

Compte rendu de l'échange entre le GT AvATher et le projet SACHA 15 mai 2025, 17h00–19h00 (Réunion virtuelle via TEAMS)

Présentes : Alban DHANANI, Astrid VABRET, François GOEHRINGER, Hervé WATIER, Laurence WEISS, Lionel PIROTH, Robert MANFREDI.

ANRS-MIE : Meena MURMU.

Invités : Mustapha SI-TAHAR, Antoine GUILLON.

Objectif de la réunion : Présenter le projet SACHA, qui vise à développer une thérapie innovante pour le traitement de la grippe sévère.

A. Contexte

Les antiviraux actuellement disponibles, tels que l'inhibiteur de la neuraminidase oseltamivir, présentent une efficacité limitée dans les formes sévères de grippe, en particulier lorsqu'ils sont administrés plus de 48 heures après l'apparition des symptômes. Cette limite souligne l'urgence de concevoir de nouvelles thérapies capables de relever deux défis essentiels : freiner la réplication virale et contrôler la réponse inflammatoire excessive, principale cause de la sévérité et de la mortalité des infections grippales sévères.

Le projet SACHA s'appuie sur le domaine émergent de l'immunométabolisme, qui explore les liens étroits entre métabolisme énergétique et immunité. Cette approche innovante considère certains métabolites - comme le succinate, non plus comme de simples intermédiaires énergétiques mais comme de véritables composés bioactifs, dotés de propriétés antimicrobiennes et immunorégulatrices.

Dans ce cadre, **l'ambition de SACHA est d'identifier et de valoriser le cis-aconitate et ses analogues chimiques** comme nouveaux composés capables à la fois d'inhiber la réplication virale et de moduler l'inflammation, ouvrant la voie à de nouvelles thérapies curatives contre la grippe et d'autres immunopathologies d'origine virale.

B. Données de la recherche

B.1 : Résultats antérieurs obtenus avec le succinate

- **Résultats *in vivo* : modèle murin**

L'analyse métabolomique du liquide de lavage broncho-alvéolaire de souris infectées par le virus grippal influenza A ou par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* a révélé des signatures métaboliques distinctes et spécifiques à chaque pathogène. L'analyse en composantes principales (ACP) a montré une séparation claire entre les groupes infectés et les témoins, ainsi qu'entre les deux types d'infection. Parmi les métabolites discriminants, le succinate, connu pour ses propriétés immunorégulatrices (PMID : 32333837), s'est distingué par des niveaux particulièrement élevés dans les poumons de souris infectées par le virus grippal.

- **Pertinence clinique : données chez les patients**

Dans les fluides respiratoires prélevés chez des patients intubés atteints de grippe sévère, les taux de succinate étaient significativement plus élevés que chez les patients témoins en réanimation présentant une inflammation pulmonaire d'intensité comparable (par exemple, des niveaux similaires d'IL-6 et IL-8). Le groupe témoin comprenait des patients cérébrolésés ayant développé une inflammation pulmonaire et une bronchorrhée purulente due à des micro-aspirations. Cette élévation spécifique du succinate chez les patients grippés suggère un mécanisme de régulation propre à l'infection et soutient l'hypothèse d'un rôle bénéfique du succinate dans la réponse de l'hôte à l'infection grippale.

- **Résultats *in vitro* : modèle de cellules épithéliales**

Des expériences menées sur des cellules épithéliales bronchiques humaines ont confirmé que le succinate, administré seul à des concentrations non-cytotoxiques, n'induit aucune réponse inflammatoire. En revanche, l'infection par le virus de la grippe déclenche une forte production d'IL-6, nettement atténuée par le succinate de manière dose-dépendante. Cet effet anti-inflammatoire s'étend à plusieurs autres cytokines pro-inflammatoires.

En outre, l'analyse en microscopie électronique a révélé que les cellules épithéliales humaines infectées par le virus de la grippe produisaient de nombreux virions bourgeonnants, témoignant d'une réplication active. En contraste, dans les cellules traitées au succinate, le cycle viral semblait interrompu, très peu de particules bourgeonnantes n'étant observées, suggérant une inhibition marquée de la réplication grippale.

- **Validation *in vivo* : modèle murin**

Chez des souris infectées par le virus de la grippe, l'administration par voie intranasale de succinate a permis de réduire de manière significative l'inflammation pulmonaire et de préserver l'architecture tissulaire des poumons, témoignant d'un effet protecteur sur la fonction respiratoire. Sur le plan clinique, les souris traitées au succinate ont maintenu leur poids corporel et atteint un taux de survie de 100 % après un challenge léthal (DL50). A l'inverse, les souris non traitées ont subi une perte de poids importante et une mortalité d'environ 50%, confirmant le bénéfice thérapeutique du succinate dans ce modèle de grippe sévère.

