



HAL
open science

Développement de nouveaux inhibiteurs du $\text{TNF}\alpha$ identifiés par Drug Design

Hadley Mouhsine

► **To cite this version:**

Hadley Mouhsine. Développement de nouveaux inhibiteurs du $\text{TNF}\alpha$ identifiés par Drug Design. Immunologie. Conservatoire national des arts et métiers - CNAM, 2012. Français. NNT : 2012CNAM0842 . tel-01290205

HAL Id: tel-01290205

<https://theses.hal.science/tel-01290205>

Submitted on 17 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE Abbé Grégoire
Laboratoire Génomique, Bioinformatique et Applications

THÈSE présentée par :
Hadley MOUHSINE
soutenue le : **29 octobre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur du Conservatoire National des Arts et Métiers**
Discipline/ Spécialité : Bioinformatique et Immunologie

Développement de nouveaux inhibiteurs du TNF α
identifiés par Drug Design

THÈSE dirigée par :

Monsieur ZAGURY Jean-François

Professeur, Cnam

RAPPORTEURS :

Monsieur THERWATH Amu

Professeur, Université Pierre et Marie Curie

Monsieur BOISSIER Marie-Christophe

Professeur, Université Paris-Nord 13

JURY :

Madame DUMAS Françoise

Docteur, Université Paris-Sud 11

Monsieur LELIÈVRE Jean-Daniel

Professeur, Université Paris-Est Créteil

Monsieur DO Hervé

Docteur, Société Vaxconsulting

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Pr. Jean-François Zagury, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance tout au long de ma thèse. J'ai eu plaisir à travailler avec vous Jean-François.

Je suis très reconnaissante au Pr. Amu Therwath d'avoir accepté d'être le rapporteur et d'évaluer ce travail.

Je remercie le Pr. Marie-Christophe Boissier d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et de m'avoir fait profiter de ses connaissances sur la polyarthrite rhumatoïde.

Le Pr. Jean-Daniel Lelièvre a accepté de juger mon travail en tant qu'examineur, je le remercie vivement.

Je tiens à remercier le Dr. Françoise Dumas d'avoir accepté d'être examinatrice de ce travail. Je sais tout l'intérêt qu'elle porte à la synthèse de petites molécules anti-inflammatoires et leurs applications.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. Hervé Do d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail et de m'avoir apporté son soutien tout au long de ma thèse.

J'exprime ma reconnaissance au Dr. Matthieu Montes pour m'avoir associée au projet Drug Design et son aide dans le choix des peptides de cytokines.

Un grand merci à l'équipe de l'animalerie de Cochin et principalement à Laetitia pour s'être occupée de la gestion de nos souris à l'animalerie et à Otilia pour m'avoir appris les techniques sur l'animal et son aide tout au long des protocoles.

Un grand merci à notre gestionnaire de choc Christiane pour ne pas m'avoir trop disputée lors des erreurs de commandes.

Merci à Julie, toute nouvelle, enfin plus trop maintenant, sur les projets cytokines pour m'avoir aidée et remplacée auprès de nos chères cellules et souris pendant que j'écrivais ce manuscrit mais également pour la relecture.

Un grand merci à Gaby, le siffleur fou ou le chanteur fou suivant l'humeur pour son aide et ses conseils précieux lors de l'élaboration des protocoles et de l'exécution des manips (aaaaah les deepwells !). Merci d'être toujours de bonne humeur, de raconter des histoires, de chanter et d'arrondir les angles quand il y a des problèmes.

À MiniLu également, ma collègue devenue amie pour son aide, ses conseils, sa relecture, sa bonne humeur, son réconfort pendant les moments difficiles. Merci de m'avoir supportée tout au long de cette thèse, sans toi, ça aurait été beaucoup plus dur.

Je remercie également l'équipe GBA du CNAM, Sigrid pour ses blind tests (mais si la je connais cette chanson ! C'est, c'est,...) et ses millions de trucs à faire, Lieng pour sa musique et ses critiques cinématographiques (alors c'était comment ? NUL !), Cédric pour ses essais de chanteur (ma préférée restant sa reprise de Balavoine) et ses débats, Hélène pour son rire communicatif et son aide sur les bases du Drug Design, Taoufik pour ses mensonges, Jean-

Louis pour son écoute et Hervé pour sa prévoyance dans la direction. Je tiens également à remercier Caro, qui ne fait pas vraiment partie du labo mais c'est tout comme. Un grand merci à Nesrine pour sa trouvaille qui a révolutionnée le choc septique et pour les produits synthétisés. Merci également à ceux qui sont partis, Sophie et Olivier mais également Rojo qui m'a appris toutes les bases du projet de vaccination et m'a accueillie à bras ouverts dans son bureau. J'ai passé de très bons moments avec toi. Merci aussi à Nathalie, Vincent, Damien et Pierre pour leur bonne humeur. Enfin, merci au Léonard d'avoir alimenté nos discussions du vendredi soir.

Je voudrais remercier mes amis rencontrés tout au long de ma scolarité : d'abord Soline, 25 ans d'amitié, en espérant qu'on puisse se voir bientôt. Max, Presci, Wilfried, Amandine et Belkacem, lapinoux première génération. Max et Presci, prenez soin de Luna et Melo, elles sont les lapinoux deuxième génération ! Mes deux premières années de fac n'auraient pas été les mêmes sans vous.

Spéciale dédicace à Magali, rencontrée le jour de l'inscription au Magistère, avec qui j'ai partagée certains concerts, beaucoup de soirées un peu (beaucoup) arrosées, une chambre, une table basse mais aussi mes coups de blues et mes soucis. Merci à mes trois mecs Flo, Mica et Lolo pour ses années passées en leur compagnie et surtout ces 5 mois au pays du hamburger, du barbecue et du poulet frit (vraiment très très frit !). Sans vous ça aurait été beaucoup plus difficile. Un grand merci à Pauline également, pour les dimanches soirs passés en sa compagnie, son oreille attentive et son aide pour choisir un film (ah, tu as bien aimé ce film ? Oui ! Bon je ne vais pas aller le voir alors !).

Merci également à Manue, Dorian (ah l'Islande), Ana, Jean-Luc, Flavia, Mélanie et Laure.

Enfin je tiens à remercier toute ma famille mes oncles et tantes Laïla et Jean-Claude, Joël et Mimi, Jean, Annia et Francis, mes cousins et cousines Fabien, Jérémie, Caro, Willie et Romain. Un remerciement particulier à ma cousine Justine avec qui j'ai passé une grosse partie de mon enfance et de mes vacances (désolée pour les maladies diverses et variées attrapées) et qui me donnent des bonnes nouvelles quand ça ne va pas fort ; merci à Florent de t'avoir fait croire en toi.

Merci à mes grands-parents maternels et paternels qui ont toujours été là pour moi et qui me manquent pour certains.

Merci à ma petite sœur Gabrielle, je crois que c'est la meilleure du monde, normal c'est ma sœur, tu vois Pépette tu l'as eu ce fichu concours et maintenant tu fais ce que tu aimes !

Je remercie également mes parents. Papa, Maman, merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir poussé à travailler pour avoir le choix plus tard, je pense avoir fait le bon et c'est grâce à vous.

Résumé

Les anticorps monoclonaux ont constitué une révolution dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques, mais ils présentent des inconvénients majeurs (effets secondaires, coûts élevés, résistances).

Notre équipe développe des inhibiteurs du TNF α par deux approches : immunisation active contre des peptides de cytokine pour générer des anticorps neutralisants et petites molécules chimiques pouvant inhiber directement le TNF α .

J'ai évalué *in vitro* les meilleurs composés d'un criblage de chimiothèque *in silico*, et notamment identifié une petite molécule qui a protégé les animaux dans deux modèles de maladies *in vivo* (choc septique et colite au DSS). J'ai aussi réalisé l'analyse d'analogues chimiques des meilleurs composés identifiés *in vitro*.

J'ai également évalué l'immunogénicité de plusieurs peptides de TNF α mais les anticorps générés n'étaient pas neutralisants *in vitro* et nous n'avons donc pas testé les peptides *in vivo*.

Mon travail s'est situé à l'interface de la bioinformatique, de la chimie, et de la biologie et m'a permis de bien comprendre les enjeux du développement moderne du médicament.

Mots-clés : TNF α , inhibiteurs, petites molécules, criblage, immunisation active

Résumé en anglais

Monoclonal antibodies have been a revolution for the treatment of chronic inflammatory diseases but present several drawbacks (secondary effects, prohibitive costs, resistance)

Our team develops TNF α inhibitors using two approaches : active immunization against cytokine peptides and small compounds having a direct inhibition on TNF α .

I have evaluated *in vitro* the best compounds selected after *in silico* screening of a chemical library and I have identified a small molecule which was protective in two animal models (septic shock and DSS induced colitis). I have also analyzed chemical analogues of the best compounds found *in vitro*.

I have also tested the immunogenicity of TNF α peptides but they did not yield neutralizing antibodies *in vitro*, and we thus did not test them *in vivo*.

My work was at the interface of bioinformatics, chemistry and biology, and this has enabled me to understand the key issues in the modern development of drugs.

Key words : TNF α , inhibitors, small molecules, screening, active immunization.

Tables des matières

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 3 |
| Résumé | 5 |
| Résumé en anglais | 6 |
| Tables des matières | 7 |
| Liste des tableaux | 10 |
| Liste des figures | 11 |
| -A- Introduction | 13 |
| 1. Le système immunitaire | 14 |
| 1.1. Généralités | 14 |
| 1.2. Les organes lymphoïdes | 15 |
| 1.2.1. Les organes lymphoïdes centraux | 15 |
| 1.2.1.1. Le Thymus | 16 |
| 1.2.1.2. La moelle osseuse | 17 |
| 1.2.2. Les organes lymphoïdes périphériques | 17 |
| 1.2.2.1. Les ganglions lymphatiques | 17 |
| 1.2.2.2. La rate | 17 |
| 1.2.2.3. Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses | 19 |
| 1.3. Les effecteurs cellulaires | 21 |
| 1.3.1. Généralités | 21 |
| 1.3.2. Les cellules présentatrices d'antigènes | 22 |
| 1.3.3. Les cellules Natural Killer (cellules NK) | 23 |
| 1.3.4. Les cellules granulocytaires | 23 |
| 1.3.5. Le lymphocyte T | 24 |
| 1.3.6. Le lymphocyte B | 26 |
| 1.4. Les effecteurs moléculaires | 26 |
| 1.4.1. Les immunoglobulines (ou anticorps) | 26 |
| 1.4.2. Les cytokines | 29 |
| 2. Les cytokines dans l'immunité | 29 |
| 2.1. Description des cytokines | 29 |
| 2.2. Les différents types de cytokines et leur rôle | 30 |
| 2.2.1. Les interférons | 30 |
| 2.2.2. Les interleukines | 31 |
| 2.2.3. Les chimiokines | 31 |
| 2.2.4. Le TNF α | 31 |
| 2.3. Les récepteurs de cytokines | 32 |
| 2.4. Le réseau de cytokines | 34 |
| 2.5. Les cytokines dans la réponse immunitaire | 35 |
| 3. Le TNFα : cytokine centrale de l'immunité | 36 |
| 3.1. Historique | 36 |
| 3.2. Génétique | 36 |
| 3.3. La cytokine et ses récepteurs | 37 |
| 3.4. Cellules productrices et cellules cibles | 39 |
| 3.5. Voies de signalisation | 39 |
| 3.6. Implication dans les maladies inflammatoires chroniques | 40 |
| 4. Les maladies inflammatoires chroniques | 41 |
| 4.1. Historique | 41 |
| 4.2. Pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques | 42 |
| 4.2.1. Hypothèses mécanistiques | 42 |
| 4.2.1.1. Rupture de tolérance | 42 |
| 4.2.1.2. Cas des antigènes séquestrés et cryptiques | 44 |
| 4.2.1.3. Mimétisme moléculaire | 44 |
| 4.2.1.4. Expression inappropriée du CMH | 45 |
| 4.2.1.5. Activation polyclonale des lymphocytes B | 45 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.2.2. | Causes possibles | 46 |
| 4.3. | Exemples de maladies autoimmunes | 47 |
| 4.3.1. | La polyarthrite rhumatoïde | 47 |
| 4.3.1.1 | Description de la pathologie | 47 |
| 4.3.1.2 | Mécanismes et rôle des cytokines | 48 |
| 4.3.1.3 | Traitement conventionnels | 50 |
| 4.3.2. | Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin | 51 |
| 4.3.2.1 | Description de la pathologie | 51 |
| 4.3.2.2 | Mécanismes et rôle des cytokines | 52 |
| 4.3.2.3 | Traitements conventionnels | 52 |
| 4.3.3. | Psoriasis | 53 |
| 4.3.3.1 | Description de la maladie | 53 |
| 4.3.3.2 | Mécanismes et rôles des cytokines | 54 |
| 4.3.3.3 | Traitements conventionnels | 55 |
| 4.4. | Traitements anti-cytokines commercialisés dans les maladies inflammatoires chroniques | 56 |
| 4.4.1. | Les anticorps monoclonaux anti-cytokines | 56 |
| 4.4.1.1 | Les anti-TNF α | 57 |
| 4.4.1.2 | Les anti-IL-23 | 60 |
| 4.4.1.3 | Les anti-IL-1 | 61 |
| 4.4.1.4 | Les anti-IL-6 | 61 |
| 4.4.2. | Les petites molécules anti-cytokines | 62 |
| 4.5. | Les inhibiteurs de cytokines en développement | 63 |
| 4.5.1. | Les anticorps | 63 |
| 4.5.1.1 | Les anti-TNF α | 63 |
| 4.5.1.2 | Les anti-IL-23 | 64 |
| 4.5.1.3 | Les anti-IL-6 | 65 |
| 4.5.1.4 | Les anti-IL-1 | 65 |
| 4.5.2. | Les petites molécules | 66 |
| 4.5.2.1 | Petites molécules spécifiques de kinases | 66 |
| 4.5.2.2 | Les petites molécules spécifiques de cytokines. | 66 |
| 4.5.2.3 | Petites molécules spécifiques de la production de TNF α | 67 |
| 4.5.2.4 | Petites molécules ciblant directement le TNF α | 68 |
| 4.5.3. | Les vaccins anti-cytokines | 69 |
| 4.5.3.1 | Vaccins cytokine entière | 71 |
| 4.5.3.2 | Les vaccins à ADN | 73 |
| 4.5.3.3 | Les immunisations à base de peptides de cytokines | 73 |
| 5. | Mon laboratoire d'accueil | 74 |
| 5.1. | Description de mon laboratoire d'accueil | 74 |
| 5.2. | Rappels sur le drug design | 76 |
| 6. | Objectifs de ma thèse | 77 |
| 6.1.1. | Approche vaccinale de l'inhibition du TNF α | 77 |
| 6.1.2. | Approche petites molécules de l'inhibition du TNF α | 77 |
| -B- | Matériels et Méthodes | 79 |
| 1. | Approche d'inhibition de cytokines par petites molécules | 80 |
| 1.1. | Expérimentations <i>in silico</i> | 80 |
| 1.1.1. | Bibliothèque de petites molécules | 80 |
| 1.1.2. | Criblage virtuel par structure-based | 80 |
| 1.1.3. | Criblage virtuel par ligand-based | 80 |
| 1.2. | Expérimentations <i>in vitro</i> | 81 |
| 1.2.1. | Neutralisation de l'activité du TNF α humain par les petites molécules | 81 |
| 1.2.1.1 | Entretien des cellules L929 | 81 |
| 1.2.1.2 | Test de neutralisation du TNF α humain | 81 |
| 1.2.2. | Mesure de la fluorescence intrinsèque du TNF α | 82 |
| 1.3. | Expérimentations <i>in vivo</i> | 83 |
| 1.3.1. | Étude de la protection des inhibiteurs lors d'un choc septique au LPS/D-Galactosamine | 83 |
| 1.3.2. | Traitement des souris par injection intrapéritonéale d'une solution de petites molécules | 83 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 1.3.3. | Traitement des souris par gavage avec une solution de petites molécules | 84 |
| 1.3.4. | Étude de la protection des inhibiteurs lors d'un modèle de colite au DSS | 84 |
| 1.4. | Optimisation chimique des molécules | 85 |
| 2. | Approche d'inhibition par vaccination anti-cytokines | 85 |
| 2.1. | Sélection des peptides, synthèse et couplage | 85 |
| 2.1.1. | Sélection des peptides | 85 |
| 2.1.2. | Synthèse des peptides | 85 |
| 2.1.3. | Purification et analyse des peptides | 86 |
| 2.1.4. | Couplage des peptides à la KLH par le BDB ou le glutaraldéhyde | 86 |
| 2.2. | Étude de l'immunogénicité des peptides chez la souris | 86 |
| 2.2.1. | Protocole d'immunisation | 86 |
| 2.2.2. | Préparation des sérums | 87 |
| 2.2.3. | Détermination des titres anticorps par ELISA à partir d'échantillons de souris ou de lapin | 87 |
| 2.3. | Étude de l'immunogénicité des peptides chez le lapin | 88 |
| 2.3.1. | Protocole d'immunisation | 88 |
| 2.3.2. | Purification des anticorps anti-peptides | 88 |
| 2.3.3. | Test de neutralisation du TNF α par les anticorps purifiés de lapin | 89 |
| -C- | Résultats | 91 |
| 1. | Approche d'inhibition du TNFα par les petites molécules | 92 |
| 1.1. | Première publication | 93 |
| 1.2. | Deuxième publication | 109 |
| 1.3. | Étude de toxicité des petites molécules anti-TNF α | 122 |
| 2. | Résultats additionnels : approche d'immunisation active anti-cytokine. | 123 |
| 2.1. | Choix des peptides | 123 |
| 2.2. | Étude de l'immunogénicité des peptides du TNF α chez la souris OF1 | 125 |
| 2.3. | Étude de l'immunogénicité des peptides du TNF α chez le lapin New Zealand | 127 |
| 2.4. | Neutralisation de l'activité biologique du TNF α | 128 |
| 2.5. | Conclusion | 128 |
| -D- | Discussion | 129 |
| 1. | Discussion sur l'inhibition du TNFα par les petites molécules | 130 |
| 1.1. | Sélection <i>in silico</i> des produits et efficacité du drug design | 130 |
| 1.2. | Critiques des expérimentations choisies pour le criblage <i>in vitro</i> | 131 |
| 1.3. | Critiques des expérimentations <i>in vivo</i> | 132 |
| 1.3.1. | Le choc septique au LPS/D-Galactosamine | 132 |
| 1.3.2. | Toxicité du DMSO administré en gavage quotidien sur une durée prolongée | 134 |
| 1.3.3. | Critiques de l'expérimentation de colite au DSS | 134 |
| 1.4. | Optimisation chimique | 135 |
| 1.5. | Intérêt de la cible et des petites molécules | 136 |
| 1.6. | Perspectives sur le développement des petits composés anti-TNF α | 138 |
| 2. | Discussion sur l'inhibition du TNFα par l'immunisation active anti-cytokine | 139 |
| 2.1. | Taille des peptides | 139 |
| 2.2. | Importance de la cyclisation des peptides | 140 |
| 2.3. | Démarche d'exploration suivie | 140 |
| 2.4. | Conclusion | 140 |
| -E- | Conclusion | 143 |
| | Bibliographie | 145 |
| | Communications scientifiques | 155 |

Liste des Tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Tableau illustrant le mimétisme moléculaire _____ | 45 |
| Tableau 2 : Tableau représentant les différents peptides synthétisés _____ | 124 |
| Tableau 3 : Titres ₅₀ anticorps anti-peptide des souris immunisées avec les peptides du TNF α _____ | 125 |
| Tableau 4 : Titres ₅₀ des anticorps reconnaissant la cytokine murine ou humaine _____ | 126 |
| Tableau 5 : Titres ₅₀ des anticorps anti-peptide des lapins immunisées par les peptides mTA502 et mTA504. _ | 127 |
| Tableau 6 : Titres ₅₀ des anticorps anti-peptide reconnaissant le TNF α _____ | 127 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Schéma représentant une coupe de thymus. _____ | 16 |
| Figure 2 : Schéma représentant un ganglion. _____ | 18 |
| Figure 3 : Coupe schématique de la rate. _____ | 18 |
| Figure 4 : Coupe schématique de la muqueuse intestinale. _____ | 19 |
| Figure 5 : Représentation des organes lymphoïdes centraux et périphériques. _____ | 20 |
| Figure 6 : Hématopoïèse. _____ | 22 |
| Figure 7 : Les différents types de lymphocytes T_H . _____ | 25 |
| Figure 8 : Représentation schématique d'un anticorps. _____ | 27 |
| Figure 9 : Les cinq classes d'anticorps. _____ | 28 |
| Figure 10 : Schéma représentant les cinq familles de récepteurs de cytokines. _____ | 33 |
| Figure 11 : Structure du $TNF\alpha$ et de son récepteur $TNFR_{II}$. _____ | 38 |
| Figure 12 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation du $TNF\alpha$ ainsi que les différents cibles potentielles des inhibiteurs. _____ | 41 |
| Figure 13 : Schéma récapitulatif des différents hypothèses pouvant conduire à des phénomènes d'autoimmunité. _____ | 46 |
| Figure 14 : Peptides murins du $TNF\alpha$. _____ | 124 |
| Figure 15 : Peptides humains du $TNF\alpha$. _____ | 124 |

-A-

Introduction

1. Le système immunitaire

1.1. Généralités

L'immunité se définit comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant de discriminer le Soi comprenant les constituants de l'organisme, du Non Soi comprenant les corps étrangers (bactéries, virus, champignons) et du Soi altéré (cellules tumorales).

L'effecteur de l'immunité dans sa globalité est le système immunitaire. Il a pour fonction la défense de l'organisme contre les infections bactériennes, virales, fongiques, parasitaires ou encore les tumeurs. Il possède la capacité d'éliminer un grand nombre de pathogènes en reconnaissant un organisme comme étranger et de produire une réponse visant à sa neutralisation. La présence d'un pathogène dans l'organisme va déclencher une réponse immunitaire pouvant être innée (non spécifique) ou acquise (adaptative).

➤ L'immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les infections et regroupe les barrières épithéliales avec production de peptides antibiotiques, des phagocytes comme les neutrophiles, les macrophages ou encore les cellules dendritiques. On retrouve également les lymphocytes à diversité limitée comme les cellules Natural Killer (cellules NK) et les cellules T Natural Killer (TNK). Les médiateurs de l'immunité innée ne reconnaissent pas un type de pathogènes en particulier mais un ensemble de caractéristiques partagées par des groupes de bactéries ou de virus appelées les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) dans lesquelles on regroupe le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane ou encore l'acide ribonucléique double brin. Ces PAMPs sont reconnus par les Toll-like Receptors (TLR). Les tissus endommagés ou les cellules mortes quant à eux sont reconnus par le biais des Damaged Associated Molecular Patterns (DAMPs). L'immunité innée permet donc l'induction de l'inflammation aboutissant à la neutralisation des microbes, des cellules endommagées, l'inhibition de la réplication virale mais aussi la stimulation de l'immunité adaptative. Cependant l'immunité innée ne permet pas de générer une mémoire immunologique.

➤ L'immunité adaptative

La seconde ligne de défense est l'immunité adaptative. Elle intervient dans un deuxième temps, et est dépendante de l'immunité innée. Elle permet d'éliminer les pathogènes ayant échappé à l'immunité innée ou persistants après celle-ci. Une des

caractéristiques de cette réponse est la présence de cellules mémoires, permettant une réponse plus rapide et amplifiée en cas de deuxième exposition à des pathogènes identiques ou apparentés. L'immunité adaptative est caractérisée par des cellules immunitaires spécifiques que sont les lymphocytes T et les lymphocytes B (effecteurs cellulaires) ainsi que par des molécules appelées anticorps (effecteurs moléculaires) produits par les lymphocytes B. Les lymphocytes T et B dérivent tous deux de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et se développent dans les organes lymphoïdes centraux (ou primaires) et migrent dans les organes lymphoïdes périphériques (ou secondaires).

Malgré leur séparation franche au niveau du langage, l'immunité innée et l'immunité adaptative sont étroitement liées. En effet, l'immunité adaptative requiert le concours de l'immunité innée par la présentation des antigènes par les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPAg) par exemple.

Le système immunitaire est composé de cellules spécifiques regroupées dans des organes lymphoïdes comme les ganglions, la rate, la moelle, le thymus ou les tissus lymphoïdes rattachés aux muqueuses. La génération de ces cellules appelée hématopoïèse s'effectue, dès de la naissance, dans la moelle osseuse, les cellules immunitaires y naissent avant de subir leur maturation pour être effectrices. Le transit des cellules immunitaires de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes s'effectue grâce à l'appareil circulatoire comprenant le réseau lymphatique et le réseau sanguin ; il permet également la circulation des cellules immunitaires entre les différents organes.

1.2. Les organes lymphoïdes

1.2.1. Les organes lymphoïdes centraux

Les organes lymphoïdes centraux regroupent le thymus et la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine de la lignée myéloïde et de la lignée lymphoïde regroupant les cellules sanguines (globules rouges) et les plaquettes mais également les cellules immunitaires composées des lymphocytes, des cellules NK, des monocytes ou des polynucléaires. La moelle osseuse assure ainsi la différenciation des cellules sanguines et immunitaires ainsi que la maturation des lymphocytes B. La maturation des lymphocytes T est quant à elle assurée par le thymus.

1.2.1.1 Le Thymus

Le thymus est un organe situé au niveau de la partie supérieure du thorax, à la base du cou. C'est un organe plat reposant sur le cœur, composé de différents compartiments, le cortex et la médulla. Le cortex, compartiment externe contient les thymocytes immatures alors que la médulla, compartiment interne contient peu de thymocytes (**figures 1 et 5**). On trouve également dans le thymus des cellules épithéliales, des cellules dendritiques interdigitées et des macrophages. Elles sont nécessaires à l'architecture et permettent la différenciation et la maturation des thymocytes. Le thymus a pour fonction la génération de lymphocytes T à partir de thymocytes en effectuant une sélection positive et une sélection négative. Les lymphocytes de faible affinité pour le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ou autoréactifs sont éliminés. Après ces deux étapes de sélection, on estime que 95% des thymocytes seront éliminés, 5% pourront rejoindre les organes lymphoïdes secondaires.

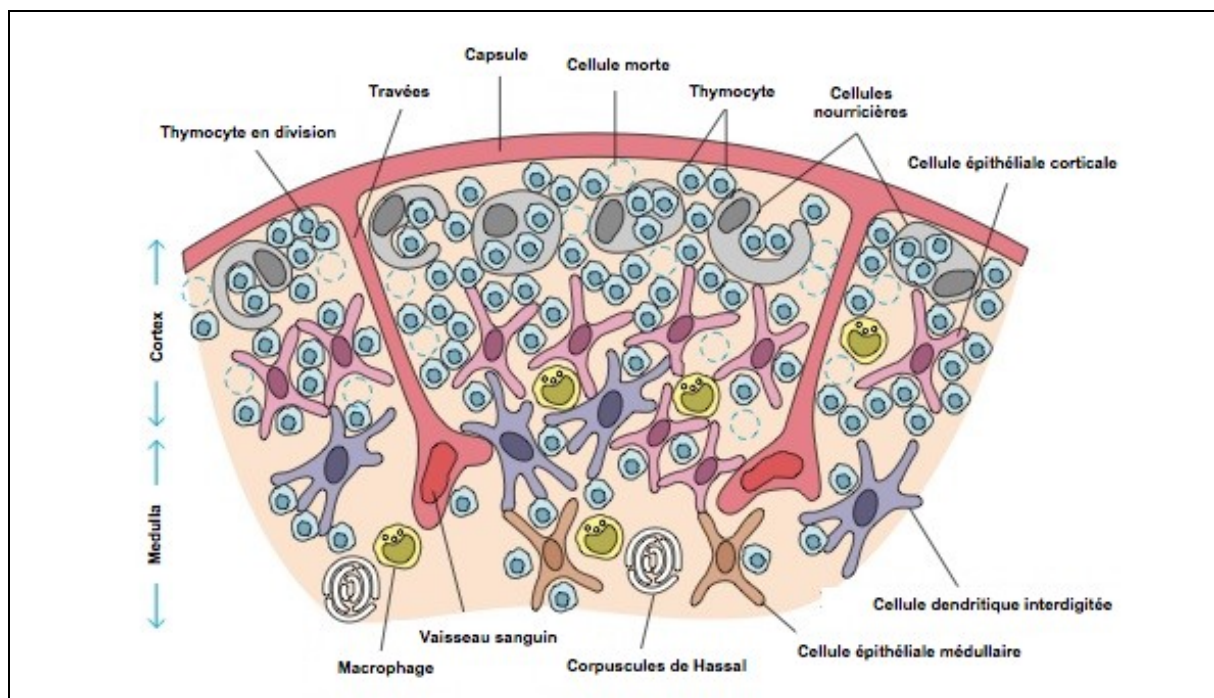


Figure 1 : Schéma représentant une coupe de thymus. Les différents compartiments sont figurés avec les thymocytes en bleu, migrant du cortex vers la médulla au cours de la sélection thymique. Les thymocytes vont entrer en interaction avec les différentes cellules présentes. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

1.2.1.2 La moelle osseuse

La moelle osseuse est le siège de production des cellules immunitaires mais également le siège de maturation des lymphocytes B. Les lymphocytes prolifèrent dans la moelle osseuse et subissent une étape de sélection négative. Les cellules autoréactives, possédant des immunoglobulines de surface reconnaissant des antigènes du Soi, sont éliminées.

