

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS**

**UNIVERSITÉ DE TOURS**

**FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »**

Année 2020-2021

N°34

**THÈSE D'EXERCICE**

**pour le**

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

GAUTRON Clément

Né le 02/03/1994 à Chambray-lès-Tours

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 11 septembre 2020

**Nouveaux formats armés pour le traitement des cancers du  
sein HER2+**

JURY

Président :

Dr. Emilie ALLARD-VANNIER (Pharmacien, Faculté de Pharmacie de Tours)

Membres :

Dr. Nicolas JOUBERT (MCU, Faculté de Sciences de Tours)

Dr. Nicolas AUBREY (MCU, Faculté de Pharmacie de Tours)

Dr. Guillaume BRACHET (Pharmacien, CHRU de Tours)

Dr. Anthony LARUE (Pharmacien)



## **SERMENT DE GALIEN**

*En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

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

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

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

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

*Date : 11/09/2020*

*L'étudiant  
M. Clément Gautron*

*Le Doyen de la Faculté  
Mme Véronique Maupoil*

**ANNEE : 2020 - 2021**

**Directrice : Pr Véronique MAUPOIL**

**Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS**

**Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### ***17 PROFESSEURS***

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Véronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### ***2 PROFESSEURS EMERITES***

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES

### ***38 MAITRES DE CONFERENCES***

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRES REGLEMENTAIRES ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
OUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRES REGLEMENTAIRES ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

## ***1 DIRECTEUR DE RECHERCHE***

CHALON	Sylvie	INSERM
--------	--------	--------

## ***2 CHARGES DE RECHERCHE***

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRA
MOIRE	Nathalie	INRA

## ***1 PRAG***

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

## ***3 AHU***

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

## ***4ATER***

BILLET	Kevin	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DRIOUCH	Abderrazzak	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LAKHRIF	Zineb	FORMATIONS BIO3 INSTITUTE
VERGES	Valentin	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE

## Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier les Docteurs Emilie ALLARD-VANNIER, Nicolas AUBREY et Nicolas JOUBERT pour leur encadrement et leurs conseils avisés dans la réalisation de ces travaux.

Merci aux Professeurs Igor CHOURPA, Isabelle DIMIER-POISSON et Marie Claude VIAUD-MASSUARD pour m'avoir permis de réaliser ces travaux au sein de leur laboratoire.

Je dédie également ces remerciements à mes parents, pour leur amour et leur soutien indéfectible.

Merci à Christine et Dominique d'aimer et soutenir mes parents au quotidien.

A mon grand frère, Romain. Merci d'être là et de me soutenir, également pendant les moments difficiles.

A mes amis. Merci de faire partie de ma vie car pour moi, vous êtes ma deuxième famille.

J'ai également des pensées à mes orthophonistes. Elles méritent un grand merci car sans elles, je n'aurais pas pu surmonter mon bégaiement et je n'aurais pas pu accomplir tout le chemin que j'ai parcouru jusqu'à présent.

## Table des matières

Partie I : bibliographique .....	1
I- Le cancer du sein .....	2
A- Le cancer du sein dans le monde .....	2
B- Le cancer du sein en France .....	3
C- Les facteurs de risque du cancer du sein <sup>5</sup> .....	4
D- Physiopathologie du cancer du sein .....	8
E- Symptômes du cancer du sein .....	18
F- Diagnostic .....	19
G- Prise en charge thérapeutique .....	22
II- Prise en charge du cancer du sein HER2+ .....	32
A- Le récepteur HER2 .....	32
B- Thérapies ciblant HER2 .....	35
III- Anticorps armés ou Antibody-Drug Conjugate (ADC) .....	45
A- Structure d'un ADC .....	45
B- Historique des ADC (1ère, 2e, 3e génération) .....	47
C- Limites des ADC .....	52
IV- Fragments d'anticorps .....	58
A- Structure d'un fragment d'anticorps .....	58
B- Marché des fragments d'anticorps .....	60
C- Caractéristiques des fragments d'anticorps .....	62
Partie II : expérimentale : Conception de nouveaux formats armés anti-HER2 pour le traitement des cancers du sein HER2+ .....	65
A- Présentation du projet .....	66
B- Matériel et méthodes .....	70
1) Explication des codes des différents fragments d'anticorps produits .....	70
2) Construction moléculaire des différents fragments d'anticorps .....	70
3) Production des différents fragments d'anticorps en cellules CHO .....	71
4) Purification des fragments d'anticorps .....	72
5) Electrophorèse de type SDS-page .....	72
6) Lignées cellulaires : cellules SK-BR-3 (HER2+) et cellules MDA-MB-231 (HER2-) .....	72
7) Analyse de la reconnaissance à l'Ag HER2 par méthode ELISA indirect (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) .....	73
8) Essais de cytotoxicité sur cellules SK-BR-3 et MDA-MB-231 .....	73

C- Résultats .....	75
1) Modification du système d'expression : caractérisation du fragment scFv H13B2 .....	75
2) Caractérisation des fragments scFv DAR 2 (H22B2, H23B2, H24B2, H25B2) .....	79
3) Caractérisation des fragments DAR 4 : diabody (H40B2), scFv en tandem (H41B2), Fab-scFv (H42B2) et scFv-Fc (H43B2) et de l'anticorps entier DAR 4 (H109B2).....	85
4) Caractérisation du scFv en tandem H41C2 DAR 4.....	91
D- Discussion .....	93

## Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Représentation géographique de l'incidence du cancer du sein en 2018 .....	2
<u>Figure 2</u> : Représentation géographique de la mortalité du cancer du sein en 2018.....	3
<u>Figure 3</u> : Evolution de l'incidence (vert) et de la mortalité (rouge) par cancer du sein en France de 1980 à 2012.....	4
<u>Figure 4</u> : Anatomie du sein.....	9
<u>Figure 5</u> : Localisation des ganglions lymphatiques du sein.....	10
<u>Figure 6</u> : Courbes de survie sans rechute (A) et de survie globale (B) des différents sous-types moléculaires de cancer du sein : luminal A (bleu foncé), luminal B (bleu clair), basal-like (rose), HER2 positif (rouge), claudin-low (jaune).....	15
<u>Figure 7</u> : Distribution de l'expression des récepteurs aux oestrogènes (RE) et de HER2 selon les sous-types moléculaires de tumeur mammaire.....	16
<u>Figure 8</u> : Mécanismes d'action des différentes thérapies ciblées : (i) ciblage du ligand (AcMo), (ii) liaison au domaine extracellulaire du récepteur (AcMo et ADC), et (iii) liaison au domaine intracellulaire du récepteur (ITK).....	31
<u>Figure 9</u> : Structure des récepteurs à l'EGF (ErbB ou HER).....	32
<u>Figure 10</u> : Voies de signalisation intracellulaire induites par les récepteurs ErbB.....	33
<u>Figure 11</u> : Représentation schématique des récepteurs de la famille des ErbB, conformation active (ouverte) constitutive de HER2 et formation d'hétérodimères avec HER2 et un autre récepteur de la famille des ErbB.....	34
<u>Figure 12</u> : Formation du fragment p95HER2 par perte du domaine extracellulaire de la protéine HER2.....	35
<u>Figure 13</u> : Mécanismes d'action du trastuzumab : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), inhibition de l'induction des voies de signalisation intracellulaire pro-prolifératives, inhibition du clivage protéolytique du domaine extracellulaire de HER2, inhibition de l'angiogénèse, inhibition des mécanismes de réparation d'ADN endommagé par la chimiothérapie.....	37
<u>Figure 14</u> : Mécanisme d'action du lapatinib : Inhibition de l'autophosphorylation du domaine intracellulaire des récepteurs HER2 et EGFR induisant ainsi un blocage des voies de signalisation intracellulaire PI3K/AKT/mTOR et Ras/MAPK.....	40
<u>Figure 15</u> : Mécanismes d'action du T-DM1.....	43
<u>Figure 16</u> : Représentation schématique d'un ADC : la drogue (en rouge) est reliée à un linker (en vert), lui-même relié à une tête de bioconjugaison (en bleu) permettant le greffage sur l'anticorps thérapeutique.....	45
<u>Figure 17</u> : Linker clivable : les enzymes lysosomales clivent au niveau du linker permettant la libération de l'agent cytotoxique.....	46



<u>Figure 18</u> : Linker non clivable : la dégradation complète de l'anticorps est nécessaire afin de libérer le métabolite actif.....	47
<u>Figure 19</u> : Les différentes générations d'ADC.....	47
<u>Figure 20</u> : La co-administration de trastuzumab (B et C) avec le T-DM1 (fluorescence verte) améliore la pénétration tumorale du T-DM1 et rend sa distribution intra-tumorale plus homogène.....	53
<u>Figure 21</u> : L'amélioration de la pénétration tumorale du T-DM1 par co-administration de trastuzumab (3 :1 et 8 :1) permet une diminution de la croissance tumorale (A) et une augmentation de la survie in vivo chez la souris (B), indépendamment de la dose.....	53
<u>Figure 22</u> : Représentation schématique de différents formats d'anticorps.....	58
<u>Figure 23</u> : Demi-vie, pénétration tumorale et rétention tumorale des anticorps monoclonaux en fonction de leur taille et de leur valence.....	63
<u>Figure 24</u> : Représentation schématique d'un ADC : la drogue (en rouge) est reliée à un linker (en vert), lui-même relié à une molécule de maléimide de deuxième génération (en bleu) permettant le greffage sur deux cystéines au niveau des ponts disulfures de l'anticorps.....	66
<u>Figure 25</u> : Représentation schématique des différents formats d'anticorps (* représente un site de bioconjugaison).....	68
<u>Figure 26</u> : Représentation schématique du motif « CGC » introduit au niveau du lien peptidique et permettant le greffage de la drogue (en rouge) sur le fragment par l'intermédiaire d'un groupement maléimide de deuxième génération (en bleu).....	69
<u>Figure 27</u> : Explication du code des fragments d'anticorps produits en prenant pour exemple le fragment scFv DAR 1 H13B2 (A) avec sa représentation schématique (B).....	70
<u>Figure 28</u> : Caractérisation du fragment scFv H13B2 : Purification, Rendement de production, Interaction avec HER2.....	77
<u>Figure 29</u> : Caractérisation des fragments H13B2 non conjugué et H13B2 conjugué à la MMAE.....	78
<u>Figure 30</u> : Caractérisation des fragments scFv DAR 2 (H22B2, H23B2, H24B2, H25B2) : Purification, Rendement de production, Masse.....	80
<u>Figure 31</u> : Caractérisation des fragments scFv H22B2 et SDC DAR 2 (H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF) : fonctionnalité.....	84
<u>Figure 32</u> : Purification et rendement de production des fragments DAR 4 (H40B2, H41B2, H42B2, H43B2) et de l'anticorps entier (H109B2) (* représente un site de bioconjugaison).....	86
<u>Figure 33</u> : Représentation schématique des fragments H40B2 et H40B2-MMAF.....	88
<u>Figure 34</u> : Caractérisation du fragment H40B2-MMAF : fonctionnalité.....	90
<u>Figure 35</u> : Purification et rendement de production du fragment du H41C2.....	91

## Liste des tableaux

<u>Tableau I</u> : Critères du grade histopronostic SBR.....	12
<u>Tableau II</u> : Tableau descriptif de la classification TNM.....	13
<u>Tableau III</u> : Description des stades du cancer définis selon les critères de la classification TNM.....	14
<u>Tableau IV</u> : Caractéristiques des sous-types moléculaires de cancer du sein.....	15
<u>Tableau V</u> : Propriétés des agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein.....	28
<u>Tableau VI</u> : Liste des protocoles de traitements du cancer du sein HER2+ précoce et métastatique.....	44
<u>Tableau VII</u> : Liste des ADC de 1 <sup>ère</sup> génération sur le marché.....	49
<u>Tableau VIII</u> : Liste des ADC de 2 <sup>e</sup> génération sur le marché.....	50
<u>Tableau IX</u> : Fragments d'anticorps sur le marché en 2018.....	62
<u>Tableau X</u> : Bioconjugaison des fragments scFv DAR 2 (H22B2, H24B2 et H25B2) avec la MMAE (linker clivable) et la MMAF (linker non clivable).....	82
<u>Tableau XI</u> : Mesure de la masse (spectrométrie de masse) des fragments H40B2, H41B2, H42B2, H43B2 et de l'anticorps entier H109B2 (* représente un site de bioconjugaison).....	87
<u>Tableau XII</u> : Bioconjugaison du fragment diabody (H40B2) à la MMAF (linker non clivable) : 100 % des fragments diabody (H40B2) sont bioconjugués à la MMAF.....	88
<u>Tableau XIII</u> : Mesure de la masse en Da du fragment H41C2 par spectrométrie de masse.....	92

## Liste des abréviations

Ac : Anticorps  
ACR : American College of Radiology (Institut Américain de Radiologie)  
ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase  
ADC : Antibody-Drug Conjugate (Anticorps armé)  
Ag : Antigène  
AJCC : American Joint Committee on Cancer (Symposium Américain sur le Cancer)  
ALT : Alanine transaminase  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
AST : Aspartate transaminase  
BBS : Borate-Buffered Saline (Tampon borate)  
CCIS : Carcinome canalaire *in situ*  
CFDA : China Food and Drug Administration (Agence Chinoise du Médicament)  
CH1/CH2/CH3 : Domaines constants de la chaîne lourde 1/2/3  
CKAP5 : Cytoskeleton-associated protein 5  
CL : Domaine constant de la chaîne légère  
CLIS : Carcinome lobulaire *in situ*  
DAR : Drug-to-Antibody-Ratio (Ratio Drogue sur Anticorps)  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMT : Dose Maximale Tolérée  
EGF : Epidermal Growth Factor (Facteur de croissance tissulaire)  
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)  
EMA : European Medicines Agency (Agence Européenne du Médicament)  
ER : Estrogen Receptor (Récepteurs aux œstrogènes).  
Fab : Fragment Antigen Binding (Fragment de liaison à l'antigène)  
Fc : Fragment cristallisable  
FDA : Food and Drug Administration (Agence Américaine du Médicament)  
FDC : Fragment-Drug Conjugate (Fragment armé)  
FSH : Hormone folliculo-stimulante  
Gy : Gray  
HAS : Haute Autorité de Santé  
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (Récepteur du facteur de croissance tissulaire humain-2)  
IHC : Immunohistochimie  
IgG : Immunoglobuline G  
INCa : Institut National du Cancer  
IV : Intraveineux  
LH : Hormone lutéinisante  
LH-RH : Hormone de libération de la lutéinostimuline  
MMAE/MMAF : Monométhyl Auristatine E / Monométhyl Auristatine F  
MMP : Matrix Metalloproteinase  
MR : Récepteur aux mannoses  
PBS : Phosphate-Buffered Saline (Tampon phosphate)

PGR : Récepteurs à la progestérone  
PPS : Programme Personnalisée de Soins  
RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit  
RTK : Récepteur à tyrosine kinase  
SBR : Scarff Bloom et Richardson  
scFv: single chain Fragment variable  
SDC : scFv-Drug Conjugate (scFv armé)  
SVF : Sérum de Veau Fœtal  
TNM : Tumor, Nodes, Metastasis (Tumeur, Ganglions, Métastases)  
UICC : Union Internationale Contre le Cancer  
VH : Domaine variable de la chaîne lourde  
VL : Domaine variable de la chaîne légère

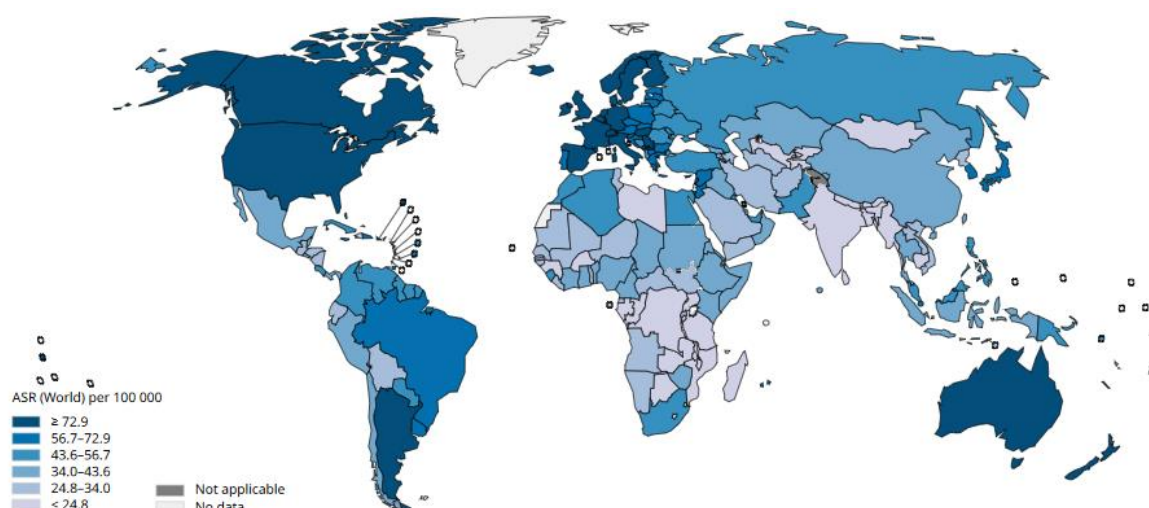
## **Partie I : bibliographique**

## I- Le cancer du sein

### A- Le cancer du sein dans le monde

Le cancer du sein est le deuxième cancer le plus fréquent dans le monde, après le cancer du poumon. Il est également le cancer féminin le plus fréquent en impactant 2,1 millions de nouveaux cas en 2018<sup>1</sup>.

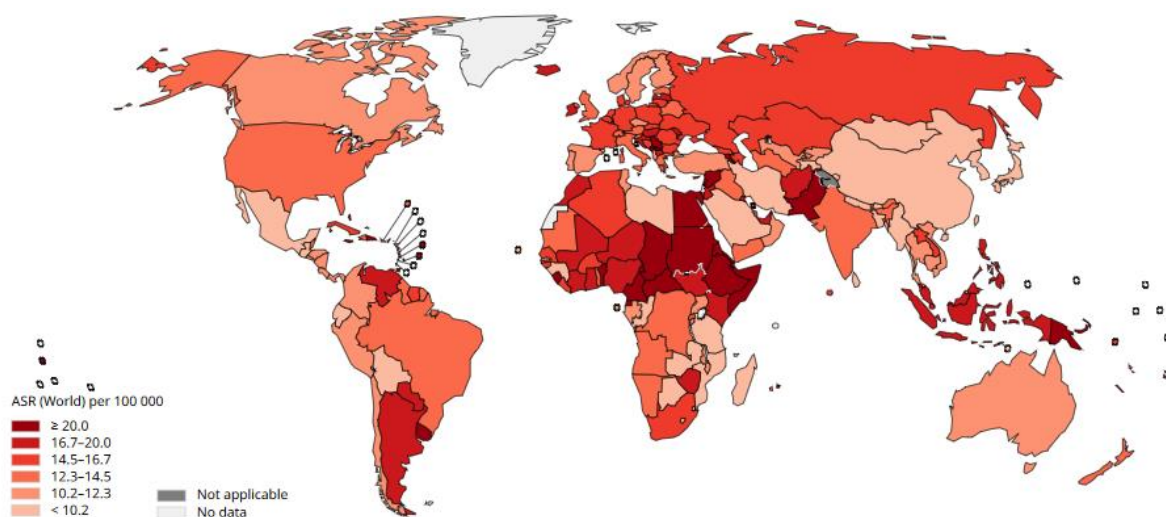
Les taux d'incidence varient en fonction des régions du globe avec un fort taux d'incidence dans les pays développés (jusqu'à 94,2 nouveaux cas pour 100 000 femmes en Australie et en Nouvelle-Zélande), et un faible taux d'incidence dans les pays en voie de développement (jusqu'à 27,9 nouveaux cas pour 100 000 femmes en Afrique centrale)<sup>2</sup> (figure 1).



*Figure 1 : Représentation géographique de l'incidence du cancer du sein en 2018 (extrait de l'IARC-OMS)*

Le cancer du sein est également la cinquième cause de décès par cancer tous sexes confondus avec 627 000 décès en 2018, soit 15% des décès par cancer parmi les femmes<sup>1</sup> et 6,6% des décès par cancer tous sexes confondus<sup>2</sup>.

Les taux de mortalité ne présentent pas le même profil que les taux d'incidence dans le monde se caractérisant notamment par un faible taux de mortalité en Asie de l'Est (8,6 décès pour 100 000 femmes) et de taux de mortalité élevés en Asie du Sud-Est (25,5 décès pour 100 000 femmes en Mélanésie) et en Afrique (18,4 décès pour 100 000 habitants)<sup>2</sup> (figure 2).



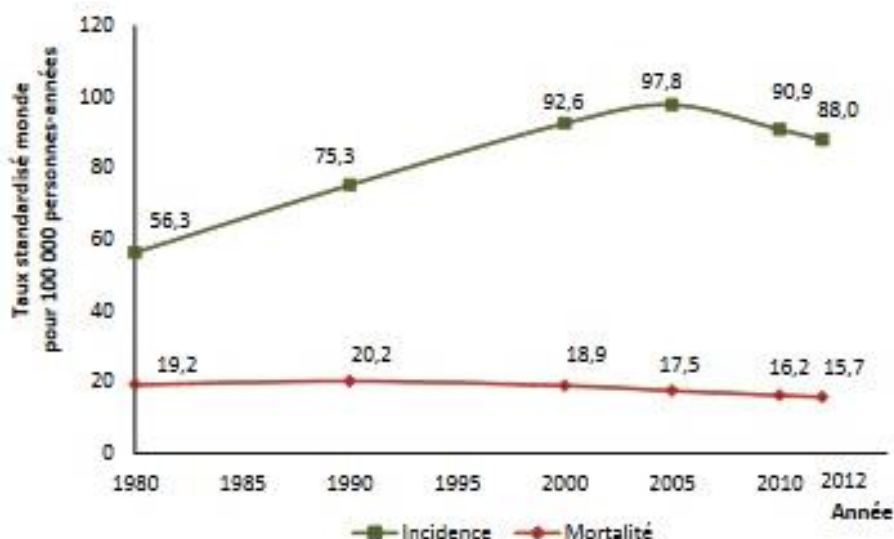
**Figure 2 :** Représentation géographique de la mortalité du cancer du sein en 2018 (extrait de l'IARC-OMS)

## B- Le cancer du sein en France

Le cancer du sein, le plus répandu des cancers féminins, a recensé en France environ 59 000 nouveaux cas (âge moyen de diagnostic à 62 ans) et 11 900 décès en 2017 (âge moyen de décès à 73 ans)<sup>3</sup>. Il est au premier rang des cancers en termes de fréquence en représentant 33,5% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer, et reste la première cause de mortalité chez la femme représentant 18,2% des décès féminins par cancer et près de 8% des décès par cancer, tous sexes confondus<sup>3</sup>. Près d'une femme sur neuf sera confrontée au cancer du sein au cours de sa vie. Grâce à de grands progrès dans le dépistage et dans la prise en charge médicale de la maladie, 3 cancers du sein sur 4 sont guéris à ce jour<sup>4</sup>. La maladie est caractérisée par une survie à 5 ans de 87% et une survie à 10 ans de 76%<sup>3</sup>.

Le taux d'incidence n'a cessé d'augmenter de 1980 à 2005, notamment grâce au dépistage organisé chez les femmes de plus de 50 ans, et a légèrement baissé à partir de 2005 jusqu'à se stabiliser aux alentours de 90 nouveaux cas pour 100 000 femmes (figure 3).

La mortalité par cancer du sein, dont le pic a été atteint en 1990 avec 20,2 décès pour 100 000 femmes, ne cesse de diminuer régulièrement jusqu'à atteindre 15,7 décès pour 100 000 femmes en 2012 et ce, malgré une incidence en hausse (figure 3). Ces profils d'incidence et de mortalité par cancer du sein s'expliquent par un meilleur diagnostic, grâce au dépistage, et une meilleure prise en charge de la maladie<sup>4</sup>.



*Figure 3 : Evolution de l'incidence (vert) et de la mortalité (rouge) par cancer du sein en France de 1980 à 2012 (extrait de l'INCa, 2013)*

### C- Les facteurs de risque du cancer du sein<sup>5</sup>

Il existe des facteurs de risque internes, constitutifs de l'individu (âge, sexe, antécédents familiaux et personnels, prédisposition génétique) et des facteurs de risque externes liés à l'environnement et au mode de vie des individus. Il est possible d'agir sur les facteurs externes afin de diminuer le risque de cancer de sein mais les facteurs internes échappent généralement à notre contrôle.

#### 1) Facteurs de risque internes

##### a) Sexe

Bien que 0,5 à 1% des cancers du sein touchent les hommes<sup>4</sup>, le cancer du sein, cancer hormono-dépendant, demeure un cancer principalement féminin, notamment à cause de la présence des hormones ovariennes féminines, les œstrogènes et la progestérone<sup>6</sup>.

##### b) Age

L'âge est le facteur de risque le plus important vis-à-vis du cancer du sein<sup>7</sup>. En effet, le risque de cancer de sein est faible chez les jeunes femmes (moins de 35 ans). Environ 10% des cancers du sein touchent les femmes de moins de 35 ans et 20% avant 50 ans. En revanche, près de 50% des cancers du sein sont diagnostiqués entre 50 et 69 ans et 28% après 69 ans (environ trois quarts des cancers du sein diagnostiqués après 50 ans)<sup>8</sup>. Ce sont pour ces raisons que le dépistage est organisé tous les 2 ans chez les femmes de 50 à 74 ans



(mammographie)<sup>8</sup> afin de permettre un diagnostic et une prise en charge précoce de la maladie.

#### c) Antécédents personnels

##### Antécédents de cancer du sein

Les femmes ayant déjà eu un cancer du sein sont plus à risque d'en développer un autre (risque 3 à 4 fois plus élevé qu'une femme du même âge sans antécédent de cancer du sein)<sup>9</sup>. Ce risque varie également selon la nature du cancer du sein. En effet, le risque de développer un cancer du sein infiltrant est 8 à 10 fois plus important chez les femmes ayant eu un cancer du sein canalaire *in situ* ou un cancer lobulaire *in situ*<sup>9</sup>.

##### Antécédents d'affections bénignes du sein

Les affections bénignes du sein sont histologiquement classés en deux groupes : les lésions non prolifératives et les lésions prolifératives ou hyperplasies<sup>5</sup>. Ce sont principalement les hyperplasies, lésions bénignes mammaires associées à une prolifération du tissu mammaire, qui augmentent le risque de cancer du sein<sup>9</sup>. Ces hyperplasies sont caractérisées par leur nature atypique (cellules présentant un aspect anormales) ou non atypique<sup>9</sup>. Le risque de cancer du sein est multiplié par deux chez les femmes ayant présentées des hyperplasies sans atypie et par quatre chez celles ayant présentées des hyperplasies avec atypie<sup>5,6</sup>.

#### d) Antécédents familiaux

Parmi les femmes atteintes du cancer du sein, 20 à 30% ont des antécédents familiaux de cancers dont des cancers du sein<sup>10</sup>. En effet, il a été montré que lorsqu'une parente au premier degré (mère, sœur, fille) a déjà été atteinte d'un cancer du sein, plus particulièrement à un âge jeune avant la ménopause, le risque de cancer du sein est deux fois plus élevé<sup>11</sup>. Ce risque augmente également lorsqu'une parente au second degré (grand-mère, tante, nièce) a déjà été atteinte de ce cancer<sup>10,11</sup>.

#### e) Facteurs hormonaux endogènes

Deux principaux facteurs hormonaux endogènes agissent sur le risque de cancer du sein : l'âge précoce des premières menstruations et la ménopause tardive. Tout d'abord, un âge précoce des premières menstruations augmente le risque de cancer du sein. En effet, il a été montré que plus l'âge des premières menstruations est élevé, moins fort est le risque de cancer de sein<sup>12</sup>. Une femme ayant eu ses premières menstruations à 15 ans présente un risque de

cancer du sein diminué de 30% par rapport à une femme ayant eu ses premières menstruations à 12 ans<sup>13</sup>. Une ménopause tardive augmente également le risque de cancer du sein, risque augmentant d'environ 3% pour chaque année supplémentaire à partir de l'âge présumé de la ménopause<sup>5,14</sup>. Le mécanisme mis en cause dans l'augmentation du risque de cancer du sein pour ces deux facteurs semble être l'exposition prolongée aux hormones ovariennes (œstrogènes et progestérone)<sup>5</sup>.

#### f) Prédisposition génétique

Environ 5 à 10% des cancers du sein seraient liés à une prédisposition génétique<sup>15</sup> (formes héréditaires) dont la plus fréquente est la mutation des gènes BRCA1 (BReast CAncer 1) et BRCA2 (BReast CAncer 2). Les Gènes BRCA1 et BRCA2 codent pour des protéines suppressives de tumeur ayant un rôle dans la réparation d'ADN endommagé. La mutation de ces gènes entraîne l'altération de la fonction de ces protéines ne pouvant plus, en conséquence, assurer leur fonction réparatrice d'ADN ce qui favorise l'apparition de cancer<sup>16</sup>. Il est estimé que 72% des femmes portant la mutation du gène BRCA1 et 69% des femmes portant la mutation du gène BRCA2 auront développé un cancer du sein à 80 ans<sup>17</sup> contre 12% des femmes dans la population générale<sup>16</sup>. Ces mutations ont également une influence sur le risque d'apparition d'autres cancers comme le cancer de l'ovaire notamment<sup>18</sup>.

#### g) Densité mammographique

Une forte densité des tissus mammaires en mammographie augmente le risque de cancer du sein. En effet, les femmes présentant une forte densité des tissus mammaires en mammographie présente un risque de cancer du sein quatre à six fois plus élevé<sup>19</sup>.

### **2) *Facteurs de risque externes : environnement et mode de vie***

#### a) Facteurs hormonaux exogènes

Deux principaux facteurs hormonaux exogènes agissent sur le risque de cancer du sein : l'utilisation de contraceptifs oraux ou de traitement hormonal substitutif. La prise de contraceptifs oraux augmente de 25% le risque de cancer du sein<sup>20</sup>. En revanche, cette augmentation du risque est temporaire puisqu'après 10 ans suivant l'arrêt de l'utilisation de contraceptifs oraux, cette augmentation du risque n'est plus significative et le risque de cancer du sein chez ces femmes redevient équivalent à celui des femmes n'ayant jamais pris de contraceptifs oraux. Ce sont les femmes jeunes, en âge de procréer, qui utilisent les contraceptifs oraux, moment où le risque de cancer du sein est très faible chez la femme.

Cette utilisation de ces traitements n'a donc qu'un impact relatif sur le risque de cancer du sein. Cet impact devient plus important en cas d'utilisation tardive (aux alentours de 50 ans) de ces médicaments<sup>5,20</sup>. Les traitements hormonaux substitutifs, utilisés lors de la ménopause pour pallier à la baisse du niveau des hormones ovariennes (œstrogènes et progestérone) chez la femme, augmente le risque de cancer du sein de 3% par année d'utilisation<sup>14</sup>, risque équivalent à celui causé par la ménopause tardive (*partie C-1)e Facteurs endogènes*), jusqu'à atteindre un risque augmenté de 26 à 35% après 5 ans d'utilisation de ces traitements<sup>14,21</sup>. Cet effet dépend également du type de traitement utilisé, le risque de cancer du sein étant plus grand en utilisant une association œstrogènes-progestérone par rapport à l'utilisation d'œstrogènes substitutifs seuls<sup>21</sup>. Tout comme l'utilisation de contraceptifs oraux, l'utilisation de traitements substitutifs hormonaux a un effet temporaire sur le risque de cancer du sein, effet qui diminue jusqu'à disparaître après arrêt de l'utilisation de ces médicaments<sup>14</sup>.

#### b) Facteurs liés au mode de vie

##### Obésité

Le tissu adipeux constitue un site de stockage des hormones stéroïdiennes sexuelles et est riche en aromatasase, enzyme transformant les androgènes en œstrogènes. L'accumulation de tissu adipeux en cas de surpoids ou d'obésité augmente par conséquent le taux d'œstrogènes circulant favorisant ainsi le développement d'un cancer du sein. Il existe un lien entre l'indice de masse corporelle ( $IMC = \text{poids (kg)} / \text{taille}^2 \text{ (m}^2\text{)}$ ) et l'incidence du cancer du sein chez les femmes ménopausées (WCRF/AICR, 2018). Pour une augmentation de l'IMC de 5 kg/m<sup>2</sup>, le risque de cancer du sein après ménopause augmente entre 8 et 14%<sup>22</sup>. Une étude de cohorte regroupant plus d'un million de femmes montre que le risque de cancer du sein chez la femme ménopausée augmente proportionnellement à l'IMC avec une incidence augmentée de 10, 21 et 29 % chez les femmes ayant un IMC de 25 à 27,4 kg/m<sup>2</sup>, de 27,5 à 29,9 kg/m<sup>2</sup> et supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> respectivement<sup>23</sup>. L'augmentation de l'IMC chez la femme ménopausée augmente également la mortalité par cancer du sein avec un risque relatif augmenté de 22 à 26 % chez les femmes en surpoids (IMC compris entre 25 et 29,9 kg/m<sup>2</sup>) et de 49 % chez les femmes obèses (IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup>)<sup>23</sup>. Curieusement, on observe une relation inverse entre l'IMC et l'incidence de cancer du sein chez les femmes avant la ménopause avec une diminution du risque relatif de 14% pour une augmentation de l'IMC de 10 points<sup>23</sup>. En revanche, le mécanisme de cette association inverse entre l'IMC et le risque de cancer du sein chez la femme avant la ménopause reste mal connu.

### Activité physique

L'activité physique modérée (30 à 60 minutes au moins quatre fois par semaine<sup>5</sup>) est associée à une diminution du risque de cancer du sein<sup>6,24</sup>. Cet effet est plus important chez la femme ménopausée avec une diminution du risque de 30% environ<sup>24</sup>. La régularité de la pratique d'une activité physique est également importante puisqu'une femme ayant pratiqué une activité physique tout le long de sa vie présente un risque de cancer du sein diminué de 42% par rapport à une femme n'ayant jamais pratiqué d'activité physique<sup>24</sup>.

### Tabagisme

L'effet du tabac sur le risque de cancer du sein reste mal établi<sup>5</sup>. En effet, l'effet du fumage passif diffère de celui du fumage actif sur le risque de cancer du sein<sup>25,26</sup>. Le fumage passif augmente le risque de cancer du sein de 86% en moyenne. Cependant, il se présente une grande variabilité d'effet sur le risque de cancer du sein selon les individus, risque allant de 17% à 200% par rapport aux non-fumeurs non exposés. La même observation a été faite en ce qui concerne le fumage actif (plus de 20 paquets de cigarettes par an). En effet, le fumage actif augmente le risque de cancer du sein de 34% en moyenne mais présente aussi une grande variabilité d'effet selon les individus (augmentation du risque de cancer du sein jusqu'à 93%)<sup>25</sup>.

### Alcool

La consommation d'alcool augmente le risque de cancer du sein avec une augmentation de 7% chez les femmes consommant 10g d'alcool (une unité d'alcool ou un verre de vin) par jour par rapport aux femmes ne consommant pas d'alcool<sup>27</sup>. Le risque augmente avec la quantité d'alcool consommé par jour puisque le risque de cancer du sein s'élève de 32% à 46% pour une consommation journalière supérieure à 45g d'alcool<sup>27</sup>. La consommation d'alcool augmente également la létalité du cancer du sein puisqu'une femme ménopausée consommant au moins un verre de boisson alcoolique quotidiennement présente une mortalité augmentée de 30% par rapport à une femme ne consommant pas d'alcool<sup>28</sup>.

## **D- Physiopathologie du cancer du sein**

### **1) Anatomie et physiologie du sein**

La fonction biologique du sein est de produire du lait afin de nourrir un nouveau-né. Chaque sein est composé d'une glande mammaire contenant 15 à 20 lobes séparés par du tissu adipeux et du tissu de soutien contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des fibres de

soutien et de la graisse<sup>29</sup>. Le tout est soutenu par le muscle pectoral. Les lobes de la glande mammaire sont eux-mêmes composés de lobules dont la fonction est de sécréter du lait en période d'allaitement. Les lobes et les lobules sont reliés entre eux par les canaux galactophores qui permettent d'acheminer le lait jusqu'au mamelon, situé au centre d'une zone pigmentée, l'aréole (*figure 4*).

