

# Recherche et développement à partir des substances naturelles

Alexandre MACIUK

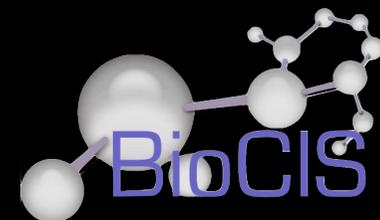
UMR 8076 CNRS BioCIS

Faculté de Pharmacie

Bâtiment Henri Moissan, Bureau 1712

[alexandre.maciuk@universite-paris-saclay.fr](mailto:alexandre.maciuk@universite-paris-saclay.fr)

université  
PARIS-SACLAY



Biomolécules :  
Conception, Isolement, Synthèse

FACULTÉ DE PHARMACIE

# PLAN

## I - Comment trouver des substances naturelles bioactives ?

- par criblage systématique (taxol)
- fortuitement (par “sérendipité”) (alcaloïdes de la pervenche)
- en observant les usages traditionnels (pavot, cannabis, armoise)
- en modélisant la biologie

## II - Différentes façons d'en faire des médicaments

- tels quels (antitumoraux, antidouleurs, cannabis)
- après modification
- en les adaptant à une stratégie d'adressage (ex. de la stratégie ADC)

## III - Atelier de “valorisation”

- exemple des alcaloïdes antiparkinsonien de *Mucuna pruriens*.

Comment trouver des substances naturelles bioactives ?

# I – Par criblage systématique

Introduction : exemple de la cible microtubule

1 et 2 = prophase

3 = métaphase

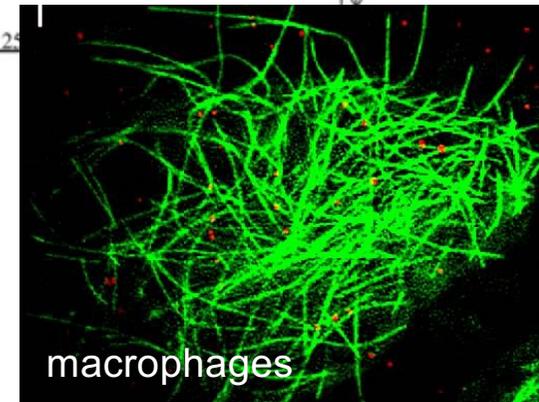
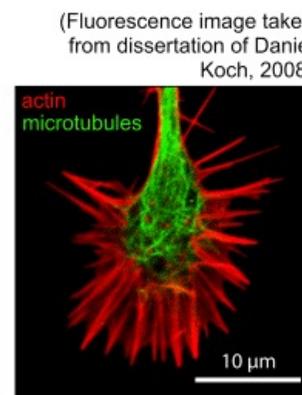
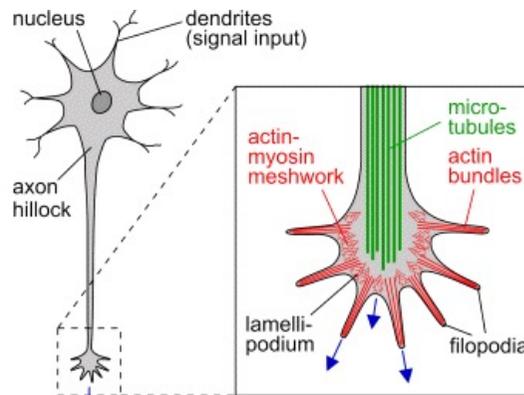
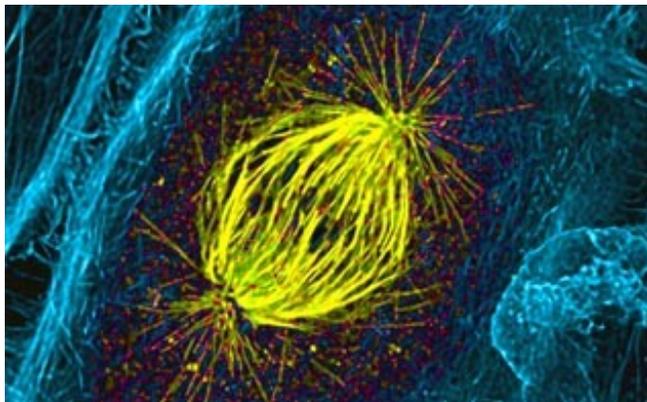
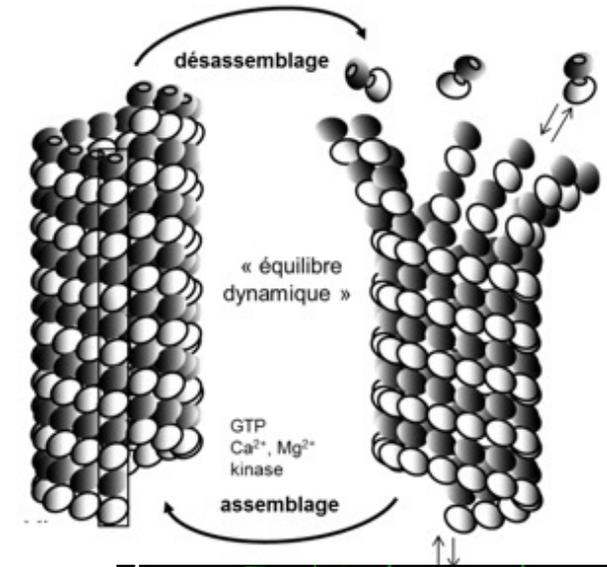
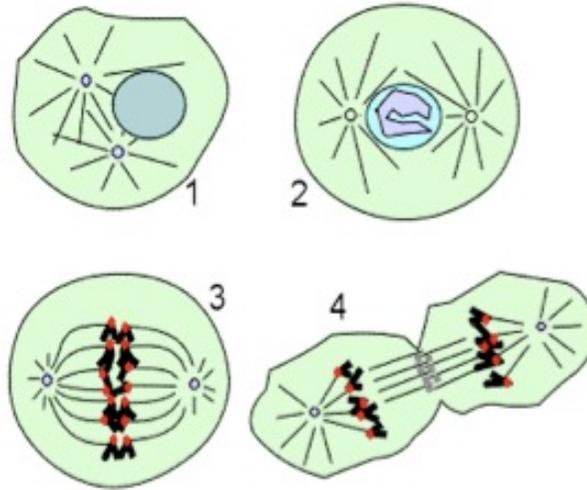
4 = anaphase

Cellule humaine « rapide » :

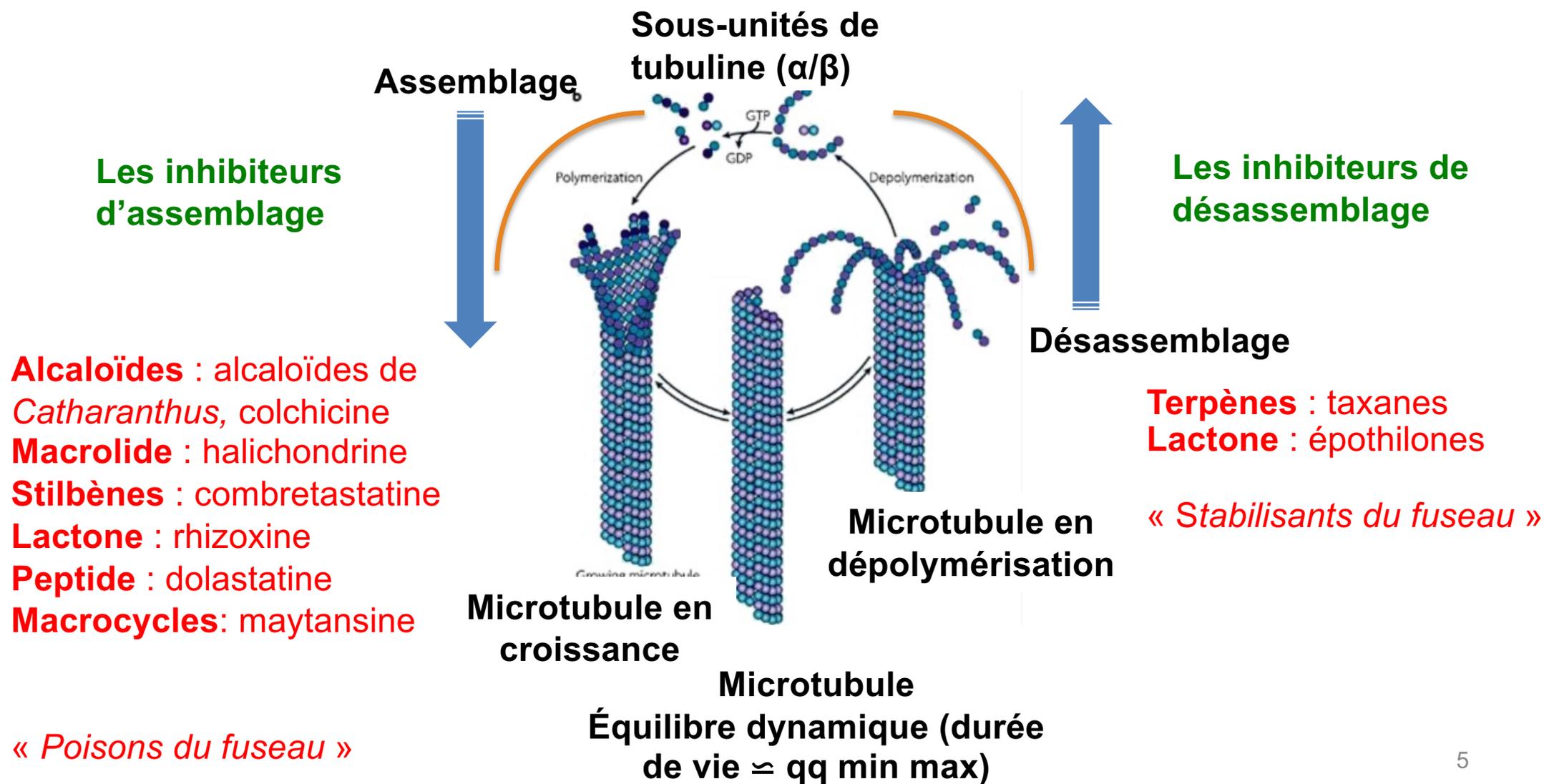
16-48H, au max 60 cycles.

Cellules cancéreuses :

- pas limitées par le contact
- “immortelles”
- divisions plus rapides.

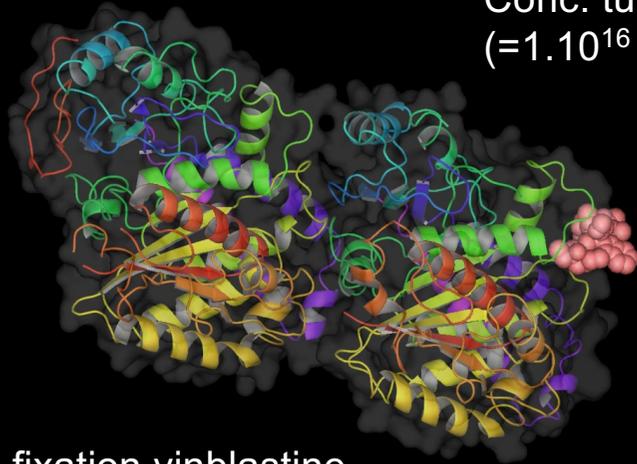


## 2 types d'effet sur les microtubules (test *in vitro*)

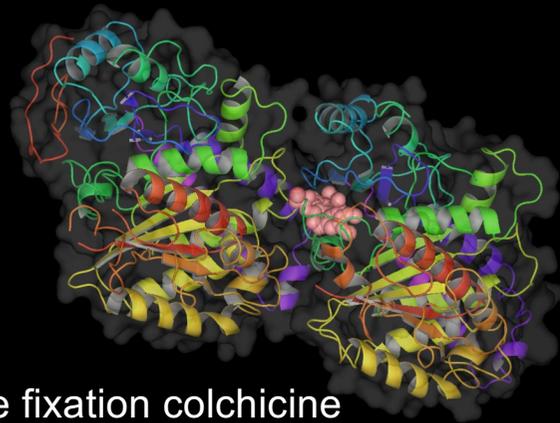
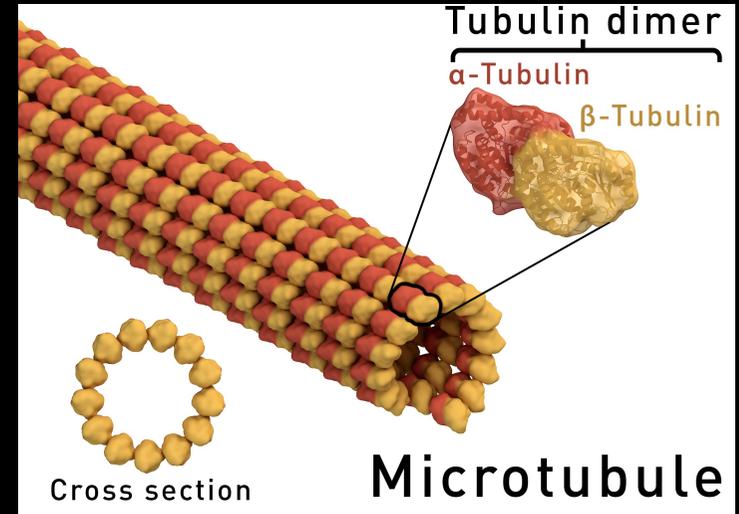


# Différents sites de fixation à la tubuline :

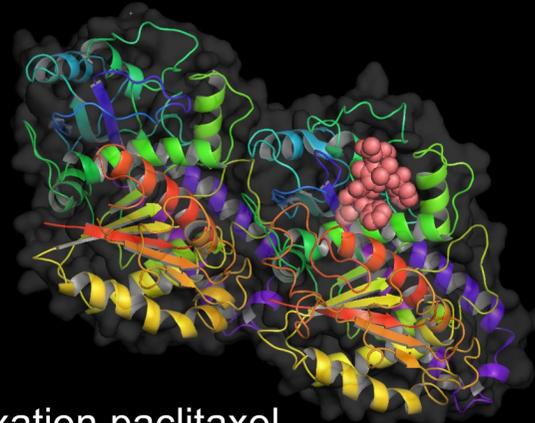
Conc. tubuline dans cellule : 2 mg/ml !  
(=1.10<sup>16</sup> molécules/ml)



Site fixation vinblastine



Site fixation colchicine

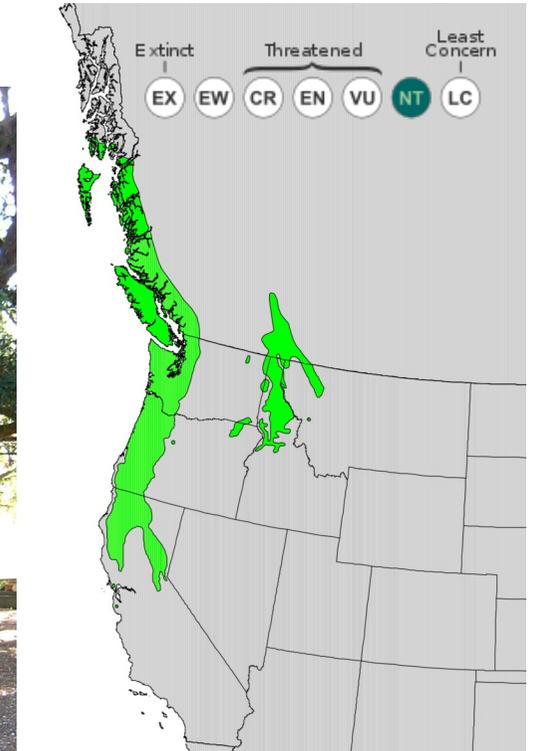


Site fixation paclitaxel

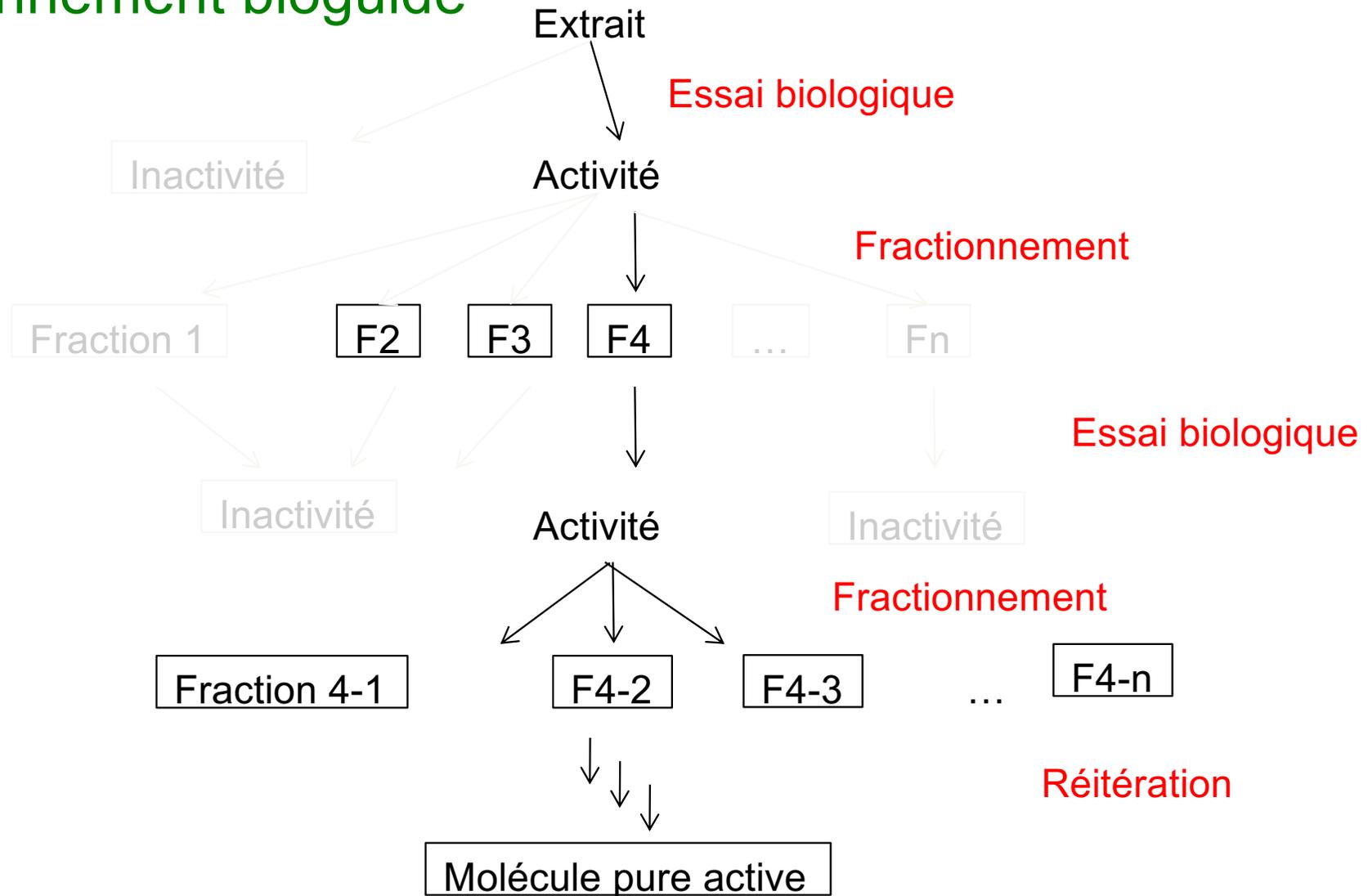
## Exemple des taxanes

*Taxus* spp - ifs : arbres sacrés, armes, cimetière, sorcellerie...

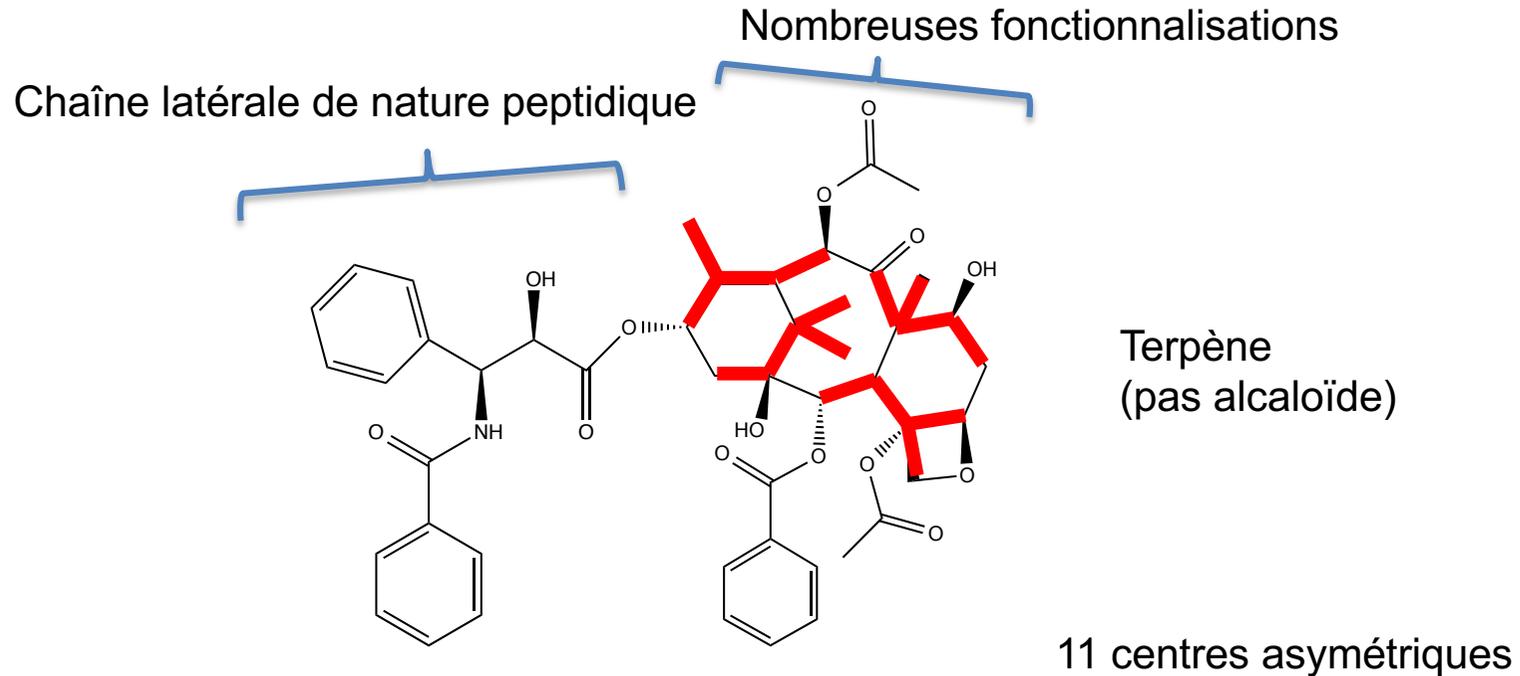
Collecte écorce d'un if américain, *Taxus brevifolia*, par botaniste en 1962 ;  
**Criblage** par RTI, 1964, actif (criblage de 35 000 extraits criblés de 1960 à 1981 par NCI).  
Fractionnement bio-guidé, isolement et structure par RX du **taxol** (1971).



# Fractionnement bioguidé



# Le taxol/paclitaxel :



Suite à découverte en 1971 : jugé comme ne méritant pas un développement (autres produits équivalent, peu soluble...).

1979 : démo que mécanisme de **stabilisation** fuseau, blocage en métaphase et à d'autres stades, mort par apoptose. 1999 : liaison à Bcl-2 = induction apoptose.

AMM FDA 1992 (ovaire), 1994 (sein).

BMS, sous le nom Taxol®. Oblige les chercheurs à utiliser une nouvelle DCI : **paclitaxel**.

Chiffre d'affaire à son apogée (fin années 2000) : 2 Md \$/an.

## II – Fortuitement, par “sérendipité”

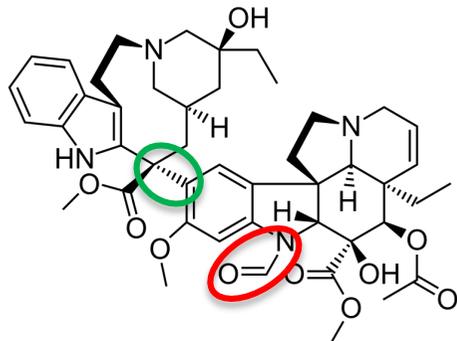
### Alcaloïdes de la pervenche tropicale

*Catharanthus roseus*. Apocynaceae.

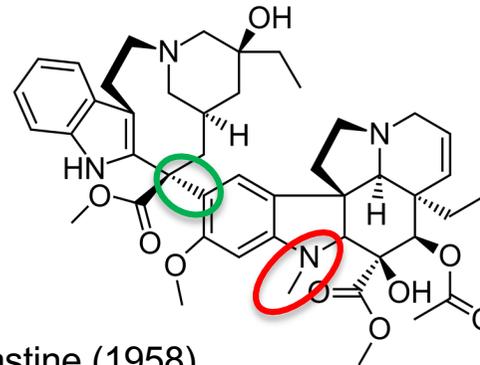
Découverte par sérendipité ! Usage traditionnel anti-diabète. Extrait feuilles sur souris en 1958 : mort par infection. Leucémie. (Noble et Beer, Canada). Fractionnement bioguidé : isolement de vincristine et vinblastine.



Rq : Petite pervenche :  
*Vinca minor*



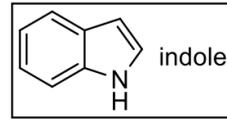
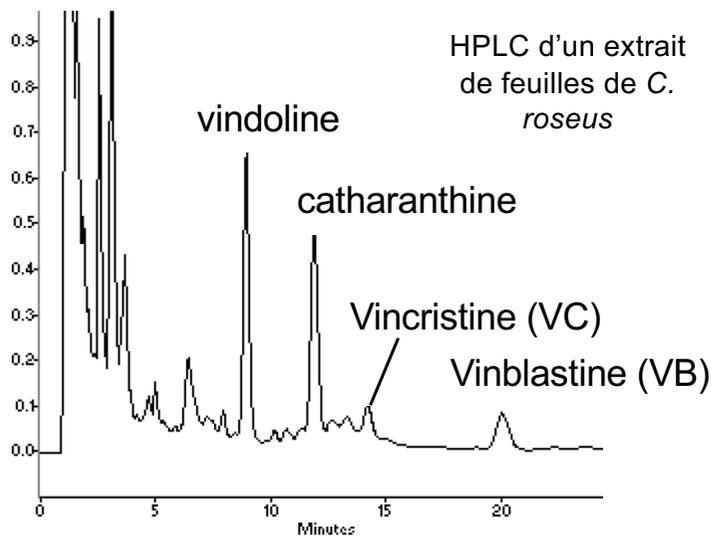
Vincristine (1962)



Vinblastine (1958)

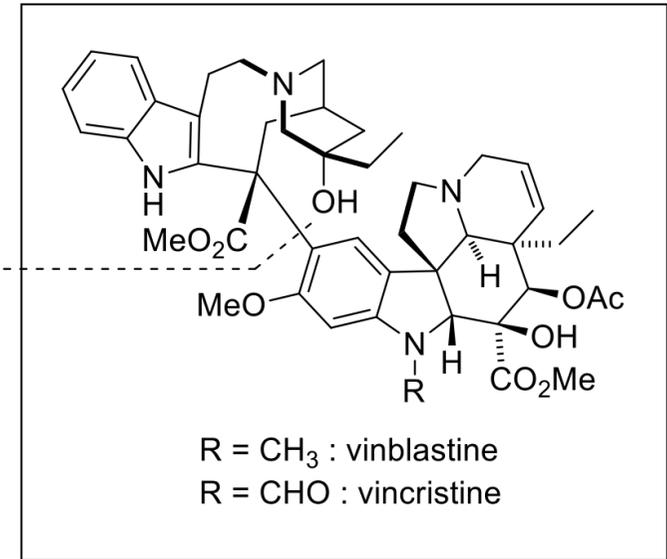
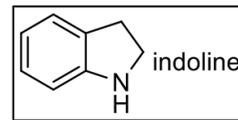


Parties aériennes : alcaloïdes 1% max, 90 alcaloïdes, VC = 0,0003%, VB 0,01%.



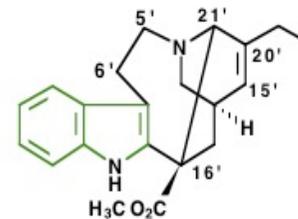
partie indolique provenant de la catharanthine

partie indoline (dihydroindolique) correspondant à la vindoline

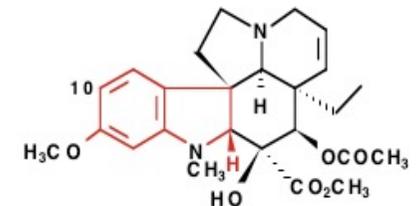


- Alcaloïdes indolomonoterpéniques (nombreux réarrangements biosynthétiques) ;
- Bis-indoliques (“dimères”, “binaires”) ;
- Une seule configuration biosynthétique (config. C16' indis. à l'activité) ;
- Monomères inactifs.

vinblastine = vincalécoblastine = VB  
vincristine = leurocristine = VC

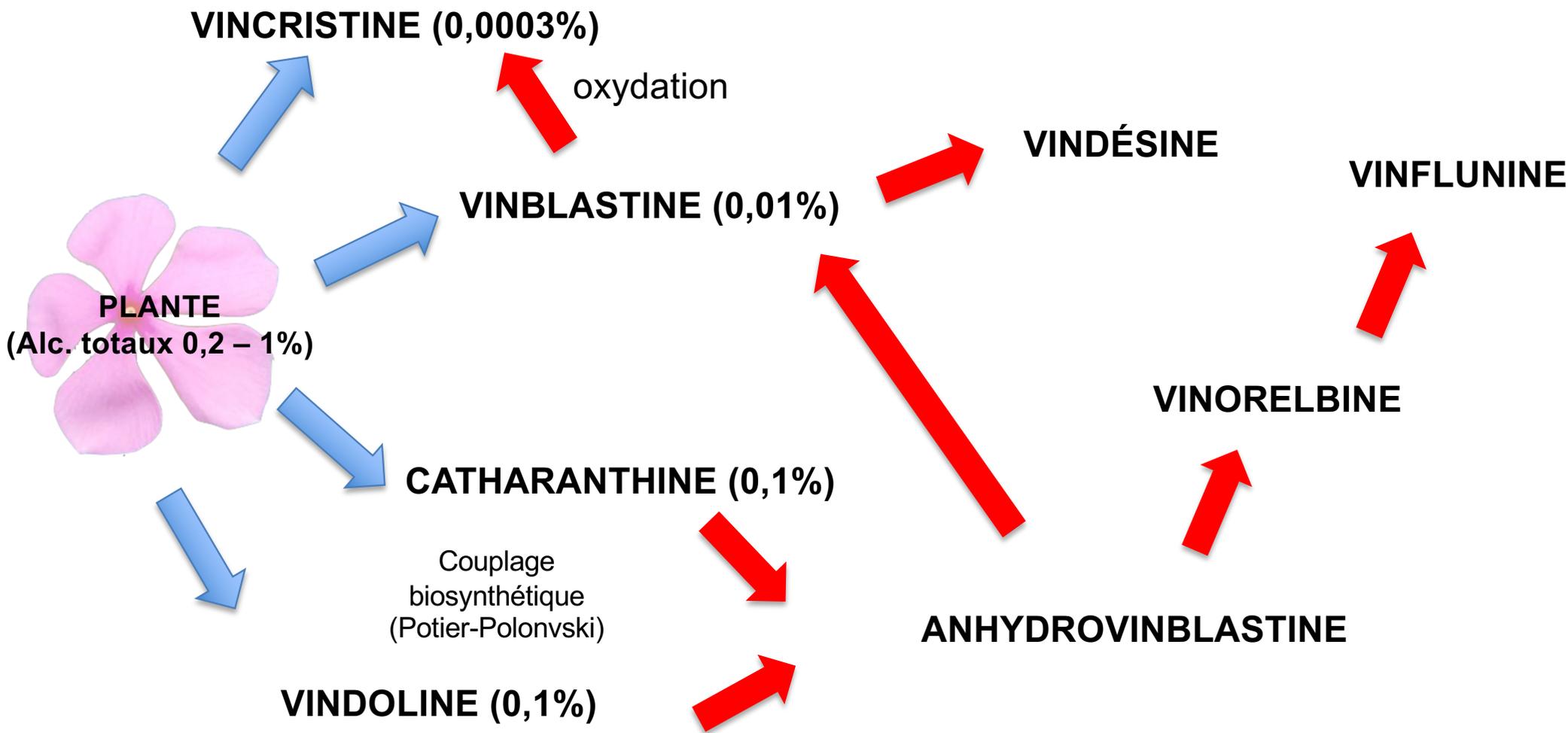


**Catharanthine**  
monomère indolique



**Vindoline**  
monomère dihydroindolique

Filière de production :





En réalité, **de nombreux médicaments majeurs ont été découverts sans avoir été spécifiquement recherchés** :

pénicilline, paracétamol, sulfamides hypoglycémiants, sildénafil, benzodiazépines, lithium...