1.2.2. Les organes lymphoïdes périphériques

Les organes lymphoïdes périphériques comprennent la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

1.2.2.1 Les ganglions lymphatiques

Les ganglions sont des sites où les réponses immunitaires se mettent en place. Le ganglion est composé de différents compartiments que sont le cortex, le paracortex et la médulla (**figures 2 et 5**). Les lymphocytes B sont localisés au sein du cortex dans des centres germinatifs, les lymphocytes T au niveau du paracortex. La médulla contient essentiellement des plasmocytes sécrétant d'anticorps. Les antigènes présents dans l'organisme sont apportés par la lymphe grâce aux vaisseaux lymphatiques afférents et vont rencontrer des cellules dendritiques et des macrophages ; les lymphocytes présents vont alors reconnaître l'antigène et engager une réponse immunitaire avec une prolifération des cellules et la production de cytokines. Les ganglions sont le lieu de reconnaissance des antigènes provenant des tissus environnants.

1.2.2.2 La rate

La rate est située dans l'abdomen, à gauche. C'est un organe jouant un rôle majeur dans le développement des réponses immunitaires contre des antigènes provenant de la circulation sanguine. Le sang est amené par l'artère splénique. La rate est entourée d'une capsule et possède deux compartiments, la pulpe rouge et la pulpe blanche séparées par la zone marginale diffuse. La pulpe rouge contient des sinus vasculaires où séjournent les macrophages et les globules rouges ; les érythrocytes sont détruits au niveau de la pulpe

rouge. La pulpe blanche contient quant à elle les lymphocytes T alors que la zone marginale est peuplée de lymphocytes B et de macrophages (**figure 3 et 5**).

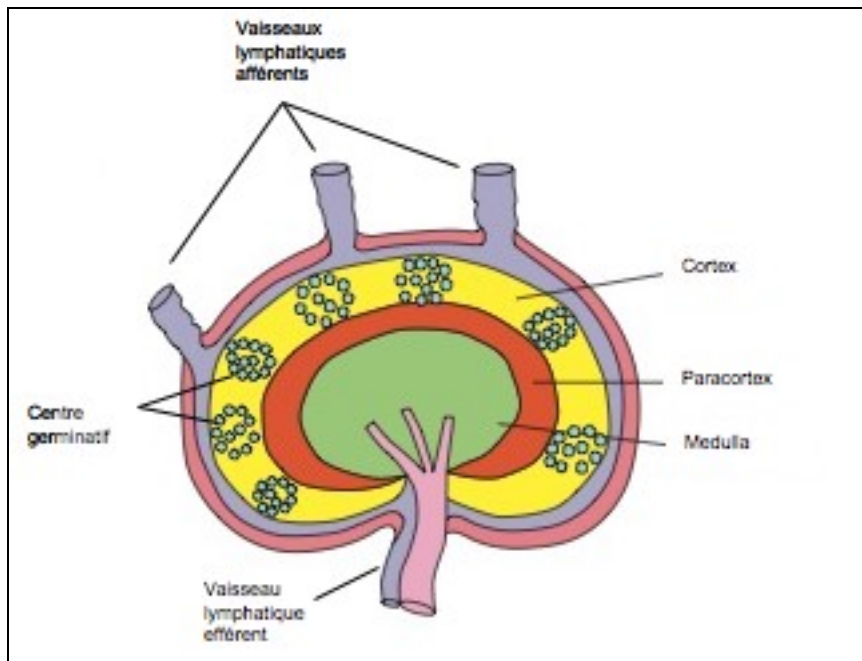


Figure 2 : Schéma représentant un ganglion avec les différents compartiments : le cortex, le paracortex et la médulla. Les antigènes véhiculés par la lymphe arrivent dans le ganglion par les vaisseaux afférents. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

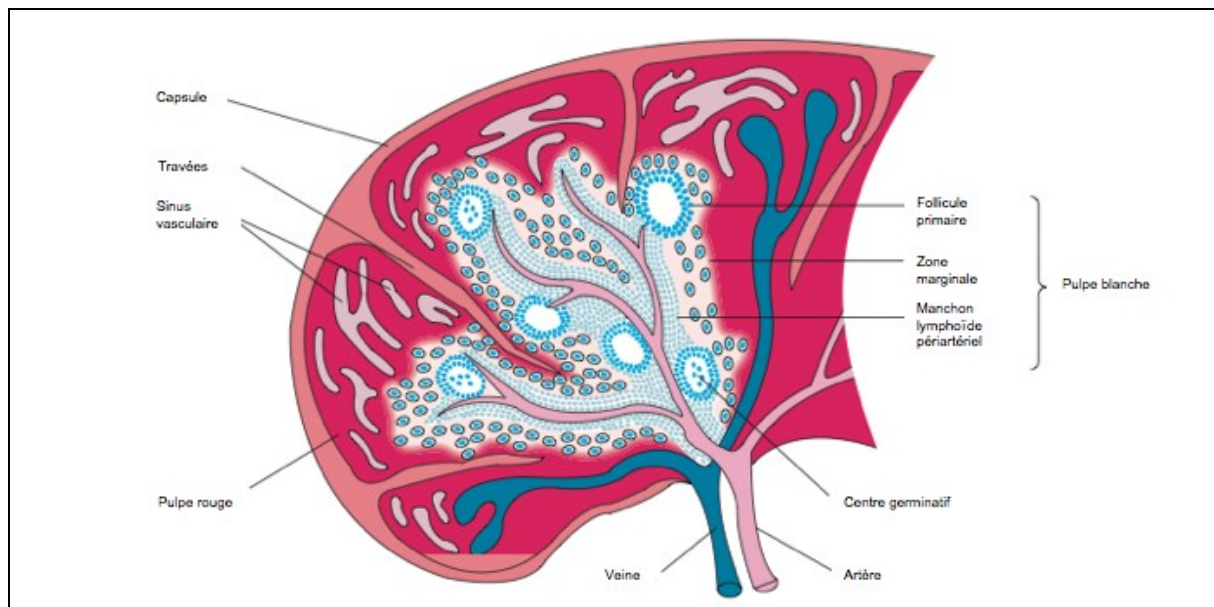


Figure 3 : Coupe schématique de la rate. La pulpe rouge contient les érythrocytes. Le manchon lymphoïde périartériel contient les lymphocytes T, la zone marginale, les lymphocytes B ; ils forment la pulpe blanche. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

1.2.2.3 Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses

Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses bordent les différents sites potentiels d'entrée de pathogènes. On les retrouve au niveau de l'épithélium respiratoire, digestif et urogénital. Cela peut être des groupes de cellules lymphoïdes peu organisées à très organisées comme les plaques de Peyer. Au niveau de l'intestin, par exemple, la couche externe de l'épithélium contient des lymphocytes dits intraépithéliaux, majoritairement des lymphocytes T. La couche située en dessous de l'épithélium, la *lamina propria*, contient des lymphocytes B, des plasmocytes ainsi que des lymphocytes T. La sous-muqueuse contient les plaques de Peyer constituées de follicules lymphoïdes donnant naissance à des centres germinatifs. Le transport des antigènes à travers la muqueuse s'effectue grâce aux cellules M. Les antigènes peuvent activer les cellules présentes qui produiront alors les immunoglobulines de classe A (IgA sécrétoires), présentes en grand nombre au niveau des muqueuses (**figures 4 et 5**).

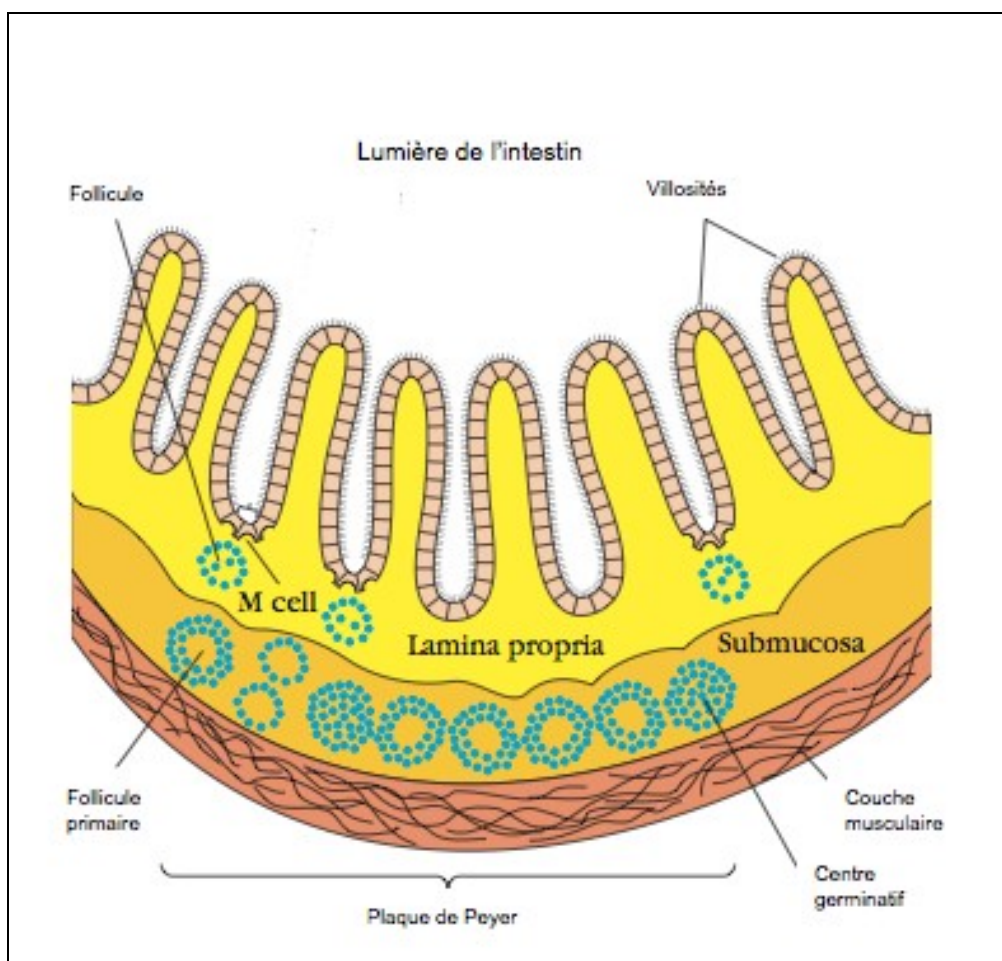


Figure 4 : Coupe schématique de la muqueuse intestinale. Les cellules M captent l'antigène qui va activer les lymphocytes B. Ils se différencient alors en plasmocytes producteurs d'IgA sécrétoires. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

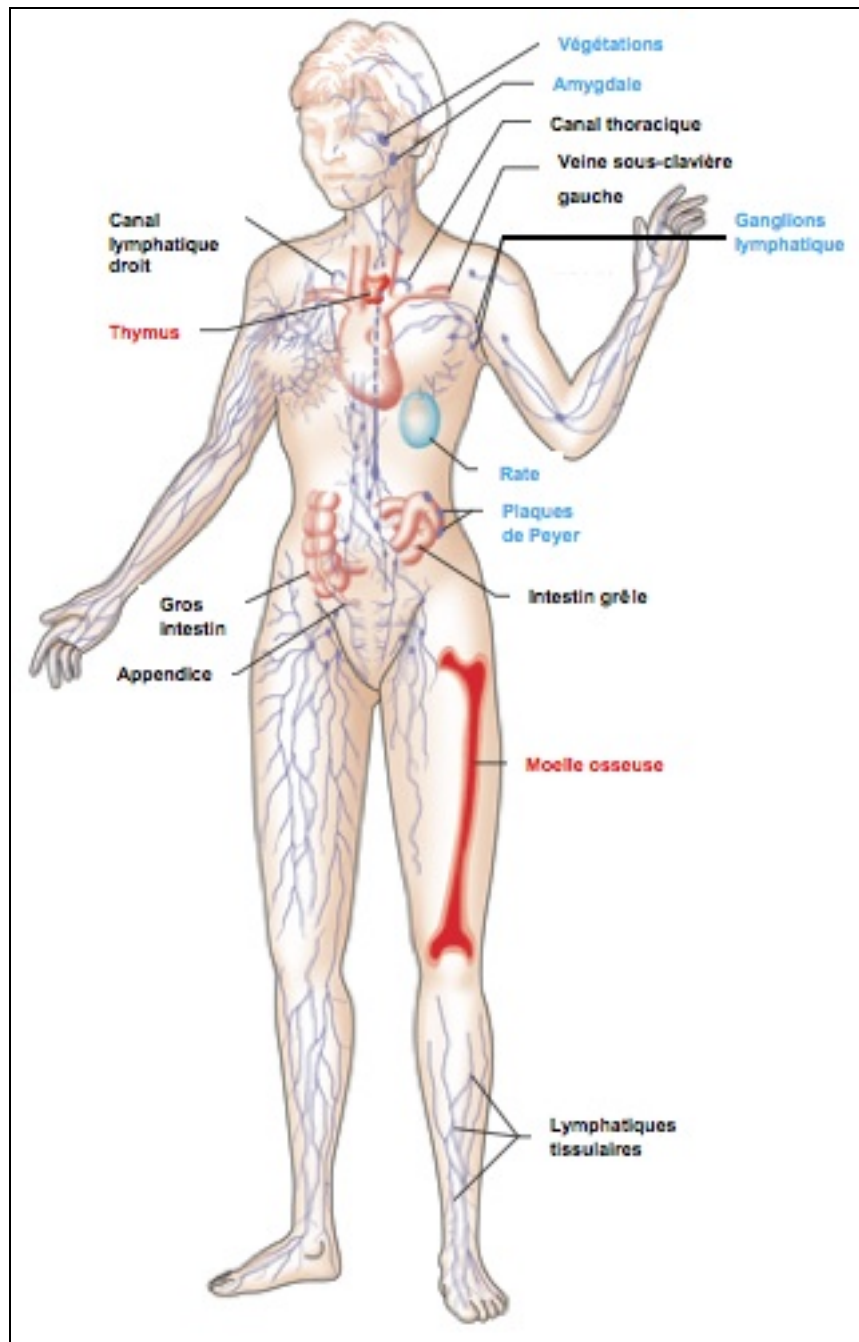


Figure 5 : Représentation des organes lymphoïdes centraux (en rouge) et périphériques (en bleu). Les vaisseaux lymphatiques sont colorés en violet. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

1.3. Les effecteurs cellulaires

1.3.1. Généralités

Les cellules du système immunitaire dérivent de cellules souches hématopoïétiques. Cette cellule souche est capable de donner naissance à deux lignées : soit à la lignée myéloïde, soit à la lignée lymphoïde ; elle a également la capacité de s'auto-renouveler.

➤ Lignée myéloïde

La lignée myéloïde dérive d'un progéniteur myéloïde qui peut donner naissance aux monocytes, aux neutrophiles, aux éosinophiles, aux basophiles, aux mégakariocytes (producteurs de plaquettes) et aux érythrocytes (globules rouges) (**figure 6**). Parmi ces cellules, les cellules dendritiques, les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles ont la possibilité de phagocyter les éléments étrangers du corps. Les cellules dendritiques ainsi que les monocytes sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T et B.

➤ La lignée lymphoïde

La lignée lymphoïde dérive d'un progéniteur lymphoïde qui peut donner naissance, à des cellules dendritiques, aux cellules Natural Killer (NK), à un progéniteur T (qui migrera dans le thymus) ou à un progéniteur B (**figure 6**).

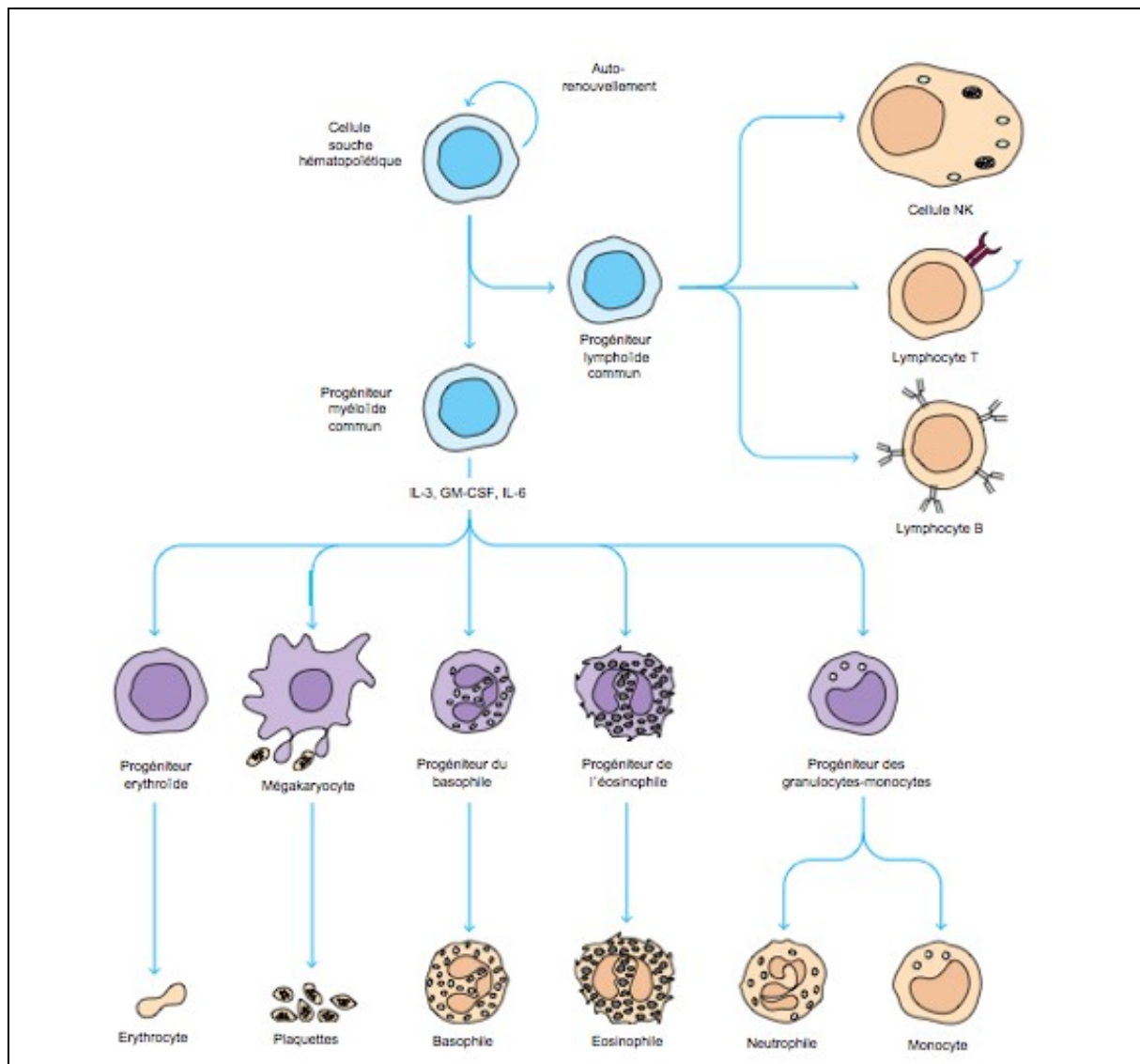


Figure 6 : Hématopoïèse. Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux différentes cellules du système immunitaire ainsi qu'aux cellules sanguines et aux plaquettes. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

1.3.2. Les cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) sont définies par l'expression de molécules de CMH de classe II et de molécules de costimulation. Elles sont capables de présenter des antigènes aux lymphocytes T $CD4^+$. Il existe trois types de CPAg : les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Les cellules dendritiques expriment un taux élevé de CMH de classe II et de molécules de costimulation et sont capables d'activer les lymphocytes T_H naïfs (voir partie 1.3.5). Les macrophages doivent d'abord phagocytter un

microorganisme avant d'exprimer le CMH de classe II et les molécules de costimulation et enfin les lymphocytes B expriment constitutivement le CMH de classe II mais doivent être activés avant d'exprimer les molécules de costimulation.

Toutes les cellules nucléées du corps expriment le CMH de classe I ; elles sont donc potentiellement capables de présenter des antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques, ce sont des CPAg non professionnelles. En général, lorsque ces cellules sont infectées par des virus ou des bactéries intracellulaires, elles expriment des peptides viraux ou bactériens qui permettent leur lyse par les lymphocytes T cytotoxiques après reconnaissance.

1.3.3. Les cellules Natural Killer (cellules NK)

Ce sont des lymphocytes mais non B et non T car ils n'expriment pas les marqueurs de ces lymphocytes que sont CD3 (lymphocyte T) et CD19 (lymphocyte B). Les cellules NK sont impliquées dans les mécanismes de défense contre les virus, les bactéries intracellulaires ou encore les tumeurs. Elles répondent à l'IL-12 et en produisant de l'IFN γ ; elles peuvent donc réguler les réponses immunes innées et adaptatives, l'IFN γ pouvant favoriser la phagocytose par les macrophages et orienter la réponse adaptative vers une réponse plutôt T_{H1} que T_{H2}.

Les cellules NK sont capables de tuer leur cellule cible par l'expression de Fas Ligand (FasL) à leur surface ou par sécrétion de perforine et de granzyme. Les cellules NK n'expriment pas de récepteurs spécifiques aux antigènes comme les lymphocytes T ou B mais des récepteurs activateurs (NKG2D) et inhibiteurs (KIR) qui vont s'opposer. Suivant la force de l'un ou l'autre des signaux, il y aura ou non lyse des cellules. La lyse est basée sur la présence de Soi altéré à la surface de la cellule cible. En effet, les cellules infectées ou tumorales vont avoir une diminution de l'expression du CMH de classe I à leur surface ; la cellule sera alors reconnue comme anormale par les cellules NK et tuée.

1.3.4. Les cellules granulocytaires

Le terme granulocyte est un nom générique regroupant trois types cellulaires :

- Les neutrophiles
- Les éosinophiles
- Les basophiles

Ces différentes cellules, comme leur nom l'indique ont des granules dans leur cytoplasme.

Le neutrophile possède un noyau multilobé ainsi que des granules qui prennent à la fois les colorants acides et basiques. Lors d'une infection, le neutrophile circulant dans le sang va sortir des vaisseaux par un phénomène d'extravasation pour se rendre dans les tissus. Les molécules permettant le déplacement des neutrophiles sont les chimiokines, cytokines chimioattractantes (voir partie 2.2.3). D'autres molécules participent à leur déplacement comme le complément ou les facteurs de coagulation. Les neutrophiles sont, comme les macrophages, des cellules phagocytaires, les granules de leur cytoplasme permettant la lyse des microbes.

L'éosinophile possède un noyau bilobé ainsi que des granules prenant la coloration acide (éosine). Ce sont des cellules phagocytaires dont les granules joueraient un rôle dans la lyse des membranes des parasites.

Le basophile possède un noyau également lobé mais contrairement aux neutrophiles et éosinophiles, il n'est pas capable de phagocytose. Les granules des basophiles joueraient un rôle dans l'allergie. Il agit de concert avec le mastocyte.

1.3.5. Le lymphocyte T

Le progéniteur du lymphocyte T provient de la moelle osseuse mais migre à l'état de cellule immature vers le thymus. Il va alors acquérir son récepteur, le TCR (T Cell Receptor) et subir une sélection négative et positive, visant à éliminer les clones ayant une faible affinité pour le CMH dans un premier temps, puis ceux ayant une forte affinité pour les peptides du Soi dans un deuxième temps. Les lymphocytes T expriment également des molécules de costimulation à leur surface appelées CD4 ou CD8. Les lymphocytes T CD4⁺ sont appelés T helper (T_H) alors que les lymphocytes T CD8⁺ sont appelés T cytotoxiques. Il existe également des lymphocytes T dits régulateurs (T_{reg}) qui expriment une molécule CD4⁺; ils permettent d'inhiber la réponse immunitaire. Les lymphocytes T cytotoxiques sont impliqués dans la lyse des cellules infectées ou tumorales par sécrétion de perforine et reconnaissent un antigène présenté par le CMH de classe I alors que les lymphocytes T_H aide à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative par une activation des cellules B, des lymphocytes T cytotoxiques ou encore des macrophages; ils reconnaissent un antigène présenté par le CMH de classe II. Les lymphocytes T_H sont classés en plusieurs sous-groupes: les lymphocytes T_H1, sécrétant préférentiellement de l'interféron γ (IFN γ) et du facteur de nécrose tumorale

α ($\text{TNF}\alpha$), les lymphocytes $\text{T}_{\text{H}2}$ sécrétant préférentiellement de l'interleukine 4 (IL-4), de l'interleukine 5 (IL-5) et de l'interleukine 13 (IL-13). Cette dichotomie a été mise en évidence chez la souris mais n'est pas complètement similaire chez l'homme. Il existe également un troisième sous-groupe, les lymphocytes $\text{T}_{\text{H}17}$, sécrétant de l'interleukine 17 (IL-17), de l'interleukine 17F (IL-17F), de l'interleukine 21 (IL-21) ou encore de l'interleukine 22 (IL-22) (**figure 7**).

Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes présentés par le CMH sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) et les cellules infectées ou tumorales. Lorsque qu'un lymphocyte T_{H} rencontre et reconnaît un antigène couplé au CMH de classe II sur une cellule présentatrice d'antigènes, il s'active et devient alors une cellule effectrice sécrétant des cytokines, permettant l'activation des lymphocytes B (et la sécrétion d'anticorps), des lymphocytes T cytotoxiques, des macrophages mais aussi d'autres types cellulaires qui vont permettre la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

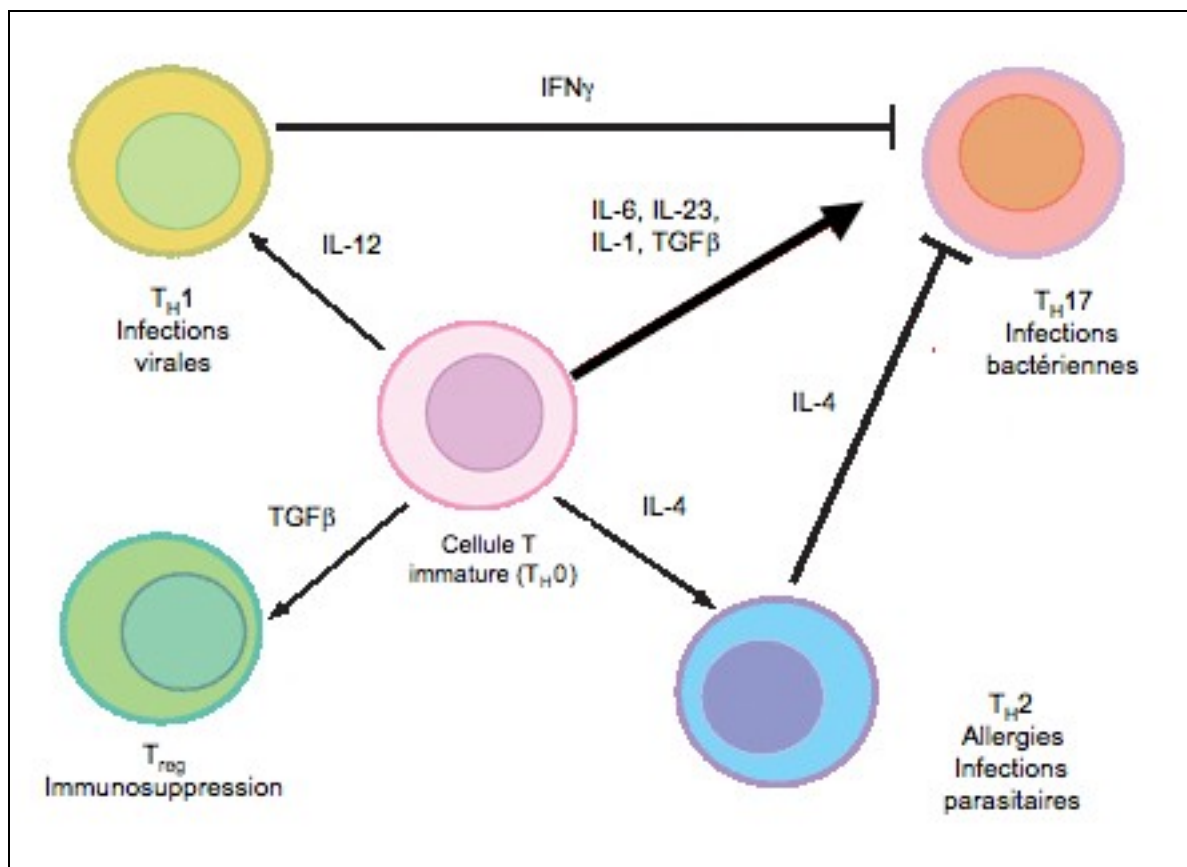


Figure 7 : Les différents types de lymphocytes T_{H} . Un lymphocyte T immature peut donner naissance à des différents types de lymphocytes T_{H} , en fonction des cytokines présentes dans l'environnement.