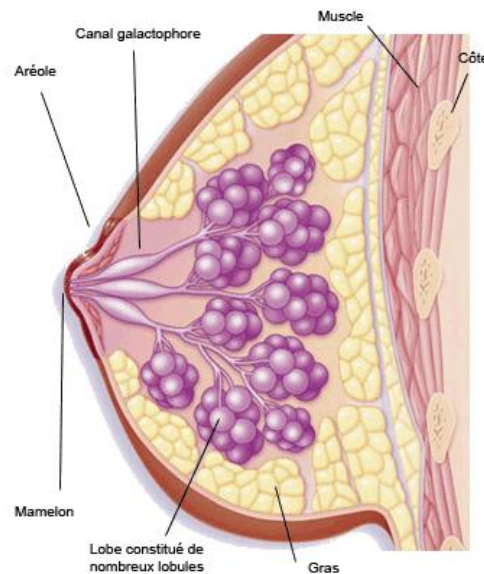


Figure 4 : Anatomie du sein (extrait de la Ligue contre le cancer)

Le sein est composé d'un réseau de vaisseaux et de ganglions lymphatiques (organes lymphoïdes secondaires riches en cellules immunitaires) afin de combattre les infections. Les ganglions lymphatiques du sein sont situés au niveau de l'aisselle (ganglions lymphatiques axillaires), au-dessus de la clavicule (ganglions sus-claviculaires), sous la clavicule (ganglions sous-claviculaires ou infra-claviculaires) et à l'intérieur du thorax au niveau du sternum (ganglions mammaires internes) (*figure 5*).

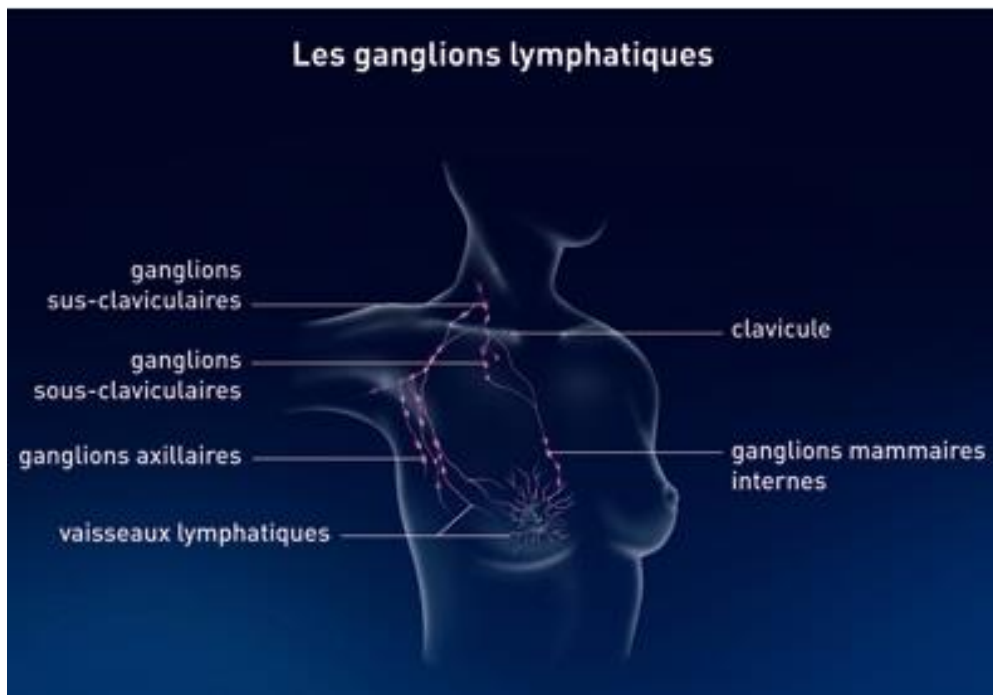


Figure 5 : Localisation des ganglions lymphatiques du sein (extrait de l'INCa)

Le développement mammaire se réalise sous l'influence des hormones sexuelles ovariennes (les œstrogènes et la progestérone), hormones également impliquées dans la grossesse et la lactation. Les cellules mammaires possèdent deux grands types de récepteurs hormonaux : les récepteurs aux œstrogènes et les récepteurs à la progestérone. Les œstrogènes permettent le développement des seins au cours de la puberté mais ont aussi un rôle important au cours de la grossesse (assouplissement des tissus mammaires, augmentation du volume sanguin nécessaire à l'alimentation du bébé). Quant à la progestérone, elle joue un rôle dans la différenciation des cellules mammaires en préparant les seins à la lactation pendant la grossesse et sur le cycle menstruel (en collaboration avec les œstrogènes)<sup>29</sup>.

## ***2) Classification des différents types de cancer du sein***

### ***a) Classification anatomo-histologique***

Les cancers du sein sont des adénocarcinomes se développant essentiellement au niveau des lobes et des canaux galactophores. Ils se classent en deux grandes catégories : les cancers du sein non invasifs ou *in situ* et les cancers du sein invasifs ou infiltrants.

### Cancers du sein non invasifs ou *in situ*

Les cancers du sein *in situ* représentent 25% des cas de cancer du sein<sup>30</sup>. On distingue les cancers canauxiaux *in situ*, touchant les canaux galactophores et représentant la majorité des cancers du sein *in situ* (80 à 90% des cancers *in situ*) et les cancers lobulaires *in situ*, touchant les lobules. Le cancer lobulaire *in situ* est un cas de cancer du sein rare (10 à 15% des cancers du sein *in situ*) qui est considéré comme un facteur de risque et non comme un précurseur direct de cancer du sein. Sa prise en charge est donc différente des autres cancers du sein<sup>30</sup>. Les cancers du sein *in situ* restent uniquement à l'intérieur des canaux galactophores ou des lobules sans franchir la membrane basale les entourant et par conséquent, sans infiltrer les tissus voisins.

### Cancers du sein invasifs ou infiltrants

Les cancers du sein infiltrants représentent 75% des cas de cancer du sein<sup>30</sup>. Ils sont caractérisés par l'invasion par la tumeur des tissus entourant les lobules et les canaux galactophores. Ils sont principalement canauxiaux (75% des cancers du sein infiltrants) et plus rarement lobulaires (10% des cancers du sein infiltrants). Il existe également des formes plus rares comme le carcinome médullaire (1%), le carcinome tubuleux (2%), le carcinome papillaire (1 à 2%) ou le cancer du sein inflammatoire (1 à 4%). Les cancers du sein infiltrants doivent être traités rapidement car en cas de prise en charge trop tardive, la tumeur peut se propager en empruntant les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour engendrer des métastases. Le pronostic et la prise en charge de ces cancers infiltrants diffèrent suivant le type de cancer, le stade d'évolution de la tumeur et de l'état physique et psychologique de la patiente<sup>30</sup>.

### Grade histopronostic de Scarff Bloom et Richardson (SBR)

L'évaluation du grade SBR est effectuée lors de l'examen anatomopathologique d'un échantillon de tumeur. Il est composé de trois critères reposant sur (i) l'architecture cellulaire, (ii) la forme cytonucléaire des cellules cancéreuses (forme du noyau) et (iii) l'activité mitotique des cellules cancéreuses. A chaque critère est attribué un score et la somme des critères détermine le grade histopronostic SBR qui transcrit l'agressivité de la tumeur (*tableau I*).

*Tableau I: Critères du grade histopronostic SBR*

Score	Architecture cellulaire	Forme cytonucléaire	Nombre de mitoses (activité mitotique)
	Evaluation de la proportion de structures tubulo-glandulaires bien différenciés dans la tumeur. Plus une cellule cancéreuse est différenciée, moins elle est agressive.	Evaluation de la taille et de la forme du noyau des cellules cancéreuses.	Recherche du nombre de mitoses par champ . A compter sur 10 champs au grossissement x400 en périphérie de tumeur. Le nombre de mitose le plus important par champ (n) est retenu.
1	75 % de la tumeur Structure cellulaire tubulo-glandulaire et différenciée	Noyaux de petites tailles, réguliers et monomorphes	$n \leq 1$
2	10 à 75 % de la tumeur Structure cellulaire partiellement tubulo-glandulaire et partiellement différenciée	Atypies (pléomorphisme) modérées	$n = 2$
3	< 10 % de la tumeur Structure cellulaire non différenciée et non tubulo-glandulaire	Noyaux irréguliers de taille et de forme avec nucléoles proéminents (pléomorphisme important).	$n \geq 3$

Les scores obtenus sont additionnés afin d'obtenir le grade SBR. Le grade I, caractérisant les tumeurs les moins agressives, correspond aux scores 3 à 5, le grade II correspond aux scores 6 et 7 et le grade III, caractérisant les tumeurs les plus agressives, correspond aux scores 8 et 9.

b) Classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis)

A l'aide des examens de diagnostic, le stade du cancer, c'est-à-dire l'étendue de la tumeur, est évalué selon la classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) composé de trois critères (T, N et M) associés à des chiffres selon la gravité de chaque critère (de 0 à 4 pour T, de 0 à 3 pour N et 0 ou 1 pour M) (*tableau II*) :

- **La taille et l'infiltration de la tumeur (T).** Ce critère donne une indication sur le degré d'évolution de la maladie.
- **L'atteinte ou non des ganglions lymphatiques (N).** Ce critère évalue le nombre et la localisation des ganglions lymphatiques envahis par la tumeur. Les ganglions axillaires sont généralement les premiers touchés. Ce critère donne une indication sur le degré de propagation de la tumeur.
- **La présence ou non de métastases (M).** Les organes les plus touchés par les métastases d'une tumeur du sein sont les os, le foie et les poumons.



**Tableau II :**      *Tableau descriptif de la classification TNM*

Taille de la tumeur	Description
Tx	Tumeur primitive non évaluable
T0	Tumeur primitive non palpable
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
T1	Tumeur ≤ 2 cm
T2	2 cm < Tumeur ≤ 5 cm
T3	Tumeur > 5 cm
T4	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau
Atteinte ganglionnaire	Description
Nx	Évaluation impossible de l'atteinte ganglionnaire
N0	Absence d'envahissement ganglionnaire
N1	Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires
N2	Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires, ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire.
N3	Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires, ou envahissement des ganglions sous-claviculaires, ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux avec envahissement ganglionnaire axillaire, ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux.
Métastases	Description
Mx	Détermination impossible de l'extension métastatique
M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

L'évaluation de ces critères repose tout d'abord sur un examen clinique. Cet examen clinique est effectué avant tout traitement : on parle de classification cTNM dans ce cas (c pour clinique). Un deuxième examen (examen anatomopathologique) est effectué après chirurgie et prélèvement de la tumeur (exérèse) et des ganglions afin d'obtenir des informations plus précises et de confirmer ou non les caractéristiques observées lors de l'examen clinique avant traitement : on parle de classification pTNM dans ce cas (p pour post-chirurgical). La combinaison de ces trois critères permettent de définir le stade de la maladie selon la classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). Ces stades sont exprimés selon un chiffre allant de 0 à IV et sont décrits dans le *tableau III*. Ils définissent la prise en charge thérapeutique de la tumeur.

**Tableau III :** Description des stades du cancer définis selon les critères de la classification TNM

Stade de la tumeur	Critères	Description
0	• Tis + N0 + M0	Cancer <i>in situ</i> confiné aux canaux ou aux lobules
I	• T1 + N0 + M0	Tumeur unique et locale de petite taille ( $T \leq 2$ cm) sans ganglions envahis Absence de métastases.
IIa	• T0 + N1 + M0	Tumeur non palpable mais présence de cellules cancéreuses dans 1 à 3 ganglions axillaires. Absence de métastases.
	• T1 + N1 + M0	Tumeur $\leq 2$ cm. Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires. Absence de métastases.
	• T2 + N0 + M0	$2 \text{ cm} < T \leq 5 \text{ cm}$ . Absence de ganglions envahis. Absence de métastases.
IIb	• T2 + N1 + M0	$2 \text{ cm} < T \leq 5 \text{ cm}$ . Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires. Absence de métastases.
	• T3 + N0 + M0	$T > 5 \text{ cm}$ . Absence de ganglions envahis. Absence de métastases.
IIIa	• T0 + N2 + M0	Tumeur non palpable. Présence de cellules cancéreuses dans 4 à 9 ganglions axillaires ou dans les ganglions mammaires internes homolatéraux. Absence de métastases.
	• T1 + N2 + M0	Tumeur $\leq 2$ cm. Présence de cellules cancéreuses dans 4 à 9 ganglions axillaires ou dans les ganglions mammaires internes homolatéraux. Absence de métastases.
	• T2 + N2 + M0	$2 \text{ cm} < T \leq 5 \text{ cm}$ . Présence de cellules cancéreuses dans 4 à 9 ganglions axillaires ou dans les ganglions mammaires internes homolatéraux. Absence de métastases.
	• T3 + N1 + M0	$T > 5 \text{ cm}$ . Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires. Absence de métastases.
	• T3 + N2 + M0	$T > 5 \text{ cm}$ . Présence de cellules cancéreuses dans 4 à 9 ganglions axillaires ou dans les ganglions mammaires internes homolatéraux. Absence de métastases.
IIIB	• T4 + N0, N1, N2 + M0	Tumeur présentant une extension à la paroi thoracique ou à la peau. Absence de métastases.
IIIC	• Tout T + N3 + M0	Tumeur de n'importe quelle taille. Envahissement ganglionnaire au niveau de : - Au moins 10 ganglions axillaires - Des ganglions mammaires internes et des ganglions axillaires - Des ganglions sous-claviculaires ou sus-claviculaires.
IV	• Tout T + Tout N + M1	Tumeur présentant une extension large sous forme de métastases indépendamment de la taille de la tumeur et du degré d'envahissement ganglionnaire.

### c) Classification moléculaire

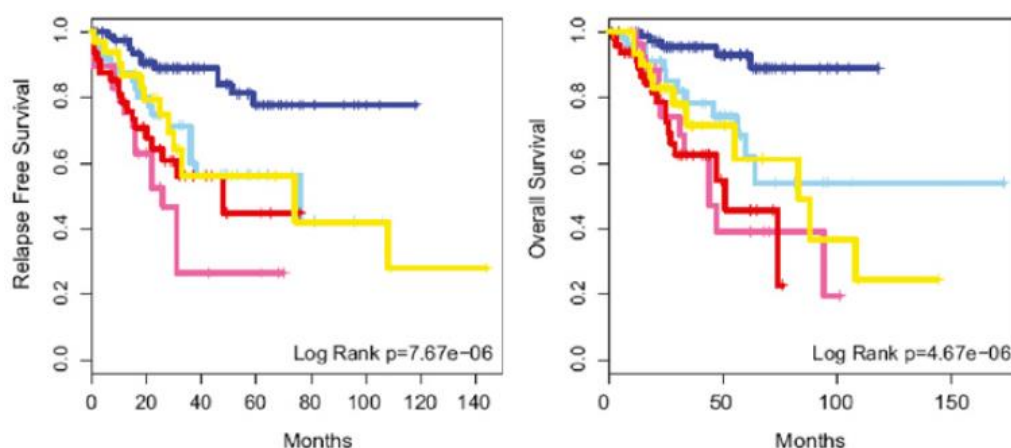
La classification moléculaire des cancers du sein repose sur la présence ou l'absence de certains récepteurs à la surface des cellules cancéreuses : les récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PGR) qui sont des récepteurs hormonaux et HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) qui est un récepteur à facteur de croissance. Cette classification s'appuie sur l'immunohistochimie (IHC) réalisée sur des coupes de tumeurs de sein afin d'établir leur profil IHC. Trois types de cancer du sein ressortent de cette classification : (i) les cancers hormono-dépendants (ER+ ; PGR+ ; HER2-), (ii) les cancers HER2 positifs ou surexprimant HER2 (ER-/+ ; PGR-/+ ; HER2+) et (iii) les cancers triple-négatifs (ER- ; PGR- ; HER2-) représentant 60 à 70%, 15 à 20% et 15 à 20% des cas de cancers du sein respectivement. La technique d'IHC dans la caractérisation des tumeurs mammaires est une technique à bas coût mais qui présente une grande variabilité et une évaluation d'un nombre

limité de biomarqueurs cliniques<sup>31</sup>. En revanche, cette technique reste à ce jour largement utilisée puisque ces biomarqueurs cliniques (ER, PGR et HER2) restent les plus pertinents dans la caractérisation des tumeurs mammaires<sup>32</sup> et dans la prise en charge thérapeutique qui en découle<sup>31</sup>.

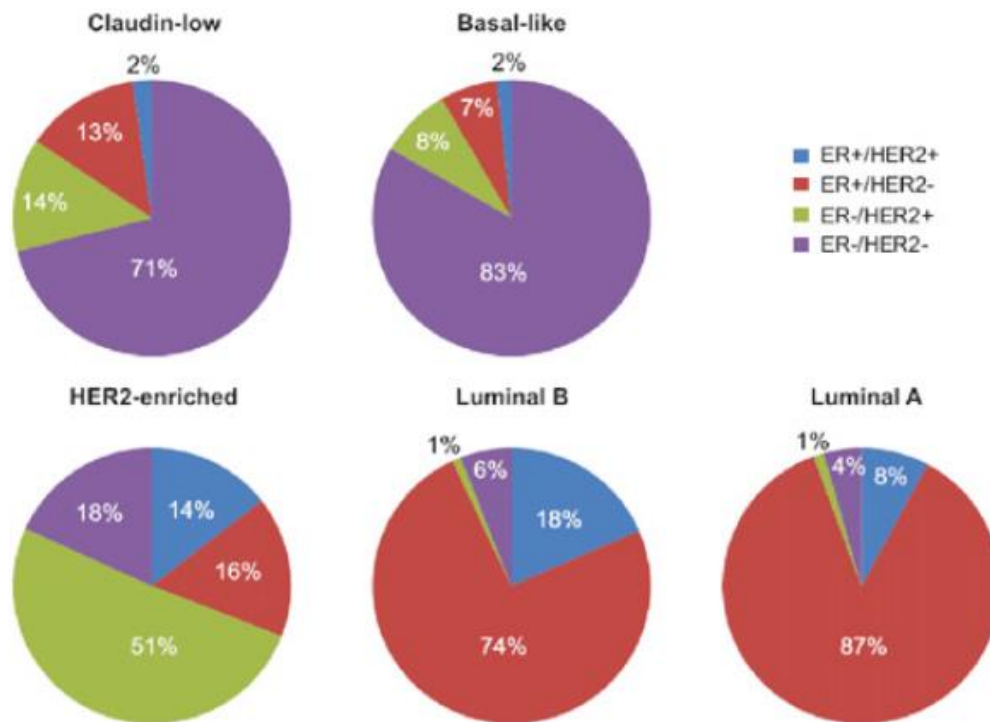
Plus récemment, à l'aide des techniques de séquençage du génome (puces à ADN ou « microarray DNA », séquençage haut débit NGS), une classification moléculaire des types de cancer du sein a été établie sur la base de l'expression transcriptionnelle de plus de 500 gènes « intrinsèques » à la tumeur<sup>33</sup>. Cette classification moléculaire, initialement fournie par Perou *et al*<sup>34</sup> puis complétée par Sorlie *et al*<sup>33</sup> et Sotiriou *et al*<sup>35</sup>, identifie six sous-types moléculaires : (i) luminal A, (ii) luminal B, (iii) « basal-like », (iv) HER2 positif, (v) « normal breast-like » et (vi) « Claudin-low » (*tableau IV*)<sup>36</sup>.

**Tableau IV :** Caractéristiques des sous-types moléculaires de cancer du sein (extrait d'Eroles *et al*, 2012)

Molecular Subtype	Frequency	ER/PRg/HER2	CK5/6 EGFR	Genes of Proliferation	Characteristics genes	Histologic grade	TP53 mutations	Prognostic
Basal-like	10-20%	ER- PRg- HER2-	+	High	KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2	High	High	Bad
HER2-enriched	10-15%	ER- PRg- HER2+	+/-	High	ERBB2, GRB7	High	High	Bad
Normal breast-like	5-10%	ER-/+ HER2-	+	Low	PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7	Low	Low	Intermediate
Luminal A	50-60%	ER+ PRg+ HER2-	-	Low	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1	Low	Low	Excellent
Luminal B	10-20%	ER +/- PRg +/- HER2 +/-	-	High	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM8	Intermediate /High	Intermediate	Intermediate /Bad
Claudin-low	12-14%	ER- PRg- HER2-	+/-	High	CD44, SNAI3	High	High	Bad



**Figure 6 :** Courbes de survie sans rechute (A) et de survie globale (B) des différents sous-types moléculaires de cancer du sein : luminal A (bleu foncé), luminal B (bleu clair), basal-like (rose), HER2 positif (rouge), claudin-low (jaune) (extrait d'Eroles *et al*, 2012)



**Figure 7 :** Distribution de l'expression des récepteurs aux œstrogènes (RE) et de HER2 selon les sous-types moléculaires de tumeur mammaire (extrait d'Eroles et al, 2012)

#### Sous-type luminal A :

Ce sous-type de cancer représente 50 à 60% des cancers du sein et expriment les gènes caractéristiques des cellules mammaires épithéliales luminales. Ce type de tumeur est généralement caractérisé par l'expression à leur surface des récepteurs hormono-dépendants (ER+/PGR+) et l'absence d'expression de HER2 (HER2-) (*tableau IV ; figure 7*). Une autre caractéristique importante est la faible expression de l'antigène Ki67 (<14%), marqueur de prolifération, au niveau du noyau de la cellule tumorale. Ce type de cancer est un cancer faiblement agressif (faible grade SBR) et de bon pronostic présentant la meilleure survie sans rechute et la meilleure survie globale par rapport aux autres sous-types moléculaires (*figure 6*).

#### Sous-type luminal B :

Représentant 10 à 20% des cancers du sein et exprimant également les gènes caractéristiques des cellules mammaires épithéliales luminales, ce sous-type de cancer présente un phénotype plus agressif (grade SBR plus élevé) et un plus mauvais pronostic par rapport aux tumeurs luminal A (*tableau IV ; figure 6*). Caractérisé principalement par un profil IHC équivalent aux tumeurs luminal A (ER+/PGR+/HER2-) (*tableau IV ; figure 7*), ce type de cancer présente

néanmoins une plus forte expression de l'antigène Ki67 ( $\geq 14\%$ ) caractérisant ainsi ce sous-type moléculaire.

Les sous-types luminal A et B regroupent la plupart des tumeurs mammaires hormono-dépendantes.

#### Sous-type HER2 positif :

Caractérisé par la forte expression du gène de la protéine HER2, ce sous-type de cancer représente 15 à 20% des tumeurs mammaires. Principalement composé des tumeurs présentant un profil IHC HER2+, ce type de tumeur présente un phénotype agressif et un mauvais pronostic (*tableau IV ; figure 6*), pronostic certes amélioré par l'utilisation des traitements anti-HER2.

#### Sous-type « basal-like » :

Représentant 10 à 20% des carcinomes mammaires, les cancers « basal-like » expriment les gènes caractéristiques des cellules mammaires épithéliales basales. Ce sont des cancers très agressifs présentant un fort grade histologique SBR, une grande taille de la tumeur au diagnostic, y compris à un stade précoce, et une haute fréquence d'envahissement des ganglions lymphatiques<sup>36</sup>. C'est un cancer de mauvais pronostic (*figure 6*) à fort pouvoir métastatique. Caractérisés par un profil IHC ER-/PGR-/HER2-, les cancers « basal-like » sont considérés en clinique comme les cancers « triple-négatifs ».

#### Sous-type « normal breast-like »:

Représentant 5 à 10% des tumeurs mammaires, ce sous-type moléculaire est pauvrement caractérisé<sup>36</sup>. Présentant principalement un profil IHC « triple-négatifs », ce type de cancer mammaire présente un pronostic vital intermédiaire (*tableau IV*).

#### Sous-type « claudin-low » :

Nouveau sous-type moléculaire découvert en 2007<sup>36</sup>, il est caractérisé par une faible expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans les jonctions serrées telles que les claudines. Représentant 12 à 14% des tumeurs mammaires, c'est un cancer agressif de haut grade histologique SBR (*tableau IV*) et de mauvais pronostic (*tableau IV ; figure 6*) présentant principalement un profil IHC « triple-négatifs » (*figure 7*).

Il est important de noter que la concordance entre le profil IHC et les sous-types moléculaires n'est pas de 100%. En effet, 80% des cancers « basal-like » sont « triple-négatifs » et les 20% restant ne le sont pas (*figure 7*). De plus, les cancers « basal-like » ne représentent que 50 % des cancers « triple-négatifs » (Prat & Perou, 2011<sup>37</sup>). Un autre exemple concerne les cancers de sous-type luminal B. En effet, ces cancers présentent une hétérogénéité au niveau de leur profil IHC avec 75% de ces cancers présentant un profil IHC hormono-dépendant et HER négatif mais les 25% restant présentant un profil IHC différent (*figure 7*).

En raison de ces observations, une nouvelle caractérisation des types de cancers associant la caractérisation moléculaire classique par IHC et la caractérisation moléculaire génomique du sein a émergé<sup>38</sup> afin d'optimiser la compréhension et la prise en charge du cancer du sein. Dans ce sens, un comité d'expert lors de la 12<sup>e</sup> conférence internationale du cancer du sein de St Gall (12th St Gallen International Breast Cancer Conference)<sup>39</sup> propose une nouvelle classification selon cinq sous-types clinico-pathologiques :

- Luminal A (ER+/PGR+/HER2-, Ki67<14%)
- Luminal B HER2 négatif (ER+/PGR+/HER2-, Ki67≥14%)
- Luminal B HER2 positif (ER+/PGR+/HER2+, tout niveau d'expression de Ki67)
- HER2 positif non luminal (ER-/PGR-/HER2+)
- Triple négatifs (ER-/PGR-/HER2-)

En résumé, le séquençage de l'ADN a un rôle de plus en plus important dans la caractérisation des tumeurs mammaires<sup>31</sup>. Des idées de classification de ces tumeurs émergent en associant la classification IHC et la classification moléculaire par séquençage d'ADN afin d'optimiser la prise en charge du cancer du sein<sup>39</sup>.

#### **E- Symptômes du cancer du sein**

Il n'existe pas de symptômes caractéristiques du cancer du sein. En revanche, un certain nombre de signes inhabituels doivent inciter à consulter afin de détecter le plus tôt possible le cancer du sein<sup>40</sup> :

- **Une modification de la forme et/ou de la taille du sein**
- **Une grosseur ou une boule dans un sein.** Cette masse est en général non douloureuse et de consistance dure avec des contours irréguliers. Attention, toute présence de boules au niveau du sein ne signifie pas que c'est un cancer du sein.

- **Des ganglions durs au niveau de l'aisselle.** La présence d'une ou plusieurs masse(s) dure(s) à l'aisselle peut suspecter une propagation de la tumeur aux ganglions axillaires.
- **Un écoulement par le mamelon, en particulier si celui-ci est sanglant**
- **Une modification de la pigmentation ou de la texture de la peau ou du mamelon :** aspect de peau d'orange, rétraction de la peau, rougeur, rétraction ou changement de coloration du mamelon ou de l'aréole.

Lorsque le cancer du sein n'est pas diagnostiqué précocement, d'autres symptômes tardifs peuvent apparaître comme des douleurs osseuses, des nausées, une perte d'appétit, une perte de poids, un essoufflement, des maux de têtes, une faiblesse musculaire,...<sup>40</sup>.

## **F- Diagnostic**

Le diagnostic du cancer du sein repose sur deux étapes : le bilan diagnostic ou initial afin de repérer le cancer du sein et le bilan d'extension afin d'évaluer son évolution<sup>41</sup>.

### **1) Bilan diagnostic (= bilan initial)<sup>41</sup>**

#### **a) Examen clinique**

L'examen clinique (=examen physique) se réalise par palpation lors d'une consultation chez le médecin. Il vise à évaluer la nature de la tumeur en évaluant plusieurs éléments :

- La taille de la tumeur
- La mobilité de la tumeur
- La localisation de la tumeur
- L'aspect de la peau du sein
- La forme du mamelon et de l'aréole
- L'augmentation de la taille de la tumeur en demandant à la patiente si elle a remarqué une augmentation de sa taille
- La présence de ganglions ou non par palpation
- La recherche de signes d'extension de la maladie à distance du sein (douleurs osseuses,...)

L'examen clinique est suivi d'une mammographie des deux seins.

#### b) Mammographie

La mammographie vise à rechercher une masse ou des micro-calcifications. Selon la forme, la taille et le nombre des micro-calcifications, les images mammographiques sont classées en six catégories selon la classification de l'American College of Radiology (ACR) :

- ACR 0 : classification d'attente, investigations complémentaires nécessaires
- ACR 1 : mammographie normale
- ACR 2 : anomalies bénignes qui ne nécessitent ni surveillance ni examen complémentaire.
- ACR 3 : anomalie probablement bénigne pour laquelle une surveillance à court terme (3 à 6 mois) est conseillée.
- ACR 4 : anomalie indéterminée ou suspecte
- ACR 5 : anomalie évocatrice d'un cancer

La mammographie est l'examen de référence de dépistage du cancer du sein, le but étant de détecter un cancer du sein de petite taille, à un stade précoce avant l'apparition des symptômes afin de le traiter le plus précocement possible. Il est réalisé tous les 2 ans chez les femmes de 50 à 74 ans. Ce dépistage systématique a permis d'augmenter l'incidence et de diminuer la mortalité du cancer du sein.

Dans certains cas, une échographie mammaire est réalisée afin d'analyser plus finement l'anomalie observée par la mammographie ou lorsque les seins sont trop denses, chez les jeunes femmes notamment, empêchant d'obtenir une image mammographique nette et de qualité (image blanche).

Afin de confirmer le diagnostic de cancer du sein, une biopsie de l'anomalie observée est toujours réalisée.

#### c) Biopsie

Il existe deux types de biopsie : la biopsie percutanée et la biopsie chirurgicale.

La biopsie percutanée consiste à prélever des fragments de tissus de l'anomalie observée, à l'aide d'une aiguille, à travers la peau. Souvent réalisée par un radiologue, on parle de microbiopsie lorsque l'aiguille utilisée a un diamètre de 3 à 5 millimètres et de macrobiopsie pour une aiguille de 5 à 10 millimètres. En cas de lésion très petite et non palpable, la biopsie peut être réalisée sous mammographie dans le but de guider le préleveur lors du prélèvement,



on parle dans ce cas de biopsie stéréotaxique. Lorsque le prélèvement est réalisé sous échographie mammaire, on parle de biopsie échoguidée. La biopsie percutanée présente plusieurs avantages :

- Elle est plus rapide à mettre en œuvre, moins invasive et moins coûteuse que la biopsie chirurgicale.
- Elle est aussi efficace que la biopsie chirurgicale pour établir un diagnostic.
- Elle ne provoque pas de cicatrice visible sur la peau ni de modification de l'aspect du sein.
- Elle évite une intervention chirurgicale lorsque l'anomalie observée se révèle être bénigne.

La biopsie chirurgicale consiste à prélever, par chirurgie, une partie ou la totalité d'une anomalie du sein identifiée par mammographie et/ou échographie mammaire. Cette biopsie est effectuée uniquement dans le cas où la biopsie percutanée n'a pas permis d'établir un diagnostic. Cette biopsie est réalisée par un chirurgien sous anesthésie générale et nécessite une hospitalisation.

Après biopsie de l'anomalie observée, le prélèvement est analysé lors d'un examen anatomo-pathologique.

#### d) Examen anatomo-pathologique

L'examen anatomo-pathologique correspond à l'analyse au microscope des tissus ou des cellules prélevés lors de la biopsie (percutanée ou chirurgicale). C'est cet examen qui confirmera de manière définitive le diagnostic de cancer du sein. Il présente plusieurs objectifs :

- préciser le type de cancer
- définir l'étendue de la maladie (taille de la tumeur, envahissement des ganglions lymphatiques) et par conséquent le stade du cancer (stade TNM)
- définir le grade SBR de la tumeur (agressivité),
- déterminer le statut de la tumeur par rapport à l'expression des récepteurs hormonaux (ER+/- et PGR+/-) à sa surface
- déterminer le statut de la tumeur par rapport à l'expression de HER2 (HER2 +/-) à sa surface

## 2) Bilan d'extension<sup>41</sup>

Ce bilan d'extension est effectué à l'issue du bilan diagnostic et de l'examen anatomo-pathologique en cas de doute sur la présence de métastases (migration des cellules cancéreuses dans des parties éloignées du sein malade). Durant ce bilan d'extension, des examens d'imagerie comme une radiographie du thorax, une scintigraphie osseuse, un IRM ainsi qu'un bilan sanguin peuvent être réalisés afin de détecter les métastases et d'analyser leur étendue. Ce bilan d'extension n'est pas systématique (effectué uniquement en cas de la présence ou de doute de métastases).

### G- Prise en charge thérapeutique

Il existe plusieurs traitements du cancer du sein : la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Ces traitements présentent plusieurs objectifs selon les cas de cancer du sein<sup>42</sup> :

- Supprimer la tumeur ou les métastases
- Réduire le risque de récurrence
- Ralentir le développement de la tumeur ou des métastases
- Améliorer le confort et la qualité de vie de la personne malade, en traitant les symptômes engendrés par la maladie

La chirurgie est le traitement de référence du cancer du sein qui peut être complété par la suite selon la localisation et l'évolution de la tumeur par un/des traitements complémentaires préventifs de rechutes nommés traitements adjuvants (radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie, thérapies ciblées). Lorsque la taille de la tumeur est trop importante et difficilement opérable, ces mêmes traitements peuvent être utilisés afin de réduire la taille de la tumeur et de faciliter sa suppression par chirurgie, on parle dans ce cas de traitements néo-adjuvants.

Le choix des traitements dépend de plusieurs caractéristiques :

- De la taille de la tumeur
- Du type de cancer du sein (lobulaire, canalaire, autre type)
- Du caractère invasif ou non de la tumeur et du degré d'envahissement des ganglions lymphatiques
- De son grade histologique (SBR)
- De sa localisation dans le sein

- De son caractère unifocal (un foyer cancéreux) ou multifocal (plusieurs foyers cancéreux)
- De son stade au moment du diagnostic
- Du statut des récepteurs hormonaux de la tumeur et de l'expression ou non de HER2
- De l'âge de la patiente
- De son état de santé général
- De ses antécédents personnels médicaux et chirurgicaux
- De ses antécédents familiaux
- Des éventuelles contre-indications aux traitements

Etant donné la diversité des traitements et des tumeurs du sein, une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) réunissant au moins trois médecins et professionnels de santé de spécialités différentes (chirurgien, oncologue médical, oncologue radiothérapeute, ...) est réalisée pour chaque patiente afin d'établir une proposition de traitement inscrit dans un programme personnalisée de soins (PPS). Le traitement du cancer du sein est donc un traitement individualisé, différent selon les patientes.

### **Prise en charge selon les stades**<sup>42</sup>

#### Carcinome du sein *in situ* (stade 0) :

Le traitement est différent selon que ce soit un carcinome canalaire *in situ* (CCIS) ou un carcinome lobulaire *in situ* (CLIS).

Le traitement d'un carcinome canalaire *in situ* (CCIS) repose sur un traitement locorégional composé :

- Soit d'une chirurgie mammaire conservatrice (tumorectomie) suivi d'une radiothérapie si nécessaire.
- Soit d'une chirurgie non conservatrice du sein (mastectomie).

Dans les deux cas, l'intervention chirurgicale peut être accompagnée ou non d'une exérèse du ganglion sentinelle.

Quant à la prise en charge du carcinome lobulaire *in situ*, elle est le plus souvent basée sur une surveillance régulière. Dans certains cas, une biopsie chirurgicale ou une exérèse du ganglion sentinelle peuvent être effectuées.

### Cancer du sein infiltrant non métastatique (stades I, IIA, IIB, IIIA, IIIB et IIIC) :

La prise en charge repose tout d'abord sur un traitement locorégional composé :

- Soit d'une chirurgie mammaire conservatrice accompagnée d'une chirurgie des ganglions (exérèse du ganglion sentinelle ou curage ganglionnaire), complétée si besoin d'une radiothérapie.
- Soit d'une chirurgie mammaire non conservatrice (mastectomie) accompagnée d'une chirurgie des ganglions (exérèse du ganglion sentinelle ou curage ganglionnaire), complétée si besoin d'une radiothérapie.

En fonction de la présence ou non de facteurs de risque de récurrence (taille de la tumeur, grade SBR-degré d'agressivité, atteinte ou non des ganglions lymphatiques et nombre, caractère hormonosensible ou non de la tumeur, statut HER), le traitement locorégional peut être complété de traitements complémentaires :

- Une chimiothérapie quelle que soit le type de chirurgie associée à une thérapie ciblée en cas de tumeur HER2+
- Une hormonothérapie si la tumeur est hormonosensible

Dans le cas de cancer du sein inflammatoire ou en cas de tumeur trop volumineuse pour être opérable, un traitement néoadjuvant (chimiothérapie et/ou hormonothérapie en cas de tumeur hormonosensible) peut être nécessaire avant l'intervention chirurgicale.