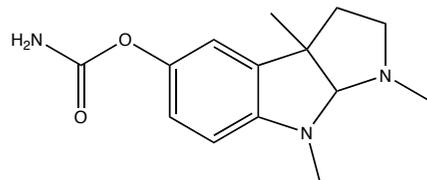
Viagra<sup>®</sup> (sildénafil) :  
AMM Europe 1999.  
Bénéfice 2010 : 2Md \$

Voir aussi : DOI [10.31887/DCNS.2006.8.3/tban](https://doi.org/10.31887/DCNS.2006.8.3/tban)  
DOI [10.5306/wjco.v3.i1.1](https://doi.org/10.5306/wjco.v3.i1.1)  
DOI [10.1016/j.tips.2016.03.004](https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.03.004)

# III – En observant les usages traditionnels

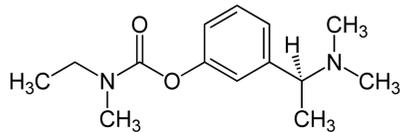
## 1) Ex. de poison d'ordalie africain : inhibiteurs de l'acétylcholine estérase

*Physostigma venenosum*, Balf  
Fabaceae.

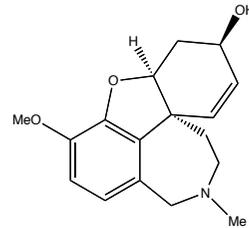


Physostigmine (=eserine)

Dérivé hémisynthétique :  
rivastigmine (Exelon®)



*Leucojum spp, Narcissus spp, Galanthus spp,*  
Amaryllidaceae  
Anti-migraine, Bulgarie

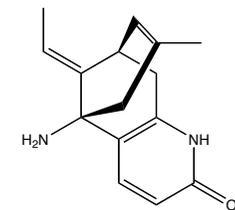


(-)-Galanthamine  
(isoquinoleic)

Reminyl®

Produit à présent par synthèse

*Lycopodium serratum (=Huperzia serrata),*  
Lycopodiaceae  
Anti-inflamm. en Chine



Huperzine A  
(quinolizidinic)

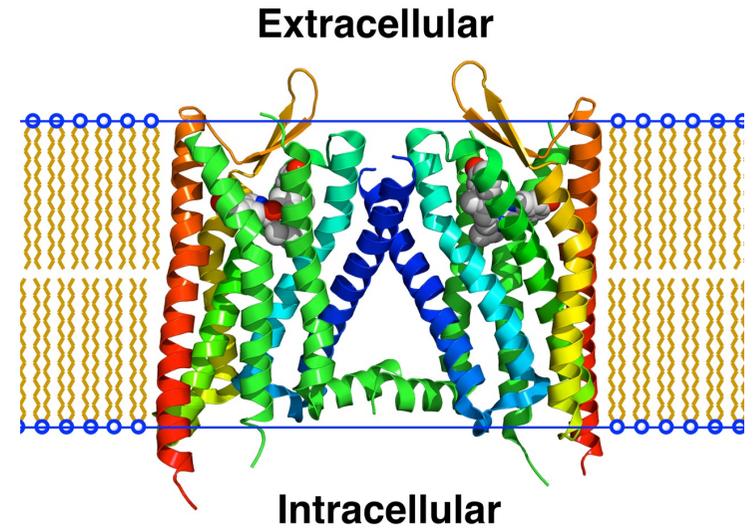
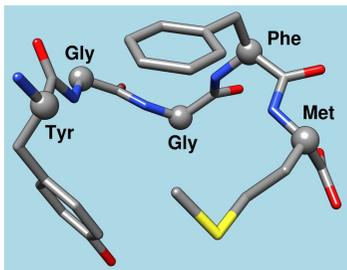
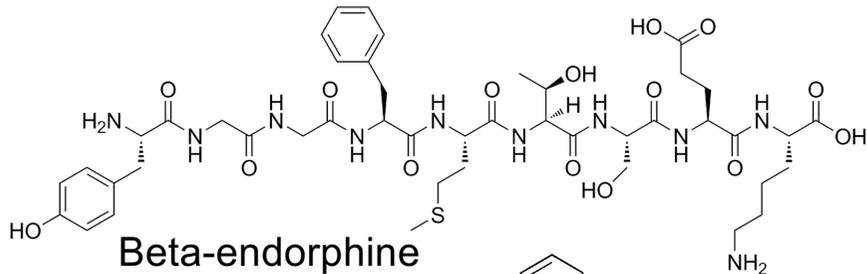
Le prochain ?  
Non car SMR faible...

Conclusion : chimie et botanique différentes... mais même activité.



## Endorphines :

1970s : identification des R opioïdes (dans SNC et TD), puis des ligands **agonistes endogènes** : enképhalines (« dans la tête » en grec) et endorphines (hypophyse et hypothalamus), dynorphine. Sécritées lors de stress, sport intense, douleur, orgasme, rire, consommation de chocolat, effet placebo...



Récepteur  $\kappa$ -opioïde (GPCR)

Opiïdes endogènes :

Enképhalines : agoniste récepteurs  $\delta$  (DOR)

Endorphines : agoniste récepteurs  $\mu$  (MOR)

Dynorphine : agoniste récepteurs  $\kappa$  (KOR)

## Effet de la liaison d'un agoniste :

- Inhibition de l'adénylate cyclase : diminution de la production d'AMPc, de l'activation de la PKA...  $\Rightarrow$  diminution de la transcription des gènes cibles ;
- inhibition des récepteurs  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants : hyperpolarisation de la membrane  $\Rightarrow$  le neurone ne transmet plus le signal et ne sécrète plus de substance P.

## b) La plante

Pavot à opium (*Papaver somniferum*, ne pas confondre avec coquelicot, *Papaver rhoeas*).  
Cultivé depuis 5000 ans. Europe (graines alimentaires – Huile d'œillette). Variétés *nigrum* (Eur.), *album* (Inde),  
*glabrum* (Asie). Huile d'œillette = alimentaire et siccativ.



*Papaver rhoeas* 18



Mode de récolte de l'opium :

- incision des capsules (latex (=émulsion) : alcaloïdes, sucres, acides organiques...) ;
- raclage du latex qui exsude ;
- latex séché = opium.

c) Historique :

Grèce,  
Egypte,  
Perse...

civilisation  
assyrienne  
(-800)



Déesse grecque  
de la guérison  
(- 2000)

### Usage oral :

Egypte, calmer les bébés.

Thériaque de Galien. Laudanum de Paracelse (*Laudare* : louer) : analgésique soporifique.

### Fumé :

sérénité, tranquillité, plus de limite de temps ou d'espace. On se sent sage, heureux.

Dès 17<sup>e</sup> s. : consommation par chinois. Approvisionnés en opium indien par britanniques. Volonté d'arrêter cette intoxication du peuple : fermeture des ports aux anglais. 1839, guerre. Victoire des anglais, contrôle des ports et « prise » de Hong-Kong, jusqu'en 1997.

Sertürner (allemand), Séquin (français) : isolement de la morphine, 1805.

Antidouleur oral.

Puis détournement « chic » de l'usage. Poésie romantique du 19<sup>e</sup> siècle.

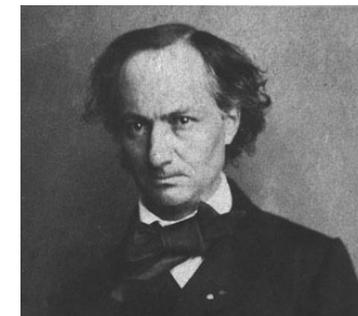
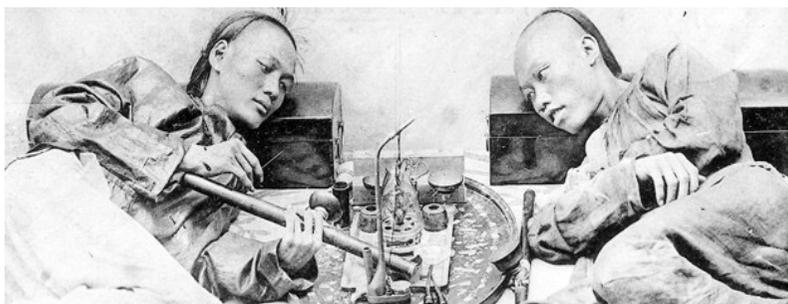
Invention seringue en 1853... : **injection IV.**

Rque : toxicomanies « dépressives » asiatiques (héroïne)

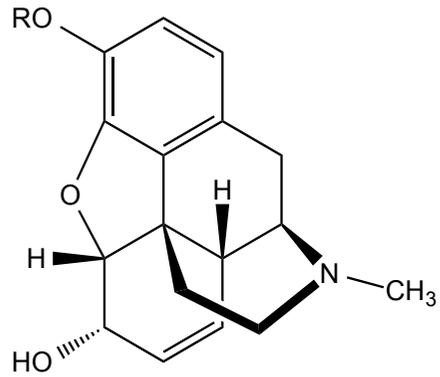
vs « stimulantes » occidentales (cocaïne, amphétamines, LSD)...

*“L'opium agrandit ce qui n'a pas de bornes,  
Allonge l'illimité,  
Approfondit le temps, creuse la volupté,  
Et de plaisirs noirs et mornes  
Remplit l'âme au-delà de sa capacité.”*

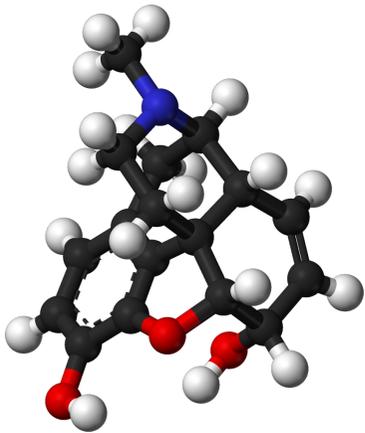
Beaudelaire



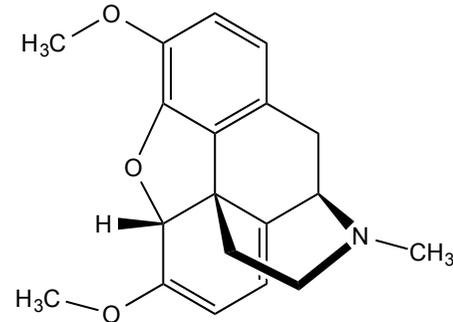
## d) Structures



R = H : Morphine 10%  
R = CH<sub>3</sub> : codéine 2-5 %



Naturel : un seul énantiomère  
(5*R*, 6*S*, 9*R*, 13*S*, 14*R*)  
= le seul actif



Thébaïne <1%

Autres alcaloïdes 2-5%  
(néopine, codéinone,  
oripavine...)



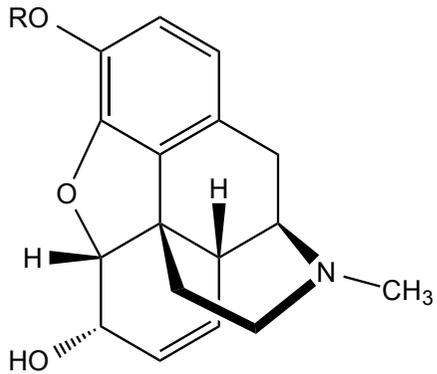
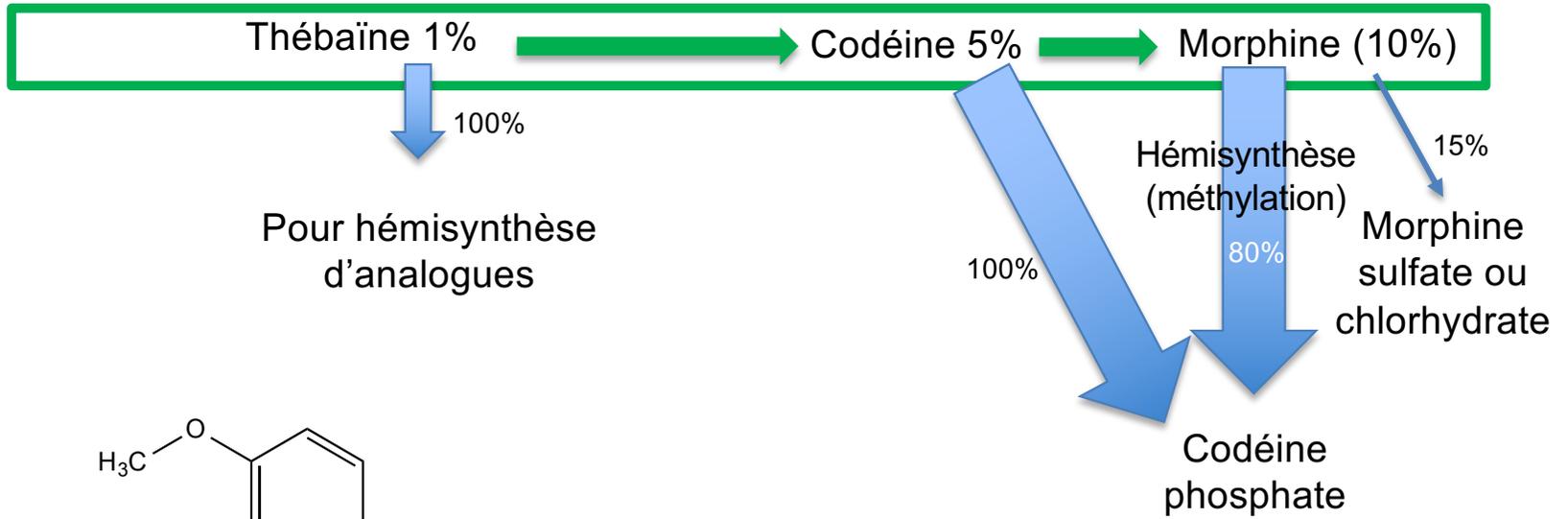
Eau 15%

Acides organiques 30%  
(acides méconique,  
lactique, fumarique,  
oxaloacétique...)

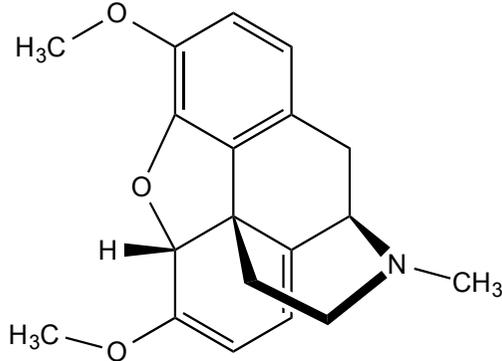
Sucres 20%

d) Filière de production (surtout paille de pavot)

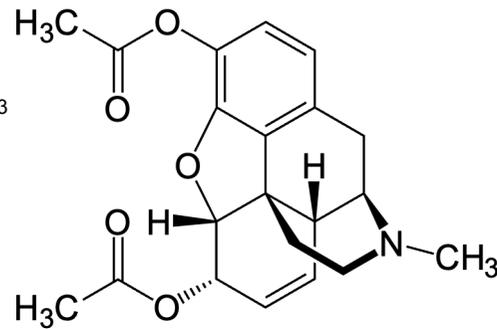
DANS LA PLANTE :



R = H : Morphine  
R = CH<sub>3</sub> : codéine

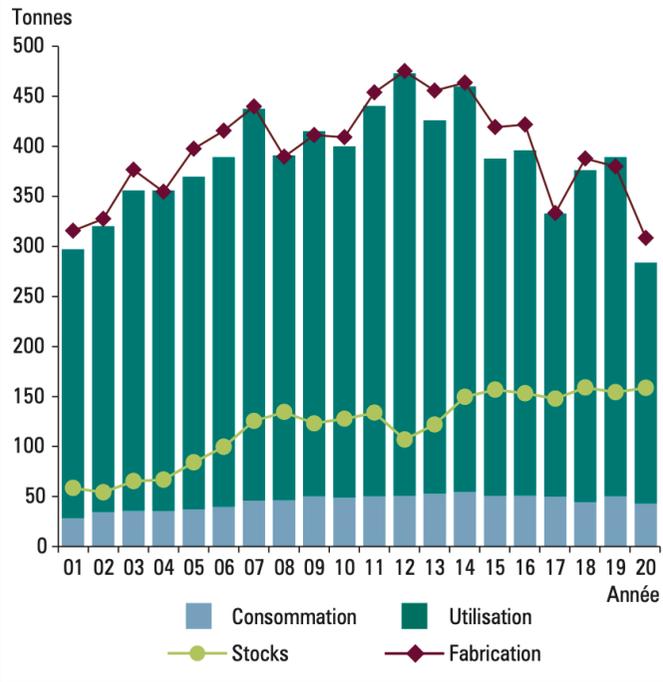


Thébaïne



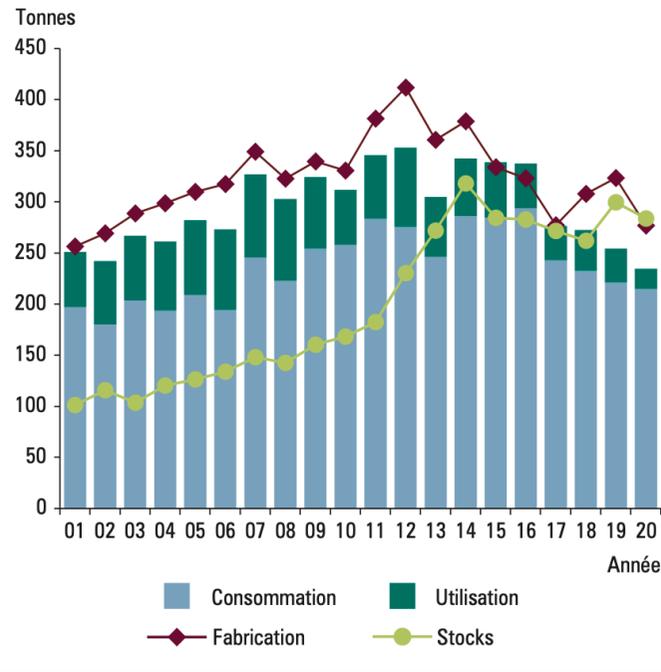
Héroïne

**Figure 11. Morphine : fabrication, stocks<sup>a</sup>, consommation et utilisation au niveau mondial, 2001-2020**



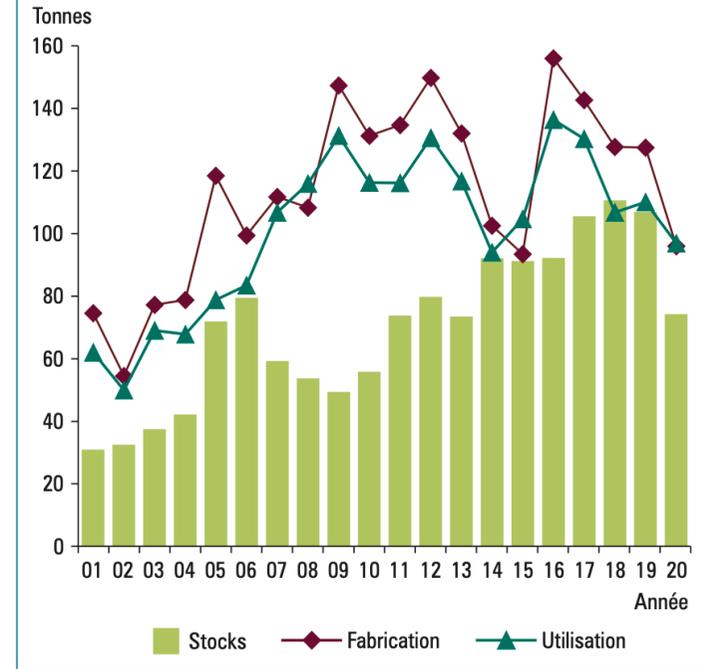
Production : 300T/an  
 Consommation : 50T/an  
 Transformation : 250T/an

**Figure 14. Codéine : fabrication, stocks<sup>a</sup>, consommation et utilisation au niveau mondial, 2001-2020**



Production (incluant hémisynthèse) : 250T/an  
 Consommation : 230T/an

**Figure 18. Thébaïne : fabrication, utilisation et stocks<sup>a</sup> au niveau mondial, 2001-2020**



Production : 80T/an  
 Consommation : 80T/an

## e) Effets pharmacologiques :

**AGONISTES** des R opioïdes ( $\mu$  surtout, mais aussi  $\kappa$ ,  $\delta$ ) :

### Système nerveux central :

- pré-synaptique (fibres nociceptives) : inhibition AMPc et inhib libération glutamate et substance P = **analgésie** ;
- post-synaptique : hyperpolarisation = **analgésie** ;
- Inhibition production enképhalines : augmentation des R = **accoutumance et syndrome de sevrage** ;
- Effet **euphorisant** et de bien-être ;
- Inhibe centres respiratoire bulbaire : diminution sensibilité  $\text{CO}_2$ , **bradypnée** ;
- *Inhibe centre de la toux* : **antitussif** ;
- Active centre du **vomissement** ;
- **myosis** (signe intox. chronique) ;
- **Assèchement** sécrétions.



### Tube digestif :

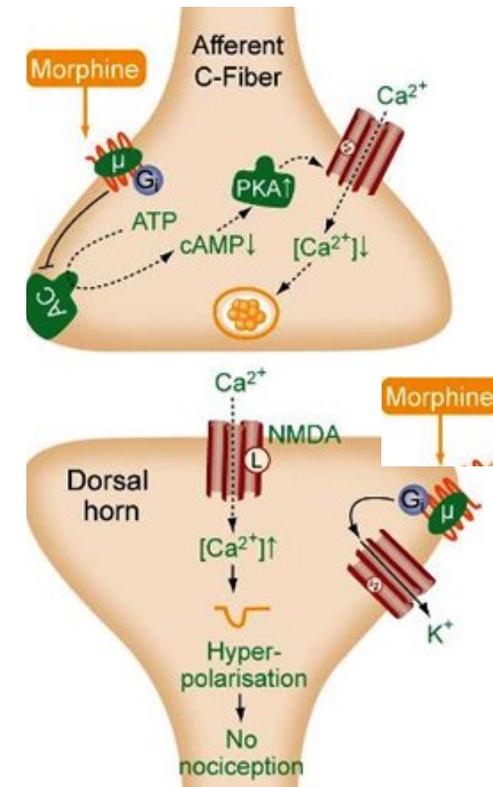
- Ralentissement péristaltisme, stimulation sphincters : **constipation**.

### Autres :

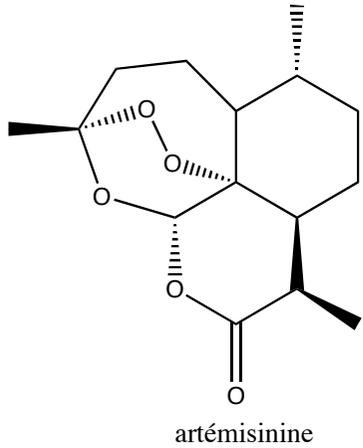
- Rétention urinaire, **bradycardie**, **hypotension**.

Syndrome d'abstinence (=de sevrage) : tout l'inverse ! (rhinorrhée, sueurs, algies, diarrhées, anxiété, insomnie, polypnée...)  
(= malaise de privation = état de manque).

Cause de la **dépendance** (car diminue production enképhalines) et **tolérance** (car nombre de R augmente).



4) Artémisinine :  
Youyou Tu, Nobel médecine 2015.



Antipaludique

*Artemisia annua*

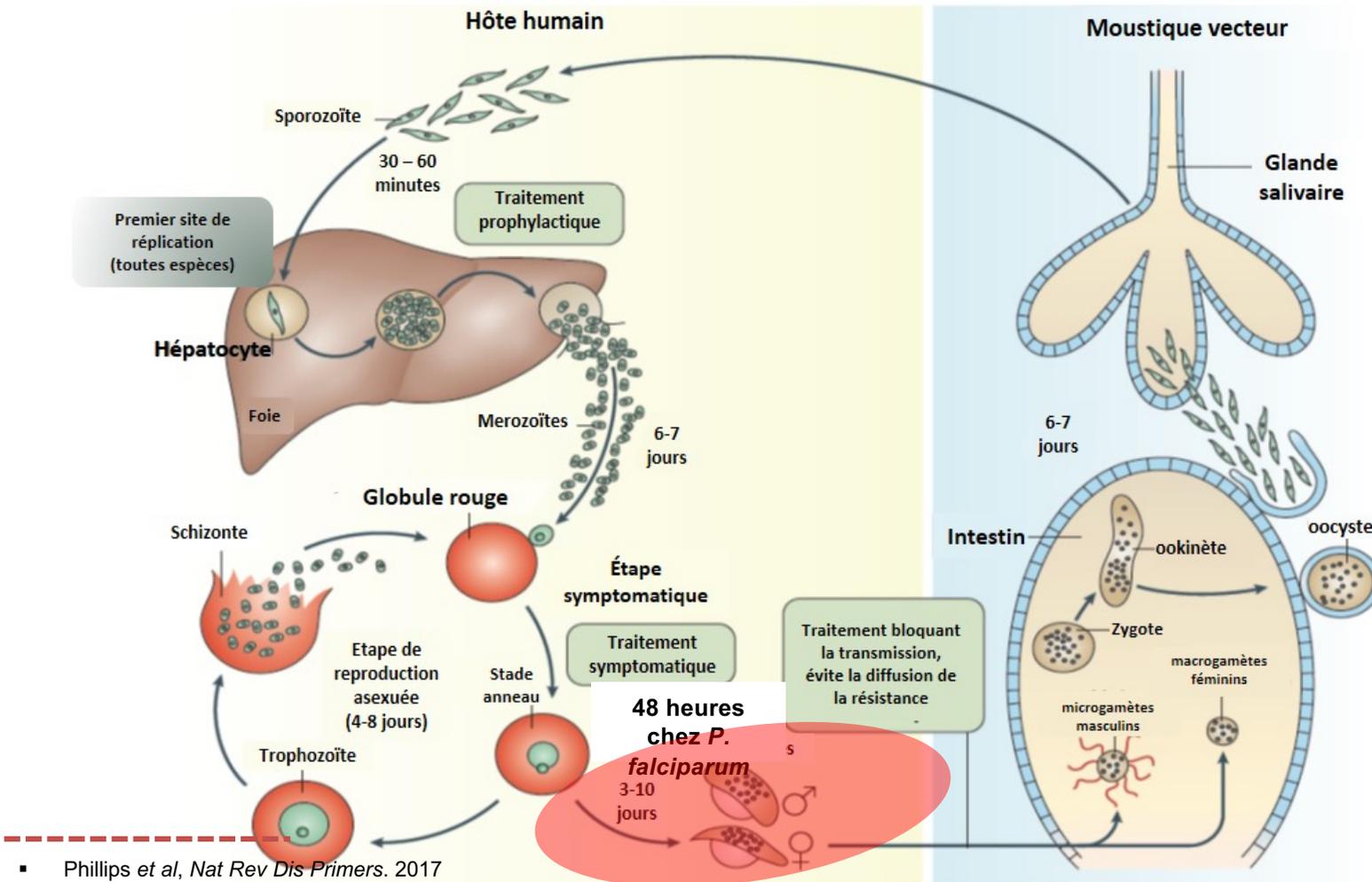


Rque :

Usage en tisane pas recommandé par l'OMS (dosage variable, inconnu, insuffisant, favorable au développement de souches résistantes du parasite.. )

# a) Paludisme et *Plasmodium falciparum*

Cycle de vie du parasite *Plasmodium falciparum* :



▪ Phillips et al, Nat Rev Dis Primers. 2017

# Les hématophages font du tri sélectif...

- 1) *In vitro* : tester les composés/extraits sur parasites vivants : coûteux, marqueurs radioactifs, chronophage...
- 2) Approche ciblée : interférer avec le système de détoxification de l'hème

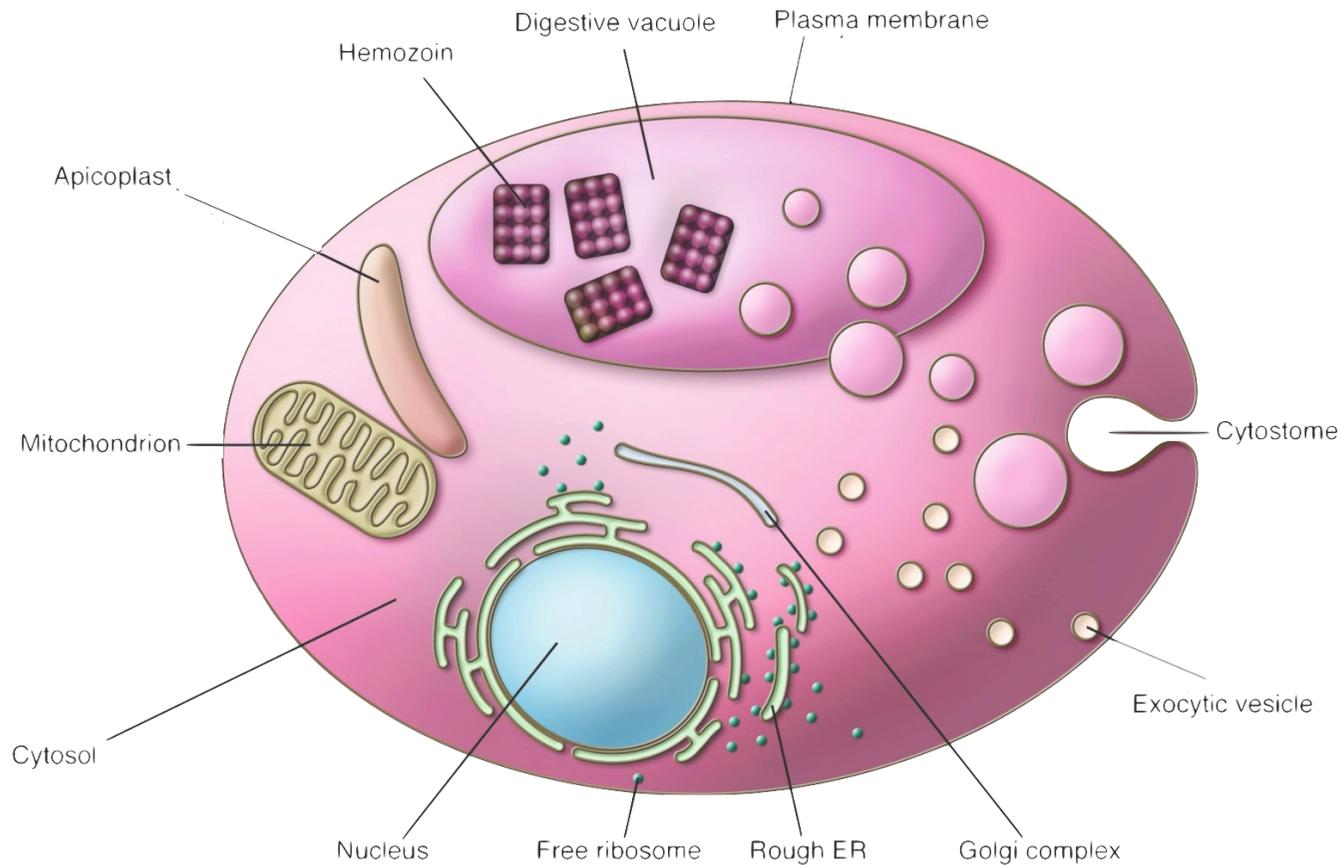
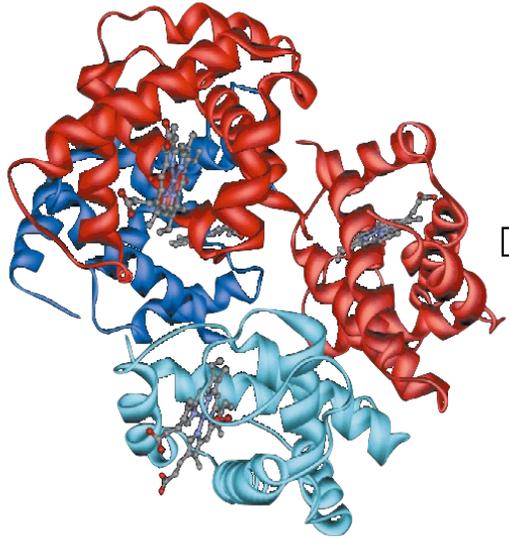
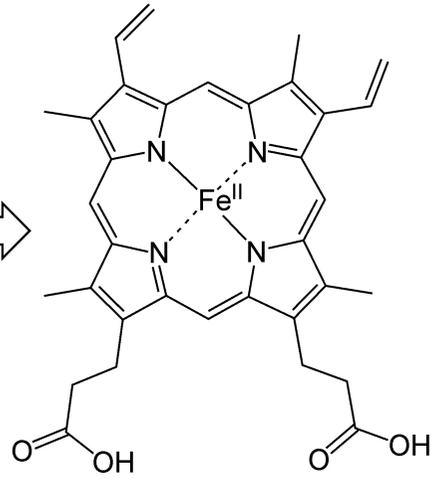
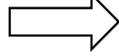