1.3.6. Le lymphocyte B

Le lymphocyte B comme le lymphocyte T provient de la moelle osseuse mais va poursuivre sa maturation au même endroit où il acquiert le BCR (B Cell Receptor), une immunoglobuline membranaire (IgM). Les lymphocytes B possédant un BCR autoréactif, c'est-à-dire reconnaissant des antigènes du Soi seront éliminés par délétion clonale. Ils peuvent également subir le mécanisme d'editing, le BCR sera réarrangé, au niveau des parties variables responsables de sa spécificité ce qui donnera une « seconde chance » à la cellule. Une fois activé le lymphocyte B se différencie en cellules B effectrices, appelées plasmocytes et en cellules B mémoires. Les plasmocytes sont des cellules sécrétant des immunoglobulines (anticorps) correspondant au BCR.

Les mécanismes de sélection négative et positive des lymphocytes T et B décrits ci-dessus dans le thymus et la moelle osseuse sont appelés la tolérance centrale. Toutefois, certaines cellules peuvent échapper aux différentes sélections et se retrouver dans les organes lymphoïdes périphériques. Dans le cas du lymphocyte T, intervient alors la tolérance périphérique qui sera définie dans la partie 4.2.1.1. Le lymphocyte B peut également subir une délétion périphérique mais aussi un mécanisme d'anergie (voir partie 4.2.1.1).

Les ruptures de tolérance centrale et/ou périphérique peuvent conduire à des phénomènes d'autoimmunité qui seront discutés dans la partie 4. de l'introduction.

1.4. Les effecteurs moléculaires

1.4.1. Les immunoglobulines (ou anticorps)

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont des protéines d'environ 150 kiloDalton (kDa) produits par les lymphocytes B activés c'est-à-dire les plasmocytes. On peut également les retrouver à la surface des lymphocytes B, ils servent alors de récepteur (BCR). Ils ont deux fonctions : neutraliser des antigènes étrangers et induire des fonctions effectrices pour permettre la neutralisation des corps étrangers. Les anticorps sont formés par quatre chaînes polypeptidiques comprenant deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Les chaînes légères sont liées aux chaînes lourdes par un pont disulfure et des liaisons non covalentes. Les extrémités (NH_3^+) des chaînes légères et lourdes sont des extrémités variables et permettent la

liaison à l'antigène, ce qui fait la spécificité d'un anticorps par rapport à un autre (**figure 8**). Le reste d'une molécule d'anticorps est similaire dans une même classe.

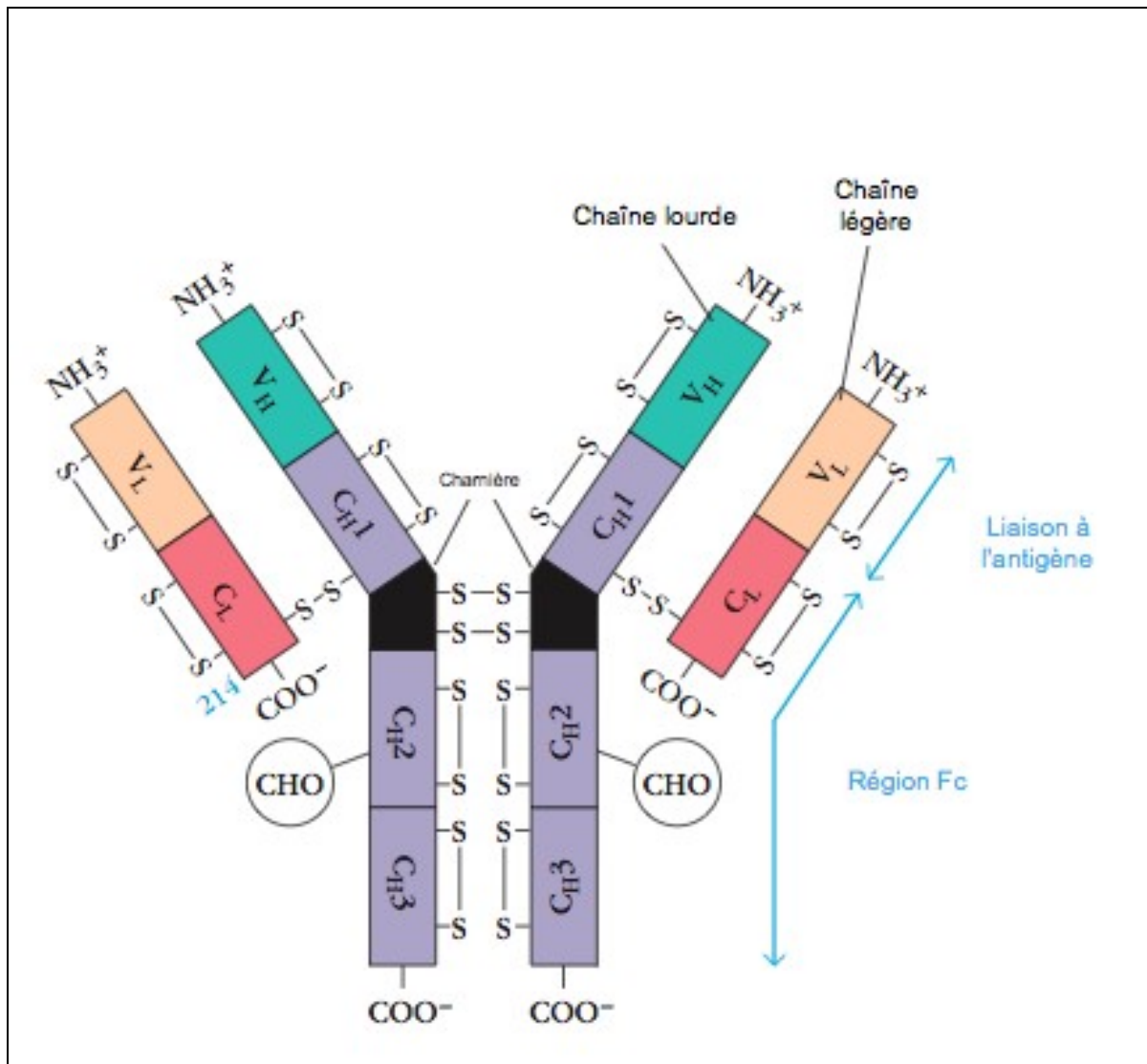


Figure 8 : Représentation schématique d'un anticorps. Un anticorps est composé de deux chaînes légères, de deux chaînes lourdes et d'une région charnière. Les extrémités NH₃⁺ des chaînes lourdes et légères (V_L, V_H) sont des sites de liaison à l'antigène. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

Il existe cinq classes d'anticorps, appelé isotype. Les chaînes lourdes μ , γ , α , δ , ϵ déterminent la classe des anticorps : IgM, IgG, IgA, IgD, IgE. Certains anticorps peuvent être multiples, en effet l'IgM peut être un pentamère et l'IgA peut être un dimère (**figure 9**). L'IgG est la classe d'anticorps la plus abondante. L'IgM, deuxième classe la plus abondante, est la première immunoglobuline à être produite lors d'une réponse immune à un antigène. L'IgA est une immunoglobuline retrouvée dans le sérum mais également dans les sécrétions

comme le lait, la salive ou encore le mucus, elle est alors appelée IgA sécrétoire. Les IgE interviennent dans les réactions d'hypersensibilité immédiate comme le rhume des foins ou l'urticaire. L'IgE se lie aux membranes des basophiles et des mastocytes par les récepteurs Fc, il y a alors dégranulation des cellules, permettant la libération de granules provoquant les manifestations allergiques. L'IgD est retrouvée à très faible concentration dans le sérum, son rôle est peu connu.

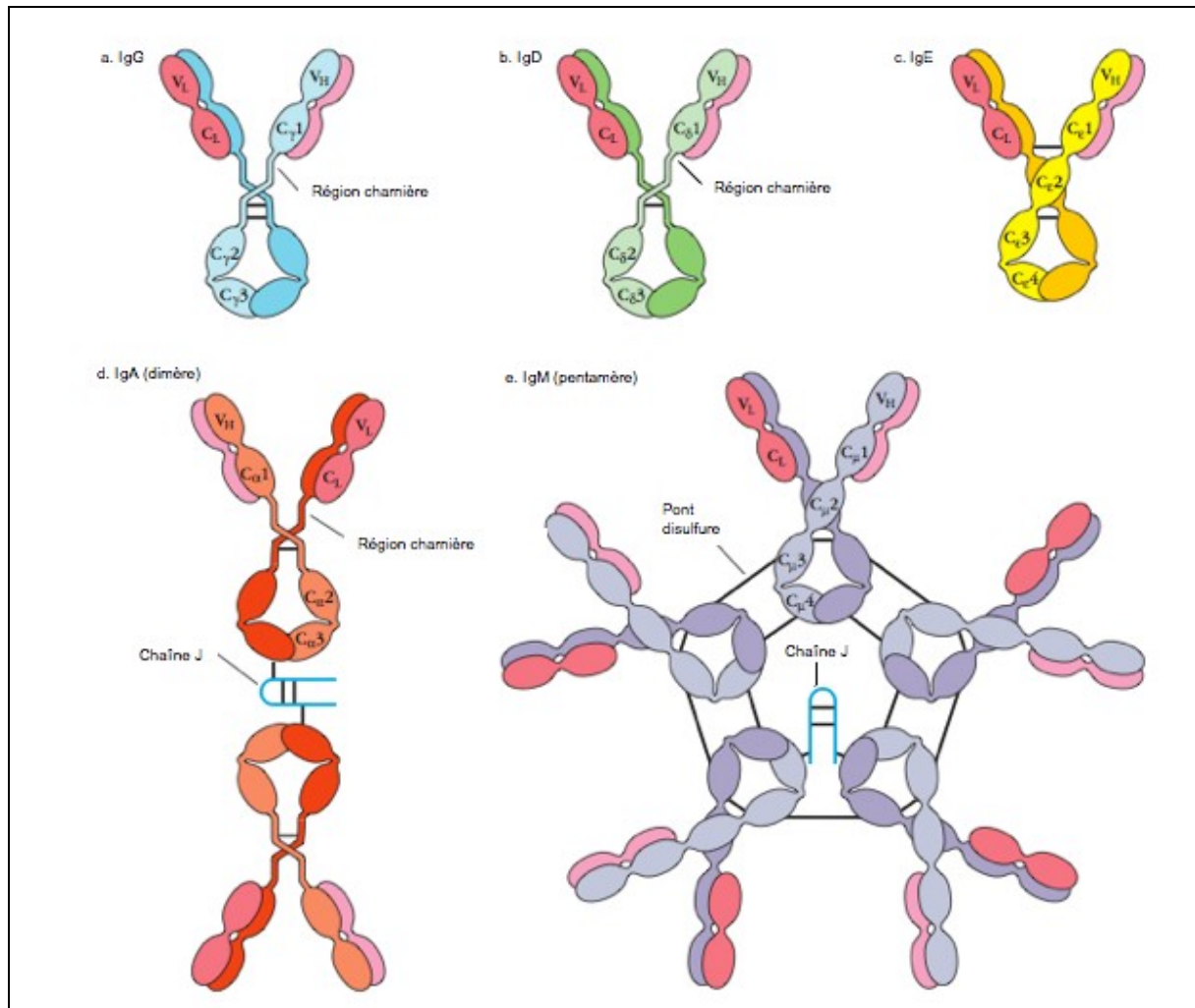


Figure 9 : Les cinq classes d'anticorps. Les chaînes légères sont nommées V_L et C_L ; les chaînes lourdes sont nommées V_H, C_H. Les traits noirs représentent les ponts disulfures. Les anticorps dimériques (IgA) ou pentamériques (IgM) contiennent la chaîne J. Les chaînes lourdes des IgA, IgG et IgD contiennent 4 domaines et une région charnière ; les chaînes lourdes des IgE et IgM contiennent 5 domaines sans région charnière. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

Les anticorps sont capables de reconnaître l'antigène mais également de médier des fonctions effectrices. Parmi elles, il existe:

- L'opsonisation. Les anticorps se lient à l'antigène. La partie Fc de l'anticorps va ensuite être reconnue par les récepteurs de Fc présents à la surface des macrophages et des neutrophiles et induire la phagocytose du complexe antigène-anticorps (complexe immun).
- L'activation du complément. Le complément est un groupe de protéines pouvant perforer les membranes cellulaires. Le fragment C3b est capable de se fixer aux complexes antigène-anticorps permettant la reconnaissance par les phagocytes et l'élimination du complexe.
- La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (pour Antibody Dependent Cell Cytotoxicity : ADCC). Les anticorps se fixant par leur Fc sur des cellules peuvent permettre la lyse par les cellules NK notamment.

1.4.2. Les cytokines

Les cytokines sont des messagers de communication intercellulaire. Ce sont de petites protéines d'environ 200 acides aminés. Elles sont produites par les cellules immunitaires mais également par les cellules épithéliales, les kératinocytes, les cellules gliales ou encore les synoviocytes. La description des cytokines fait l'objet d'un chapitre à part entière (chapitre 2.).

2. Les cytokines dans l'immunité

2.1. Description des cytokines

Les cytokines sont des messagers protéiques de taille le plus souvent comprise entre 80 à 200 acides aminés permettant la communication entre les différentes cellules du système immunitaire mais également d'autres types cellulaires. Leur découverte a commencé dans les années 1950 par l'interleukine 1 (IL-1)¹ et le Nerve Growth Factor (NGF)². À partir des années 1980, grâce à la technologie du séquençage, beaucoup de protéines ont été identifiées et regroupées dans la famille des cytokines.

On regroupe dans le terme cytokine les interleukines (IL-), les interférons (IFN), les facteurs de croissance ou encore les chimiokines. Les cytokines agissent de façon autocrine (fixation

sur les récepteurs de la cellule qui l'a sécrétée), paracrine (fixation sur les récepteurs d'une cellule voisine) ou endocrine (fixation sur les récepteurs d'une cellule après passage dans le sang) et permettent la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose des cellules cibles. Elles sont également capables de provoquer l'inflammation, la fièvre ou encore l'inhibition des fonctions effectrices des lymphocytes T. Les cytokines peuvent agir sous forme monomérique comme l'interleukine 4 (IL-4), sous forme dimérique comme l'interféron (IFN γ)³ ou trimérique comme le facteur de nécrose tumorale (TNF α)⁴. Elles peuvent être secrétées sous forme inactive qui nécessitera un clivage par une enzyme. C'est le cas par exemple de l'IL-1. Elles ont une forte affinité pour leur récepteur et agissent à des doses pouvant aller du picomolaire au nanomolaire.

2.2. Les différents types de cytokines et leur rôle

À l'origine, les différentes cytokines ont été nommées suivant leur fonction comme pour le TNF α ou le facteur stimulant des colonies (GM-CSF) ou avec un numéro dans l'ordre de découverte (IL-1, IL-2,...). De nos jours, on les classifie en fonction de la famille structurale (superfamille) à laquelle elles appartiennent^{5,6}.

- La famille du TNF (TNF α , TNF β , B Lymphocyte Stimulator : BLYS, TNF Related Apoptosis Inducing Ligand : TRAIL, Fas Ligand : FasL)
- La famille des interférons (IFN α , IFN β)
- La famille des chimiokines comprenant 4 sous-familles (CCL, CXCL, CXXCL, CL)
- La famille des hématopoïétines (IL-2, IL-4, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor : GM-CSF)
- La famille de l'IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33)
- La famille de l'IL-10 (IL-20, IL-22)
- La famille du Transforming Growth Factor (TGF β , Bone Morphogenetic Protein : BMP)

Voici quelques exemples de cytokines ainsi que leur rôle dans l'immunité.

2.2.1. Les interférons

Les membres les plus connus sont les interférons α , β et γ (IFN α , β , γ). Les IFNs α et β sont des interférons de type I alors que IFN γ est un interféron de type II. Le phénomène

d'interférence virale a été mis en évidence dans les années 1950 par Isaacs et Lindenmann⁷. Les interférons de type I sont secrétés par les cellules infectées permettant aux cellules aux alentours de se prémunir contre les infections⁷. En revanche, l'IFN γ est secrété par les lymphocytes T activés ou encore les cellules NK et permet la régulation de la production d'anticorps, l'activation des macrophages, l'expression du CMH à la surface des cellules ou encore la régulation de la fonction des cellules NK⁸.

2.2.2. Les interleukines

Les interleukines sont des cytokines produites par les lymphocytes T mais aussi les cellules présentatrices d'antigènes. Elles exercent un rôle important dans la communication cellulaire entre les différents partenaires du système immunitaire mais également pour la régulation des réponses comme la différenciation⁹ ou la prolifération¹⁰ des cellules cibles. Trente-sept interleukines ont été découvertes jusqu'à présent et cette famille comprend par exemple l'IL-1 ayant un rôle dans la réaction inflammatoire ou l'IL-2 nécessaire à la prolifération et au fonctionnement des cellules T.

2.2.3. Les chimiokines

Ce sont de petites protéines importantes pour leur propriété de chimiotactisme. Elles contrôlent la migration des cellules vers les organes lymphoïdes comme le couple CCL19-21/CCR7¹¹ ou vers les lieux d'infection¹². Il existe quatre sous-familles de chimiokines : les CC chimiokines possédant 2 cystéines adjacentes en N-terminal, les CXC chimiokines, possédant deux cystéines en N-terminal séparées par un acide aminé, les C chimiokines possédant une cystéine en N-terminal et enfin les CX₃C chimiokines possédant deux cystéines en N-terminal séparées par trois acides aminés (X représentant un acide aminé).

2.2.4. Le TNF α

Le facteur de nécrose tumorale est une cytokine connue pour ses propriétés apoptotiques sur les cellules tumorales. Elle est produite par des types cellulaires variés regroupant les macrophages, les lymphocytes T, mais également les fibroblastes, les synoviocytes ou encore les keratinocytes. En présence d'IL-1 ou de composés bactériens, de fortes quantités de TNF α sont produites. Le TNF α permet la production des protéines de la

phase aiguë par le foie comme la protéine C réactive ou les lectines. Le TNF α et ses récepteurs seront discutés plus en détails dans le chapitre 3..

2.3. Les récepteurs de cytokines

Comme pour la classification des cytokines, les récepteurs sont regroupés en familles basées sur leur caractéristiques structurales communes⁶. Ainsi, il existe 5 familles :

- Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines. Ils sont composés de domaines immunoglobulines dans leur partie extracellulaire et de domaines Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) dans leur partie cytoplasmique, partie commune avec les récepteurs Toll (TLR) permettant la transduction du signal¹³. On retrouve dans cette famille le récepteur de l'IL-1. L'IL-1 possède deux récepteurs l'IL-1 récepteur de type I (IL-1RI)¹⁴ et l'IL-1 récepteur de type II (IL-1RII)¹⁵ ainsi qu'un antagoniste du récepteur (IL-1Ra). Le récepteur de type I permet, en formant un complexe avec le récepteur accessoire (IL-1RaCP)¹⁶ la transduction du signal et l'activation de NF κ B. Le récepteur de type II est dépourvu de queue cytoplasmique, il n'est donc pas capable de transduire le signal¹⁷. Le récepteur antagoniste quant à lui peut se fixer sur l'IL-1RI mais sans induire la transduction du signal. Il permet de moduler l'activité de l'IL-1 (**figure 10a**).
- Les récepteurs des cytokines de classe I (récepteurs des hématopoïétines). Ce sont des récepteurs transmembranaires qui partagent des motifs conservés à savoir quatre cystéines en une position conservée et un motif tryptophane, sérine, X, tryptophane, sérine (WSXWS, où X est un acide aminé non conservé) et qui s'associent à d'autres chaînes permettant la transduction du signal. Ils peuvent donc être homodimériques, hétérodimériques ou hétérotrimériques. Certaines chaînes composant le récepteur peuvent être conservées entre différents membres de la famille, c'est le cas, par exemple, de la chaîne gamma (γ c) qui est partagée entre l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7¹⁸, l'IL-9 ou encore l'IL-21¹⁹ (**figure 10b**).
- Les récepteurs des cytokines de classe II (anciennement récepteurs des interférons). Ils possèdent également les quatre cystéines en position conservée comme les récepteurs de type I mais le motif WSXWS est absent. Ces récepteurs regroupent à la fois les

récepteurs des interférons α , β , γ (IFN α , β , γ)²⁰ mais aussi les récepteurs des cytokines de la famille de l'interleukine 10 (IL-10)²¹ (**figure 10c**).

- Les récepteurs de la famille du TNF. Cette famille regroupe les récepteurs des cytokines faisant partie de la famille du TNF comme le TNF α et le TNF β mais aussi les différents récepteurs de BLyS comme le B cell Activating Factor belonging to the TNF family récepteur (BAFFR), le Transmembrane Activator Calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) et le B Cell Maturation Antigen (BCMA)²². On retrouve également dans cette famille le récepteur activateur du NF κ B (RANK) qui se lie au ligand du récepteur activateur du NF κ B (RANKL)²³ ou encore le récepteur Fas qui se lie au FasL²⁴. Les régions extracellulaires de ces différents récepteurs sont caractérisées par des régions pseudorépétées riches en cystéine pouvant former des ponts disulfure²⁴ (**figure 10d**).
- Les récepteurs de la famille des chimiokines. Ces récepteurs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G permettant la transduction du signal. Ils sont subdivisés en quatre familles correspondant aux différentes familles de chimiokines qu'ils sont capables de lier²⁵ (**figure 10e**).

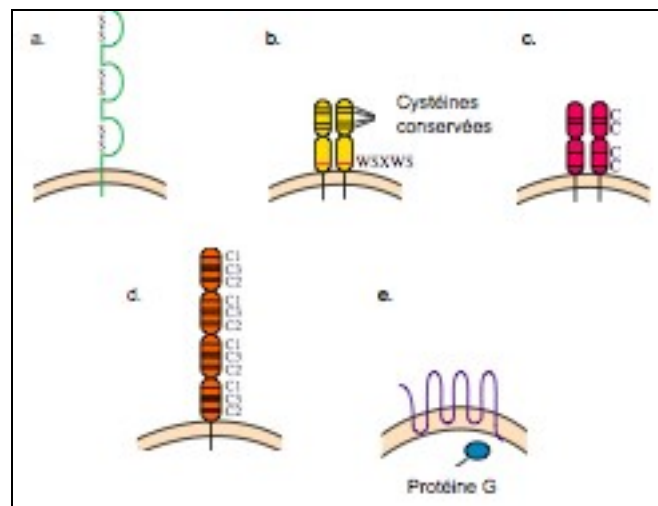


Figure 10 : Schéma représentant les cinq familles de récepteurs de cytokines. a. Récepteur de la famille des immunoglobulines. b. Récepteur de cytokines de classe I avec le motif les cystéines conservés. c. Récepteur de cytokines de classe II avec les cystéines conservées. d. Récepteur de la famille du TNF avec les régions cystéine pseudorépétées. e. Récepteur de la famille des chimiokines, récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

2.4. Le réseau de cytokines

Une des caractéristiques des cytokines est leur capacité à inhiber ou stimuler la production d'autres cytokines. Par exemple, l'IL-1 β induit la sécrétion d'IL-2 qui à son tour va induire la prolifération des lymphocytes T et B. L'IL-1 permet la production de GM-CSF²⁶ ou de chimiokines²⁷. L'IL-2 permet la régulation positive de l'expression des récepteurs à l'interleukine 12 (IL-12) et du facteur de transcription STAT4 sur les cellules NK²⁸. L'IL-12, anciennement nommée facteur de stimulation des cellules NK (NKSF²⁹), est capable d'induire la production d'IFN γ par les cellules NK et les lymphocytes T³⁰. Elle polarise la réponse T_H1 (production d'IL-2 et d'IFN γ), en inhibant la réponse T_H2 (production d'IL-4, IL-5 ou IL-13)³¹. Cette cytokine est un régulateur majeur de l'IFN γ dans l'organisme. D'autres cytokines peuvent avoir un effet inhibiteur comme l'IL-10. Elle permet la régulation négative de la production d'IFN γ par les lymphocytes T et les cellules NK³². Grâce à ces quelques exemples, nous pouvons voir que les cytokines agissent comme un véritable réseau de communication entre les différents partenaires du système immunitaire. Lors de la mise en œuvre de la réponse, de nombreuses cytokines vont agir sur les cellules immunitaires, interagissent entre elles pour induire des mécanismes bien précis permettant la réparation des tissus, la mort des cellules tumorales ou l'élimination du pathogène. On caractérise l'action des cytokines en réseau de la façon suivante :

- La pléiotropie, qui se définit comme la capacité d'une cytokine à avoir différents effets biologiques sur différentes cellules.
- Lorsque deux ou plusieurs cytokines sont capables de médier des fonctions semblables, on parle de redondance.
- Lorsque l'effet combiné de deux cytokines sur une cellule est plus fort que l'effet séparé des cytokines sur cette cellule, on parle de synergie.
- Si une cytokine exerce un effet inhibiteur sur une cytokine, on parle alors d'antagonisme.
- Enfin, les cytokines sont capables d'induire des cascades. L'action d'une cytokine sur une cellule-cible va permettre la production par cette cellule cible d'une ou plusieurs cytokines.

2.5. Les cytokines dans la réponse immunitaire

Le développement de la réponse immunitaire repose sur l'intervention de plusieurs partenaires dont le lymphocyte T $CD4^+$ est le chef d'orchestre. Les CPAg vont présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs, ces cellules prolifèrent et se différencient en lymphocytes T $CD4^+$ avec un profil plutôt T_H1 , T_H2 ou T_H17 . Comme cela est décrit plus haut les lymphocytes T_H1 (après polarisation par l'IL-12) vont produire préférentiellement des cytokines de type IL-2, $IFN\gamma$ ou $TNF\alpha$ avec l'induction d'une immunité à médiation cellulaire, impliquant des lymphocytes T cytotoxiques, les cellules phagocytaires comme les macrophages et les cellules NK. Les lymphocytes T_H2 (après polarisation par l'IL-4) vont, quant à eux, produire des cytokines comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et collaborer avec les lymphocytes B (producteurs d'anticorps) pour induire une immunité à médiation humorale. Et enfin les lymphocytes T_H17 vont produire de l'IL-17A, IL-17F, IL-22. Lors de la première rencontre avec l'antigène, il y aura également la mise en place d'une mémoire immunitaire permettant une réaction plus rapide lors d'une deuxième rencontre avec ce même antigène.

Les cytokines permettant la différenciation de ces deux populations sont capables de s'inhiber entre elles. Ainsi les cytokines T_H1 inhibent le développement des cellules T_H2 et T_H17 . Les cytokines T_H2 sont capables d'inhiber le développement des cytokines T_H1 et T_H17 et les cellules T_H17 peuvent inhiber le développement des cellules T_H1 et T_H2 . Ces différentes populations cellulaires ont des rôles différents. En effet, les lymphocytes T_H1 sont impliqués dans la lutte contre le développement des tumeurs, les pathogènes intracellulaires, les champignons ou l'hypersensibilité retardée alors que les lymphocytes T_H2 sont impliqués dans les réactions d'hypersensibilité immédiate (allergie) et les lymphocytes T_H17 dans les l'élimination des pathogènes extracellulaires.

La balance $T_H1/T_H2/T_H17$ est finement régulée. Les cytokines participent à l'homéostasie de l'organisme en permettant l'activation, l'inhibition ou le maintien des différentes fonctions du système immunitaire. Des dérèglements au niveau de la production, de la transduction du signal ou de l'activité des cytokines peuvent engendrer des états d'inflammation aiguë et/ou chronique pouvant conduire à l'apparition de maladies dites auto-immunes.

3. Le TNF α : cytokine centrale de l'immunité

3.1. Historique

En 1868, P. Bruns a rapporté la régression de tumeurs chez des patients ayant subi une infection bactérienne. En 1891, un oncologue du nom de William Coley a injecté des streptocoques à un patient souffrant d'un cancer des os³³ (Coley's toxin). Il a émis l'hypothèse que le système immunitaire, en traitant l'infection, s'attaquerait à la tumeur. En effet, peu de temps après la tumeur a régressé. W. Coley a soigné, avec plus ou moins de succès, des patients³³. En 1931, Gratia *et al.* ont induit la régression de tumeurs chez le cochon d'Inde en leur injectant des extraits bactériens. Dans les années 40, le LPS a été isolé à partir d'extraits bactériens et montré comme responsable de la régression des tumeurs par Shear *et al.*³⁴. En 1952, G. Algire a montré que le LPS induisait une nécrose des tumeurs en provoquant une hypotension, une diminution de la vascularisation et la mort des cellules³⁵.

En 1962, O'Malley *et al.* ont montré que le sérum de souris infectées avec *Serratia marcescens* était capable d'induire la mort de cellules de sarcome ; le sérum contenait un facteur conduisant à la régression tumorale qui a été nommé facteur nécrosant les tumeurs³⁶. Il a ensuite été rebaptisé facteur de nécrose tumorale, en 1975, par le groupe de L. Old qui a également montré que les macrophages étaient la source principale de TNF α ³⁷ alors que le TNF β (ou lymphotoxine) est produit par les lymphocytes³⁸.

Dans les années 80, la séquence protéique du TNF α a été déterminée. Le TNF α possède une forte identité avec la lymphotoxine (LT), appelée également TNF β . C'est à partir de cette découverte qu'est née la superfamille du TNF qui compte environ une vingtaine de membres comme BLYS, TRAIL ou encore RANKL. Peu après la publication de la séquence du TNF α , Beutler *et al.* ont montré que la cachectine chez la souris était du TNF α murin³⁹. Dans cette description, je parlerai uniquement du TNF α car je me suis intéressée à cette cible lors de ma thèse.