### Cancer du sein métastatique :

Le traitement du cancer du sein métastatique repose sur un traitement systémique par chimiothérapie, thérapie ciblée (en cas de tumeur HER2+) et/ou hormonothérapie (en cas de tumeur hormonosensible). Dans certains cas, un traitement locorégional par chirurgie et/ou radiothérapie peut être réalisé en complément de ce traitement systémique.

#### ***1) Prise en charge non médicamenteuse***

##### ***a) Chirurgie*** <sup>43</sup>

La chirurgie est la clé de voûte de la prise en charge du cancer du sein localisé. Il existe deux principaux types d'intervention chirurgicale : une chirurgie mammaire conservatrice, la tumorectomie, et une chirurgie mammaire non conservatrice, la mastectomie.

### Tumorectomie

La tumorectomie, chirurgie mammaire conservatrice, consiste à retirer la tumeur avec une marge de tissus sains qui l'entourent de façon à conserver la plus grande partie du sein. Dans la mesure du possible, le traitement par chirurgie conservatrice sera préconisé puisque, au contraire de la mastectomie, la tumorectomie présente un résultat esthétique satisfaisant. Ce type de chirurgie n'est possible que lorsque la tumeur est unifocale (un seul foyer) et suffisamment de petite taille (tumeur < 3 cm généralement) par rapport à la taille du sein. Dans le cas d'une tumeur unifocale mais de taille trop importante (tumeur > 3 cm), un traitement néoadjuvant par chimiothérapie et/ou hormonothérapie peut être pratiqué afin de réduire la taille de la tumeur et permettre la réalisation de la chirurgie conservatrice plutôt que la chirurgie non conservatrice. Présentant un risque de récurrence plus élevé que la mastectomie, la tumorectomie est souvent complétée d'une radiothérapie.

### Mastectomie

La mastectomie, chirurgie mammaire non conservatrice, consiste à retirer la totalité du sein comportant la tumeur, y compris l'aréole et le mamelon. Elle est réalisée lorsque :

- La tumeur est trop volumineuse (tumeur > 3 cm) par rapport à la taille du sein pour réaliser une chirurgie conservatrice et lorsque le traitement par chimiothérapie et/ou hormonothérapie n'est pas possible ou n'a pas permis de réduire la taille de la tumeur de manière satisfaisante.
- La forme de la tumeur ou l'endroit où elle se trouve empêche le traitement par chirurgie conservatrice (trop peu de tissu mammaire ou sein déformé après l'intervention).
- La tumeur est multifocale (plusieurs foyers)

La chirurgie non conservatrice modifie fortement l'apparence physique ce qui peut être traumatisant pour la patiente et nécessite une reconstruction mammaire par prothèse mammaire.

En parallèle de l'exérèse de la tumeur par chirurgie, l'envahissement ganglionnaire par les cellules cancéreuses au-delà du sein doit être évalué. En effet, en cas d'envahissement ganglionnaire (tumeur infiltrante), il est nécessaire de vérifier et de supprimer les ganglions lymphatiques atteints par les cellules cancéreuses afin de réduire le risque de récurrence et l'apparition de métastases. Les deux techniques employées en complément de la chirurgie

sont l'exérèse du ganglion sentinelle et le curage ganglionnaire. En plus de retirer les ganglions lymphatiques atteints, l'objectif est d'évaluer la progression de la maladie au-delà du sein et par conséquent de déterminer la nécessité ou non d'un traitement complémentaire par chimiothérapie ou radiothérapie.

L'exérèse du ganglion sentinelle est réalisée en cas de tumeur infiltrante de petite taille. Elle consiste à enlever le ou les ganglions lymphatiques de l'aisselle les plus proches de la tumeur afin de vérifier, par examen anatomopathologique au microscope, s'ils contiennent des cellules cancéreuses ou non. Cette technique permet d'éviter le curage ganglionnaire aux patientes ne présentant pas d'envahissement ganglionnaire. En effet, en cas de résultat négatif (les ganglions sentinelles ne contiennent pas de cellules cancéreuses), le risque que les cellules cancéreuses soient présentes dans d'autres ganglions de l'aisselle est faible (inférieur à 5%) et par conséquent, les autres ganglions axillaires sont laissés en place. Lorsque le ganglion sentinelle contient des cellules cancéreuses, un curage ganglionnaire est effectué afin de retirer les autres ganglions lymphatiques.

Le curage ganglionnaire, également appelé curage axillaire, est effectué lorsque l'exérèse du ganglion sentinelle n'est pas possible ou non indiqué ou lorsque le ganglion sentinelle contient des cellules cancéreuses (ganglion positif). Afin d'évaluer la progression de la maladie au-delà du sein, un examen anatomopathologique des ganglions retirés est réalisé. En moyenne 8 à 10 ganglions axillaires sont retirés afin d'y être analysés. Cet examen anatomopathologique permet de déterminer s'il est nécessaire de retirer des ganglions lymphatiques supplémentaires ou non (dans la mesure du possible).

#### b) Radiothérapie <sup>44</sup>

La radiothérapie est un traitement locorégional du cancer du sein consistant à utiliser des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses en inhibant leur multiplication. Le but est de diriger précisément ces rayonnements ionisants sur la zone à traiter tout en préservant les tissus sains et les organes avoisinants. La radiothérapie externe, mode de radiothérapie le plus fréquemment utilisé dans le traitement du cancer du sein, utilise une source externe de rayonnements dirigés, à travers la peau, vers la zone à traiter. Dans ce cas, les rayonnements sont produits par un accélérateur de particules. La radiothérapie est indiquée en complément de la chirurgie (radiothérapie adjuvante) afin de détruire les cellules cancéreuses pouvant persister suite à l'intervention chirurgicale et ainsi diminuer le risque de récurrence. La dose moyenne d'administration est de 50 Gy délivrée en 25 séances quotidiennes

soit environ 5 semaines de traitement (dose de rayons en radiothérapie exprimée en gray (Gy)). Quatre zones du corps peuvent être traitées par radiothérapie :

- La glande mammaire (après une chirurgie conservatrice)
- Le lit tumoral (= région du sein où se trouvait la tumeur avant l'intervention chirurgicale conservatrice)
- La paroi thoracique (après une chirurgie non conservatrice)
- Les ganglions de la chaîne mammaire interne et ceux situés au-dessus de la clavicule (sus-claviculaires) et ce quel que soit le type de chirurgie

L'autre type de radiothérapie, très peu utilisé dans le traitement du cancer du sein, est la curiethérapie qui consiste à administrer une source radioactive à l'intérieur du corps directement au contact de la zone à traiter.

## ***2) Traitements médicamenteux***

### ***a) Chimiothérapie***

La chimiothérapie est le traitement médicamenteux le plus ancien et le plus fréquemment utilisé dans le traitement du cancer. Le mécanisme d'action de la chimiothérapie consiste à agir sur les mécanismes de division cellulaire afin de stopper la multiplication cellulaire des cellules cancéreuses. Son administration systémique permet d'atteindre les cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation dans le corps mais le manque de spécificité des molécules utilisées en chimiothérapie pour les cellules cancéreuses induit de nombreux effets indésirables néfastes. Le traitement par chimiothérapie est par conséquent un traitement très lourd. Différentes classes d'agents anticancéreux sont utilisées dans le traitement du cancer du sein. Leurs propriétés sont décrites dans le *tableau V*. Le plus souvent, plusieurs agents anticancéreux sont administrés en même temps : on parle alors de protocole de chimiothérapie.

Tableau V : Propriétés des agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein.

Classe	Mécanisme	Famille	Molécules
<b>Agents alkylants</b>	Altèrent l'ADN le rendant ainsi non fonctionnelle	Oxazaphosphorines	<i>Cyclophosphamide</i>
<b>Antimétabolites</b>	Interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques	Antifoliques	<i>Méthotrexate</i>
		Antipyrimidiques	<i>5-fluoro-uracile</i>
			<i>Capécitabine</i>
			<i>Gemcitabine</i>
<b>Inhibiteurs de topoisomérase</b>	Inhibent les topoisomérases I et II, enzymes essentielles à la synthèse d'ADN	Anthracyclines	<i>Doxorubicine</i>
			<i>Epirubicine</i>
<b>Poisons du fuseau</b>	Inhibent la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules afin de bloquer la mitose des cellules	Taxanes	<i>Paclitaxel</i>
			<i>Docétaxel</i>
		Vinca-alcaloïdes (dérivés de la Pervenche de Madagascar)	<i>Vinorelbine</i>
			<i>Eribuline</i>

#### b) Hormonothérapie <sup>45</sup>

L'hormonothérapie est prescrite dans le cas de tumeurs mammaires hormonosensibles ER+ (environ 80% des cancers du sein), c'est-à-dire que les hormones sexuelles féminines stimulent leur croissance. Ce traitement consiste à empêcher l'action stimulante des hormones féminines sur les cellules cancéreuses. L'hormonothérapie est utilisée en tant que traitement néoadjuvant et plus largement en tant que traitement adjuvant. En tant que traitement adjuvant, elle est habituellement prescrite pour une période d'au moins 5 ans. Elle présente comme objectifs (i) de réduire le risque de récurrence locale dans le sein opéré, (ii) de diminuer le risque d'atteinte au niveau de l'autre sein et (iii) de diminuer le risque d'apparition de métastases à distance. Plusieurs classes thérapeutiques de médicaments peuvent être utilisées en agissant à plusieurs niveaux, allant de l'inhibition de la synthèse des hormones sexuelles féminines comme les agonistes de la LH-RH et les anti-aromatases jusqu'à l'inhibition de leurs récepteurs comme les anti-œstrogènes.

#### Les agonistes de la LH-RH

Ces médicaments ont pour objectif de stopper, de manière réversible, la fabrication des hormones féminines par les ovaires par hyperstimulation de l'hypophyse (la LH-RH est une hormone sécrétée par l'hypothalamus qui stimule l'hypophyse). Cette hyperstimulation hypophysaire entraîne une désensibilisation de l'hypophyse qui arrête la production des hormones hypophysaires, la LH (hormone lutéinisante) et la FSH (hormone folliculo-stimulante), hormones stimulant la production des hormones ovariennes féminines. Les médicaments de cette classe thérapeutique sont la Goséréline (Zoladex®) et la Leuproréline



(Enantone<sup>®</sup>). Ils sont peu utilisés et prescrits au cas par cas chez la femme non ménopausée atteintes d'un cancer du sein métastatique hormono-dépendant pour une durée de 3 à 5 ans.

#### Les anti-œstrogènes

Les anti-œstrogènes empêchent la liaison des œstrogènes avec leur récepteur en entrant en compétition avec eux empêchant ainsi la stimulation des cellules cancéreuses présentant des récepteurs hormonaux par ces hormones. Les anti-œstrogènes ne suppriment pas la sécrétion des œstrogènes. La classe des anti-œstrogènes se répartit en deux types :

- Les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) qui entrent en compétition avec les œstrogènes dans leurs liaisons aux récepteurs hormonaux. C'est le cas pour le tamoxifène (Nolvadex<sup>®</sup>) ou le torémifène (Fareston<sup>®</sup>).
- Les SERD (Selective Estrogen Receptor Degradation) dont l'action est de dégrader les récepteurs aux œstrogènes empêchant ainsi la liaison aux œstrogènes avec leur récepteur. C'est le cas du Fulvestrant (Faslodex<sup>®</sup>).

Le tamoxifène est le traitement de référence en tant que traitement adjuvant des tumeurs mammaires hormono-dépendantes (ER+) chez les femmes non ménopausées. Il est généralement prescrit pour une durée de 5 ans.

#### Les anti-aromatases

Après la ménopause, la production des œstrogènes par les ovaires est interrompue chez la femme. Chez la femme ménopausée, la production des œstrogènes est maintenue par l'aromatase, enzyme permettant la transformation de la testostérone (androgènes), produite par les glandes surrénales, en œstrogènes. Les anti-aromatases inhibent la production des œstrogènes prévenant ainsi la liaison de celles-ci à leur récepteurs présents au niveau des tumeurs mammaires hormono-sensibles.

Cette classe de médicaments est composée de deux types<sup>46</sup> :

- Les anti-aromatases de type I : ce sont des analogues de l'androstènedione de structure stéroïdienne inhibant directement par compétition l'enzyme. Les médicaments appartenant à cette classe sont le formestane (Lentaron<sup>®</sup>), administré par voie parentérale, et l'exémestane (Aromasine<sup>®</sup>), administré par voie orale. Cette classe de médicament est très peu utilisée.

- Les anti-aromatases de type II : de structure non stéroïdienne, cette classe d'inhibiteurs se fixe sur l'atome de fer de l'hème de l'enzyme. L'anastrozole (Arimidex®) et le létrozole (Fémara®) sont les médicaments composant cette classe thérapeutique. Administrés oralement, ces médicaments sont plus largement utilisés.

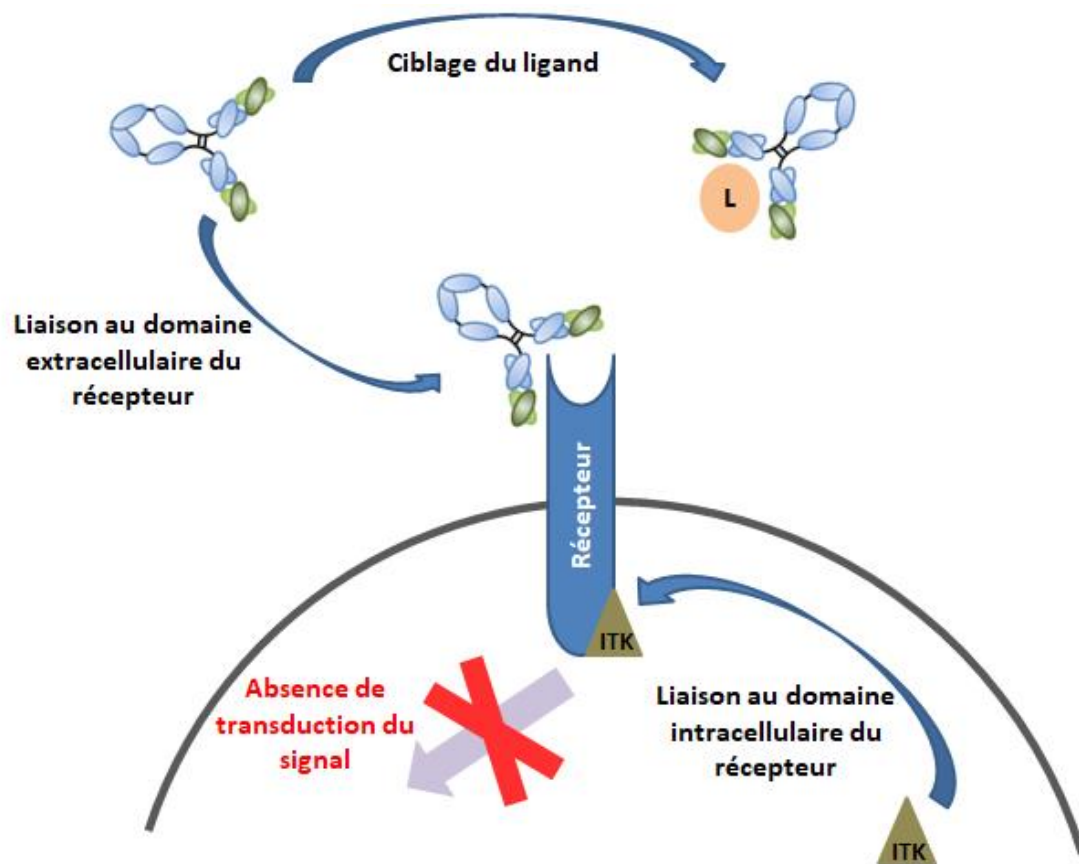
Les anti-aromatases sont prescrits en tant que traitement adjuvant du cancer du sein hormonodépendant chez la femme ménopausée. Ils peuvent être prescrits seuls pendant 5 ans ou prescrits pendant 2 ans suivis par un traitement au tamoxifène pour une durée d'hormonothérapie de 5 ans au total.

### c) Thérapies ciblées <sup>47</sup>

Les thérapies ciblées sont des molécules ciblant une protéine, qui peut être soit circulante comme un ligand, ou soit transmembranaire comme les récepteurs présents à la surface d'une cellule. Ces thérapies permettent notamment une action ciblée d'une tumeur en attaquant spécifiquement les cellules cancéreuses ou leur environnement, tout en limitant les effets secondaires qui peuvent être observés en chimiothérapie par exemple. Ces thérapies agissent à différents niveaux du développement de la cellule tumorale. En effet, ces molécules peuvent (i) bloquer directement la croissance des cellules cancéreuses, (ii) s'opposer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins formés à la périphérie de la tumeur (anti-angiogénèse), (iii) activer le système immunitaire contre la tumeur, et (iv) commander la mort de la cellule cancéreuse par apoptose (effet pro-apoptotique). L'arrivée sur le marché des thérapies ciblées en oncologie a permis de révolutionner la prise en charge thérapeutique des cancers.

Il existe actuellement trois grandes familles de thérapies ciblées utilisées en oncologie qui ciblent différents domaines de la protéine (*figure 8*) :

- Les anticorps monoclonaux (AcMo) qui ciblent soit une protéine circulante (ligand) soit le domaine **extracellulaire** d'une protéine transmembranaire (récepteur).
- Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) qui ciblent le domaine **intracellulaire** d'une protéine transmembranaire (récepteur).
- Les anticorps armés ou Antibody-Drug Conjugate (ADC) qui ciblent le domaine **extracellulaire** d'une protéine transmembranaire (récepteur)



**Figure 8 :** Mécanismes d'action des différentes thérapies ciblées : (i) ciblage du ligand (AcMo), (ii) liaison au domaine extracellulaire du récepteur (AcMo et ADC), et (iii) liaison au domaine intracellulaire du récepteur (ITK)

## II- Prise en charge du cancer du sein HER2+

### A- Le récepteur HER2

Environ 15% des tumeurs du sein surexpriment à leur surface la protéine HER2<sup>4</sup>. La surexpression de HER2 rend ce type de cancer du sein très agressif et de mauvais pronostic.

Le récepteur HER2 appartient à la grande famille des récepteurs à tyrosine kinases (RTKs) et plus particulièrement à la famille des récepteurs à l'EGF (epidermal growth factor) ou ErbB composée de quatre récepteurs : HER1 ou EGFR, HER2, HER3 et HER4<sup>48,49</sup>. Ces récepteurs ErbB sont des glycoprotéines transmembranaires présentant une structure moléculaire commune. En effet, ils présentent un domaine extracellulaire N-terminal présentant un site de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase intracellulaire C-terminal (*figure 9*)<sup>50</sup>, sauf pour HER3 qui ne possède pas de domaine tyrosine kinase<sup>50,51</sup>. La région extracellulaire N-terminal est également divisée en quatre domaines : les domaines I et III impliqués dans la liaison avec le ligand, le domaine II impliqué dans la dimérisation du récepteur et le domaine IV ayant une fonction d'auto-inhibition en interagissant avec le domaine II et le gardant enfoui<sup>49</sup> (*figures 9 et 11*).

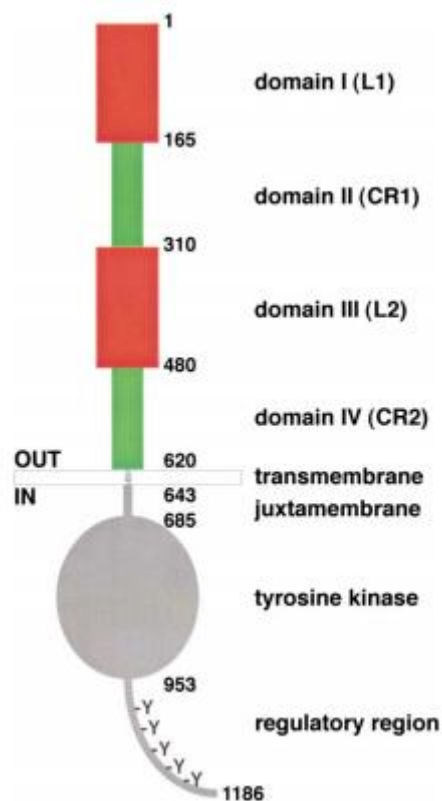
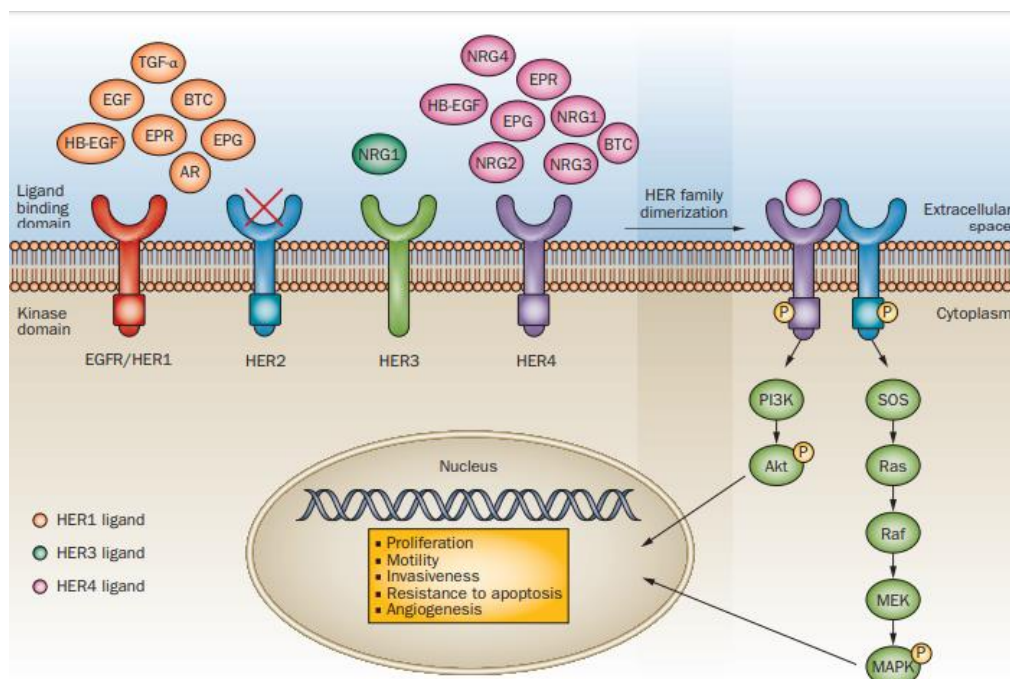


Figure 9:      Structure des récepteurs à l'EGF (ErbB ou HER) (extrait de Burgess et al, 2003)

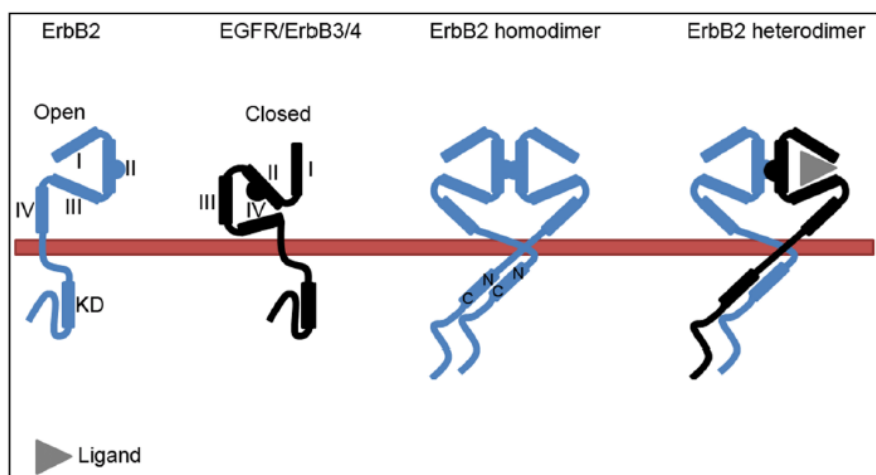
Ces récepteurs présentent également une fonction commune. En effet, ces récepteurs présentent un rôle crucial dans le cycle cellulaire, la migration cellulaire, le métabolisme cellulaire et la survie cellulaire. Après leur activation, ces récepteurs se dimérisent engendrant ainsi une auto-phosphorylation de leur domaine intracellulaire par augmentation de l'activité tyrosine kinase présente sur ce domaine. Ceci induit une cascade de signalisation et notamment l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et Ras/MAPK (mitogen activated protein kinase), voies favorisant la prolifération cellulaire et l'angiogenèse<sup>48,52</sup> (figure 10).



**Figure 10 :** Voies de signalisation intracellulaire induites par les récepteurs ErbB (extrait d'Arteaga et al, 2011)

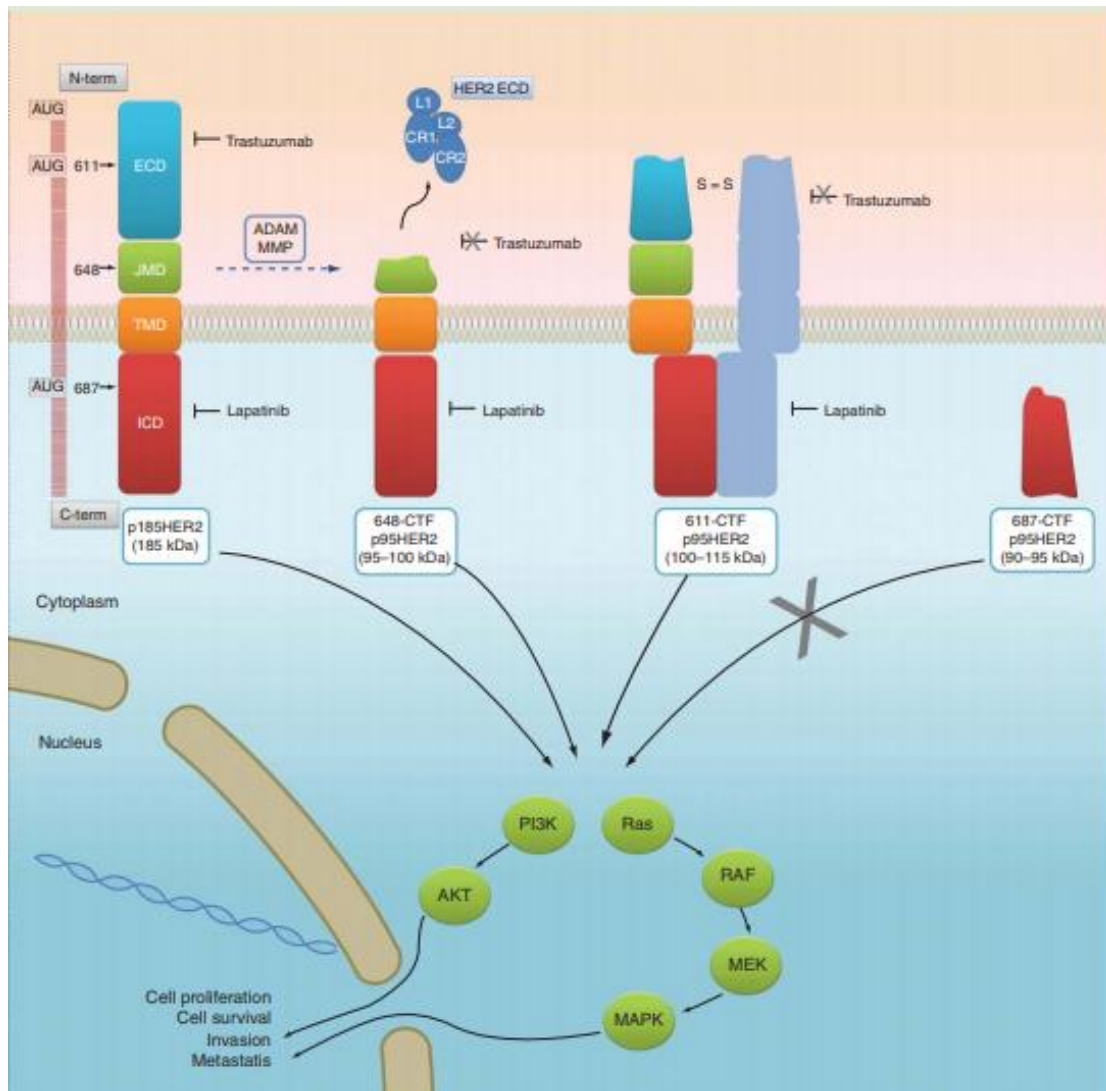
En revanche, le récepteur HER2, protéine transmembranaire de 185 kDa, présente plusieurs particularités par rapport aux autres récepteurs à l'EGF.

- (i) Tout d'abord, contrairement à HER1, HER3 et HER4 qui possèdent plusieurs ligands, aucun ligand se liant à HER2 n'a été identifié<sup>49,50</sup>.
- (ii) HER2 présente une conformation active constitutive exposant en continu son domaine II de dimérisation indépendamment de la liaison du ligand, s'opposant ainsi aux autres ErbB qui dépendent de la liaison d'un ligand pour être activés et exposer leur domaine II afin de se dimériser (figure 11)<sup>49</sup>.



**Figure 11.** Représentation schématique des récepteurs de la famille des ErbB, conformation active (ouverte) constitutive de HER2 et formation d'hétérodimères avec HER2 et un autre récepteur de la famille des ErbB (extrait de Bertelsen et al, 2014)

- (iii) HER2 ne subit pas de régulation négative après son activation et sa dimérisation contrairement aux autres ErbB<sup>49</sup>, c'est-à-dire qu'il n'est pas dégradé après son activation maintenant ainsi un nombre important de récepteurs HER2 à la surface de la cellule<sup>53</sup>.
- (iv) Après activation, HER2 peut se dimériser avec un autre récepteur HER2 afin de former un homodimère mais présente également la capacité de s'associer avec les autres récepteurs HER afin de former un hétérodimère<sup>48,49</sup> (figure 11).
- (v) Une autre particularité du récepteur HER2 est sa capacité à perdre son domaine extracellulaire, phénomène ayant notamment une répercussion clinique<sup>54,55</sup>. La conséquence de ce phénomène est la formation d'un récepteur HER2 « tronqué » de 95 à 100 kDa environ appelé p95HER2. Ce fragment p95HER2 présente une activité tyrosine kinase augmentée et un pouvoir oncogénique 10 à 100 fois plus élevé que la protéine HER2 entière<sup>56</sup>. Trois variants de la protéine p95HER2 sont obtenus : 611-CTF, 648-CTF et 687-CTF. Le variant 648-CTF est obtenu par clivage protéolytique par des métalloprotéases (ADAM et MMP) alors que les variants 611-CTF (transmembranaire) et 687-CTF (cytoplasmique) sont obtenus suite à une position alternative du codon initiateur AUG sur l'ARNm codant pour la protéine HER2<sup>57</sup> (figure 12). Les variants 648-CTF et 611-CTF, contrairement au variant 687-CTF, présentent la capacité à activer les voies de signalisation intracellulaire PI3K/AKT/mTOR et Ras/MAPK<sup>58</sup> (figure 12).



**Figure 12 :** Formation du fragment p95HER2 par perte du domaine extracellulaire de la protéine HER2 (extrait de Tural et al, 2014)

En présentant ces différentes caractéristiques, l'activation et l'expression de HER2 est facilitée accélérant ainsi grandement la prolifération des cellules tumorales surexprimant ce récepteur. Le cancer du sein HER2+ est par conséquent un type de cancer du sein très agressif et de mauvais pronostic<sup>4</sup>.

### B- Thérapies ciblant HER2

L'arrivée sur le marché des traitements ciblant HER2 a permis de traiter efficacement les tumeurs du sein HER2+ ce qui a amélioré grandement le pronostic vital de ces cancers<sup>48,59</sup>.

Il existe actuellement 4 traitements ciblant HER2 : deux anticorps monoclonaux humanisés, le trastuzumab (Herceptin®) et le pertuzumab (Perjeta®), arrivés sur le marché en 1998 et 2012



respectivement, un inhibiteur de tyrosine kinase, le lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>), arrivé sur le marché en 2007, et un anticorps conjugué (ADC), l'ado-trastuzumab emtansine ou T-DM1 (Kadcyla<sup>®</sup>)<sup>60-63</sup>, arrivé sur le marché en 2013.

### 1) Le trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>)

Le trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>), anticorps monoclonal humanisé anti-HER2, est le premier traitement ciblant HER2 arrivé sur le marché en obtenant l'AMM par la FDA (USA) en 1998 et par l'EMA (UE) en 2000. Développé par les laboratoires Roche, son arrivée sur le marché a permis de traiter efficacement les tumeurs du sein HER2+.

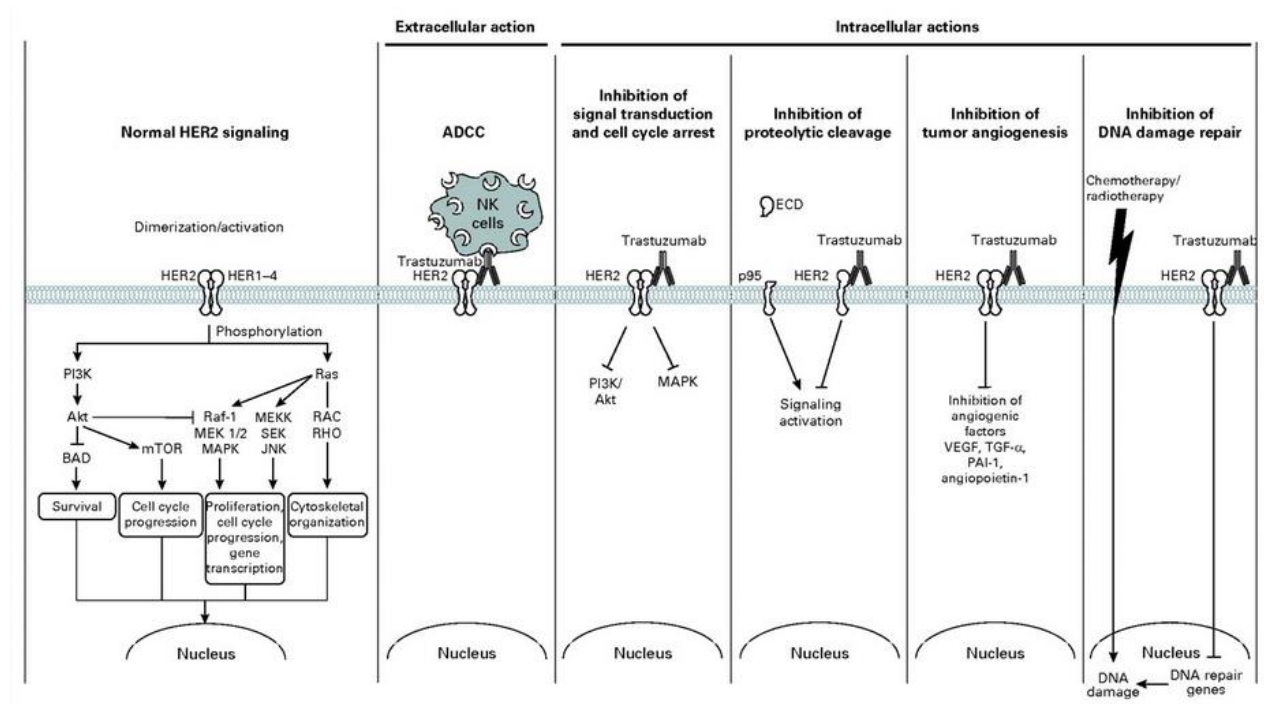
Le trastuzumab, étant un anticorps monoclonal, il possède un fragment Fab (fragment antigen binding), contenant la chaîne légère, le domaine variable VH et le domaine constant CH1 de la chaîne lourde, lui permettant de reconnaître et de se lier au sous-domaine IV du domaine extracellulaire du récepteur HER2<sup>64</sup> et, un fragment Fc (fragment cristallisable), contenant les domaines constants CH2 et CH3 de la chaîne lourde, permettant à l'anticorps d'être reconnu par des effecteurs de l'immunité, en particulier les cellules immunitaires après sa liaison avec l'antigène. Le trastuzumab présente une efficacité anti-tumorale sur les cellules tumorales mammaires HER2+ en inhibant HER2 et rendant la cellule tumorale sensible à la chimiothérapie et à l'apoptose.