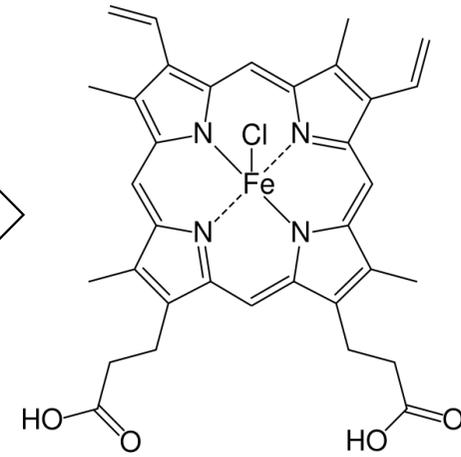
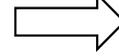
Figure d'après : Malaria: progress, perils, and prospects for eradication, Brian M. Greenwood *et al.* J. Clin. Invest. 118(4): 1266-1276 (2008)



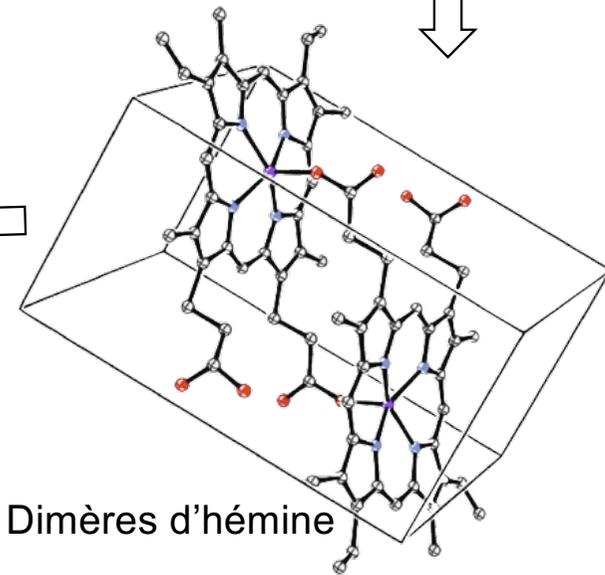
Hémoglobine



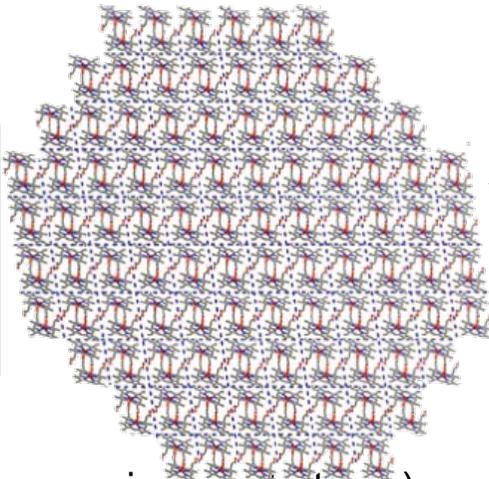
Hème  
(= Fe(II)-protoporphyrine IX)



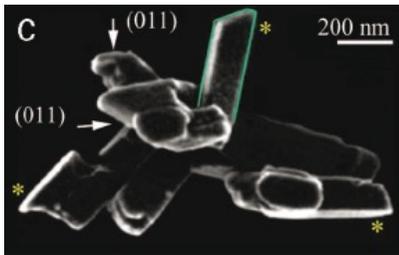
Hémine  
(hematine = OH-Fe(III)-protoporph., synth)



Dimères d'hémine

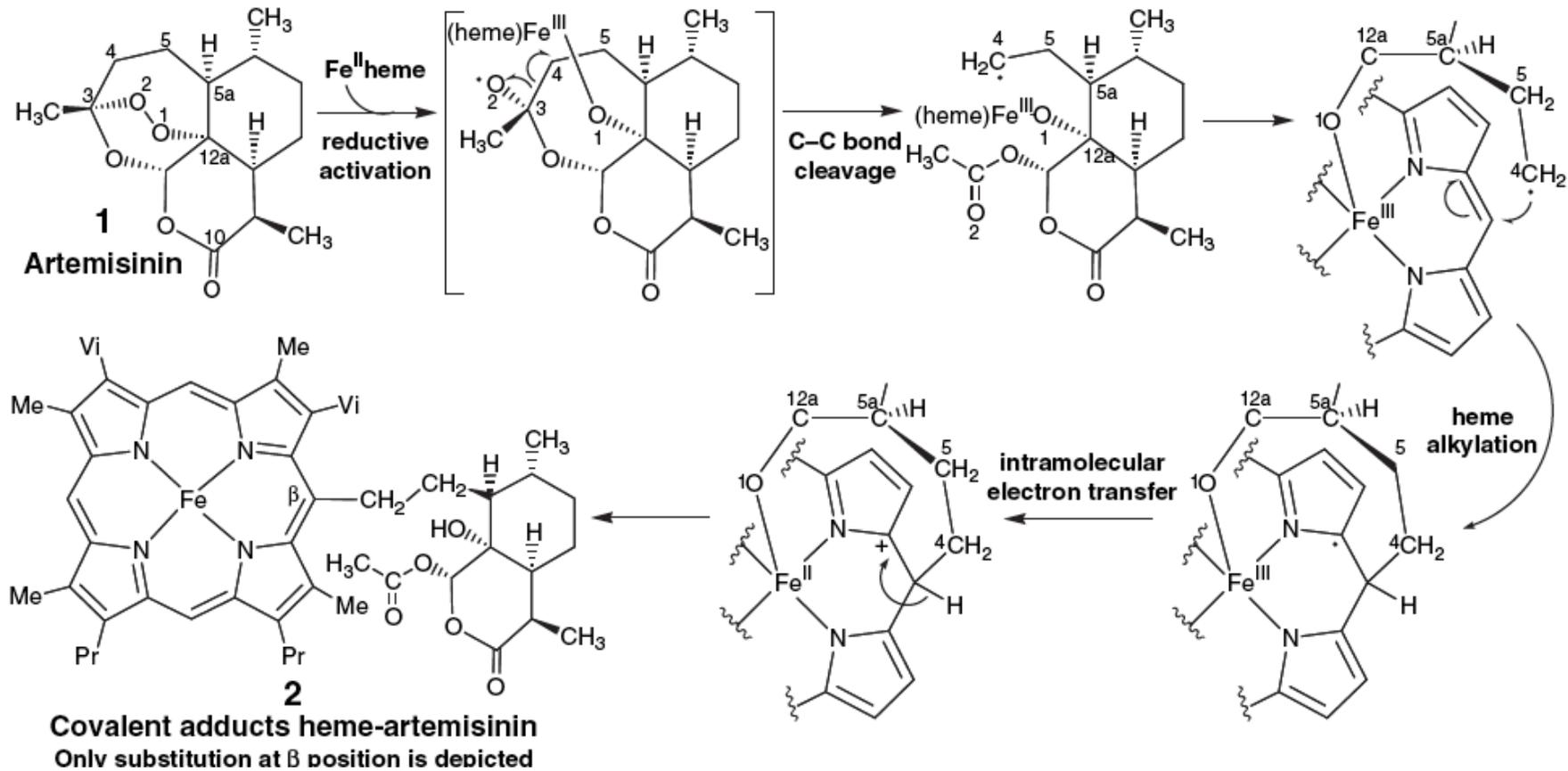


Hémizoïne  
(β-hématine = version synthétique)



C

## Mécanisme d'action de l'artémisinine : fixation covalente à l'hème



b) Exemple de recherche académique : la cible hème dans *Plasmodium falciparum*

## Detection, Characterization, and Screening of Heme-Binding Molecules by Mass Spectrometry for Malaria Drug Discovery

Katalina Muñoz-Durango,<sup>†,‡,⊥</sup> Alexandre Maciuk,<sup>\*,†</sup> Abha Harfouche,<sup>†</sup> Sandra Torijano-Gutiérrez,<sup>†,¶</sup> Jean-Christophe Jullian,<sup>†</sup> Jérôme Quintin,<sup>†,#</sup> Kevin Spelman,<sup>†,||</sup> Elisabeth Mouray,<sup>§</sup> Philippe Grellier,<sup>§</sup> and Bruno Figadère<sup>\*,†</sup>

# Comment détecter des composés ciblant l'hème ?

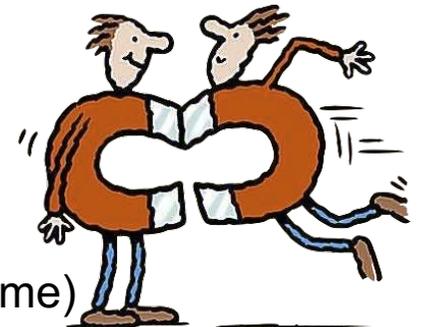
## - CLASSIQUEMENT :

- Séparation des espèces libres ou complexées, mesure UV en milieu basique (405nm)
- Mesure UV d'un complexe hématine libre+pyridine en milieu acide 405 nm.
- calorimétrie
- polymérisation de l'hème
- inhibition de croissance de cristal
- radiomarquage...

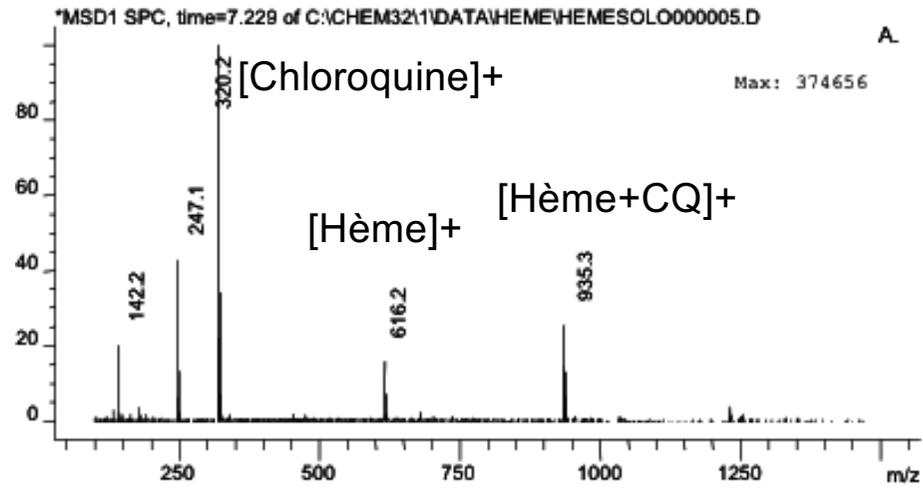
**INCUBATIONS LONGUES, PROTOCOLE COMPLEXES, VARIABILITÉ...**

## OBJECTIF de notre recherche :

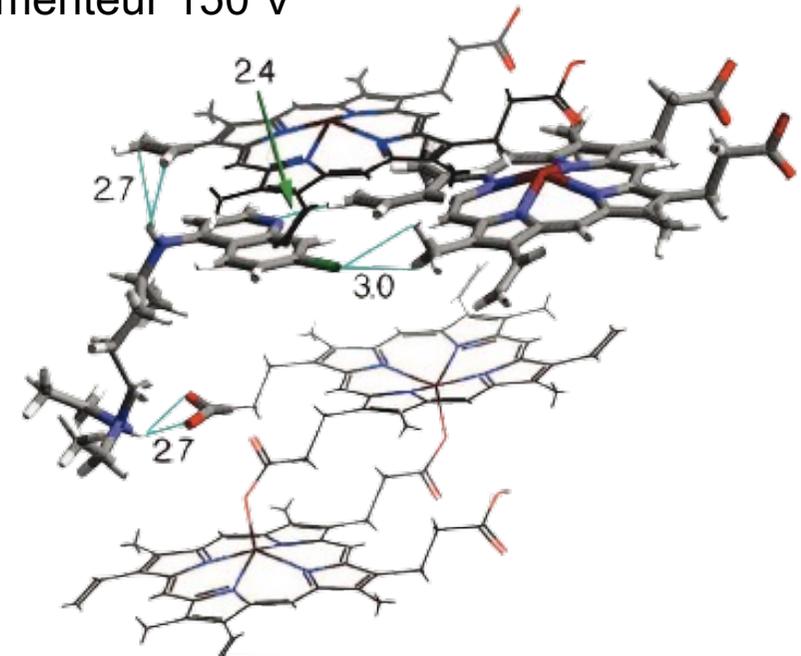
- Détecter les adduits avec l'hème par spectrométrie de masse
- = molécules vraisemblablement antiplasmodiales (détruit le parasite *in vitro*)
  - = molécules potentiellement antimalariques (traitement de la maladie chez l'homme)



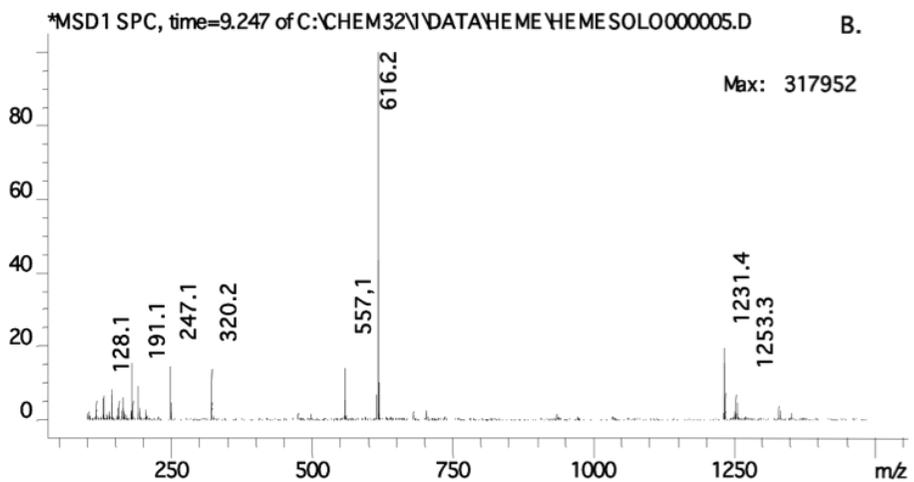
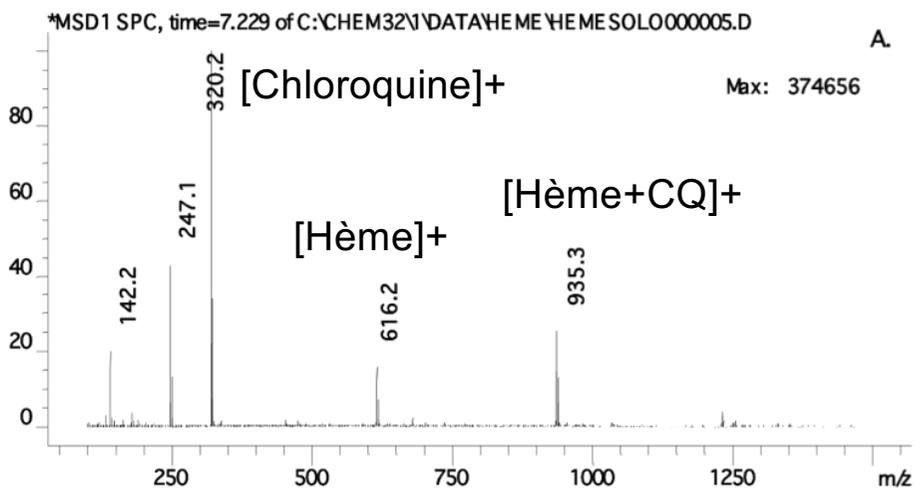
# Études de stabilité



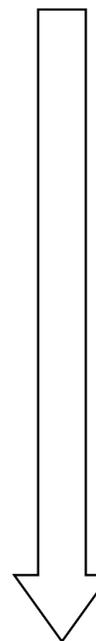
Fragmenteur 150 V



# Études de stabilité



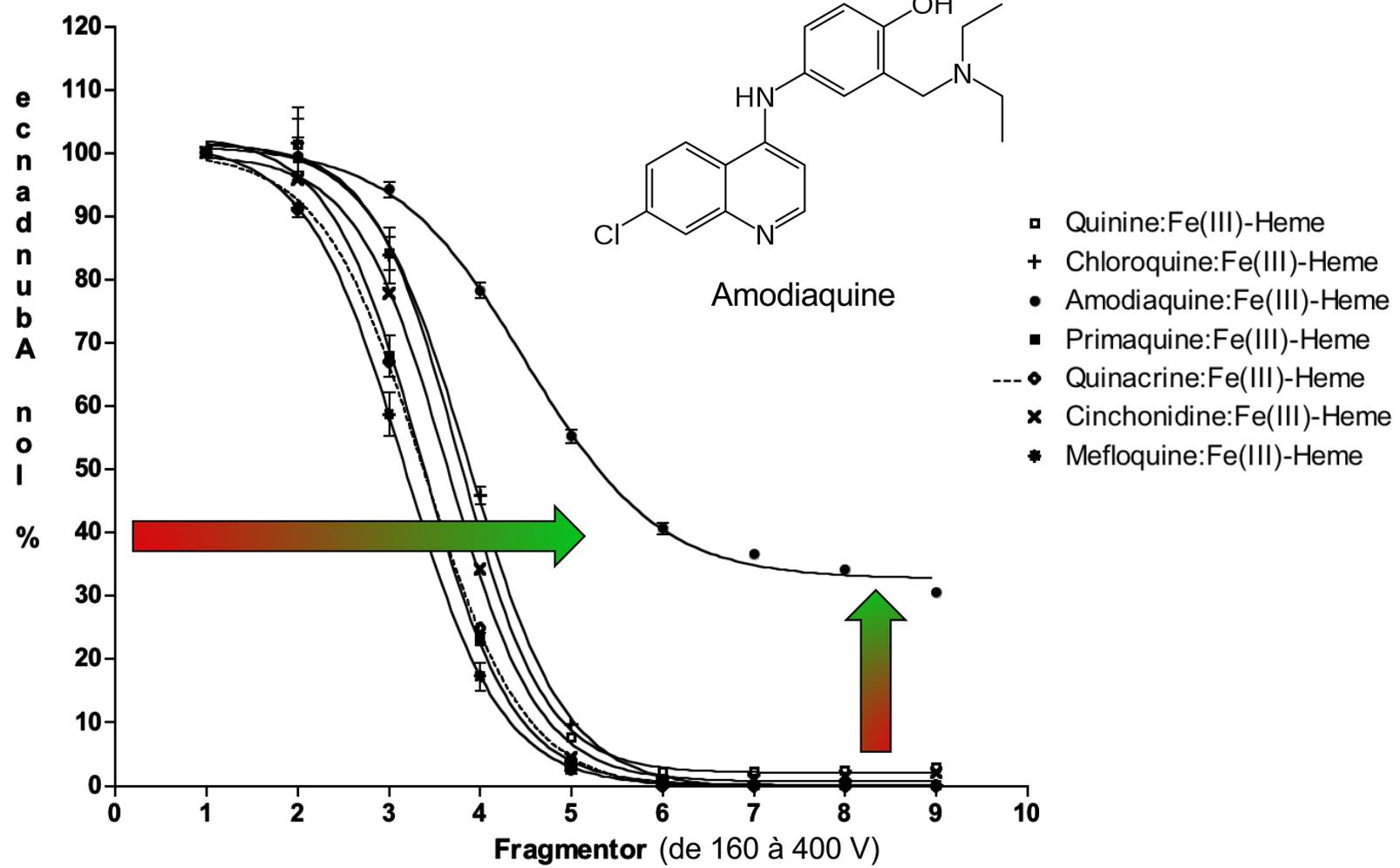
Fragmenteur 150 V



Fragmenteur 250 V

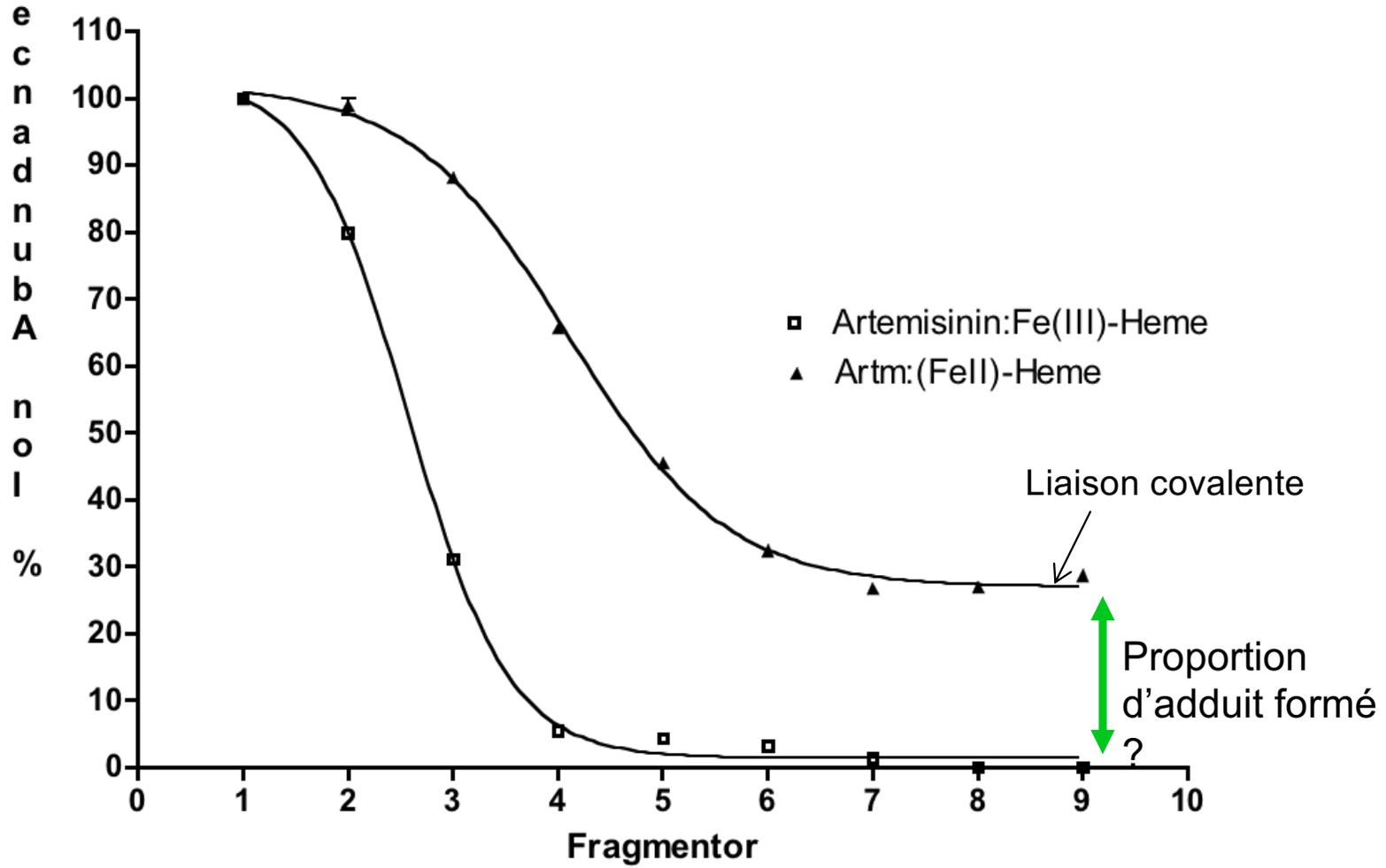
# Courbes de stabilité

Quinololéines :



# Courbes de stabilité

Artémisinine :

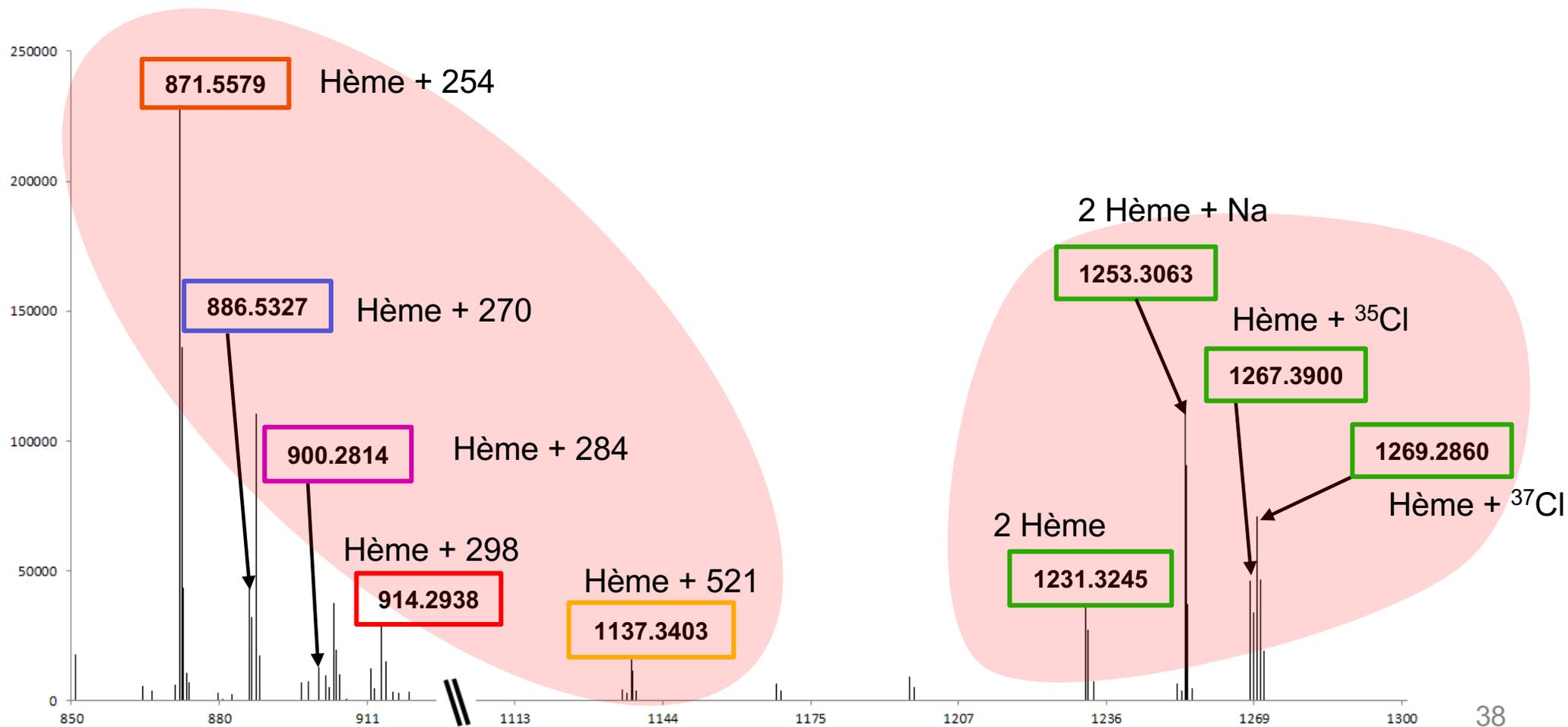


## Application : biodéréplication de *Piper coruscans*.

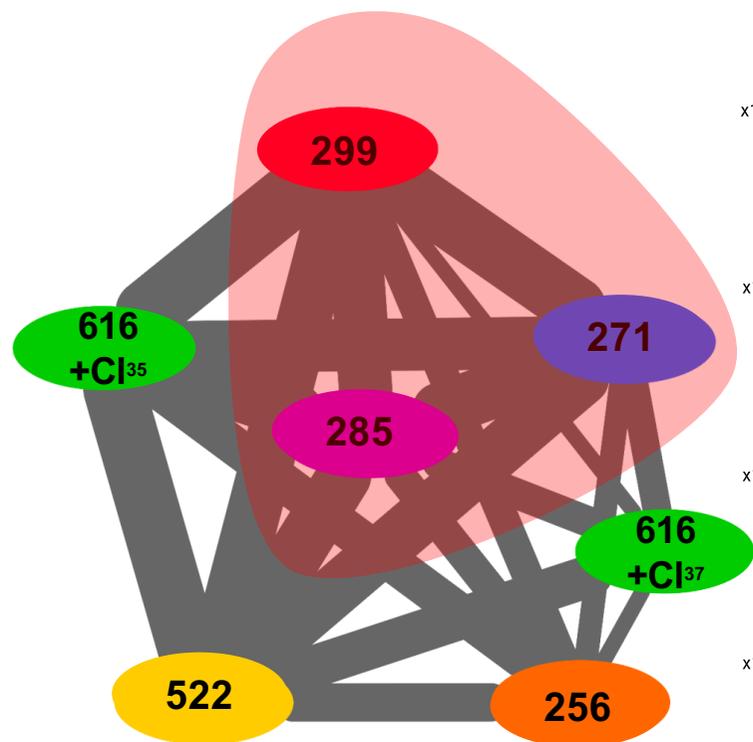
❖ Test d'association à l'hème sur l'extrait éthanolique de *P. coruscans* :



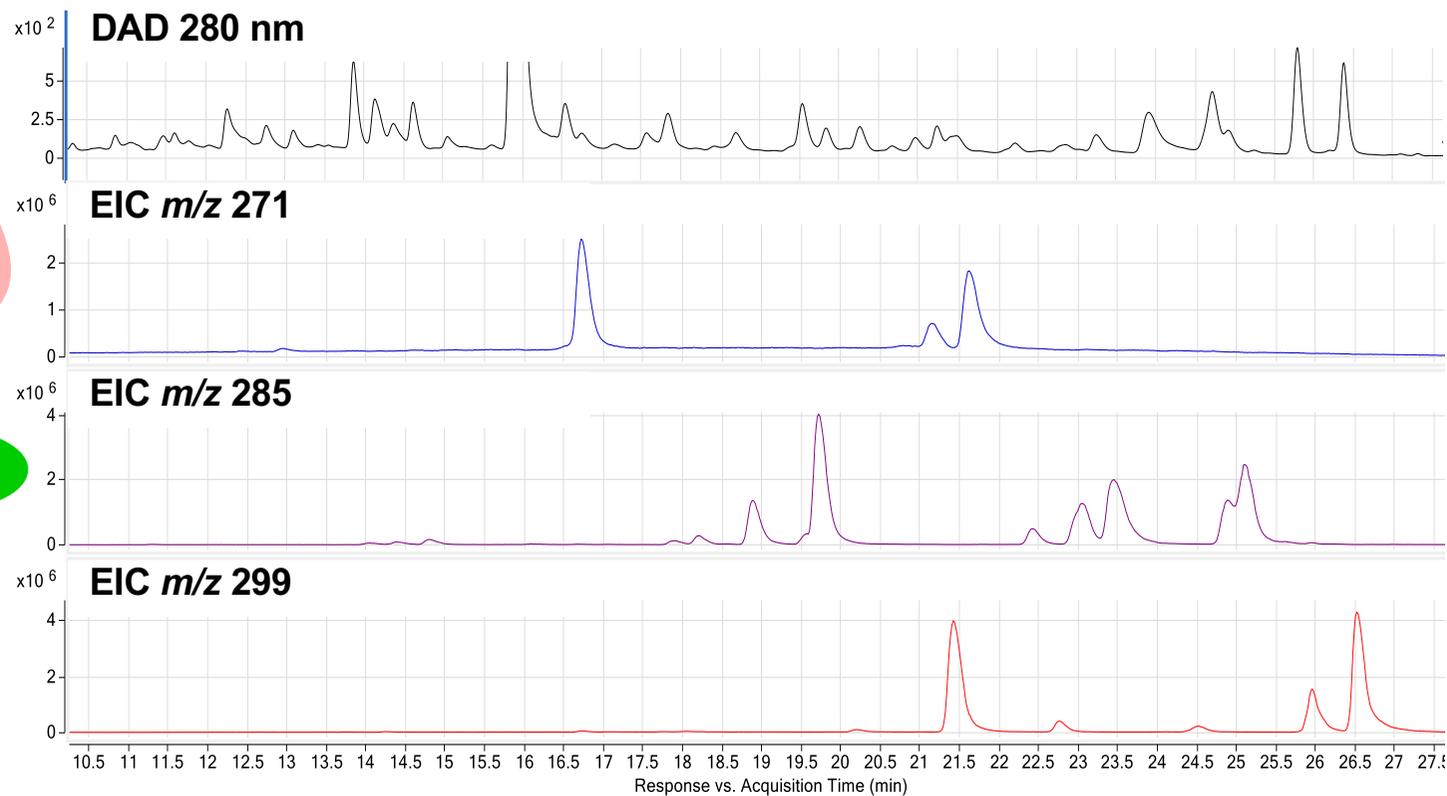
## Application : biodéréplication de *Piper coruscans*.