- **Mécanisme d'action – Rétention nucléaire et succinylation de la protéine NP**

L'analyse par microscopie confocale des cellules épithéliales infectées par le virus de la grippe a révélé qu'à 20 heures post-infection, la nucléoprotéine virale (NP), composant essentiel du complexe ribonucléoprotéique viral (vRNP), quitte normalement le noyau pour rejoindre le cytoplasme, étape essentielle à l'assemblage des néo-virions. En revanche, dans les cellules traitées au succinate, ce processus est profondément modifié : la NP demeure confinée dans le noyau, traduisant un blocage du cycle viral en amont de l'export des vRNPs.

Des études mécanistiques complémentaires ont révélé que le succinate induit une modification post-traductionnelle de la NP par succinylation de la lysine K87, un résidu hautement conservé chez les virus influenza A et situé dans la poche de liaison à l'ARN génomique viral. Cette modification altère la conformation et la charge de la lysine K87, perturbant ainsi la capacité de la NP à se lier à l'ARN viral. Il est à noter que la NP est la seule protéine grippale identifiée comme cible de la succinylation induite par le succinate. L'incapacité de NP à interagir correctement avec l'ARN viral empêche l'association et l'assemblage des complexes vRNPs.

En l'absence de vRNPs fonctionnels, aucune exportation vers le cytoplasme n'est possible, ce qui conduit à une diminution marquée de la production de particules infectieuses et par conséquent, à une réduction de l'inflammation associée.

B.2 : Résultats en lien avec le programme SACHA

- **Le cis-aconitate : un métabolite à double action, inhibiteur puissant de la réplication virale et de l'inflammation**

Forts de la découverte de l'effet antiviral du succinate, l'équipe a étendu son analyse à d'autres métabolites endogènes susceptible de moduler la multiplication du virus grippal. Parmi de nombreux candidats, notamment issus du cycle de Krebs, le cis-aconitate s'est révélé particulièrement puissant, montrant une inhibition marquée de la réplication virale et de l'inflammation de l'hôte.

La microscopie électronique de cellules épithéliales bronchiques humaines infectées par le virus de la grippe et traitées au cis-aconitate a montré une quasi-absence totale de bourgeonnement viral. Parallèlement, les analyses par Western blot ont révélé une réduction prononcée des niveaux de protéines virales, et les analyses qPCR ont confirmé une diminution de l'expression des ARN viraux. Des études mécanistiques ont ensuite montré que le cis-

aconitate interfère avec l'activité de la polymérase virale, se traduisant par la baisse de l'expression d'un gène rapporteur spécifiquement contrôlé par cette enzyme.

Le traitement de cellules épithéliales bronchiques humaines par du cis-aconitate et stimulées avec du poly(I:C) (un agoniste du TLR3), a montré une diminution nette et dose-dépendante de l'inflammation. Cela indique que le cis-aconitate possède un effet anti-inflammatoire propre, indépendant de son action antivirale, ce qui le distingue du succinate. Cette action a également été observée lorsque l'inflammation était induite par d'autres stimuli comme le PMA ou le TNF-alpha, confirmant l'effet anti-inflammatoire robuste du cis-aconitate.

Chez des souris rapportrices du facteur de transcription NF- κ B, essentiel à la régulation de la réponse inflammatoire, l'administration intranasale de LPS a induit une forte inflammation, mise en évidence par une augmentation du signal de luminescence. Le traitement par le cis-aconitate a montré une réduction nette de ce signal, témoignant d'un effet anti-inflammatoire majeur *in vivo*.

Enfin, dans un modèle murin infecté par la grippe, l'administration de cis-aconitate ou d'oseltamivir 20 minutes après l'infection a permis une protection complète tant sur la survie que sur la prévention de la perte de poids. En revanche, lorsque le traitement était différé de deux jours, l'oseltamivir a perdu toute efficacité tandis qu'une seule dose de cis-aconitate assurait toujours une protection. Fait remarquable, le cis-aconitate a conservé son effet protecteur même lorsqu'il était administré quatre jours après l'infection, démontrant ainsi une fenêtre thérapeutique étendue.

B.3 : De la découverte à l'innovation thérapeutique : lancement d'une start-up pour accélérer le développement

S'appuyant sur les données mécanistiques ayant mis en évidence les propriétés antivirales du succinate et du cis-aconitate contre le virus de la grippe, l'équipe a engagé un programme ambitieux de recherche et de développement de ces composés naturels et de leurs analogues chimiques dans le cadre du programme ANR SuccesS [ANR-21-CE18-0061, en partenariat avec S. Messaoudi (CNRS & Ecole polytechnique X, Saclay)]. Plus de 60 analogues chimiques optimisés ont été synthétisés, dont plusieurs présentent une activité antivirale supérieure à celle du cis-aconitate.