Il possède divers mécanismes d'actions. Premièrement, par son fragment Fab, le trastuzumab exerce un effet neutralisant de l'antigène en inhibant HER2. Cet effet neutralisant direct sur HER2 est dû à plusieurs mécanismes et notamment, (i) l'inhibition de l'activation constitutive de HER2 indépendante de la liaison du ligand<sup>49</sup> entraînant ainsi l'inhibition de l'induction des voies de signalisation intracellulaire dont la voie PI3K/AKT<sup>60</sup>, (ii) l'inhibition du clivage protéolytique du domaine extracellulaire de HER2 par les métalloprotéases ce qui prévient la formation de la protéine p95HER2<sup>65</sup>, (iii) la réduction de l'angiogénèse<sup>66</sup> et (iv) la diminution des mécanismes de réparation d'ADN, mécanismes de résistance activés par la cellule tumorale en réponse à la chimiothérapie<sup>67</sup> (*figure 13*).

Deuxièmement, il entraîne le recrutement des cellules immunitaires au niveau de la tumeur, notamment des cellules NK (Natural Killer), lymphocytes cytotoxiques appartenant à l'immunité innée. Leur principale fonction est de tuer les cellules anormales. Suite à la liaison du trastuzumab au récepteur HER2, la partie Fc de l'anticorps se lie aux récepteurs FcγRIIIA présents à la surface de ces cellules NK. Une fois recrutées, les cellules NK tuent les cellules



tumorales ciblées : c'est la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)<sup>67</sup> (figure 13). Il existe également un deuxième mécanisme d'action Fc-dépendant du trastuzumab : la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), c'est-à-dire la capacité du trastuzumab à activer le complément par la liaison de son fragment Fc avec le C1q<sup>68</sup>.



**Figure 13:** Mécanismes d'action du trastuzumab : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), inhibition de l'induction des voies de signalisation intracellulaire pro-prolifératives, inhibition du clivage protéolytique du domaine extracellulaire de HER2, inhibition de l'angiogénèse, inhibition des mécanismes de réparation d'ADN endommagé par la chimiothérapie (extrait de Spector et al, 2010)

Le trastuzumab (Herceptin®) n'est indiqué que pour des tumeurs présentant soit une surexpression de HER2, soit une amplification du gène HER2. Il possède plusieurs indications thérapeutiques (EMA) :

- (i) Dans le traitement de patients adultes atteints d'un cancer du sein métastatique HER2+ :
  - En monothérapie, chez les patients déjà pré-traités par au moins deux protocoles de chimiothérapie pour leur maladie métastatique.

- En association avec le paclitaxel, chez les patients non pré-traités par chimiothérapie pour leur cancer du sein métastatique et chez lesquels le traitement par anthracyclines ne peut pas être envisagé.
- En association avec le docétaxel, chez les patients non pré-traités par chimiothérapie pour leur maladie métastatique.
- En association à un inhibiteur de l'aromatase, chez les patientes ménopausées ayant des récepteurs hormonaux positifs, non traitées précédemment par trastuzumab.

(ii) Dans le traitement de patients adultes atteints d'un cancer du sein précoce HER2+ :

- Après chirurgie, chimiothérapie (néoadjuvante ou adjuvante) et radiothérapie (si indiquée).
- Après une chimiothérapie adjuvante avec la doxorubicine et le cyclophosphamide, en association avec le paclitaxel ou le docétaxel.
- En association à une chimiothérapie adjuvante associant le docétaxel et le carboplatine.

(iii) Dans le traitement du cancer gastrique métastatique HER2+ en association à la capécitabine ou au 5-fluoro-uracile et au cisplatine.

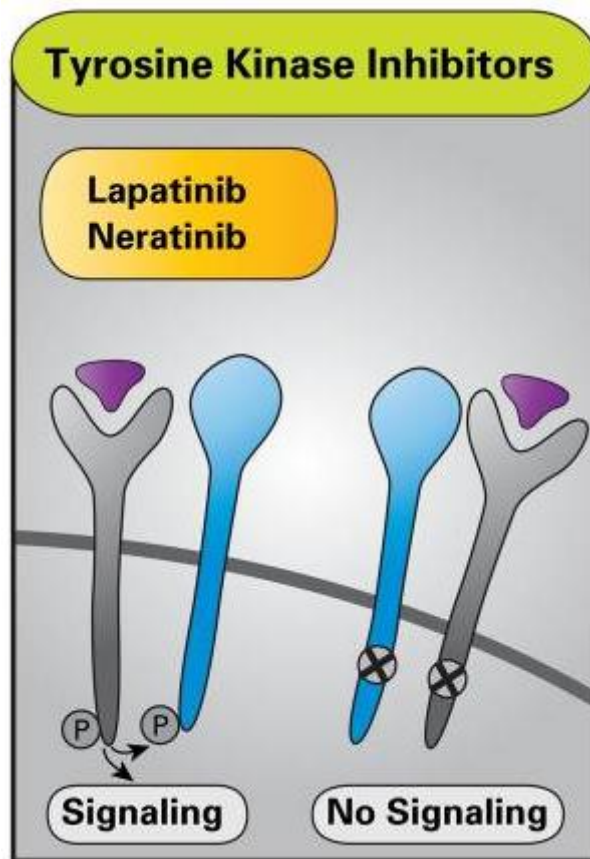
Le trastuzumab est administré par voie intraveineuse (IV) selon deux principaux protocoles d'administration. L'administration peut se faire toutes les trois semaines avec une dose de charge de 8mg/kg de poids corporel suivi d'une dose d'entretien de 6 mg/kg ou bien, l'administration peut être hebdomadaire avec une dose de charge de 4 mg/kg suivi d'une dose d'entretien de 2 mg/kg. La durée du traitement par trastuzumab est généralement d'un an.

Depuis 2018, le trastuzumab est entré dans le domaine public. Ceci a permis l'arrivée sur le marché de plusieurs biosimilaires. Actuellement, il existe cinq médicaments biosimilaires du trastuzumab (Herceptin®) sur le marché (ANSM) : Herzuma®, Kanjiti®, Ogivri®, Ontruzant®, Trazimera®, le premier biosimilaire du trastuzumab sur le marché étant l'Herzuma® des laboratoires Biogaran.

## 2) Le lapatinib (Tyverb®)

Le lapatinib (Tyverb®) est un inhibiteur de tyrosine kinase des récepteurs HER2 et EGFR (ErbB-1). Développé par GlaxoSmithKline (GSK), il a obtenu l'AMM le 13 mars 2007 (FDA), dans le cadre d'une utilisation thérapeutique en association avec la capécitabine (Xeloda®) dans le traitement des patients atteints de cancer du sein HER2+ avancé ou métastatique et ayant reçu au préalable un traitement comportant une anthracycline, un taxane et le trastuzumab<sup>69</sup>. L'association du lapatinib avec la capécitabine diminue le risque de progression de la maladie de 51% par rapport à l'utilisation de la capécitabine seule (survie sans progression de la maladie : 8,4 mois pour l'association lapatinib + capécitabine vs 4,4 mois pour la capécitabine seul)<sup>70</sup>. L'arrivée sur le marché du lapatinib a permis de traiter les patientes atteintes du cancer du sein HER2+ présentant une résistance au trastuzumab.

Le lapatinib est un inhibiteur du domaine intracellulaire à tyrosine kinase des récepteurs HER2 et EGFR (ErbB-1). Il bloque l'auto-phosphorylation du domaine intracellulaire de ces récepteurs inhibant ainsi l'induction des voies de signalisation intracellulaire PI3K/AKT/mTOR et Ras/MAPK, voies favorisant la prolifération cellulaire et la survie des cellules tumorales mammaires<sup>71,72</sup> (*figure 14*). Le lapatinib favorise également l'apoptose des cellules mammaires tumorales résistantes au trastuzumab<sup>73</sup>. Contrairement au trastuzumab, il possède la capacité d'inhiber le récepteur HER2 tronqué p95HER2 en inhibant l'auto-phosphorylation du domaine intracellulaire à tyrosine kinase de ce récepteur. Ceci inhibe son activation et prévient son hétérodimérisation avec le récepteur ErbB3 notamment<sup>74</sup>.



**Figure 14 :** Mécanisme d'action du lapatinib : Inhibition de l'autophosphorylation du domaine intracellulaire des récepteurs HER2 et EGFR induisant ainsi un blocage des voies de signalisation intracellulaire PI3K/AKT/mTOR et Ras/MAPK (extrait d'Emde et al, 2010)

Le lapatinib est indiqué chez l'adulte dans le traitement du cancer du sein HER2+ métastatique (EMA) :

- En association à la capécitabine, chez les patients ayant une maladie avancée ou métastatique en progression après un traitement antérieur ayant comporté une anthracycline, un taxane et le trastuzumab.
- En association au trastuzumab chez les patients ayant une maladie métastatique avec des récepteurs hormonaux négatifs, en progression après un traitement antérieur par trastuzumab en association à une chimiothérapie.
- En association à un inhibiteur de l'aromatase, chez les patientes ménopausées ayant une maladie métastatique avec des récepteurs hormonaux positifs et pour lesquelles la chimiothérapie n'est actuellement pas envisagée.

La posologie du lapatinib varie selon qu'il soit associé avec la capécitabine, le trastuzumab ou un inhibiteur de l'aromatase soit 1250 mg (cinq comprimés), 1000 mg (quatre comprimés) et 1500 mg (six comprimés) respectivement en une prise par jour, en continu. Un avantage de ce médicament est que son administration se fait par voie orale ce qui est plus confortable pour le patient.

### **3) Le pertuzumab (Perjeta®)**

Le pertuzumab (Perjeta®) est un anticorps monoclonal anti-HER2 mis sur le marché en 2012. Développé par les laboratoires Roche, il est indiqué dans le traitement du cancer du sein HER2+ précoce et métastatique.

En ce qui concerne le traitement du cancer du sein HER2+ précoce, le pertuzumab est indiqué en association au trastuzumab et à une chimiothérapie en tant que (EMA) :

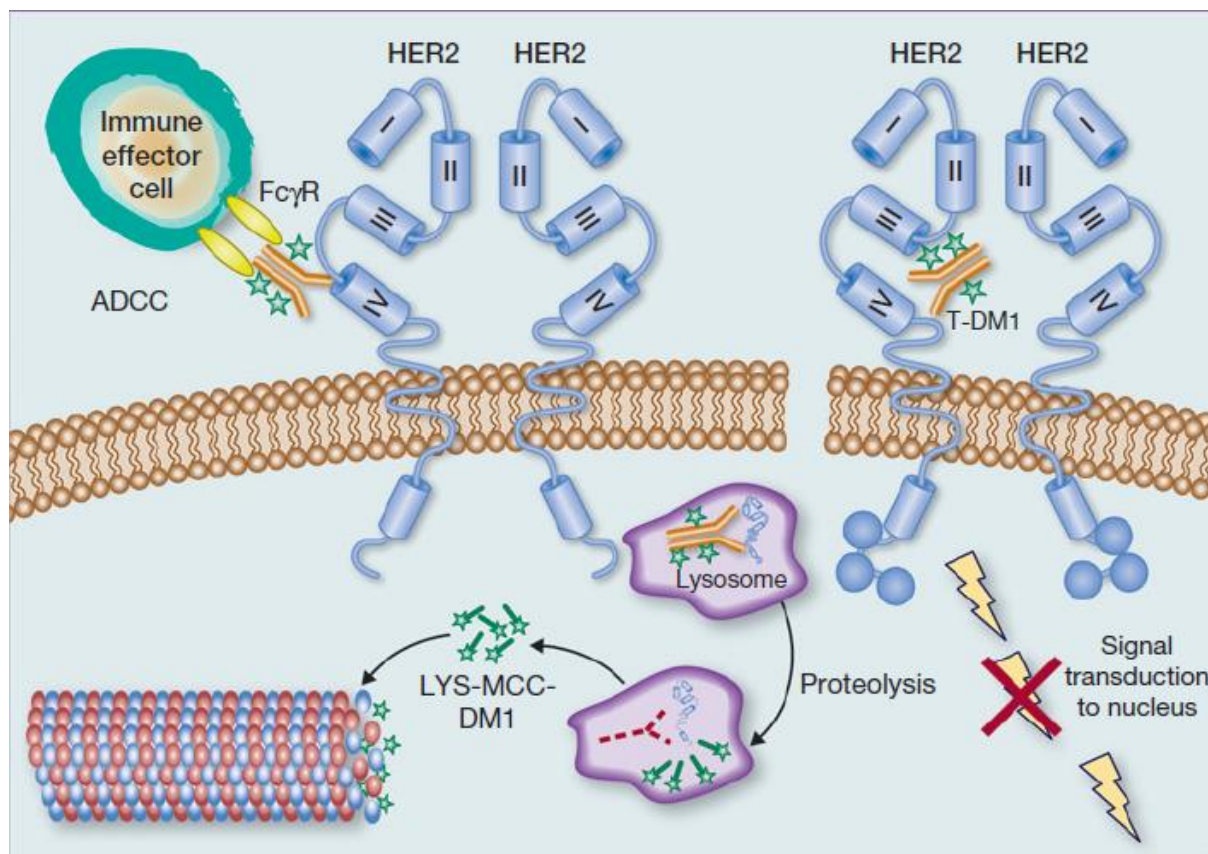
- Traitement néoadjuvant de patients adultes atteints d'un cancer du sein HER2+ localement avancé, inflammatoire ou à un stade précoce avec un risque élevé de récurrence.
- Traitement adjuvant de patients adultes atteints d'un cancer du sein précoce HER2+ avec un risque élevé de récurrence.

En ce qui concerne le traitement du cancer du sein HER2+ métastatique, le pertuzumab est indiqué en association au trastuzumab et au docétaxel pour les patients adultes n'ayant pas reçu au préalable de traitement anti-HER2 ou de chimiothérapie pour leur maladie métastatique (EMA).

Le pertuzumab possède un mécanisme d'action différent du trastuzumab. En effet, il cible le sous-domaine II du domaine extracellulaire de HER2, appelé « bras de dimérisation ». Ceci empêche la dimérisation (homodimérisation et hétérodimérisation) du récepteur après son activation inhibant ainsi l'activation des voies de signalisation intracellulaire et la croissance tumorale<sup>49,75</sup>. Utilisé en association avec le trastuzumab et une chimiothérapie, le pertuzumab diminue le risque de progression de la maladie et augmente la survie globale des patients atteints de cancers du sein HER2+ qu'il soit utilisé en tant que traitement adjuvant<sup>76,77</sup> ou en tant que traitement néoadjuvant<sup>62</sup>.

#### 4) Le T-DM1 (Kadcyla®)

Le T-DM1 (Kadcyla®) est un anticorps armé ou anticorps conjugués (ADC) qui combine le trastuzumab avec l'emtansine ou DM1, un puissant agent cytotoxique inhibant la polymérisation des microtubules appartenant à la famille des dérivés de la maytansine. Ces deux entités sont reliés entre elles par un linker non clivable qui permet la libération de l'agent cytotoxique<sup>78</sup>. Développé par les laboratoires Roche, il a été mis sur le marché en février 2013. Il est actuellement indiqué, en monothérapie, dans le traitement de patients adultes atteints d'un cancer du sein HER2+ métastatique ou localement avancé non résécable, ayant reçu au préalable du trastuzumab et un taxane (EMA). La dose thérapeutique du T-DM1 est de 3,6 mg/kg de poids corporel (correspondant à la dose maximale tolérée (DMT)) pour une administration en IV toutes les 3 semaines. Le T-DM1 est une chimiothérapie vectorisée ciblant les cellules tumorales mammaires HER2+. En effet, une fois internalisé, le T-DM1 libère un métabolite actif cytotoxique (lysine-linker-DM1) capable de tuer la cellule tumorale<sup>78,79</sup>. L'action anticancéreuse du T-DM1 est principalement exercée par son métabolite actif lysine-linker-DM1 qui bloque la formation des microtubules et empêche ainsi la division et la croissance des cellules cancéreuses, conduisant à terme à leur mort cellulaire par apoptose (*figure 15*). Le T-DM1 conserve également les mécanismes d'action du trastuzumab, c'est-à-dire, d'une part, l'inhibition directe de HER2 et d'autre part, le recrutement de cellules immunitaires via l'ADCC<sup>80</sup> (*figure 15*).



*Figure 15 : Mécanismes d'action du T-DM1 (extrait de Krop et al, 2014)*

Pour le traitement des patients atteints du cancer du sein HER2+ métastatique et ayant déjà reçu un traitement par le trastuzumab et un taxane, l'utilisation du T-DM1 diminue le risque de progression de la maladie et augmente le taux de survie par rapport à l'utilisation de l'association lapatinib-capécitabine<sup>81</sup>. Le T-DM1 présente également une efficacité anti-cancéreuse sur les tumeurs mammaires HER2+ résistantes à la fois au trastuzumab et au lapatinib<sup>80</sup>. L'arrivée sur le marché du T-DM1 a donc permis le traitement de cette population de patientes atteintes du cancer du sein HER2+ et présentant une résistance à ces deux traitements ciblant HER2 (trastuzumab et lapatinib)<sup>82</sup>. Dans son indication actuelle et d'après l'avis du 19 mars 2014 de la Commission de la Transparence de la HAS, le T-DM1 (Kadcyla<sup>®</sup>) représente un nouveau traitement de deuxième ligne et au-delà du cancer du sein métastatique HER2+.



Pour résumer, les différentes indications thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein HER2+ précoce et métastatique des thérapies ciblant HER2 ont été listées dans le *tableau VI* ci-dessous.

*Tableau VI:* Liste des protocoles de traitements du cancer du sein HER2+ précoce et métastatique (informations tirées du RCP des différents traitements anti-HER2 sur le site de l'EMA)

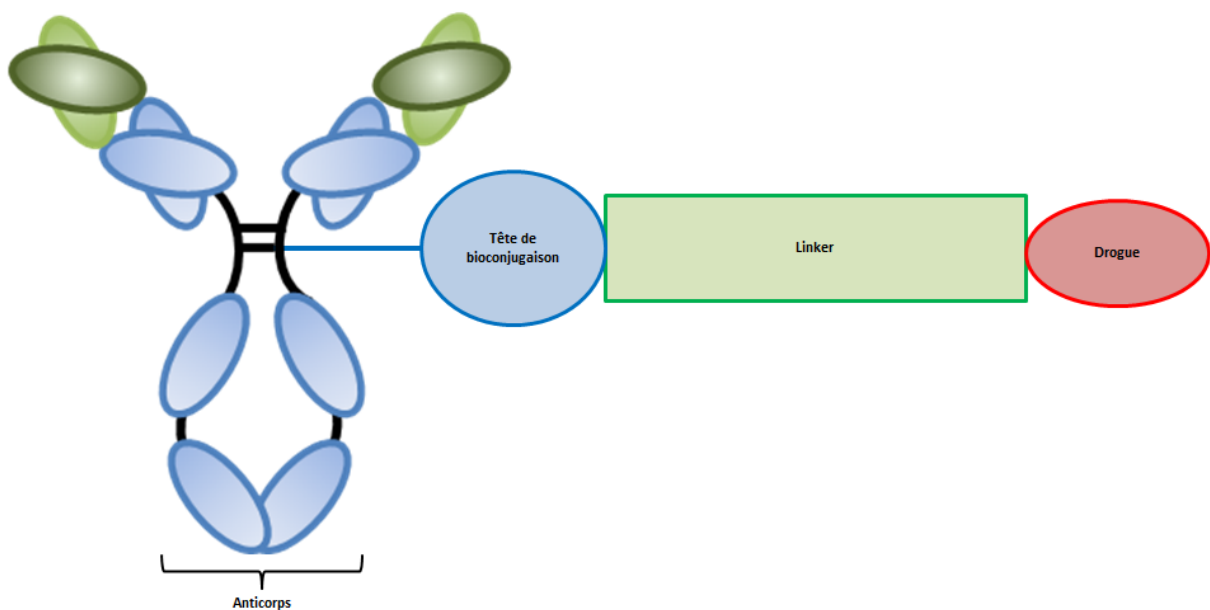
	Protocoles de traitements	Indication thérapeutique
<b>Cancer du sein HER2+ précoce</b>	Trastuzumab Docétaxel Carboplatine	Traitement adjuvant du cancer du sein HER2+ précoce
	Trastuzumab Paclitaxel ou Docétaxel	Traitement du cancer du sein HER2+ précoce après une chimiothérapie adjuvante avec la doxorubicine et le cyclophosphamide
	Trastuzumab Pertuzumab Chimiothérapie	Traitement néoadjuvant ou adjuvant du cancer du sein précoce HER2+ avec un risque élevé de récurrence.
<b>Cancer du sein HER2+ métastatique</b>	Trastuzumab	En monothérapie pour les patients déjà pré-traités par au moins deux protocoles de chimiothérapie pour leur maladie métastatique.
	Trastuzumab Docétaxel	Patients non pré-traités par chimiothérapie pour leur maladie métastatique
	Trastuzumab Paclitaxel	Patients non pré-traités par chimiothérapie pour leur cancer du sein métastatique et chez lesquels le traitement par anthracyclines ne peut pas être envisagé.
	Trastuzumab Anti-aromatase	Patientes ménopausées ayant des récepteurs hormonaux positifs, non traitées précédemment par trastuzumab
	Trastuzumab Pertuzumab Docétaxel	Patientes n'ayant pas reçu au préalable de traitement anti-HER2 ou de chimiothérapie pour leur maladie métastatique
	Lapatinib Capécitabine	Patientes ayant une maladie avancée ou métastatique en progression après un traitement antérieur ayant comporté une anthracycline, un taxane et le trastuzumab.
	Lapatinib Trastuzumab	Patientes ayant une maladie métastatique avec des récepteurs hormonaux négatifs, en progression après un traitement antérieur par trastuzumab en association à une chimiothérapie.
	Lapatinib Anti-aromatase	Patientes ménopausées ayant une maladie métastatique avec des récepteurs hormonaux positifs et pour lesquelles la chimiothérapie n'est actuellement pas envisagée
	T-DM1	En monothérapie, dans le traitement de patientes adultes atteintes d'un cancer du sein HER2+ métastatique ou localement avancé non résectable ayant reçu au préalable du trastuzumab et un taxane



### III- Anticorps armés ou Antibody-Drug Conjugate (ADC)

#### A- Structure d'un ADC

Un anticorps armé ou ADC est composé d'un agent cytotoxique greffé sur un anticorps thérapeutique par l'intermédiaire d'un linker adapté (*figure 16*). Un ADC correspond à une chimiothérapie vectorisée ciblant les cellules tumorales permettant la délivrance sélective d'un agent cytotoxique au niveau de la tumeur tout en limitant la toxicité observée lors d'une administration systémique habituelle de la chimiothérapie.

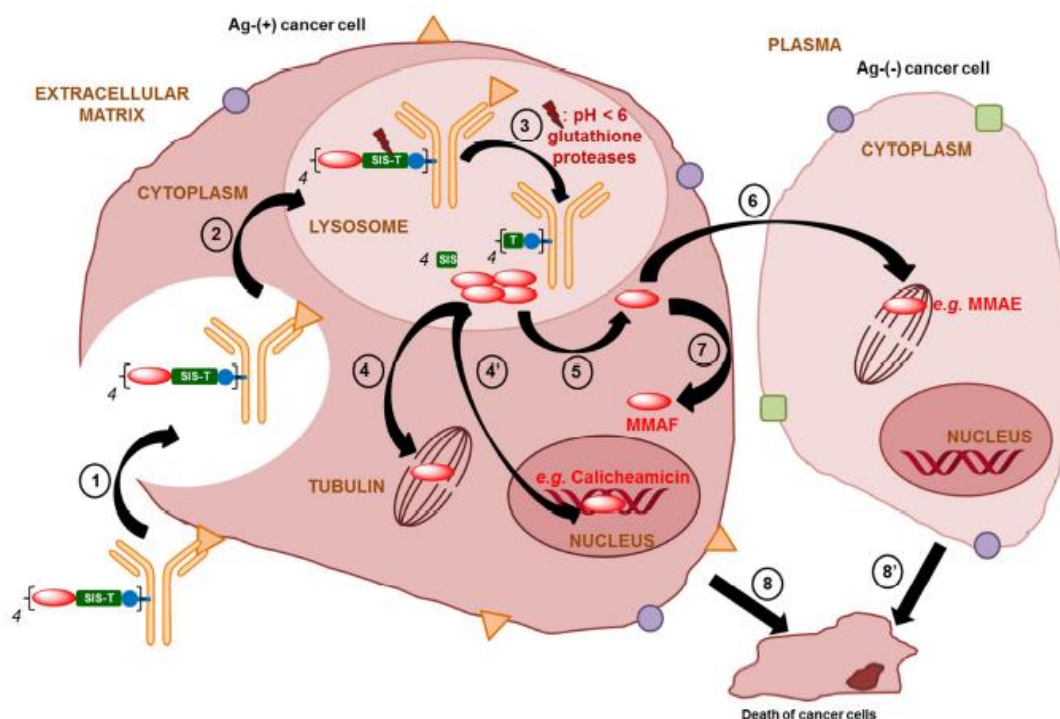


*Figure 16 :* Représentation schématique d'un ADC : la drogue (en rouge) est reliée à un linker (en vert), lui-même relié à une tête de bioconjugaison (en bleu) permettant le greffage sur l'anticorps thérapeutique

Suite au ciblage d'un antigène à la surface d'une cellule tumorale grâce à l'anticorps thérapeutique, l'ADC est internalisée au sein du lysosome de la cellule tumorale où il pourra libérer son agent cytotoxique (*figures 17 et 18*). La libération de l'agent cytotoxique se réalise grâce à un linker approprié. Il existe deux principaux types de linker : un linker clivable, c'est-à-dire que le linker est clivé par les enzymes lysosomales permettant ainsi la libération de l'agent cytotoxique (*figure 17*), et un linker non clivable, c'est-à-dire que la dégradation complète de l'anticorps par les protéases est nécessaire afin de libérer la drogue cytotoxique (*figure 18*). Le linker doit être subtilement construit afin de permettre une libération efficace

de la drogue. En effet, le linker doit être stable lorsque l'ADC circule dans le sang afin d'éviter une toxicité off-target tout en permettant une bonne libération de la drogue active au sein de la cellule tumorale après internalisation de l'ADC. Le linker comportant la drogue est greffé à l'anticorps thérapeutique à travers une réaction de bioconjugaison à l'aide d'une tête de bioconjugaison (*figure 16*). Il existe plusieurs systèmes de greffage qui peuvent se faire sur lysines, sur cystéines ou à travers les ponts disulfures. Une caractéristique importante de l'ADC est le DAR (Drug-to-Antibody-Ratio), c'est-à-dire le nombre de molécules cytotoxiques fixées sur l'anticorps<sup>83</sup>, influençant notamment l'efficacité antitumorale et la toxicité de l'ADC et son comportement pharmacocinétique<sup>84,85</sup>.

Dans ce contexte, l'anticorps thérapeutique a un rôle de vecteur ciblant spécifiquement la cellule tumorale, d'où le terme de chimiothérapie vectorisée. Ceci permet l'utilisation de puissantes drogues cytotoxiques, trop toxique pour être administrée de manière systémique par chimiothérapie. Pour exemple, le DM1, l'agent cytotoxique du T-DM1 (Kadcyla®), est 24 à 270 fois plus puissant que le paclitaxel<sup>80</sup>, anti-cancéreux couramment utilisé en chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein.



*Figure 17 :* Linker clivable : les enzymes lysosomales clivent au niveau du linker permettant la libération de l'agent cytotoxique (extrait de Joubert et al, 2017).

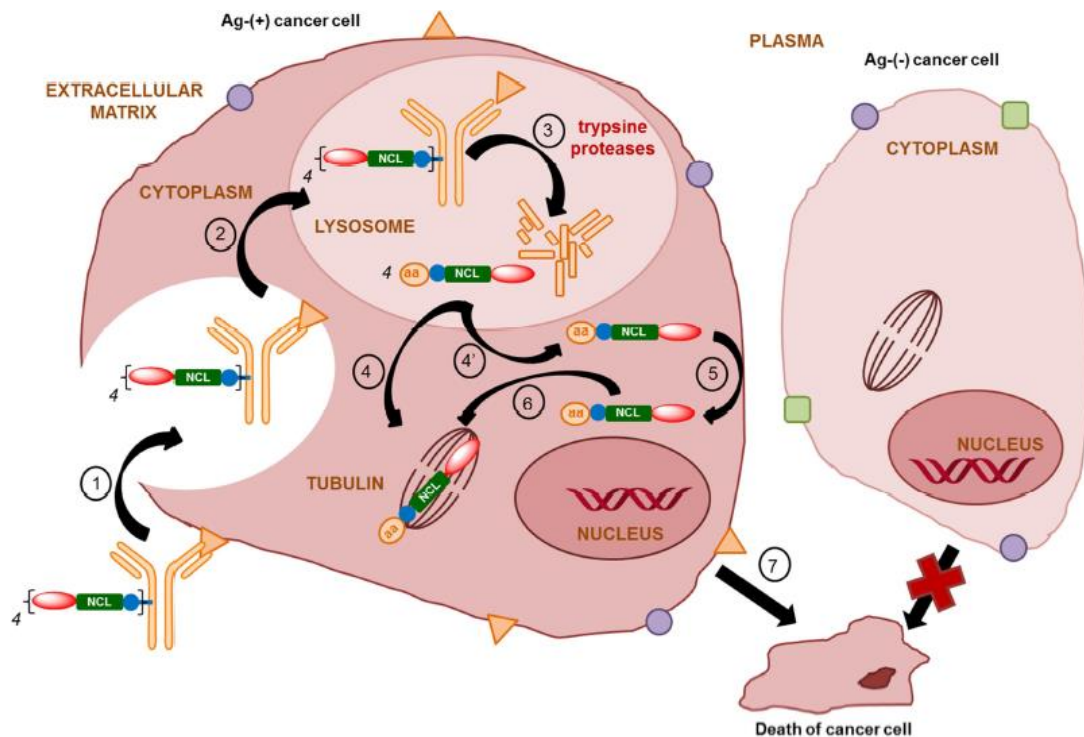


Figure 18 : Linker non clivable : la dégradation complète de l'anticorps est nécessaire afin de libérer le métabolite actif (extrait de Joubert et al, 2017)

## B- Historique des ADC (1ère, 2e, 3e génération)

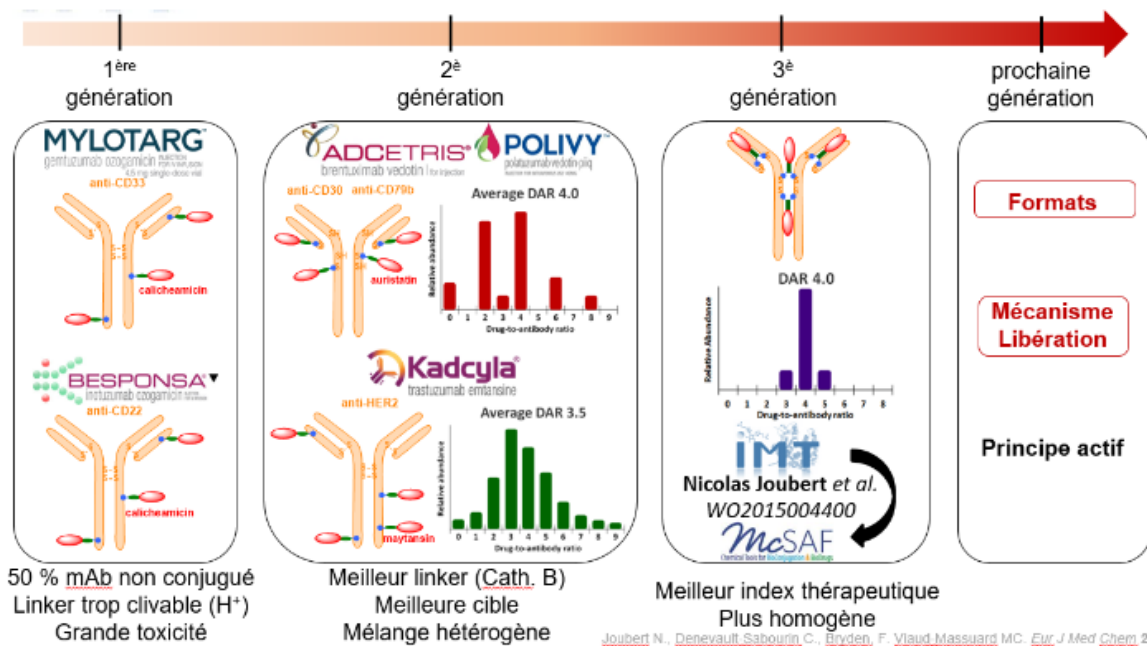


Figure 19 : Les différentes générations d'ADC (extrait de Joubert et al, 2017)

### 1) Du concept de Paul Ehrlich à la conception des ADC de 1<sup>ère</sup> génération

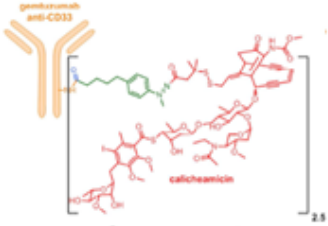
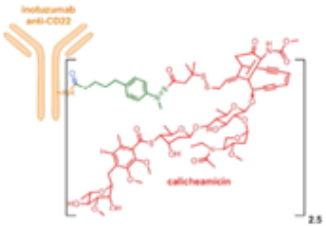
L'histoire des ADC commence avec le concept de « magic bullet » proposé par Paul Ehrlich (Prix Nobel de médecine en 1908) il y a plus de 100 ans. Cette notion proposée par le scientifique allemand repose sur la combinaison d'une drogue cytotoxique à une entité présentant une affinité sélective pour une tumeur afin de former une seule molécule permettant de libérer spécifiquement cet agent cytotoxique dans la tumeur<sup>86</sup>. Les ADC sont les médicaments incarnant le plus fidèlement la vision de « magic bullet » de Paul Ehrlich, l'anticorps monoclonal incarnant l'entité présentant une affinité sélective pour une tumeur.

Le conception et le développement des ADC débute tout d'abord avec l'invention des anticorps monoclonaux en 1975<sup>87</sup>. En effet, ceci a permis la réalisation des premiers essais cliniques d'ADC conçus à base d'IgG murines lors des années 1980s<sup>88</sup>. Ces ADC évalués en essais cliniques n'ont pas été mis sur le marché et correspondent à la génération 0 des ADC. Ce n'est qu'en 2000 que le domaine des ADC fait un grand pas en avant avec la mise sur le marché du premier ADC, le gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg<sup>®</sup>) (*tableau VII*). Le Mylotarg<sup>®</sup>, développé par Wyeth, a obtenu l'AMM par la FDA en 2000. Il est composé d'un anticorps anti-CD33, le gemtuzumab, conjugué à la calichéamicine via un linker sensible au pH acide et au milieu réducteur (glutathion). Il est utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde aiguë. En revanche, en 2010, le médicament a été volontairement retiré du marché par Pfizer suite à une étude post-AMM démontrant que le gemtuzumab ozogamicin accompagné de la chimiothérapie n'augmente pas la survie et montre un risque accru de toxicité fatale par rapport à la chimiothérapie seule. Cependant, le Mylotarg<sup>®</sup> a été remis sur le marché par la FDA et l'EMA en 2017 et 2018 respectivement suite à d'autres études de phase II et de phase III montrant un bénéfice de ce médicament à des doses plus fractionnées et plus faibles<sup>89</sup>. Il est le chef de file des ADC de 1<sup>ère</sup> génération. Un deuxième ADC de première génération a été mis sur le marché en juin 2017, l'inotuzumab ozogamicin ou Besponsa<sup>®</sup> (*tableau VII*). Cet ADC utilise le même linker et la même drogue que le Mylotarg<sup>®</sup>. Il est composé d'un anticorps anti-CD22, l'inotuzumab, et est utilisé dans le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë.

Les ADC de 1<sup>ère</sup> génération présentent plusieurs caractéristiques (*figure 19*). Tout d'abord, ils présentent une très grande hétérogénéité au niveau de leur DAR avec environ 50% d'anticorps non conjugué<sup>90</sup>. De plus, ils possèdent un linker sensible au pH acide et au milieu réducteur (glutathion). Ce linker présente une grande instabilité ce qui entraîne une libération

prématurée de la drogue cytotoxique dans la circulation sanguine provoquant ainsi une forte toxicité systémique de ces ADC<sup>83</sup>.

