

Le Dr Trent D. Stephens, Ph.D., et le Dr Bradley J. Fillmore, ont publié un article dans Teratology 61 : 189-195 (2000) intitulé «**Hypothesis: Thalidomide Embryopathy - Proposed Mechanism of Action**». En termes simples, l'article publié propose des explications sur la façon dont la thalidomide a touché le fœtus d'une femme enceinte.

Le Dr Trent D. Stephens, Ph.D., a accepté d'écrire un article expressément destiné au bulletin L'ACTION de l'ACVT, afin de décrire ses conclusions.

L'Association canadienne des victimes de la thalidomide et les auteurs de cette publication remercient le Dr Stephens de sa coopération.

## **OBJET : LE MÉCANISME DE LA THALIDOMIDE**

par Dr Trent D. Stephens, Ph.D.

Service des sciences biologiques, Université d'État de l'Idaho

Écrit par Glenn Alford, 3 Mars 2000

Le 1<sup>er</sup> octobre 1957, trois jours avant que les Russes ne lancent Spoutnik dans le ciel d'octobre, changeant ainsi nos vies pour toujours, la firme Chemie Grünenthal lançait officiellement son nouveau somnifère, Contergan, sur le marché mondial. Bien que peu de gens étaient au courant de ce second lancement et que personne ne connaissait ses répercussions, cela allait également changer en permanence nos vies et nos perspectives. J'avais neuf ans au moment où sont survenus ces deux lancements.

En août 1962, le Dr Helen Taussig, de l'école de médecine Johns Hopkins, publiait un document intitulé «Le syndrome de la thalidomide» dans la revue *Scientific American*. J'entrais alors en première année d'étude au Raft River High School, dans une minuscule communauté agricole de Malta, en Idaho, à l'automne de 1962. Le présentoir à journaux occupait un très petit coin de la petite bibliothèque, qui servait aussi de local d'étude. *Scientific American* était à peu près la seule revue scientifique à laquelle mon école était abonnée, mais je la lisais religieusement. J'ai été profondément impressionné par le dessin d'un «thalidomidien» dans le document du Dr Taussig.

Dix ans plus tard, alors collégien de la Brigham Young University, je lisais un article fascinant du Dr Edgar Zwilling publié dans le *Developmental Biology* sur les avantages d'étudier le développement des membres de poussins comme moyen de comprendre la forme biologique. À partir de ce moment-là, le développement normal et anormal des membres est devenu ma passion, mon obsession et, bien sûr, résoudre le mystère du mécanisme de la thalidomide faisait partie de cette obsession. Plus tard, j'ai fait mon doctorat sous la direction du Dr James W. (Jay) Lash, dans le département de l'anatomie de l'Université de la Pennsylvanie parce

qu'il avait publié plusieurs articles sur les mécanismes d'action de la thalidomide. Seulement, la recherche de Jay se trouvait dans une impasse et il ne trouvait aucun moyen de s'en sortir. De la façon dont les choses allaient tourner, il aurait été impossible de résoudre l'énigme à ce moment-là. Plus de 20 années allaient se passer avant que nous ne disposions de l'information de base sur les molécules. Lorsque j'étais à Penn, la question de la thalidomide fut mise en veilleuse, et j'ai travaillé sur un autre dossier : l'origine du membre. C'est une autre histoire.

Dans l'intervalle, l'intérêt envers la thalidomide était en baisse partout dans le monde, et le nombre de documents publiés sur le médicament était passé d'une centaine en 1967 à moins de 25 en 1980. En conclusion de son article écrit en 1962, le Dr Taussig avait écrit que l'histoire de la thalidomide était terminée pour la plupart des gens. Bien entendu, l'histoire était loin d'être terminée pour les thalidomidiens et le peu d'entre nous qui se passionnaient à vouloir résoudre le mystère du fonctionnement de ce médicament.