3.2. Génétique

La séquence nucléotidique et polypeptidique du TNF α a été publiée en 1984-1985^{40,41}. Le gène du TNF α humain qui a été cloné en 1985⁴², a une taille d'environ 3 kb et se trouve sur le chromosome 6. Il possède 4 exons et 3 introns ; le dernier exon codant pour 80% de la protéine sécrétée⁴³.

Le gène du TNF α murin a été cloné en 1988⁴⁴ ; il se trouve sur le chromosome 17 et comme pour la protéine humaine, il possède 4 exons et 3 introns⁴⁵. Le polypeptide synthétisé a deux formes, une forme de 233 acides aminés (le TNF α membranaire) et une forme de 157 acides aminés (le TNF α soluble) avec des masses moléculaires respectives de 26 kiloDalton (17,5 kDa) et 17,5 kDa⁴⁰. Lorsqu'il est ancré dans la membrane ou en solution, le TNF α est trimérique avec une masse moléculaire d'environ 52 kDa ; des liaisons non covalentes permettant l'association en trimère. La forme active du TNF α est une forme trimérique ; le monomère ayant une faible activité^{46,47}.

3.3. La cytokine et ses récepteurs

Après la traduction de l'ARN messager du TNF α , le pro-TNF α est ancré au niveau de la membrane plasmique sous forme d'homotrimère avec une taille de 26 kDa. Cependant, grâce à l'action d'une enzyme, plus précisément d'une métalloprotéase, la TNF- α Converting Enzyme (TACE), le TNF α peut être clivé, libérant ainsi du TNF α soluble avec une taille de 17 kDa. Le clivage s'effectue au niveau de l'Ala76 et de la Val77⁴⁸ de la protéine.

Le TNF α possède deux récepteurs, également des homotrimères, TNFR1 d'une taille de 55 kDa (p55) et TNFR2 d'une taille de 75 kDa (p75) (**figure 11**). Les deux récepteurs ont des expressions différentes à la surface des cellules. Alors que TNFR1 est exprimé sur la plupart des cellules du corps, TNFR2 est exprimé sur les cellules immunitaires et endothéliales⁴⁹. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires avec des régions pseudorépétées riches en cystéine dans la partie N-terminale extracellulaire. Les deux récepteurs partagent des homologies au niveau de la structure et de la fonction mais leurs domaines intracellulaires sont distincts. En effet, contrairement au TNFR1, TNFR2 ne possède pas de domaine de mort permettant l'apoptose de la cellule cible⁴⁹. Le TNFR2 pourrait toutefois engager des phénomènes d'apoptose par des réactions croisées avec le TNFR1 ; il reconnaît également le TNF β ⁵⁰. Le TNF α est capable de se fixer sur les deux récepteurs sous forme soluble ou membranaire, toutefois, le TNF α soluble se fixe préférentiellement sur le TNFR1 alors que le TNF α membranaire se fixe plutôt sur TNFR2. Comme pour le TNF α , les deux récepteurs peuvent être clivés par une enzyme pour générer des récepteurs solubles : dans le cas de TNFR2, c'est la TACE, l'enzyme clivant le TNFR1 étant inconnue ; des syndromes autoinflammatoires comme le TNFR1-associated periodic syndromes (TRAPS) ont été associés à des défauts de clivage de TNFR1⁵¹.

Face à une infection, en présence de LPS ou de composés bactériens, il y aura production de grandes quantités de $\text{TNF}\alpha$ soluble via l'activation des TLRs présents sur les macrophages par exemple. Le $\text{TNF}\alpha$ va alors permettre la production d'autres cytokines comme l'IL-1 ou de protéines de la phase aigue comme la protéine C réactive. C'est une cytokine proinflammatoire majeure. Le $\text{TNF}\alpha$ a des rôles multiples⁵² :

- Il peut conduire à l'apoptose des cellules cibles ou permettre la survie cellulaire ou la transcription de protéines.
- Il peut également supprimer l'appétit, on parle alors de cachexie.
- C'est également un pyrogène endogène (induction de fièvre) comme l'IL-1 ou l'IL-6.
- Il peut avoir des actions antitumorales (voir historique)
- Sa surproduction peut avoir des effets néfastes, c'est le cas du choc septique et des maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou le psoriasis.

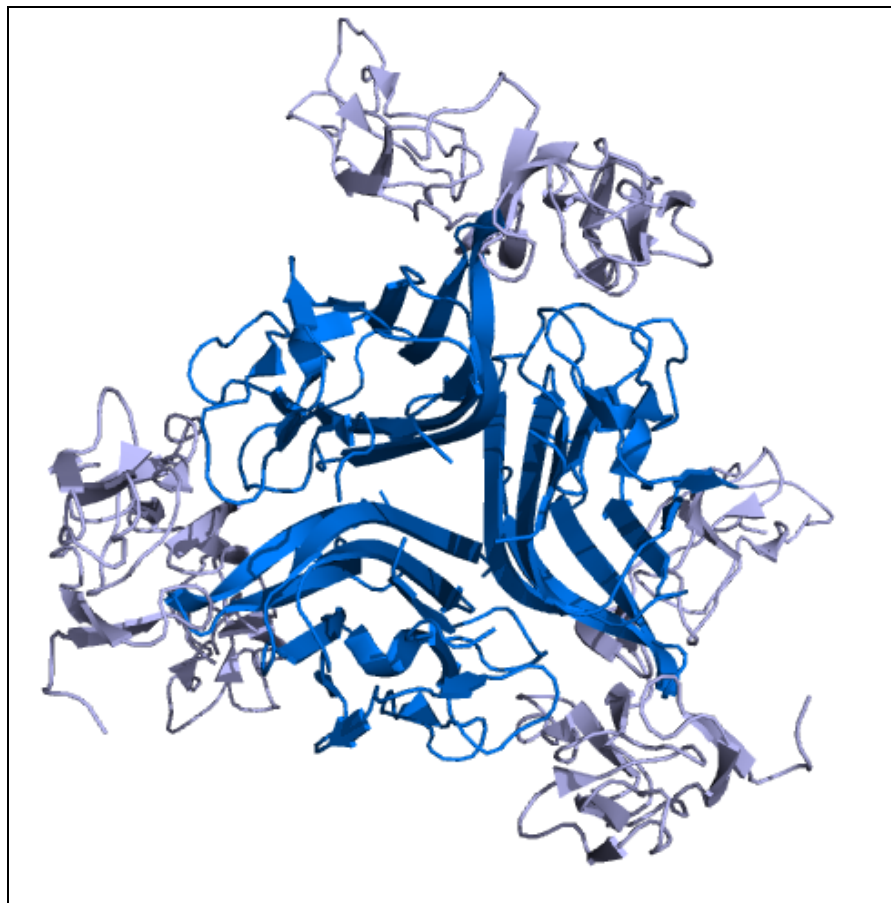


Figure 11 : Structure du $\text{TNF}\alpha$ et de son récepteur TNFRII. Bleu foncé : le $\text{TNF}\alpha$, bleu clair : récepteur TNFRII. D'après la PDB, code 3ALQ.

3.4. Cellules productrices et cellules cibles

Le TNF α est majoritairement produit par les macrophages. En présence de LPS et de composés bactériens, les TLRs présents à leur surface (TLR4 pour le LPS) vont activer la transcription et la sécrétion du TNF α . Le TNF α est également produit par les cellules T, majoritairement CD4⁺ ainsi que par les cellules épithéliales (cellules de la muqueuse intestinale) et les fibroblastes comme les synoviocytes ou les kératinocytes, cellules impliquées respectivement dans la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis. Le TNF α est également produit en présence d'IL-1, cytokine proinflammatoire.

Le TNF α peut agir sur différentes cibles et provoquer l'apoptose, la survie cellulaire, la sécrétion de cytokines et de protéines de la phase aiguë et diminuer le métabolisme lipidique. Il agit sur les cellules épithéliales et les fibroblastes en favorisant la production de collagénase et de prostaglandines par ces cellules.

3.5. Voies de signalisation

Le TNF α est une cytokine proinflammatoire pouvant induire des phénomènes d'apoptose, de survie cellulaire et de production de protéines (comme les cytokines). Après la fixation du TNF α sur son récepteur, en fonction du milieu environnant et des signaux de survie ou de mort, il y aura activation des cascades de signalisation propres au TNF α .

Trois voies de signalisation sont présentes dans la cascade du TNF α : la voie apoptotique, la voie des MAP kinases et la voie NF κ B⁵².

Le TNFR1 possède un domaine de mort commun au récepteur Fas. Après la fixation du TNF α sur son récepteur, des protéines adaptatrices vont être recrutées : le TNF Receptor Death Domain (TRADD) puis le Fas Associated Death Domain (FADD), le TNFR Associated Factor 2 (TRAF2) et le Receptor Interacting Protein (RIP). Les protéines adaptatrices FADD, TRAF2 et RIP vont orienter la réponse soit vers une survie cellulaire avec transcription de gènes soit vers la mort cellulaire par apoptose⁴⁹.

Dans le cas de l'apoptose, le complexe TNF α -TNFR1 avec la protéine adaptatrice TRADD va recruter FADD et permettre l'apoptose en activant la voie des caspases, principalement la caspase 8. La voie des caspases est induite uniquement lorsque la synthèse protéique de la cellule est bloquée, permettant ainsi d'éviter une réponse apoptotique indésirable⁵³.

Lorsque le complexe TNF α -TNFR1-TRADD recrute les protéines TRAF2 et RIP, il active la voie du NF κ B par la destruction de I κ B et la voie des MAP kinases par la phosphorylation de c-jun qui formera un complexe avec c-fos (complexe AP-1). La MAP Kinase p38 intervient également dans la cascade de signalisation en permettant par l'activation de d'autres kinases et l'expression génique. AP-1 et NF κ B sont deux facteurs de transcription qui, une fois transloqués au noyau, assurent la génération de signaux de survie et la synthèse et la sécrétion de protéines de l'inflammation^{49,53,54}.

Il existe une dernière voie mais contrairement aux trois précédentes, elle intervient dans la production de TNF α et non dans la transduction du signal. C'est la voie de la PDE4, elle est présentée dans ce chapitre car potentiellement importante en clinique ; des essais sont en cours dans les maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou la sclérose en plaques. La PDE4 permet l'hydrolyse de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPC) en AMP. Il en résulte une diminution de la Protéine Kinase A et donc de la transcription du gène du TNF α par NF κ B et à terme une inhibition du relargage de la cytokine dans le milieu⁴⁹. Les voies de signalisation du TNF α sont schématisées dans la **figure 12**.

3.6. Implication dans les maladies inflammatoires chroniques

Le TNF α a été impliqué dans nombre de maladies inflammatoires chroniques dont la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (voir partie 4.3.). Les traitements biologiques comme les anticorps monoclonaux ou les récepteurs solubles sont utilisés pour traiter les patients depuis plus de 10 ans maintenant (partie 4.4.) et se concentrent sur le TNF α lui-même, soluble ou membranaire. Actuellement, des essais cliniques avec des petites molécules inhibitrices des voies de transduction ou de production du TNF α sont en cours d'essais chez l'homme (**figure 12**). Elles ciblent particulièrement la TACE, l'enzyme permettant le relargage de la cytokine dans le milieu, la MAP kinase p38 (transduction du signal) ou la PDE4 (production de TNF α)⁴⁹.

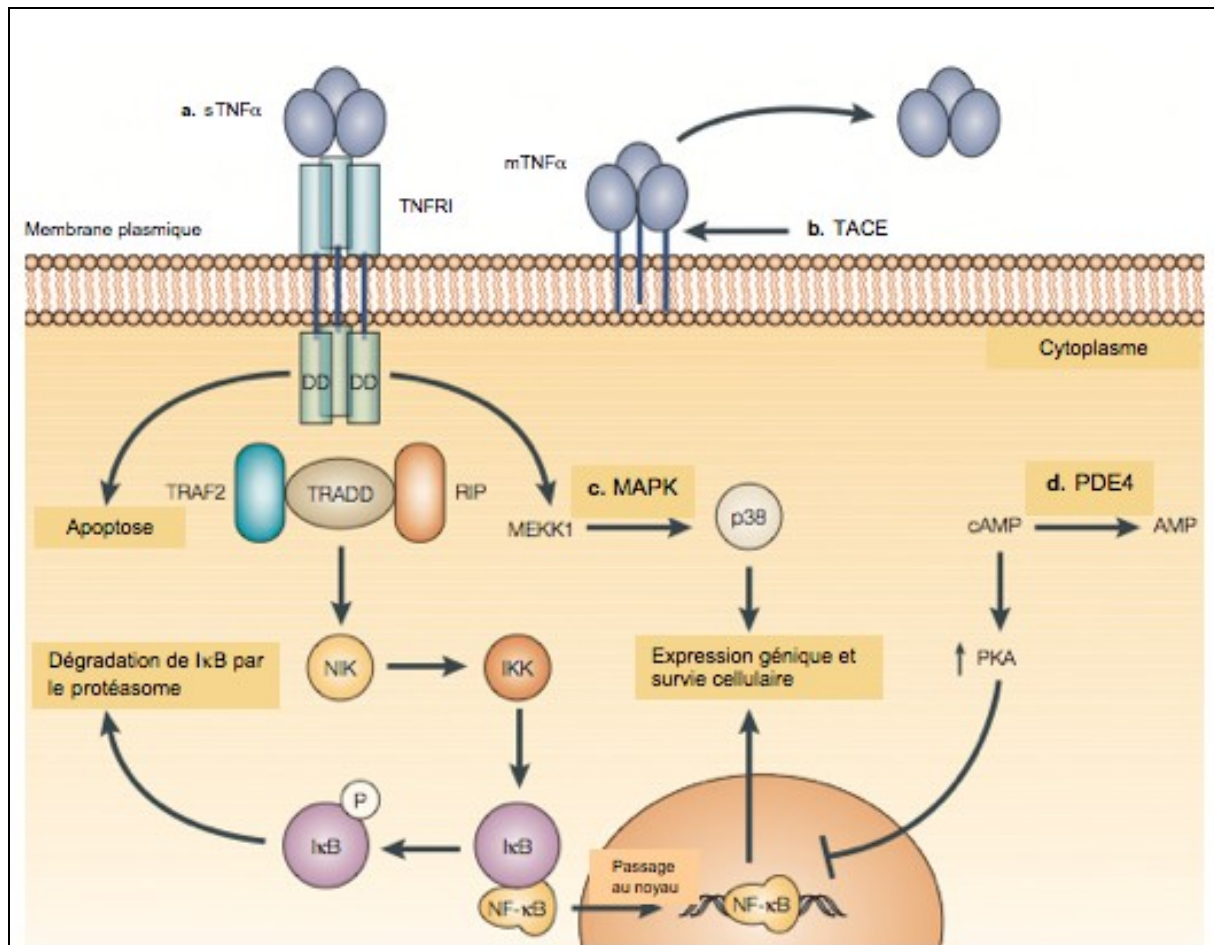


Figure 12 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation du TNF α ainsi que les différents cibles potentielles des inhibiteurs. sTNF α : TNF α soluble ; mTNF α : TNF α membranaire. a : inhibiteur du TNF α soluble, b. : inhibiteur de la TACE, c. : inhibiteur des MAP kinases (p38) et d. : inhibiteur de la PDE4. Adapté de Palladino *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003.

4. Les maladies inflammatoires chroniques

4.1. Historique

La première personne à avoir parlé de maladie auto-immune était Paul Ehrlich. Il a découvert que le système immunitaire était capable de discriminer le Soi du Non Soi c'est-à-dire de rejeter des substances étrangères en conservant intacts les tissus de l'organisme. Il postula que toute anomalie dans cette discrimination pouvait conduire à ce qu'il appelait « horror autotoxicus », une destruction des constituants de l'organisme. Il venait de définir l'autoimmunité. Lorsque le système immunitaire ne fait plus la distinction entre structures autologues et structures étrangères, il s'attaque alors aux constituants de l'organisme.

Les maladies autoimmunes peuvent toucher un nombre de tissus variés. Lorsqu'un organe est atteint, on parle de maladie spécifique d'organe, lorsque plusieurs tissus sont touchés, on parle alors de maladie systémique. Parmi les maladies autoimmunes, on retrouve le diabète insulino-dépendant où les cellules β de Langerhans, productrices d'insuline sont détruites, la polyarthrite rhumatoïde où la membrane synoviale des articulations est touchée ou encore le lupus qui peut affecter la peau, les reins, les poumons ou encore le système nerveux central. Ces maladies touchent entre 5 et 8 % de la population mondiale. Notons également que parmi ces malades, environ 80 % sont des femmes.

La réponse autoimmune est similaire à une réponse immune dirigée contre un antigène exogène. Il y a sélection des lymphocytes T et B reconnaissant l'autoantigène, puis réponse dirigée contre cet autoantigène. Les maladies autoimmunes sont des inflammations chroniques où nous observons une fixation d'autoanticorps (anticorps dirigé contre un autoantigène) sur les tissus et une réaction immune cellulaire.

En fonction des autoantigènes, on distingue différents types de maladies :

- Les maladies dites spécifiques d'organe, avec des autoantigènes provenant d'un organe ou d'un tissu particulier (cellules de la thyroïde, îlots du pancréas)
- Les maladies systémiques, avec des autoantigènes provenant de constituants cellulaires (phospholipides, noyau, ADN). C'est le cas du lupus érythémateux systémique qui peut toucher plusieurs organes (articulations, rein, poumon, cœur)

Les causes de ces maladies sont encore méconnues, cependant, depuis une dizaine d'années, les mécanismes tendent à être mieux compris et plusieurs hypothèses concernant la défaillance des mécanismes de la réponse immunitaire ont vu le jour.

4.2. Pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques

4.2.1. Hypothèses mécanistiques

4.2.1.1 Rupture de tolérance

Les lymphocytes T et B présents dans le thymus et la moelle osseuse respectivement subissent une sélection positive (lymphocytes T) et négative (lymphocytes T et B). Certains lymphocytes vont échapper à cette sélection et rejoindre les organes lymphoïdes secondaires, ils sont appelés lymphocytes autoréactifs car capables de reconnaître des autoantigènes. Ce phénomène est appelé rupture de tolérance centrale.

S'il y a une mauvaise sélection thymique (rupture de tolérance centrale), il existe encore des modes de contrôle au niveau périphérique (tolérance périphérique), qui sont les suivants :

- L'anergie, le lymphocyte ne reçoit pas de deuxième signal d'activation ou signal de costimulation (CD28/B7), il devient alors inactif.
- La délétion clonale en périphérie, les lymphocytes autoréactifs rencontrant leur autoantigène vont être simultanément activés. Il y a alors une réaction d'ACID pour Antigen Induced Cell Death. Les lymphocytes autoréactifs vont mourir par l'intervention du couple Fas/FasL, récepteur de mort.
- L'intervention des lymphocytes T régulateurs par le biais de la protéine membranaire CTLA-4 ou la production d'IL-10 et/ou de Transforming Growth Factor (TGF β), cytokines anti-inflammatoires.
- L'ignorance, un lymphocyte autoréactif peut ne jamais rencontrer son autoantigène car ils ne se trouvent pas dans le même compartiment ; c'est le cas de l'œil par exemple.
-

Pour les lymphocytes B, il existe un phénomène de délétion périphérique et d'anergie.

Les défaillances au niveau de la tolérance périphérique sont appelées rupture de tolérance périphérique.

Les preuves, impliquant les lymphocytes T dans l'apparition des maladies autoimmunes, sont apparues lors d'expériences effectuées sur des rats. L'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE, modèle pour la sclérose en plaques) chez le rat peut être induite par injection de lymphocytes T activés provenant des ganglions lymphatiques de rat déjà malade⁵⁵. Cette expérience montre que les lymphocytes T (et on peut supposer son TCR) sont impliqués dans la maladie. Le TCR se liant au CMH, un individu souffrant d'autoimmunité doit posséder un complexe TCR/CMH capable de reconnaître des autoantigènes.

4.2.1.2 Cas des antigènes séquestrés et cryptiques

Il existe plusieurs hypothèses conduisant à la rupture de la tolérance naturelle. Citons par exemple les antigènes séquestrés, des antigènes sont ignorés car, anatomiquement, ils ne sont pas en contact avec les lymphocytes lors de leur maturation thymique. C'est le cas de l'œil, les antigènes du cristallin sont dans un compartiment préservé. Cependant, lors d'une blessure à l'œil, des antigènes peuvent passer dans le sang. Ils vont être pris en charge par les CPAg d'où une activation des lymphocytes T spécifiques de ces antigènes et des lymphocytes B. Il y aura apparition d'une réaction immunitaire au niveau de l'œil atteint mais également au niveau de l'œil sain.

Certains antigènes ne sont pas présentés lors de la sélection négative aux lymphocytes T du fait de leur localisation au sein de la protéine. Cependant, lors d'une réaction inflammatoire, ces peptides appelés antigènes cryptiques peuvent potentiellement être apprêtés d'où une activation des lymphocytes non tolérants.

Les antigènes séquestrés et cryptiques conduisent à l'activation de cellules autoréactives ignorantes, cellules qui, en conditions normales, ne rencontrent pas l'antigène (**figure 13**).

4.2.1.3 Mimétisme moléculaire

Les maladies autoimmunes peuvent apparaître après une infection. Une hypothèse a été proposée par Michael Oldstone en 1987⁵⁶, certaines régions protéiques des virus partagent des épitopes communs avec des protéines du Soi. C'est le cas par exemple de la protéine basique de la myéline, un peptide de cette protéine partage des acides aminés en commun avec un peptide de la protéine P3 du virus de la rougeole ou de l'adénovirus de type 2⁵⁷. Lors d'une infection par ce virus, l'organisme va produire des anticorps dirigés contre la protéine P3, ceux-ci pourront crossréagir avec la protéine basique de la myéline, on peut alors observer une apparition de lésions de la myéline d'où les symptômes de la sclérose en plaques. Ce phénomène, appelé mimétisme moléculaire, pourrait être à l'origine de l'apparition de maladies autoimmunes (**figure 13 et tableau 1**).

| Protéine | Position du 1 ^{er} résidu | Séquence |
|-------------------------------------|------------------------------------|-------------|
| Cytomégalo virus humain | 79 | PDPLGRPDED |
| Molécule HLA-DR | 60 | VTELGRPDAE |
| Papillomavirus | 76 | SLHLES LKDS |
| Récepteur à l'insuline | 66 | VYGLES LKDL |
| Nitrogénase de <i>K. pneumoniae</i> | 186 | SRQTDREDE |
| Molécule HLA-B27 | 70 | KAQTDREDL |
| Protéine P3 de la rougeole | 31 | EISDNLGQE |
| Protéine basique de la myéline | 61 | EISFKLGQE |

Tableau 1 : Tableau illustrant le mimétisme moléculaire entre des protéines humaines et virales ou bactériennes. Les acides aminés communs sont en rouge. Adapté de Oldstone, *Cell*, 1987.

4.2.1.4 Expression inappropriée du CMH

L'apparition de maladie auto-immune pourrait également être due à une expression inappropriée de CMH de classe II à la surface de cellules qui ne l'expriment normalement pas. C'est le cas par exemple des cellules β du pancréas chez la souris Non Obese Diabetes (NOD). Ces souris expriment la molécule de CMH de classe II à la surface des îlots pancréatiques et l'expression est augmentée au cours de la maladie⁵⁸. L'expression de CMH de classe II à la surface de ces cellules non présentatrices d'antigènes pourraient conduire à une activation inappropriée des lymphocytes T_H avec pour finalité un diabète dû à la destruction des îlots pancréatiques (**figure 13**).

4.2.1.5 Activation polyclonale des lymphocytes B

Enfin, l'apparition de maladies auto-immunes pourrait être due à une activation polyclonale non spécifique des lymphocytes B avec production d'immunoglobulines M (IgM). Certains virus comme l'Epstein Barr Virus (EBV, responsable de la mononucléose) ou des bactéries gram-négatives ont la capacité d'induire la prolifération de clones B sans l'intervention des lymphocytes T_H. Si les lymphocytes B activés sont autoréactifs, il y aura alors production d'autoanticorps responsables de lésions (**figure 13**).

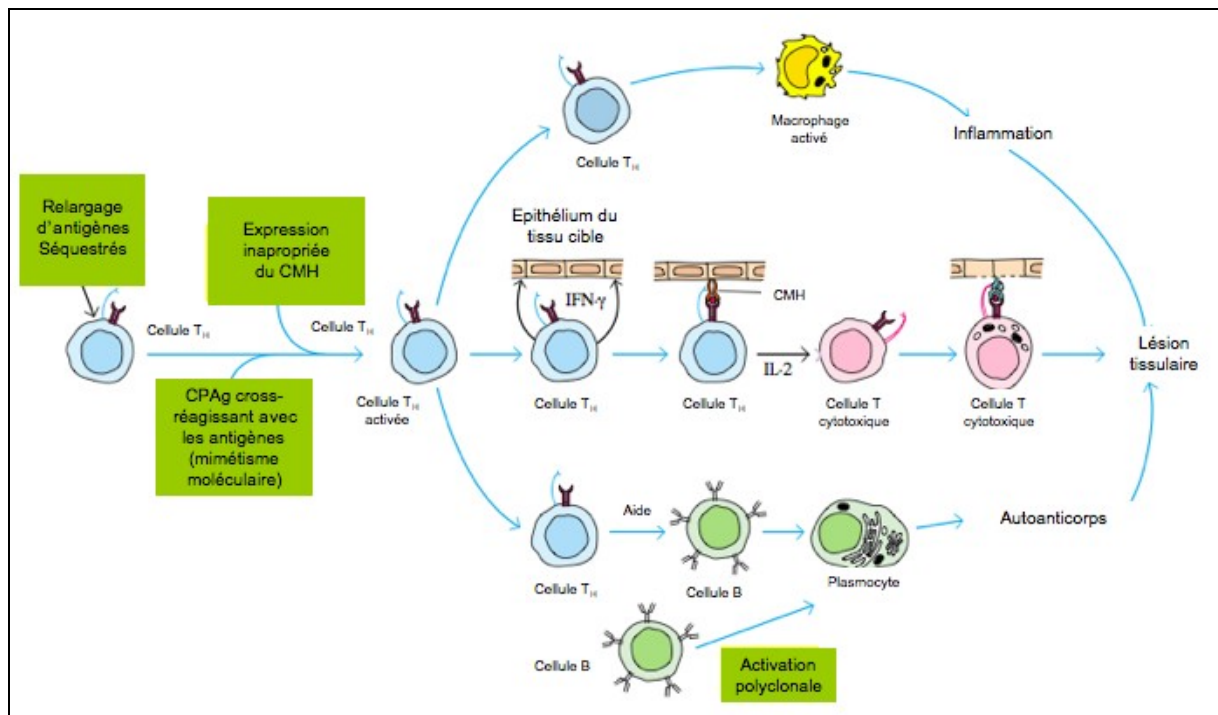


Figure 13 : Schéma récapitulatif des différents hypothèses pouvant conduire à des phénomènes d'autoimmunité. On y retrouve les antigènes séquestrés, le mimétisme moléculaire, l'expression inappropriée du CMH et l'activation polyclonale. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008.

4.2.2. Causes possibles

Les hypothèses (mimétisme moléculaire, antigènes cryptiques, rupture de tolérance centrale et périphérique) conduisant à l'apparition de maladies autoimmunes ont été décrites plus haut. Cependant, ces différents mécanismes ne peuvent être mis en œuvre seulement si le complexe CMH/TCR est capable de reconnaître un autoantigène. Plusieurs gènes de susceptibilité pour différentes maladies autoimmunes ont été mis en évidence grâce notamment aux taux de concordance entre jumeaux monozygotes et dizygotes. Ils concernent les gènes codant pour les CMH de classe I et II, les TLR ou les récepteurs de cytokines. Par exemple, l'allèle HLA-B27 du gène codant pour le CMH de classe I est retrouvé chez les patients souffrant de spondylarthrite ankylosante⁵⁹. De la même façon, l'allèle HLA-DR4 du gène codant pour le CMH de classe II augmente la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde⁶⁰. Et enfin, des études d'association (Genome-Wide Association Study : GWAS) ont identifié des variants du gène codant pour le récepteur à l'IL-23 (IL-23R) comme facteur de risque dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, maladies regroupant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique⁶¹. Cependant, ce ne sont que des

prédispositions génétiques, un individu portant ces allèles ne souffrira pas forcément de maladies autoimmunes.

Il est important de noter que sur la totalité des patients souffrant de maladies autoimmunes, 80% environ sont des femmes. Des études ont montré que les hormones sexuelles ainsi que les traitements hormonaux étaient impliqués dans l'activité de la maladie. De même, les grossesses peuvent déclencher des poussées⁶² ; c'est le cas du lupus érythémateux systémique) ou alors améliorer les symptômes de la maladie⁶³ ; c'est le cas de la sclérose en plaques).

La susceptibilité aux maladies autoimmunes vient d'une part d'un terrain génétique propice et d'autre part de facteurs environnementaux favorisant l'apparition de la maladie. Par mimétisme moléculaire, certaines infections peuvent déclencher l'apparition de symptômes chez un individu ayant un terrain favorable. Il a été montré également que les rayons ultra-violets ainsi que certains métaux étaient capables d'exacerber le lupus érythémateux systémique. De même certains médicaments provoquent un lupus-like syndrome, les symptômes disparaissant lors de l'arrêt du médicament⁶⁴.

