies

**Université Toulouse III Paul Sabatier
UFR de Santé, Département des Sciences Pharmaceutiques
35, chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex**

**Directeur de thèse : Frédéric ELUSTONDO
Auteur : Clément RIPOLL**