*Tableau VII : Liste des ADC de 1<sup>ère</sup> génération sur le marché*

	ADC de 1 <sup>ère</sup> génération	
	<b>Mylotarg®</b> <b>(gemtuzumab ozogamicin)</b> 	<b>Besponsa®</b> <b>(inotuzumab ozogamicin)</b> 
Cible	Anti-CD33	Anti-CD22
Indication	Leucémie myéloïde aiguë	Leucémie lymphoblastique aiguë
Mise sur le marché	2000	2017
DAR moyen	2,5	2,5
Linker	Linker hydrazone sensible au pH acide (linker clivable)	Linker hydrazone sensible au pH acide (linker clivable)
Droque	Calichéamicine (agent alkylant ciblant l'ADN)	Calichéamicine (agent alkylant ciblant l'ADN)

## 2) Les ADC de 2<sup>e</sup> génération

En parallèle de la mise sur le marché du Mylotarg®, d'autres types de linker ainsi que d'autres procédés de bioconjugaison des drogues ont été développés afin d'améliorer la stabilité du linker et la bioconjugaison de la drogue à l'anticorps. C'est dans ce contexte que deux ADC de deuxième génération ont été mis sur le marché : le brentuximab vedotin (Adcetris®) et l'ado-trastuzumab emtansine (T-DM1 ou Kadcyla®) (*tableau VIII*). Le brentuximab vedotin est le premier ADC de deuxième génération mis sur le marché. Développé par Seattle Genetics, il a obtenu l'AMM en 2011 dans le traitement des lymphomes hodgkiniens et anaplasiques à grandes cellules CD30+. La molécule cytotoxique utilisée est la MMAE (Monomethyl Auristatin E), un dérivé de la dolastatine 10, bioconjuguée via un linker clivable

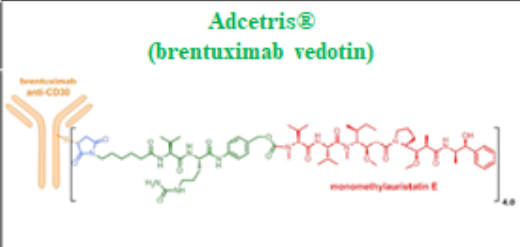

sensible à la cathepsine B (enzyme lysosomale) sur les résidus cystéines d'un anticorps monoclonal anti-CD30, le brentuximab, partiellement réduit.

L'Adcetris® se différencie du Kadcyla® sur plusieurs aspects au niveau de leur conception (*description du Kadcyla® présente dans la partie II-4*). Tout d'abord, sur le type de linker : le linker est clivable pour l'Adcetris® et non clivable pour le Kadcyla®. Ensuite, sur le procédé de bioconjugaison du linker et de la drogue sur l'anticorps : la drogue cytotoxique de l'Adcetris® est bioconjuguée via le linker sur les résidus cystéines du brentuximab alors que la drogue cytotoxique du Kadcyla® est bioconjuguée via le linker sur les résidus histidines du trastuzumab.

Les ADC de deuxième génération présente une meilleure stabilité de leur linker (linker sensible à la cathepsine B ou linker non clivable) ce qui diminue leur toxicité systémique mais conserve néanmoins une certaine hétérogénéité au niveau de leur DAR (*figure 19*).

Parmi les quatre ADC sur le marché actuellement, les ADC de 2<sup>e</sup> génération demeurent plus utilisés que les ADC de 1<sup>ère</sup> génération.

Tableau VIII : Liste des ADC de 2<sup>e</sup> génération sur le marché

	ADC de 2 <sup>e</sup> génération	
	<p><b>Adcetris®</b> (brentuximab vedotin)</p> 	<p><b>Kadcyla®</b> (T-DM1 ou ado-trastuzumab emtansine)</p> 
Cible	Anti-CD30	Anti-HER2
Indication	Lymphomes Hodgkiniens et anaplasiques à grandes cellules CD30+	Cancer du sein HER2+
Mise sur le marché	2011	2013
DAR moyen	4	3,5
Linker	Linker clivable sensible à la cathepsine B	Linker non clivable
Droque	MMAE (Dérivé de la dolastatine 10 ciblant la tubuline)	DM1 (Dérivé de la maytansine ciblant la tubuline)



### 3) Vers le développement des ADC de 3<sup>e</sup> génération

Malgré la conception des ADC de 2<sup>e</sup> génération, des limites demeurent : hétérogénéité du DAR et instabilité du linker. Afin de palier à ces limites, de nouvelles stratégies de conception des ADC sont nécessaires. Ces améliorations concernent différents niveaux de la conception de l'ADC. Une de ces améliorations concerne le procédé de bioconjugaison des drogues afin de palier au problème de l'hétérogénéité du DAR des ADC de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>e</sup> génération. De nouvelles stratégies de bioconjugaison des drogues sont actuellement en développement. Ceci est notamment illustré avec la conception d'une nouvelle technologie propriétaire de greffage sur ponts disulfures de l'anticorps par le biais d'un résidu maléimide de deuxième génération (brevet n° WO20150044A1)<sup>91</sup>. Ce nouveau procédé de bioconjugaison permet d'obtenir des ADC de 3<sup>e</sup> génération présentant un DAR homogène et par conséquent, un meilleur index thérapeutique (*figure 19*).

Une autre amélioration porte sur l'optimisation du linker que ce soit au niveau de l'amélioration de la stabilité du linker ou de la réduction de l'hydrophobicité de celui-ci afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques des ADC<sup>92</sup>. D'autres thèmes de recherche portent également sur la conception de nouveaux linkers permettant de nouvelles stratégies de libération de la drogue dans le microenvironnement tumoral et non à l'intérieur de la cellule tumorale<sup>83</sup>. Enfin, les autres axes d'amélioration de la conception des ADC portent non seulement sur l'optimisation et la recherche de nouvelles drogues cytotoxiques<sup>93,94</sup> mais concernent aussi la partie anticorps de l'ADC avec la conception de nouveaux formats et notamment l'utilisation de fragments d'anticorps afin de surmonter le problème de la faible pénétration tumorale des ADC de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>e</sup> génération<sup>95-97</sup>.

L'ensemble de ces nouvelles stratégies de conception des ADC va permettre le développement et l'émergence des prochaines générations des ADC (*figure 19*).

## C- Limites des ADC

Les ADC ayant obtenus l'AMM présentent quatre principales limites : une hétérogénéité au niveau de leur DAR, une faible pénétration tumorale, une toxicité off-target ainsi que des mécanismes de résistances. Pour illustrer ces propos, on prendra l'exemple du Kadcyla® ou T-DM1.

### 1) Hétérogénéité du DAR

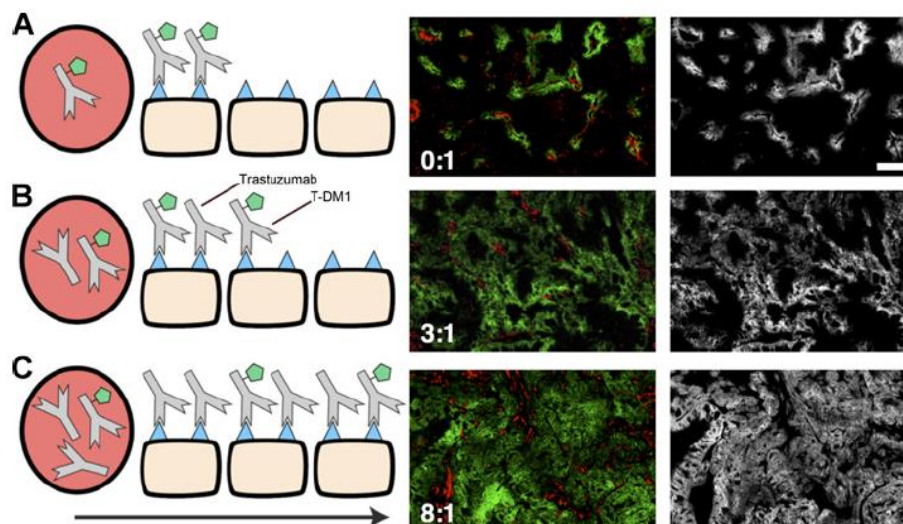
Tout d'abord, le T-DM1 présente une grande hétérogénéité au niveau de son DAR<sup>98</sup>. Il a été montré que le DAR optimal pour les ADC est de 4 en utilisant un dérivé d'auristatine ou de maytansine<sup>84</sup>. En effet, un DAR 1 ou 2 présente une activité faible voire insuffisante et un DAR au-delà de 4 entraîne un risque d'aggrégation et une certaine instabilité<sup>99,100</sup> ainsi qu'une augmentation de la toxicité et une pharmacocinétique inadéquate<sup>85</sup>. En effet, Hamblett et al<sup>84</sup> ont montré qu'un DAR 8, bien que présentant une meilleure efficacité *in vitro*, se trouve être moins efficace qu'un DAR 4 *in vivo* et présente une clairance accrue ainsi qu'une augmentation de sa toxicité diminuant ainsi son index thérapeutique. Cette pharmacocinétique inadéquate est due à l'hydrophobicité du linker<sup>92</sup> qui favorise l'élimination de l'ADC à DAR élevé par le système réticulo-endothélial<sup>101</sup>. Par conséquent, en cas d'hétérogénéité du DAR, chaque fraction présente une efficacité, une toxicité et un comportement pharmacocinétique différents compliquant ainsi l'utilisation clinique du T-DM1 ou de tout autre ADC obtenu par une méthode de bioconjugaison stochastique.

### 2) Faible pénétration tumorale

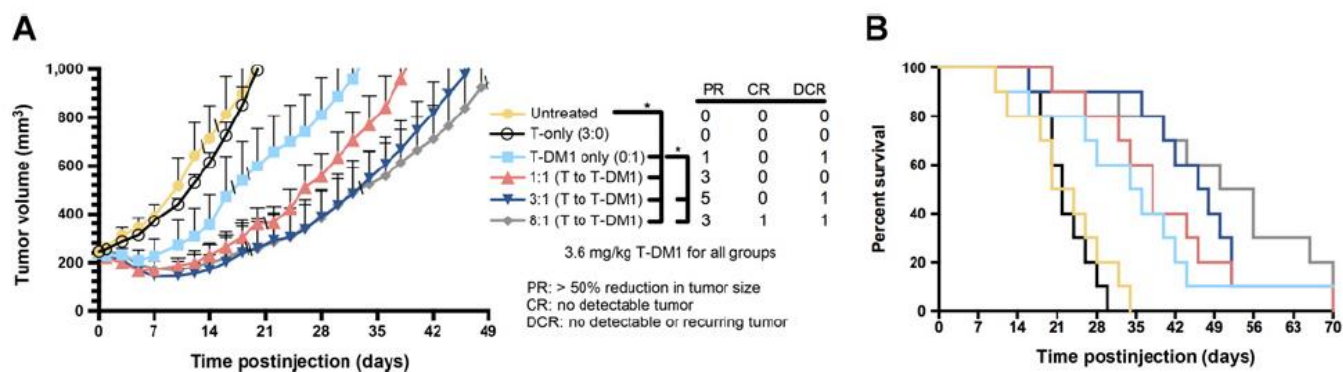
Dans le cas des tumeurs solides comme les tumeurs mammaires, le trastuzumab (AcMo) ou le T-DM1 (ADC), dans leur format IgG et de par leur grande taille (150kDa), présentent une faible pénétration tumorale, une distribution intra-tumorale non homogène et une accumulation lente au niveau de la tumeur<sup>102</sup>. En effet, seulement 0,01% environ de la dose injectée en anticorps est localisée au sein de la tumeur solide 24h après son administration<sup>86</sup>. Ce phénomène est principalement dû à la géométrie tortueuse des cellules tumorales ainsi qu'au réseau dense de fibres de collagènes présent au sein des tumeurs solides<sup>102,103</sup> qui empêchent une bonne diffusion intra-tumorale des macromolécules comme les anticorps<sup>103</sup>. La faible pénétration tumorale du T-DM1 pose problème puisqu'il se traduit notamment par une diminution de son efficacité anti-tumorale<sup>104</sup>. En effet, Cilliers et al<sup>104</sup> ont montré qu'une co-administration de trastuzumab avec le T-DM1 permet au T-DM1 d'atteindre les récepteurs HER2 au centre de la tumeur permettant ainsi d'améliorer sa pénétration tumorale et rendant sa distribution



intra-tumorale plus homogène (figure 20). De plus, ils ont montré que cette amélioration de la pénétration tumorale du T-DM1 avait une répercussion clinique se traduisant par une augmentation de son efficacité anti-tumorale ainsi qu'une augmentation de la survie *in vivo*, et cela indépendamment de la dose (figure 21)<sup>104</sup>.



**Figure 20 :** La co-administration de trastuzumab (B et C) avec le T-DM1 (fluorescence verte) améliore la pénétration tumorale du T-DM1 et rend sa distribution intra-tumorale plus homogène (extrait de Cilliers et al, 2018, Cancer Research)



**Figure 21 :** L'amélioration de la pénétration tumorale du T-DM1 par co-administration de trastuzumab (3 :1 et 8 :1) permet une diminution de la croissance tumorale (A) et une augmentation de la survie *in vivo* chez la souris (B), indépendamment de la dose (extrait de Cilliers et al, 2018, Cancer Research)

### 3) Toxicité off-target

#### a) Thrombopénie induite par le T-DM1

La thrombopénie est la principale toxicité observée lors de l'administration du T-DM1 (thrombopénie de grade supérieur ou égal à 3 observé dans 5%<sup>105</sup> à 12,9%<sup>81</sup> des patients en essai de phase III). Cette toxicité définit la dose maximale tolérée (DMT = 3,6 mg/kg<sup>106</sup>) du T-DM1 et par conséquent la posologie d'administration de ce médicament (3,6 mg/kg en IV toutes les 3 semaines<sup>107</sup>). De plus, définissant la DMT, la thrombopénie induite par le T-DM1 limite l'efficacité anti-tumorale du T-DM1. Il a été notamment observé que l'activité anti-tumorale du T-DM1 est plus forte à une dose de 15 mg/kg<sup>108</sup>. En effet, 35-60% des tumeurs mammaires ont montré une régression complète aux doses égales ou supérieures à 15 mg/kg toutes les 3 semaines<sup>108</sup>. Par conséquent, à la dose maximale tolérée (DMT = 3,6 mg/kg), la capacité maximale du T-DM1 en termes d'efficacité anti-tumorale n'est pas atteinte.

La thrombopénie induite par le T-DM1, indépendante de la fixation au récepteur HER2 (toxicité off-target), n'agit pas directement sur les plaquettes mais au niveau des mégacaryocytes (cellules progénitrices des plaquettes), en particulier lors de la différenciation de ces cellules à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse<sup>109,110</sup>. Le T-DM1 est donc internalisé par les mégacaryocytes et libère son métabolite cytotoxique (lysine-linker-DM1) tuant ainsi la cellule progénitrice des plaquettes induisant une thrombopénie par diminution de la production des plaquettes. En revanche, le mécanisme d'internalisation du T-DM1 par les mégacaryocytes n'est pas clair. Uppal et al<sup>109</sup> observe que l'internalisation du T-DM1 se fait par une voie dépendante des récepteurs FcγRIIA (CD32) présents à la surface des mégacaryocytes. Le FcγRIIA est un récepteur FcγR activateur présent à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes se liant aux anticorps via leur fragment Fc<sup>111</sup>. Le T-DM1 se lierait à ce récepteur par sa partie Fc et serait internalisé par les mégacaryocytes après fixation à ce récepteur. En revanche, Zhao et al<sup>112</sup> propose une autre voie d'internalisation du T-DM1 indépendante du récepteur FcγRIIA, une voie dépendante de la macropinocytose. A l'état actuel des connaissances, il est fortement probable qu'il y ait plusieurs mécanismes impliqués dans l'internalisation du T-DM1 par les mégacaryocytes, approche partagée par Hinrichs et al<sup>113</sup>, avec d'une part, un mécanisme d'endocytose Fc-dépendant via les récepteurs FcγRIIA présents à la surface des mégacaryocytes mais aussi, d'autre part, un mécanisme d'endocytose non spécifique et Fc-indépendant comme la macropinocytose.

## b) Hépatotoxicité off-target

Une autre principale toxicité observée avec les ADCs est une toxicité hépatique. Il a été rapporté une toxicité hépatique de grade supérieur ou égal à 3 (augmentation des ALT et des AST) chez 6,9% des patients sous T-DM1<sup>114</sup>. D'autres études montrent le même ordre de grandeur de patients sous T-DM1 atteints de toxicité hépatique avec une augmentation des AST et des ALT de grade 3 ou supérieur chez 4,3% et 4,1% des patients respectivement<sup>115</sup>. Tout comme la thrombopénie induite par le T-DM1, le mécanisme de l'hépatotoxicité induite par le T-DM1 reste méconnu. Plusieurs mécanismes sont proposés afin d'expliquer l'hépatotoxicité par le T-DM1. Un premier mécanisme d'internalisation du T-DM1, proposé par Gorovits et al<sup>116</sup>, dépendant des récepteurs aux mannoses, serait Fc-dépendant. Les récepteurs aux mannoses (MR) sont des récepteurs, appartenant à la superfamille des lectines de type C, se liant et internalisant les glycoprotéines<sup>117</sup>. Les anticorps entiers possèdent un résidu glucidique au niveau de leur partie Fc. Par conséquent, le T-DM1, de par son format IgG entier, se lierait aux MR par les glycanes présents au niveau de sa partie Fc. Les glycanes des anticorps possèdent 2 motifs terminaux et sont caractérisés selon trois glycoformes : IgG-G2F correspondant aux glycanes ayant 2 motifs galactoses terminaux, IgG-G1F, un galactose terminal et IgG-G0F, aucun galactose au niveau du motif terminal. L'absence de galactose terminal (IgG-G0F) favorise la liaison des glycanes avec les mannoses récepteurs. La production d'anticorps entier par les cellules CHO entraîne, au niveau du motif de glycosylation, une forte proportion de glycoforme G0F (66%)<sup>118</sup>, rendant possible la liaison et l'endocytose via les MR de ces IgG entières par les cellules endothéliales sinusoidales du foie<sup>119</sup>. L'hépatotoxicité observée avec le T-DM1, de par son format IgG entier, peut être expliquée par ce mécanisme. Un deuxième mécanisme d'internalisation des ADCs par les hépatocytes, dépendant de la drogue cytotoxique du T-DM1 (DM1) et par conséquent Fc-indépendant, est proposé par Endo et al<sup>120</sup>. En effet, le DM1 se lierait à la protéine CKAP5 (Cytoskeleton-associated protein 5), protéine présente à la surface des hépatocytes et ayant un rôle dans la régulation de la polymérisation des microtubules. Cette internalisation du T-DM1 par ces hépatocytes entraînerait une toxicité off-target sur ces cellules par une dérégulation de la structure du cytosquelette cellulaire entraînant ainsi leur apoptose. Tout comme la thrombopénie induite par le T-DM1, il est fort probable que l'hépatotoxicité induite par cet ADC soit également multifactoriel avec d'une part un mécanisme d'internalisation Fc-dépendant via la liaison du motif de glycosylation de

l'anticorps aux MR et d'autre part, un mécanisme Fc-indépendant et dépendant de la drogue cytotoxique.

#### 4) Mécanismes de résistance

Des mécanismes de résistance au T-DM1 ont tout d'abord été observés lors des essais précliniques<sup>121,122</sup>. Ces mécanismes de résistance ont également été observés lors des essais cliniques où deux types de résistance au T-DM1 ont été mis en évidence : la résistance innée (primary resistance) et la résistance acquise (acquired resistance)<sup>123</sup>. La résistance innée, inhérente à l'individu, est peu fréquente en particulier chez les patientes non traitées au préalable par le trastuzumab<sup>123,124</sup>. La résistance acquise au T-DM1, plus fréquente, apparaît, elle, après un traitement prolongé au T-DM1<sup>123</sup>. Les mécanismes de résistance au T-DM1 sont des processus complexes et variés avec une implication plus ou moins importante de différents mécanismes de résistances selon le profil génétique des cellules tumorales mammaires<sup>125</sup>. L'étude de ces mécanismes de résistance est effectuée sur des lignées cellulaires de tumeur mammaire HER2+ rendues résistantes au T-DM1, soit d'une part, *in vitro*, par administration continue d'une faible concentration de T-DM1 ou par administration cyclique d'une forte concentration de T-DM1 ou d'autre part, par sélection *in vivo* de modèles de tumeurs mammaires humaines greffées chez la souris<sup>126</sup>.

Cinq grands mécanismes de résistance au T-DM1 se distinguent, (i) la diminution de l'expression de HER2, (ii) l'altération des voies d'endocytose et du transport vésiculaire intracellulaire du T-DM1, (iii) l'altération du traitement et de la libération du métabolite actif du T-DM1 (lysine-MCC-DM1) sur son site d'action, (iv) la perte de HER2 (Ag) et (v) le recyclage du complexe ADC/Ag en dehors de la cellule.

Le premier mécanisme de résistance est notamment observé à la surface de trois lignées cellulaires mammaires tumorales résistantes au T-DM1 : les cellules JIMT1-TM, HCC1954 et BT-474-TM<sup>126</sup>. Cette diminution de l'expression des récepteurs HER2 à la surface des cellules résistantes au T-DM1 entraîne une altération de la liaison du T-DM1 sur ces cellules (diminution de 58% de la liaison globale du T-DM1 à HER2 observée avec la lignée cellulaire JIMT1-TM<sup>125</sup>).

Le deuxième grand mécanisme de résistance est l'altération des voies d'endocytose et de transport vésiculaire intracellulaire du T-DM1<sup>126</sup>. Ce mécanisme est illustré par deux phénomènes. Premièrement, il y a une implication plus importante de l'endocytose et du

transport vésiculaire du T-DM1 via les cavéosomes (cavéoline-dépendant) au détriment du transport vésiculaire via les endosomes et les lysosomes, site de libération du métabolite actif du T-DM1<sup>127</sup>. Deuxième, il se présente une altération générale dans la régulation du cytosquelette et dans le transport des vésicules endosomales et lysosomales<sup>125</sup> et notamment des protéines impliquées dans la biogénèse et le transport intracellulaire des endosomes et des lysosomes.

Le troisième grand mécanisme de résistance au T-DM1 est l'altération du traitement et de la libération du métabolite actif du T-DM1 (lysine-MCC-DM1) sur son site d'action. Ce mécanisme se caractérise tout d'abord par une altération de l'activité protéolytique du lysosome se traduisant ainsi par une diminution du catabolisme du T-DM1 en son métabolite actif au sein du lysosome<sup>128</sup>. De plus, le transport du T-DM1 vers son site d'action, en l'occurrence les microtubules présents dans le cytoplasme, est altéré. Ceci se traduit d'une part, par l'altération de la sortie du T-DM1 du lysosome vers le cytoplasme via la protéine SLC46A3<sup>129</sup> (perte de la protéine SLC46A3<sup>130</sup>) et d'autre part, la surexpression des protéines ABC (ATP-Binding Cassette) humaines (MDR1, BCRP, MRP1) qui favorisent l'expulsion du T-DM1, et plus particulièrement du DM1, en dehors de la cellule<sup>131,132</sup>. L'augmentation du niveau d'expression de ces protéines ABC a été observée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales résistantes au T-DM1<sup>125,126,130</sup>.

Le quatrième grand mécanisme de résistance au T-DM1 est la perte (*shedding*) de HER2. Ce mécanisme se traduit par la perte du domaine extracellulaire du récepteur HER2 afin de former la protéine tronquée p95HER2. Ce récepteur HER2 tronqué, n'ayant pas de domaine extracellulaire, ne présente pas de sous-domaine IV, site de liaison du trastuzumab et du T-DM1, empêchant ainsi la liaison du T-DM1 à ce récepteur<sup>123</sup>.

Le dernier grand mécanisme de résistance au T-DM1 est le recyclage du complexe ADC/Ag en dehors de la cellule. Cette augmentation du recyclage du complexe T-DM1/Ag en dehors de la cellule empêche la dégradation du trastuzumab et par conséquent la libération du métabolite actif dans la cellule<sup>123</sup>.

## IV- Fragments d'anticorps

### A- Structure d'un fragment d'anticorps

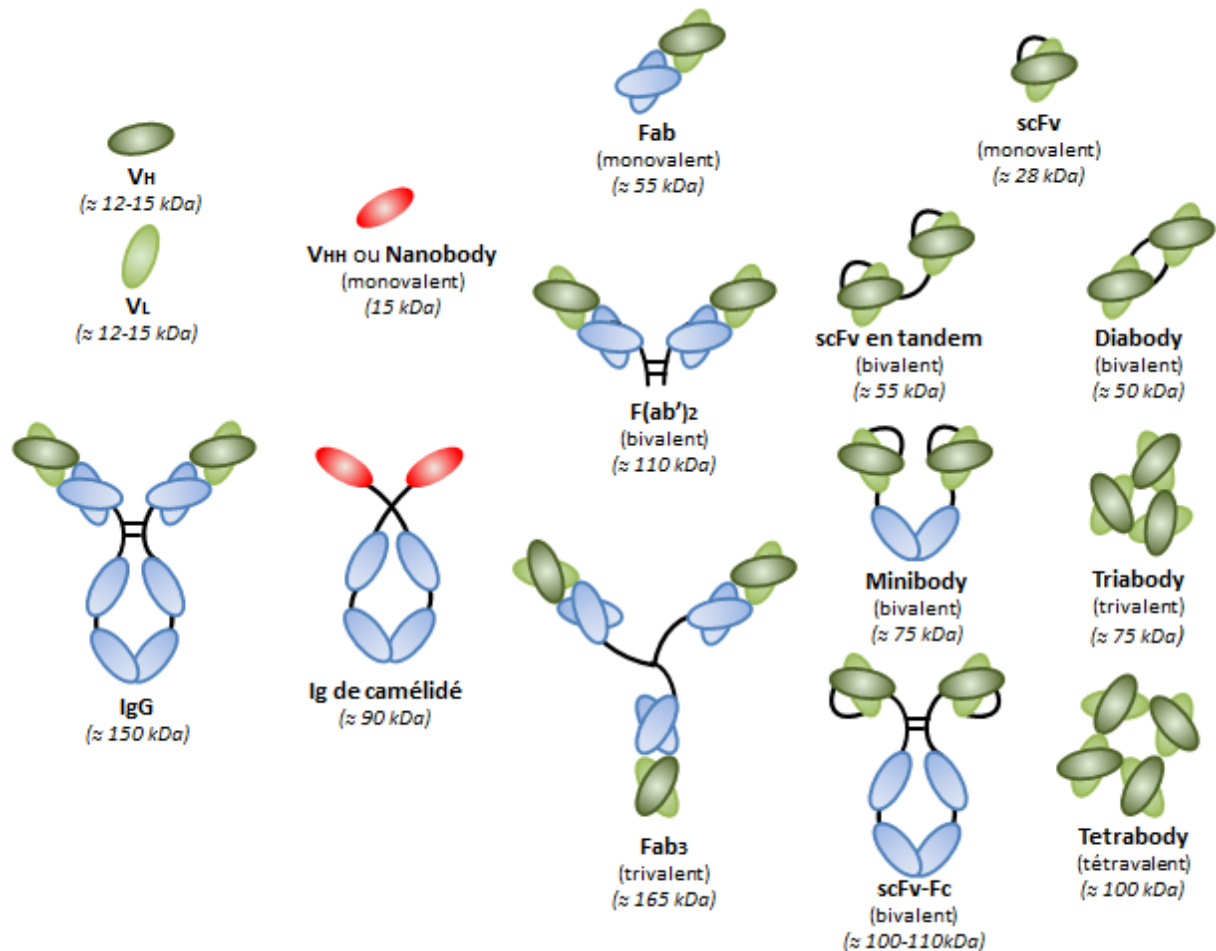


Figure 22 : Représentation schématique de différents formats d'anticorps (inspiré de Holliger P. et al, 2005)

L'IgG entière humaine est un anticorps bivalent composé de deux chaînes lourdes, chacune composée de trois domaines constants CH3, CH2 et CH1 et d'un domaine variable VH, et de deux chaînes légères, chacune composée d'un domaine constant CL et d'un domaine variable VL (figure 22). Les domaines variables VH et VL forment le fragment Fv, support de la reconnaissance antigénique. Les fragments d'anticorps sont une partie de l'IgG entière comportant les domaines VH et VL (ou fragment Fv). Il existe de nombreux fragments d'anticorps se différenciant de par leur structure et leur valence. Deux principaux fragments d'anticorps monovalents découlent du format IgG entier, le fragment Fab et le fragment scFv (figure 22). Le fragment Fab est un des premiers fragments qui a pu être isolé notamment

grâce à la digestion protéolytique de l'anticorps par la papaine qui permet d'obtenir deux fragments Fab et un fragment Fc. L'autre fragment d'anticorps qui peut être obtenu par digestion protéolytique est le fragment  $F(ab')_2$  (*figure 22*), fragment obtenu suite à la digestion protéolytique de l'anticorps à l'aide de la pepsine. De nos jours, les anticorps entiers et les fragments d'anticorps sont des protéines recombinantes conçues par biologie moléculaire et produites via des systèmes d'expression procaryotes ou eucaryotes. Le fragment Fab est un fragment d'anticorps monovalent d'environ 55 kDa composé des domaines constants CH1 et CL et des domaines variables VH et VL. Plusieurs fragments Fab peuvent être reliés entre eux grâce à des liens peptidiques afin d'obtenir des fragments bivalents voire trivalents comme le fragment  $Fab_3$  (*figure 22*). L'autre fragment d'anticorps monovalent obtenu à partir du format IgG est le fragment scFv (28 kDa) (*figure 22*). Cette construction résulte de l'association d'un domaine VH et d'un domaine VL via un linker peptidique de 12 à 15 acides aminés. De cette construction découle deux principaux fragments d'anticorps bivalents. Le premier est le format diabody. Ce format résulte de la réduction du lien peptidique à environ 5 acides aminés entre les domaines VH et VL. Ce raccourcissement de la longueur du lien entraîne un auto-assemblage des domaines VH et VL sous la forme de dimère afin de former le diabody (50 kDa) (*figure 22*). Une réduction supplémentaire de la longueur de ce lien peptidique peut également entraîner la formation de formats trivalents comme le triabody (75 kDa) ou tétravalents comme le tétrabody (100 kDa) (*figure 22*)<sup>133,134</sup>. Le deuxième fragment d'anticorps bivalent est le scFv en tandem. Ce fragment d'environ 55 kDa résulte de la liaison de deux fragments scFv via un lien peptidique (*figure 22*). Il existe également d'autres formats bivalents obtenus à partir du format scFv. En effet, deux fragments scFv peuvent être reliés aux domaines CH3 de la chaîne lourde des IgG afin de former un minibody, fragment bivalent de 75kDa environ (*figure 22*). Deux fragments scFv peuvent également être reliés à un fragment Fc afin de former le fragment scFv-Fc, autre fragment bivalent de 100-110 kDa environ (*figure 22*).

Il existe également des fragments d'anticorps issus des Ig de camélidés. Les Ig de camélidés se caractérisent par l'absence de chaînes légères. En effet, les Ig de camélidés sont composés de deux chaînes lourdes portant chacune un domaine  $V_{HH}$ , support de la reconnaissance antigénique. Le fragment le plus couramment utilisé issu de ces Ig de camélidés est le nanobody. Le nanobody est un fragment monovalent correspondant au domaine  $V_{HH}$  (*figure 22*). Les nanobodies ou  $V_{HH}$  sont caractérisés par un très faible poids moléculaire (15 kDa), une forte stabilité et une grande pénétration au sein des différents tissus<sup>135</sup>. De par ces



caractéristiques, les nanobodies occupent une place de plus en plus importante dans le développement des fragments d'anticorps thérapeutiques<sup>136</sup>.

## B- Marché des fragments d'anticorps

Le marché des fragments d'anticorps est un marché qui a débuté en même temps que celui des anticorps monoclonaux puisque le premier fragment d'anticorps approuvé par la FDA (Food and Drug Administration), l'abuximab (ReoPro<sup>®</sup>, Centocor) a reçu l'AMM en décembre 1994<sup>136</sup>. C'est un marché qui a connu deux principales périodes d'arrêt ou de *stand-by* avec une absence de nouveaux fragments d'anticorps mis sur le marché entre 1994 et 2006, et entre 2008 et 2014.

En revanche, c'est aujourd'hui un marché qui connaît un essor au niveau du nombre de fragments d'anticorps mis sur le marché et en recherche clinique. En effet, en 2008, seulement quatre fragments d'anticorps, tous des formats Fab, ont été mis sur le marché. Trois d'entre eux ont été approuvés par la FDA, l'abuximab (ReoPro<sup>®</sup>, Centocor), le ranibizumab (Lucentis<sup>®</sup>, Genentech) et le certolizumab pegol (Cimzia<sup>®</sup>, UCB), et un a été approuvé par l'agence chinoise du médicament (CFDA), le radioiodinated metuximab (Licartin<sup>®</sup>, Chengdu Hoist Hi-tech). Mais fin 2018, quatre fragments supplémentaires ont été mis sur le marché, le blinatumomab (Blinicyto<sup>®</sup>, Amgen), l'idarucizumab (Praxbind<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim), le caplacizumab (Cablivi<sup>®</sup>, Sanofi), et le moxetumomab pasudotox (Lumoxiti<sup>®</sup>, AstraZeneca) (*tableau IX*). Le nombre de fragments d'anticorps en recherche clinique (étude de phase III) devient également de plus en plus important avec deux fragments en essai de phase III fin 2008 (le naptumomab estafenatox et le VB4-845)<sup>136</sup> contre quatre fragments en 2018<sup>137</sup> :

- le brolocizumab (Novartis) : scFv humanisé anti-VEGF-A dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (ophtalmologie)
- l'oportuzumab monatox (Viventia Bio) : scFv anti-EpCAM conjugué à l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* dans le traitement du cancer de la vessie
- l'association L19IL2, diabody anti-fibronectine conjugué à l'interleukine 2<sup>138</sup> + L19TNF, scFv anti-fibronectine conjugué au TNF $\alpha$ <sup>138</sup> (Philogen SpA) dans le traitement du mélanome.
- Le KN035 (Alphamab), scFv-Fc anti-PD-L1 dans le traitement du carcinome des voies biliaires.



De plus, le marché des fragments d'anticorps est en pleine mutation et de plus en plus diversifié. Cette diversité s'observe au niveau du format des fragments mais aussi au niveau des indications pour lesquelles les fragments d'anticorps sont utilisés. La diversité au niveau des formats s'observe tout d'abord au niveau du développement clinique. En effet, avant 1995, 100% des fragments d'anticorps en recherche clinique avaient un format Fab contre 37% pendant la période 2000-2008 illustré notamment par une proportion des fragments de format scFv qui devient de plus en plus importante (53% des fragments en recherche clinique en 2008)<sup>136</sup>. Cette diversité des formats se vérifie également au regard des fragments d'anticorps mis sur le marché. En 2008, les quatre fragments d'anticorps sur le marché ont tous un format Fab alors que parmi les quatre autres fragments mis sur le marché après 2008, un seul présente un format Fab (Idarucizumab). La proportion des autres formats sur le marché devient par conséquent de plus en plus importante avec notamment, un fragment de type scFv (Moxetumomab pasudotox), un fragment de type scFv en tandem (Blinatumomab) et un fragment de type nanobody (Caplacizumab) parmi les huit fragments sur le marché en 2018 (*tableau IX*). De plus, le marché des fragments d'anticorps est diversifié au niveau des indications thérapeutiques que ce soit dans le domaine de la cancérologie (radioiodinated metuximab, blinatumomab, moxetumomab pasudotox) ou des indications non cancéreuses comme les pathologies hématologiques (idarucizumab, caplacizumab), cardiaques (abciximab), ophtalmiques (ranibizumab) et inflammatoires (certolizumab).

Enfin, le marché des fragments d'anticorps est dynamique avec une implication forte des différents acteurs de l'industrie pharmaceutique que ce soit les « Big Pharma » comme Sanofi (caplacizumab), Roche (ranibizumab), Boehringer Ingelheim (idarucizumab), AstraZeneca (moxetumomab pasudotox) ou Novartis (brolucizumab en phase III) mais aussi les laboratoires spécialisés dans les biotechnologies comme Viventia Bio (oportuzumab monatox en phase III), Phylogen SpA (L19IL2 + L19TNF en phase III) ou Alphamab (KN035 en phase III). Cette implication forte des laboratoires pharmaceutiques dans le développement des fragments d'anticorps thérapeutiques démontre que la production industrielle de ces fragments d'anticorps est viable et ceci devrait engendrer une place de plus en plus importante de ces formats au sein du marché des anticorps thérapeutiques.