Un premier brevet décrivant l'activité antivirale du cis-aconitate a été déposé et validé au niveau international (WO 2024126742) et est désormais en phase d'évaluation nationale. Parallèlement, deux autres familles de brevets ont été déposées pour élargir et consolider le portefeuille d'innovations. Le projet SACHA a par ailleurs été distingué par le Grand Prix du concours i-PhD 2024.

Dans une logique de transfert et de valorisation, l'équipe s'attache à présent à transformer ses découvertes en solutions thérapeutiques à travers la création d'une start-up dédiée. Cette initiative est soutenue par le service de valorisation de l'Université de Tours, par C-Valo (structure de transfert de la région Centre-Val de Loire) ainsi que par des dispositifs nationaux de financement tels que France 2030-CATRIEM. L'objectif est de positionner le cis-aconitate et ses dérivés comme de nouvelles options thérapeutiques pour répondre au fardeau clinique et économique des infections grippales.

C. Discussions :

1. Comment expliquez-vous le fait que vous n’observiez plus aucune efficacité au jour 4 (post-infection) ?

Au jour 4, les souris ont déjà perdu 20 % de leur poids corporel et sont moribondes. A ce stade, il est déjà remarquable d’observer un quelconque effet du traitement. L’efficacité observée au jour 4 du cis-aconitate est probablement liée à sa double action antivirale et anti-inflammatoire. L’hypothèse est que, grâce à son action conjointe sur la réplication virale et sur la signalisation inflammatoire, le cis-aconitate reste efficace même à un stade avancé de l’infection. Il est à noter que cet effet protecteur tardif n’est pas observé avec le succinate, qui ne possède pas d’activité anti-inflammatoire.

2. Le traitement par succinate affecte-t-il la localisation nucléaire de la nucléoprotéine (NP) de la grippe, et quelles pourraient être les implications pour la réplication virale ?

Des images obtenues par microscopie confocale ont révélé une accumulation inhabituelle de la NP dans le noyau des cellules traitées au succinate, suggérant une interférence avec le trafic intracellulaire des complexes ribonucléoprotéiques (vRNPs). Normalement, lors d’une infection grippale, l’ARN viral est transcrit dans le noyau de la cellule hôte, tandis que la NP, synthétisée dans le cytoplasme, est importée dans le noyau pour s’associer aux segments d’ARN viral nouvellement transcrits. Les complexes vRNPs ainsi formés sont ensuite exportés vers le cytoplasme pour être assemblés en nouveaux virions. L’accumulation nucléaire de la NP sous traitement succinate suggère une inhibition de l’export des vRNPs, conduisant à une interruption du cycle viral et à une réduction de la production de néo-virions.

3. L’efficacité du cis-aconitate est-elle limitée à une administration nasale en phase précoce de l’infection, ou s’étend-elle aux voies systémiques et aux tissus pulmonaires profonds ?

Le cis-aconitate a démontré une efficacité antivirale bien au-delà de la muqueuse nasale. Son activité a été confirmée dans des cellules bronchiques, alvéolaires, ainsi que dans des coupes de tissu pulmonaire humain. Par ailleurs, des études chez l’animal sont en cours avec des voies d’administration systémiques (gavage oral, injection IV) afin de déterminer si ses effets antiviraux et anti-inflammatoires peuvent être reproduits par d’autres voies que l’administration locale.

4. Avec une instillation intrapulmonaire similaire à l’administration par aérosol, pensez-vous que l’effet observé est purement une action locale sur l’épithélium pulmonaire, ou pourrait-il également exercer des effets systémiques sur des sites distants, tels que le cerveau, où la grippe peut provoquer une neurotoxicité ?

Aucune analyse cérébrale n’a été effectuée dans le modèle murin actuel d’infection grippale, de sorte qu’il n’a pas été possible d’évaluer directement les effets systémiques, notamment au niveau le cerveau. Cependant, les données pharmacocinétiques préliminaires suggèrent que l’administration intranasale entraîne des concentrations très faibles voire indétectables de cis-aconitate dans la circulation sanguine, ce qui indique que l’effet thérapeutique observé est principalement local, au niveau pulmonaire.