4.3. Exemples de maladies autoimmunes

Je ne présente ici que les maladies sur lesquelles notre équipe a travaillé et pour lesquelles un modèle murin d'étude expérimentale est disponible au laboratoire ou en collaboration.

4.3.1. La polyarthrite rhumatoïde

4.3.1.1 Description de la pathologie

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique touchant 0,5 à 1% de la population. En France, la prévalence est estimée à 0,4 - 0,8% de la population. Comme la majorité des maladies autoimmunes, trois personnes atteintes sur quatre sont des femmes. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie systémique caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale des articulations avec un épanchement synovial, une déformation de l'articulation et à terme une destruction s'accompagnant de gonflement et de douleur. Dans des cas plus rares, des formes extra-articulaires peuvent apparaître avec une atteinte des poumons, du système nerveux et apparition de nodules sous-cutanés.

L'inflammation de la membrane synoviale conduit à une multiplication anormale des synoviocytes d'où la formation d'un pannus et l'érosion progressive des os et du cartilage de l'articulation, pouvant nécessiter des prothèses. L'articulation inflammée est également caractérisée par une importante vascularisation. La maladie peut toucher toutes les articulations du corps comme les mains, les poignets, les coudes, les genoux ou les mâchoires. C'est une maladie à forte morbidité pouvant conduire à l'arrêt de l'activité professionnelle et à une diminution de l'espérance de vie.

Les critères diagnostiques de la maladie ont été définis en 1987 par l'American College of Rheumatology (ACR) et modifiés en 2010 par l'ACR et l'European League Against Rheumatism (EULAR)⁶⁵. Ils sont basés sur l'atteinte articulaire, la durée des symptômes articulaires et la sérologie des patients avec la présence du facteur rhumatoïde (IgM dirigés contre les IgG) ou des anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP)⁶⁵.

Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans l'apparition de la polyarthrite rhumatoïde. Parmi eux, on retrouve :

- les facteurs génétiques de susceptibilité comme HLA-DR4.
- les hormones avec une majorité de femmes atteintes.
- l'environnement avec les infections bactériennes et virales.

4.3.1.2 Mécanismes et rôle des cytokines

Une articulation de patient atteint de polyarthrite rhumatoïde va subir des changements histologiques : l'inflammation chronique de la membrane synoviale va conduire à la formation d'un tissu synovial invasif, le pannus, qui va peu à peu éroder les os et le cartilage et une augmentation de la vascularisation facilitant l'arrivée des cellules mononuclées (lymphocytes, macrophages, neutrophiles), capables de produire des cytokines participant à l'inflammation et à la dégradation de l'articulation.

L'IL-1 et le TNF α sont deux cytokines proinflammatoires intervenant précocement dans la réaction immunitaire. L'IL-1, produite par les monocytes infiltrant l'articulation, participe à la dégradation du cartilage⁶⁶ et de forts taux de cette cytokine ont été retrouvés dans les articulations des patients⁶⁷. Le TNF α , quant à lui, permet la production de prostaglandines E2 et de métalloprotéases par les synoviocytes⁶⁸, entraînant une inflammation et à terme la

destruction de l'articulation par la dégradation du cartilage. Le TNF α est produit par les cellules immunitaires présentes dans l'articulation. Il permet également la production de CCL20 par les synoviocytes, chimiokine dont le récepteur, CCR6, est exprimé à la surface des T_H17⁶⁹, permettant le recrutement de ces cellules sur le lieu d'inflammation.

De plus, le TNF α permet la production d'IL-1 par les synoviocytes. L'IL-1 peut alors agir en synergie avec RANKL pour permettre la survie et l'activation des ostéoclastes, cellules induisant la destruction de l'articulation⁷⁰.

Des inhibiteurs de l'IL-1 et du TNF α sont utilisés en clinique dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

Parmi les cellules infiltrant l'articulation, des lymphocytes T activés sont présents.

L'antigène (bactérien ou viral) ou l'autoantigène permettant la réaction inflammatoire est inconnu. Les lymphocytes présents dans l'articulation sont des lymphocytes T_H1 (produisant TNF α et IFN γ) et T_H17 (produisant IL-17). À l'origine, la polyarthrite rhumatoïde était perçue comme une pathologie T_H1, impliquant des lymphocytes T producteurs d'IFN γ , cette cytokine étant retrouvée dans le sang et les articulations des patients⁷¹. Plus tard, l'IFN γ a été montré comme permettant la production de prostaglandine E2 par les synoviocytes⁷². Chez la souris, dans un modèle d'arthrite expérimentale au collagène, l'injection d'IL-12 permet le développement de la maladie avec l'apparition de lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IFN γ ⁷³ ; l'IL-12 étant une cytokine inductrice de la voie T_H1.

Cependant, des souris déficientes pour l'IL-12p35, une des sous-unités spécifique de l'IL-12 présentent une aggravation des symptômes dans un modèle d'arthrite au collagène. L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique, composée de l'IL-12p40 et de l'IL-12p35. L'IL-12p40 est commune à l'IL-12 et l'IL-23. Il a alors été montré que l'IL-23 plutôt que l'IL-12 intervenait dans la pathogenèse de l'arthrite au collagène⁷⁴ ; l'IL-23 étant une cytokine à l'origine de la différenciation des lymphocytes T_H17 chez l'homme et au maintien de la population T_H17 chez la souris. Les lymphocytes T_H17 produisent de l'IL-17, promoteur de l'ostéoclastogenèse au niveau de l'articulation⁷⁵. L'IL-17 contribue à l'inflammation en permettant la production d'IL-6 par les synoviocytes.

L'IL-6 permet la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps. Conjointement avec le TGF β , il permet la différenciation des cellules T_H17 chez la souris⁷⁶.

L'IL-6 est présente en quantité excessive dans les articulations des patients⁷⁷ et joue un rôle majeur dans l'arthrite idiopathique juvénile⁷⁸. Un anticorps contre le récepteur, le tocilizumab est utilisé en seconde ligne de traitement chez les patients réfractaires aux anti-TNF α et chez les patients souffrant d'arthrite juvénile dont la corticothérapie a échoué.

4.3.1.3 Traitement conventionnels

En parallèle d'une composante médicamenteuse, il faut du repos et ménager les articulations.

Les traitements dans la polyarthrite rhumatoïde ont pour but de soulager les douleurs et de ralentir ou arrêter la progression de la maladie.

Il y a quelques années, les traitements se constituaient d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme le paracétamol ou l'ibuprofène. On traitait d'abord l'inflammation permettant la réduction des douleurs et des gonflements articulaires. Ensuite étaient rajoutés des anti-inflammatoires stéroïdiens de type corticoïdes comme la prednisone et enfin des médicaments antirhumatiques modifiant le cours de la maladie (DMARD : Disease Modifying Antirheumatic Drug) comme les anti-malariques ou le methotrexate qui ralentissent voire arrêtent la progression de la maladie.

De nos jours, l'utilisation d'un DMARD dès le début du traitement est préconisée en combinaison avec des analgésiques permettant de réduire les douleurs non soulagées.

Les DMARDs ont un certain nombre d'effets secondaires. Les anti-malariques comme l'hydroxychloroquine est utilisé lors de polyarthrite peu agressive, mais peut provoquer à long terme des rétinopathies potentiellement irréversibles.

Le traitement le plus utilisé aujourd'hui est le methotrexate. Il existe des effets secondaires non négligeables cependant le ratio bénéfice/risque est en faveur de son utilisation.

Depuis plus de 10 ans maintenant, en cas de non-réponse ou de réponse insuffisante aux traitements ci-dessus, des inhibiteurs du TNF α peuvent être utilisés en association avec le methotrexate. À ces traitements viennent s'ajouter un anti-IL-1 et un anti-IL-6 récepteur.

4.3.2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

4.3.2.1 Description de la pathologie

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn ainsi que la rectocolite hémorragique. Environ 100 000 personnes sont touchées par ces maladies en France (40 000 pour la rectocolite hémorragique et 60 000 pour la maladie de Crohn). Bien que les maladies semblent similaires dans les symptômes, les lésions lors des examens cliniques apparaissent différentes. Ainsi, la rectocolite hémorragique ne touche que le colon avec plus ou moins d'étendue selon la gravité, la maladie de Crohn pouvant toucher l'ensemble du tractus digestif. Les MICI sont caractérisées par des douleurs abdominales, des diarrhées abondantes et fréquentes et dans le cas de la rectocolite hémorragique sanglantes pouvant entraîner des hémorragies. On observe des lésions au niveau du colon pouvant conduire à des abcès ou des fistules. Les maladies évoluent par poussées (crises) entrecoupées d'accalmie avec disparition des symptômes. Chez certains patients, des manifestations extra-digestives peuvent apparaître avec notamment des douleurs articulaires, un érythème ou des uvéites (inflammation de l'œil). Les critères diagnostiques sont différents suivant le type de MICI. Pour la rectocolite hémorragique, le nombre de selles par jour, la température ou la fréquence cardiaque sont à prendre en compte suivant les critères de Truelove et Witts⁷⁹. En ce qui concerne la maladie de Crohn, les critères sont regroupés dans l'indice de Best et prennent en compte le nombre de selles par jour ou les douleurs abdominales⁸⁰.

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la maladie :

- Les facteurs génétiques comme les mutations sur le gène NOD2, la protéine issue de ce gène, CARD15 est un récepteur cytosolique des macrophages⁸¹. Les mutations entraînent une augmentation de la réponse inflammatoire face aux bactéries commensales pour lesquelles l'individu est normalement tolérant^{82,83}.
- Les variants génétiques de l'IL-23 récepteur ont été montrés comme facteur de susceptibilité dans les MICI⁶¹.
- Les agents infectieux avec comme cité plus haut la flore bactérienne endogène ou des agents infectieux exogènes.

4.3.2.2 Mécanismes et rôle des cytokines

Au cours de la maladie, il existe une hyperactivation du système immunitaire au niveau de l'intestin. Le dysfonctionnement immunitaire a été montré par la présence de macrophages dans la paroi intestinale des patients⁸⁴. Ces macrophages sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1, ou l'IL-6⁸⁵. De plus, les taux de TNF α sont augmentés dans le sang des patients souffrant de MICI⁸⁶. Ces données suggèrent un rôle pathologique de TNF α dans les MICI, la perte de contrôle des taux de TNF α entraînant une réaction inflammatoire avec la production de médiateurs de l'inflammation qui fragilisent la barrière intestinale. De plus, les traitements anti-TNF α comme les anticorps monoclonaux (mais pas les récepteurs solubles) ont prouvé leur efficacité depuis plus de 10 ans maintenant.

Comme pour la polyarthrite rhumatoïde, on pensait que les lymphocytes T_H1, induit par l'IL-12 et produisant de l'IFN γ , étaient impliqués dans la pathogenèse de la maladie. En effet, les monocytes intestinaux de la *lamina propria* surexpriment l'IL-12⁸². Un déséquilibre des populations lymphocytaires en faveur de la population T_H1 dans les muqueuses des patients a été également observé⁸⁷.

Cependant, une population de lymphocytes T_H produisant de l'IL-17 a été découverte. Chez l'homme, l'IL-23 permet la différenciation et l'amplification de cette population. Chez la souris, l'injection d'IL-23 provoque une inflammation systémique sévère touchant plusieurs organes ainsi que la muqueuse intestinale⁸⁸. Les ARN messagers de l'IL-23p19, sous-unité de l'IL-23, sont surexprimés dans les muqueuses des patients⁸⁹ et des taux élevés d'IL-17 sont présents dans le sérum et la muqueuse intestinale⁹⁰. Cependant des essais cliniques effectués avec un anti-IL-17 ont montré que le blocage de cette cytokine était inefficace dans le cas de la maladie de Crohn⁹¹.

4.3.2.3 Traitements conventionnels

Les traitements ont pour but de contrôler l'inflammation intestinale, de pallier aux douleurs abdominales ainsi que les diarrhées et les hémorragies. Il faut également éviter les carences et adopter un régime équilibré qui peut être légèrement modifié en cas de poussées

(diminution des fruits et légumes). Les traitements sont prescrits en fonction du caractère de la poussée, de la localisation de la maladie et des différentes complications.

Des traitements symptomatiques comme des antalgiques, des anti-spasmodiques et des anti-diarrhéiques peuvent être utiles.

Pour une poussée légère, il est prescrit des aminosalicylés qui ont un rôle anti-inflammatoire sur la muqueuse intestinale.

En cas de poussée légère à modérée, une corticothérapie est prescrite comme la prednisone. Cependant, après passage de la poussée, la posologie doit être diminuée pour éviter tout effet secondaire.

En cas de cortico-dépendance (rechute quasi immédiate après l'arrêt de la corticothérapie), de cortico-résistance ou de formes fistulisées, il est prescrit un immunomodulateur de type methotrexate.

Depuis 1999, les anticorps anti-TNF α sont utilisés chez les patients dont les traitements par les corticoïdes et/ou les immunomodulateurs de type methotrexate ont échoué, ne sont pas assez efficaces ou mal tolérés.

En cas d'échec des précédents traitements, il peut être proposé une chirurgie consistant en l'ablation des lésions inflammatoires dans le cas de la maladie de Crohn ou d'une partie ou la totalité du colon dans la rectocolite hémorragique.

4.3.3. Psoriasis

4.3.3.1 Description de la maladie

Le psoriasis est une atteinte de la peau qui touche environ 2% de la population mondiale. Il existe plusieurs types de psoriasis :

- Le psoriasis en plaques (ou vulgaire, le plus courant, 90% des patients) caractérisé par des grandes plaques desquamantes (de 2 à 30 centimètres) au niveau des coudes, genoux, lombaires ou cuir chevelu.
- Le psoriasis en gouttes caractérisé par des petites lésions d'environ 1 cm.
- Le psoriasis érythrodermique caractérisé par une atteinte de toute la surface du corps
- Le psoriasis des plis caractérisé par des atteintes au niveau des plis fessiers ou sous-mammaires.
- Le psoriasis pustuleux caractérisé par l'apparition en général de pustules (pus aseptique) au niveau des mains et des pieds.

- L'arthrite psoriasique caractérisée par des douleurs articulaires soit au niveau du dos et du cou (axial) soit au niveau des mains, des pieds (périphérique). Parmi les patients souffrant de psoriasis en plaques, 30% développent de l'arthrite psoriasique .

Outre son aspect inesthétique, le psoriasis peut être très invalidant dans le cas de rhumatismes associés à des démangeaisons.

Au niveau des plaques, on observe l'apparition de lésions desquamantes. La maladie évolue par poussées entrecoupées de périodes de rémission où on observe une disparition des lésions, pouvant aller jusqu'à plusieurs années. Le psoriasis est caractérisé par un renouvellement trop rapide de l'épiderme, il y a alors accumulation de cellules au niveau de la peau et formation de plaques. À l'histologie, les lésions sont caractérisées par une hyperkératose (hyperplasie de la couche cornée), une hyperacanthose (persistance de la couche cornée), la présence de neutrophiles et une augmentation de la vascularisation.

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la maladie :

- Les facteurs génétiques comme l'allèle HLA-C⁹², l'IL-23 ou encore des régulateurs de NF-κB⁹³
- Les facteurs environnementaux : certains médicaments peuvent exacerber le psoriasis, le stress est un facteur déclenchant de poussées.

4.3.3.2 Mécanismes et rôles des cytokines

Au cours de la maladie, il existe une hyperactivation du système immunitaire. La peau est infiltrée par des lymphocytes T, des neutrophiles et des macrophages⁹⁴. L'acteur majeur dans le psoriasis est le kératinocyte. Les kératinocytes de patients participent activement à l'inflammation en relarguant dans le milieu des cytokines proinflammatoires comme l'IL-1⁹⁵, l'IL-6⁹⁶ ou des chimiokines comme l'IL-8⁹⁷ permettant l'attraction des cellules immunitaires sur le lieu de l'inflammation. Ils expriment également des molécules d'adhésion comme ICAM (Intracellular Adhesion Molecule) permettant l'extravasation des lymphocytes et le CMH de classe II de façon aberrante⁹⁸. L'expression de ces différentes molécules dans le milieu et à la surface des kératinocytes est induite par le TNFα et l'IFNγ⁹⁸.

Une des premières cytokines à avoir été étudiée est l'IL-8. L'IL-8 est une chimiokine permettant l'attraction des neutrophiles et des lymphocytes T au niveau du lieu d'inflammation. Elle est surexprimée au niveau des lésions⁹⁹ et dans le sang des patients¹⁰⁰ ainsi que son récepteur l'IL-8 récepteur. La production d'IL-8 est stimulée par le TNFα⁹⁷,

l'IL-1, l'IFN γ ⁹⁷ et l'IL-17¹⁰¹. Cette chimiokine représentait un intérêt important, cependant les essais cliniques avec un anticorps anti-IL-8 se sont révélés infructueux.

L'IFN γ apparaît comme une cytokine intéressante car elle permet l'expression aberrante du CMH de classe II et de ICAM⁹⁸. De plus, l'IFN γ est produit par les lymphocytes T_H1, population cellulaire ayant été impliquée dans nombre de maladies autoimmunes. Cependant les essais de neutralisation de cette cytokine par un anticorps monoclonal (fontolizumab) ont été arrêtés.

Le TNF α est également une cible prépondérante dans cette maladie. Le TNF α en association avec l'IFN γ permet l'expression du CMH de classe II et de ICAM. Il permet également la sécrétion par les kératinocytes de cytokines proinflammatoires ou attractantes comme l'IL-6, l'IL-1¹⁰² et l'IL-8^{97,103}. Les taux de TNF α chez les patients sont corrélés avec la sévérité de la maladie. De plus, les anti-TNF α sont utilisés en clinique pour traiter les patients depuis plus de dix ans.

L'IL-17 est une cytokine proinflammatoire permettant la production d'IL-8 par les kératinocytes. L'IL-17 est produite par les lymphocytes T_H17, population cellulaire dont le rôle dans les maladies autoimmunes a été montré comme important. L'IL-17, comme le TNF α stimule la production de CCL20¹⁰⁴, chimiokine permettant le recrutement de lymphocytes T_H17 sur le lieu d'inflammation¹⁰⁴. L'IL-23 est une des cytokines permettant la différenciation et l'amplification des T_H17 chez l'homme. Cette cytokine est produite par les macrophages et partage une de ces sous-unités avec l'IL-12, la sous-unité p40. Cette cytokine est retrouvée à des taux élevés chez les patients souffrant de psoriasis et des injections intradermales d'IL-23 chez la souris provoque une hyperkératose et une hyperacanthose¹⁰⁵. Depuis 2009, un anticorps anti-IL12/IL23p40, l'Ustekinumab, est commercialisé dans le traitement du psoriasis.

4.3.3.3 Traitements conventionnels

Les traitements contre le psoriasis dépendent de l'étendue des lésions sur la peau. Pour des plaques localisées, des traitements locaux comme des crèmes et des lotions à base de corticoïdes et d'acide salicylique. La consommation de corticoïdes ne doit pas être excessive sous peine d'épuisement thérapeutique et d'éventuels effets secondaires.

En cas de plaques étendues, on préférera le PUVAthérapie associée au psoralène. Cette technique consiste à exposer le patient à des rayons ultra-violet A en association avec un médicament photosensibilisant, le psoralène. Cependant, il faut être vigilant par rapport aux risques de cancer cutané.

Pour les psoriasis les plus graves ou résistants aux traitements ci-dessus des immunosuppresseurs comme le methotrexate peuvent être prescrits.

En cas d'échec ou d'effets modérés des immunomodulateurs ou de contre-indication, des anticorps anti-TNF α ou anti-IL12/IL23p40 peuvent être prescrits.

4.4. Traitements anti-cytokines commercialisés dans les maladies inflammatoires chroniques

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les cytokines pouvaient être associées aux symptômes d'une maladie inflammatoire chronique. En effet, bien que la surexpression d'une cytokine particulière puisse être un marqueur de l'avancée de la maladie, certaines cytokines, et parmi elles le TNF α , l'IL-1, l'IL-6 ou encore l'IL-23 participent activement à l'inflammation chronique en permettant la destruction de tissus par la synthèse de metalloprotéases ou en favorisant l'expansion de populations cellulaires pathogéniques. Le défi était alors de rétablir l'homéostasie cytokinique en limitant l'activité des cytokines impliquées dans les maladies, en ciblant une cytokine particulière.

4.4.1. Les anticorps monoclonaux anti-cytokines

Dans les années 1990, les chercheurs ont validé le concept d'immunomodulation de cytokines grâce à des anticorps monoclonaux, dans les maladies inflammatoires chroniques sur des modèles animaux. L'effet ayant été prometteur, des essais sur l'Homme ont été entrepris qui ont permis la commercialisation de ces anticorps monoclonaux à la fin des années 1990. Ces thérapies sont utilisées chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou encore le psoriasis. La stratégie d'injection d'anticorps monoclonaux est nommée immunisation passive.

Les anticorps monoclonaux présentés sont dirigés contre des cytokines dont nous faisons l'étude au laboratoire c'est-à-dire : le TNF α , l'IL-23, l'IL-1 et l'IL-6.

4.4.1.1 Les anti-TNF α

➤ Infiximab : commercialisé sous le nom de Remicade®

Les premiers essais de neutralisation du TNF α chez l'animal ont débuté dans les années 1990. Plusieurs équipes ont montré que la modulation du TNF α améliorait les symptômes de différentes maladies inflammatoires chroniques. Par exemple, en 1991, Selmaj *et al.* ont montré que la thérapie anti-TNF α abrogeait la démyélinisation dans un modèle d'EAE, obtenu par transfert adoptif de lymphocytes T sensibilisés à la Myelin Binding Protein (MBP)¹⁰⁶. Peu de temps après, une équipe a montré que des anticorps anti-TNF α dans un modèle d'arthrite au collagène améliorait les scores cliniques et histologiques chez des souris¹⁰⁷. En 1997, deux équipes ont montré l'efficacité de cette thérapie dans deux modèles de maladies inflammatoires intestinales^{108,109}. Ces exemples montrent l'intérêt que le TNF α peut avoir dans le traitement de ces maladies autoimmunes. Parallèlement à ces découvertes, des essais cliniques avaient été entrepris avec des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde¹¹⁰ et de la maladie de Crohn¹¹¹ avec des effets bénéfiques chez les patients dans les deux cas. D'autres essais cliniques ont alors été effectués aboutissant à la commercialisation en 1999, d'un anticorps monoclonal appelé infliximab d'abord dans la polyarthrite rhumatoïde puis dans la maladie de Crohn. Suivant la Haute Autorité de Santé, l'infliximab peut être utilisé chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, de la maladie de Crohn, de la rectocolite hémorragique, du psoriasis en plaques, de l'arthrite psoriasique et de la spondylarthrite ankylosante. La posologie est de 3-5 mg/kg en injection intraveineuse avec un renouvellement à la semaine 2 puis 6 et ensuite toutes les huit semaines. L'infliximab est un anticorps IgG chimérique, humain à 75%, le reste de la protéine étant d'origine murine. L'origine murine partielle a provoqué une perte d'efficacité du traitement chez certains patients, du fait de l'apparition d'anticorps anti-infliximab. Des anticorps anti-TNF α totalement humanisés ont alors vu le jour.

➤ Adalimumab : commercialisé sous le nom de Humira®

L'adalimumab est un anticorps monoclonal IgG1 entièrement humanisé ayant pour cible le TNF α . Il a été commercialisé en France en 2003 pour la polyarthrite rhumatoïde. Désormais, il est utilisé dans l'arthrite juvénile idiopathique, l'arthrite psoriasique, la maladie de Crohn, le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante. La posologie est généralement de 40 mg en injection sous-cutanée toutes les deux semaines.

➤ Etanercept : commercialisé sous le nom de Enbrel®

L'Etanercept est une protéine fusion composée de la portion extracellulaire du récepteur RII du TNF α (TNFRII) et du fragment Fc d'une IgG1. L'Etanercept est un récepteur soluble permettant la neutralisation du TNF α . Il a été commercialisé en France en 2002 puis en 2005 et 2006 sous d'autres formes d'injection. L'Etanercept est utilisé comme traitement dans la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite juvénile idiopathique, l'arthrite psoriatique, le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante. Il n'est pas utilisé dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin car son action est plus faible que celle observée avec les anticorps anti-TNF α . Cette différence d'efficacité peut être expliquée par le fait que l'Etanercept ne provoque pas l'apoptose des lymphocytes intraépithéliaux (de la *lamina propria*) exprimant le TNF α membranaire, contrairement aux anticorps monoclonaux anti-TNF α ¹¹². L'Etanercept ne ciblerait que le TNF α soluble. La posologie usuelle est de 50 mg par semaine en injection sous-cutanée.

➤ Certolizumab pegol : commercialisé sous le nom de Cimzia®

Le Certolizumab pegol est un anticorps monoclonal humanisé ; plus précisément, c'est un fragment Fab pegylé (polyéthylène glycol) d'un anticorps monoclonal. Il a pour cible le TNF α . Le Certolizumab pegol est commercialisé en France depuis 2009 et est utilisé dans la polyarthrite rhumatoïde contrairement aux Etats-Unis où il est également autorisé pour la maladie de Crohn. Son efficacité a été montrée dans deux essais cliniques de phase III : RAPID I¹¹³ et RAPID II¹¹⁴. La posologie habituelle est de 400 mg en injection sous-cutanée aux semaines 0, 2 et 4 puis 200 mg toutes les deux semaines. L'intérêt du Certolizumab est sa conjugaison avec le polyéthylène glycol, permettant une élimination plus lente, permettant un espacement des injections.

➤ Golimumab : commercialisé sous le nom de Simponi®

Le Golimumab est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1. Il a pour cible le TNF α . Le Golimumab a été commercialisé en 2009 en France et est utilisé dans la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, l'arthrite psoriatique. Son efficacité a été démontrée dans plusieurs essais cliniques nommés GO-BEFORE¹¹⁵, GO-FORWARD¹¹⁶ et GO-AFTER^{117,118}. La posologie habituelle est d'une injection sous-cutanée de 50 mg, une fois par mois.

Le Golimumab comme le Certolizumab n'est pas autorisé en France pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Efficacité des anti-TNF α

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les analgésiques, les corticostéroïdes ainsi que les DMARDs comme l'hydroxychloroquine ou le methotrexate sont les traitements de première intention dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques. Cependant dans les cas de poussées sévères ou résistantes aux traitements cités ci-dessus, il peut être prescrit des anti-TNF α de type anticorps monoclonal ou récepteur soluble.

Les différents essais cliniques effectués avec l'infliximab, l'adalimumab et l'etanercept ont montré une bonne efficacité de ces traitements chez les patients présentant une polyarthrite rhumatoïde sévère et résistante. De bons résultats ont été obtenus également dans le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante¹¹⁹. Concernant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, seuls l'infliximab et l'adalimumab sont autorisés et ont une bonne efficacité de traitement ; l'etanercept n'étant pas utilisé dans ces maladies de l'intestin car il est faiblement efficace contrairement aux anticorps monoclonaux.

Effets secondaires des anti-TNF α

L'innocuité des thérapies anti-TNF α a été étudiée. Le TNF α ayant un rôle primordial dans les infections, il a été montré que les patients sous thérapie anti-TNF α souffraient plus d'infections que les patients contrôles. En revanche, les infections sérieuses nécessitant une hospitalisation et une prise d'antibiotiques de type IV et pouvant conduire à la mort ne sont pas plus élevées chez les patients sous anti-TNF α que chez les contrôles. L'effet secondaire le plus commun est une réaction inflammatoire au niveau du site d'injection de l'anti-TNF α qui n'entraîne que très rarement un arrêt du traitement.

Les thérapies anti-TNF α ont été associées avec un risque accru de tuberculose par rapport à la population générale. Tous les anti-TNF α sur le marché présenteraient ce risque. Les recommandations sont de tester les patients pour une tuberculose latente avant la mise en place d'un traitement par anti-TNF α . Dans le cas d'un test positif, un traitement contre cette tuberculose latente doit être mis en place avant l'initiation de la thérapie anti-TNF α .

Quelques études ont également montré que les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde avaient un risque accru de développer des lymphomes, avant un début de traitement par les anti-TNF α . Après un traitement anti-TNF α , il n'a pas été montré une élévation du risque de développer un lymphome¹²⁰. Cependant, des études complémentaires doivent être effectuées sur un plus long terme pour développer un consensus sur les effets secondaires et surtout sur le risque accru de phénomènes malins.

4.4.1.2 Les anti-IL-23

Comme décrit plus haut, l'IL-23 chez l'homme est une cytokine permettant la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en T_H17. Les lymphocytes T_H17 sont impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques comme la maladie de Crohn ou encore le psoriasis. L'IL-23 est une cytokine proinflammatoire partageant une sous-unité, la p40 avec l'IL-12.

➤ Ustekinumab : commercialisé sous le nom de Stelara®

L'Ustekinumab est un anticorps monoclonal de classe IgG1 bloquant la sous-unité p40 de l'IL-12 et de l'IL-23. Il a été commercialisé en France en 2009 et est utilisé dans le traitement du psoriasis dans les formes modérées à sévères.