**Tableau IX :** Fragments d'anticorps sur le marché en 2018

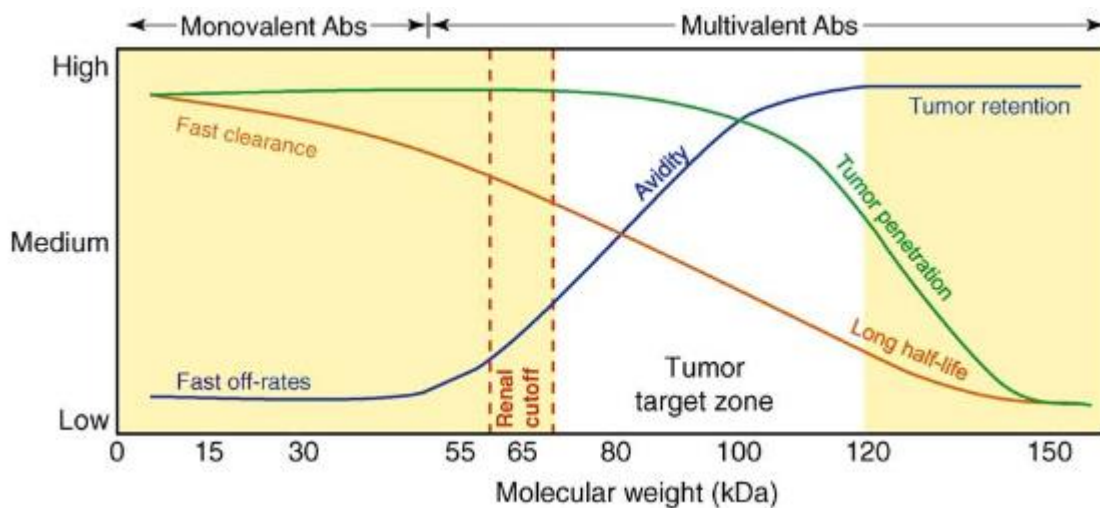
Nom	Description	Indication	Date de première mise sur le marché USA (FDA) ou Europe (EMA)	Industrie pharmaceutique
Abciximab (ReoPro®)	Fab anti-GPIIb/IIIa	Antiagrégant plaquettaire utilisé dans la prise en charge des angors instables et des angioplasties coronaires	22/12/1994 (FDA)	Centocor
Ranibizumab (Lucentis®)	Fab anti-VEGF	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	30/06/2006 (FDA)	Genentech (Roche)
Certolizumab (Cimzia®)	Fab Pegylé anti-TNFα	Maladie de Crohns	22/04/2008 (FDA)	UCB
Radioiodinated metuximab (Licartin®)	Fab anti-CD47 conjugué au radioisotope <sup>131</sup> I	Cancer du foie	Avril 2005 (uniquement en Chine)	Chengdu Hoist Hi-Tech
Blinatumomab (Blincto®)	scFv en tandem bispécifique anti-CD19 et anti-CD3	Leucémie aiguë lymphoblastique	Décembre 2014 (FDA)	Amgen
Idarucizumab (Praxbind®)	Fab anti-dabigatran	Inhibiteur de l'effet anticoagulant du dabigatran	Novembre 2015 (FDA)	Boehringer Ingelheim
Caplacizumab (Cablivi®)	Nanobody bi-valent humanisé anti-Facteur Willebrand	Purpura thrombotique thrombocytopénique	31/08/2018 (EMA)	Sanofi
Moxetumomab pasudotox (Lumoxiti®)	scFv anti-CD22 conjugué à l'exotoxine A (PE38) de Pseudomonas aeruginosa	Leucémie à tricholeucocytes	13/09/2018 (FDA)	AstraZeneca

## C- Caractéristiques des fragments d'anticorps

### 1) Meilleure pénétration tumorale

L'anticorps entier, de par sa grande taille, s'accumule dans les régions péri-vasculaires situées à la périphérie de la tumeur et par conséquent, présente une faible pénétration tumorale et une distribution intra-tumorale hétérogène dans le cas des tumeurs solides<sup>139,140</sup>. En revanche, les fragments d'anticorps, tels que les fragments scFv, présentent une meilleure pénétration tumorale et une diffusion intra-tumorale plus homogène que les anticorps entiers<sup>139</sup> (figure 23). En effet, les fragments d'anticorps pénètrent d'une part, plus profondément dans le tissu tumoral mais présente aussi une accumulation plus rapide au sein de la tumeur. Le maximum de pénétration tumorale est obtenu 30 min après injection en ce qui concerne le scFv contre 48 à 96 h en ce qui concerne l'anticorps entier. Le phénomène de pénétration tumorale est donc un phénomène taille-dépendante<sup>139</sup> avec une diffusion facilitée des petites molécules dans la matrice extracellulaire tumorale par rapport aux grosses molécules<sup>103,141</sup>. Des différences de pénétration tumorale sont également observées au sein des fragments d'anticorps, avec une pénétration tumorale accrue des plus petits fragments tels que les scFv par rapport aux fragments de plus grande taille tels que les fragments Fab et F(ab')<sub>2</sub><sup>139</sup>. Il a été montré qu'une pénétration tumorale accrue des ADC comme le T-DM1 engendre une répercussion clinique avec une augmentation de leur efficacité anti-tumorale indépendamment

de la dose<sup>104</sup>. Par conséquent, de par leur meilleure pénétration au sein des tumeurs solides, la vectorisation de molécules cytotoxiques ou de radioisotopes à des fragments d'anticorps que ce soit à visée thérapeutique dans le cadre des ADC<sup>97</sup> ou à visée diagnostique en imagerie<sup>102</sup> se présente comme une alternative thérapeutique viable.



**Figure 23 :** Demi-vie, pénétration tumorale et rétention tumorale des anticorps monoclonaux en fonction de leur taille et de leur valence (extrait de Cuesta AM et al, 2010)

## 2) Courte demi-vie

Contrairement aux IgG entières dont la demi-vie s'élève à trois semaines, les fragments d'anticorps se caractérisent par leur courte demi-vie (quelques mins à quelques heures) dans la circulation sanguine (*figure 23*). En effet, les fragments d'anticorps, de par le fait qu'ils ne possèdent pas de partie Fc, sont incapables de se lier au FcRn et sont rapidement dégradés<sup>136,142</sup>. De plus, de par leur faible taille, les fragments d'anticorps, en particulier ceux dont la taille est inférieure à 60 kDa<sup>143</sup>, subissent une clairance rénale rapide (forte accumulation des fragments d'anticorps de faible taille au niveau des reins rapidement après leur administration<sup>144</sup>). En revanche, les fragments d'anticorps possédant une partie Fc comme le scFv-Fc possèdent une demi-vie équivalente aux IgG entières<sup>144</sup>. Dans le cas d'une visée thérapeutique, la longue demi-vie des anticorps entiers permet leur administration à intervalle espacé (administration toutes les 3 semaines du trastuzumab dans le traitement du cancer du sein HER2+) ce qui est plus confortable pour le patient. Au contraire, l'intervalle entre deux administrations de fragments d'anticorps à visée thérapeutique sera beaucoup plus court et rendra leur administration beaucoup moins confortable pour le patient. En revanche,

la courte demi-vie des anticorps peut également se révéler être un avantage dans certaines indications. En effet, à visée diagnostique et plus particulièrement en imagerie<sup>102</sup>, l'utilisation de fragments d'anticorps couplés à des radioisotopes permet à la fois une délivrance rapide de ces radioisotopes au sein de la tumeur ainsi qu'une élimination rapide de ces derniers<sup>136</sup>. Le couplage des radioisotopes à des fragments d'anticorps est particulièrement adapté pour des radioisotopes de courte demi-vie<sup>144</sup>.

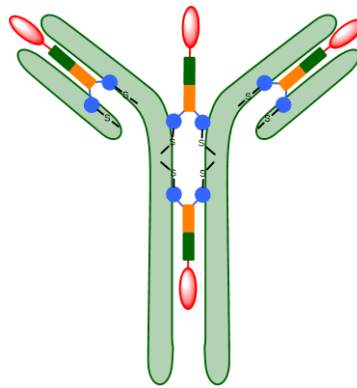
.

## **Partie II : expérimentale :**

### **Conception de nouveaux formats armés anti-HER2 pour le traitement des cancers du sein HER2+**

## A- Présentation du projet

Au sein de l'équipe BioMAP (UMR INRA 1282, Tours), des scFv anti-HER2, dérivé du trastuzumab, nommés 4D5.2 (domaines VH et VL associées par un lien peptidique), ont été produits en système procaryote afin de les associer à des nanoparticules dans le but de cibler les cellules cancéreuses mammaires HER2+<sup>146</sup>. En parallèle, l'équipe IMT du GICC (EA7501) de l'Université de Tours a produit plusieurs ADC présentant un DAR homogène moyen de 4 (DAR optimal), via une technologie propriétaire de greffage sur ponts disulfures de l'anticorps par le biais d'un résidu maléimide de deuxième génération (brevet n° WO20150044A1) (*figure 24*).



*Figure 24.* Représentation schématique d'un ADC : la drogue (en rouge) est reliée à un linker (en vert), lui-même relié à une molécule de maléimide de deuxième génération (en bleu) permettant le greffage sur deux cystéines au niveau des ponts disulfures de l'anticorps (extrait de Joubert et al, 2017)

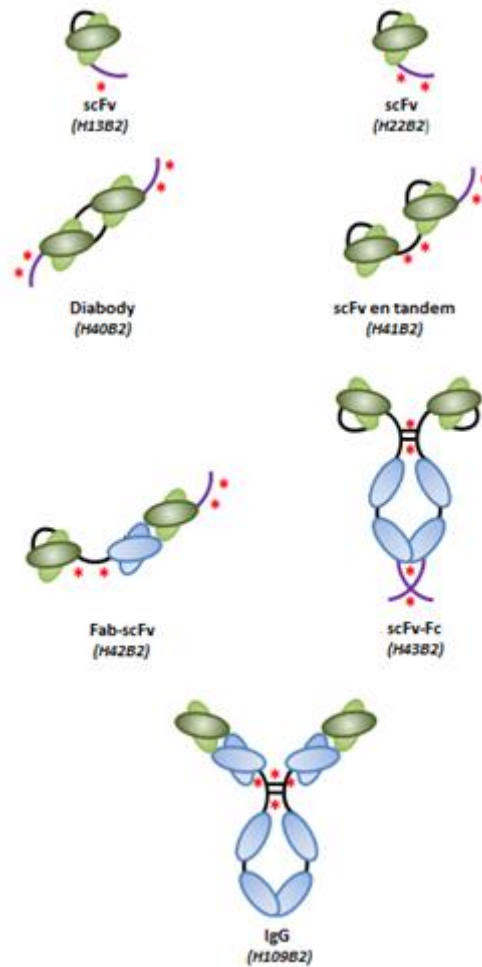
Nous avons vu précédemment que le T-DM1, de par sa grande taille et son format complet IgG, présentait une faible pénétration tumorale.

Dans ce contexte, il est né l'idée de coupler les scFv anti-HER2 (nommés 4D5.2), produits en système procaryote, à la MMAE et la MMAF via un linker incorporant la technologie brevetée de greffage, afin de former des FDC (Fragment-Drug Conjugate) et plus particulièrement des SDC (scFv-Drug Conjugate) de DAR 1. Ces premiers conjugués de fragments d'anticorps ont montré des résultats pertinents en cytotoxicité *in vitro* et ont motivé la suite de ces travaux.

Le but de ce projet consiste à produire des FDC anti-HER2 en transposant la construction d'ADC, obtenus via la méthodologie propriétaire de bioconjugaison de mAb, à des fragments d'anticorps anti-HER2 produits en système eucaryote.

Pour cela, les objectifs de ces travaux consisteront tout d'abord à (i) concevoir et produire les différents formats d'anticorps dans un système d'expression eucaryote, (ii) bioconjuguer les nouveaux formats à l'aide de la méthodologie propriétaire à la MMAE *via* un linker clivable sensible à la cathepsine B ou à la MMAF *via* un linker non clivable, (iii) vérifier la fonctionnalité de ces FDC en étudiant leur liaison à l'Ag HER2 par méthode ELISA ainsi que d'évaluer leur efficacité et leur spécificité *via* une étude de cytotoxicité sur deux lignées de cellules mammaires humaines tumorales, des cellules HER2+, nommées SK-BR-3, et des cellules HER2-, nommées MDA-MB-231.

Dans le but d'atteindre ces objectifs, plusieurs fragments d'anticorps ont été conçus avec, comme critères, être bivalents et présenter quatre sites de bioconjugaison afin d'obtenir un DAR de 4 comme dans le cas du T-DM1 ou de l'ADC conçu par l'IMT. Les 4 formats d'anticorps choisis sont un diabody, un scFv en tandem, un Fab-scFv et un scFv-Fc (*figure 25*). L'anticorps entier a également été réalisé afin de l'obtenir dans les mêmes conditions.



**Figure 25:** Représentation schématique des différents formats d'anticorps (\* représente un site de bioconjugaison)

Pour obtenir des ADC de DAR optimaux de 4, la solution la plus simple a été d'utiliser les ponts disulfures inter-chaîne existant dans l'anticorps entier. Un fragment, n'ayant pas de pont disulfure inter-chaîne, l'autre solution est l'utilisation du motif « CGC » qui peut être alors placé au niveau du lien peptidique (figure 26). Cette solution devra répondre, pour chaque format, à plusieurs critères : (i) conservation de l'affinité du fragment pour HER2, (ii) faible influence des motifs « CGC » sur le rendement et la qualité de production et (iii) obtention du DAR attendu.



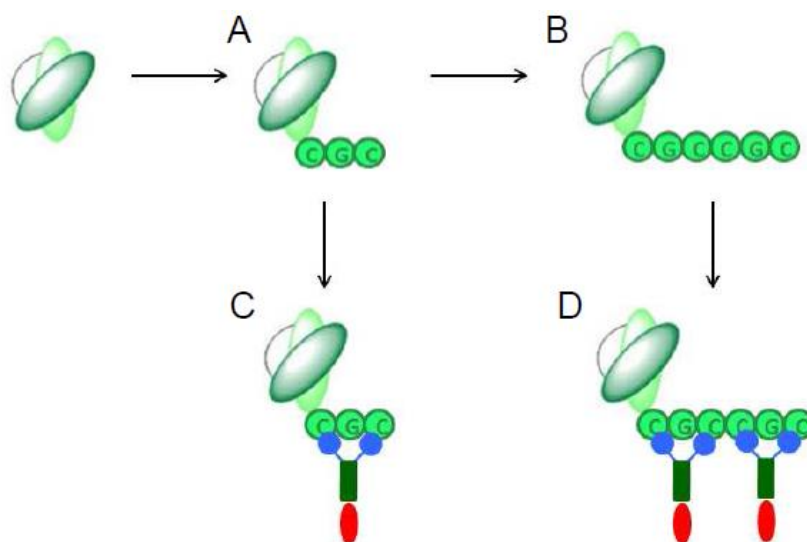
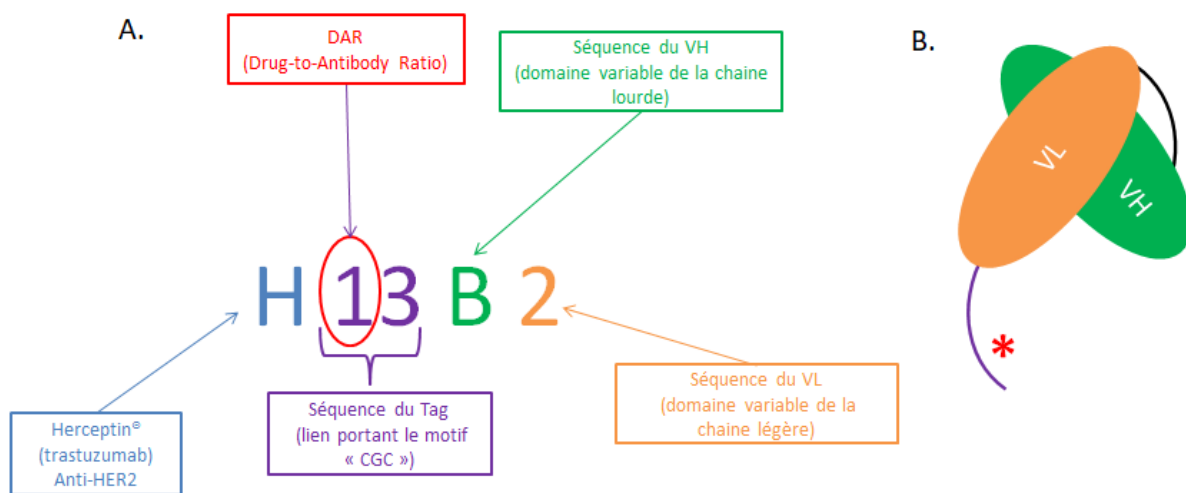


Figure 26 : Représentation schématique du motif « CGC » introduit au niveau du lien peptidique et permettant le greffage de la drogue (en rouge) sur le fragment par l'intermédiaire d'un groupement maléimide de deuxième génération (en bleu)

## B- Matériel et méthodes

### 1) Explication des codes des différents fragments d'anticorps produits

Les différents fragments d'anticorps produits suivront un même code (*figure 27*). Ce code se compose de la lettre H pour Herceptin<sup>®</sup>, suivi d'un nombre à deux chiffres correspondant à la séquence du Tag portant les motifs « CGC » permettant la bioconjugaison, puis d'une lettre en majuscule correspondant à la séquence du domaine variable de la chaîne lourde (VH) et enfin, un chiffre correspondant à la séquence du domaine variable de la chaîne légère (VL).



*Figure 27 : Explication du code des fragments d'anticorps produits en prenant pour exemple le fragment scFv DAR 1 H13B2 (A) avec sa représentation schématique (B)*

### 2) Construction moléculaire des différents fragments d'anticorps

Afin de produire les différents fragments d'anticorps recombinants, un système d'expression en cellule eucaryote CHO (Chinese Hamster Ovary) a été utilisé. Trois gènes ont été synthétisés par la société GeneArt (Thermo Fisher Scientific) et clonés dans le plasmide d'expression pCDNA3.4.

Les trois gènes codent pour (i) la chaîne légère (H92k), (ii) la chaîne lourde du trastuzumab (H10B1h) et (iii) le fragment scFv du trastuzumab de DAR1, appelé H13B2. Le scFv résulte de l'association du VH, du lien (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, du VL et d'une séquence, appelé « 13 » contenant un motif de couplage « CGC » et le drapeau Histidine.

Ainsi, l'anticorps, le trastuzumab, est obtenu en transfectant les cellules CHO avec les 2 plasmides pCDNA3.4-H10B1h et pCDNA3.4-H92k.

Les fragments d'anticorps DAR2 (H22B2, H23B2, H24B2 et H25B2) ont été obtenus à partir du plasmide pCDNA3.4-H13B2 à l'aide du kit Q5® Site-Directed Mutagenesis de BioLabs®, et des amorces appropriées, permettant de générer 4 séquences C-terminal possédant 2 motifs « CGC » (22, 23, 24 et 25).

Le diabody et le scFv en tandem de DAR4 (H40B2 et H41B2 respectivement), ont été obtenus à partir du plasmide pCDNA3.4-H22B2. Pour cela, les kits NEB® Golden Gate Assembly Mix, Q5® High-Fidelity DNA Polymerase et des amorces appropriées, synthétisées par Eurofins, ont été utilisés. Les mêmes outils ont été utilisés pour les autres fragments décrits ci-dessous.

Le Fab-scFv de DAR 4 (H42B2) résulte de l'association par un pont disulfure de la chaîne légère du trastuzumab (H92k) avec la chaîne formée par l'association suivante : Fd-scFv (VH-CH1-VH-VL) nommé H22BcB2. Le plasmide pCDNA3.4-H22BcB2 a été obtenu à partir des plasmides pCDNA3.4-H22B2 et pCDNA3.4-H10B1h.

Le scFv-Fc de DAR 4 (H43B2), a été obtenu à partir des plasmides pCDNA3.4-H22B2 et pCDNA3.4-H10B1h.

Le scFv en tandem de DAR 4 H41C2, a été obtenu à partir des plasmides pCDNA3.4-H41B2 et pCDNA3.4-H22B2.

### **3) Production des différents fragments d'anticorps en cellules CHO**

Les cellules ExpiCHO-S™ ont été mises en culture à 37°C, 80% d'humidité relative et 8% de CO<sub>2</sub>. A J-1 de la transfection, la densité cellulaire dans le milieu de culture est de 4.10<sup>6</sup>-6.10<sup>6</sup> cellules/mL. Au moment de la transfection (J0), pour un volume de milieu de culture de 25 mL, la densité cellulaire est de 6.10<sup>6</sup> cellules/mL. 20µL de plasmide à 1 µg/µL dilués dans 1 mL d'OptiPRO™ sont ajoutés dans le milieu cellulaire ainsi que 80 µL d'ExpiFectamine™ dilués dans 920 µL d'OptiPRO™. A J+1 de la transfection, 150 µL d'ExpiCHO™ Enhancer et 4 mL d'ExpiCHO™ Feed sont ajoutés. De nouveau, 4 mL de Feed sont ajoutés à J+5 de la transfection. La récolte des surnageants est effectuée 14 jours après la transfection.

#### 4) Purification des fragments d'anticorps

Les fragments d'anticorps DAR 1 (H13B2) , DAR2 (H22B2, H23B2, H24B2, H25B2) ainsi que certains fragments DAR 4 : le diabody (H40B2), les scFv en tandem (H41B2 et H41C2) et le Fab-scFv (H42B2) ont été purifiés à l'aide d'une méthode de chromatographie d'affinité à la protéine L (PpL)<sup>147</sup> dont le tampon de lavage est le PBS à pH 7,4 et dont l'élution du fragment s'effectue grâce à un tampon glycine 0,1 M à pH 2. Les anticorps H43B2 (scFv-Fc) et H109B2 (anticorps entier) ont été purifiés à l'aide d'une méthode de chromatographie d'affinité à la protéine A dont le tampon de lavage est l'acide borique 50mM, NaCl 1 M à pH 8,9) et dont l'élution s'effectue par une solution de glycine 0,1 M pH 2. Après purification, l'absorbance à 280 nm des fractions éluées est mesurée afin d'évaluer leurs concentrations.

Les fragments sont ensuite dialysés contre un tampon borate pH 8 (tampon BBS). Après une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes, l'absorbance à 280 nm est de nouveau mesurée afin d'estimer la concentration en fragments d'anticorps de nos échantillons.

#### 5) Electrophorèse de type SDS-page

Les échantillons (26µL) ont été déposés sur un gel précoulé de polyacrylamide Invitrogen™ à 4-12% avec agent réducteur (+4µL βmercaptoéthanol) ou sans agent réducteur (+4µL de PBS). Après migration pendant 22 min à 200 V et 400 mA dans un tampon de migration MES, le gel est immergé dans du bleu de coomassie pendant 45 min, puis décoloré.

#### 6) Lignées cellulaires : cellules SK-BR-3 (HER2+) et cellules MDA-MB-231 (HER2-)

Deux lignées humaines de cancer mammaire sont utilisées dans cette étude. Les cellules MDA-MB231 sont dérivées d'un adénocarcinome mammaire humain et ne surexpriment pas l'antigène HER2 (ECACC cell lines, England). Elles sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media), supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), de 1% de pénicilline/streptomycine et de 1% d'acides aminés non essentiels.

Les cellules SK-BR3, sont aussi dérivées d'un adénocarcinome mammaire humain mais elles sont caractérisées par une forte surexpression de l'antigène HER2 (CLS, Eppelheim, Germany). Elles sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media), supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et de 1% de pénicilline/streptomycine.

Ces deux lignées sont cultivées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère à 5% en CO<sub>2</sub>.

## **7) Analyse de la reconnaissance à l'Ag HER2 par méthode ELISA indirect (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)**

L'antigène HER2 est immobilisé dans une plaque ELISA 96 puits en déposant 100 µL de la solution d'HER2 à une concentration de 1 µg/mL. La plaque est laissée toute la nuit à 4°C. Les puits sont vidés en tapant la plaque sur du papier absorbant puis sont ensuite saturés avec 300 µL par puits d'une solution de BSA à 3% pendant 1 heure à 37°C. Les puits sont ensuite vidés en tapant la plaque sur du papier absorbant. 100 µL d'échantillons de 0,01 nM à 1000 nM sont déposés en triplicat sur la protéine immobilisée, puis incubés pendant 1 heure à 37°C. La plaque est ensuite lavée 4 fois avec du PBS Tween 0,05%. 100 µL de protéine L-HRP à 1,25 µg/mL sont ajoutés dans chaque puits, puis la plaque est incubée pendant 1 heure à 37°C. La plaque est de nouveau lavée 4 fois avec du PBS Tween 0,05%. 100 µL de substrat TMB sont ajoutés dans chaque puits dont la réaction enzymatique est stoppée après ajout de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1M. La plaque est lue à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Bio-Tek® instruments, Inc., USA).

## **8) Essais de cytotoxicité sur cellules SK-BR-3 et MDA-MB-231**

100 µL de cellules SK-BR3 (HER2+) par puits sontensemencées sur une plaque 96 puits à une concentration de 6000 cellules par puits puis la plaque est incubée à 37°C pendant 24 heures.

100 µL de cellules MDA-MB231 (HER2-) par puits sontensemencées sur une plaque 96 puits à une concentration de 3000 cellules par puits puis la plaque est incubée à 37°C pendant 24 heures.

Les différents échantillons de fragments couplés dilués dans 100 µL de milieu de culture sont déposés dans chaque puits, pour une échelle de concentration allant de 0,001 à 100 nM. La plaque est ensuite incubée à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 5 jours.

10 µL de réactif de viabilité cellulaire, le WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) est ensuite ajouté par puits et la plaque est incubée à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 1 à 2 heures. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 450 nm grâce à un lecteur de plaque (Bio-Tek® instruments, Inc., USA).

Pour le fragment H40B2 (Diabody), le MTT, un autre réactif de viabilité cellulaire, a été utilisé. 10 µL d'une solution de MTT à 5g/L est ajouté par puits et la plaque est incubée à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 4 heures. Après aspiration du liquide contenu dans le puits,

200  $\mu$ L de DMSO est ensuite ajouté dans chaque puits. Après agitation avec un agitateur de microplaque, on mesure l'absorbance de chaque puits à 540 nm grâce à un lecteur de plaque (Bio-Tek® instruments, Inc., USA).

## C- Résultats

Les fragments d'anticorps de type scFv peuvent être produits à moindre coût dans des systèmes procaryotes. Cependant, il devient généralement plus difficile de produire des fragments plus complexes (diabody, scFv en tandem, scFv-Fc,...) avec notamment un risque de produire moins, voire rien et d'obtenir des fragments plus protéolysés. Afin de produire différents formats d'anticorps de taille variable, la première étape du travail a été de transposer la production du scFv 4D5.2 dans un système d'expression eucaryote en cellule CHO ; le fragment est alors renommé H13B2 (le chiffre 13 correspond à la séquence du Tag présente en C-terminale).

### 1) Modification du système d'expression : caractérisation du fragment scFv H13B2

La séquence primaire du fragment scFv H13B2 correspond exactement à celle du fragment scFv 4D5.2 avec les domaines VH et VL, reliés par un lien peptidique flexible et soluble auxquels est ajoutée une séquence en C-terminale comprenant une séquence « CGC » permettant la liaison du maléimide de deuxième génération lors de la bioconjugaison et le tag Histidine.

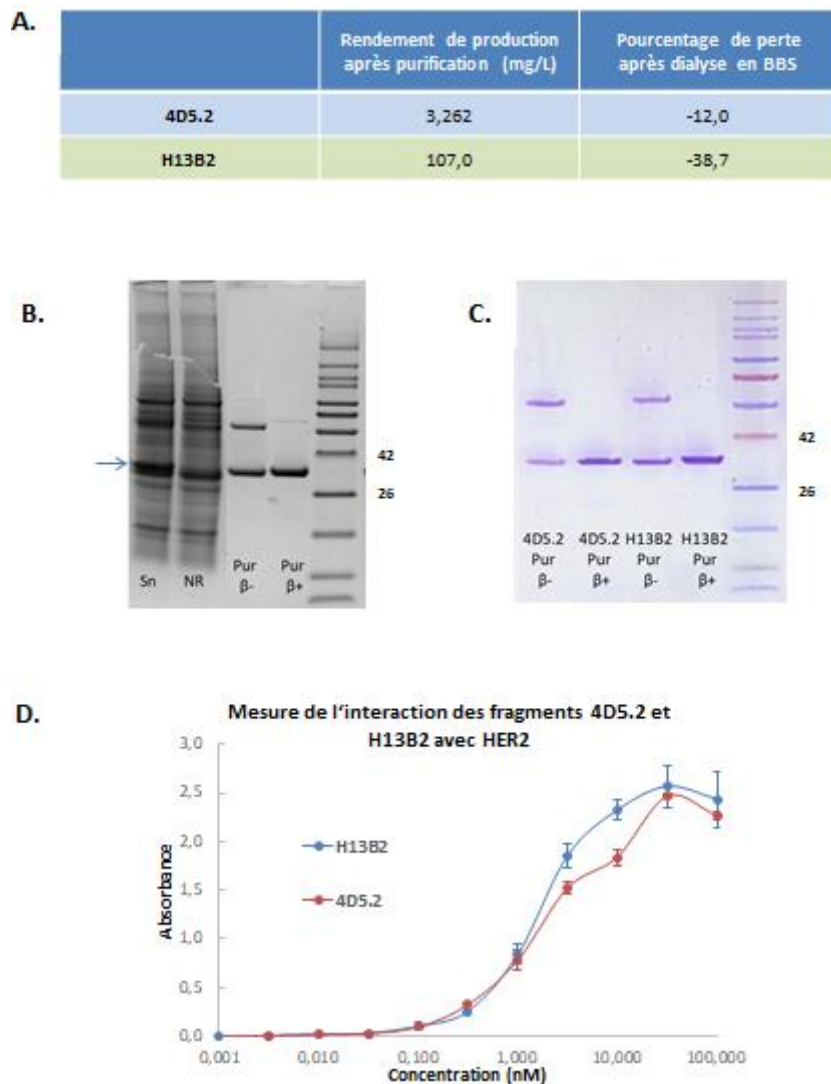
Le fragment 4D5.2 est produit dans un système d'expression procaryote via le plasmide d'expression pSW-4D5.2. Ce plasmide comporte une séquence signal, permettant une expression sous forme fonctionnelle dans le périplasma bactérien. Après purification par chromatographie d'affinité sur gel de protéine L-agarose (PpL), un rendement de 3 mg/L est obtenu avec une perte, après dialyse en BBS, de l'ordre de 12% (*figure 28A*). Un essai de production du scFv H13B2 dans un volume de 30 ml de milieu CHO a permis d'obtenir à partir du surnageant, 3,4 mg de protéine après purification (PpL) soit un rendement de production de 107 mg/L. Néanmoins, lors de la dialyse en BBS, 38,7% des fragments se sont agrégés (*figure 28A*). La qualité de la production et de la purification est évaluée sur gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie. Le surnageant montre une bande correspondant à une protéine surexprimée, soit le scFv H13B2. La totalité du fragment a été purifiée puisque la bande correspondant au fragment ne se trouve plus dans le non retenu (*figure 28B*). Le fragment purifié est pur et homogène. Il est sous forme de monomères à 29 kDa et d'homodimères à 58 kDa résultant de la formation d'un pont disulfure entre 2 motifs « CGC » présents sur 2 scFv (*figure 28B*). Les fragments scFv 4D5.2 et H13B2 ont une taille identique (*figure 28C*). En revanche, pour le fragment scFv H13B2, un épaississement de la bande apparaît au niveau de la bande à 29 kDa suggérant une protéolyse (H13B2 Pur  $\beta^+$ ) (*figure*

28C). La fonctionnalité du scFv H13B2 a été testée en ELISA vis-à-vis de l'antigène HER2. Il montre une interaction comparable au fragment 4D5.2 (*figure 28D*).

L'analyse par spectrométrie de masse confirme la protéolyse pour le fragment scFv H13B2. En effet, le spectre du scFv 4D5.2 présente deux pics : un pic à 27604 Da correspondant à la forme monomérique et un pic à 55141 Da correspondant à la forme homodimérique (*figures 29A et 29C*), alors que le spectre de masse du scFv H13B2 présente trois pics : un pic à 27585 Da correspondant à la forme monomérique et un pic à 55107 Da correspondant à la forme homodimérique mais aussi un petit pic à 26141 Da (*figures 29B et 29C*). D'après la différence de masse, il apparaît qu'une protéolyse a lieu dans les premiers résidus d'acides aminés de la séquence C-terminale. Ainsi, le fragment protéolysé ne possède plus le motif « CGC » et le drapeau Histidine. Les deux fragments ont ensuite été bioconjugués à la MMAE à l'aide d'un linker clivable. La totalité du 4D5.2 se bioconjugue à la MMAE (Pic unique à 29401 Da) (*figure 29C*). En revanche, après bioconjugaison avec la MMAE, H13B2 présente à la fois le fragment conjugué H13B2-VC-MMAE (28868 Da) et le fragment protéolysé non conjugué (26141 Da) ayant perdu le motif « CGC » (*figure 29C*).

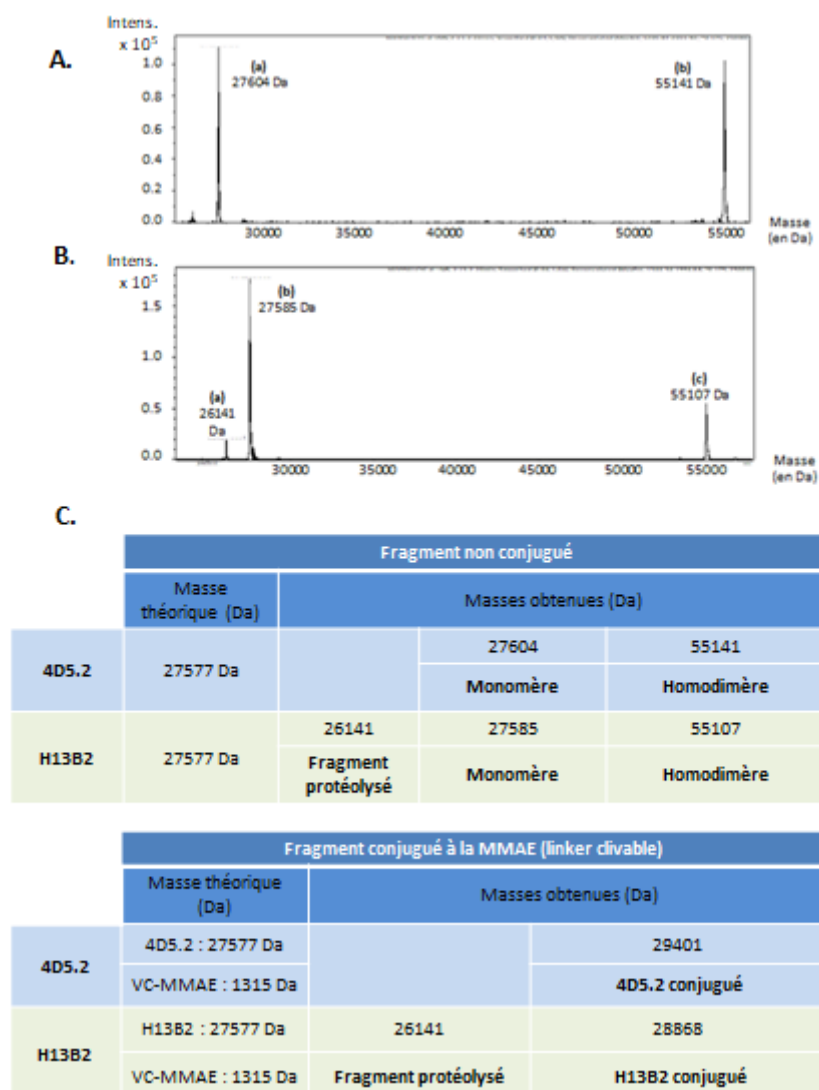
Ainsi, le passage en culture CHO permet d'obtenir le scFv H13B2 en grande quantité, malgré une perte un peu plus importante. Le résultat inattendu est la présence d'une protéolyse lors de la production en système eucaryote CHO, qui n'était pas observée lors de la production en bactérie.





**Figure 28** : Caractérisation du fragment scFv H13B2 : Purification, Rendement de production, Interaction avec HER2.

- A. Comparaison des rendements de production après purification et du pourcentage de perte après dialyse en BBS des fragments 4D5.2 et H13B2.
- B. Vérification de la qualité de la purification du fragment H13B2 sur gel précoulé de polyacrylamide Invitrogen™. (Sn) : Surnageant contenant le fragment purifié (bande au niveau de la flèche bleue), (NR) : Non retenu ne contenant plus le fragment purifié, (Pur β-) : Fragment purifié révélé non réduit (sans β-Mercapto-éthanol), (Pur β+) : fragment purifié réduit (avec β-Mercapto-éthanol).
- C. Comparaison des fragments purifiés 4D5.2 et H13B2 sur gel précoulé de polyacrylamide Invitrogen™ : Les fragments 4D5.2 et H13B2 ont la même taille. Présence d'une double bande pour le H13B2 purifié traduisant la présence de fragments protéolysés.
- D. Mesure de l'interaction des fragments 4D5.2 et H13B2 avec l'antigène HER2 à l'aide d'une méthode ELISA.