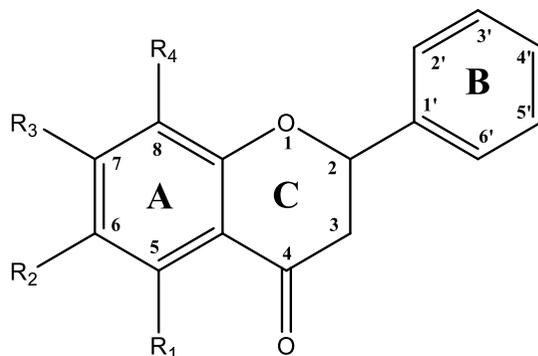
❖ Molécules ciblées de masse  $m/z$  256, 271, 285, 299, 522.



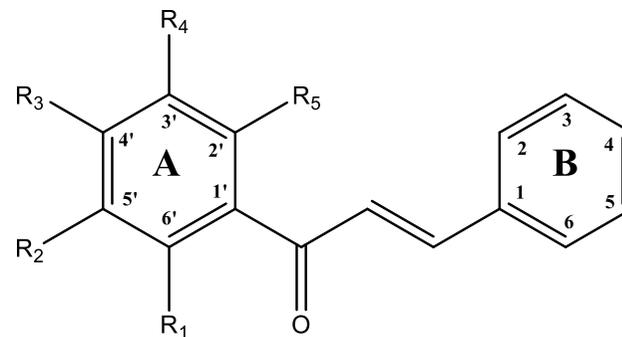
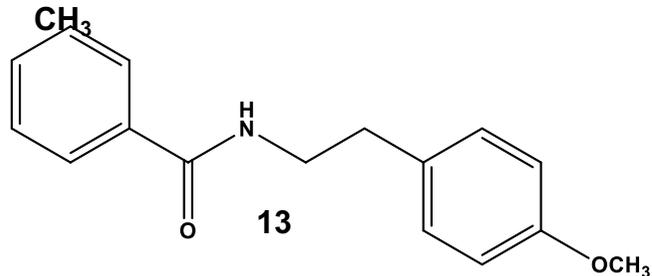
❖ Molécules isobares  $m/z$  271, 285, 299



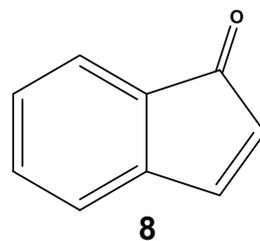
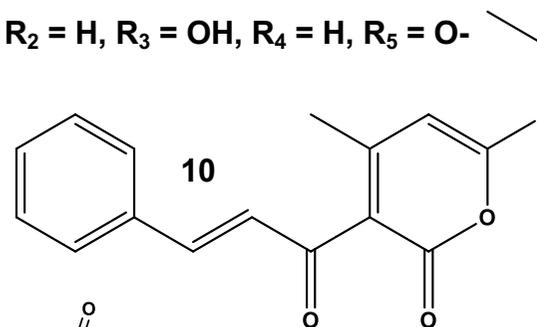
❖ Caractérisation des molécules ciblées :



- 2 :  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$ ,  $R_3 = \text{O-Me}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
 3 :  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$ ,  $R_3 = \text{O-Me}$ ,  $R_4 = \text{CH}_3$   
 4 :  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{CH}_3$   
 9 :  $R_1 = \text{O-Me}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
 11 :  $R_1 = \text{O-Me}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{O-Me}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
 12 :  $R_1 = \text{O-Me}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{O-Me}$ ,  $R_4 = \text{CH}_3$

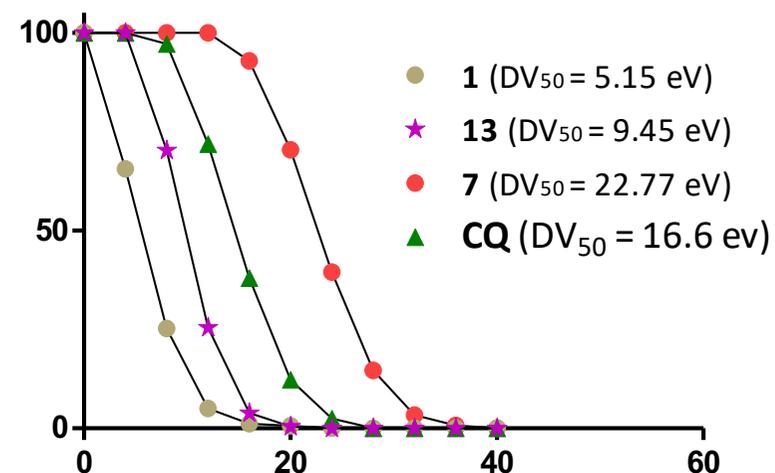


- 1 :  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$ ,  $R_3 = \text{O-Me}$ ,  $R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{O-Me}$   
 5 :  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{O-Me}$   
 6 :  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{O-Me}$



❖ Tests antiplasmodial et cytotoxique.

Famille	Comp.	<i>m/z</i> (M + H) <sup>+</sup>	<i>P. falciparum</i> , 3D7 souche sensible (IC <sub>50</sub> , μM)	Cytotoxicité (fibroblaste dermique humain) (IC <sub>50</sub> , μM)	IS	DV <sub>50</sub> (eV)
chalcones	1	299	2.25	68.5	30.4	5.15
	5	285	51	>100	1.9	5.93
	6	271	5.5	58	10.5	5.60
flavanones	2	285	60	>100	< 1	NA
	3	299	33.2	23	< 1	NA
	4	285	71	>100	1.4	NA
	9	271	72	>100	1.4	8.40
	11	285	78	>100	1.3	8.68
	12	299	85	>100	>100	1.2
kavalactone	10	285	>100	>100	1	NA
alkylamide	13	256	>100	>100	1	9.45
indanone	8	131	>100	>100	1	NA
Dérivé de l'acide cinnamique	7	522	32.5	54	1.7	22.77
Extrait brut			1.36 ± 0.06 μg/ml	37.5 μg/ml		
CQ		320	0.04 ± 3.25	NT		14.27



❖ La chalcone 1 valide l'activité antiplasmodiale de *P. coruscans*, avec contribution mineure à la cytotoxicité de l'extrait.

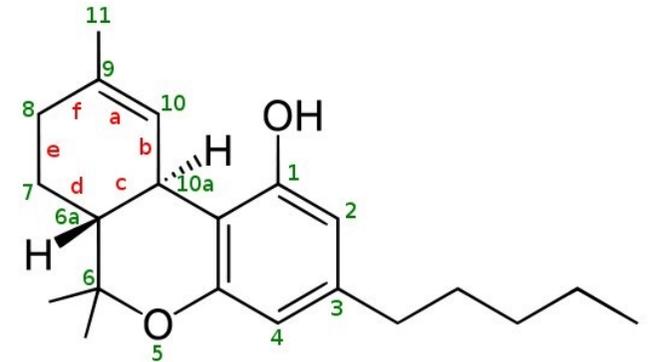
## 5) Le cannabis et les cannabinoïdes

### - *Cannabis sativa* (Cannabaceae)

>100 cannabinoïdes dont delta-9-tétrahydrocannabinol.

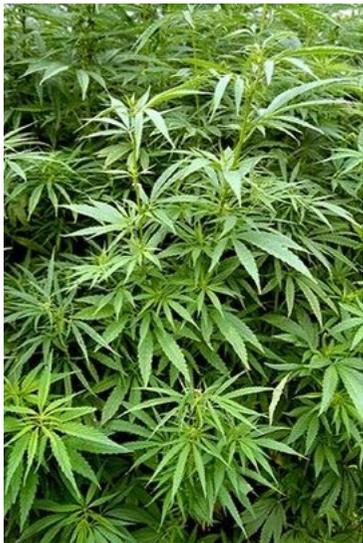
Une seule espèce (origine indienne), mais grand polymorphisme génétique : chimiotypes.

Culture en France pour fibre (THC < 0,3%).

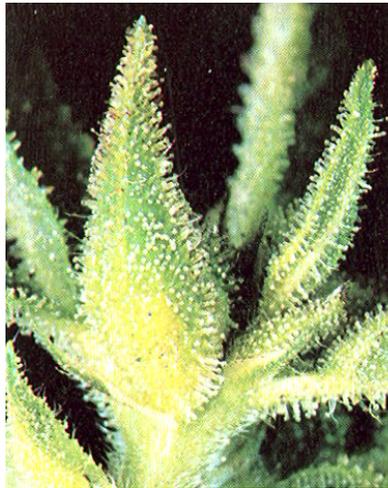


$\Delta^9$ -THC

Cannabinoïdes présents dans « résine grasse » sur les feuilles (dans poils (trichomes) sécréteurs,).



Pieds de *C. sativa*



Bractée sommitale,  
poils glandulaires à résine



Une **toute petite famille**,  
mais que tout le monde connaît :

Cannabaceae :

*Cannabis sativa*

*Humulus lupulus* (houblon)



Une **sexualité débridée** :

- Plante dioïque : sexes séparés (5% des angiospermes), mais des variétés monoïques ;
- Anémophile : grande quantité de pollen pouvant voyager loin : hybridation.

Traces vers -10000 en Europe de l'Est, Chine, Japon, Himalaya (Néolithique - Âge des métaux).

Plante **rudérale** (*runderis* = décombres : à proximité des activités humaines)



## Usage récréatif :

Culture illicite mondiale : 1000 Milliards € (licite (100 Millions)).

Effet psychoactif si teneur en THC > 1%.

Herbe (2-20%, moy. 10%), résine (8-20% moy. 15%) ; huile (extrait 60%).

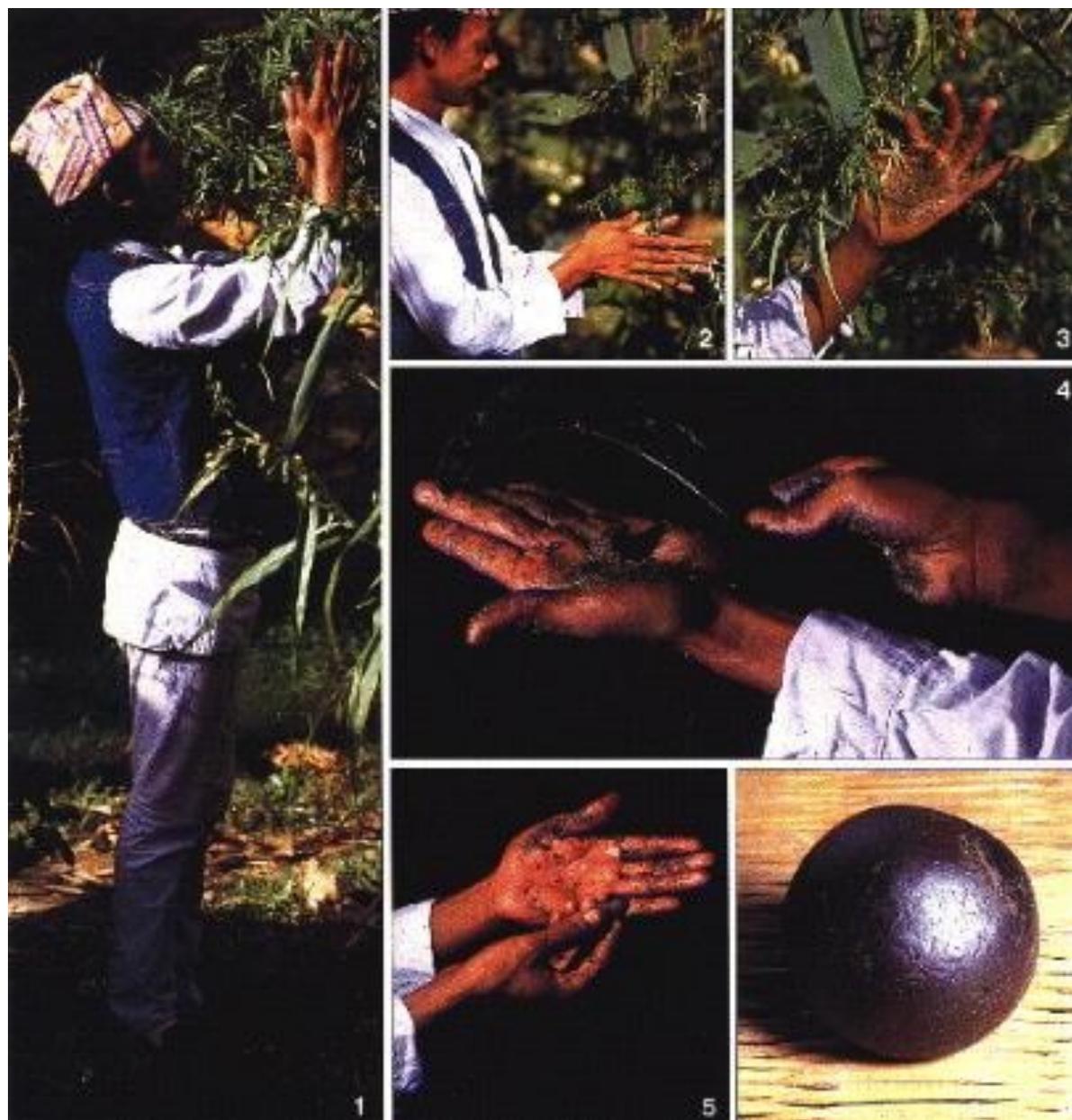
1 joint = env 10 mg de THC (max 60mg, mal toléré).

Effet **cherché** : relaxation, exacerbation des perceptions sensorielles, ébriété, hilarité...

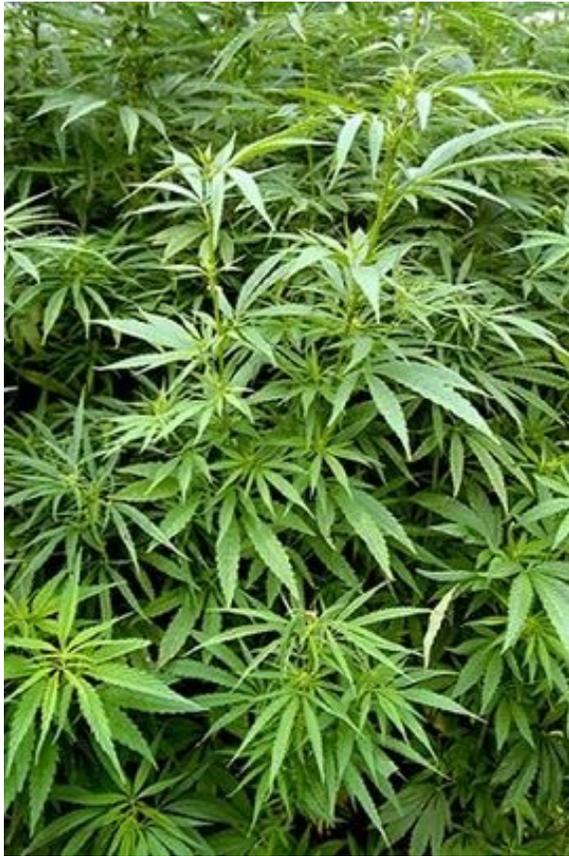
Effets **indésirables** : trouble apprentissage, perte motivations, ralentissement cognitif, attaque panique, angoisse, hallucinations, révélation schizophrénique ou dépression.

Teneurs élevées (>20%) : toxique. Depuis 2010 : cannabinoïdes de synthèse toxiques.

Psychoactifs les plus utilisés : caféine > alcool > nicotine > THC.



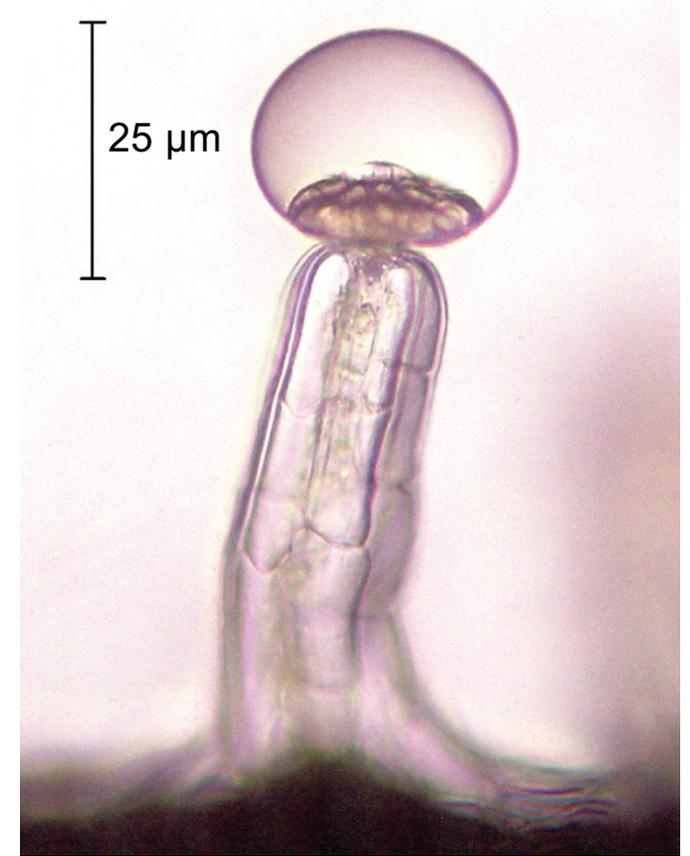
Cannabinoïdes présents dans poils sécréteurs sur les feuilles (dans poils sécréteurs).



Pieds de *C. sativa*



Bractée sommitale, poils glandulaires à résine



Poil sécréteur

- Pas une "résine" *stricto sensu*
- Résine de haschich : poils sécréteurs agglomérés.

# Pourquoi le chanvre produit-il une résine dans des poils externes ?

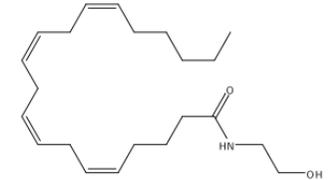
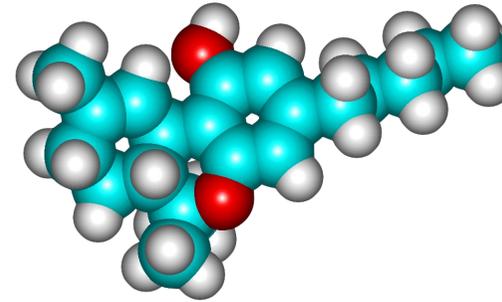
Cannabinoïdes, terpènes (huile essentielle), autres molécules... :

- Diminution de l'évaporation d'eau ;
- Immobilisation des insectes ;
- Antibactérien antifongique ;
- Répulsif ?
- Toxicité ?
- Autre protection ?

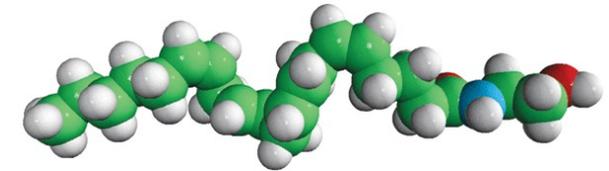
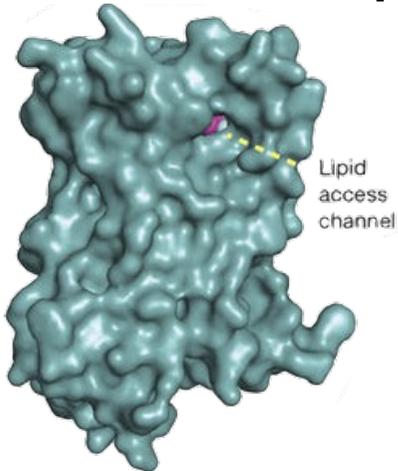


# Le sens de l'Histoire...

**1960** : structure THC (Mechoulam, Israel)



**1988** : identification des récepteurs CB



1996 : chocolat...

**1992** : identification du ligand endogène :  
anandamide (du sanskrit...)

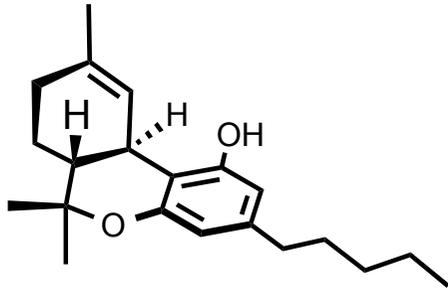
**2007** : cannabinoïde de synthèse (Rimonabant)

**2010** : médicament (THC/CBD)

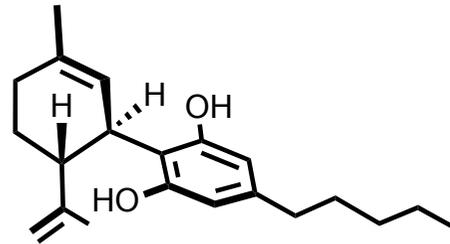


# Une star et des seconds rôles...

Des **cannabinoïdes** (plus de 100) :

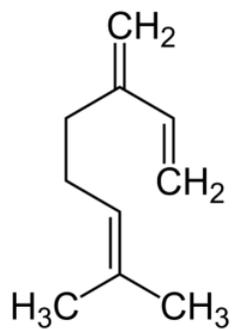


**Δ<sup>9</sup>-Tétrahydrocannabinol (THC)**



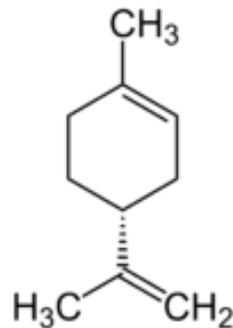
**Cannabidiol (CBD)**

Des **terpènes** (des dizaines) : effet de synergie ou « d'entourage » (ne fait pas consensus)

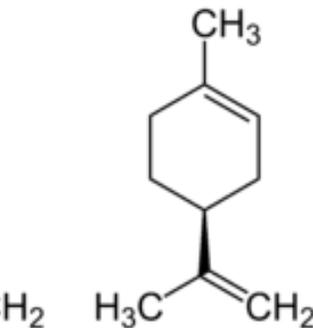


**Myrcène**

Odeur épicée poivrée boisée  
Effet narcotique « couch-lock »



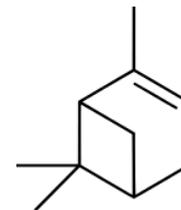
**(R)**



**(S)**

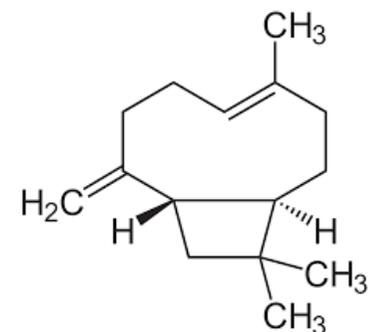
**Limonène**

Odeur pin (-), citronnée (+)  
Effet stimulant de l'humeur



**Alpha-pinène**

Odeur térébenthine  
Diminue effets amnésiants du THC



**Beta-caryophyllène**

Odeur clou de girofle  
Se lie aux récepteurs CB<sub>1</sub>

## Le statut réglementaire complexe et hétérogène du cannabis

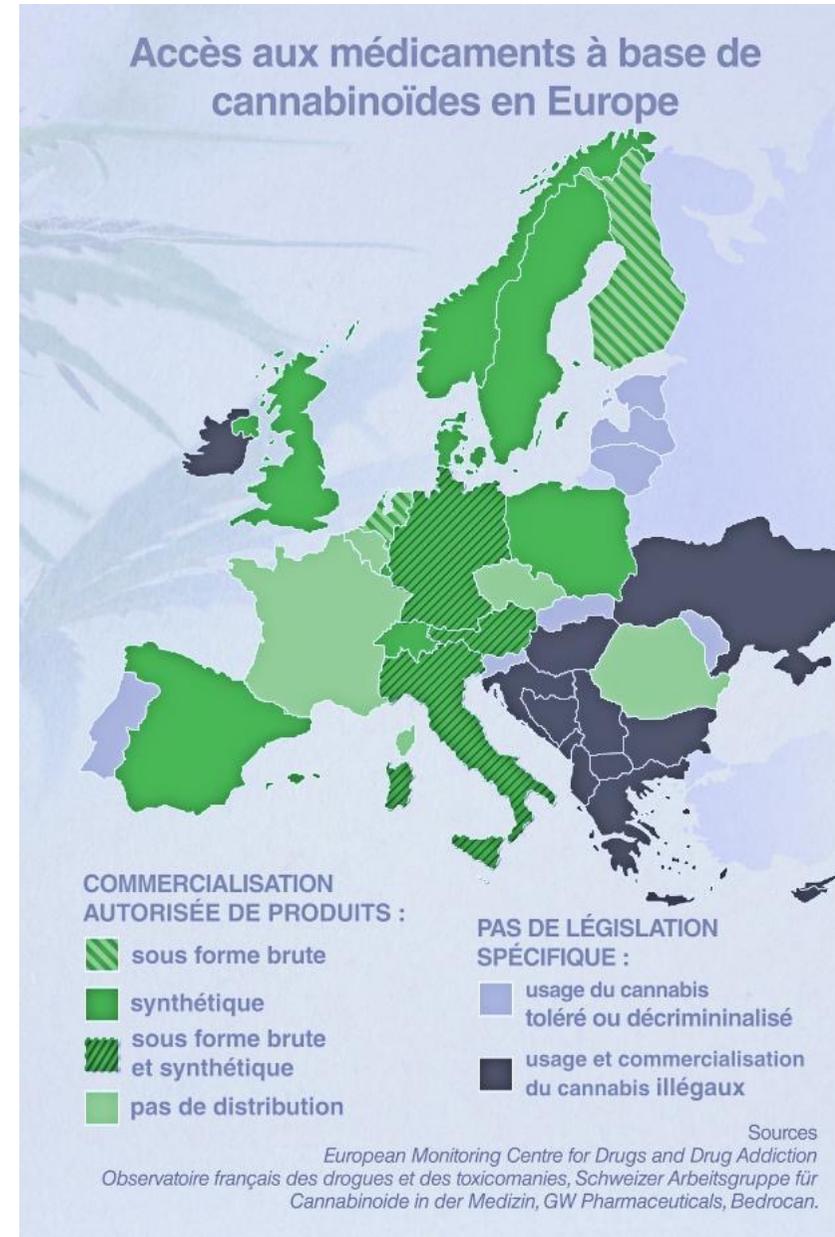
### **USA** : 10 ans d'avance ?

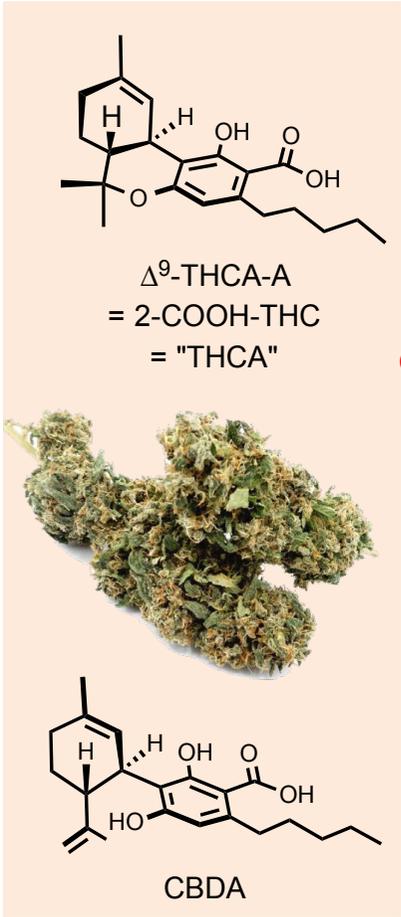
- Illégal au niveau fédéral (stupéfiant pur, même pas médical) ;
- Tolérance non pérenne sur les choix des Etats ;
- Trump : position floue ; procureur général défavorable ;
- Population : 61% pro-légalisation; 88% pro-usage médical ;
- Malgré l'hétérogénéité des réglementations : gros commerce !

**Canada** : légalisation en juillet 2018, sous réserve de contrôle : premier vrai grand système de légalisation.

**Europe** : très hétérogène.

**France** : expérimentation du cannabis thérapeutique en 2021 !





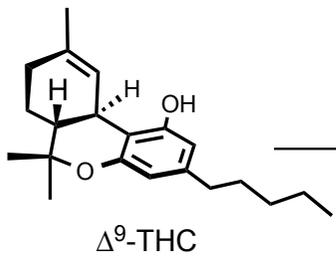
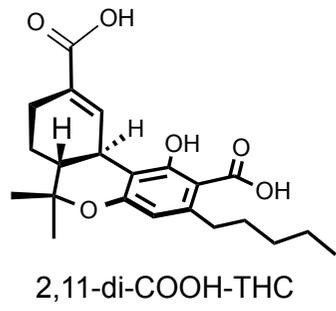
absorption →

chaleur  
 (ex. : combustion,  
 chauffage, vaporisation,  
 analyse CPG...)

**THCA**  
 psychotrope,  
 peu enivrant

métabolisation →

Nombreux  
 métabolites, dont :

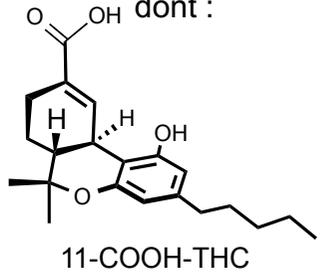


absorption →

**THC**  
 psychotrope,  
 enivrant

métabolisation →

Nombreux métabolites,  
 dont :

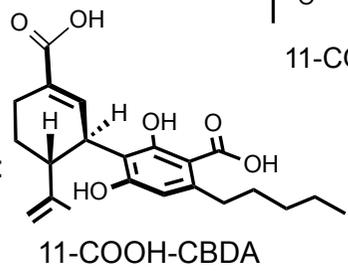


absorption →

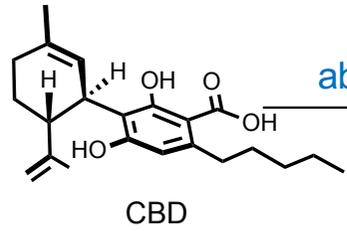
**CBDA**

métabolisation →

Nombreux métabolites, dont :



chaleur →

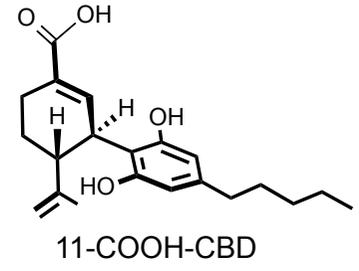


absorption →

**CBD**  
 psychotrope,  
 non enivrant

métabolisation →

Nombreux métabolites, dont :



# La recherche sur les cannabinoïdes : des faux-pas...

**1992** : Marinol (THC de synthèse) (douleurs).

**2014** : Sativex : mélange de 2 extraits, contient surtout THC/CBD (douleurs).

**2018** : Epidyolex (CBD) (épilepsie).

**2007** : médicament cannabinoïde de synthèse anorexigène : (Rimonabant : Acomplia®). AMM obésité .

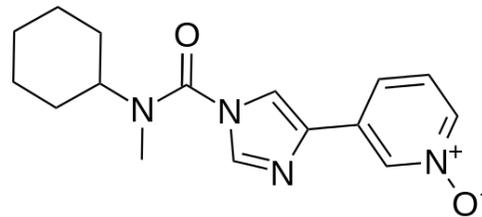
**2008** : **retiré du marché** pour dépression, troubles psychotiques...

**2016** : essai clinique Biotrial d'un antagoniste de l'enzyme dégradant l'anandamide : potentiellement efficace sur alimentation, sommeil, anxiété, alcoolisme, douleur... : un **décès**, 4 victimes de lésions cérébrales. Pas d'erreur de protocole.

Autres dérivés en cours d'étude (Merck, Pfizer) :  
pas d'accident à ce jour

Domaine de recherche très actif mais hasardeux.