Il a été approuvé après trois essais cliniques PHOENIX 1¹²¹ et PHOENIX 2¹²² (placebo versus Ustekinumab) et ACCEPT¹²³ (Ustekinumab versus Etanercept). Ces essais ont montré une efficacité de l'Ustekinumab par rapport à un placebo et une meilleure efficacité par rapport à l'Etanercept. La posologie habituelle est une injection sous-cutanée de 45 mg à la semaine 0 puis la semaine 4 puis toutes les 12 semaines.

Les effets secondaires les plus souvent rencontrés sont des réactions au site d'injection ainsi que des infections.

Une étude clinique de phase III avec l'Ustekinumab dans la maladie de Crohn va bientôt débiter (en cours de recrutement).

4.4.1.3 Les anti-IL-1

- Anakinra : commercialisé sous le nom de Kineret®

L'Anakinra est un compétiteur de l'IL-1. En se fixant sur IL-1RI et il empêche la signalisation de l'IL-1 α et de l'IL-1 β . Il a été commercialisé en 2002 et est utilisé dans la polyarthrite rhumatoïde, en traitement de deuxième intention chez les patients ne répondant pas ou peu au methotrexate et aux anti-TNF α ou présentant une contre-indication.

Cependant l'Anakinra semble avoir un plus faible taux d'efficacité par rapport aux anti-TNF α . La posologie habituelle est une injection sous-cutanée de 100 mg tous les jours.

Les effets secondaires les plus fréquemment rencontrés sont des infections qui semblent être plus sérieuses que pour les anti-TNF α . Cependant, une autre étude a montré que les risques n'étaient pas plus élevés qu'avec les anti-TNF α .

- Canakinumab : commercialisé sous le nom d'Ilaris®

La Canakinumab est un anticorps monoclonal de type IgG humanisé ciblant l'IL-1 β . Il a été commercialisé en France en 2009 suivant une autorisation de mise sous le marché exceptionnnele car il permet de traiter les syndromes périodiques associés à la cryopyrine, maladies orphelines. Ces maladies sont caractérisées par des mutations permettant une expression continue de l'enzyme de conversion de l'IL-1¹²⁴, induisant une augmentation de la sécrétion de l'IL-1 et provoquant des symptômes autoinflammatoires¹²⁴ (inflammation sans lymphocytes autoréactifs ni autoanticorps). La posologie habituelle est une injection de 150 mg par voie sous-cutanée toutes les 8 semaines chez les sujets de plus de 40 kilogrammes.

Dans cette étude, deux patients (sur 35) ont connu des effets secondaires, l'un une infection des voies urinaires résistante aux antibiotiques et l'autre un vertigo. Les injections de Canakinumab augmenteraient la sensibilité aux infections.

4.4.1.4 Les anti-IL-6

- Tocilizumab : commercialisé sous le nom de RoActemra®

Le Tocilizumab est un anticorps monoclonal anti-IL-6 récepteur (IL-6R) de type IgG1. Il est commercialisé en France depuis 2009 et est utilisé dans la polyarthrite rhumatoïde. Depuis

2011, il est utilisé dans le traitement de l'arthrite juvénile idiopathique. Chez les sujets adultes, il est généralement utilisé en deuxième intention lorsque la réponse au methotrexate et aux anti-TNF α est jugée insuffisante¹²⁵. Chez les enfants, il est utilisé lorsque le traitement par anti-inflammatoires et corticostéroïdes en association ou non avec le methotrexate est insuffisante. La posologie habituelle est de 8 mg/kg en injection intraveineuse.

Les effets secondaires rapportés sont des réactions au site d'injection et des infections modérées à sévères ainsi que des neutropénies pouvant nécessiter l'arrêt du traitement.

4.4.2. Les petites molécules anti-cytokines

Ici, je ne présente qu'une seule petite molécule pouvant interagir avec la sécrétion du TNF α et qui est commercialisée : le thalidomide.

En effet, les petites molécules commercialisées ou en développement sont, en général, des inhibiteurs de kinases ou de facteurs de transcription. Il n'existe pas, à ma connaissance, de petites molécules anti-cytokines ou anti-récepteur de cytokine utilisées en clinique ; elles sont toutes en développement.

➤ Thalidomide

Le thalidomide est une petite molécule connue depuis longtemps. En effet, ce médicament a été utilisé dans les années 60 principalement pour son action anti-nauséuse et sédative et a principalement été administré chez les femmes enceintes. Cependant, il a été retiré du marché en 1961 suite à la découverte chez les enfants nés de femmes sous thalidomide de graves malformations au niveau des bras et des jambes. Beaucoup d'enfants ont souffert d'amélie (absence de un ou plusieurs membres, bébé « phoque »), d'ectromélie (absence de l'extrémité d'un membre), de phocomélie (absence de segment intermédiaire au niveau du membre), de polydactylie (doigt ou orteil surnuméraire) ou de syndactylie (doigts ou orteils collés). Ce scandale sanitaire retentissant a contribué à la mise en oeuvre de normes plus strictes concernant la commercialisation des produits de santé.

Le thalidomide a été remis sur le marché et est utilisé dans le myélome multiple et comme médicament orphelin dans un certain nombre de maladies comme le lupus érythémateux cutané ou la lèpre. Le mécanisme d'action du thalidomide n'est pas résolu. Cependant, il a été montré que le thalidomide inhibait l'accumulation de l'ARN messager du TNF α au niveau des cellules du sang périphérique¹²⁶. De plus, cette inhibition n'affecte pas les autres

cytokines produites (IL-1, IL-6) et n'abolit pas complètement la sécrétion de $TNF\alpha$ ¹²⁷. Il empêcherait également la dégradation de IKK, kinase permettant la phosphorylation et ainsi la dégradation de I κ B. L'inactivation de IKK inhibe alors la voie de signalisation du $TNF\alpha$, dépendante du NF κ B¹²⁸. La posologie varie en fonction de la maladie et de son avancée ; de 50 mg par jour à 600 mg par jour.

Les effets secondaires

Le Thalidomide a été retiré du marché mondial en 1961 suite à des effets tératogènes catastrophiques chez les enfants nés de mère ayant pris du thalidomide pendant leur grossesse (voir plus haut) C'est un des effets secondaires majeurs. Il a également été observé des neuropathies périphériques pouvant être irréversibles avec apparition de fourmillement dans les extrémités des membres inférieurs et supérieurs, nécessitant une diminution voire un arrêt du traitement.

Des thromboses veineuses profondes ainsi que des embolies pulmonaires peuvent survenir ; la prescription prophylactique d'un traitement anti-coagulant peut alors être envisagée.

4.5. Les inhibiteurs de cytokines en développement

Comme nous l'avons vu, les inhibiteurs de cytokines ont une place de choix dans le panel thérapeutique depuis plus de 10 ans maintenant. Cependant, des effets secondaires comme des risques d'infections augmentés, l'apparition d'anticorps anti-anticorps monoclonal chez certains patients, diminuant l'efficacité du traitement ou pouvant conduire à son arrêt, le développement de nouvelles molécules (anticorps ou petites molécules ou vaccins) reste donc indispensable. Les paragraphes suivants font une description des anticorps monoclonaux (ou polyclonaux), des petites molécules ou encore des vaccins en développement pour les thérapies anti-cytokines.

4.5.1. Les anticorps

4.5.1.1 Les anti- $TNF\alpha$

Au cours de ces dernières années plusieurs composés ont été arrêtés en phase II ou III comme l'oncept (développé par Serono), récepteur soluble du $TNF\alpha$ (récepteur RI, p55) testé dans le psoriasis et le mélanome. L'essai clinique de phase III dans le psoriasis a été

stoppé du fait d'apparition de syndromes de réponse inflammatoire systémique chez deux patients dont l'un est mort, le bénéfice/risque n'étant plus en faveur du traitement, l'essai n'a pas été poursuivi.

Le CytoFab® (développé par AstraZeneca) est un fragment Fab polyclonal ovin anti-TNF α humain. Malgré l'implication du TNF α dans l'inflammation, son inhibition, lors de précédents essais avec d'autres anti-TNF α , n'a pas montré d'amélioration de l'état des patients. Cependant, le CytoFab® a l'avantage d'être polyclonal et par conséquent d'avoir la capacité de se fixer sur différents domaines du TNF α , il pénètre également mieux dans les tissus. Lors d'un précédent essai clinique, deux heures après injection, le TNF α était à des niveaux indétectables chez les patients. Il est actuellement en essai de phase II chez des patients souffrant de sepsie sévère ou de choc septique.

4.5.1.2 Les anti-IL-23

L'Ustekinumab a été décrit plus comme un anticorps anti-IL-23p40 approuvé dans le psoriasis sous le nom de Stelara®

Des essais cliniques de phase III sont en cours pour évaluer l'efficacité de l'Ustekinumab dans l'arthrite psoriatique et la maladie de Crohn ; est en cours également un essai clinique de phase II dans la spondylarthrite ankylosante.

Comme expliqué plus haut, l'IL-23 a une sous-unité commune avec l'IL-12, la p40. Un anticorps monoclonal comme l'Ustekinumab va cibler les deux cytokines alors que la cytokine impliquée est plutôt l'IL-23. Il a donc été développé des anticorps monoclonaux contre la sous-unité p19 de l'IL-23, sous unité spécifique. Ces anticorps, nommés CNTO 1959 (développé par Centocor Inc) et SCH900222 (développé par Schering-Plough).

Des études de phase II vont débiter avec le CNTO 1959 dans le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde (en comparaison avec l'ustekinumab) et une étude de phase II avec le SCH900222 est en cours dans le psoriasis.

4.5.1.3 Les anti-IL-6

Plusieurs anticorps monoclonaux sont en développement contre la surproduction de l'IL-6. La surproduction de l'IL-6 a été impliquée dans les maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou encore dans certains cancers comme le myélome multiple.

Le Tocilizumab, un anticorps anti-IL-6 récepteur a été approuvé dans la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrite idiopathique juvénile.

Le Siltiximab est un anticorps anti-IL-6 développé par Centocor. C'est un anticorps chimérique murin-humain se fixant à l'IL-6. Il a été testé en essai clinique de phase II dans le cancer du rein métastatique. Des essais de phase II sont en cours dans le cancer de la prostate et d'autres vont débiter dans le myélome multiple.

Le Sarilumab est un anticorps anti IL-6 développé par Regeneron. Il est dirigé contre la sous-unité α de l'IL-6 récepteur. Des essais cliniques de phase III dans la polyarthrite rhumatoïde vont bientôt débiter.

4.5.1.4 Les anti-IL-1

Le Canakinumab est un anticorps anti-IL-1, autorisé dans le traitement des syndromes associés à la cryopyrine. Des essais cliniques de phase III vont débiter dans le traitement de la goutte. Des essais de phase II dans la polyarthrite rhumatoïde ont donné de bons résultats.

Le Rolincept est une protéine fusion dimérique composée du domaine extracellulaire de l'IL-1 récepteur et le fragment Fc d'une IgG ; il peut à la fois bloquer l'IL-1 α et l'IL-1 β .

Des essais cliniques de phase III vont débiter dans la goutte. Il a été testé dans un essai de phase III dans les syndromes périodiques associés à la cryopyrine et des essais de phase II sont en cours dans les fièvres méditerranéennes familiales, qui sont également des maladies autoinflammatoires.

Les différents anticorps monoclonaux présentés ici sont font partie d'un ensemble de thérapies qui sont actuellement en cours de tests dans la lutte contre les maladies autoimmunes, autoinflammatoires mais également les cancers. De nombreuses cibles ont été identifiées : l'IL-15 impliquée dans la polyarthrite rhumatoïde, l'IL-17, impliquée dans le

psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, l'IL-22 impliquée dans le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde ou encore l'IFN γ dans le lupus érythémateux disséminé.

4.5.2. Les petites molécules

Il n'existe pas à ma connaissance de petite molécule commercialisée qui soit un inhibiteur direct de cytokine. Cependant, Il existe des molécules spécifiques des cytokines ou de leurs récepteurs en cours d'évaluation chez l'homme. De plus, de nombreux essais cliniques sont en cours sur des petites molécules ciblant les kinases de type Janus kinase (JAK) ou MAP kinase situées en aval des voies de signalisation.

L'avantage des petites molécules est leur coût de production nettement inférieur aux biothérapies. Elles présentent également l'avantage d'être administrables par voie orale, permettant l'arrêt du traitement à l'apparition du moindre effet secondaire et une élimination plus rapide, contrairement aux anticorps monoclonaux.

4.5.2.1 Petites molécules spécifiques de kinases

De nombreuses petites molécules sont actuellement en cours d'essais cliniques dans diverses maladies inflammatoires chroniques. Beaucoup de ces molécules ciblent des kinases comme les JAK, présentes dans les voies de signalisation de la majeure partie des cytokines ou encore les MAP kinases (p38). Cependant, les petites molécules inhibitrices de p38 testées en clinique se sont révélées inefficaces dans le traitement de la maladie de Crohn et la polyarthrite rhumatoïde^{129,130,131}.

Cinq petites molécules ciblant les JAK sont actuellement testées dans des essais cliniques dans des maladies inflammatoires chroniques comme le psoriasis, la maladie de Crohn ou encore la polyarthrite rhumatoïde. Ces molécules peuvent cibler deux JAK à la fois comme le Tofacitinib inhibant les JAK 1 et 3 ou le Roxilitinib inhibant JAK 1 et 2.

4.5.2.2 Les petites molécules spécifiques de cytokines.

Plusieurs petites molécules ont été développées pour inhiber directement l'effet de la cytokine sans cibler les voies de signalisation en aval.

Des molécules spécifiques de l'IL-23/IL-12, du VEGF récepteur ou de chimiokines sont actuellement en essai clinique dans les maladies inflammatoires chroniques.

Le STA-5326 (Apilimod mesylate) est une petite molécule ciblant l'IL-23 et l'IL-12, en inhibant leur production et développée par Synta Pharmaceuticals. Des essais cliniques de phase I et II ont été effectués dans la maladie de Crohn. Cependant, les résultats de l'étude n'ont pas été concluants en phase II^{132,133}.

L'Axitinib est une petite molécule ciblant le VEGF récepteur et plus particulièrement le VEGF tyrosine kinase inhibitor et développée par Pfizer. De nombreux essais cliniques de phase II et de phase III sont en cours d'évaluation ou en recrutement dans différents cancers comme le glioblastome, le cancer du rein ou de la thyroïde.

Des essais cliniques sont actuellement en cours avec des petites molécules ciblant les récepteurs de chimiokines. Les chimiokines sont des cytokines chemoattractantes permettant la circulation des cellules dans le corps vers les lieux où leur présence est nécessaire.

Des petites molécules ciblant le récepteur de MIP1 α , MIP1 α étant impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde, sont en cours d'évaluation. Une petite molécule, développée par Pfizer, inhibant CCR5, co-récepteur du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est approuvée dans le traitement du SIDA. Des petites molécules inhibant CCR5, développées par d'autres compagnies, sont aussi en cours d'essais cliniques dans le traitement contre le VIH.

4.5.2.3 Petites molécules spécifiques de la production de TNF α

D'autres molécules peuvent cibler des enzymes nécessaires à la production des cytokines comme l'enzyme TNF- α Converting Enzyme (TACE) ou l'IL-1 Converting Enzyme (ICE), qui permet le relargage du TNF α et de l'IL-1 respectivement dans le milieu et enfin, des molécules ciblent directement les cytokines.

Une petite molécule ciblant la PDE-4 (Apremilast) est actuellement en essai dans le psoriasis, l'arthrite psoriasique et la polyarthrite rhumatoïde. Une deuxième molécule, le rolipram, a été testée dans la sclérose en plaques¹³⁴ mais arrêtée en cours d'évaluation car elle était mal tolérée. De plus, il a été observé une augmentation de l'inflammation au niveau du cerveau¹³⁴.

4.5.2.4 Petites molécules ciblant directement le TNF α

Nous avons vu plus haut que le thalidomide avait des propriétés anti-TNF α en dégradant l'ARN messager, la traduction est alors impossible, d'où une diminution de la production de la protéine. Des petites molécules peuvent avoir un effet anti-TNF α en ciblant les MAP kinases en aval dans la cascade de signalisation. Une petite molécule ciblant la TACE est également en développement.

À notre connaissance, il n'y a pas de petites molécules commercialisées ciblant directement le TNF α ou les récepteurs du TNF α . Cependant, quelques études ont été publiées sur des composés pouvant empêcher le TNF α de se fixer sur son récepteur ou permettant la détrimérisation.

La première molécule découverte capable d'inhiber l'interaction TNF α -TNF récepteur (inhibition protéine-protéine) est la suramine¹³⁵. La suramine (GermaninTM, développée par Bayer) est un composé utilisé dans le traitement de la maladie du sommeil induite par *Trypanosoma rhodesiense*, transmise par la mouche tsé-tsé et endémique en Afrique¹³⁵. Elle doit être utilisée en phase précoce de la maladie ; les effets secondaires sont des allergies, des troubles rénaux mais également des neuropathies périphériques. Dans les années 90, une équipe a montré que la suramine agit sur le TNF α lui-même¹³⁶ et empêche la cytotoxicité induite par le TNF α sur une lignée murine sensible à cette cytokine, la lignée LM, de façon dose-dépendante¹³⁶. La même équipe a proposé que la suramine permettait la dissociation du TNF α et de fait empêchait la fixation du ligand au TNFR et son effet cytotoxique sur les cellules¹³⁷. En 1999, une équipe a montré que des analogues structuraux de la suramine présentait le même profil avec toutefois une activité plus faible¹³⁸.

En 2005, une équipe a montré qu'une petite molécule du nom de SPD304¹³⁹ était capable d'inhiber la fixation du TNF α sur le TNF récepteur RI (p55), dans un test de fixation mais également dans un test cellulaire avec la lignée HeLa¹³⁹. SPD304 se fixerait au niveau d'une poche présente dans le TNF α et entrerait en contact avec 16 résidus : 9 sur la chaîne A (premier monomère) et 7 sur la chaîne B (deuxième monomère). Ils ont alors fait l'hypothèse que SPD304 permettait la détrimérisation du TNF α et ont montré que l'ajout du composé dans une solution de TNF α accélérerait la dissociation de la protéine de 600 fois¹³⁹. Cependant,

le SPD304 est un composé toxique pour les cellules ce qui le rend difficilement utilisable en thérapie.

En 2010, par une méthode de structure-based virtual screening (drug design), une équipe a montré que des produits naturels étaient capables de cibler et d'inhiber le TNF α ¹⁴⁰. Le modèle moléculaire utilisé était le co-cristal obtenu par He *et al.*¹³⁹ en 2005. Le screening a permis de mettre en évidence deux produits ayant la capacité d'empêcher le binding du TNF α sur son récepteur (TNFRI) et dans un test cellulaire sur les cellules HepG2¹⁴⁰.

En 2010, une équipe a identifié cinq composés ayant des effets inhibiteurs sur le TNF α dans un test cellulaire suivi d'un marquage du TNFRI (CD120a)¹⁴¹.

En 2011, l'équipe ayant découvert les propriétés inhibitrices des produits naturels a analysé l'effet anti-TNF α de produits approuvés par la Food and Drug Administration (FDA)¹⁴² avec la même méthode de structure-based screening. Deux produits ont été montrés pour avoir des propriétés anti-TNF α avec toutefois une activité plus faible que les précédents¹⁴².

4.5.3. Les vaccins anti-cytokines

Précédemment, nous avons vu les anticorps monoclonaux et les petites molécules à visée thérapeutique commercialisés ou en développement clinique et préclinique.

L'immunisation passive requiert des injections régulières d'anticorps (ou de récepteurs solubles), le plus souvent à l'hôpital avec un coût pouvant avoisiner les 15 000 - 20 000 € par an et par patient. Des effets secondaires, décrits plus haut, comme des douleurs au site d'injection, des maux de tête, des allergies, une susceptibilité accrue aux infections ou l'apparition de tuberculose chez des patients présentant une tuberculose latente peuvent survenir. De plus, le traitement peut devenir inefficace du fait de la génération d'anticorps anti-anticorps monoclonal dans certains cas (épuisement thérapeutique). Le traitement doit alors être modifié ; on peut proposer un autre anticorps ciblant la même cytokine ou un anticorps ciblant une autre cytokine impliquée dans la maladie, quand cela est possible.

L'immunisation active anti-cytokine est apparue et a été testée chez l'homme avant même les premiers anticorps monoclonaux¹⁴³, mais elle ne s'est pas développée aussi rapidement car il fallait surmonter deux obstacles historiques : accepter de cibler une cytokine (ce que les anticorps monoclonaux ont permis de faire), et induire une immunisation active ciblant une protéine du soi. Le principe de l'immunisation active anti-cytokine est d'induire une réponse

immunitaire (a priori humorale) contre la cytokine cible et ainsi de provoquer la production d'anticorps contre cette cytokine. Le patient va générer ses propres anticorps dirigés contre la cytokine d'intérêt ce qui permettra la neutralisation de ses effets toxiques.

Il y a une rupture du concept de tolérance immunitaire, au moins sur le plan des anticorps, mais plusieurs équipes ont montré que nous possédions en fait tous des auto-anticorps^{144,145}. La stratégie visant à augmenter ces anticorps par une technique de vaccination prend alors tout son sens.

La rupture de tolérance peut être obtenue par une modification de la protéine endogène par des traitements chimiques et/ou en la couplant à une protéine porteuse immunogène. Les études de rupture de tolérance ont permis la mise au point de modèles de maladies autoimmunes chez le rongeur comme l'arthrite au collagène (collagène de type II bovin comme immunogène) ou encore l'encéphalite expérimentale autoimmune (myéline comme immunogène).

Dès 1991 (donc avant même les premiers essais sur les anticorps monoclonaux anti-TNF α), des premiers essais de vaccination contre l'IFN α chez des patients infectés par le VIH ont montré la faisabilité de la stratégie et qu'il y avait production d'anticorps anti-IFN α ¹⁴⁶. L'IFN α est une cytokine surexprimée chez les patients porteurs du VIH qui promeut l'immunosuppression chez les patients développant le SIDA. Plusieurs essais^{147,148,149} ont abouti à la publication en 1999 d'un essai de phase II/III chez des patients infectés. Le produit s'est avéré sans effets secondaires, immunogène, et a amélioré le pronostic des patients¹⁵⁰, mais il n'a cependant pas eu de succès car il est arrivé au moment où les tri-thérapies ont fait leur apparition radicale.

Cependant, le succès des anticorps monoclonaux dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques a donné un regain d'intérêt pour la vaccination anti-cytokine. Différentes équipes ont adopté des stratégies variées : des vaccins à base de cytokine entière, à base d'ADN de cytokine, ou à base de peptides dérivés des cytokines.

Le but de l'immunisation active anti-cytokine est que les anticorps anti-cytokine soient produits par l'organisme lui-même avec le concept sous-jacent qu'il s'agit d'une simple modulation du taux physiologique cytokine/anticorps¹⁵¹. De fait, des anticorps anti-IL-1 et IL-6 (autoanticorps) ont été décrits chez des sujets sains ne développant pas de maladie^{152,153}. L'immunisation active anti-cytokine permettrait d'augmenter les titres et par conséquent de

générer une « autoimmunité humorale bénéfique » en cas de besoin. Les maladies inflammatoires étant caractérisées par une surproduction de cytokines, cette stratégie apparaît tout à fait séduisante.

De plus, depuis dix ans maintenant, l'immunisation passive par infusion d'anticorps monoclonaux anti-TNF α et contre d'autres cytokines est utilisée dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques et les effets secondaires sont maintenant bien connus et relativement maîtrisés. L'immunisation active anti-cytokine pourrait être une bonne alternative aux traitements par immunisation passive mais requiert cependant un système immunitaire compétent ; les patients immunodéprimés ou sous immunosuppresseurs comme le méthotrexate devront faire l'objet d'une analyse minutieuse du bénéfice/risque. De même, les effets secondaires constatés lors d'un traitement par immunisation passive contre une cytokine devront être surveillés lors d'une immunisation active contre cette même cytokine. Les problèmes d'anticorps anti-anticorps monoclonal rencontrés lors des biothérapies par immunisation passive devraient être absents.

Cependant, la génération d'anticorps endogènes anti-cytokine peut être rendue difficile du fait de la tolérance. Les coûts de production de l'immunogène seraient moindres comparés à ceux des anticorps monoclonaux obtenus par génie génétique, et les injections pourraient être moins fréquentes, conférant une meilleure qualité de vie pour les patients.

Voici différentes approches utilisées pour l'immunisation active anti-cytokine :

- les vaccins par cytokine entière
- les vaccins par ADN de cytokine
- les vaccins par peptides de cytokine

4.5.3.1 Vaccins cytokine entière

La première équipe à avoir développé l'immunisation active anti-cytokines a été celle du Pr D. Zagury dès les années 1990¹⁴⁶ et la technique utilisée a été d'inactiver la cytokine par différents procédés chimiques puis de la coupler à une protéine porteuse permettant de fournir les épitopes T nécessaires à la mise en place d'une réponse immunitaire. Les protéines porteuses sont généralement des hémocyanines de mollusques, la plus connue étant la Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH, le complexe formé est alors nommé kinoïde) ou encore l'ovalbumine. Plusieurs autres études ont été réalisées à partir de cette stratégie de couplage à

une protéine porteuse. En 2000, une équipe belge a montré qu'une vaccination par l'IL-9¹⁵⁴ couplée à l'ovalbumine réduisait l'éosinophilie dans le sang des animaux et empêchait l'expulsion du ver *Trichuris muris*, expulsion dépendante de l'IL-9¹⁵⁴. En 2007, l'équipe de D. Zagury, en collaboration avec celle du Pr Boissier, a montré qu'une vaccination par le TNF α couplé à la KLH permettait une protection significative des souris transgéniques pour le TNF α humain, développant spontanément une arthrite^{155,156}. De la même façon, une vaccination contre le VEGF a permis une diminution du nombre et de la taille des tumeurs¹⁵⁷. Dans ces différents exemples, les épitopes T étaient apportés par la protéine porteuse. Actuellement, des essais cliniques avec un kinoïde du TNF α sont actuellement en cours dans la polyarthrite rhumatoïde¹⁵⁸ et la maladie de Crohn¹⁵⁹ (société Neovacs).

Une autre stratégie proposée bien plus tard a été d'introduire des épitopes T dans la séquence protéique de la cytokine avec cependant le risque de perdre la structure native de la protéine. C'est le cas d'un travail de 1999 où des épitopes T de l'ovalbumine ou du lysozyme ont été intégrés dans la séquence du TNF α puis injecté chez des animaux¹⁶⁰. Le vaccin s'est avéré protecteur dans un modèle de cachexie et d'arthrite au collagène, toutefois la protection est dépendante de la lignée murine utilisée¹⁶⁰. D'autres tests en modèle murin, s'appuyant sur un épitope T de la toxine tétanique inséré dans la séquence du TNF α ¹⁶¹ et de BlyS¹⁶², ont conféré une protection contre un cancer dépendant du TNF α et l'encéphalite expérimentale autoimmune respectivement^{161,162}. Le même groupe a testé en essai clinique de phase I chez l'Homme le même vaccin hybride avec le TNF α humain chez des patients atteints de mélanome¹⁶³.

Enfin, la cytokine peut aussi être rendue immunogène par l'utilisation de Virus Like Particles (VLP). Ce sont des particules pseudo virales ne pouvant induire la maladie mais fortement immunogènes. Ainsi, la cytokine exprimée à la surface des VLP permet d'obtenir la génération d'autoanticorps. Cette stratégie a été utilisée dans plusieurs modèles animaux notamment un modèle d'ostéoporose avec une vaccination contre RANKL¹⁶⁴, cytokine impliquée dans cette maladie et un modèle d'arthrite au collagène avec une vaccination contre l'IL-17¹⁶⁵ et le TNF α ¹⁶⁶ et dans un modèle d'EAE et de myocardite autoimmune avec l'IL-17^{165,167}. De même, la stratégie a été utilisée dans un modèle d'arthrite avec une vaccination contre l'IL-1 dans un modèle d'arthrite au collagène¹⁶⁸. Enfin, des essais cliniques ont été réalisés avec une vaccination contre l'angiotensine II, responsable de l'hypertension mais l'efficacité était inférieure aux traitements conventionnels hypotenseurs.

Ces différents travaux montrent que l'approche d'immunisation active anti-cytokines est une approche valable et prometteuse. Cependant, comme nous avons pu le voir, les souches de souris, la protéine porteuse, l'emplacement de l'épitope T peuvent influencer sur la production d'anticorps.

4.5.3.2 Les vaccins à ADN

Dans la vaccination par ADN, on injecte, en général en intramusculaire, un plasmide contenant le gène de la cytokine contre laquelle on veut immuniser. Le plasmide sera capté par les cellules, et après des étapes de transcription et de traduction, la protéine sera reconnue comme étrangère par les cellules du système immunitaire via le CMH, il y aura alors production d'auto-anticorps ciblant la cytokine d'intérêt.

De nombreux essais chez la souris ont montré l'efficacité de cette approche^{169,170,171,172}. Par exemple, des rats ont été vaccinés par l'ADN de MCP-1 et MIP-1 α , deux chimiokines impliquées dans l'EAE, l'immunisation par ces deux protéines a permis une protection très forte contre l'EAE et durable^{169,170}. Cette stratégie a également été utilisée dans un modèle d'arthrite induite par adjuvant¹⁷¹, il a été observée une protection chez les rats vaccinés par l'ADN du TNF α ¹⁷¹. Des essais ont été également couronnés de succès dans un modèle de syndrome des antiphospholipides avec une vaccination par l'ADN du TNF α ¹⁷².