**Figure 29 :** Caractérisation des fragments H13B2 non conjugué et H13B2 conjugué à la MMAE

- A. Mesure de la masse (spectrométrie de masse) du fragment 4D5.2 (produit en système procaryote) non conjugué : (a) 4D5.2 : Monomère de 27604 Da, (b) 4D5.2 : Homodimère de 55141 Da.
- B. Mesure de la masse (spectrométrie de masse) du fragment H13B2 (produit en système eucaryote) non conjugué : (a) Fragment protéolysé de 26141 Da qui a perdu son Tag, (b) H13B2 : Monomère de 55141 Da, (c) H13B2 : Homodimère de 55107 Da.
- C. Bioconjugaison des fragments 4D5.2 et H13B2 à la MMAE (mesure de la masse en Da par la spectrométrie de masse) : La totalité du 4D5.2 se bioconjugue avec la MMAE. En ce qui concerne le fragment H13B2, il y a un mélange de fragment H13B2 conjugué à la MMAE avec du fragment protéolysé qui ne se bioconjugue pas avec la MMAE à cause de la perte de son Tag.

## **2) Caractérisation des fragments scFv DAR 2 (H22B2, H23B2, H24B2, H25B2)**

La conception des fragments scFv DAR 2 nécessite la création d'une séquence C-terminal comprenant deux motifs « CGC ». Ainsi, la séquence « 13 » est modifiée dans le but d'éviter la protéolyse et de rajouter un motif « CGC ». Quatre nouveaux scFv avec des Tag différents (tag 22 à 25) ont été produits afin de trouver la meilleure séquence n'engendrant pas de protéolyse.

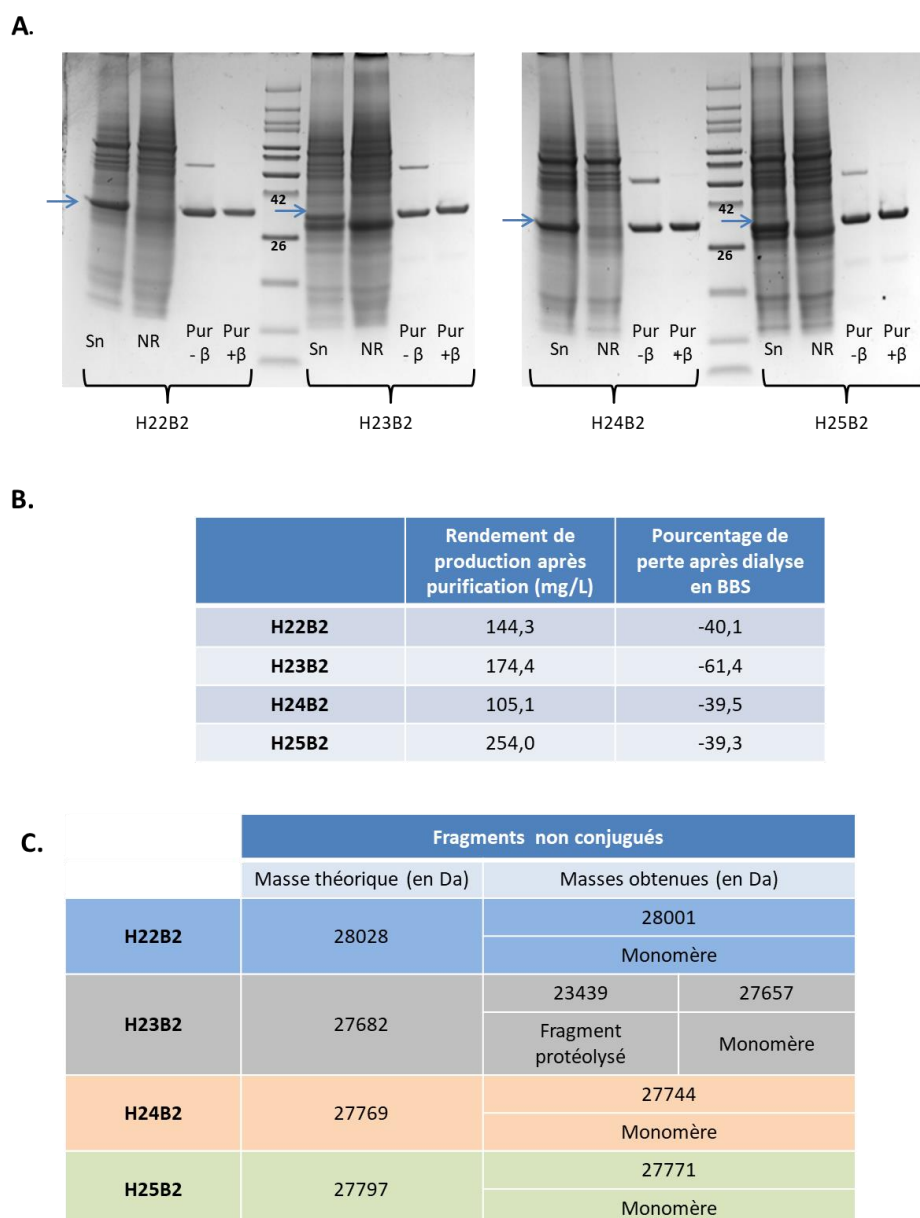
### ***a) Production et purification des fragments scFv DAR 2***

Les quatre fragments scFv DAR 2 (H22B2, H23B2, H24B2 et H25B2) ont été purifiés par protéine L. Les quatre fragments ont tous une taille équivalente aux alentours de 30 kDa (*Figure 30A*). La totalité des quatre fragments a été purifiée puisque les fragments, présents dans le surnageant (Sn), ne se trouvent plus dans le retenu (NR) (*figure 30A*).

En ce qui concerne le rendement de production après purification, le scFv H25B2 est le fragment présentant le meilleur rendement de production (254,0 mg/L), suivis des scFv H22B2 et H23B2 (144,3 mg/L et 174,4 mg/L respectivement), et enfin le scFv H24B2 (105,1 mg/L). Le pourcentage de perte après dialyse en BBS est d'environ 40 % pour ces fragments, perte identique à celle du fragment H13B2, excepté pour le H23B2 (60%) (*Figure 30B*).

### ***b) Mesure de la masse des fragments scFv DAR 2 non conjugués à l'aide de la spectrométrie de masse***

Les fragments scFv H22B2, H24B2 et H25B2 présentent une seule forme monomérique (pic à 28001 Da, 27744 Da et 27771 Da respectivement) (*figure 30C*). En revanche, le fragment scFv H23B2 présente une forme monomérique de 27657 Da mais aussi une forme protéolysée de 23439 Da (*figure 30C*).



**Figure 30 :** Caractérisation des fragments scFv DAR 2 (H22B2, H23B2, H24B2, H25B2) : Purification, Rendement de production, Masse.

- A. Vérification de la qualité de la purification des fragments DAR 2 sur gel précoulé de polyacrylamide Invitrogen™: Sur le gel de polyacrylamide, 4 échantillons ont été déposés : (**Sn**) : Surnageant contenant le fragment purifié (bande au niveau de la flèche bleue), (**NR**) : Non retenu ne contenant plus le fragment purifié, (**Pur β-**) : Fragment purifié révélé non réduit (sans β-Mercapto-éthanol), (**Pur β+**) : fragment purifié réduit (avec β-Mercapto-éthanol)
- B. Comparaison des rendements de production après purification et du pourcentage de perte après dialyse en BBS des fragments DAR 2
- C. Mesure de la masse (spectrométrie de masse) des fragments H22B2, H23B2, H24B2 et H25B2 non conjugué: Les fragments H22B2, H24B2 et H25B2 ne présentent pas de protéolyse. En revanche, H23B2 présente des fragments protéolysés à 23439 Da.

*c) Bioconjugaison des fragments scFv DAR 2 à la MMAE (linker clivable) et à la MMAF (linker non clivable)*

Présentant de la protéolyse, le fragment scFv H23B2 n'a pas été bioconjugué à la MMAE et à la MMAF.

H22B2 présente 100% de bioconjugaison à la MMAE et à la MMAF obtenant ainsi 100% de fragment conjugué à la MMAE DAR 2 (H22B2-VC-MMAE DAR 2) et 100% de fragment conjugué à la MMAF DAR 2 (H22B2-MMAF DAR 2) (*tableaux XA et XB*).

En ce qui concerne H24B2, après bioconjugaison à la MMAE, il est obtenu 85% de DAR 2 (30374 Da) et 15% de DAR 1 (29031 Da) (*tableau XA*). Après bioconjugaison à la MMAF, il est obtenu les mêmes proportions, c'est-à-dire, 85% de DAR 2 (29590 Da) et 15% de DAR 1 (28636 Da) (*tableau XB*).

Concernant H25B2, après bioconjugaison à la MMAE, il est généré 90% de DAR 2 (30402 Da) et 10% de DAR 1 (29058 Da) (*tableau XA*). Après bioconjugaison à la MMAF, il est obtenu 90% de DAR 2 (29618 Da) et 10% de DAR 3 (30560 Da) (*tableau XB*).

Ainsi, le scFv H22B2 présente les meilleurs caractéristiques, en l'occurrence, 100% de bioconjugaison à la MMAE et à la MMAF permettant d'obtenir 100% de SDC (scFv-Drug Conjugate) DAR 2 (H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF).

**Tableau X :** Bioconjugaison des fragments scFv DAR 2 (H22B2, H24B2 et H25B2) avec la MMAE (linker clivable) et la MMAF (linker non clivable)

- A. Bioconjugaison avec la MMAE (linker clivable) : représentation des masses (en Da), obtenues par spectrométrie de masse, des différents fragments après bioconjugaison
- B. Bioconjugaison avec la MMAF (linker non clivable) : représentation des masses (en Da), obtenues par spectrométrie de masse, des fragments après bioconjugaison

A.	Fragment conjugué à la MMAE (linker clivable)		
	Masse théorique (Da)	Masses obtenues (Da)	
H22B2	H22B2 : 28028 Da		30633 Da
	VC-MMAE : 1315 Da		
	Interprétation		DAR 2
	Proportion des fragments		100 %
H24B2	H24B2 : 27769 Da	29031 Da	30374 Da
	VC-MMAE : 1315 Da		
	Interprétation	DAR 1	DAR 2
	Proportion des fragments	15 %	85 %
H25B2	H25B2 : 27797 Da	29058 Da	30402 Da
	VC-MMAE : 1315 Da		
	Interprétation	DAR 1	DAR 2
	Proportion des fragments	10 %	90 %

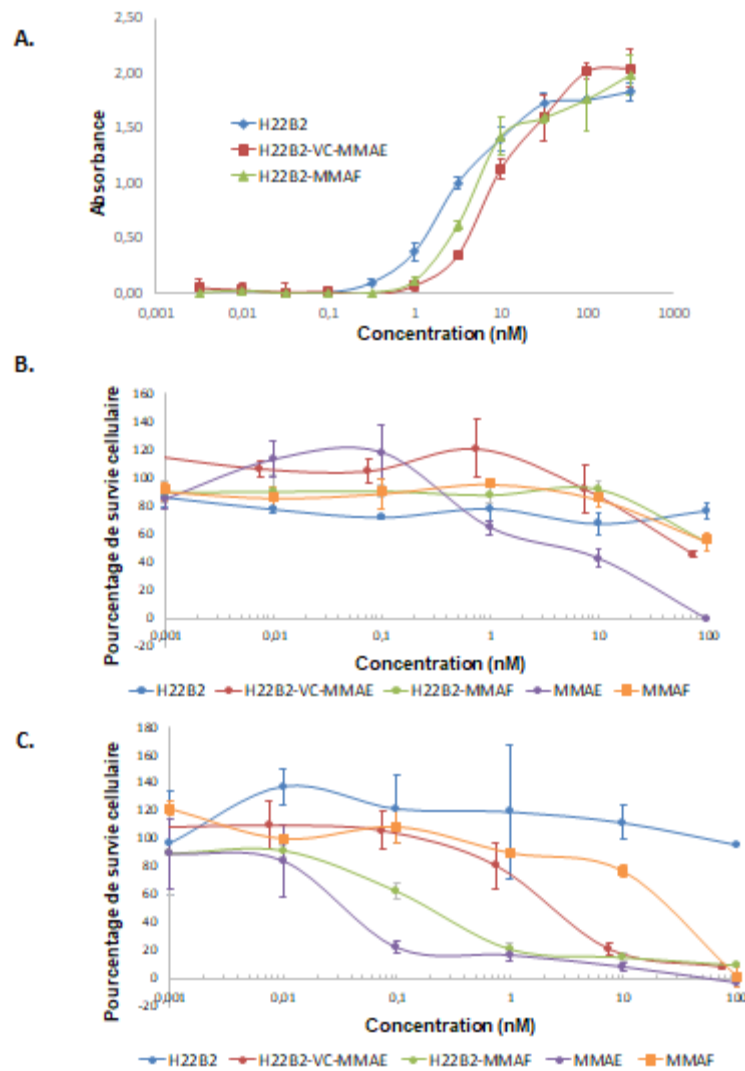
B.	Fragment conjugué à la MMAF (linker non clivable)			
	Masse théorique (Da)	Masses obtenues (Da)		
H22B2	H22B2 : 28028 Da		29849 Da	
	MMAF : 923 Da			
	Interprétation		DAR2	
	Proportion des fragments		100 %	
H24B2	H24B2 : 27769 Da	28636 Da	29590 Da	
	MMAF : 923 Da			
	Interprétation	DAR 1	DAR 2	
	Proportion des fragments	15 %	85 %	
H25B2	H25B2 : 27797 Da		29618 Da	30560 Da
	MMAF : 923 Da			
	Interprétation		DAR 2	DAR 3
	Proportion des fragments		90 %	10 %

#### ***d) Caractérisation des fragments scFv H22B2 et SDC DAR 2 (H22B2-MMAE et H22B2-MMAF)***

L'influence de la présence des drogues conjuguées au scFv H22B2 a tout d'abord été évaluée vis-à-vis de la reconnaissance à l'antigène HER2. Le fragment scFv H22B2 non conjugué reconnaît bien l'antigène HER2 (*figure 31A*). Les fragments conjugués SDC DAR 2 H22B2-VC-MMAE (linker clivable) et H22B2-MMAF (linker non clivable) ont une reconnaissance de l'Ag HER2 légèrement inférieur au fragment scFv non conjugué (H22B2) mais gardent une reconnaissance spécifique pour HER2 (*figure 31A*).

Vis-à-vis des cellules MDA-MB-231 (HER2-), le fragment scFv H22B2 ne présente pas de toxicité ce qui est logique puisque qu'il n'est pas couplé à la drogue et que l'antigène HER2 n'est pas exprimé dans cette lignée cellulaire (*figure 31B*). Les fragments conjugués SDC DAR 2 H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF ne présentent pas de toxicité hormis à 100 nM avec une légère baisse de la survie cellulaire ( $CE_{50}$  atteinte uniquement pour H22B2-VC-MMAE à 750nM). Les drogues libres, MMAE et MMAF, ne présentent pas le même profil. La MMAE présente une toxicité avec une  $CE_{50}$  à 10 nM. En revanche, la MMAF présente une très faible toxicité à partir de 10nM ( $CE_{50}$  non atteinte). La MMAE est plus toxique que la MMAF sur cette lignée cellulaire.

Vis-à-vis des cellules SK-BR-3 (HER2+), le fragment scFv H22B2 non conjugué ne présente pas de toxicité ce qui est logique puisqu'il n'est pas couplé à la drogue (*figure 31C*). Les fragments conjugués SDC DAR 2 H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF sont toxiques sur cette lignée cellulaire. En effet, après reconnaissance de l'Ag HER2, H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF peuvent libérer leurs drogues. H22B2-MMAF est plus toxique que H22B2-VC-MMAE sur ce type cellulaire ( $CE_{50}=0,3$  nM environ et  $CE_{50}=3$  nM environ respectivement). Les drogues libres MMAE et MMAF sont plus toxiques sur la lignée SK-BR-3 que sur la lignée MDA-MB-231 avec une  $CE_{50}$  entre 0,05 et 0,08 nM pour la MMAE et une  $CE_{50}$  entre 20 et 50 nM pour la MMAF. Comme vu précédemment, la MMAE est plus toxique que la MMAF (*figure 31C*).



**Figure 31 :** Caractérisation des fragments scFv H22B2 et SDC DAR 2 (H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF) : fonctionnalité

- A. Comparaison de l'interaction avec HER2 par ELISA : fragments H22B2 ; H22B2-VC-MMAE ; H22B2-MMAF
- B. Cytotoxicité sur cellules MDA-MB-231 (HER2-) des fragments H22B2, H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF, et de la drogue libre, la MMAE et la MMAF.
- C. Cytotoxicité sur cellules SK-BR3 (HER2+) des fragments H22B2, H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF, et de la drogue libre, la MMAE et la MMAF.



### 3) Caractérisation des fragments DAR 4 : diabody (H40B2), scFv en tandem (H41B2), Fab-scFv (H42B2) et scFv-Fc (H43B2) et de l'anticorps entier DAR 4 (H109B2)

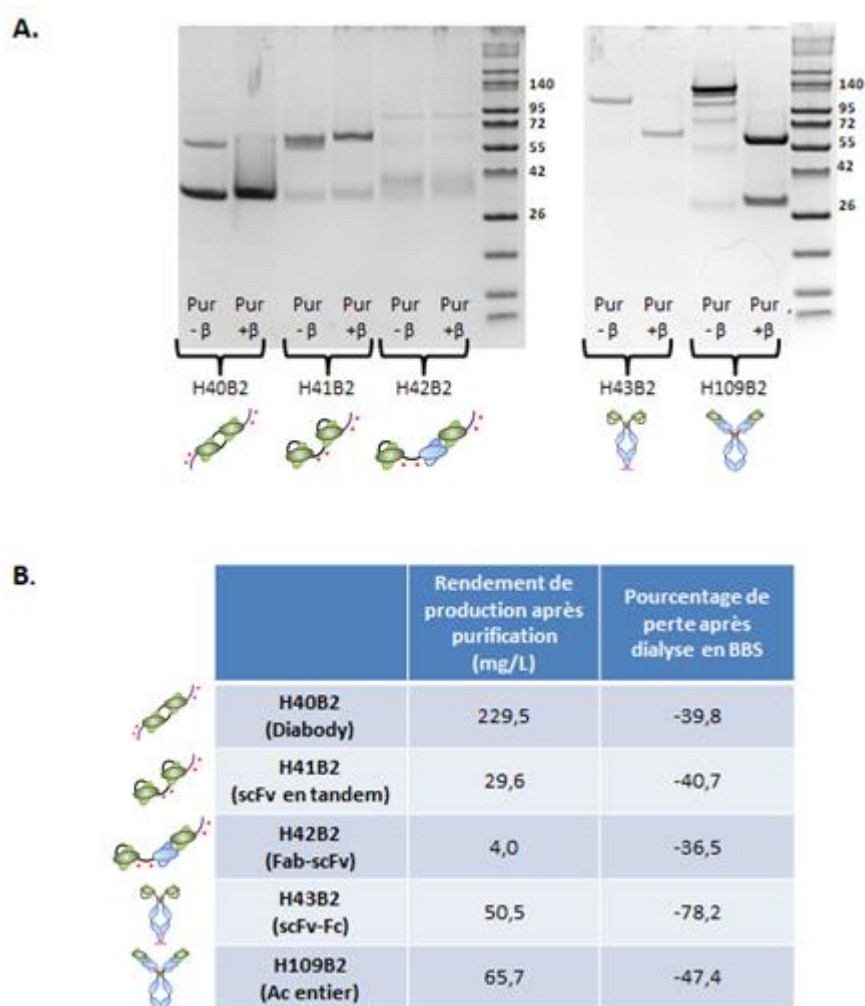
Le fragment scFv DAR 2 H22B2 présentant les meilleures caractéristiques de bioconjugaison, la conception des différents fragments DAR4 s'est réalisée en partant de la séquence C-terminal « 22 » du fragment H22B2.

#### a) Production et purification des fragments DAR 4 : diabody (H40B2), scFv en tandem (H41B2), Fab-scFv (H42B2), scFv-Fc (H43B2) et de l'anticorps entier DAR 4 (H109B2)

Le format diabody (H40B2) présente le meilleur rendement de production (229,5 mg/L). Les fragments scFv en tandem (H41B2) et scFv-Fc (H43B2) et l'anticorps entier H109B2 présentent un rendement de production intermédiaire (29,6 mg/L ; 50,5 mg/L ; 65,7 mg/L respectivement). Le fragment Fab-scFv (H42B2) présente un rendement de production très faible (4,0 mg/L) (*figure 32B*).

En revanche, le scFv-Fc (H43B2) présente une très forte agrégation avec un pourcentage de perte après dialyse très important de -78,2% en comparaison aux autres fragments (-40% environ) (*figure 32B*).

Après purification, le format diabody (H40B2) présente une forme monomérique majoritaire à environ 30kDa et une forme homodimérique covalente à 60 kDa environ (Pur  $\beta^-$ ) (*figure 32A*). Le fragment scFv en tandem purifié (H41B2) a une taille d'environ 60kDa avec très peu de scFv seul (faible bande à 30kDa). La présence d'une double bande à 60 kDa (Pur  $\beta^-$ ) suspecte de la protéolyse et une reconstitution d'homodimère de scFv covalent (*figure 32A*). Concernant le fragment Fab-scFv (H42B2), très peu de fragments ont été purifiés et la qualité de la purification est faible. En théorie, sans réducteur, une bande vers 75 kDa aurait dû être observée, et en présence de réducteur, deux bandes de 25 et 50 kDa. Ici, le profil reste presque identique sans et avec réducteur ; des bandes entre 26 et 42 kDa semblent apparaître mais l'interprétation est difficile (*figure 32A*). Le fragment scFv-Fc (H43B2) a bien été purifié avec une bande à 110 kDa environ (Pur $\beta^-$ ) ou 55 kDa (Pur $\beta^+$ ) en condition réductrice (*figure 32A*). L'anticorps entier (H109B2) présente une bonne purification (bande majoritaire à 145 kDa) avec l'observation des chaînes lourdes et légères (55 et 26 kDa) en présence de réducteur. Sans réducteur, d'autres bandes sont également légèrement visibles (*figure 32A*).








**Figure 32 :** Purification et rendement de production des fragments DAR 4 (H40B2, H41B2, H42B2, H43B2) et de l'anticorps entier (H109B2) (\* représente un site de bioconjugaison)

- A. Vérification de la qualité de la purification des fragments DAR 4 et de l'anticorps entier sur gel précoulé de polyacrylamide Invitrogen™  
 (Pur β-) : Fragment purifié non réduit (sans β-Mercapto-éthanol),  
 (Pur β+) : Fragment purifié réduit (avec β-Mercapto-éthanol)
- B. Rendement de production après purification et pourcentage de perte après dialyse des fragments DAR 4 et de l'anticorps entier

**b) Mesure de la masse des fragments DAR 4 (H40B2, H41B2, H42B2, H43B2) et de l'anticorps entier DAR 4 (H109B2)**

Le diabody (H40B2) présente une seule forme monomérique à 27371 Da sans protéolyse (*tableau XI*). Le fragment scFv en tandem (H41B2), quant à lui, présente une forme monomérique à 55186 Da mais aussi une forme protéolysée à 27371 Da (*tableau XI*). Le fragment Fab-scFv (H42B2) est complètement dégradé et ne présente que des formes protéolysées à 27372 Da et 27995 Da, semblant correspondre à des fragments scFv (*tableau XI*). Le fragment scFv-Fc (H43B2), malgré la présence d'une seule bande à 110 kDa (Pur  $-\beta$ ) sur le gel de polyacrylamide (*figure 32A*), s'est complètement dégradé et ne présente que des formes protéolysées à 26120 Da et 26903 Da lors de la spectrométrie de masse (*tableau XI*). Selon la taille de ces fragments protéolysés, ces fragments semblent correspondre à des fragments scFv. L'anticorps entier (H109B2) présente quant à lui une forme monomérique à 148060 Da. La différence de masse 2641 Da observée entre la masse théorique (145419 Da) et la masse obtenue est due à la présence des sucres au niveau de la partie Fc de l'anticorps entier (*tableau XI*).

**Tableau XI :** Mesure de la masse (spectrométrie de masse) des fragments H40B2, H41B2, H42B2, H43B2 et de l'anticorps entier H109B2 (\* représente un site de bioconjugaison)

	Fragments non conjugués		
	Masse théorique (en Da)	Masses obtenues (en Da)	
	H40B2 (Diabody)	27397	27371
			Monomère
	H41B2 (scFv en tandem)	55218	27371
			scFv
	H42B2 (Fab-scFv)	76768	55186
			scFv en tandem
	H43B2 (scFv-Fc)	107217	27372
			?
	H109B2 (Ac entier)	145419	27995
			?
			26120
			?
			26903
			?
			148060
			Ac entier glycosylé

### c) Bioconjugaison du diabody H40B2 à la MMAF (linker non clivable)

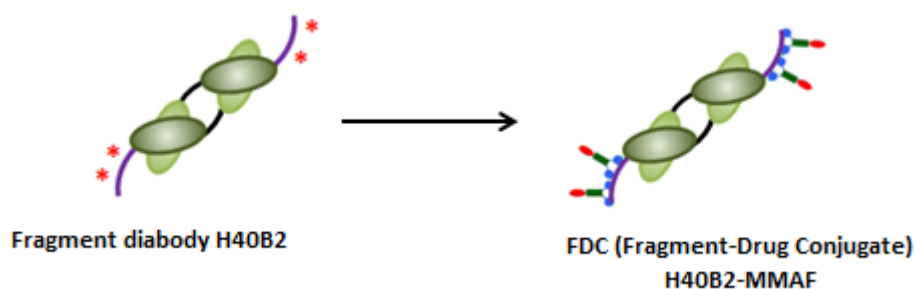
Le fragment diabody (H40B2) est l'unique fragment DAR 4 n'ayant pas présenté de protéolyse. Il a donc été bioconjugué à la MMAF via le linker non clivable. La bioconjugaison du diabody H40B2 à la drogue MMAE via le linker clivable n'a pas été réalisée à cause d'un manque de quantité de linker clivable.


Le fragment diabody (H40B2) présente 100% de bioconjugaison obtenant ainsi 100% de fragment conjugué à la MMAF sous forme de monomère DAR 2 à 29220 Da donnant ainsi un dimère DAR 4 sous forme de diabody (H40B2-MMAF) (*tableau XII*).

Ainsi, le diabody H40B2 est le fragment DAR 4 présentant les meilleures caractéristiques, en l'occurrence, une absence de protéolyse et 100 % de bioconjugaison à la MMAF. Il a donc été obtenu un FDC diabody DAR 4 (H40B2-MMAF) (*figure 33*).

**Tableau XII :** Bioconjugaison du fragment diabody (H40B2) à la MMAF (linker non clivable) : 100 % des fragments diabody (H40B2) sont bioconjugués à la MMAF

Fragment conjugué à la MMAF (linker non clivable)		
	Masse théorique (Da)	Masse obtenue (Da)
<b>H40B2 (Diabody)</b>	H40B2 : 27397 Da	29220 Da
	MMAF : 923 Da	
	Interprétation	Monomère DAR 2 (dimère DAR 4)
	Proportion des fragments conjugués	100 %



**Figure 33:** Représentation schématique des fragments H40B2 et H40B2-MMAF (\* représente un site de bioconjugaison,  représente une drogue)

#### *d) Caractérisation du FDC diabody DAR 4 (H40B2-MMAF) : ELISA et cytotoxicité*

L'influence de la présence de la MMAF conjuguée au fragment diabody H40B2 vis-à-vis de la reconnaissance de l'antigène HER2 a été évaluée. Le diabody H40B2 non conjugué reconnaît bien l'antigène HER2 avec une reconnaissance équivalente au fragment H22B2 vis-à-vis de la protéine HER2. Malgré une reconnaissance de HER2 légèrement plus faible par rapport à celle du H40B2, le fragment conjugué H40B2-MMAF reconnaît également l'antigène HER2 (*figure 34A*).

En ce qui concerne la cytotoxicité vis-à-vis des cellules MDA-MB-231 (HER2-), le fragment conjugué H40B2-MMAF ne présente pas de toxicité ce qui est logique puisque cette lignée cellulaire n'exprime pas l'antigène HER2 (*figure 34B*). La drogue MMAE libre, quant à elle, présente une toxicité avec une  $CE_{50}$  égale à 20 nM (*figure 34B*).

Vis-à-vis des cellules SK-BR-3 (HER2+), le fragment conjugué H40B2-MMAF est toxique sur cette lignée cellulaire avec une  $CE_{50}$  égale à 0,4 nM (*figure 34C*). La cytotoxicité du H40B2-MMAF sur les cellules SK-BR-3 est équivalente à celle du fragment DAR 2 H22B2-MMAF ( $CE_{50} = 0,3$  nM) (*figure 31C*). La drogue libre MMAE présente quant à elle une toxicité plus importante sur la lignée SK-BR-3 avec une  $CE_{50}$  égale à 0,04 nM environ (*figure 34C*).

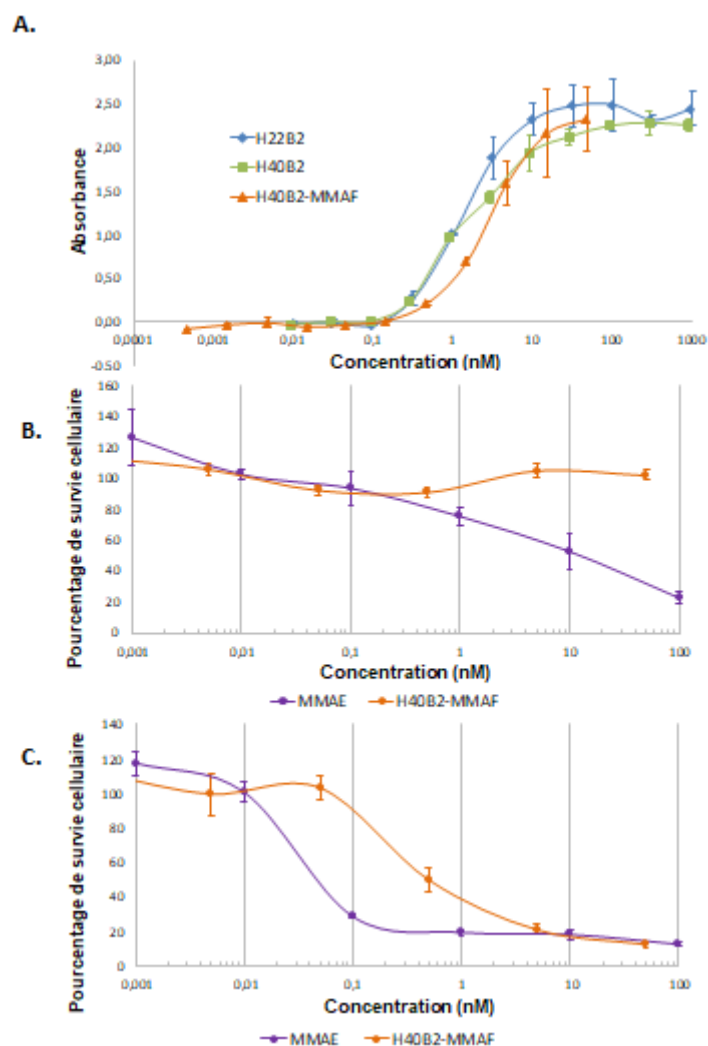


Figure 34 : Caractérisation du fragment H40B2-MMAF : fonctionnalité

- A. Mesure de l'interaction avec HER2 par ELISA : fragments H22B2, H40B2 et H40B2-MMAF
- B. Cytotoxicité sur cellules MDA-MB-231 (HER2-) du fragment H40B2-MMAF en comparaison à la drogue libre MMAE
- C. Cytotoxicité sur cellules SK-BR-3 (HER2+) du fragment H40B2-MMAF en comparaison à la drogue libre MMAE

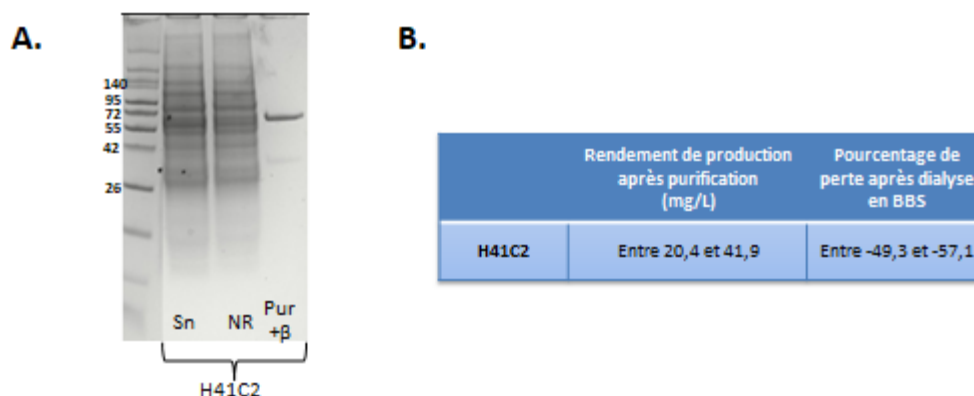
#### 4) Caractérisation du scFv en tandem H41C2 DAR 4

Le fragment H41B2 (scFv en tandem DAR 4), a présenté une protéolyse (*tableau X*). Au regard de la taille du fragment protéolysé, il a été soupçonné que la protéolyse s'effectuait au niveau du domaine VH du fragment H41B2. Dans ce contexte, une nouvelle séquence du domaine VH a été construite, la séquence « C », formant ainsi le scFv en tandem H41C2.

##### a) Production et purification du fragment H41C2

Deux productions du fragment H41C2 ont été effectuées. Lors d'une première production, H41C2 a présenté un rendement de production de 20,4 mg/L et un pourcentage de perte après dialyse de -49,3%. Une deuxième production du H41C2 a présenté un rendement de production de 41,9 mg/L et un pourcentage de perte après dialyse de -57,1% (*figure 35B*). Le rendement de production du H41C2 se trouve dans le même ordre de grandeur que le rendement de production du fragment H41B2 (*figure 32B*).

Après purification, le scFv en tandem H41C2 présente une forme monomérique avec une bande nette observée à 60kDa environ sur le gel de polyacrylamide (Pur + $\beta$ ) (*figure 35A*).



**Figure 35 :** Purification et rendement de production du fragment H41C2

A. Vérification de la qualité de la purification du fragment H41C2 sur gel précoulé de polyacrylamide Invitrogen<sup>TM</sup> : Sur le gel de polyacrylamide : 3 échantillons ont été déposés : (Sn) : Surnageant, (Nr) Non retenu, (Pur + $\beta$ ) : fragment purifié réduit (avec  $\beta$ -mercapto-éthanol)

B. Rendement de production après purification et pourcentage de perte après dialyse en BBS du fragment H41C2 : deux purifications ont été effectués :

1<sup>ère</sup> purification : rendement de production : 20,4 mg/L ; pourcentage de perte après dialyse : -49,3%

2<sup>e</sup> purification : rendement de production : 41,9 mg/L ; pourcentage de perte après dialyse : -57,1%

***b) Mesure de la masse du fragment H41C2 à l'aide de la spectrométrie de masse***

Contrairement au scFv en tandem H41B2 (*tableau XI*), le H41C2 ne présente pas de protéolyse. En effet, il présente une seule forme monomérique à 55148 Da observée à l'aide de la spectrométrie de masse (*tableau XIII*).