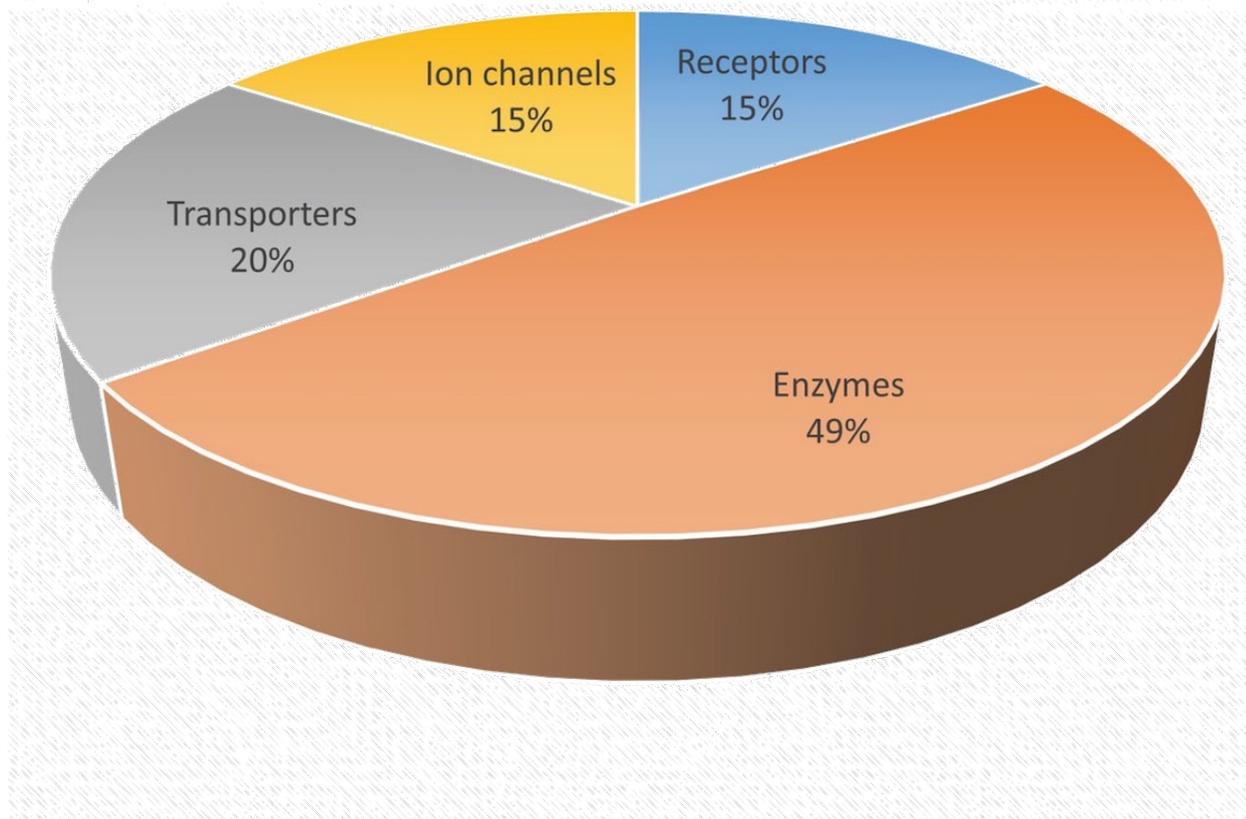
BIA 10-2474



## IV – En modélisant la biologie

Exemple du cannabidiol :

> 65 cibles identifiées !



## Récepteurs :

CB<sub>1</sub> : Modulateur négatif allostérique (modulation effet THC) ou antagoniste (?)

CB<sub>2</sub> : agoniste de faible affinité ou modulateur négatif allostérique (?)

5HT<sub>1A</sub> : agoniste (anxiolytique, nombreux effets SNC)

5HT<sub>2A</sub> : agoniste partiel faible

5HT<sub>3A</sub> : antagoniste non-compétitif

Récepteur adénosine : agoniste

GPR55 (implication dans excitabilité neurones) : antagoniste

GPCR12 : agoniste inverse

PPAR  $\gamma$  : agoniste

TRPV1 : agoniste

Récepteur glycine : potentiateur

Récepteur dopaminergiques

Récepteurs opioïdes

Récepteurs nicotiniques

Target	Concentration range ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
CB <sub>1</sub>	3; NSC	ND
	3; NSC	ND
	NSC	>10
	NSC	>30
CB <sub>2</sub>	3; NSC	ND
	3; NSC	ND
	NSC	>10
	NSC	>30
Glycine receptor $\alpha$ 1 subunit	1-300; (+)	12.3
	1-300; (+)	132.4
Glycine receptor $\alpha$ 1 $\beta$ subunit	1-300; (+)	18.1
	1-300; (+)	144.3
Glycine receptor $\alpha$ 3 subunit	0.01-50.00; (+)	3*
GPR18	10 <sup>-4</sup> -100; (+)	51.1
GPR55	10 <sup>-3</sup> -1; (-)	0.45
	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-2</sup> ; (-)	ND
	(-)	0.445
5-HT <sub>1A</sub>	8-32; (-)	ND
	16; (-)	ND
	16; (-)	ND
5-HT <sub>2A</sub>	8-32; (+)	ND
nAChR $\alpha$ -7	0.1-100.0; (-)	11.3
Opioid ( $\delta$ )	0.1-100.0; (-)*	10.7*
Opioid ( $\mu$ )	0.1-100.0; (-)*	10*
PPAR $\gamma$	3; (+)	ND
	3; (+)	ND

**Enzymes** : FAAH : inhibiteur (ou activation ?), enzymes du métabolisme des xénobiotiques (Cytochrome P450, enz. métabolisme du cholestérol, du céramide...), inflammation...

Target	Concentration range (μM); (effect)	EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> (μM)				
FAAH	1-10 <sup>2</sup> ; (-)*	27.5	ACAT	1-30; (-)	<10*	ND
	1-50; (-)	15.2	Arylalkylamine <i>N</i> -acetyltransferase	0.1-10.0; (-)	ND	ND
	0.5 mg/mouse/day for 23 days; (+)	ND	Catalase	10; (-)	ND	ND
	10-16; (+)	ND	Complex I	2-10 <sup>2</sup> ; (-)*	8.2	ND
Glutathione reductase	10 <sup>2</sup> ; (+)	ND	Complex II	2-10 <sup>2</sup> (-)*	19.1	ND
GSH peroxidase	10 <sup>2</sup> ; (+)	ND	Complex IV	2-10 <sup>2</sup> ; (-)*	18.8	ND
HMG-CoA Reductase	1-30; (+)	ND	Complex I	15-60 mg/kg, single dose (+)	ND	ND
IDO	0.1-10.0; (-)	ND	Complex II		ND	ND
LOX-5	2-200; (-)	73.73	Complex II-III		ND	ND
	10-10 <sup>3</sup> ; (NSC)	ND	Complex IV		ND	ND
	0.5mg/mouse/day for 23 days; (-)	ND	COX1	10-10 <sup>3</sup> ; (-)	ND	ND
LOX-15	0.2-10.0; (-)	2.56	COX2	318; (NSC)*	ND	ND
	10-10 <sup>3</sup> ; (NSC)	ND		10-10 <sup>3</sup> ; (-)	ND	ND
MAGL	1-10 <sup>2</sup> ; (NSC)	ND		318; (NSC)*	ND	ND
<i>N</i> -acylethanolamine acid amide hydrolase	1-10 <sup>2</sup> ; (-)	>100		0.5mg/mouse/day for 23 days; (+)	ND	ND
NAD(P)H quinone reductase	10 <sup>2</sup> ; (-)	ND	CYP2C19	10 <sup>-2</sup> -10; (-)	2.51	0.793/50.800
NAPE-PLD	0.5 mg/mouse/day for 23 days; (NSC)	ND		10 <sup>-2</sup> -10; (-)	1.55	ND/1.26
Phosholipase A2	31.9-159.5; (+, -)	6.4/134.0		10 <sup>-2</sup> -10; (-)	1.79	ND/2.32
Progesterone 17α-hydroxylase	10-10 <sup>3</sup> ; (-)	ND	CYP2D6	1-40; (-)	6.52	1.16
SOD	10 <sup>2</sup> ; (-)	ND		1-40; (-)	6.01	2.69
Sphingomyelinase	16.00-63.60; (+)*	ND	CYP3A4	0.1-50.0; (-)	11.7	1
Testosterone 6α-hydroxylase	10-10 <sup>3</sup> ; (-)	ND	CYP3A5	0.1-50.0; (-)	1.65	0.195
Testosterone 16β-hydroxylase	10-10 <sup>3</sup> ; (-)	ND	CYP3A7	0.1-50.0; (-)	24.7	12.3
			CYP2C9	0.1-10; (-)*	2.7	2.31
				0.1-10; (-)*	2.67	0.964
			CYP1A1	0.1-2.5; (-)	0.537	0.155
			CYP1A2	1-10; (-)	-3.5*	2.69
			CYP1B1	1-10; (-)	-5*	3.63
			DAGL-α	1-10 <sup>2</sup> ; (NSC)	ND	ND

## **Canaux :**

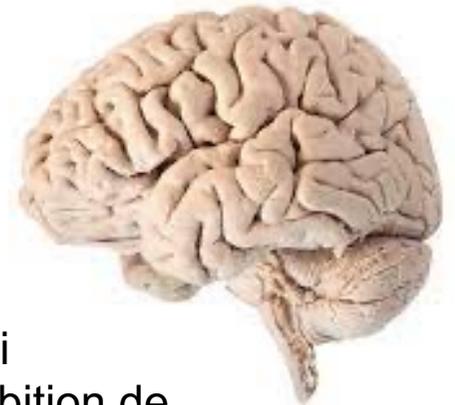
TRPV (1-4) : agoniste entier, de faible affinité (anticonvulsivant, antipsychotique, immunomodulateur), VDAC, VGCC, canaux sodium, BCRP (inhibiteur), ...

## **Transporteurs :**

Neuroamines, anandamide, MDR, Mg-ATPase...

## **Effets neurologiques du CBD :**

- Ne sont pas médiés par le système endocannabinoïde ;
- Impliquent la régulation au calcium intracellulaire ;
- Certains auteurs les attribuent aux interactions médicamenteuse du CBD qui augmente les concentrations circulantes d'antiépileptiques, ou à l'effet d'inhibition de la FAAH...



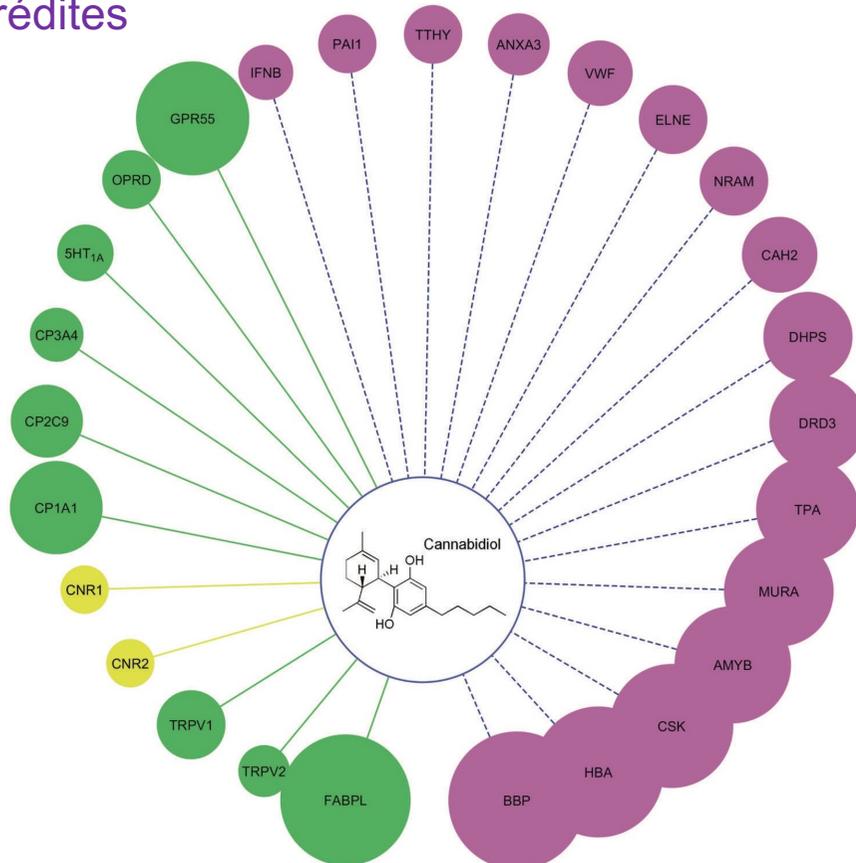
Pharmacologie des systèmes : approche chimiogénomique *in silico* (docking et bases de données) :

Taille = affinité.

Récepteurs cannabinoïdes

Cibles validées expérimentalement

Cibles prédites



Targets Protein name

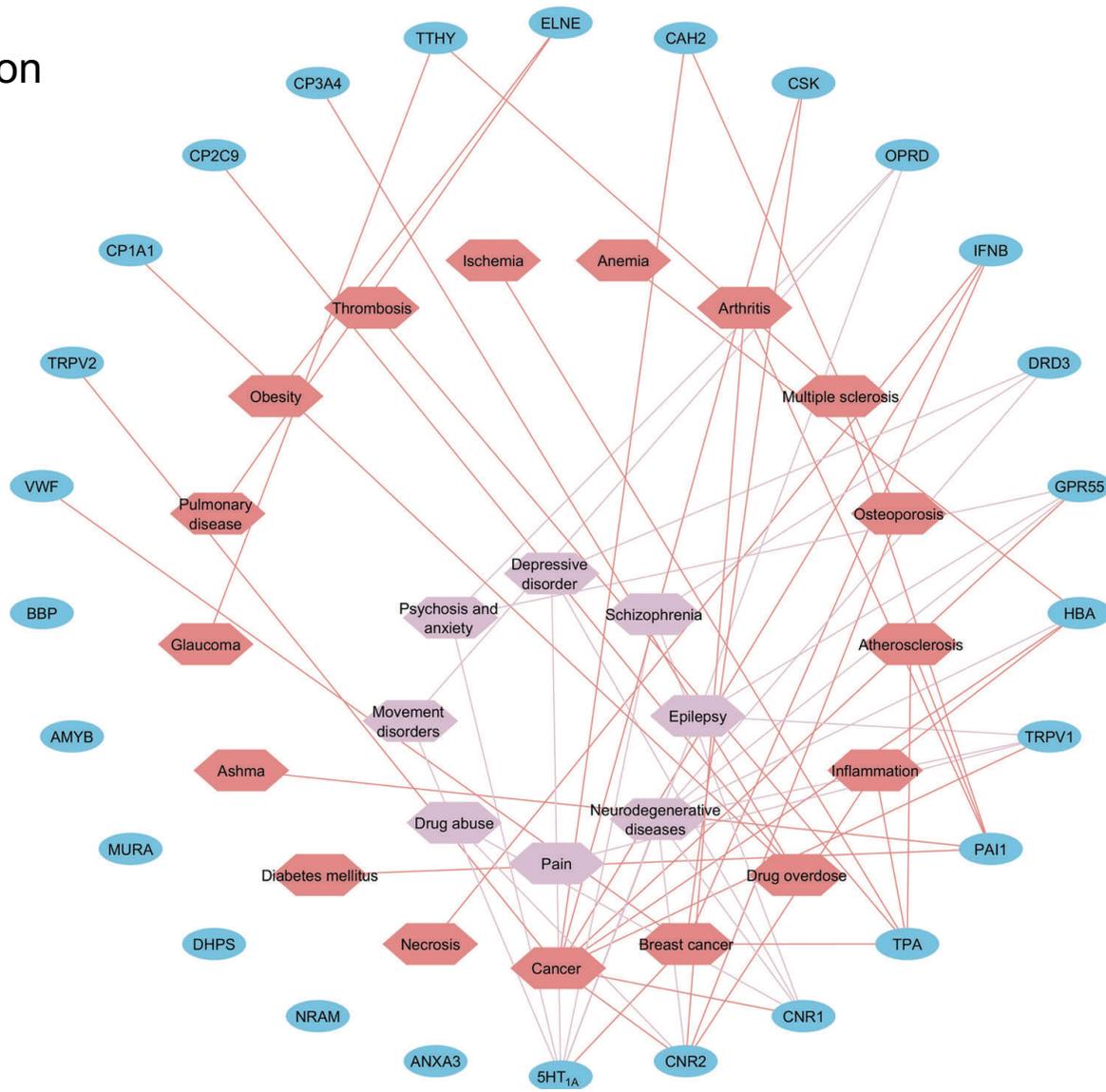
BBP	Bilin-binding protein (BBP_PIEBR)	
FABPL	Fatty acid-binding protein liver (FABPL_HUMAN)	
HBA	Hemoglobin subunit alpha beta(HBA_HUMAN/HBB_HUMAN)	
CSK	Tyrosine-protein kinase CSK(CSK_HUMAN)	
AMYB	Beta-amylase (AMYB_SOYBN)	
GPR55	G-protein coupled receptor 55 (GPR55_HUMAN)	
MURA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (MURA_ECOLI)	
CP1A1	Cytochrome P450 1A1 (CP1A1_HUMAN)	
TPA	Tissue-type plasminogen activator (TPA_HUMAN)	
DRD3	Dopamine receptor 3(DRD3_HUMAN)	
DHPS	Dihydropteroate synthase (DHPS_ECOLI)	
CAH2	Carbonic anhydrase 2 (CAH2_HUMAN)	
NRAM	Neuraminidase (NRAM_INBBE)	
CP2C9	Cytochrome P450 2C9 (CP2C9_HUMAN)	
ELNE	Leukocyte elastase (ELNE_HUMAN)	
TRPV1	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1	
VWF	von Willebrand factor (VWF_HUMAN)	
ANXA3	Annexin A3 (ANXA3_HUMAN)	
TTHY	Transthyretin (TTHY_HUMAN)	
OPRD	Delta-type opioid receptor (OPRD_HUMAN)	
CP3A4	Cytochrome P450 3A4 (CP3A4_HUMAN)	
5HT <sub>1A</sub>	5-Hydroxytryptamine receptor 1A (5HT <sub>1A</sub> _HUMAN)	
PAI1	Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1_HUMAN)	
IFNB	Interferon beta (IFNB_HUMAN)	
TRPV2	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	
CNR1	Cannabinoid receptor 1 (CNR1_HUMAN)	58
CNR2	Cannabinoid receptor 2 (CNR2_HUMAN)	

# Réseau putatif d'interaction récepteurs - maladies :

Cibles identifiées *in silico*

Maladies neurologiques

Autres maladies



Targets	Protein name
BBP	Bilin-binding protein
FABPL	Fatty acid-binding pr
HBA	Hemoglobin subunit
CSK	Tyrosine-protein kina
AMYB	Beta-amylase (AMYB
GPR55	G-protein coupled re
MURA	UDP-N-acetylglucosa
CP1A1	Cytochrome P450 1A
TPA	Tissue-type plasmino
DRD3	Dopamine receptor 3
DHPS	Dihydropteroate syn
CAH2	Carbonic anhydrase
NRAM	Neuraminidase (NRA
CP2C9	Cytochrome P450 2C
ELNE	Leukocyte elastase (E
TRPV1	Transient receptor po
VWF	von Willebrand facto
ANXA3	Annexin A3 (ANXA3
TTHY	Transthyretin (TTHY
OPRD	Delta-type opioid rec
CP3A4	Cytochrome P450 3A
5HT <sub>1A</sub>	5-Hydroxytryptamine
PAI1	Plasminogen activato
IFNB	Interferon beta (IFNB
TRPV2	Transient receptor po
CNR1	Cannabinoid recepto
CNR2	Cannabinoid re59to

Comment faire des médicaments à partir de substances naturelles bioactives ?



## Indications :

### Paclitaxel, liste I (Taxol®)

- Cancer du sein métastatique (en 2<sup>e</sup> intention) ;
- Cancer de l'ovaire (en 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>e</sup> intention) ;
- Cancer du poumon non à petites cellules ;
- Sarcome de Kaposi lié au SIDA (en 2<sup>e</sup> intention).



## b) Alcaloïdes de la pervenche :

Vinblastine sulfate, liste I (Velbé®)

Maladie de Hodgkin et lymphomes non hodgkiniens ; diverses tumeurs solides (sein, poumon, ovaire, testicule).

Vincristine: sulfate, liste I (Oncovin®)

Vindésine: sulfate, liste I (Eldisine®)

Leucémies aiguës lymphoblastiques, lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens ; diverses tumeurs solides (sein, poumon, utérus).

Vinorelbine: ditartrate, liste I (Navelbine®)

Cancer du sein métastatique, cancer du poumon non à petites cellules.

Vinflunine: ditartrate, liste I (Javior®)

Certains cancers des voies urinaires avancés ou métastatiques après échec d'un traitement à base de platine.

**Mais : TOXICITÉ locale, risque de nécrose veineuse !**



c) Cannabinoïdes :

## THC comme médicament :

**THC** naturel (=  $\Delta$ -9-tétrahydrocannabinol) ou de synthèse (= dronabinol) : Marinol® (1992)

**Indications** : anorexie chez patients HIV+, nausées vomissements des chimiothérapies. Plutôt mal toléré (THC pur). Comprimés.

Mélange (-)-*trans*- $\Delta^9$ -THC et (+)-*trans*- $\Delta^9$ -THC (synthèse, DCI nabilone) : Cesamet® (gélules)



**Extrait** (= nabiximols = 2 extraits contenant mélange cannabinoïdes + non-cannabinoïdes, majoritairement  $\Delta$ -9-THC et CBD ratio 1:1 : Sativex® (2014)

**Indications** : spasticité dans la sclérose en plaques résistante, (douleurs, douleurs cancéreuses).

MAIS : toujours pas en vente en France :

- désaccord sur le prix, jugé pas assez efficace, nécessité suivi et prévention addiction...
- Blocage psychologique ?? Pas sujet à expérimentation (???)



## CBD comme médicament

**Nom de produit** : Epidyolex (GW Pharma), Arvisol (comprimé oral, Echo Pharmaceuticals, Pays-Bas)

**Indications** : certaines maladies orphelines (épilepsie résistante aux traitements classique, syndrome de Dravet, de Lennox-Gastaut, spasmes infantiles, sclérose tubéreuse de Bourneville), asphyxie néonatale...

Epidyolex® : AMM en UE (Epidyolex® dans le reste du Monde, USA notamment) – Médicament orphelin.  
CBD purifié, solution orale 100 mg/ml dans huile de sésame/10% EtOH, GW Pharmaceuticals (UK).  
Posologie 100-700 mg/j.

Notes :

- le CBD n'est pas (plus) un stupéfiant (ONU).



# L'expérimentation "cannabis thérapeutique" en France en 2021 :

Sélection de 3000 patients souffrant de pathologies faisant partie d'une liste restrictive :

- douleurs neuropathiques réfractaires aux thérapies accessibles,
- certaines formes d'épilepsie pharmacorésistantes,
- certains symptômes rebelles en oncologie (tels que nausées, vomissements, anorexie...),
- situations palliatives,
- spasticité douloureuse de la sclérose en plaques ou des autres pathologies du système nerveux central

- Objectif de l'expérimentation :

évaluer en situation réelle le circuit de prescription et délivrance (fleurs, huiles) ainsi que l'adhésion des professionnels de santé et des patients à ces conditions.

- Progrès en France en considérant l'historique de prohibition forte du cannabis
- Mais insuffisant pour certains....
- RDV en 2024 : généralisation ? Probablement que non (pas de remboursement).
- Question complètement distincte de la question de la légalisation (attention à la confusion dans les médias).



## Formes galéniques et absorption :

C'est l'absorption qui cause les plus grandes différences entre voies d'administration !

Forme	Avantage	Inconvénient
Fumée	Flexible, rapide	Combustion, toxicité, perte de produit
Inhalée ( <i>via</i> vaporisateur)	Flexible, rapide Pas de combustion	Effet renforçateur Quantité pas maîtrisée Requiert dextérité, protocole Coût des vaporisateurs Mieux si échant. titrés
Orale galénique	Précision dosage BD satisfaisante Effet prolongé Diminution effets SNC Extraits complexes possibles	Détermination posologie délicat (délai)
Orale alimentaire	Compliance (?)	Difficile à doser
Sub-linguale		Pas de différence ni de supériorité vs voie orale
Transdermique	Patches : peu contraignant	Irritation cutanée Limitation de la voie topique Plus adapté à molécules pures Effet local surtout



FIGURE 1. The Syqe Inhaler Exo—a thermal-metered-dose cannabis inhaler.



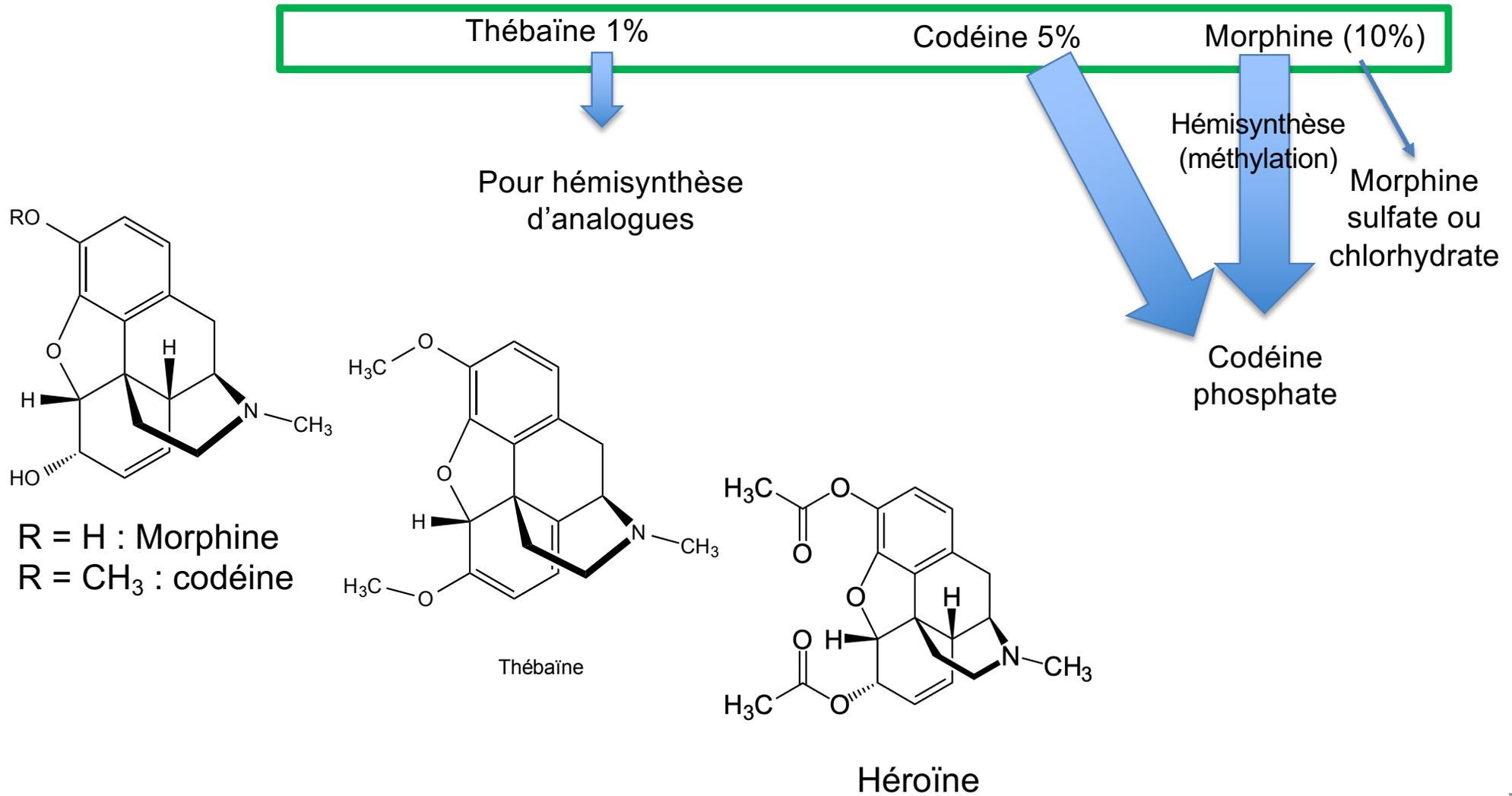
## Formes en développement :

Nombreux brevets. Surtout pour THC ou CBD.

- Émulsion, dendrimères, nanomicelles (voie sublinguale)
- Liposomes (THC par voie pulmonaire 0,3 mg/ml, libération prolongée),
- Prodrogues glycosylées pour ciblage TD
- Chewing-gum (en essai clinique !)
- Nasale (BD 30-50%),
- Capsules molles de microémulsion (60 nm) : augmente BD orale (ex. ciclosporine Néoral®), éventuellement avec pipérine (inhibiteur Pgp et métabolisation).
- Forme sous-cutanée (CBD pour insuffisance cardiaque, essais pré-cliniques).
- Matrices polymériques (PEG, chitosan, acide lactique/glycolique...)
- etc.

## d) Les opioïdes

### DANS L'OPIUM :



## d) Les opioïdes

### Indications :

#### **Morphine:**

douleurs aiguës et chroniques intenses et/ou rebelles aux autres antalgiques.

#### Voie orale :

Forme simple (sulfate) : délai 60 min, durée 4H.

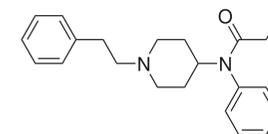
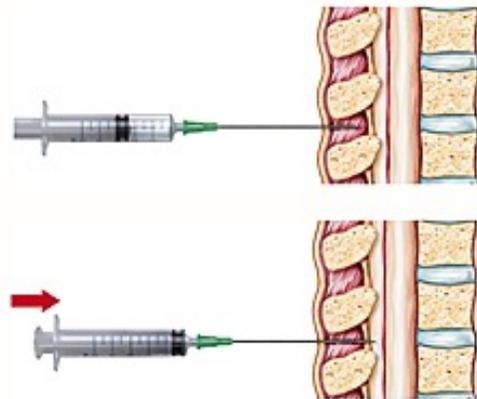
Forme prolongée (enrobage) : délai 2H, durée 12H.

Douleurs cancéreuses, traumatismes...

#### Autres voies :

Médullaire : péridurale (morphine + anesthésiques locaux) : accouchement.

Anale, perlinguale, transdermique = patches (surtout Fentanyl)...



Fentan  
yl

### **Codéine :**

analgésique (association avec paracétamol) (car O-déméthylée en morphine dans l'org. par CYP 2D6 : effet prolongé, mais sujet à polymorphisme marche pas chez 10% pop.), antitussif (association avec grindelia et sulfoguaiacol, détournement avec alcool), 3e médicament le plus vendu en officine). Exonérée (30mg) jusqu'au 12 juillet 2017 : maintenant sur prescription.

### **Noscapine (nat.), pholcodine (synth.) :**

Antitussifs.

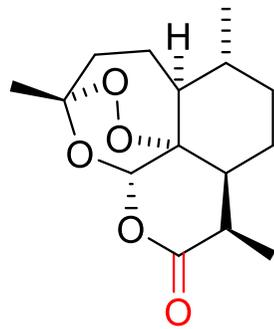


Détournement des médicaments pour l'usage récréatif : Néo-codion, sirops pour “purple drink” aux USA...  
A motivé l'annulation en 2019 des doses d'exonération qui permettaient d'acheter sans ordonnance certains médicaments contenant de la codéine en petites quantités.

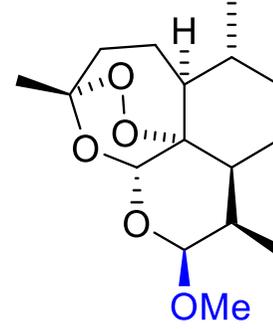
## 2) Après modification :

### a) Analogues de l'artémisinine :

- Hémissynthétiques : artémether (augmente l'absorption orale)



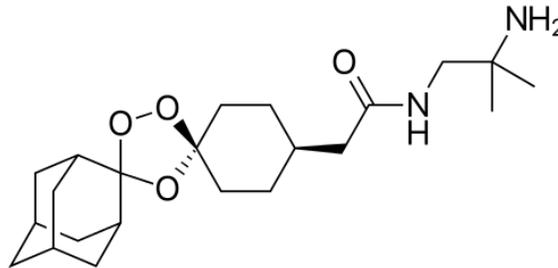
Artemisinin



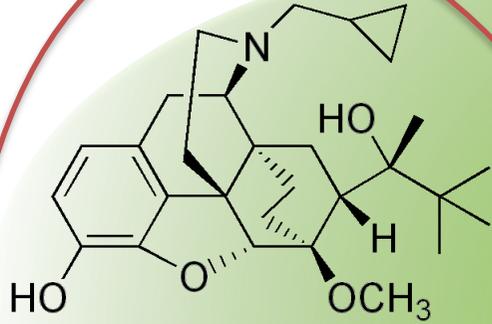
Artemether

- Synthèse totale d'analogues : coût, efficacité, résistances...