Cependant, cette approche bien que séduisante utilise le répertoire des lymphocytes T ce qui pourrait poser des problèmes d'innocuité. À notre connaissance, aucun vaccin anti-cytokines n'a encore été développé par cette approche.

4.5.3.3 Les immunisations à base de peptides de cytokines

Cette stratégie d'immunisation active anti-cytokines repose sur l'utilisation de peptides couplés à une protéine porteuse. Elle a été développée au sein du laboratoire. Elle présenterait potentiellement moins de risques d'avoir des épitopes T au sein du peptide que lors de l'utilisation de cytokine entière par immunogène protéique ou ADN. Elle présente également l'avantage d'être moins coûteuse en termes de production par rapport à la production de la cytokine entière.

Cette stratégie permet également, contrairement à la stratégie cytokine entière, d'avoir des anticorps dirigés contre une partie limitée de la cytokine avec peu d'épitopes et donc d'obtenir une réponse moins « diluée » qu'en utilisant une cytokine entière avec beaucoup d'épitopes

comme antigène¹⁷³. En revanche, les titres seront plus faibles que lors d'une immunisation par cytokine entière. Afin d'avoir des titres anticorps élevés, l'optimisation de la protéine porteuse et du peptide serait utile.

Au sein du laboratoire, les régions d'intérêt potentiel pour un vaccin à base de peptides de cytokines sont choisies par bioinformatique. Cela suppose que la structure de la cytokine soit disponible et documentée.

Des essais d'immunisation active par peptides de cytokines ont montré un bénéfice dans des modèles de choc septique au LPS/D-Galactosamine par une vaccination avec un peptide du TNF α ¹⁷³ et d'arthrite au collagène par une vaccination avec un peptide de l'IL-1¹⁷⁴ et un peptide de l'IL-23¹⁷⁵, les trois peptides étant couplés à la protéine porteuse KLH. Cependant, les titres anticorps restent plus faibles par rapport à une vaccination par cytokine entière. D'autres essais ont montré une protection significative dans un modèle d'inflammation intestinale après une vaccination contre l'IL-23 mais grâce un couplage à des VLPs^{176,177}. Un peptide du TGF β a montré une amélioration de la fibrose intestinale lors d'une colite chronique suivant la même méthode¹⁷⁸ ainsi que dans un modèle d'asthme après une vaccination à base de peptides de l'IL-13 en systémique¹⁷⁹ et en local¹⁸⁰.

La stratégie de vaccination avec des peptides de cytokines apparaît elle aussi séduisante. Elle permet d'avoir des anticorps concentrés sur une partie de la cytokine. Cependant, parmi les exemples présentés ci-dessus, on peut voir que les immunisations à base de peptides produisent des titres plus faibles que lorsque la cytokine entière est utilisée. Il serait peut-être utile d'améliorer l'immunogénicité des peptides.

5. Mon laboratoire d'accueil

5.1. Description de mon laboratoire d'accueil

Mon laboratoire d'accueil, la chaire de bioinformatique du Conservatoire National des Arts et Métiers (dirigée par le Pr J-F. Zagury), est une équipe pluridisciplinaire s'appuyant sur la bioinformatique pour essayer de développer de nouveaux médicaments. Il est composé :

1. d'un groupe de génomique qui essaye d'identifier les facteurs génétiques de résistance face au VIH afin de mieux comprendre les mécanismes de pathogenèse et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles,

2. d'un groupe travaillant en modélisation moléculaire et en drug design, en essayant notamment de développer de petites molécules anti-cytokines par criblage *in silico*,

3. d'un groupe expérimental travaillant notamment sur le développement de vaccins à base de peptides de cytokines dans les maladies inflammatoires chroniques. C'est ce groupe expérimental, tourné vers les applications de l'immunologie et les modèles animaux que j'ai intégré.

Il convient de rappeler certaines étapes de la vie d'un médicament depuis sa genèse. L'équipe travaille dans la phase très précoce du développement de médicaments. Cette phase de développement regroupe des tests d'activité *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux, ainsi que des essais d'optimisation. Une fois un composé sélectionné et optimisé, on peut envisager de le tester chez l'Homme. Il y aura alors une phase d'essais pré-cliniques d'évaluation de sa toxicité, ensuite, on distingue 3 phases d'essais chez l'Homme. Les essais de phase I visent à étudier la tolérance du médicament dans l'organisme. Une faible dose du médicament est utilisée sur de petits effectifs chez des volontaires en général sains. La phase II permet de déterminer la dose optimale du médicament ainsi que son efficacité chez un petit effectif de personnes malades. Les études de phase III visent à tester le produit chez un grand nombre de malades volontaires sur des durées variables avec le plus souvent le médicament de référence en comparaison, et elles permettent de déterminer le bénéfice/risque du produit. Les études dites de phase IV interviennent après la commercialisation (c'est la pharmacovigilance) et elles visent à identifier les effets indésirables rares non identifiés en phase III, ce qui permet une meilleure utilisation du médicament.

Entre la phase de développement et la commercialisation, il se passe souvent une dizaine d'années et une majorité des produits qui ont débuté le processus de validation s'avèrent inefficaces, ou toxiques ou moins efficaces que la référence. En moyenne, moins d'un produit sur 1000 arrivera à commercialisation.

A mon arrivée au laboratoire en décembre 2008, le groupe drug design venait de commencer un projet sur les petites molécules inhibitrices de TNF α . La force de cette approche se situe dans la sélection *in silico* des molécules potentiellement effectives. Là où des grands groupes testent expérimentalement un million de produits (High Throughput Screening), l'approche d'exploration par drug design *in silico* permet de ne tester que quelques milliers de molécules seulement en identifiant une poche d'intérêt dans une protéine cible¹³⁹ et en criblant une chimiothèque *in silico*.

Notre groupe expérimental avait déjà développé des peptides de TNF α ¹⁷³, d'IL-1¹⁷⁴, et d'IL-23¹⁷⁵ capables de protéger du choc septique au LPS/D-Galactosamine¹⁷³ et/ou de l'arthrite au collagène^{174,175}. Les peptides sont choisis par bioinformatique en privilégiant les sites potentiellement accessibles aux anticorps que sont les boucles. Des peptides dirigés contre le TNF α ainsi que des peptides dirigés contre l'IFN γ , le VEGF et l'IL-23 avaient été identifiés et étaient en cours d'évaluation à mon arrivée.

Le groupe de drug design et le groupe de développement expérimental ont travaillé en étroite collaboration car c'est le groupe expérimental qui a réalisé le criblage expérimental des meilleurs composés anti-TNF α identifiés par l'approche drug design.

5.2. Rappels sur le drug design

Le drug design a permis une diminution drastique en terme de temps et de coûts d'expérimentation. En effet, l'approche traditionnelle de criblage de molécules passait par un criblage expérimental systématique à haut débit d'une chimiothèque d'environ un million de composés. Les molécules intéressantes étaient ensuite sélectionnées et optimisées et on obtenait environ cinq médicaments candidats. Avec l'apparition du drug design, on effectue un criblage *in silico* (par ordinateur) d'une bibliothèque de composés. Le criblage expérimental *in vitro* s'effectue alors seulement sur les molécules sélectionnées (environ 1000 composés). Après optimisation, on aboutit à cinq candidats médicaments.

La sélection des molécules par criblage *in silico* peut s'effectuer par deux méthodes : le criblage *in silico* basé sur la structure de la protéine cible (Structure Based Virtual Ligand Screening : SBVLS) et le criblage *in silico* basé sur la structure d'un ou de plusieurs ligands de référence (Ligand Based Virtual Ligand Screening : LBVLS). Les méthodes sont choisies en fonction de la disponibilité de la structure de la protéine cible. Si l'on a à notre disposition la structure de la protéine cible (ici le TNF α), on utilisera une méthode de SBVLS, en ciblant des poches où le composé pourrait s'insérer, le but étant de maximiser le contact de la molécule avec sa cible (docking). Si la structure n'est pas à notre disposition mais qu'il existe des ligands actifs connus, on utilisera alors une méthode de LBVLS, par exemple une méthode de similarité s'appuyant sur le fait que des structures similaires ont plus de chances d'avoir des propriétés similaires et de se lier au même groupe de protéines.

Le drug design permet un criblage rapide, de l'ordre de quelques semaines, de banques de molécules chimiques de plus de un million de composés.

6. Objectifs de ma thèse

À mon arrivée au laboratoire, j'ai effectué une bibliographie extensive sur différentes cibles susceptibles d'être exploitées dans les maladies inflammatoires chroniques. Il n'y avait pas d'inhibiteur petite molécule ciblant le TNF α en développement. Il m'a donc été proposé de travailler sur le développement d'inhibiteurs du TNF α , en collaboration avec le groupe drug design pour les petits composés. J'ai aussi proposé d'essayer de trouver de nouveaux peptides immunogènes utilisables par immunisation active. J'ai bien-sûr collaboré sur d'autres projets de recherche, mais dans le cadre de ce mémoire, j'ai fait le choix de me concentrer sur l'axe « inhibiteurs » de TNF α .

6.1.1. Approche vaccinale de l'inhibition du TNF α

À partir des données préexistantes au laboratoire et publiées, l'objectif était de générer de nouveaux peptides dérivés du TNF α , de les tester afin de déterminer leur immunogénicité. Les peptides les plus immunogènes seraient ensuite injectés à des lapins et ensuite testés dans un modèle murin de maladie intestinale, la colite au DSS ou dans un modèle d'arthrite au collagène.

6.1.2. Approche petites molécules de l'inhibition du TNF α

Après différentes étapes de sélection *in silico* de petites molécules issues d'une grande chimiothèque disponible au laboratoire, les composés ayant franchi toutes les étapes sont testés dans un test cellulaire dépendant du TNF α . Les meilleurs composés sont ensuite testés dans un modèle de choc septique au LPS/D-Galactosamine, dépendant du TNF α puis dans d'autres modèles murins.

Mon projet de thèse était donc centré sur le développement de nouveaux candidats médicaments anti-TNF α .

-B-

Matériels et Méthodes

1. Approche d'inhibition de cytokines par petites molécules

1.1. Expérimentations *in silico*

1.1.1. Bibliothèque de petites molécules

Les petites molécules utilisées lors du criblage *in silico* sont issues de la bibliothèque de chez Chembridge (www.hit2lead.com). Afin de constituer notre bibliothèque de criblage, 700 000 composés ont été sélectionnés selon leurs propriétés ADME/Tox, par exclusion des produits pouvant présenter une mauvaise absorption, distribution, métabolisation, excrétion ou possédant des groupements toxiques ou instables.

1.1.2. Criblage virtuel par structure-based

Le criblage a été effectué en ciblant une poche dans la structure du TNF α décrite par He *et al.*¹³⁹. Selon le modèle clé-serrure, le ligand (composé) va être introduit dans la poche. Le but est de maximiser la surface de contact entre la cible et le composé (docking). La cible (le TNF α) est supposée rigide alors que le composé est flexible, toutes les conformations du ligand sont alors explorées et les molécules sont classées en fonction de leur score. Les composés sont ensuite inspectés visuellement et les mille meilleures molécules sont testées expérimentalement *in vitro* afin d'évaluer leur capacité de neutralisation du TNF α .

1.1.3. Criblage virtuel par ligand-based

Après avoir testé les meilleures molécules dans un test *in vitro* de neutralisation du TNF α , les composés ayant une faible IC₅₀ sont utilisés pour effectuer un criblage virtuel par ligand-based permettant une recherche d'analogues dans notre bibliothèque. Le criblage est basé sur les similarités entre la molécule de référence (testée *in vitro*) et les molécules de la bibliothèque. Les molécules présentant 60 % de similarité avec la molécule de référence sont sélectionnées et inspectées à l'œil avant de tester leur capacité d'inhibition du TNF α .

La constitution de la bibliothèque ainsi que les criblages par structure-based et ligand-based ont été réalisés au sein du laboratoire Génomique, Bioinformatique et Applications par l'équipe de Drug Design.

1.2. Expérimentations *in vitro*

1.2.1. Neutralisation de l'activité du TNF α humain par les petites molécules

L'activité biologique du TNF α est déterminée par la capacité du TNF α à induire l'apoptose des cellules L929 (ATCC : CCL-1). Ce sont des fibroblastes de souris. Le test de neutralisation consiste à mettre le TNF α en présence d'un inhibiteur potentiel et d'un anti-mitotique (actinomycine) puis de mesurer l'activité apoptotique en mesurant la viabilité des cellules par spectrophotométrie¹⁸¹. L'actinomycine est un antimitotique, il empêche la prolifération cellulaire et permet de rendre les cellules L929 plus sensibles au TNF α .

1.2.1.1 Entretien des cellules L929

Les cellules sont mises en culture dans des flasques de 175 cm² (BD Falcon, France) contenant 30 ml de milieu dit complet composé de DMEM (Pan Biotech, Brumath, France), 10 % v/v de sérum de veau foetal (Pan Biotech, Brumath, France), de 2 mM de L-Glutamine (Pan Biotech, Brumath, France) et de 100 U/ml Pénicilline – 100 μ g/ml Streptomycine (Pan Biotech, Brumath, France). Lorsque les cellules sont confluentes à 80 %, elles sont détachées de la flasque à l'aide de 5 ml de 0,25 % trypsine – 0,02 % EDTA. Après décollement, on ajoute 25 ml de milieu complet afin d'inactiver la trypsine puis on centrifuge à 1200 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite retiré et les cellules sont resuspendues dans 10 ml de milieu complet puis comptées grâce à une cellule de Malassez. Pour conserver la lignée, réensemencer 1/5 de la suspension cellulaire dans une nouvelle flasque.

1.2.1.2 Test de neutralisation du TNF α humain

J0 : Des cellules L929 confluentes à 80% sontensemencées dans plaques 96 puits à fond plat (BD Falcon, Brumath, France) à raison de 40 000 cellules par puits dans 100 μ l de milieu complet puis incubées une nuit à 37°C, 5 % CO₂.

J1 : Le TNF α à 150 pg/ml (R&D Systems, Lille, France), l'actinomycine à 4 μ g/ml (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) et le composé à différentes concentrations de 100 μ M à 0,1 μ M (Chembridge, San Diego, Etats-Unis) sont ajoutés dans un volume final de 150 μ l de milieu complet dans des plaques 96 puits à fond rond (BD Falcon). Après deux heures d'incubation à 37°C, 5 % CO₂, 100 μ l de ce mélange sont déposés sur les cellules après un

lavage avec 200 µl de Phosphate Buffered Saline (PBS, Pan Biotech, Brumath, France) et l'incubation est prolongée de 24 heures à 37°C, 5 % CO₂. Chaque condition est réalisée en duplicats. Des puits contenant de l'actinomycine, du TNFα et des cellules servent de contrôle négatif et des puits contenant de l'actinomycine, du TNFα, un anticorps anti-TNFα (R&D Systems, Lille, France) et des cellules servent de contrôle positif.

J2 : Le lendemain, les surnageants sont retirés et 100 µl de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à 0,5 mg/ml sont ajoutés dans les puits. Après deux heures d'incubation à 37°C, 5 % CO₂, le MTT est retiré et le cristal au fond du puits est dilué avec 200 µl de Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). L'absorbance est ensuite mesurée par un spectrophotomètre à 570 nm (ThermoFisher, Scientific, Illkirch, France). On calcule ensuite le pourcentage de neutralisation pour chaque condition par la formule suivante :

$$\%Neutralisation = \frac{DO_{composé} - DOTNF\alpha}{DO_{Cellules} - DOTNF\alpha} \times 100$$

L'IC₅₀, dose pour laquelle on observe 50 % de l'activité du produit, est alors calculée à partir des pourcentages de neutralisation.

1.2.2. Mesure de la fluorescence intrinsèque du TNFα

Le TNFα possède une fluorescence intrinsèque du fait de la présence de tryptophane et de tyrosine dans sa séquence polypeptidique, lors d'une excitation à 290 nm. D'après He *et al.*, le composé SPD304 éteint la fluorescence du tryptophane et de la tyrosine en se plaçant à proximité de ces résidus, au niveau de la poche décrite¹³⁹. Notre composé, sélectionné pour sa capacité à se positionner au niveau de cette même poche et pour sa capacité à neutraliser le TNFα *in vitro*, a également été testé dans cette expérience.

Le composé est dilué à 10 mM dans du DMSO. Ensuite, le produit à différentes concentrations (allant de 5 µM à 100 µM) est mis en présence de 0,5 µM de TNFα dans 1 ml de PBS contenant 0,05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 1 % DMSO. On mesure la fluorescence intrinsèque du TNFα en l'excitant à 290 nm et en mesurant le pic d'émission à 322 nm par un spectrophotomètre à luminescence (Quantamaster QM4CW, Photon Technology International).

1.3. Expérimentations *in vivo*

1.3.1. Étude de la protection des inhibiteurs lors d'un choc septique au LPS/D-Galactosamine

Le choc septique au LPS/D-Galactosamine¹⁸² est un modèle de choc septique dépendant du TNF α . Les souris mutées pour le récepteur du TNF α sont résistantes à l'induction du choc septique et des anticorps anti-TNF α protègent les animaux. Nous avons donc utilisé ce modèle pour tester nos petites molécules inhibitrices du TNF α , préalablement sélectionnées sur les cellules L929, par un test de toxicité. Le choc septique au LPS/D-Galactosamine consiste en une injection intrapéritonéale d'une solution de 0,1 μ g – 0,2 μ g de LPS (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 20 mg de D-Galactosamine (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) dans 200 μ l de PBS (Pan Biotech, Brumath, France). Le LPS associé à la dose de D-Galactosamine induit la mort de l'animal dans les 24 heures suivant l'injection. La dose létale de LPS doit être déterminée avant chaque expérimentation, elle est de l'ordre de 0,1 μ g – 0,2 μ g de LPS par souris. La D-Galactosamine empêche la synthèse d'ARN messager au niveau des hépatocytes. En l'absence de signaux de survie cellulaire, le TNF α produit par l'injection de LPS va induire une apoptose massive des hépatocytes conduisant à la mort de la souris.

1.3.2. Traitement des souris par injection intrapéritonéale d'une solution de petites molécules

Des souris Balb/C (Charles River, L'Abresle, France) de 7 semaines sont injectées intrapéritonéalement avec une solution contenant 1 mg de composé dans 25 μ l de Cremophor® (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), 25 μ l d'éthanol absolu (Prolabo, Strasbourg, France), 50 μ l de PBS (Pan Biotech, Brumath, France). Huit heures après, les souris sont injectées avec une solution de 0,10 μ g à 0, 20 μ g de LPS (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) avec 20 mg de D-Galactosamine (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) dans 200 μ l de PBS. On effectue un dénombrement des animaux survivants 24 heures et 48 heures après l'injection de LPS/D-Galactosamine. Les animaux contrôles sont injectés avec 25 μ l de Cremophor®, 25 μ l d'éthanol absolu et 50 μ l de PBS.

1.3.3. Traitement des souris par gavage avec une solution de petites molécules

Des souris Balb/C (Charles River, L'Abresle, France) de 7 semaines sont gavées avec une solution contenant 10 mg de petites molécules dans 100 µl de DMSO. Huit heures après, les souris sont injectées intrapéritonéalement avec une solution de 0,10 µg à 0,20 µg de LPS (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) avec 20 mg de D-Galactosamine (ThermoFisher Scientific, France) dans 200 µl de PBS. On effectue un dénombrement des animaux survivants 24 heures et 48 heures après l'injection de LPS/D-Galactosamine. Les animaux contrôles sont gavés avec 100 µl de DMSO.

1.3.4. Étude de la protection des inhibiteurs lors d'un modèle de colite au Dextran Sulfate de Sodium

Le Dextran Sulfate de Sodium (DSS, MP Biochemicals, Illkirch, France) est un produit chimique provoquant une destruction de la muqueuse intestinale des animaux. Il en résulte une infiltration des parois par des bactéries de la flore intestinale, activant les cellules de l'immunité innée. Des cytokines proinflammatoires comme le TNF α sont produites provoquant une inflammation. Les symptômes sont une perte de poids, des selles molles avec présence de sang, on observe également une diminution de la longueur du colon¹⁸³. Après différents protocoles exploratoires, la dose de DSS induisant une diminution significative de la longueur du colon sans induire de mortalité a été déterminée, elle est de 3 %.

Des souris C57BL/6 de 20-22 grammes sont abreuvées avec 3 % de DSS dans l'eau de boisson tous les jours pendant 5 jours. À partir du sixième jour, les souris sont abreuvées avec de l'eau pendant 7 jours. Aux jours 1, 4, 7 et 11, elles reçoivent une injection intrapéritonéale d'une solution contenant 1 mg de composé dans 25 µl de Cremophor®, 25 µl d'éthanol absolu et 50 µl de PBS, le groupe contrôle recevant une injection de 25 µl de Cremophor®, 25 µl d'éthanol absolu et 50 µl de PBS. Au treizième jour, les souris sont sacrifiées et leur colon mesuré.

1.4. Optimisation chimique des molécules

Les optimisations chimiques des composés ont été réalisées au sein de l'équipe Chimie des Substances Naturelles de l'Université Paris Sud XI et de la chaire de Chimie Industrielle du Conservatoire National des Arts et Métiers.

2. Approche d'inhibition par vaccination anti-cytokines

2.1. Sélection des peptides, synthèse et couplage

2.1.1. Sélection des peptides

À partir des informations de structure disponibles dans une banque de données, la Protein Data Bank (PDB), les peptides sont choisis par le Docteur Matthieu Montes de l'équipe Drug Design. Les régions d'intérêt, pour la sélection de peptides, se situent au niveau des boucles ; en effet, un anticorps (spécifique, généré lors de la vaccination avec le peptide) empêchera la liaison de la cytokine au récepteur par encombrement stérique, même si le peptide choisi est éloigné du lieu d'interaction.

2.1.2. Synthèse des peptides

La production de peptides est effectuée par la société PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, France) spécialisée dans ce domaine. Les peptides sont assemblés en phase solide en utilisant la stratégie Fmoc/ter-butyl dans des synthétiseurs automatiques par un enchaînement d'étapes de couplage/déprotection des acides aminés. La synthèse peptidique repose sur la formation d'une liaison amide entre la fonction α -NH₂ d'une chaîne peptidique en croissance et la fonction COOH de l'acide aminé à coupler. Avant de démarrer le couplage, la fonction amine de l'acide aminé précédent doit être déprotégée pour permettre la liaison peptidique. Cette déprotection s'effectue en diméthylformamide contenant 25 % de piperidine. Le couplage a nécessité l'activation de la fonction COOH de l'acide aminé à ajouter, effectuée par des agents de couplage, le benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) et le N-HydroxyBenzotriazole (HOBt) dans un milieu de diméthylformamide (DMF) rendu basique par le diisopropyléthylamine (DIEA). Ce cycle de déprotection/couplage est répété jusqu'à

obtention de la séquence complète du peptide. À la fin de la synthèse, le peptide est totalement déprotégé et détaché de la résine par de l'acide trifluoroacétique (TFA).

2.1.3. Purification et analyse des peptides

Les peptides sont ensuite analysés par High Performance Liquid Chromatography (HPLC) avec une colonne hydrophobe et les fractions ayant une pureté supérieure à 85 % sont lyophilisées. Les peptides sont ensuite analysés par spectrométrie de masse.

2.1.4. Couplage des peptides à la KLH par le Bis-Diazotized Benzidine (BDB) ou le glutaraldéhyde (GA)

Les fonctions amines libres du peptide sont protégées avant la réaction de couplage. Le BDB, la KLH et le peptide sont ensuite incubés ensemble pendant 2 heures dans un tampon borate. Les amines des peptides sont ensuite déprotégées puis des dialyses contre le PBS sont effectuées afin de purifier les peptides.

Le peptide, la KLH et le glutaraldéhyde sont incubés pendant une heure puis des dialyses contre le PBS sont effectués afin de purifier les peptides.

L'utilisation de l'un ou l'autre des agents dépend de la séquence du peptide. En effet, le BDB se fixe préférentiellement à une tyrosine et le glutaraldéhyde sur les α -NH₂ ou les lysines¹⁸⁴. Dans nos exemples de peptides, le glutaraldéhyde est fixé en position N-terminale et le BDB en position C-terminale.

Les peptides sélectionnés sont dans un premier temps des peptides dérivant de la séquence murine du TNF α . Après des tests d'immunogénicité chez la souris, les équivalents humains des peptides les plus immunogènes sont synthétisés (si les séquences murines et humaines sont différentes) et testés chez l'animal.

2.2. Étude de l'immunogénicité des peptides chez la souris

2.2.1. Protocole d'immunisation

Afin de sélectionner les meilleurs peptides candidats pour un modèle animal, une étude de l'immunogénicité des différents peptides est réalisée. Des groupes de quatre souris

OF1 (Oncin France 1, Charles River Laboratories, L'Abresle, France) par peptide sont acclimatés pendant une semaine à l'animalerie avant d'être immunisés en intramusculaire (cuisse) avec 100 µg de peptide couplé à la KLH dans 50 µl de Complete Freund Adjuvant (CFA, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 50 µl de PBS. Trois rappels aux jours 14, 28 et 42 sont effectués avec 100 µg de peptide dans 50 µl d'Incomplete Freund Adjuvant (IFA, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 50 µl de PBS. Au jour 52, les animaux sont sacrifiés et le sang est ponctionné par prélèvement intracardiaque.

2.2.2. Préparation des sérums

Après le prélèvement intracardiaque, les tubes contenant le sang sont incubés à température ambiante pendant 30 minutes afin de permettre la coagulation. Les tubes sont ensuite centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 minutes. Les surnageants sont prélevés et centrifugés de nouveau à 14 000 rpm pendant 10 minutes. Les sérums obtenus sont ensuite congelés à -80°C.

2.2.3. Détermination des titres anticorps par ELISA direct à partir d'échantillons de souris ou de lapin

Afin de déterminer si un peptide est immunogène, les sérums de souris immunisées sont utilisés pour déterminer le titre₅₀ des anticorps anti-peptide produits par une méthode d'Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) direct. La même méthode est utilisée pour déterminer si les anticorps produits sont capables de reconnaître la cytokine dont sont issus les peptides.

50 ng de cytokine ou 100 ng de peptide sont déposés au fond des puits d'une plaque ELISA (Nunc, Brumath, France) dans 100 µl de PBS et incubés une nuit à 4°C.

Le lendemain, les plaques sont lavées deux fois avec 200 µl de PBS/Tween 0,05 % (tampon de lavage) et incubées à température ambiante avec 200 µl de sérum albumine bovine (BSA, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à 2 % dans du PBS.

Les plaques sont ensuite lavées avec le tampon de lavage et incubées avec les sérums à différentes dilutions dans 100 µl de PBS/BSA à 1 % pendant 2 heures à température ambiante.

Après un lavage, les plaques sont incubées avec un anticorps secondaire (P.A.R.I.S, Compiègne, France) dilué au 1/500^{ème} dirigé contre les IgG de l'espèce considérée (souris ou lapin) dans 100 µl de PBS/BSA 1 %, pendant 2 heures à température ambiante. L'anticorps secondaire est couplé à une enzyme, la peroxidase de raifort (HRP)

Après un dernier lavage, la révélation est effectuée avec 100 µl de 3,3',5,5' Tetraméthylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) ; la réaction est ensuite arrêtée avec 50 µl d'acide sulfurique à 1M. La densité optique à 450 nm est ensuite lue avec un spectrophotomètre.

Les puits contrôles subissent le même traitement que les échantillons mais en remplaçant les sérums par du PBS/BSA 1 % (tampon de dilution).

Les titres₅₀ anticorps sont ensuite calculés. Ils représentent la dilution pour laquelle on obtient 50 % du signal maximal et permettent de donner une valeur relative de la quantité d'anticorps anti-peptide ou anti-cytokine dans un échantillon donné.

2.3. Étude de l'immunogénicité des peptides chez le lapin

Les tests de neutralisation nécessitent une quantité importante d'anticorps afin de tester différentes dilutions. C'est pourquoi nous avons immunisé des lapins New Zealand contre des peptides du TNF α . Les immunisations ainsi que la purification des sérums ont été réalisées par la société Biotem (Lyon, France).

2.3.1. Protocole d'immunisation

Des lapins New Zealand sont immunisés avec 150 µg de peptide couplé à la KLH par lapin émulsionné en CFA en injection intra-dermique. Des rappels aux jours 14, 28, 56 et 70 sont réalisés en émulsionnant le peptide dans de l'IFA en injection sous-cutanée. Au jour 72, les animaux sont sacrifiés et le sérum prélevé.

2.3.2. Purification des anticorps anti-peptides

Le sérum de chaque lapin est purifié par chromatographie d'affinité sur des billes recouvertes de protéine A, retenant préférentiellement les IgG. Les anticorps sont ensuite

élués, aliquotés et stockés à -20°C dans un tampon phosphate 10 mM – NaCl 0,15 M à pH 7,4.

2.3.3. Test de neutralisation du TNF α par les anticorps purifiés de lapin

Le test de neutralisation de l'activité biologique du TNF α utilisé pour les petites molécules peut également être utilisé pour déterminer la capacité neutralisante des anticorps de lapin immunisé contre un peptide du TNF α .