En 1986, la Société de tératologie parrainait un symposium pour commémorer le 25e anniversaire du désastre de la thalidomide. Quelques-uns des principaux intervenants, dont le Dr Widukind Lenz et le Dr Frances Kelsey participaient au symposium. Ce fut un excellent événement, et j'étais enchanté de rencontrer ces gens importants dans l'histoire du médicament, mais en dernière analyse, j'avais le sentiment que quelque chose aurait dû être dit sur le mécanisme d'action de la thalidomide. J'en ai fait la remarque au Dr Lewis Holmes, président de la Société de tératologie, ainsi qu'au Dr Robert Brent, rédacteur en chef de la revue publiée par la Société. Ils m'ont invité à écrire un article sur la question qui serait publié avec le compte rendu du symposium. Je n'avais pas vraiment eu l'intention d'écrire un tel article moi-même, mais je me suis dit «pourquoi pas ?» J'avais déjà fait paraître une quinzaine d'articles sur divers sujets entourant les mécanismes possibles de la thalidomide. J'ai donc écrit le document demandé. J'ai passé en revue les documents des 25 dernières années dans l'Index Medicus, et relevé 24 mécanismes qui avaient été proposés depuis l'incident de la thalidomide. J'en arrivais à la conclusion que, même si un certain nombre d'hypothèses avaient été mises de l'avant, nous n'avions pas vraiment d'idée de la façon dont la thalidomide endommageait l'embryon. Le document a paru dans la revue *Teratology* en 1988 dans le compte rendu du symposium.

Suite à cet article, on m'a invité à assister à la 25e réunion de la Société européenne de tératologie, qui se déroulait à Cannes, en France, en septembre 1987, où j'ai pris part au symposium sur la thalidomide. Ma tâche consistait à faire une mise à jour du mécanisme d'action de la thalidomide depuis la parution de mon article en 1988. J'ai passé en revue les 24 mécanismes originaux qui avaient été proposés, puis discuté de plusieurs propositions plus récentes, y compris certaines données issues des recherches dans mon propre laboratoire. Ces nouvelles études jetaient plus de

lumière sur le mystère. J'ai conclu en disant que, bien que le casse-tête n'était pas complet, on avait découvert récemment quelques pièces importantes, et qu'on saurait avant longtemps toutes les rassembler pour révéler la solution de ce mystère vieux de 40 ans.

Ça m'a pris 25 heures pour revenir à la maison après la réunion, et je n'ai pas réussi à fermer l'oeil. Ma présentation à Cannes me trottait dans la tête. Je me disais que toutes les pièces importantes étaient là, et qu'il ne s'agissait que de les lier. La solution finale est sûrement toute proche, à portée de la main, si seulement je pouvais la trouver. Puis, j'ai pris un carnet de notes et, pendant la majeure partie du trajet, j'ai passé en revue plusieurs fois la liste des pièces du casse-tête ainsi que leurs rapports.

Chaque fois que je retournais aux pièces connues du casse-tête, quatre pièces semblaient vouloir se démarquer en tant qu'éléments cruciaux de la solution globale :

1. La thalidomide s'insère dans l'ADN (la molécule de la thalidomide, qui possède une structure plate, peut glisser dans les écarts entre les sous-unités de la molécule d'ADN, un peu à la manière d'un CD dans la fente d'un système stéréo).
2. La thalidomide ne s'insère pas au hasard dans l'ADN, mais là où se trouve la guanine. Chaque molécule de l'ADN est composée de milliers de sous-unités appelées nucléotides, dont on trouve quatre types fondamentaux : guanine, adénine, cytosine et thymine (l'ADN ressemble beaucoup à une recette écrite avec un alphabet à quatre lettres). La thalidomide, qui est composée de trois anneaux attachés, dont deux ont une structure globale pratiquement identique à la guanine et à l'adénine, ne se fixe pas sur la cytosine et la thymine, mais se lie plus fermement à la guanine qu'à l'adénine.
3. Il a été démontré que la thalidomide entrave l'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. L'empêchement de la croissance de nouveaux vaisseaux dans un membre en formation prive les cellules en prolifération de nutriments essentiels, ce qui amène une baisse de cette prolifération et une réduction subséquente de la taille globale du membre. Même si ces quatre pièces du casse-tête avaient été trouvées, la façon dont elles s'agençaient n'était pas claire.

Les données de plusieurs laboratoires indiquent que l'angiogenèse dépend de la présence de molécules jumelées d'attachement de surface appelées intégrines, qui ressemblent à une paire de suçons inframicroscopiques dépassant de la surface cellulaire. Les intégrines, comme les protéines, doivent être produites à partir de la matrice de l'ADN par le processus de transcription de l'ADN en ARN, et la traduction de l'ARN en protéines. Le processus de fabrication d'une protéine à partir d'une

matrice d'ADN ressemble un peu à une recette de gâteau qu'on prend dans un livre pour l'inscrire sur une fiche (ARN), suivi par la traduction de la recette (maintenant dans la séquence d'ARN) en un gâteau (protéine). Les données du laboratoire du Dr Diether Neubert à Berlin indiquent que la thalidomide peut réguler à la baisse la synthèse d'au moins quelques-unes des sous-unités de l'intégrine, dont au moins l'une d'entre elles, appelées beta 3, est un élément essentiel de l'angiogenèse. Si la thalidomide s'insère dans les résidus de guanine de l'ADN et nuit à la synthèse de l'intégrine beta 3, où une telle insertion aurait-elle le plus d'impact ?