Arterolane  
(2004)



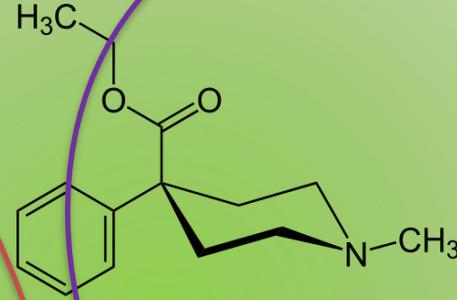
b) Opioïdes : aujourd'hui, constellation de molécules naturelles, hémisynthétiques, synthétiques...  
Exemples :



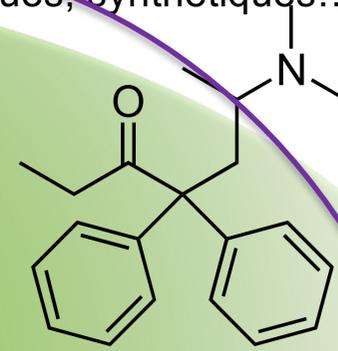
Buprénorphine  
(TSO)

**NATUREL OU  
HEMISYNTHESE**

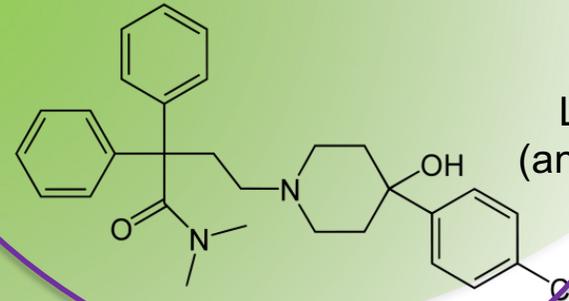
**AGONISTES**



Péthidine (1939)



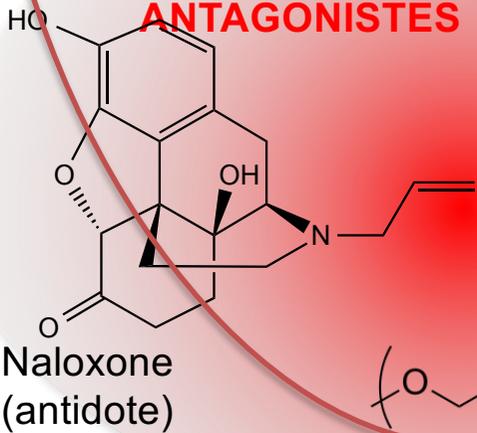
Méthadone (1941)



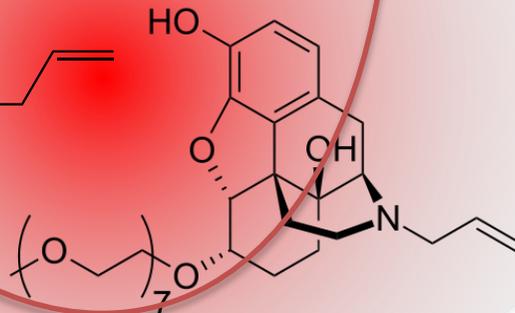
Lopéramide  
(antidiarrhéique)

**SYNTHESE**

**ANTAGONISTES**



Naloxone  
(antidote)



Naloxégol  
(anticonstipation)

# « Crise/épidémie des opioïdes » aux USA/Canada

Sur-prescription d'antalgiques opioïdes dans les années 1990 ;

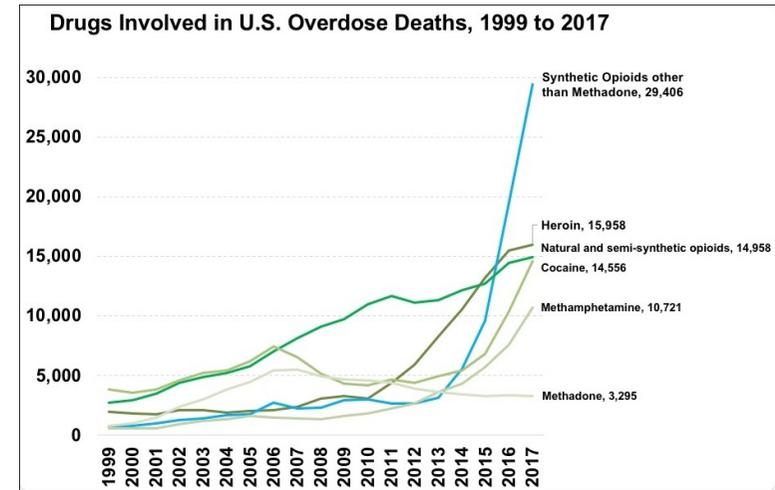
Publicité agressive des fabricants ;

Recherche de la pilule qui règle tout les problèmes...

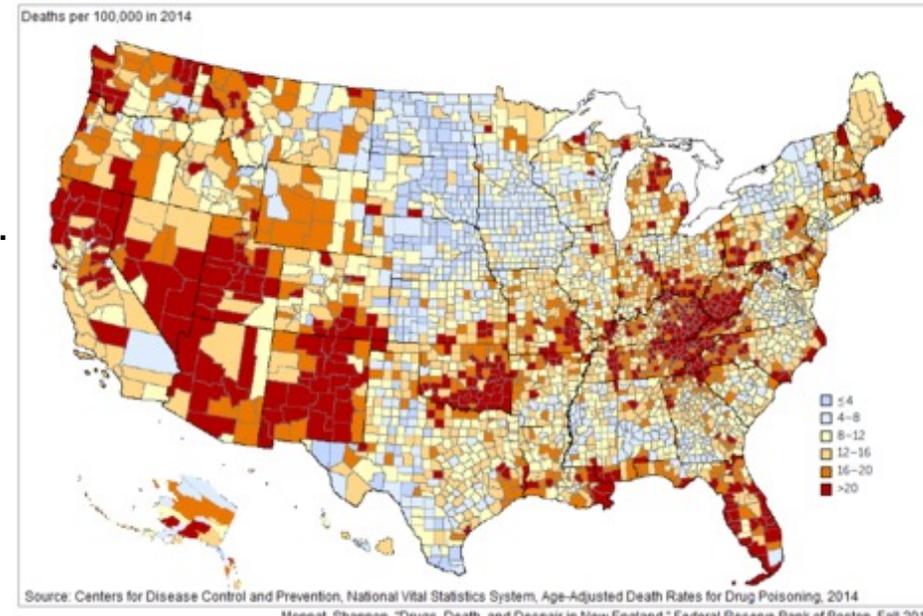
Initialement prescrit, puis contrebande ;

Ignorance/négligence des aspects addictifs par médecins/grand public ;

Contexte économie santé favorable à cette dérive aux USA.



Drug Overdose Mortality Rates by County Due Mostly to Opioids



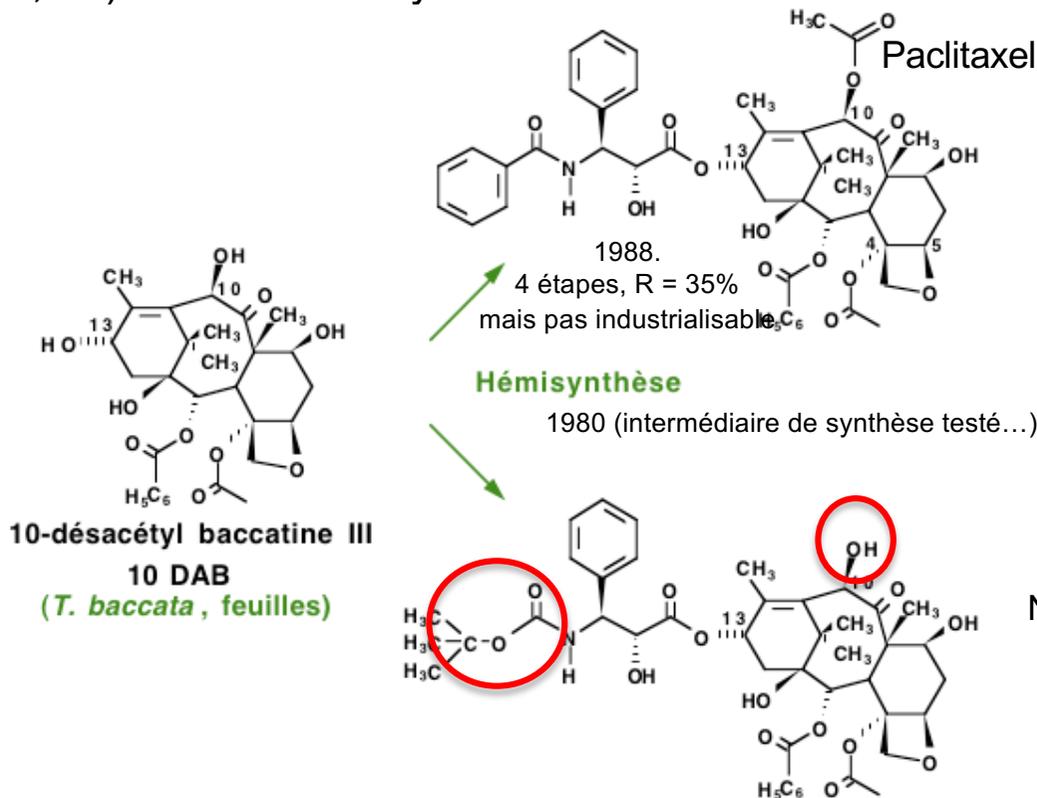
### c) Analogues du taxol/paclitaxel :

1979 : Gif-sur-Yvette perce une route dans le parc de l'ICSN, et abat des ifs (*Taxus baccata*, abondant, mais pas de taxol).

Pierre Potier, directeur de l'ICSN (qui a perdu sa femme à cause d'un cancer du sein et qui travaille sur les anticancéreux) récupère toutes les parties des arbres.

But = trouver une meilleure source que *T. brevifolia*.

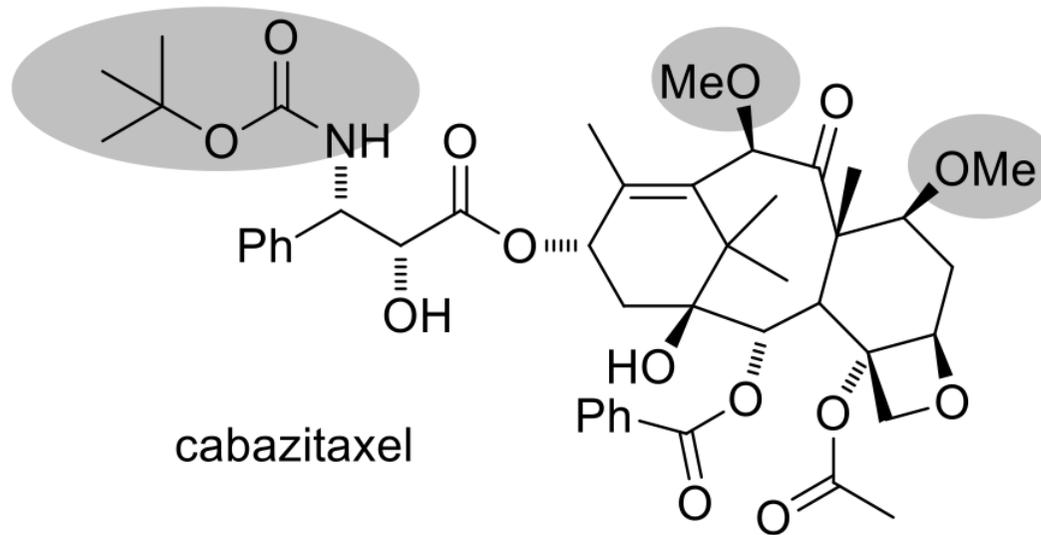
Un test maison sur la tubuline permet d'isoler une molécule modérément active mais abondante dans les feuilles : la 10-DAB III (0,02-0,1%). Possède le noyau taxane !



1993, industrialisé par BMS (hémisynth. Holton), sans royalties à l'ICSN : procès, puis arrangement financier.

Docétaxel (= Taxotère®)  
Non naturel. Plus actif, pas soumis à R au taxol.  
AMM FDA en 1994 (Sanofi)  
>4M€ annuel pour ICSN...

Autre analogue hémisynthétique :



Sanofi, AMM 2010.

Intérêts :

- 10 fois plus efficace pour tuer les cellules cancéreuses
- Efficace même si cellules résistantes à docetaxel
- Capable de traverser la BHE.

### 3) En les utilisant dans une stratégie d'adressage :

Ex. des anticancéreux :

Inconvénient des SN cytotoxiques puissantes : non spécifiques = effets indésirables.

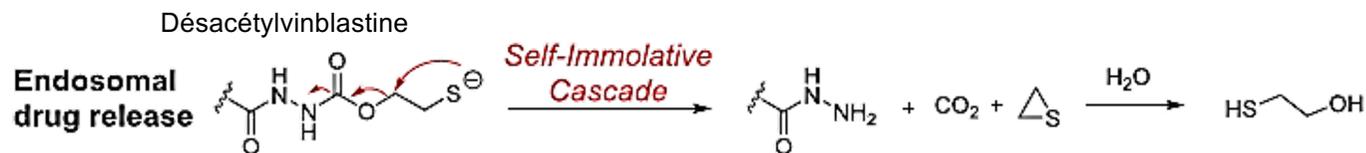
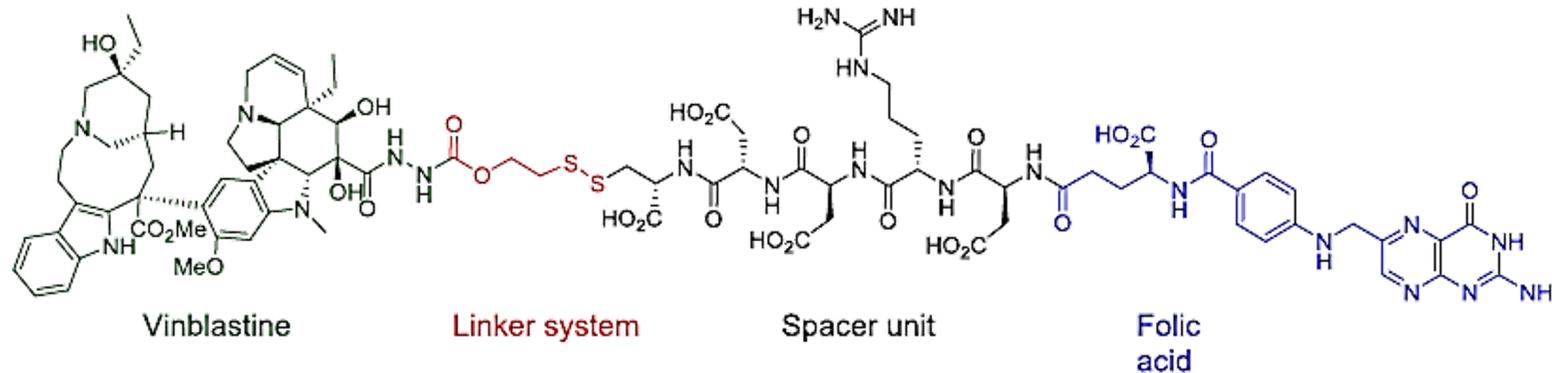
Solution : emmener la toxicité dans la cellule cancéreuse uniquement.

1) Conjugués :

Vintafolide :

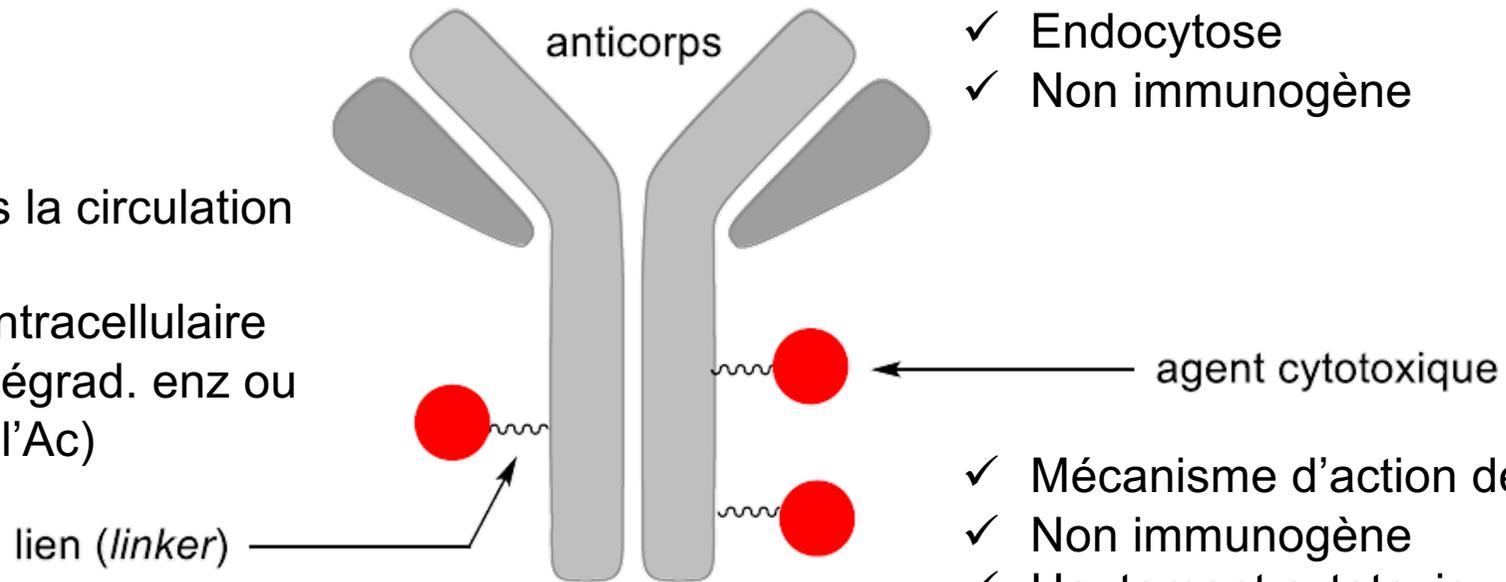
Couplé à Vit B9 : vise cellules surexprimant le R à l'acide folique (ex : cancer ovaire, en association avec doxorubicine). Entre par endocytose.

Statut d'orphan drug en 2012. Arrêt de plusieurs essais cliniques en 2014 (pas assez efficace)



## 2) Antibody-drug conjugates = ADC :

- ✓ Stable dans la circulation sanguine
- ✓ Libération intracellulaire sélective (dégrad. enz ou dégrad. de l'Ac)



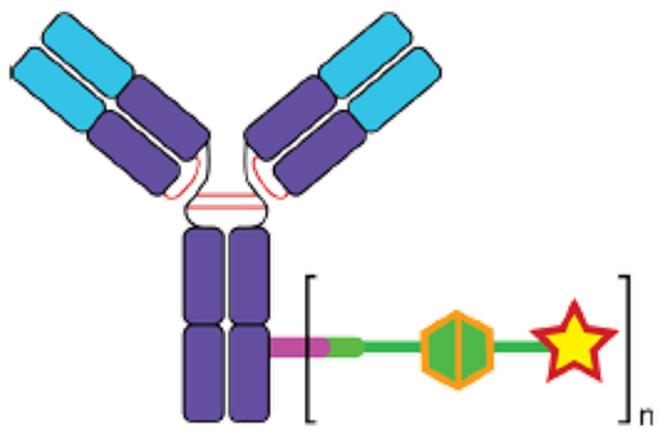
« ximab » = AcMo chimériques

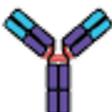
« zumab » = humanisés (~75 % des AcMo utilisés)

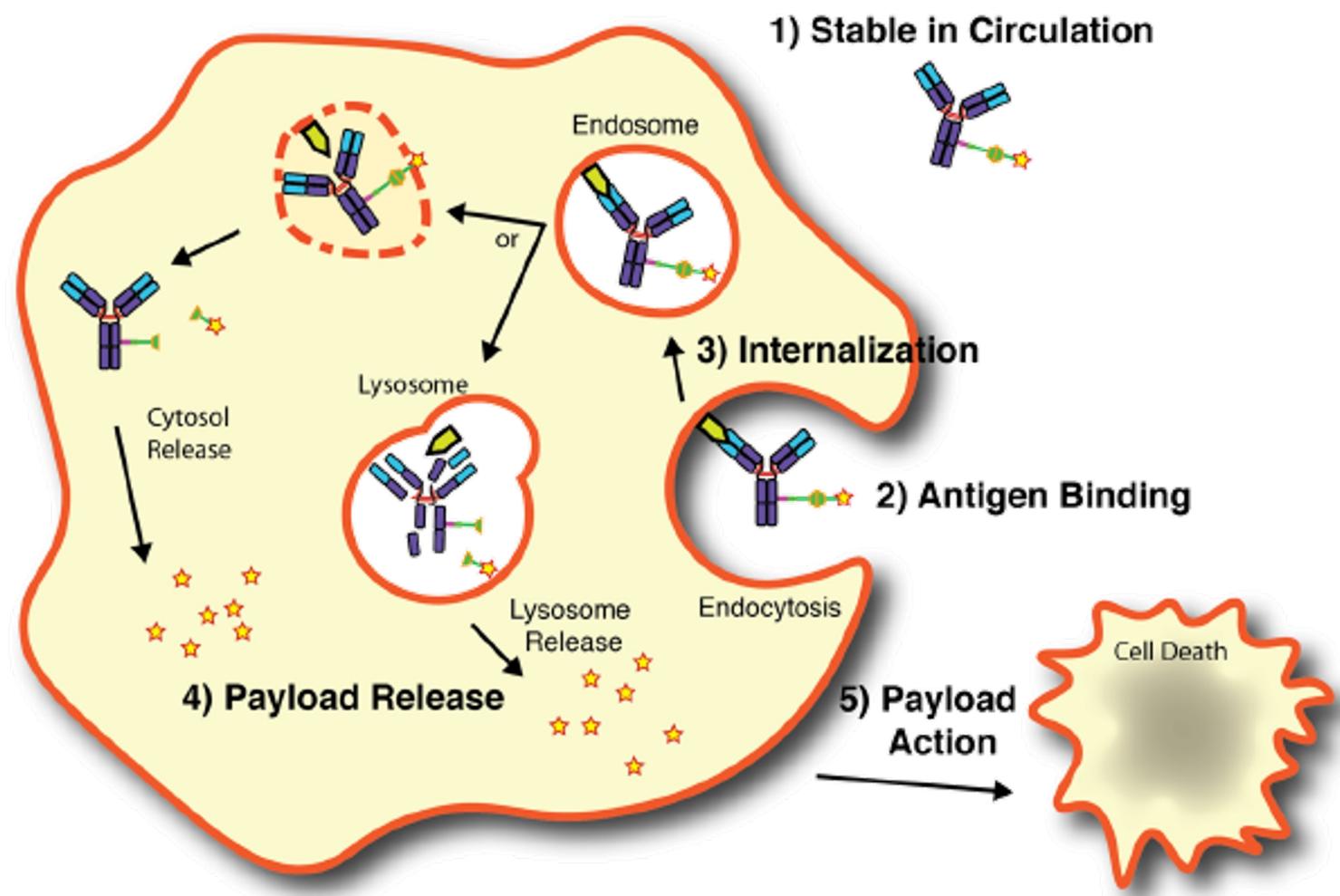
« mumab » = humains (~25 % des AcMo en essais thérapeutiques).

- ✓ Cibler un Ag hautement exprimé à la surface d'une tumeur
- ✓ Endocytose
- ✓ Non immunogène

- ✓ Mécanisme d'action défini
- ✓ Non immunogène
- ✓ Hautement cytotoxique (infime quantité qui arrive à la cible)
- ✓ Pouvant être relié à l'Ac

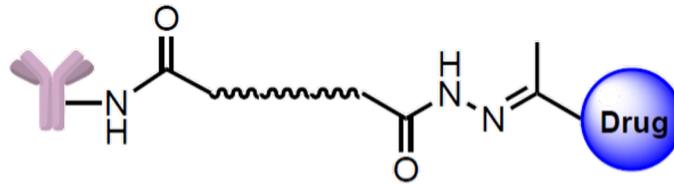


-  = mAb
-  = Conjugation Chemistry
-  = Linker
-  = Stimuli-Sensitive Functionality
-  = Cytotoxic Payload
- n = Payload Stoichiometry

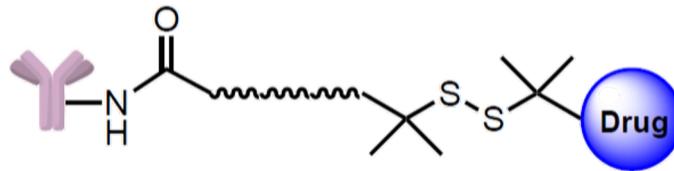


# Linkers ou agents de liaison

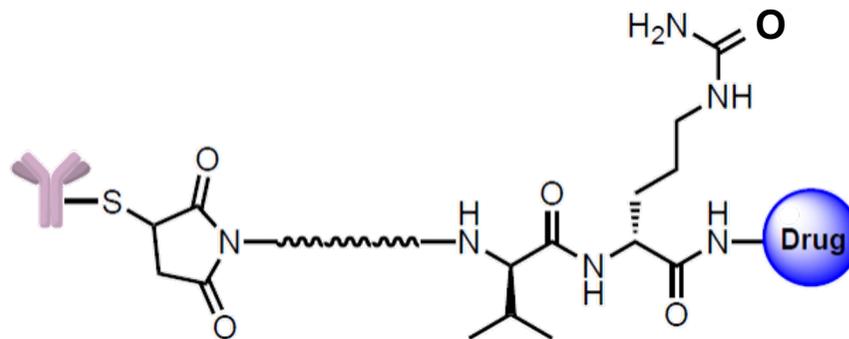
« Linkers » biodégradables (enz.)



Hydrazone (rapidement hydrolysée dans le lysosome)

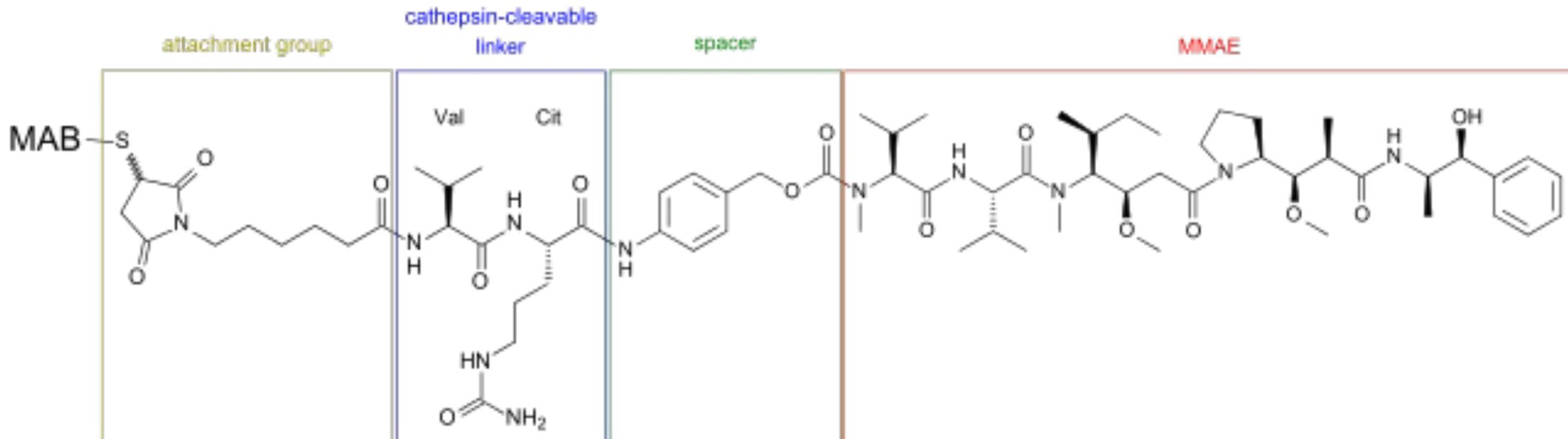


Disulfure (réduit par le glutathion dans le lysosome)



Valine-Citrulline (dipeptide reconnu par les protéases lysosomales (cathepsine B))

- MMAE couplée à différents Ac : pour reconnaître CD30 (lymphomes), nectine-30 (vessie, sein, poumon, pancréas), glycoprotéin NMB (sein, mélanome) ;
- 2013 : **Brentuximab védotine (Adcetris®)** : cible CD30 : lymphome





Maytansine (liaison à tubuline sur site rhizoxine, inhibe assemblage).

*Maytenus serrata* (buisson Éthiopie)

Antibiotique de type ansamycine.

Mais toxicité systémique.

Analogue hémisynthétique avec thiol : mertansine, raptansine...

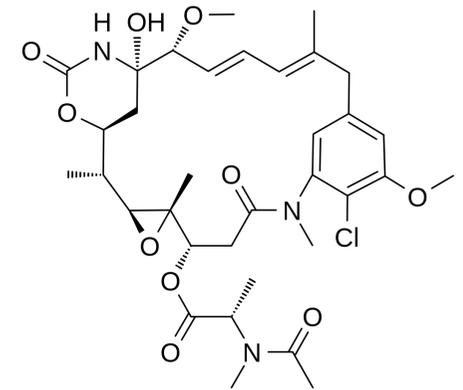
Fixée sur Ac :

- **Lorvotuzumab mertansine** (orphan drug, carcinome de Merkel)

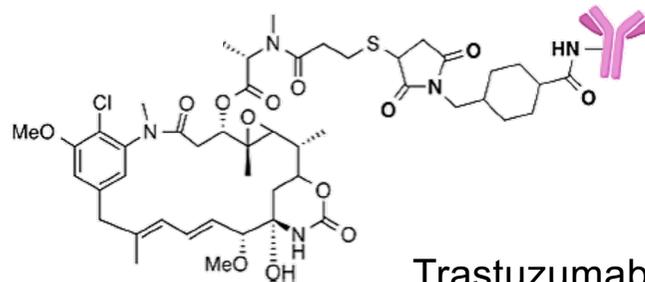
Autres :

- **Trastuzumab emtansine** (Kadcyla® - 2013). Source : Actinomycète. Premier ADC pour tumeur solide : cancer du sein métastatique (*Her2* positif)
- Puis mertansine par hémisynthèse sur emtansine : Bivatuzumab mertansine
- Cantuzumab mertansine
- Cantuzumab raptansine

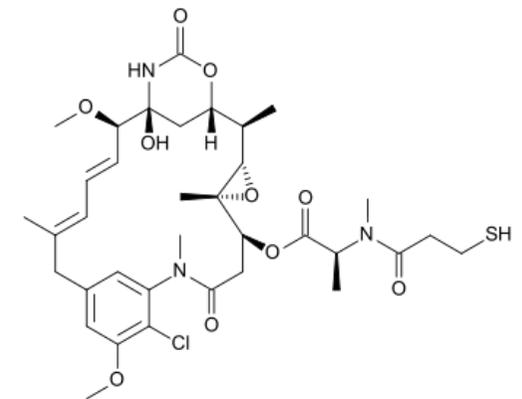
Ces 3 derniers pas commercialisés.



maytansine



Trastuzumab emtansine

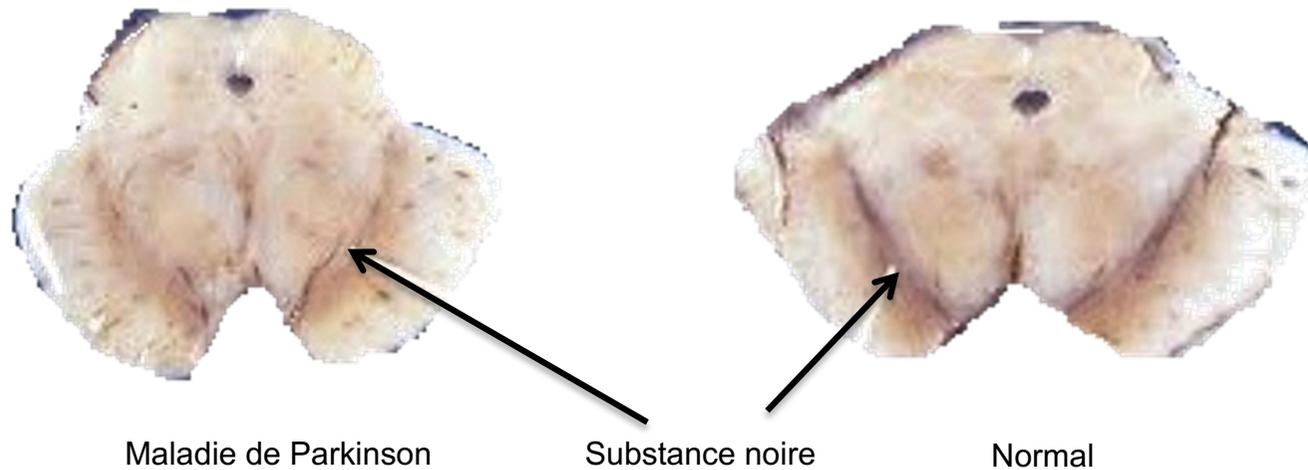


mertansine

III - Atelier de “valorisation” :  
Le chemin laborieux de la molécule active au  
médicament...