***Tableau XIII : Mesure de la masse en Da du fragment H41C2 par spectrométrie de masse***

	Fragment non conjugué	
	Masse théorique (Da)	Masse obtenue (Da)
H41C2	H41C2 : 55162 Da	55148 Da
		scFv en tandem



## D- Discussion

Le cancer du sein reste aujourd'hui un important problème de santé publique. 15% des cancers du sein surexpriment HER2 (HER2+), rendant ainsi ce type de cancer très agressif et de mauvais pronostic. L'arrivée des traitements ciblant HER2, en particulier le trastuzumab puis le T-DM1, ADC dérivant de celui-ci, a permis l'amélioration du pronostic des cancers du sein HER2+. En revanche, de par sa grande taille et son format complet IgG, le T-DM1 présente une faible pénétration tumorale. L'utilisation de fragments d'anticorps dans le cadre de FDC (fragment-drug conjugate) semble être une alternative prometteuse dans le domaine des ADC (format complet d'IgG)<sup>97</sup>. C'est dans ce contexte que nous avons développé, en système eucaryote, des fragments d'anticorps capables de se lier à deux types d'auristatines, la MMAE et la MMAF, afin de former des FDC. Le fragment natif, H13B2, a été produit en cellules CHO et purifié par la protéine L. En revanche, ce fragment a présenté de la protéolyse au niveau de sa séquence C-terminale comprenant le motif « CGC » et le Tag histidine. Le fragment protéolysé ne pouvant pas se lier à la drogue à cause de la perte du motif « CGC », après bioconjugaison de H13B2 avec la MMAE, un mélange de fragments, composé du H13B2-VC-MMAE et du fragment protéolysé, a été obtenu. Par conséquent, 4 nouvelles séquences du Tag ont été imaginées générant donc 4 fragments scFv de DAR 2 (double motifs « CGC »), les fragments H22B2, H23B2, H24B2 et H25B2, dans l'objectif d'éliminer ce phénomène de protéolyse. Le fragment H22B2 est le fragment qui a présenté le meilleur profil puisqu'il ne subit pas de protéolyse et permet l'obtention de 100% de DAR 2 après bioconjugaison, qu'il soit bioconjugué à la MMAF *via* un linker non clivable (H22B2-MMAF) ou à la MMAE *via* un linker clivable (H22B2-VC-MMAE). C'est en partant de la séquence C-terminal « 22 » de H22B2, que les fragments DAR 4 ont été construits et produits. Le diabody (H40B2) est le fragment DAR 4 présentant le meilleur profil puisqu'il présente un bon rendement de production (229,5 mg/L) sans présenter de protéolyse. Dans ce contexte, le diabody a été bioconjugué à la MMAF *via* le linker non clivable et permet d'obtenir 100% de DAR 4. N'ayant pas été bioconjugué à la MMAE, le diabody devra être bioconjugué à cette drogue *via* le linker clivable. Le scFv en tandem H41B2 présente quant à lui de la protéolyse, protéolyse se situant au niveau du domaine VH. Par conséquent, un autre scFv en tandem avec une nouvelle séquence du domaine VH a été construit formant ainsi le fragment H41C2. Le H41C2 présente un rendement de production équivalent au H41B2 mais ne subit pas de protéolyse. Ce fragment devra être par la suite bioconjugué à la MMAE et à la MMAF afin de former un FDC de DAR 4. Malgré un faible rendement de production par

rapport au diabody H40B2, le H41C2 se présente comme un bon candidat dans l'obtention d'un FDC de DAR 4. Les fragments Fab-scFv H42B2 et scFv-Fc H43B2 ne semblent pas stable et sont fortement protéolysés. Il a été vu que le fragment H41C2 ne subit pas de protéolyse contrairement au H41B2. La séquence du domaine VH « C » pourrait être utilisée pour la construction des fragments Fab-scFv et scFv-Fc, obtenant ainsi les fragments H42C2 et H43C2 respectivement, afin d'augmenter leur stabilité et de diminuer leur agrégation et le phénomène de protéolyse.

Pour les fragments possédant une partie Fc, le scFv-Fc (H43B2) et l'anticorps entier, la purification s'est faite par la protéine A, protéine couramment utilisée pour la purification d'anticorps se fixant au niveau de la partie Fc<sup>148</sup>. D'autres tampons de lavage et d'élution ont été utilisés par rapport à ceux utilisés avec la protéine L. La purification de ces fragments n'a pas été optimale car plusieurs changements de tampon ont été effectués. L'utilisation d'un premier tampon de lavage de phosphate de sodium 20mM pH 6,5 et d'un tampon d'élution d'acide citrique 0,1M pH 3,3 n'a pas permis de purifier le scFv-Fc et l'anticorps entier. Pensant qu'ils n'avaient pas été retenus par la colonne, un deuxième tampon de lavage d'acide borique 0,05M /NaCl 1M pH 8,9 a été utilisé. Suite à cela, nous nous sommes rendu compte que l'élution n'était pas optimale et il a fallu utiliser une solution de glycine pH2 (tampon d'élution utilisé lors de la purification à la protéine L) pour permettre l'élution de nos anticorps. Ces différents changements expliquent peut être le faible rendement de production du H109B2 et du H43B2 (65,7 mg/L et 50,5 mg/L respectivement) ainsi que la forte agrégation de ce dernier. Une purification par la protéine L aurait été peut-être plus adaptée. Une électrophorèse SDS-page a été effectuée sur les surnageants des différents fragments DAR 4 juste après leur récolte et avant leur congélation. Le surnageant du H43B2 présentait une grosse bande à environ 100 kDa, taille du scFv-Fc (résultats non montrés). Une deuxième électrophorèse SDS-page a été effectuée sur ces mêmes surnageants avant la purification et après la congélation (résultats non montrés). Sur le gel de polyacrylamide, la bande à 100 kDa correspondant au scFv-Fc avait presque disparu. Le H43B2 ne semble pas supporter la congélation pouvant ainsi expliquer son faible rendement de production et sa forte agrégation. En conclusion, deux fragments DAR 4 sont des candidats intéressants dans l'obtention d'un FDC DAR 4. Premièrement, le diabody (H40B2) présente le meilleur profil avec le meilleur rendement de production (229,5 mg/L), une absence de protéolyse et 100% de bioconjugaison à la MMAF. Deuxièmement, le scFv en tandem H41C2 possède également un profil intéressant puisqu'il ne subit pas de protéolyse contrairement à son homologue, le H41B2. Le

H41C2 devra être par la suite bioconjugué à la MMAF et à la MMAE dans le but d'avoir un FDC DAR 4. Afin de produire les fragments Fab-scFv et scFv-Fc, la séquence du domaine VH « C » pourrait être utilisée pour la construction de ces fragments afin d'augmenter leur stabilité et de diminuer leur agrégation et le phénomène de protéolyse. Les fragments H42C2 (Fab-scFv) et H43C2 (scFv-Fc) seraient ainsi obtenus. Le fragment DAR 2 H25B2 présente également un profil intéressant avec un bon rendement de production (254,0 mg/L), une absence de protéolyse et une bioconjugaison convenable permettant l'obtention de 90% de DAR 2. La séquence C-terminale « 25 » de ce fragment DAR 2 pourrait être également utilisée pour la construction des fragments Fab-scFv et scFv-Fc afin d'augmenter leur rendement de production et de diminuer leur agrégation.

Par la suite, la cytotoxicité des FDC DAR 2 H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF a été évaluée sur cellules de cancer mammaire SK-BR-3 (HER2+) et MDA-MB231 (HER2-). Ces FDC présentent une forte spécificité vis-à-vis d'HER2 puis qu'ils ont montré une forte toxicité sur les cellules SK-BR-3 ( $CE_{50}=0,3nM$  et  $CE_{50}=3nM$  respectivement) sans être toxiques sur les cellules MDA-MB-231 à ces mêmes concentrations. Sur les cellules SK-BR-3, le fragment H22B2-MMAF présente une plus forte cytotoxicité de l'ordre d'un log par rapport au fragment clivable H22B2-VC-MMAE. Ceci est étonnant puisque la MMAE et la MMAF présentent la même toxicité<sup>94</sup>. Une des hypothèses expliquant cette observation est que, lorsque H22B2-MMAF est internalisé dans la cellule, le FDC pourrait libérer une seule entité composé de deux molécules de MMAF et non de deux molécules de MMAF isolées. Le clivage s'effectuerait donc entre l'anticorps et la première molécule de MMAF sans se faire au niveau de la séquence situé entre les 2 molécules de MMAF. On obtiendrait ainsi une molécule de type « linker-MMAF-linker-MMAF » et non deux molécules de type « linker-MMAF ». Ceci pourrait expliquer un effet synergique expliquant la plus grande toxicité du H22B2-MMAF sur les cellules HER2+ par rapport au H22B2-VC-MMAE. Cette hypothèse semble plausible dans la mesure où ce phénomène n'est pas observé sur l'Ac entier (site de fixation sur les ponts disulfures donc trop éloignés) ou sur le scFv DAR 1 (1 seul site de fixation). En ce qui concerne les drogues utilisées, la MMAF sous forme libre présente une plus faible toxicité que la MMAE sous forme libre également. Ceci est dû au fait que par rapport à la MMAE, la MMAF est une molécule chargée et a par conséquent du mal à traverser la membrane cellulaire afin d'entrer dans la cellule. La vectorisation de la MMAF avec H22B2 (H22B2-MMAF) permet l'action de celle-ci. La vectorisation de la MMAE

permet de diminuer sa toxicité contre les cellules n'exprimant pas HER2 rendant le fragment H22B2-VC-MMAE très spécifique de HER2.

La cytotoxicité du FDC DAR 4 H40B2-MMAF a également été évaluée sur cellules de cancer mammaire SK-BR-3 (HER2+) et MDA-MB-231 (HER2-). Tout comme les FDC DAR 2, le FDC DAR 4 H40B2-MMAF présente une toxicité sur les cellules SK-BR-3 ( $CE_{50}=0,4$  nM) sans être toxiques sur les cellules MDA-MB-231. Sur les cellules SK-BR-3, le FDC DAR 4 H40B2-MMAF présente une toxicité équivalente ou légèrement inférieure au FDC DAR 2 H22B2-MMAF. Ceci est étonnant puisque le H40B2-MMAF, étant un FDC DAR 4, aurait dû montrer une toxicité supérieure au H22B2-MMAF. Afin d'expliquer cette observation, plusieurs hypothèses peuvent être émises. Tout d'abord, il est possible que le diabody soit moins bien internalisé par la cellule tumorale par rapport au scFv. Une deuxième hypothèse est que le fragment H40B2-MMAF ait perdu deux molécules de MMAF après la bioconjugaison, ayant ainsi un FDC DAR 2 et non de DAR 4. D'autres essais de cytotoxicité sont nécessaires afin d'évaluer l'influence du DAR sur l'efficacité anti-tumorale de nos FDC anti-HER2 sur les cellules de cancer mammaire HER2+.

Nous avons donc produit deux FDC DAR 2, H22B2-MMAF et H22B2-VC-MMAE, et un FDC DAR 4 H40B2-MMAF gardant une forte spécificité pour HER2 avec une très forte toxicité sur les cellules HER2+ ( $CE_{50} = 0,3$  nM ; 3 nM et 0,4 nM respectivement), sans être toxiques sur les cellules HER2-.

L'évaluation de la pénétration tumorale de nos FDC n'a pas été réalisée. L'utilisation de scFv anti-HER2 associés à des nanoparticules dans le but de cibler les cellules cancéreuses mammaires HER2+ a démontré une grande pénétration tumorale ainsi qu'une grande distribution de ces dernières<sup>146</sup>. Ceci appuie l'idée que les FDC présenteraient une meilleure pénétration tumorale que les ADC. Lors de l'essai de cytotoxicité, le temps d'incubation a été choisi en se basant sur des études de cytotoxicité réalisées avec des ADC (anticorps entier). Afin de montrer une pénétration dans la cellule tumorale plus rapide des FDC par rapport aux ADC, il pourrait être réalisé ces mêmes expériences mais avec des temps d'incubation plus courts, de l'ordre de 1 à 2 jours. Le résultat attendu serait une cytotoxicité des FDC anti-HER2 sur cellules SK-BR-3 (HER2+) sans cytotoxicité du T-DM1 (ADC de référence) observée. Par la suite, des études *in vivo* pourront être réalisées afin d'évaluer l'efficacité anti-tumorale *in vivo* des FDC anti-HER2 ainsi que leur pénétration tumorale sur des souris porteuses de tumeur mammaire surexprimant HER2.

Nous avons donc pu produire en système eucaryote un fragment scFv DAR 2, H22B2, et un fragment diabody DAR 4, H40B2, permettant d'obtenir deux FDC DAR 2, H22B2-VC-MMAE et H22B2-MMAF, et un FDC DAR 4, H40B2-MMAF, avec une grande spécificité d'action. Ces premiers résultats sont très encourageants. Nous avons également produit un scFv en tandem DAR 4, H41C2, présentant un profil intéressant (absence de protéolyse). Ce fragment sera bioconjugué à la MMAE et à la MMAF afin de former deux FDC DAR 4, le H41C2-VC-MMAE et le H41C2-MMAF. Une fois ces FDC DAR 4 produits, un essai de cytotoxicité comportant tous les FDC produits (DAR 2 et DAR 4) devra être réalisé afin d'étudier l'influence du DAR et du format en comparaison à un ADC DAR 4 ou au T-DM1 (ADC de référence).

## Bibliographie :

1. WHO | Breast cancer. Available at : WHO <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>. (Accessed: 28<sup>th</sup> March 2019)
2. Cancer Today. Available at : <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. (Accessed: 7<sup>th</sup> October 2019)
3. Le cancer du sein - Les cancers les plus fréquents. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-sein>. (Accessed: 27<sup>th</sup> March 2019)
4. Cancer du sein. *Ligue contre le cancer* /article/26094\_cancer-du-sein. (Accessed: 27<sup>th</sup> March 2019)
5. Nkondjock, A. & Ghadirian, P. [Risk factors and risk reduction of breast cancer]. *Med. Sci. MS* **21**, 175–180 (2005).
6. Key, T. J., Verkasalo, P. K. & Banks, E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* **2**, 133–140 (2001).
7. Kelsey, J. L. & Bernstein, L. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu. Rev. Public Health* **17**, 47–67 (1996).
8. Age - Facteurs de risque. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque/Age>. (Accessed: 2<sup>nd</sup> April 2019)
9. Antécédents personnels - Facteurs de risque. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque/Antecedents-personnels>. (Accessed: 2<sup>nd</sup> April 2019)
10. Antécédents familiaux - Facteurs de risque. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque/Antecedents-familiaux>. (Accessed: 2<sup>nd</sup> April 2019)
11. Pharoah, P. D., Day, N. E., Duffy, S., Easton, D. F. & Ponder, B. A. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* **71**, 800–809 (1997).
12. Kelsey, J. L., Gammon, M. D. & John, E. M. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol. Rev.* **15**, 36–47 (1993).
13. Hunter, D. J. *et al.* Non-dietary factors as risk factors for breast cancer, and as effect modifiers of the association of fat intake and risk of breast cancer. *Cancer Causes Control CCC* **8**, 49–56 (1997).
14. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet Lond. Engl.* **350**, 1047–1059 (1997).
15. Prédispositions génétiques - Facteurs de risque. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque/Predispositions-genetiques>. (Accessed: 2<sup>nd</sup> April 2019)
16. BRCA Mutations: Cancer Risk & Genetic Testing. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics/brca-fact-sheet> (2018). (Accessed: 3<sup>rd</sup> April 2019)

17. Kuchenbaecker, K. B. *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* **317**, 2402–2416 (2017).
18. Ford, D. *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 676–689 (1998).
19. Boyd, N. F. *et al.* Mammographic densities and breast cancer risk. *Breast Dis.* **10**, 113–126 (1998).
20. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet Lond. Engl.* **347**, 1713–1727 (1996).
21. Rossouw, J. E. *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288**, 321–333 (2002).
22. Wang, J., Yang, D.-L., Chen, Z.-Z. & Gou, B.-F. Associations of body mass index with cancer incidence among populations, genders, and menopausal status: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* **42**, 1–8 (2016).
23. Reeves, G. K. *et al.* Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* **335**, 1134 (2007).
24. Friedenreich, C. M., Courneya, K. S. & Bryant, H. E. Influence of physical activity in different age and life periods on the risk of breast cancer. *Epidemiol. Camb. Mass* **12**, 604–612 (2001).
25. Conlon, M. S. C., Johnson, K. C., Bewick, M. A., Lafrenie, R. M. & Donner, A. Smoking (active and passive), N-acetyltransferase 2, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol.* **34**, 142–149 (2010).
26. Johnson, K. C. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. *Int. J. Cancer* **117**, 619–628 (2005).
27. Hamajima, N. *et al.* Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br. J. Cancer* **87**, 1234–1245 (2002).
28. Feigelson, H. S., Calle, E. E., Robertson, A. S., Wingo, P. A. & Thun, M. J. Alcohol consumption increases the risk of fatal breast cancer (United States). *Cancer Causes Control CCC* **12**, 895–902 (2001).
29. Anatomie du sein - Cancer du sein. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Anatomie-du-sein>. (Accessed: 9<sup>th</sup> April 2019)
30. Cancers du sein - Les maladies du sein. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-maladies-du-sein/Cancers-du-sein>. (Accessed: 9<sup>th</sup> April 2019)
31. Mehta, S. *et al.* Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2**, 125–148 (2010).

32. Sengal, A. T. *et al.* Immunohistochemistry defined subtypes of breast cancer in 678 Sudanese and Eritrean women; hospitals based case series. *BMC Cancer* **17**, 804 (2017).
33. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–8423 (2003).
34. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
35. Sotiriou, C. *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10393–10398 (2003).
36. Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 698–707 (2012).
37. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5–23 (2011).
38. Ge, H., Walhout, A. J. M. & Vidal, M. Integrating ‘omic’ information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet. TIG* **19**, 551–560 (2003).
39. Goldhirsch, A. *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **22**, 1736–1747 (2011).
40. Symptômes - Cancer du sein. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Symptomes>. (Accessed: 18<sup>th</sup> April 2019)
41. Diagnostic d'un cancer du sein - Cancer du sein. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Diagnostic>. (Accessed: 21<sup>st</sup> April 2019)
42. Traitements - Cancer du sein. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Traitements>. (Accessed: 2<sup>nd</sup> May 2019)
43. Tumorectomie et quadrantectomie - Chirurgie (tumorectomie et mastectomie). Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Chirurgie-tumorectomie-et-mastectomie/Tumorectomie-et-quadrantectomie>. (Accessed: 6<sup>th</sup> May 2019)
44. Radiothérapie - Cancer du sein. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Radiotherapie>. (Accessed: 7<sup>th</sup> May 2019)
45. Hormonothérapie - Cancer du sein. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Hormonotherapie>. (Accessed: 7<sup>th</sup> May 2019)
46. Johnston, S. R. D. & Dowsett, M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 821–831 (2003).
47. Thérapies ciblées - Cancer du sein. Institut National du Cancer. Available at : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Therapies-ciblees>. (Accessed: 22<sup>nd</sup> September 2019)



48. Emde, A., Köstler, W. J., Yarden, Y. & Association of Radiotherapy and Oncology of the Mediterranean arEa (AROME). Therapeutic strategies and mechanisms of tumorigenesis of HER2-overexpressing breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **84 Suppl 1**, e49-57 (2012).
49. Bertelsen, V. & Stang, E. The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking. *Membranes* **4**, 424–446 (2014).
50. Burgess, A. W. *et al.* An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* **12**, 541–552 (2003).
51. Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007378/>.
52. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211–225 (2000).
53. Sorkin, A. & Goh, L. K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* **314**, 3093–3106 (2008).
54. Colomer, R. *et al.* Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 2356–2362 (2000).
55. Leitzel, K. *et al.* Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **13**, 1129–1135 (1995).
56. Segatto, O., King, C. R., Pierce, J. H., Di Fiore, P. P. & Aaronson, S. A. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5570–5574 (1988).
57. Anido, J. *et al.* Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J.* **25**, 3234–3244 (2006).
58. Tural, D., Akar, E., Mutlu, H. & Kilickap, S. P95 HER2 fragments and breast cancer outcome. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **14**, 1089–1096 (2014).
59. Arteaga, C. L. *et al.* Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**, 16–32 (2011).
60. Valabrega, G., Montemurro, F. & Aglietta, M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **18**, 977–984 (2007).
61. Tevaarwerk, A. J. & Kolesar, J. M. Lapatinib: a small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer. *Clin. Ther.* **31 Pt 2**, 2332–2348 (2009).
62. Amiri-Kordestani, L. *et al.* First FDA approval of neoadjuvant therapy for breast cancer: pertuzumab for the treatment of patients with HER2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 5359–5364 (2014).
63. Lambert, J. M. & Chari, R. V. J. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. *J. Med. Chem.* **57**, 6949–6964 (2014).

64. Cho, H.-S. *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**, 756–760 (2003).
65. Molina, M. A. *et al.* Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 4744–4749 (2001).
66. Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D. & Jain, R. K. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* **416**, 279–280 (2002).
67. Spector, N. L. & Blackwell, K. L. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5838–5847 (2009).
68. Mamidi, S., Cinci, M., Hasmann, M., Fehring, V. & Kirschfink, M. Lipoplex mediated silencing of membrane regulators (CD46, CD55 and CD59) enhances complement-dependent anti-tumor activity of trastuzumab and pertuzumab. *Mol. Oncol.* **7**, 580–594 (2013).
69. Ryan, Q. *et al.* FDA drug approval summary: lapatinib in combination with capecitabine for previously treated metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *The Oncologist* **13**, 1114–1119 (2008).
70. Geyer, C. E. *et al.* Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2733–2743 (2006).
71. Konecny, G. E. *et al.* Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 1630–1639 (2006).
72. Spector, N. L. *et al.* Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 2502–2512 (2005).
73. Nahta, R., Yuan, L. X. H., Du, Y. & Esteva, F. J. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 667–674 (2007).
74. Xia, W., Liu, L.-H., Ho, P. & Spector, N. L. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* **23**, 646–653 (2004).
75. Franklin, M. C. *et al.* Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* **5**, 317–328 (2004).
76. Baselga, J. *et al.* Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 109–119 (2012).
77. Swain, S. M. *et al.* Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* **14**, 461–471 (2013).

78. Krop, I. & Winer, E. P. Trastuzumab emtansine: a novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 15–20 (2014).
79. Xu, S. Internalization, Trafficking, Intracellular Processing and Actions of Antibody-Drug Conjugates. *Pharm. Res.* **32**, 3577–3583 (2015).
80. Junttila, T. T., Li, G., Parsons, K., Phillips, G. L. & Sliwkowski, M. X. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **128**, 347–356 (2011).
81. Verma, S. *et al.* Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1783–1791 (2012).
82. Krop, I. E. *et al.* A phase II study of trastuzumab emtansine in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer who were previously treated with trastuzumab, lapatinib, an anthracycline, a taxane, and capecitabine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 3234–3241 (2012).
83. Joubert, N., Denevault-Sabourin, C., Bryden, F. & Viaud-Massuard, M.-C. Towards antibody-drug conjugates and prodrug strategies with extracellular stimuli-responsive drug delivery in the tumor microenvironment for cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **142**, 393–415 (2017).
84. Hamblett, K. J. *et al.* Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 7063–7070 (2004).
85. Behrens, C. R. *et al.* Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Derived from Interchain Cysteine Cross-Linking Demonstrate Improved Homogeneity and Other Pharmacological Properties over Conventional Heterogeneous ADCs. *Mol. Pharm.* **12**, 3986–3998 (2015).
86. Lambert, J. M. Antibody-Drug Conjugates (ADCs): Magic Bullets at Last! *Mol. Pharm.* **12**, 1701–1702 (2015).
87. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
88. Perez, H. L. *et al.* Antibody-drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discov. Today* **19**, 869–881 (2014).
89. Birrer, M. J., Moore, K. N., Betella, I. & Bates, R. C. Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics: State of the Science. *J. Natl. Cancer Inst.* (2019) doi:10.1093/jnci/djz035.
90. Bross, P. F. *et al.* Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 1490–1496 (2001).
91. Bryden, F. *et al.* Impact of cathepsin B-sensitive triggers and hydrophilic linkers on in vitro efficacy of novel site-specific antibody-drug conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 1882–1889 (2018).

92. Lyon, R. P. *et al.* Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* **33**, 733–735 (2015).
93. Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 315–337 (2017).
94. Maderna, A. & Leverett, C. A. Recent advances in the development of new auristatins: structural modifications and application in antibody drug conjugates. *Mol. Pharm.* **12**, 1798–1812 (2015).
95. Deonarain, M. P., Yahiloglu, G., Stamati, I. & Marklew, J. Emerging formats for next-generation antibody drug conjugates. *Expert Opin. Drug Discov.* **10**, 463–481 (2015).
96. Deonarain, M. P. Miniaturised 'antibody'-drug conjugates for solid tumours? *Drug Discov. Today Technol.* **30**, 47–53 (2018).
97. Deonarain, M. P. *et al.* Small-Format Drug Conjugates: A Viable Alternative to ADCs for Solid Tumours? *Antibodies* **7**, 16 (2018).
98. Kim, M. T., Chen, Y., Marhoul, J. & Jacobson, F. Statistical modeling of the drug load distribution on trastuzumab emtansine (Kadcyla), a lysine-linked antibody drug conjugate. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1223–1232 (2014).
99. Brachet, G. *et al.* Increment in Drug Loading on an Antibody-Drug Conjugate Increases Its Binding to the Human Neonatal Fc Receptor in Vitro. *Mol. Pharm.* **13**, 1405–1412 (2016).
100. Adem, Y. T. *et al.* Auristatin antibody drug conjugate physical instability and the role of drug payload. *Bioconjug. Chem.* **25**, 656–664 (2014).
101. Boswell, C. A. *et al.* Impact of drug conjugation on pharmacokinetics and tissue distribution of anti-STEAP1 antibody-drug conjugates in rats. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1994–2004 (2011).
102. Xenaki, K. T., Oliveira, S. & van Bergen En Henegouwen, P. M. P. Antibody or Antibody Fragments: Implications for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Solid Tumors. *Front. Immunol.* **8**, 1287 (2017).
103. Netti, P. A., Berk, D. A., Swartz, M. A., Grodzinsky, A. J. & Jain, R. K. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res.* **60**, 2497–2503 (2000).
104. Cilliers, C., Menezes, B., Nessler, I., Linderman, J. & Thurber, G. M. Improved Tumor Penetration and Single-Cell Targeting of Antibody-Drug Conjugates Increases Anticancer Efficacy and Host Survival. *Cancer Res.* **78**, 758–768 (2018).
105. Krop, I. E. *et al.* Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 689–699 (2014).
106. de Goeij, B. E. & Lambert, J. M. New developments for antibody-drug conjugate-based therapeutic approaches. *Curr. Opin. Immunol.* **40**, 14–23 (2016).
107. KADCYLA (trastuzumab emtansine) : nouveau médicament dans la prise en charge du cancer du sein. VIDAL .

[https://www.vidal.fr/actualites/14469/kadcyla\\_trastuzumab\\_emptansine\\_nouveau\\_medicament\\_dans\\_la\\_prise\\_en\\_charge\\_du\\_cancer\\_du\\_sein/](https://www.vidal.fr/actualites/14469/kadcyla_trastuzumab_emptansine_nouveau_medicament_dans_la_prise_en_charge_du_cancer_du_sein/). (Accessed: 27<sup>th</sup> February 2019)

108. Jumbe, N. L. *et al.* Modeling the efficacy of trastuzumab-DM1, an antibody drug conjugate, in mice. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **37**, 221–242 (2010).
109. Uppal, H. *et al.* Potential mechanisms for thrombocytopenia development with trastuzumab emtansine (T-DM1). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 123–133 (2015).
110. Thon, J. N., Devine, M. T., Jurak Begonja, A., Tibbitts, J. & Italiano, J. E. High-content live-cell imaging assay used to establish mechanism of trastuzumab emtansine (T-DM1)--mediated inhibition of platelet production. *Blood* **120**, 1975–1984 (2012).
111. Qiao, J., Al-Tamimi, M., Baker, R. I., Andrews, R. K. & Gardiner, E. E. The platelet Fc receptor, FcγRIIa. *Immunol. Rev.* **268**, 241–252 (2015).
112. Zhao, H. *et al.* Inhibition of Megakaryocyte Differentiation by Antibody-Drug Conjugates (ADCs) is Mediated by Macropinocytosis: Implications for ADC-induced Thrombocytopenia. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 1877–1886 (2017).
113. Hinrichs, M. J. M. & Dixit, R. Antibody Drug Conjugates: Nonclinical Safety Considerations. *AAPS J.* **17**, 1055–1064 (2015).
114. Montemurro, F. *et al.* Safety of trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive advanced breast cancer: Primary results from the KAMILLA study cohort 1. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **109**, 92–102 (2019).
115. Diéras, V. *et al.* Trastuzumab emtansine in human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: an integrated safety analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 2750–2757 (2014).
116. Gorovits, B. & Krinos-Fiorotti, C. Proposed mechanism of off-target toxicity for antibody-drug conjugates driven by mannose receptor uptake. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **62**, 217–223 (2013).
117. Allavena, P., Chieppa, M., Monti, P. & Piemonti, L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit. Rev. Immunol.* **24**, 179–192 (2004).
118. Adamo, M. *et al.* Evaluation of oligosaccharide methods for carbohydrate analysis in a fully human monoclonal antibody and comparison of the results to the monosaccharide composition determination by a novel calculation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**, 181–192 (2009).
119. Bijsterbosch, M. K. *et al.* Quantitative analysis of the targeting of mannose-terminal glucocerebrosidase. Predominant uptake by liver endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* **237**, 344–349 (1996).
120. Endo, Y. *et al.* Payload of T-DM1 binds to cell surface cytoskeleton-associated protein 5 to mediate cytotoxicity of hepatocytes. *Oncotarget* **9**, 37200–37215 (2018).
121. Barok, M., Tanner, M., Köninki, K. & Isola, J. Trastuzumab-DM1 is highly effective in preclinical models of HER2-positive gastric cancer. *Cancer Lett.* **306**, 171–179 (2011).

122. Barok, M., Tanner, M., Köninki, K. & Isola, J. Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res. BCR* **13**, R46 (2011).
123. Barok, M., Joensuu, H. & Isola, J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res. BCR* **16**, 209 (2014).
124. Hurvitz, S. A. *et al.* Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 1157–1163 (2013).
125. Loganzo, F. *et al.* Tumor cells chronically treated with a trastuzumab-maytansinoid antibody-drug conjugate develop varied resistance mechanisms but respond to alternate treatments. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 952–963 (2015).
126. Loganzo, F., Sung, M. & Gerber, H.-P. Mechanisms of Resistance to Antibody-Drug Conjugates. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 2825–2834 (2016).
127. Sung, M. *et al.* Caveolae-Mediated Endocytosis as a Novel Mechanism of Resistance to Trastuzumab Emtansine (T-DM1). *Mol. Cancer Ther.* **17**, 243–253 (2018).
128. Ríos-Luci, C. *et al.* Resistance to the Antibody-Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity. *Cancer Res.* **77**, 4639–4651 (2017).
129. Hamblett, K. J. *et al.* SLC46A3 Is Required to Transport Catabolites of Noncleavable Antibody Maytansine Conjugates from the Lysosome to the Cytoplasm. *Cancer Res.* **75**, 5329–5340 (2015).
130. Li, G. *et al.* Mechanisms of Acquired Resistance to Trastuzumab Emtansine in Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 1441–1453 (2018).
131. Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D. & Haber, M. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **26**, 1–9 (2016).
132. Dean, M. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol.* **400**, 409–429 (2005).
133. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1126–1136 (2005).
134. Todorovska, A. *et al.* Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods* **248**, 47–66 (2001).
135. Khodabakhsh, F., Behdani, M., Rami, A. & Kazemi-Lomedasht, F. Single-Domain Antibodies or Nanobodies: A Class of Next-Generation Antibodies. *Int. Rev. Immunol.* **37**, 316–322 (2018).
136. Nelson, A. L. & Reichert, J. M. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* **27**, 331–337 (2009).
137. Kaplon, H. & Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2019. *mAbs* **11**, 219–238 (2019).

138. List, T. & Neri, D. Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **5**, 29–45 (2013).
139. Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M. & Schlom, J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* **52**, 3402–3408 (1992).
140. Kennel, S. J., Falcioni, R. & Wesley, J. W. Microdistribution of specific rat monoclonal antibodies to mouse tissues and human tumor xenografts. *Cancer Res.* **51**, 1529–1536 (1991).
141. Galgoczy, R. *et al.* A spectrophotometer-based diffusivity assay reveals that diffusion hindrance of small molecules in extracellular matrix gels used in 3D cultures is dominated by viscous effects. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **120**, 200–207 (2014).
142. Roopenian, D. C. & Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 715–725 (2007).
143. Sanz, L., Cuesta, A. M., Compte, M. & Alvarez-Vallina, L. Antibody engineering: facing new challenges in cancer therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 641–648 (2005).
144. El-Sayed, A. *et al.* Evaluation of antibody fragment properties for near-infrared fluorescence imaging of HER3-positive cancer xenografts. *Theranostics* **8**, 4856–4869 (2018).
145. Bryden, F. *et al.* Impact of cathepsin B-sensitive triggers and hydrophilic linkers on in vitro efficacy of novel site-specific antibody-drug conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 1882–1889 (2018).
146. Alric, C. *et al.* Covalent conjugation of cysteine-engineered scFv to PEGylated magnetic nanoprobe for immunotargeting of breast cancer cells. *RSC Adv.* **6**, 37099–37109 (2016).
147. Lakhrif, Z. *et al.* A method to confer Protein L binding ability to any antibody fragment. *mAbs* **8**, 379–388 (2016).
148. Grom, M., Kozorog, M., Caserman, S., Pohar, A. & Likozar, B. Protein A affinity chromatography of Chinese hamster ovary (CHO) cell culture broths containing biopharmaceutical monoclonal antibody (mAb): Experiments and mechanistic transport, binding and equilibrium modeling. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **1083**, 44–56 (2018).


**ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**

Je, soussigné (e) GAUTRON Clément .....

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :





**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : **21201027**

N° Thèse : **34**

Nom et Prénom : **GAUTRON Clément**

Sujet : **Nouveaux formats armés pour le traitement des cancers du sein HER2+**

Tours, le : **21/01/2022**

Le(s) Directeur(s) de Thèse :

*E. Allaud - Vannier*

*Vannier*

**Vu et Transmis :  
Le Doyen**

*Maupas*

## Nouveaux formats armés pour le traitement des cancers du sein HER2+

### RÉSUMÉ DE LA THÈSE

En France, le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent et représente la première cause de mortalité chez la femme. Environ 15% des tumeurs du sein surexpriment la protéine HER2 (HER2+). Ce type de cancer, très agressif, nécessite des traitements de plus en plus élaborés afin de pallier aux limites des traitements actuels, notamment le Kadcyla® ou T-DM1, anticorps armé (ADC) anti-HER2 utilisé dans le traitement du cancer du sein HER2+. Un anticorps armé ou ADC est une chimiothérapie vectorisée permettant la délivrance sélective d'un agent cytotoxique au niveau de la tumeur ce qui limite la toxicité systémique habituelle observée avec la chimiothérapie. Un ADC résulte du greffage d'un agent cytotoxique (drug) sur un anticorps thérapeutique (MAb) par l'intermédiaire d'un linker adapté. Cependant, le T-DM1, dans son format complet IgG et de par sa grande taille (150 kDa) présente une faible pénétration tumorale. Pour pallier à cette limitation, il est né l'idée de coupler des fragments d'anticorps anti-HER2, produits en système eucaryote, à la MMAE et à la MMAF via un linker incorporant une technologie brevetée de greffage afin d'obtenir des FDC (Fragment-Drug Conjugate) anti-HER2. Pour cela, les objectifs de ces travaux consisteront tout d'abord à (i) concevoir et produire les différents formats d'anticorps dans un système d'expression eucaryote, (ii) bioconjuguer les nouveaux formats à l'aide de la méthodologie propriétaire à la MMAE *via* un linker clivable sensible à la cathepsine B ou à la MMAF *via* un linker non clivable, (iii) vérifier la fonctionnalité de ces FDC en étudiant sa liaison à l'Ag HER2 par méthode ELISA ainsi que d'évaluer leur efficacité et leur spécificité *via* une étude de cytotoxicité sur deux lignées de cellules mammaires humaines tumorales, des cellules HER2+, nommées SK-BR-3, et des cellules HER2-, nommées MDA-MB-231. Plusieurs formats de fragments d'anticorps ont ainsi été conçus avec comme critères, être bivalent et présenter quatre sites de bioconjugaison afin d'obtenir un DAR 4 comme l'est le T-DM1. A l'issue de ces travaux, un FDC anti-HER2 de DAR 4 et bivalent a été conçu et a présenté une cytotoxicité sélective *in vitro* vis-à-vis des cellules mammaires humaines tumorales HER2+.

### MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS :

cancer du sein, HER2, T-DM1, ADC, anticorps thérapeutiques, fragments d'anticorps, FDC

### JURY

#### PRÉSIDENT :

Dr Emilie ALLARD-VANNIER (Pharmacien)

#### MEMBRES :

Dr. Nicolas JOUBERT (MCU)

Dr. Nicolas AUBREY (MCU)

Dr. Guillaume BRACHET (Pharmacien, CHRU de Tours)

Dr. Anthony LARUE (Pharmacien)

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : le 11 septembre 2020 à la Faculté de Pharmacie de Tours