La transcription d'une partie donnée d'ADN (qui peut être un gène, une partie d'un gène appelé exon, ou plus d'un gène en tandem) est amorcée par une protéine appelée l'ARN polymérase II. Cette polymérase se lie au site d'initiation (un ensemble spécifique de trois nucléotides : Tac) pour une partie donnée d'ADN et amorce le processus de transcription. Les polymérases sont des protéines complexes composées de plusieurs sous-unités. De plus, d'autres protéines, appelées facteurs de transcriptions, ou promoteurs, se fixent à un segment de l'ADN en amont du site d'initiation et aident la polymérase à trouver le site d'initiation.

Les protéines qui jouent le rôle de promoteurs se fixent également aux séquences spécifiques des nucléotides. Les séquences les plus courantes sont les TATA (Tumour-associated Transplantation Antigens) ou CCAAT, et environ 91 % de toutes les régions où se trouvent des promoteurs génétiques contiennent une ou plusieurs de ces séquences. Le 9 % de régions restantes ne contiennent pas de séquence TATA ou CCAAT, mais présentent une ou (souvent) plusieurs des séquences GGGCGG (qu'on appelle la boîte GC). Parce que la thalidomide peut s'insérer dans l'ADN plus spécifiquement dans les endroits riches en guanine, elle doit également s'insérer beaucoup plus souvent dans les régions promotrices ayant des boîtes GC que dans celles ayant des boîtes TATA ou CCAAT. Par conséquent, les protéines telles que la sous-unité d'intégrine beta 3, que peut réguler à la baisse la thalidomide, devrait se retrouver dans le groupe minoritaire de 9 % avec des promoteurs de boîte GC plutôt qu'avec les promoteurs plus courants ayant des boîtes TATA ou CCAAT. Tel que prévu, le promoteur du gène beta 3 est dépourvu de TATA et de CCAAT, mais contient de multiples séquences GGGCGG. L'insertion de la thalidomide dans cette région promotrice du gène beta 3 riche en G pourrait suffire à diminuer la transcription et la traduction subséquente du ce gène en protéine beta 3. Sans cette protéine de liaison critique sur la surface cellulaire, l'angiogenèse pourrait être entravée et le membre risque d'être diminué.

Tel que mentionné précédemment, l'intégrine existe sur la surface cellulaire sous forme de paires appelées hétérodimères, qui se composent d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta. L'intégrine qui joue le rôle le plus actif dans l'angiogenèse est appelée alpha v beta 3. Le laboratoire NeubertAEs a constaté une régulation à la baisse du beta 3 dans les membres embryonnaires des primates ( marmousets)

exposés à la Thalidomide. Toutefois, ils n'ont pas examiné l'autre sous-unité, alpha v. Bien qu'il ait été démontré que la régulation à la baisse du beta 3 suffit à elle seule à décroître la formation d'hétérodimère et à entraver l'angiogenèse, nous avons décidé d'examiner également le promoteur de gènes alpha v. Comme dans le cas de beta 3, le promoteur de gènes alpha v ne comporte ni TATA, ni CCAAT, mais contient de multiples boîtes GC. Par conséquent, il semble que la synthèse des deux sous-unités de la protéine de liaison de surface cellulaire de l'intégrine hétérodimère soit sensible à l'entrave causée par l'insertion de la thalidomide dans l'ADN. Le système est donc soumis à une double attaque ! La spécificité auparavant manquante dans les modèles des mécanismes d'action de la thalidomide commençait à se manifester.

Plusieurs laboratoires ont fait la preuve que le facteur de croissance semblable à l'insuline de type I (FCI-I) et que le facteur de croissance des fibroblastes de type 2 (FCF-2) peuvent stimuler la production de l'intégrine alpha v beta 3. Il en ressort que les promoteurs génétiques de ces deux protéines ne présentent pas de TATA, pas de CCAAT et reposent sur les séquences de GGGCGG pour l'initiation. Par conséquent, la thalidomide peut empêcher la production d'intégrine non seulement de manière directe, mais indirecte en entravant la production des protéines qui stimulent la production d'alpha v beta 3. Cependant, d'autres FCF, comme le FCF-1 et le FCF-4, qui jouent un rôle dans le développement des membres, mais non dans l'angiogenèse, comportent des boîtes standards de TATA et de CCAAT parmi leurs promoteurs, de sorte qu'ils ne sont pas sensibles à l'inhibition de la thalidomide. Et ainsi de suite, et les choses vont même en s'améliorant.