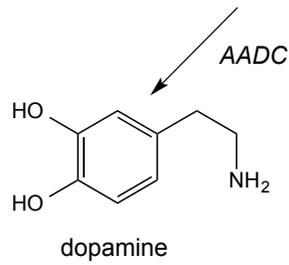
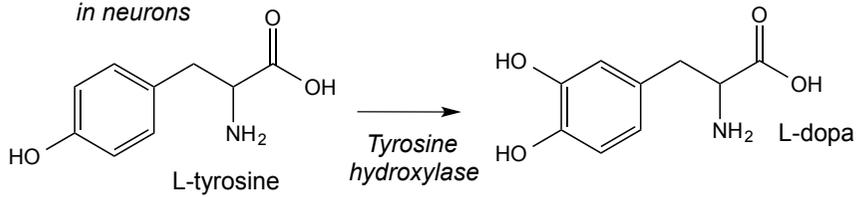
## Le contexte de la recherche : la maladie de Parkinson

Maladie neurodégénérative caractérisée par la mort progressive des neurones dopaminergiques situés dans une région du cerveau appelée substance noire

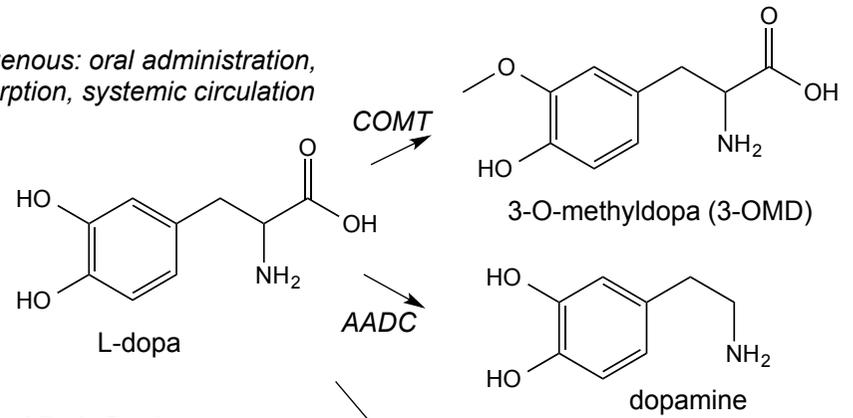


Coupe transversale de cerveau montrant la perte des neurones dopaminergiques chez les parkinsoniens

*Endogenous pathway:  
in neurons*

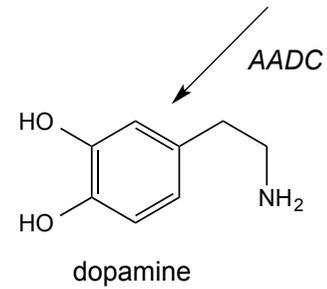
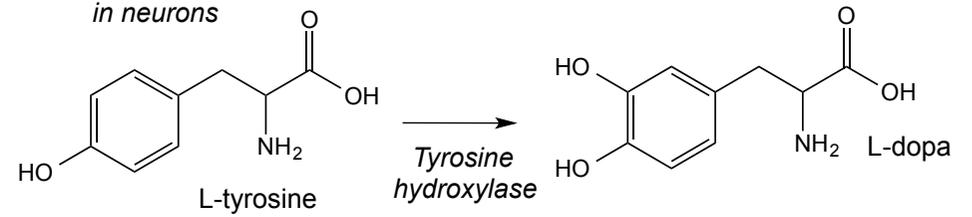


*Exogenous: oral administration,  
absorption, systemic circulation*



**Blood-Brain Barrier**

*Endogenous pathway:  
in neurons*



## ***Mucuna pruriens* (L.) DC. Fabaceae**

- **Description** : herbacée annuelle grimpante.
- **Habitat** : régions chaudes et tropicales de l'Inde, de l'Afrique et de l'Amérique centrale et du Sud
- **Partie utilisée** : graines
- **Utilisations traditionnelles (nom sanskrit : *kappikachu*)** :
  - ✓ Anémie, dysenterie, diarrhée
  - ✓ Diabète
  - ✓ Infections parasitaires
  - ✓ Aphrodisiaque
  - ✓ Maladie de Parkinson (*Kampavata* en *Āyurveda*).



Variété noire

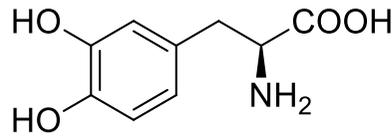


Variété blanche

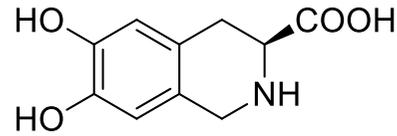


➤ **Constituants chimiques connus de *M. pruriens* avant nos travaux**

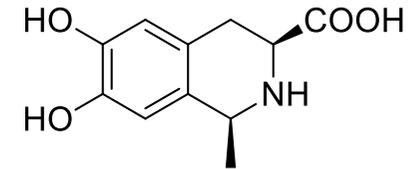
- ✓ L-dopa : 5 %
- ✓ Alcaloïdes indoliques, tétrahydroisoquinoléiques
- ✓ Nicotine, stizolamine
- ✓ Autres constituants évoqués mais non démontrés et peu probables



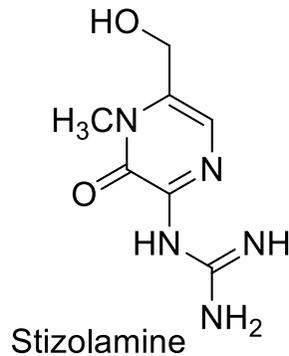
L-DOPA



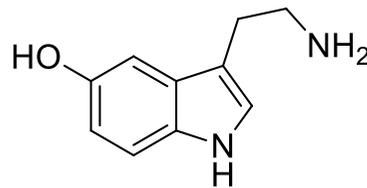
CDTHIQ



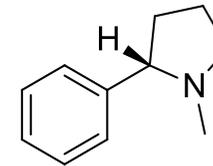
MCDTHIQ



Stizolamine



Sérotonine



Nicotine

## Activité antiparkinsonienne de *Mucuna pruriens*

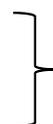
### 1- Rat parkinsonien (modèle lésionnel 6-OHDA) :

- Extrait aqueux de poudre de *M. pruriens* (= 2-4-6 mg L-dopa) +/- bensérazide (BZ) (15 mg)
- L-DOPA (2, 4, 6 mg) +/- BZ (15mg)
- Conclusion : extrait aqueux de *M. pruriens* seul plus efficace, avec moins d'effets indésirables (dyskinésies) que les autres traitements.

### 2- Humain (sujets malades) :

L-DOPA 200 mg carbidopa 50 mg

Poudre des graines de MP 30 g (= 1 g L-DOPA)



Analyse des concentrations plasmatiques de L- DOPA

*M. pruriens* :

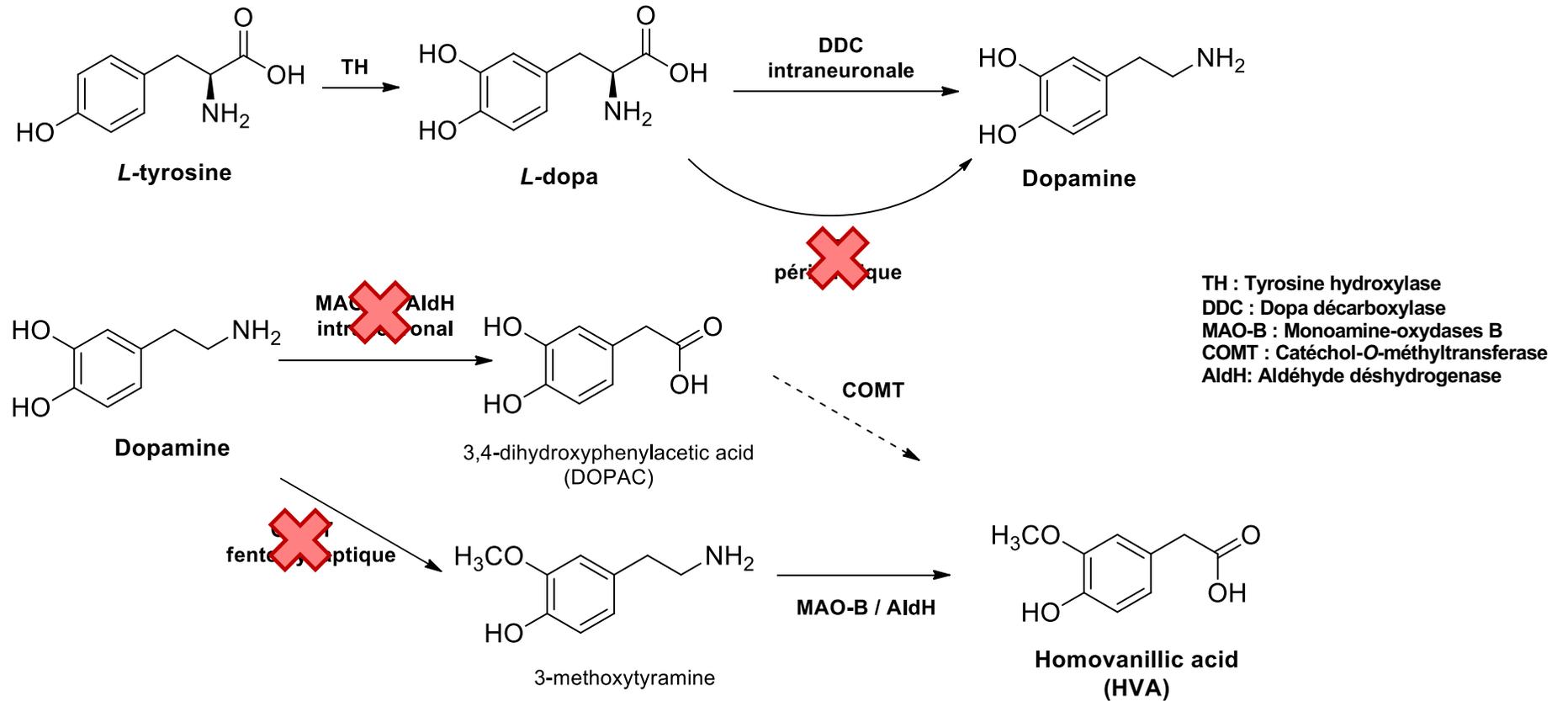
- C<sub>max</sub> de L-DOPA plus élevées ;
- T<sub>max</sub> plus court,
- durée d'effet plus longue, sans augmentation des dyskinésies.

→ Graines de *M. pruriens* : meilleure efficacité biologique que L-DOPA ;

→ La L-DOPA n'est pas le seul composé responsable de l'activité.

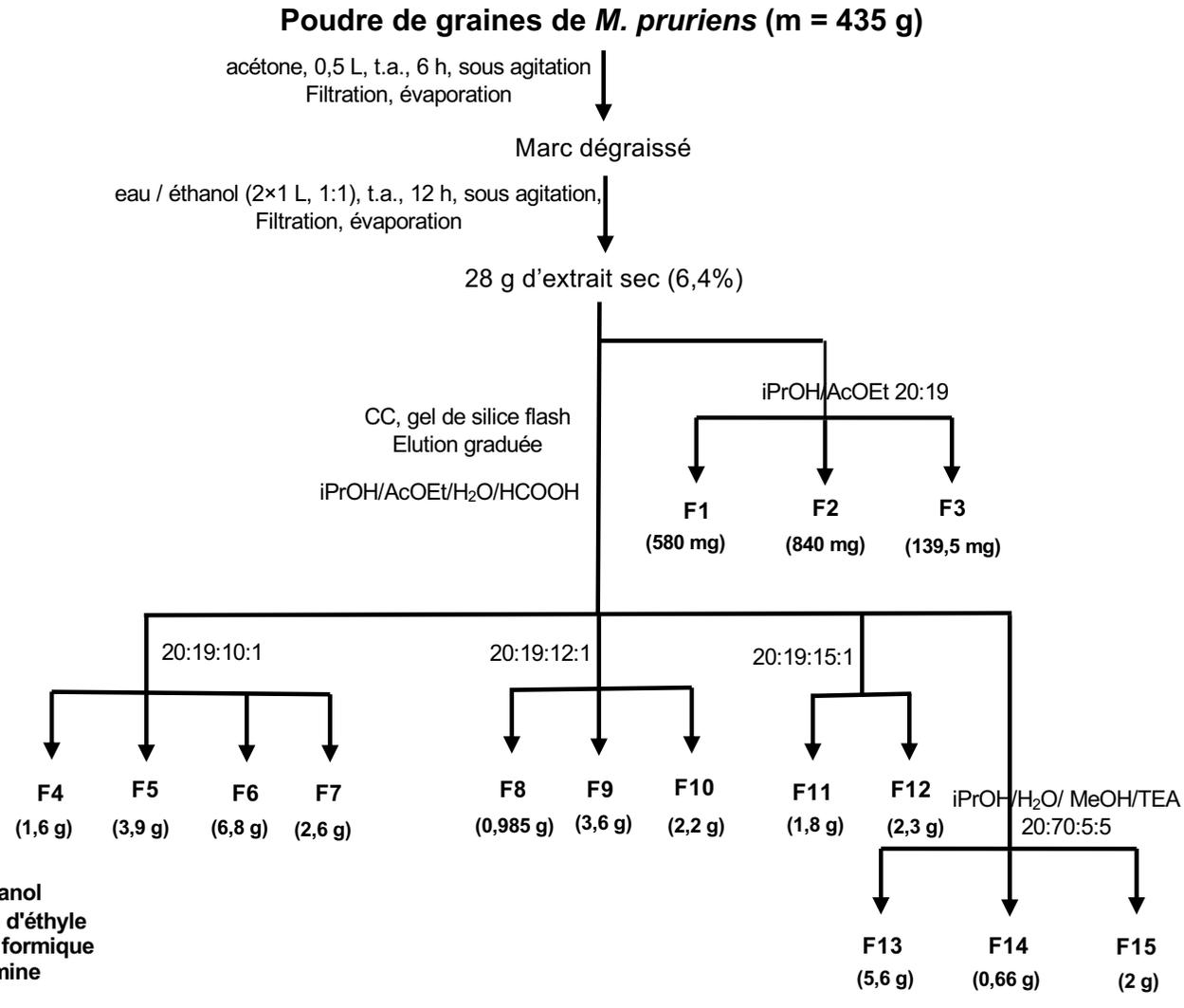
**QUELS MOLÉCULES / MÉCANISMES RESPONSABLES DE CETTE EFFICACITÉ ?**

➤ Certains composés des graines pourraient-ils avoir un effet sur le système dopaminergique ?

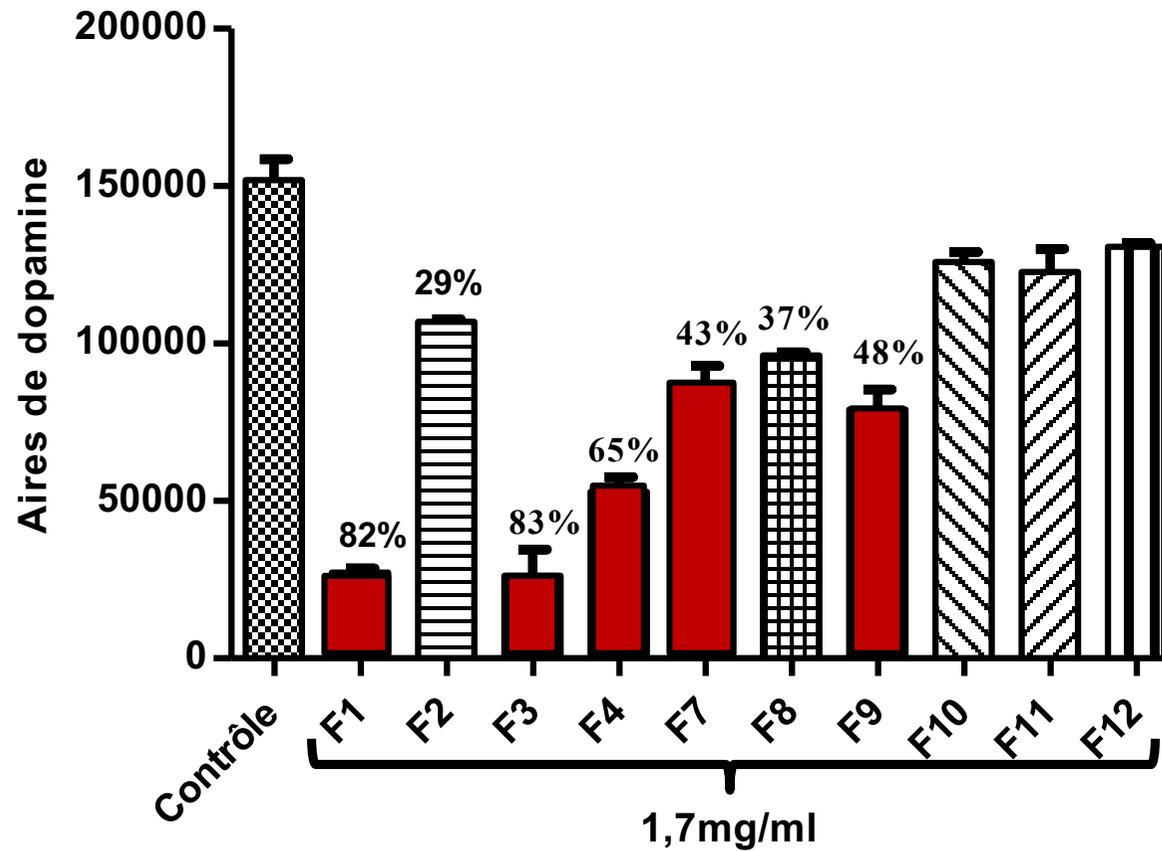


**Hypothèses d'effet à tester**

# Extraction et fractionnement



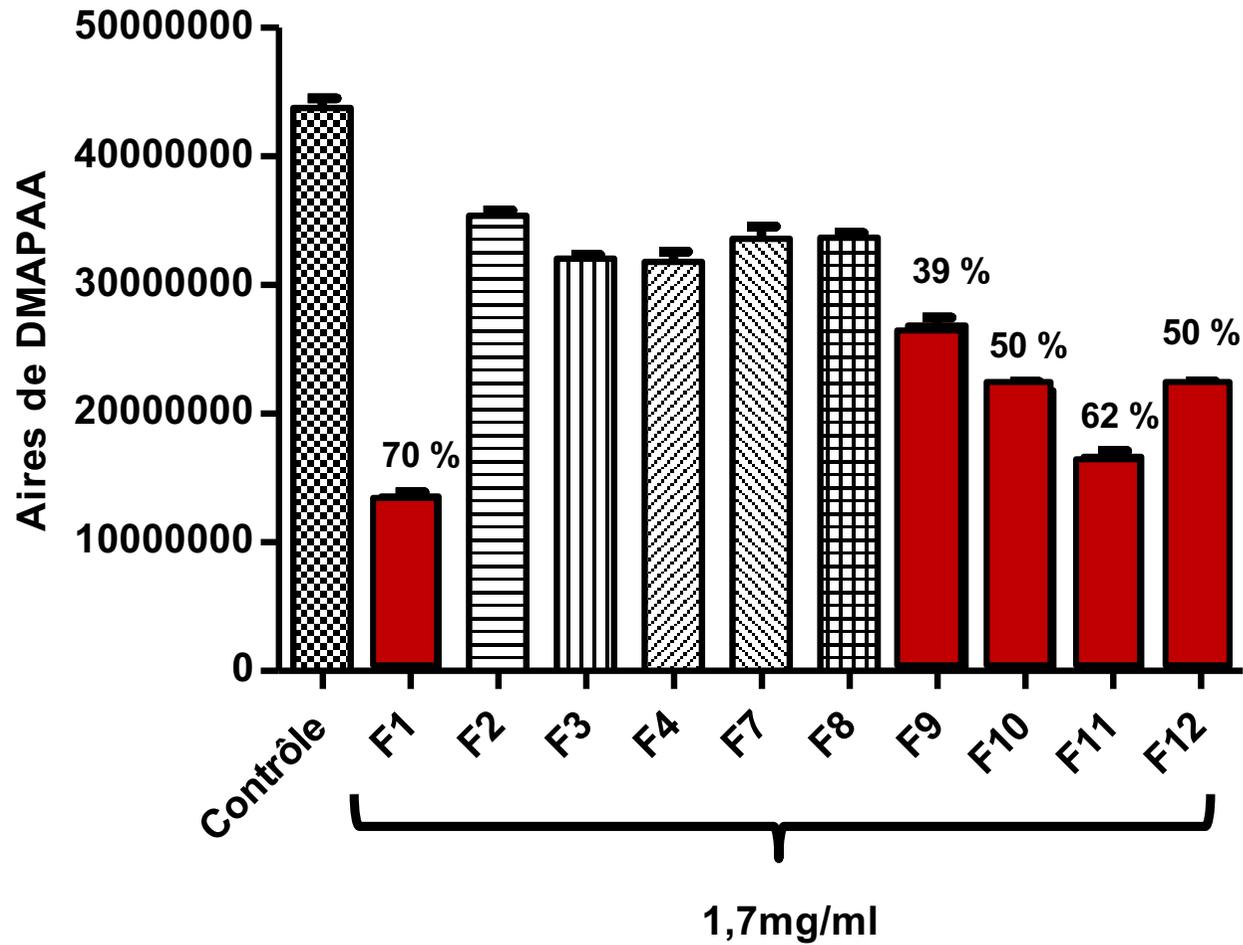
## Activité inhibitrice des fractions de *M. pruriens* sur la DDC



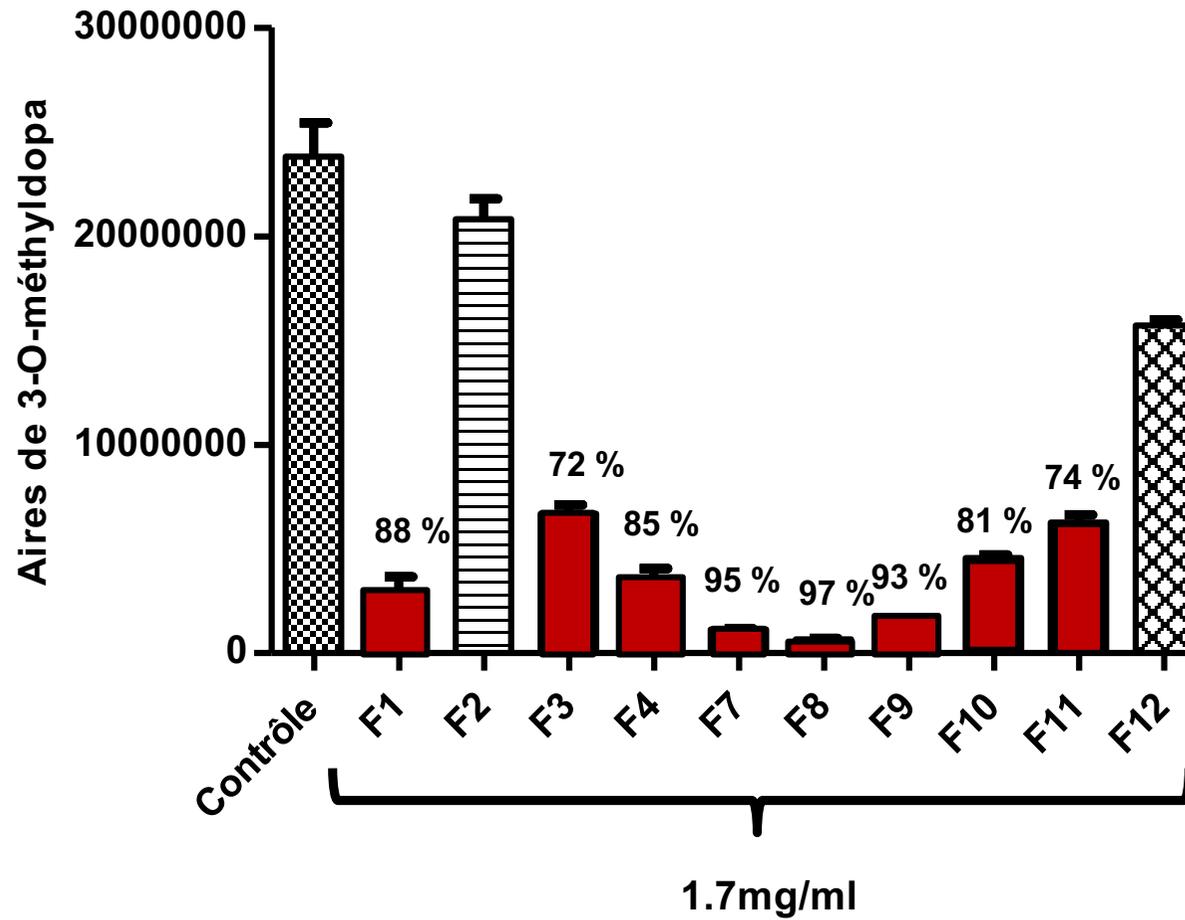
Remarques :

- étant donné la haute reproductibilité des résultats (triplicats intégraux), nous n'avons pas corrigé les résultats par un dosage protéique ;
- Spécificité de la méthode garantie par  $T_r$  et HRMS.

## Activité inhibitrice des fractions de *M. pruriens* sur la MAO-B

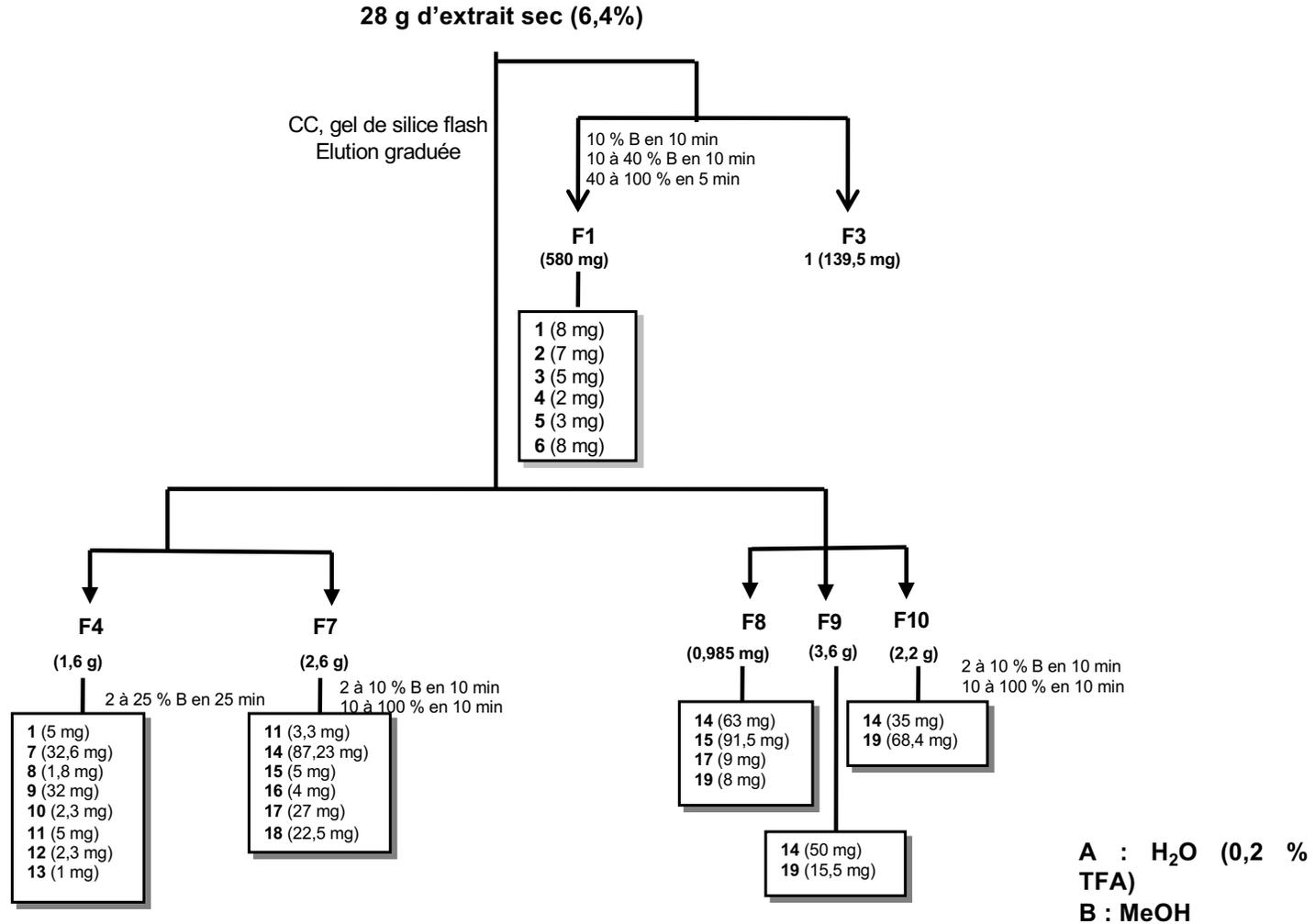


## Activité inhibitrice des fractions de *M. pruriens* sur la COMT



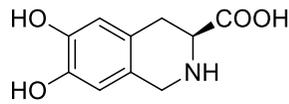
# Purification des fractions actives

Purification des fractions de *M. pruriens* par HPLC semi-préparative sur une colonne C18

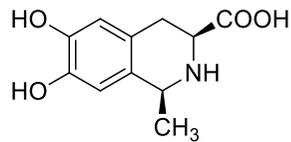


➤ **Alcaloïdes isolés des fraction actives de *M. pruriens***

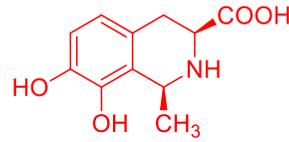
✓ **Alcaloïdes tétrahydroisoquinoléine**