Il est néanmoins intéressant de noter que dans le cadre d’un travail collaboratif avec l’équipe VIRIMI (CIRI, Lyon), le cis-aconitate a montré une activité antivirale dans des coupes de tissu cérébral infectées avec un virus neurotrophe pathogène. Cela suggère que, sous certaines conditions ou *via* d’autres voies d’administration, ses effets pourraient potentiellement s’étendre au-delà des poumons. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour confirmer cette possibilité et évaluer son impact sur les manifestations systémiques de l’infection grippale.

5. Le cis-aconitate a-t-il démontré une activité antivirale au-delà de la grippe, et quelles sont les exigences en matière de dosage ainsi que les prochaines étapes de son développement préclinique ?

Bien que le succinate et le cis-aconitate aient tous deux été étudiés initialement, l’attention se porte désormais sur le cis-aconitate en raison de sa supériorité en termes d’efficacité antivirale. Une activité robuste a été confirmée contre le virus de la grippe ainsi que contre le SARS-CoV-2. Par ailleurs, des données exploratoires suggèrent une efficacité potentielle contre d’autres agents pathogènes, mais ces résultats nécessitent encore des validations complémentaires.

En ce qui concerne le dosage, les études préliminaires sur les animaux indiquent que le cis-aconitate est efficace à des doses relativement faibles, de l'ordre de 5 mg/kg, sur la base de l'administration d'une dose unique. Ces niveaux sont considérés comme compatibles avec une voie de développement de médicaments viable. Des travaux supplémentaires sont prévus pour affiner la stratégie de dosage et optimiser les paramètres de pharmacocinétique (PK) et de pharmacodynamie (PD).

Le développement du composé suit une trajectoire préclinique classique :

- Des études de toxicologie sont en cours,
- Des tests d'efficacité sont prévus dans des modèles animaux comme le furet,
- Les résultats obtenus dans les modèles de tissu pulmonaire humain sont prometteurs, soutenant la poursuite du développement du composé.

6. Quelle est la durée de l'effet antiviral après une dose unique ? Sur la base de vos données PK/PD actuelles, avez-vous des indications sur la durée d'action de ces métabolites et sur la nécessité éventuelle d'administrations répétées ?

Les données pharmacocinétiques actuelles suggèrent une exposition très courte, ce qui indique un mécanisme d'action rapide de type *hit-and-run*. Bien qu'un schéma à doses répétées puisse être envisagé, la réponse observée est suffisamment robuste pour que, à ce stade, l'administration de plusieurs doses ne semble pas nécessaire. En cas d'apparition d'une toxicité, une réduction de la dose ou une administration fractionnée pourraient permettre de maintenir l'efficacité tout en diminuant l'exposition. Ces aspects font encore l'objet d'évaluations.

7. Étant donné que ces métabolites sont naturellement produits par l'organisme, dispose-t-on de données sur leur toxicité à fortes doses, et ces aspects font-ils l'objet d'investigations supplémentaires ? Pourquoi le cis-aconitate a-t-il été sélectionné comme composé principal plutôt que S10 ou S11, qui ont montré de meilleurs taux de survie ?

- Bien que le cis-aconitate soit un métabolite produit physiologiquement par l'organisme, une évaluation toxicologique approfondie reste nécessaire aux doses thérapeutiques. Une étude de toxicologie est actuellement en cours. Dans les modèles murins, la dose efficace s'est avérée non toxique, même en cas d'administration répétée sur une période de 15 jours, et aucune lésion organique n'a été observée. Des effets toxiques n'ont été observés qu'à des doses supra-thérapeutiques, que l'étude en cours vise à caractériser plus précisément.
- Concernant le choix du composé principal, le cis-aconitate a été retenu de préférence aux composés analogues synthétiques S10 et S11 en raison de la solidité des données précliniques disponibles et de la compréhension mécanistique la plus aboutie à ce jour. Bien que S10 et S11 aient montré des bénéfices prometteurs en termes de survie, concentrer les efforts de développement sur un candidat unique, bien caractérisé, permet de simplifier la stratégie et d'assurer une meilleure lisibilité pour les investisseurs. Les autres candidats restent intégrés au pipeline de développement comme alternatives stratégiques pour limiter les risques.

8. Le succinate et le cis-aconitate sont-ils spécifiquement induits lors d'une infection par le virus de la grippe, et si oui, quels sont les mécanismes à l'origine de la production de ces métabolites naturels ?

Il a été clairement démontré que le succinate augmente au cours de l'infection par le virus de la grippe, mais le cis-aconitate est plus difficile à mesurer en raison des limites de sensibilité analytique. Par conséquent, il n'a pas encore été définitivement démontré que le cis-aconitate est physiologiquement induit par le virus de la grippe.