Pour que le FCI-I et le FCF-2 stimulent la production d'intégrine dans une cellule, ils doivent se lier à des récepteurs de surface. Les gènes du récepteur FCI-I et d'au moins un des quatre récepteurs FCF-2 comportent des promoteurs sans TATA et sans CCAAT, et présentent de multiples boîtes GC. Ça devient maintenant un thème régulier, mais tout ne s'arrête pas là. Pour que le FCI-I se lie à son récepteur, il lui faut d'abord se fixer à une protéine de liaison appelée FCI-IBP, dont le gène promoteur, vous l'aurez deviné, ne comporte pas de TATA, ni CCAAT, et est riche en GC. De plus le récepteur FCI-I stimule l'activité d'une protéine intracellulaire appelée substrat récepteur 1 (IRS-1), dont le promoteur génétique est également sans TATA, sans CCAAT et riche en GC. Selon les résultats de nos recherches, au moins huit des acteurs dans la séquence des événements, depuis la stimulation du facteur de croissance aux protéines d'adhésion de l'intégrine à la surface cellulaire, qui stimule l'angiogenèse, sont produits par des gènes qui appartiennent au groupe de promoteurs minoritaires qui se fient aux boîtes GC pour le fonctionnement des gènes. Chacune des étapes de cette chaîne d'événements est potentiellement sensible à l'insertion de la thalidomide. La probabilité de lier les huit étapes dans une chaîne d'événements qui appartiennent tous à cette rare catégorie de promoteurs génétiques est de  $4 \times 10^{-9}$ . De plus, avec un tel parcours de liaison, la thalidomide

n'a pas à intervenir beaucoup pour avoir des répercussions profondes sur le résultat global. Par exemple, si la thalidomide diminue l'efficacité de chacune des étapes du parcours de seulement 10 %, l'efficacité entière du parcours sera réduite de plus de 50 %. Une baisse d'efficacité de 20 % à chaque étape réduirait de 80 % le système complet.

Le modèle d'embryopathie de la thalidomide que nous vous avons présenté regroupe presque tous les modèles précédents, est pertinent sur le plan biologique et tient compte de la spécificité biochimique et moléculaire. Ce modèle peut également expliquer la spécificité d'espèce chimique de la thalidomide. À titre d'exemple, l'espèce chimique peut différer dans le nombre de gènes du parcours décrit avec des promoteurs GC plutôt que des promoteurs TATA ou CCAAT. Les rats et les souris n'ont sans doute pas autant de gènes qui, dans ce parcours, comportent des promoteurs GC, de sorte qu'ils sont moins sensibles à la thalidomide que ne le sont les lapins, les humains et d'autres primates. De plus, il est bien connu que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins peut survenir via un parcours parmi plusieurs, et nous n'avons discuté que d'un parcours dans le présent document. D'autres parcours peuvent ne pas dépendre de l'alpha v beta 3, et on a démontré que certains résistaient à la thalidomide. On sait également qu'il existe des différences tissulaires dans le choix du parcours angiogénique. Ces différences peuvent tenir compte de la spécificité tissulaire de la thalidomide, affecter les membres, les yeux et les oreilles, par exemple, tout en ayant peu de conséquence sur les poumons ou le cerveau en développement. Le choix de différents parcours angiogéniques peut également être spécifique à l'espèce. L'opinion la plus classique de la spécificité d'espèce de la thalidomide est que les espèces diffèrent dans la façon dont elles métabolisent la thalidomide. Quoique cette question n'ait pas été abordée dans le présent document, il est probable que les produits métaboliques de la thalidomide sont, soit davantage en mesure d'atteindre l'ADN, soit savent mieux s'insérer dans la molécule d'ADN que la thalidomide d'origine. De plus, de nouvelles données du laboratoire de Peter G. Wells de l'Université de Toronto indiquent que l'embryopathie thalidomidienne cause des dommages oxydatifs à l'ADN, ce qui semble spécifique à l'espèce. L'insertion de la thalidomide dans l'ADN peut être accrue par l'oxydation de l'ADN, particulièrement à la huitième position des résidus de guanine. À l'heure actuelle, on ne dispose pas suffisamment de données sur les différences d'espèces relatives à plusieurs de ces propositions, ce qui constituera un secteur de recherches futures.