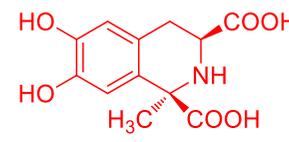
Composé 16



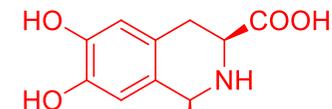
Composé 11



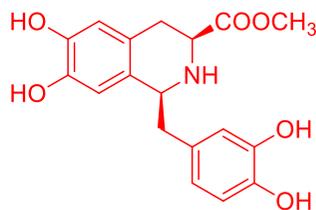
Composé 10



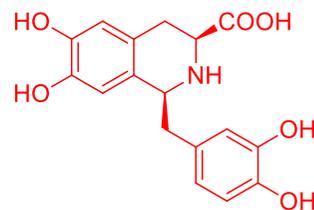
Composé 17



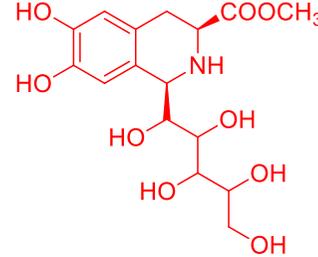
Composé 13



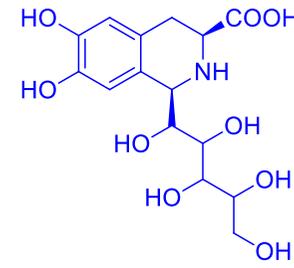
Composé 8



Composé 9

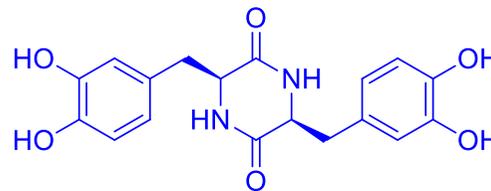


Composé 15



Composé 14

✓ **Alcaloïdes de type 2,5 dicétopipérazine**



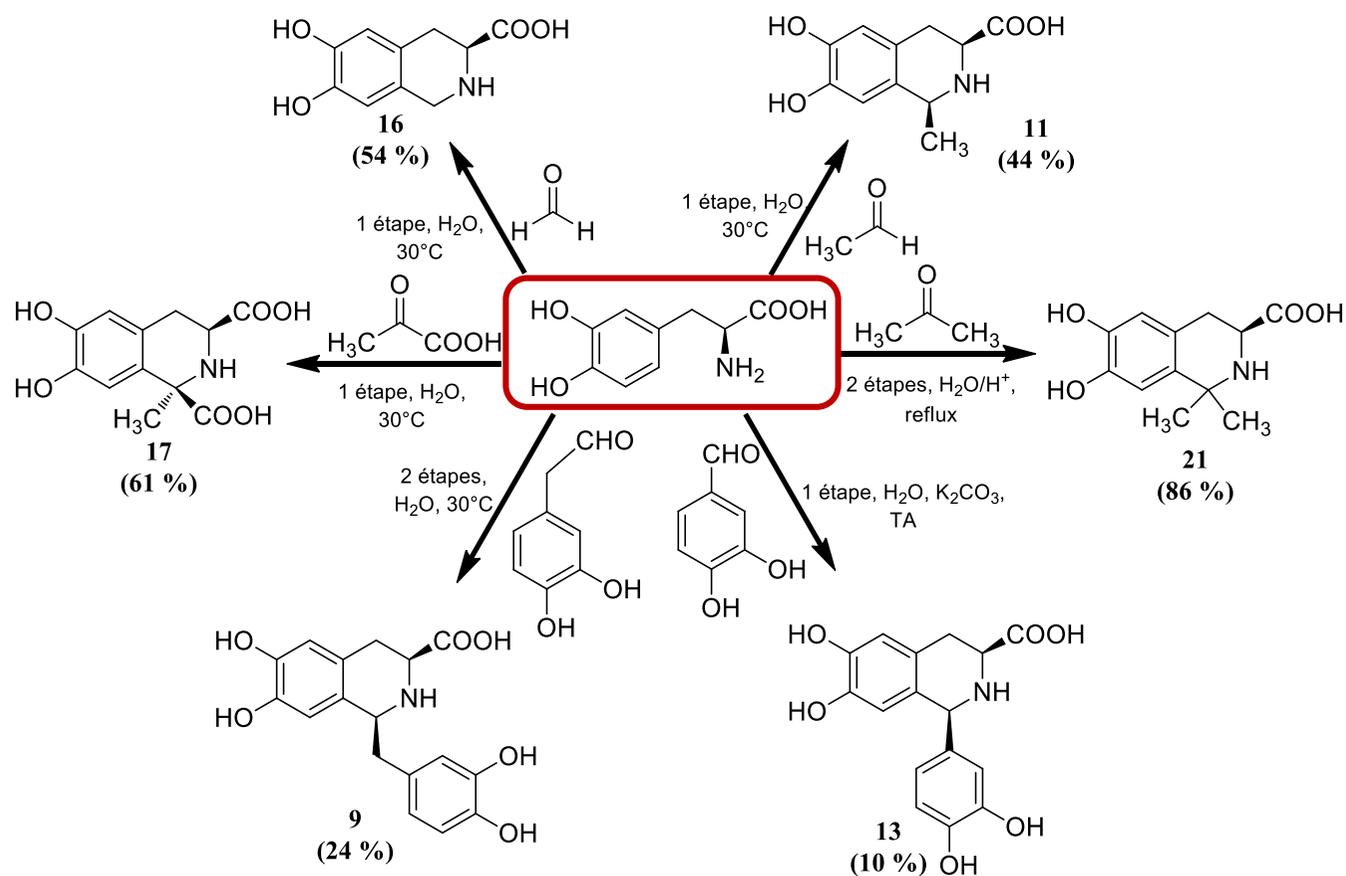
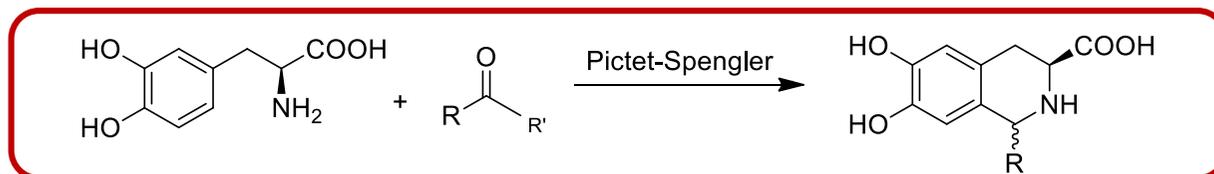
Composé 12

Composés connus

Composés nouveaux

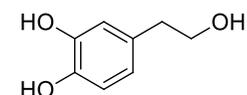
Composés nouveaux dans la plante mais décrits en synthèse

## Synthèse de produits naturels de *M. pruriens*

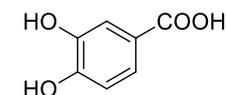


## Evaluation de l'activité antiparkinsonienne des molécules de *M. pruriens* par HRMS

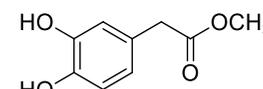
Molécule	DDC (IC <sub>50</sub> , μM)	MAO-B (IC <sub>50</sub> , μM)	COMT (IC <sub>50</sub> , μM)
Bensérazide	0,32 (litt: 0,04)	-	-
Sélégiline	-	1,86 (littérature : 1,3)	-
Tolcapone	-	-	32 (littérature : 0,773)
1	<i>nt</i>	<i>nt</i>	<i>nt</i>
2	<i>nt</i>	<i>nt</i>	<i>nt</i>
3	<b>244</b>	>10 mM	<b>205</b>
4	1800	4100	<b>120</b>
5	>10 mM	6000	308
6	<b>367</b>	>10 mM	<b>201</b>
7-10	<i>nt</i>	<i>nt</i>	<i>nt</i>
11	>10 mM	5400	<b>126</b>
12	<i>nt</i>	<i>nt</i>	<i>nt</i>
13	2600	7200	<b>222</b>
14	2813	5605	368
15	>10 mM	>10 mM	1297
16	>10 mM	>10 mM	556
17	1292	2517	<b>93</b>
18	<i>nt</i>	<i>nt</i>	<i>nt</i>
19	6800	7078	685
20	3000	>10 mM	784



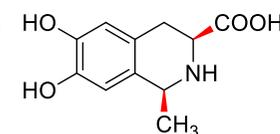
Composé 3



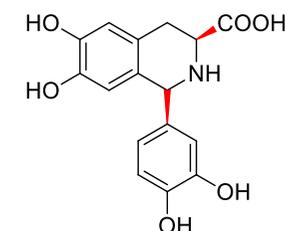
Composé 4



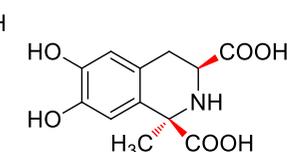
Composé 6



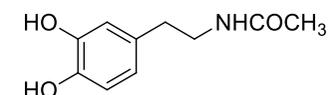
Composé 11



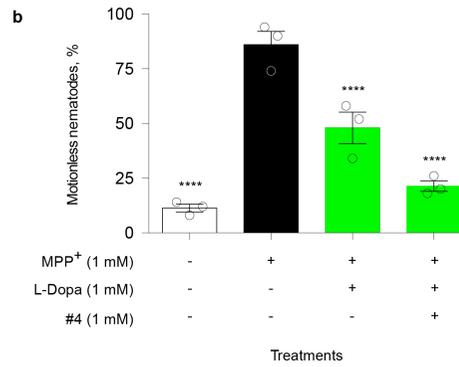
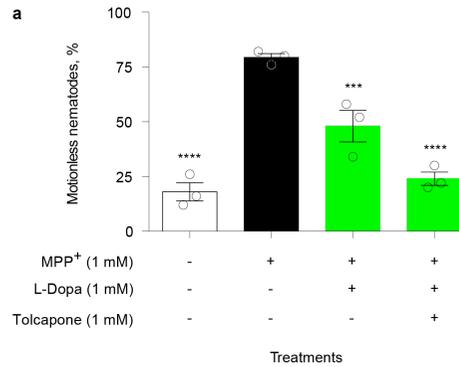
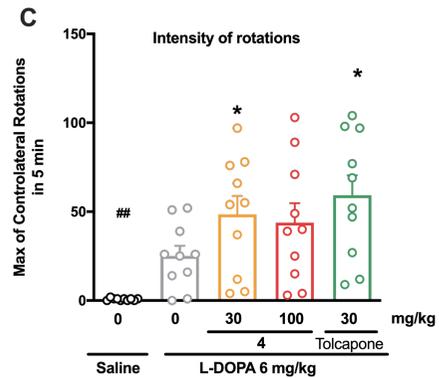
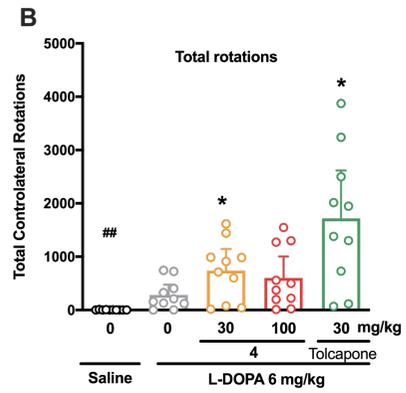
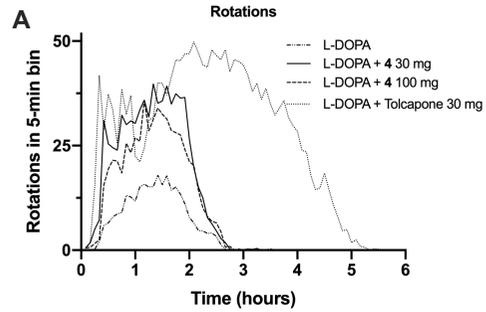
Composé 13



Composé 17

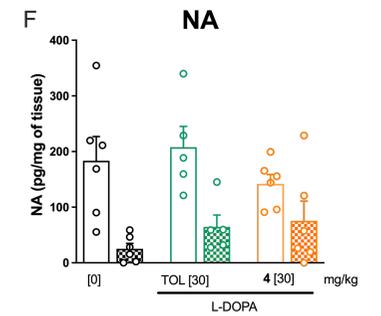
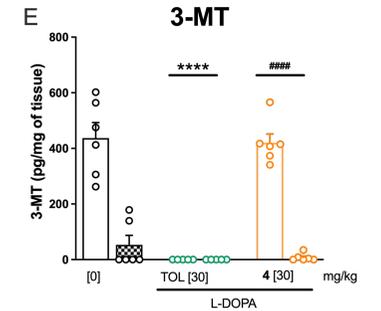
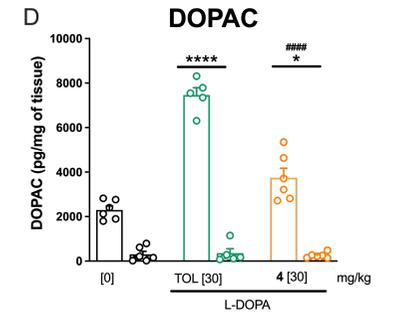
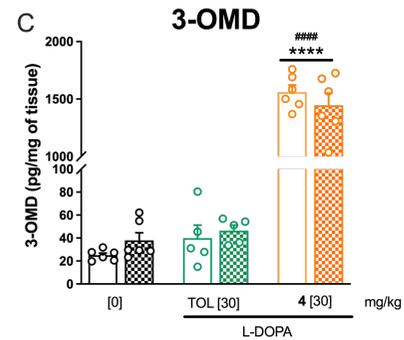
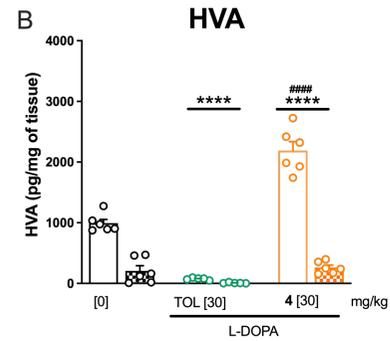
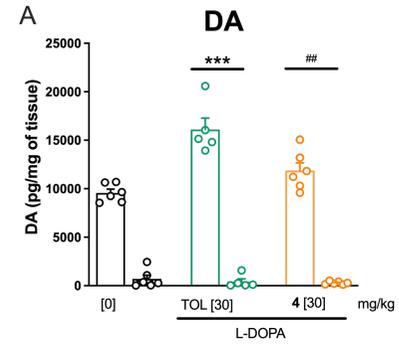


Composé 5



Essai *in vivo* sur vers :  
le produit naturel est efficace

Essai *in vivo* sur souris :  
le produit naturel est efficace



□ Healthy hemisphere  
 ▣ Lesioned hemisphere

Dosages de neuromédiateurs dans le cerveau:  
le produit naturel ne traverse pas la BHE



## 1 - Domaine d'application

Thérapeutique des troubles du SNC

Majoritairement :

Traitement symptomatique de la maladie de Parkinson

Secondairement :

Dépression, troubles psychotiques, troubles cognitifs...

## 3 - Notre solution

Rendre disponible à la licence un médicament inhibiteur de COMT, d'effet central, non toxique.

## 2 – Le problème

Pas de traitement curatif, **échappement thérapeutique** ;

**Polythérapie** autour de la L-dopa ;

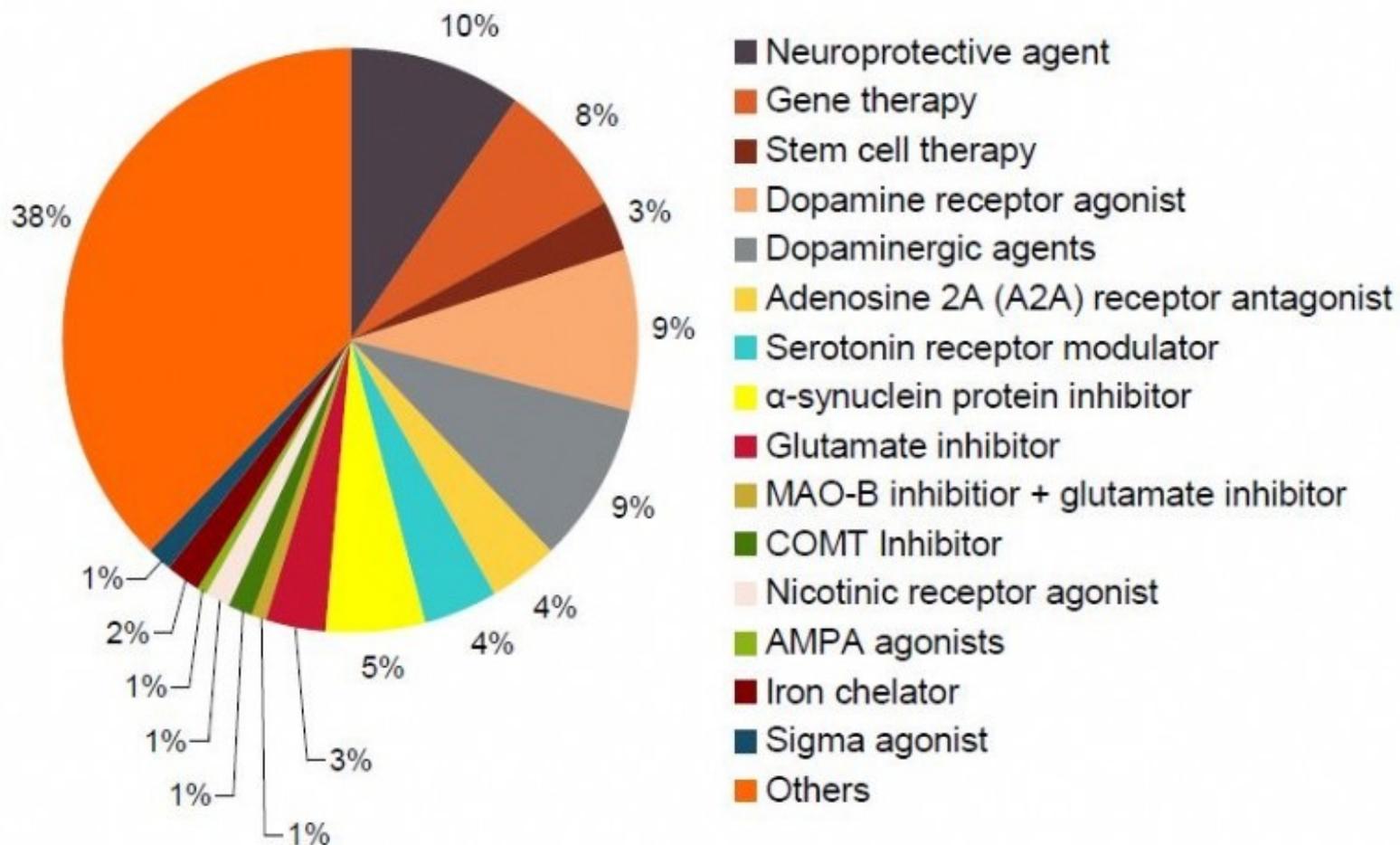
Patients peu compliants à cause des **effets indésirables** (prêts à des pompes intra-gastriques...)

La classe des inhibiteurs de la catéchol-O-méthyl transférase (ICOMT, 1998) = incontournable pour optimiser la cinétique de la L-dopa.

3 molécules sur le marché à ce jour.

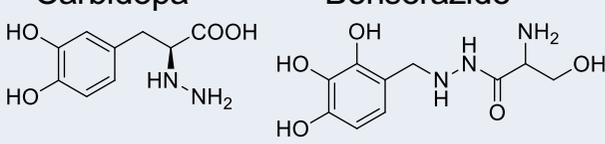
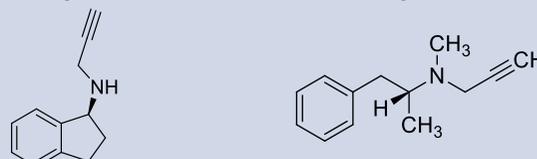
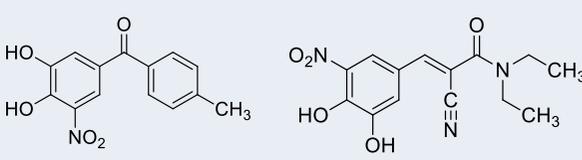
La seule qui pénètre la BHE : toxicité hépatique sévère. Toujours sur le marché (avec restriction d'indications) !

## Prédiction du marché des traitements de la maladie de Parkinson en 2020



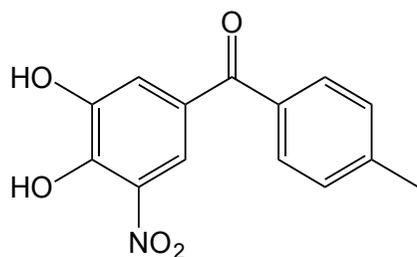
Source : Parkinson's Disease Therapeutics - Global Drug Forecasts and Treatment Analysis to 2020, ASDR Report 27890 (2012).

**- Prise en charge médicamenteuse de la maladie (symptomatique) :**

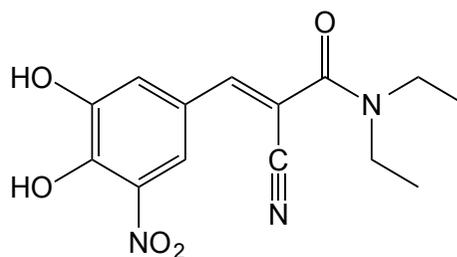
Mode d'action	Molécules	Effets indésirables
Agoniste dopaminergique	L-dopa et 7 autres molécules	crampes, rigidité locale, dyskinésies, troubles GI, troubles conscience
IDDC	<p>Carbidopa      Bensérazide</p> 	non utilisés seuls
IMAO-B	<p>Rasagiline      Sélégiline</p> 	troubles GI, toxicité hépatique
ICOMT	<p>(Tolcapone)      Entacapone</p> 	troubles GI, dyskinésies 1,7 %, toxicité hépatique
Associations	L-dopa /Carbidopa	bradykinésies, troubles de la marche, dyskinésies
	L-dopa /Carbidopa /Entacapone	dyskinésies 19 %, symptômes digestifs, hépatites graves
Anticholinergiques	5 molécules	Nombreux



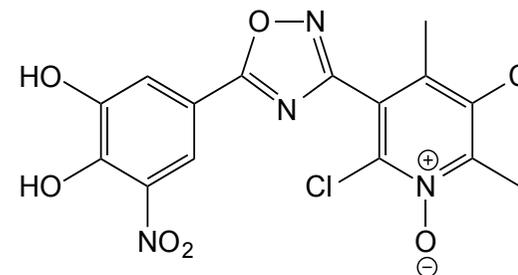
## Molécules concurrentes : autres ICOMT



Tolcapone



Entacapone



Opicapone

	Date de commercialisation	Fabriquant	généralisé	SMR	ASMR	Coût
<b>Tolcapone</b> (Tasmar®)	- 1998 - Suspendue 1998 - ré-autorisée 2005	Meda Pharma (Suède)	non	faible	absent	124€/100 cp 100mg
<b>Entacapone</b> (Comtan®)	1998	Novartis (Suisse)	oui	important	absent	40€/60 cp 200mg
<b>Opicapone</b> (Ongentys®)	AMM européenne 2016	Bial (Portugal)	non	important	absent	120€/30 cp 50mg



## BENCHMARK TECHNOLOGIQUE

	Effet central Après adm. orale	Toxicité	½ vie élim (H)	Durée d'effet (H)	Log P à pH 7,4 (Prédiction)
Tolcapone	OUI	Importante, hépatique	1,6-3,4	2	1,7
Entacapone	NON	modérée	0,4-0,7	0,4-2	0,1
Opicapone	NON	modérée	2	60-120	0,00

## DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

	½ vie élim (H)	Durée d'effet (H)	Posologie (mg/j)	Log P à pH 7,4 (Prédiction Marvin sketch)	pKa (Prédiction Marvin sketch)
<b>Tolcapone</b>	1,6-3,4	2	3x100	1,7	5,2
<b>Entacapone</b>	0,4-0,7	0,4-2	max 10x200	0,1	5,7
<b>Opicapone</b>	3	60-130	50	0,99	6,0
<b>L-dopa</b>	3	1-2	max 1500	-1,8	1,65/9,6
<b>Dopamine</b>	-	-	-	-2,3	9,3
<b>Lead</b>	à déterminer	à déterminer	à déterminer	0,75*	2,0 ; 2,7 ; 8,8



- Classe des ICOMT : **la plus vendue après L-dopa** ;
- Maladie de Parkinson : **10 M de patients** (13 M en 2040), CA de 2-3 Mds € (6 Mds en 2025) ;
- 100 000 français susceptibles d'utiliser un ICOMT (sur 200 000 parkinsoniens).
- **Acteurs** : Boehringer Ingelheim, Hoffmann-LaRoche, GSK, Novartis, Abbvie, UCB, Teva/Lundbeck, génériqueurs.
- **Molécules en développement** : 146 = quantité "faible"
  - 17 petites molécules en phase III, surtout des *me-too*, extensions d'indication (pas d'ICOMT) ;
  - pas de molécules susceptibles d'être un blockbuster dans le futur proche ;
  - R&D de niches (thérapie génique, cellules-souches, inhibiteurs d'alpha-synucléine...) : pas disponibles dans futur proche, peu susceptibles d'avoir un impact majeur.



- Lead et 3 autres molécules de *back-up* : inhibition COMT **similaire à la tolcapone** dans essai *in vitro et in vivo* ;
- Cette série chimique :
  - issue d'usage ancien sous forme brute **sans trace de cytotoxicité** ;
  - **absence d'affinité** pour les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 et les neurones dopaminergiques ( = faible probabilité d'EI psychiatriques) ;
  - **activité faible à nulle** sur les autres enzymes de la voie dopaminergique (= pas d'EI majeurs) ;
- confirmation *in vivo* sur **modèle murin** en cours (Résultats décembre 2019).



- **Potentiel : important !**
- **Attente** importante des malades pour des molécules efficaces, non toxiques et sans effets indésirables, pour améliorer compliance ;
- **voie orale** dominera toujours le marché à terme ;
- **Faible coût** facteur de succès car facilite leur prise en charge (ex. Sativex®...) ;
- Même des traitements complexes et invasifs (par ex. Duodopa® par pompe intragastrique) ont un succès significatif malgré leurs limitations !
- Antécédents de difficultés d'approvisionnement : concentration des acteurs et dépendance des patients.



## 1 - Maturité du projet

### Efficacité :

- Démonstration *in vitro* (COMT d'homogénats cellulaires) ;
- Démonstration *in vivo* (*C. elegans*, rat en cours) ;

### Sécurité :

- Absence de cytotoxicité ;
- Absence d'effet off target (D1, D2, recapture dopamine) ;
- Faible effet sur autres enzymes.

TRL estimé : 4.

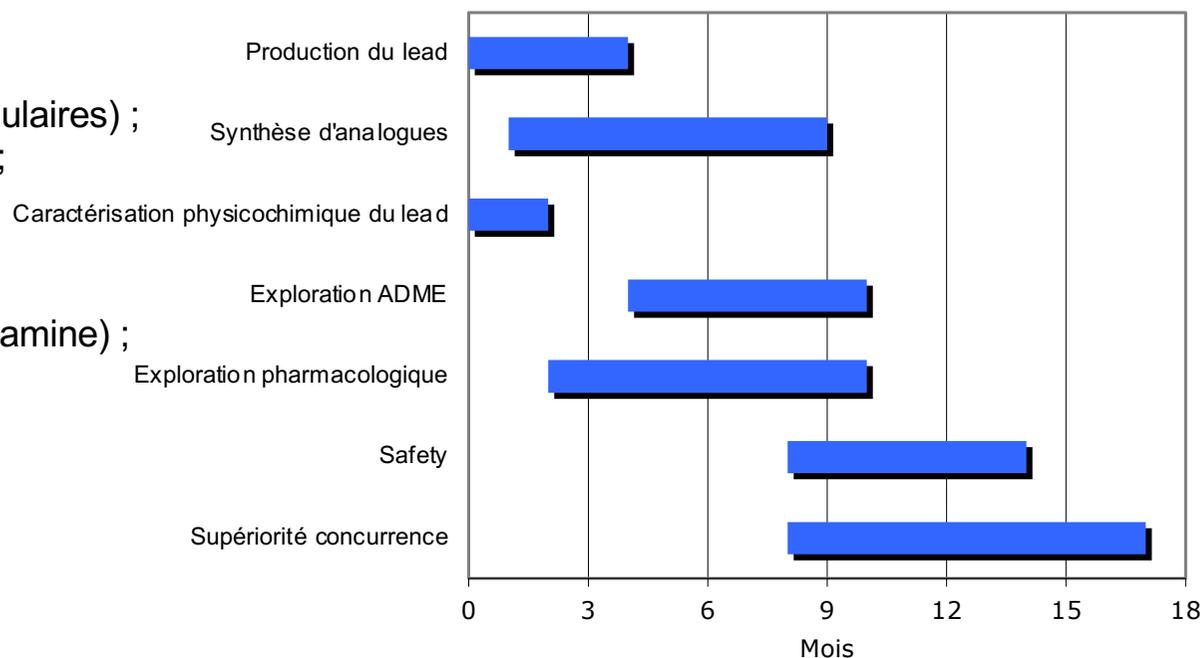
## 2 - Projet SATT "POC"

Objectif : obtenir les données indiquant le caractère *druggable* de notre ICOMT

Livrable : résultats sur modèles "gold standard" pour : profil pharmacologique, profil ADME, passage BHE, safety.

Risques : critères non remplis : solution de back up, nouveaux leads en développement.

## 3 – Calendrier et livrables





# Label-free LC-HRMS-based enzymatic activity assay for the detection of DDC, MAO and COMT inhibitors

Abha Harfouche<sup>a</sup>, Wael Alata<sup>b</sup>, Karine Leblanc<sup>a</sup>, Ghislain Heslaut<sup>a</sup>, Bruno Figadère<sup>a</sup>, Alexandre Maciuk<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> BioCIS, CNRS, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France  
<sup>b</sup> Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council of Canada, Ottawa, ON K1A 0R6, Canada

## ARTICLE INFO

Keywords:  
COMT  
MAO  
Dopa decarboxylase  
Screening  
Parkinson

## 1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is characterized by motor symptoms due to the loss of dopamine neurons in the substantia nigra with the depletion of the neurotransmitter dopamine in the striatum. Pharmacological treatment of PD by L-DOPA started in the late 60's. Since then, L-DOPA still remains the core treatment despite its symptomatic nature and the induced therapeutic escape. Other molecules are used in association with L-DOPA and these are mostly enzyme inhibitors. Their targets are dopa-decarboxylase (DDC), monoamine oxidase (MAO) and catechol-O-methyltransferase (COMT), enzymes playing an essential role in dopamine metabolism (Fig. 1).

DDC or benserazide play a crucial role for the peripheral distribution, by preventing its metabolism. MAO or pargoline play a crucial role for the peripheral distribution, by preventing its metabolism. COMT or entacapone play a crucial role for the peripheral distribution, by preventing its metabolism.

## ABSTRACT

Pharmacological treatment of Parkinson's disease consists of a combined chemotherapy that mostly relies on levodopa (L-DOPA) administration together with inhibitors of dopa-decarboxylase (DDC), monoamine oxidase (MAO) and catechol-methyltransferase (COMT). Identification of inhibitors specifically targeting these enzymes is still a significant part of the development of new alternative antiparkinsonian drugs. Most of the available animal models of Parkinson's disease are based on the administration of MPTP or 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to mice or rats, respectively. The development of alternative approaches to identify and validate new antiparkinsonian drugs is a high priority. We describe the development of a label-free LC-HRMS-based enzymatic activity assay for the detection and quantification of DDC, MAO and COMT inhibitors. The assay was validated using three different enzymatic assays coupled with high-resolution mass spectrometry (HRMS). We describe the development of a label-free LC-HRMS-based enzymatic activity assay for the detection and quantification of DDC, MAO and COMT inhibitors. The assay was validated using three different enzymatic assays coupled with high-resolution mass spectrometry (HRMS). We describe the development of a label-free LC-HRMS-based enzymatic activity assay for the detection and quantification of DDC, MAO and COMT inhibitors. The assay was validated using three different enzymatic assays coupled with high-resolution mass spectrometry (HRMS).

reduce dopamine metabolism in the brain and Alzheimer's disease, MAO-B inhibitors (e.g. rasagiline, selegiline) are used as adjunct therapy for PD or Alzheimer's disease. This also has a protective effect. Indeed, the MAO-B biotransformation of DOPAL, an unstable metabolite of L-DOPA, is the main pathway for its disposal in the brain. COMT inhibitors (e.g. tolcapone, entacapone) also have a protective effect. Indeed, the MAO-B biotransformation of DOPAL, an unstable metabolite of L-DOPA, is the main pathway for its disposal in the brain. COMT inhibitors (e.g. tolcapone, entacapone) also have a protective effect. Indeed, the MAO-B biotransformation of DOPAL, an unstable metabolite of L-DOPA, is the main pathway for its disposal in the brain. COMT inhibitors (e.g. tolcapone, entacapone) also have a protective effect. Indeed, the MAO-B biotransformation of DOPAL, an unstable metabolite of L-DOPA, is the main pathway for its disposal in the brain.

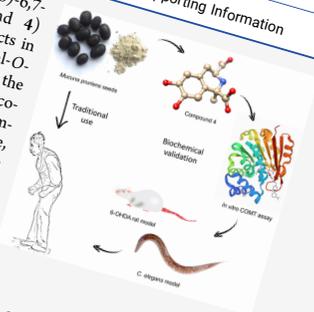
# Effects of a New Natural Catechol-O-methyl Transferase Inhibitor on Two In Vivo Models of Parkinson's Disease

Valeria Parrales-Macias, Abha Harfouche, Laurent Ferrié, Stéphane Haïk, Patrick P. Michel, Rita Raisman-Vozari, Bruno Figadère, Nicolas Bizat,\* and Alexandre Maciuk\*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00356>

ACCESS | Metrics & More

Read Online



administered doses of L-DOPA, extend its serum concentration, and decrease its side effects, leading to a longer and better clinical response. Potent and selective COMTIs bearing a nitrocatechol (1), entacapone (2), and opicapone (3) (Figure 2), are used in clinical practice in association with L-DOPA/AADC therapy. Tolcapone (1) is a nitrobenzene-1,2-diol subunit, i.e., tolcapone (1), entacapone (2), and opicapone (3) (Figure 2), are used in clinical practice in association with L-DOPA/AADC therapy. Tolcapone (1) is a nitrobenzene-1,2-diol subunit, i.e., tolcapone (1), entacapone (2), and opicapone (3) (Figure 2), are used in clinical practice in association with L-DOPA/AADC therapy.