De manière plus générale, ce type de reprogrammation métabolique n'est pas spécifique à l'infection grippale. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont montré que divers stress, tels que les infections, le cancer ou l'inflammation, conduisent les cellules immunitaires à modifier leurs voies métaboliques. Ces changements peuvent être bénéfiques pour l'hôte, mais certains pathogènes peuvent également exploiter ces ressources métaboliques pour faciliter leur réplication.

Il est intéressant de noter que certains métabolites qui s'accumulent dans des conditions de stress peuvent agir comme de puissants agents immunorégulateurs. Par exemple, le cis-aconitate présente de fortes propriétés anti-inflammatoires et antivirales. Cela soutient l'hypothèse que les métabolites font partie d'un arsenal de défense évolutif conservé au cours du temps et qu'ils représentent une source prometteuse de nouveaux candidats thérapeutiques.

9. Avez-vous également observé des niveaux accrus de succinate dans les cas de grippe hospitalisés mais non gravement malades (c'est-à-dire qui ne sont pas en soins intensifs) ?

Nous n'avons pas la réponse à cette question, car l'analyse nécessite des prélèvements de liquide pulmonaire, et nous ne possédons pas d'échantillons de patients hospitalisés mais non sévèrement atteints.

10. Le modèle animal basé sur la luciférase peut-il fournir des données cinétiques permettant de mieux comprendre la chronologie des effets antiviraux du cis-aconitate, en particulier dans les cas graves ou lors de l'évaluation de l'action systémique ?

Oui, l'analyse cinétique est possible et a probablement déjà été réalisée. L'expérience luciférase a été menée en collaboration avec une équipe INRAe de Jouy en Josas (groupe de Ronan Le Goffic). Les données actuellement disponibles concernent la période à 20 heures post-challenge, mais des acquisitions d'images à des temps antérieurs et intermédiaires ont été réalisées. Elles pourraient permettre de préciser la chronologie et la dynamique des effets thérapeutiques du cis-aconitate. Cette information serait particulièrement utile pour déterminer si le traitement agit très tôt dans le cours de l'infection, un aspect crucial pour cibler les patients les plus sévères et pour évaluer les bénéfices systémiques potentiels.

Conclusion :

Les experts d'AvATher considèrent l'approche du projet SACHA, qui vise à utiliser des métabolites comme agents curatifs dans les infections grippales, comme prometteuse. Le projet est bien structuré, déjà à un stade avancé, et ne présente actuellement pas de faiblesse majeure. Les résultats préliminaires sont encourageants et suggèrent un bénéfice thérapeutique potentiel.

Un autre avantage de cette approche est que, contrairement aux protéines qui présentent souvent des différences spécifiques aux espèces, les métabolites sont généralement moins affectés par ces variations inter-espèces. Leurs mécanismes d'action tendent à être plus conservés entre les espèces, ce qui rend la transition des modèles précliniques aux études cliniques chez l'homme plus prévisible et réduit le risque de difficultés de transposition.

Suggestion des membres d'AvATher sur le positionnement de cette approche

Pour garantir à la fois l'impact clinique et la faisabilité du développement, il serait idéal de cibler initialement le traitement sur les patients hospitalisés présentant un risque élevé de grippe grave, en particulier les jeunes immunodéprimés, notamment ceux présentant des comorbidités cardiopulmonaires, des hémopathies malignes ou des greffes d'organes.

Cette stratégie présente plusieurs avantages clés :

- **Sur le plan médical**, elle répond à un besoin non couvert : les antiviraux actuels présentent une efficacité limitée dans les formes graves, et ces populations à risque élevé restent exposées à une morbidité et une mortalité importantes, même hors réanimation.
- **Sur le plan stratégique**, elle permet d'établir une preuve de concept ciblée dans un environnement médical contrôlé, où le diagnostic est confirmé et les résultats cliniques peuvent être mesurés de manière fiable.
- **Sur le plan opérationnel**, elle évite les contraintes logistiques liées à une prise en charge précoce en ambulatoire, où le diagnostic est souvent retardé et l'organisation des soins fragmentée (par exemple en EHPAD ou en médecine de ville).

À l'inverse, un déploiement initial en population ambulatoire générale ou en EHPAD se heurterait à plusieurs obstacles : retards diagnostiques, suivi médical irrégulier et difficulté à documenter précisément l'impact thérapeutique.

Une fois l'efficacité et la tolérance établies en milieu hospitalier, l'évaluation pourrait être étendue de manière logique à une prophylaxie post-exposition chez les patients vulnérables en ambulatoire, notamment en période d'épidémie grippale, où une intervention rapide pourrait prévenir l'aggravation de la maladie, même en l'absence de diagnostic virologique formel.