Le protocole reste identique, à l'exception que différentes dilutions d'anticorps de lapin sont testées. Un contrôle anticorps de lapin sans TNF α est nécessaire pour déterminer l'effet de l'anticorps purifié seul sur les cellules.

Le même test peut également être utilisé pour déterminer la capacité neutralisante des anticorps contenus dans le sérum de souris immunisées.

-C-

Résultats

1. Approche d'inhibition du TNF α par les petites molécules

Par une approche de drug design, un criblage *in silico* de petites molécules à visée anti-TNF α a été effectué par des méthodes basées sur la structure du TNF α . D'une bibliothèque de 700 000 composés, 1 000 ont été sélectionnés afin d'être évalués dans un test de neutralisation de l'activité biologique du TNF α . Des analogues ont ensuite été générés à partir des meilleurs composés *in vitro* par une méthode de ligand-based. Les meilleurs analogues ont ensuite été testés dans un modèle de choc septique au LPS/D-Galactosamine avec deux différentes voies d'administration : la voie intrapéritonéale (injection) et la voie *per os* (gavage).

J'ai réalisé deux articles sur ce travail, qui constituent le corps principal de cette thèse. Le premier article porte sur un composé actif à la fois *in vitro* et *in vivo* dans deux modèles animaux. Jamais un tel inhibiteur direct du TNF α actif *in vivo*, et aussi oralement, n'a été décrit à ce jour. Ce travail a été soumis à Nature Medicine (sous le format court ci-après) qui ne l'a pas retenu et nous envisageons donc de le soumettre au journal *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Un deuxième article a été réalisé sur la synthèse chimique d'analogues du meilleur composé actif *in vitro*, et il devrait être soumis prochainement à *J. Med. Chem.*

1.1. Première publication

« Petite molécule inhibitrice du TNF α active par voie orale »

En préparation pour soumission à *Proceedings of the National Academy of Sciences*

➤ Résumé français du travail

Depuis plus de dix ans, les thérapies par immunisation passive par anticorps (infliximab, adalimumab) ou récepteur soluble (etanercept) anti-TNF α ont fait leurs preuves dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies de l'intestin ou le psoriasis. Ils permettent de freiner la maladie et d'améliorer la qualité de vie des patients. Cependant, ces traitements peuvent présenter des inconvénients importants comme des effets secondaires (augmentation des infections), l'apparition de résistance nécessitant un changement de traitement, et aussi des coûts prohibitifs pouvant atteindre 15 000 € par an. Une approche thérapeutique à base de petites molécules pourrait réduire ces inconvénients mais jusqu'à présent, aucun petit composé ciblant directement le TNF α n'a été commercialisé.

Dans ce travail, nous présentons une petite molécule sélectionnée par criblages *in silico* (structure-based et ligand-based drug design) ciblant la poche du trimère du TNF α décrite par He *et al.*, *Science*, en 2005¹³⁹. Nous avons montré que ce composé, un dérivé de benzène sulfonamide, était bien spécifique du TNF α (humain et murin) par des tests de neutralisation de l'activité biologique de la cytokine et par la mesure de la fluorescence intrinsèque du tryptophane.

Cette molécule a été testée *in vivo* dans le modèle murin de choc septique au LPS/D-Galactosamine et dans le modèle murin de colite au DSS. Elle a permis une protection totale des animaux contre le choc septique suite à des injections intrapéritonéales et aussi par gavage, ainsi qu'une amélioration de la taille des colons chez les animaux développant une colite.

Ces résultats valident la possibilité d'utiliser, pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques, des petites molécules qui ciblent directement le TNF α , agissant de manière similaire aux anticorps monoclonaux, et constituant donc une alternative séduisante aux thérapies biologiques actuelles.

***In Vivo* Orally Active Small-Molecule Inhibitors of TNF α .**

Matthieu Montes^{1*}, Hadley Mouhsine^{1,2*}, Hélène Guillemain^{1,2}, Gabriel Moreau¹, Bruno Baron³, Aurélien Latouche⁴, Nesrine Ben Nasr¹, Lucille Desallais¹, Rojo Ratsimandresy¹, Jean-Louis Spadoni¹, Hervé Do¹, Patrick England³, Jean-François Zagury^{1#}

¹Chaire de Bioinformatique, Laboratoire Génomique, Bioinformatique et Applications, EA 4627, Conservatoire National des Arts et Métiers, 292 rue Saint Martin, 75003 Paris, FRANCE

²Vaxconsulting SARL, 66 avenue des Champs-Elysées, 75008, Paris, France

³Plate-forme de Biophysique des Macromolécules et de leurs Interactions , Proteopole Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris

⁴Equipe MSDMA, Centre d'études et de recherche en informatique et communications, EA 4629, Conservatoire National des Arts et Métiers, 292 rue Saint Martin, 75003 Paris, FRANCE

*These authors contributed equally to this work

#To whom correspondence should be addressed : Prof Jean-François Zagury, MD, PhD, e-mail : zagury@cnam.fr

ABSTRACT

TNF α is a key cytokine associated with chronic inflammatory diseases, whose direct targeting by protein biotherapies has been an undeniable success of biotech companies. In a quest for equally effective small molecule drugs, we identified by *in silico* screening a new family of compounds that bind TNF α and inhibit its activity *in vitro* and *in vivo*, orally and intraperitoneally. This breakthrough could open avenues for innovative TNF α -targeted therapeutics.

Tumor Necrosis Factor α (TNF α) is a key cytokine of the immune system mainly involved in inflammation, host defense against infections, regulation of the immune system and tumor regression^[1,2]. The overproduction of TNF α has been notably associated with chronic inflammatory diseases notably rheumatoid arthritis, Crohn's disease or Psoriasis^[2]. Protein biotherapies targeting TNF α have been a revolution for the treatment of chronic inflammatory diseases with anti-TNF α monoclonal antibodies (infliximab, adalimumab) or soluble receptors of TNF α (etanercept). However, these biotherapies present several drawbacks including side-effects^[3], treatment resistance, and prohibitive costs (up to \$20,000 per patient per year)^[4], that could be addressed by small molecule-based therapies. However, despite many efforts^[5-10], no small molecule drug targeting TNF α has been released so far. We report here a new family of small molecules that inhibit TNF α *in vitro* and are active intraperitoneally and *per os* in TNF α -linked animal models. These molecules could represent lead compounds to treat chronic inflammatory diseases.

We have used high-throughput *in silico* screening approaches to identify small molecules targeting a binding pocket of the TNF α identified by He *et al.*^[9] in 2005 (Supplementary Figure 1). We carried out a hierarchical *in silico* and *in vitro* screening of a collection of 700,000 commercially available compounds using the TNF α structure as a template (Supplementary Figure 2): this led to the identification of benzene sulfonamide derivatives represented by compound 1 (Figure 1).

First, we demonstrated that compound 1 could enhance in a dose-dependent manner the intrinsic tryptophan fluorescence (ITF) of TNF α , confirming that it could bind directly to the TNF α trimer (Figure 2). Interestingly, the previously described compound SPD304, active only *in vitro*, induces an opposite ITF quenching^[9], suggesting that the TNF α binding mode of both compounds are different.

Second, compound 1 inhibited the induction of apoptosis by TNF α in the L929 cell line with an IC₅₀ of 12 μ M without exhibiting any cellular toxicity at 100 μ M (Figure 3). The targeted pocket is identical in both human and murine cytokines and accordingly, we found that compound 1 inhibited both human and murine TNF α with similar IC₅₀s. This aspect is important to explain why our compound could be directly tested in mouse models.

The *in vivo* activity of compound 1 was assessed using two different TNF α -linked murine disease models: the LipopolySaccharide-DGalactosamine (LPS-DGal) septic shock assay^[11] and the Dextran Sulfate Sodium (DSS)-induced colitis assay^[12]. As shown in figure 2A, in the LPS/D-Gal septic shock mouse model, compound 1 exhibited a fully protective effect with an

intraperitoneal injection of 1 mg per mouse ($p < 7.10^{-4}$). In comparison, etanercept, one of the reference anti-TNF α protein biotherapies, showed a similar protection at 600 μ g per mouse. In addition, we observed a fully protective effect with a *per os* administration of 5 mg of compound 1 per mouse 8 hours before the induction of the shock ($p < 4.10^{-3}$, Figure 2B). These results demonstrate that compound 1 has a highly protective activity *in vivo* and suggest that it has an acceptable level of oral bioavailability.

In the DSS-induced colitis assay (Figure 2C), compound 1 also exhibited a protective effect, as repeated intraperitoneal injections of compound 1 resulted in the maintenance of mice colon lengths compared to the controls ($p < 5.10^{-3}$).

Using an *in silico/in vitro* screening approach, we have thus identified a novel compound that inhibits TNF α directly and is active both *in vitro* and *in vivo*. Other small molecules targeting TNF α have been described previously^[9,10] but, to our knowledge, this is the very first protein-protein interaction inhibitor that provides significant protection in animal models. In the septic shock assay, the effect of compound 1 was comparable with that of the reference anti-TNF α soluble receptor, etanercept. In the colitis model, our compound was efficient (no shortening of the colon) but less significantly than in the septic shock model. This can be explained by the two following reasons 1. the compound was administered only once every three days in the colitis test, and 2. unlike in the septic shock model, the TNF α pathway is not mandatory in the colitis model.

The compound described in this report constitutes a considerable step forward for the development of alternative therapeutics to the biologics currently used to treat chronic inflammatory diseases, with its demonstrated oral availability that would make it a first-in-class. As shown by the undeniable success of anti-TNF α protein biotherapies, TNF α is an attractive drug target for the treatment of chronic inflammatory diseases. Small molecule drugs targeting directly TNF α would potentially provide several advantages over biologics: first of all, easier compliance and lower production costs, but also the possibility to stop treatment immediately in case of adverse side-effects and an additional class of therapeutics to fight resistance arising in patients. Our work shows it is feasible to develop bioavailable small molecule anti-cytokine inhibitors that could be efficient alternatives to the powerful biologics used since 15 years.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials, cell line and mice

Compounds were obtained from Chembridge (San Diego, CA, USA). Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Lipopolysaccharide (LPS), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) and Cremophor® EL were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Human TNF α was obtained from R&D Systems (Lille, France). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin-Streptomycin, L-Glutamine and Phosphate Buffered Saline were obtained from Pan Biotech (Brumath, France). Absolute ethanol was obtained from Prolabo (Strasbourg, France). Actinomycin D and D-Galactosamine were obtained from Fisher (Illkirch, France). Dextran Sodium Sulfate (36,000 – 50,000) was obtained from MP Biochemicals (Illkirch, France) L929 cell line has been grown in the Laboratory for years. 7 weeks-old female Balb/C mice and 18-22 grs female C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Mice used in all experiments were handled according to the guidelines and approved protocols of the Direction Départementale de Protection des Populations, Paris, France.

***In silico* screening**

Structure preparation. The binding site has been defined at 4 Å around the co-crystallized SPD304 ligand in the structure of the TNF α dimer (PDB id: 2AZ5, Supplementary Figure 1). Hydrogen atoms were added using Chimera^[13].

Compound collection. The 900.000 compounds Chembridge screening compound collection was retrieved from www.hit2lead.com. After an ADME-tox filtering using FAF-drugs2^[14], 700.000 compounds were selected to constitute our commercially available drug-like compound collection.

Structure-based virtual screening. Molecular docking was performed using Surflex-dock version 2.5^[15]. Surflex-dock is based on a modified Hammerhead fragmentation / reconstruction algorithm to dock compounds flexibly into the binding site. The query molecule is decomposed into rigid fragments that are superimposed to the Surflex-protomol *i.e.*, molecular fragments covering the entire binding site. The docking poses are evaluated by an empirical scoring function.

Ligand-based virtual screening. Ligand-based virtual screening was performed using the 2D/3D similarity search methods implemented in the webservice provided by www.hit2lead.com. Analogues identifications were performed using 2D and 3D similarity

search with a 60% 2D or 3D similarity cut-off. Compounds were selected for experimental tests after a careful visual inspection of the retrieved analogues.

Measurement of TNF α intrinsic fluorescence.

All samples were brought to 10 mM phosphate buffer, 0.05% Tween 20, 1% DMSO. Fluorescence readings were made with a Quantamaster QM4CW luminescence spectrometer, (Photon Technology International) by exciting TNF α at 290 nm and measuring the emission peaks at 322 nm. Compound 1 inner filter effects were corrected using absorbance measurements of compound alone solutions at 290 and 322 nm.

Neutralization of cellular TNF α induced apoptosis.

The biological activity of TNF α was assessed by its apoptotic activity on L929 cells. The neutralization assay consisted in mixing TNF α with the potential inhibitor, incubating the mixture for 2 hours, and then testing its apoptotic activity.

80 % confluent L929 cells were plated in flat bottom plates at 4×10^5 cells per well in 100 μ l of DMEM medium containing 10 % FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin - 100 μ g/ml Streptomycin and incubated for one night at 37°C, 5 % CO₂. TNF α (150 pg/ml), Actinomycin D (4 μ g/ml) and the compounds at different concentrations (ranging from 100 μ M to 0,1 μ M) were mixed in 150 μ l complete DMEM medium in U-bottom plates. After two hours incubation at 37°C, 5 % CO₂, 100 μ l of the mix was added to the plated cells and incubated at 37°C, 5 % CO₂ for 24 hours. A negative control was also used by incubating TNF α with no compound. Each point was done in duplicate (the test was highly reproducible).

Supernatants were discarded and 100 μ l of MTT at 0,5 mg/ml were added to wells. After two hours, supernatants were discarded and 200 μ l of DMSO were then added. Plates were read at 570 nm with a spectrophotometer providing the optical density (OD) of each well. The percentage of neutralization (%Neutra) by a compound was calculated as follows :

$$\%Neutra = \frac{OD_{compound} - OD_{TNF\alpha}}{OD_{cells} - OD_{TNF\alpha}} \times 100$$

An IC₅₀ could be computed from the percentage of neutralization for each compound.

LPS/D-Galactosamine induced lethal septic shock

7 weeks-old Balb/C mice were injected intraperitoneally with 100 µl of a solution containing A. 25 % Cremophor® EL, 25 % absolute ethanol, 50 % PBS and various doses of compound 1 (1 mg to 0.25 mg) or B. 25 % Cremophor® EL, 25 % absolute ethanol, 50 % PBS alone (compound 1 vehicle) or C. 0.6mg of etanercept or D. PBS alone (etanercept vehicle). Eight hours after, the mice received an intraperitoneal injection of 0,1 µg of LPS and 20 mg of D-Galactosamine in 200 µl of PBS. For each condition, groups of 8 mice were used. Mice survival was monitored during 48 hours after the injections.

A similar test was done *per os*, by force-feeding 7 weeks-old mice with 100 µl of a solution of DMSO containing various doses of compound 1 (5 mg down to 0.5 mg) 8 hours before receiving an intraperitoneal injection of 200 µl of PBS containing 0,1 µg of LPS and 20 mg of D-Galactosamine. A control group (vehicle) was force-fed with 100 µl of a sonicated solution of DMSO alone 8 hours before to be injected with 200 µl of a LPS/D-Galactosamine solution. Mice survival was monitored during 48 hours after the injection of LPS/D-Galactosamine.

Colitis induced by Dextran Sulfate Sodium (DSS)

18-22 g female C57BL/6 mice received 3% DSS in water for 5 days followed by 7 days of water. At Day 1, Day 4, Day 7 and Day 11, mice received an intraperitoneal injection of 100 µl of A. 1 mg of compound 1 in 25 % Cremophor® EL, 25 % absolute ethanol, 50 % PBS or B. 25 % Cremophor®, 25 % absolute ethanol, 50 % PBS alone (compound 1 vehicle). A control group (water) did not drink any DSS and only received PBS i.p.

At Day 13, mice were sacrificed, and their colons were harvested and measured. For each condition, groups of 8 mice were used.

Statistics

For the LPS-DGal septic shock assay, one-tailed p-values were calculated using Fisher's exact test. For the DSS induced colitis assay, the equality of variances was investigated by a F-test and was rejected for compound 1 vs PBS at 0.02 level. Thus, to compare the difference between the means of each sample accounting for unequal variance, we used a two-sided Welch t-test at a 0.05 significance level. For Compound 1 vs PBS the t-test is statistically significant (observed value $t=3.07$, $df=23.4$) with $p < 0.005$ (95% Confidence Interval [0.166; 0.848]).

REFERENCES

- [1] K. Pfeffer, *Cytokine Growth Factor Rev* **2003**, *14*, 185.
- [2] B. B. Aggarwal, *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 745.
- [3] R. M. Fleischmann, I. Iqbal, R. L. Stern, *Expert Opin Drug Saf* **2004**, *3*, 391.
- [4] P. P. Sfikakis, G. C. Tsokos, *Clin Immunol* **2011**, *141*, 231.
- [5] H. Choi, Y. Lee, H. Park, D. S. Oh, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 6195.
- [6] C. H. Leung, D. S. Chan, M. H. Kwan, Z. Cheng, C. Y. Wong, G. Y. Zhu, W. F. Fong, D. L. Ma, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 765.
- [7] F. Mancini, C. M. Toro, M. Mabilia, M. Giannangeli, M. Pinza, C. Milanese, *Biochem Pharmacol* **1999**, *58*, 851.
- [8] R. Alzani, A. Corti, L. Grazioli, E. Cozzi, P. Ghezzi, F. Marcucci, *J Biol Chem* **1993**, *268*, 12526.
- [9] M. M. He, A. S. Smith, J. D. Oslob, W. M. Flanagan, A. C. Braisted, A. Whitty, M. T. Cancilla, J. Wang, A. A. Lugovskoy, J. C. Yoburn, A. D. Fung, G. Farrington, J. K. Eldredge, E. S. Day, L. A. Cruz, T. G. Cachero, S. K. Miller, J. E. Friedman, I. C. Choong, B. C. Cunningham, *Science* **2005**, *310*, 1022.
- [10] D. S. Chan, H. M. Lee, F. Yang, C. M. Che, C. C. Wong, R. Abagyan, C. H. Leung, D. L. Ma, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49*, 2860.
- [11] M. A. Freudenberg, C. Galanos, *Infect Immun* **1991**, *59*, 2110.
- [12] S. Melgar, L. Karlsson, E. Rehnstrom, A. Karlsson, H. Utkovic, L. Jansson, E. Michaelsson, *Int Immunopharmacol* **2008**, *8*, 836.
- [13] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1605.
- [14] D. Lagorce, O. Sperandio, H. Galons, M. A. Miteva, B. O. Villoutreix, *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 396.
- [15] A. N. Jain, *J Med Chem* **2003**, *46*, 499.

FIGURES

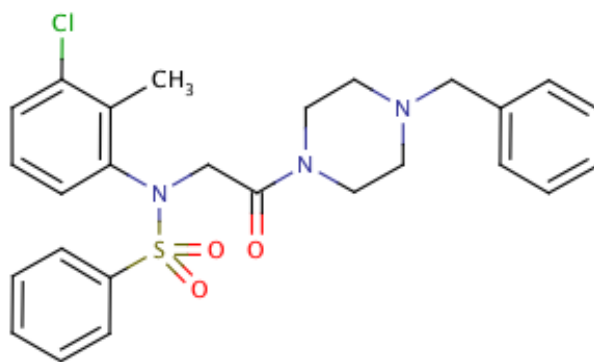


Figure 1: Structure of compound 1.

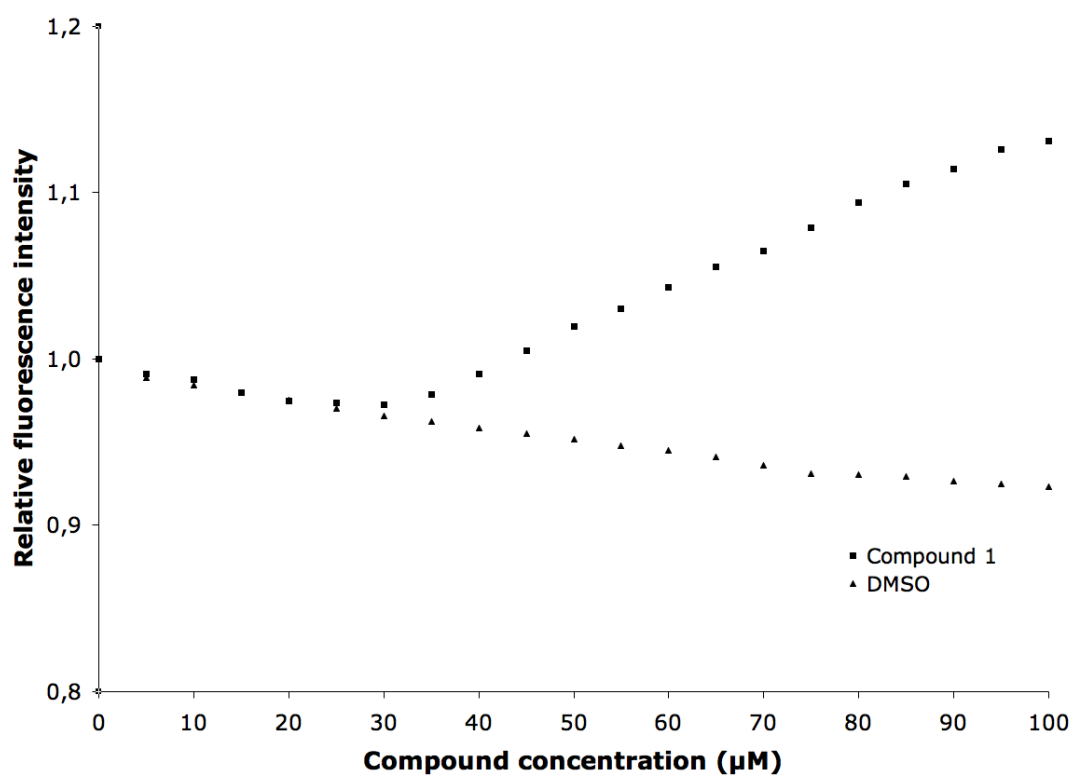


Figure 2: Intrinsic Tryptophan Fluorescence of 0,5 µM TNFα diluted in Phosphate Buffered Saline in the presence of DMSO alone or compound 1 (5 – 100 µM) in DMSO.

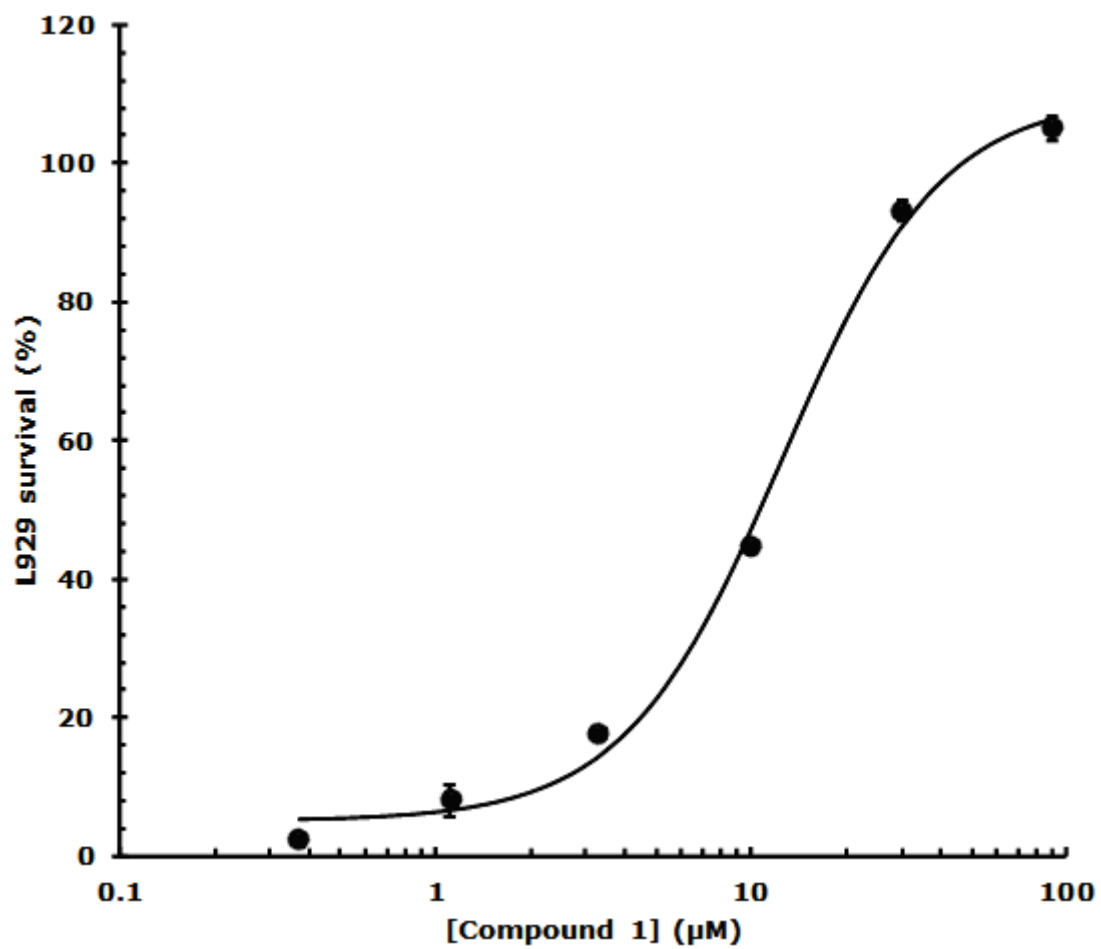


Figure 3: Compound 1 inhibition of TNF α induced apoptosis in L929 cell line. Data represent cell survival in presence of different concentrations of compound 1. IC₅₀=12 μ M.

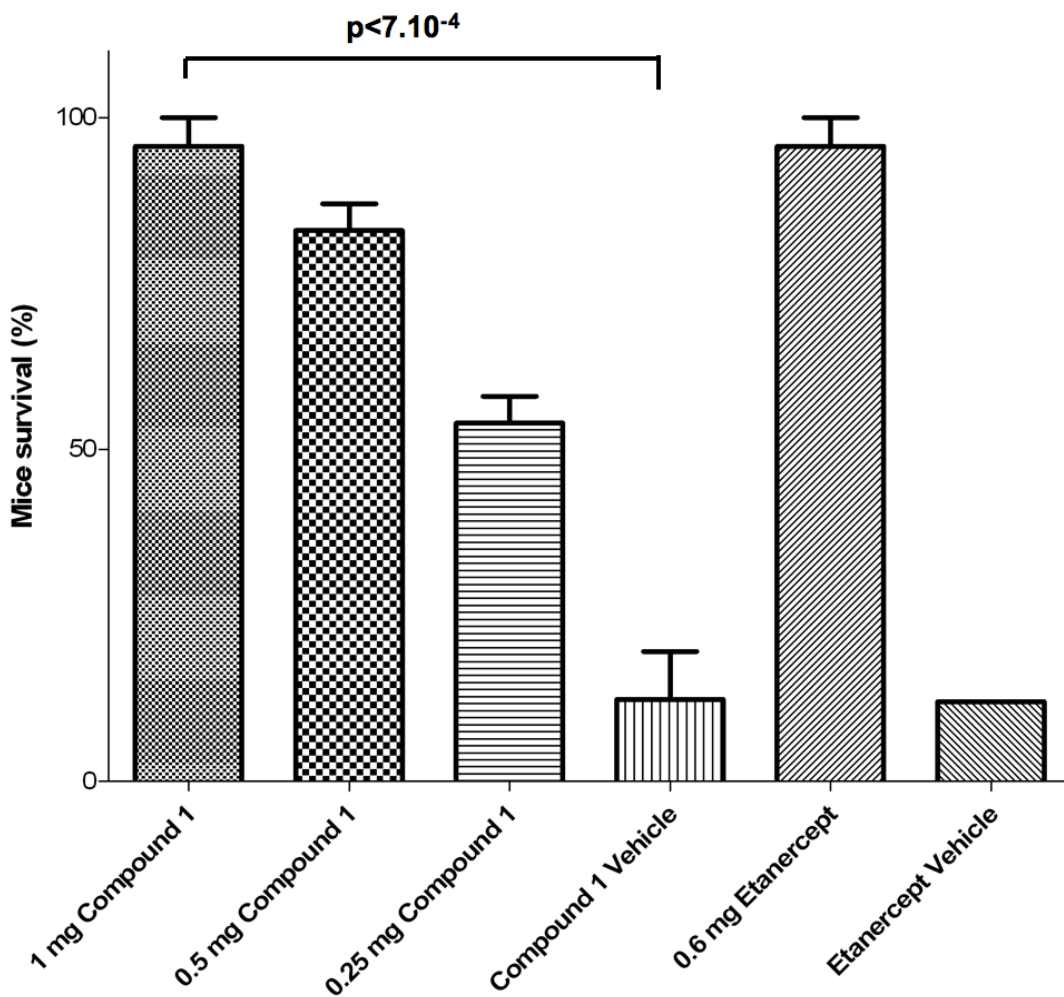


Figure 4: Effect of compound 1 in an *in vivo* murine model of LPS/D-Galactosamine induced septic shock. Mice survival after an intraperitoneal injection of LPS/D-Galactosamine and different doses of compound 1. Groups of eight mice were used. Values are mean \pm s.e.m.

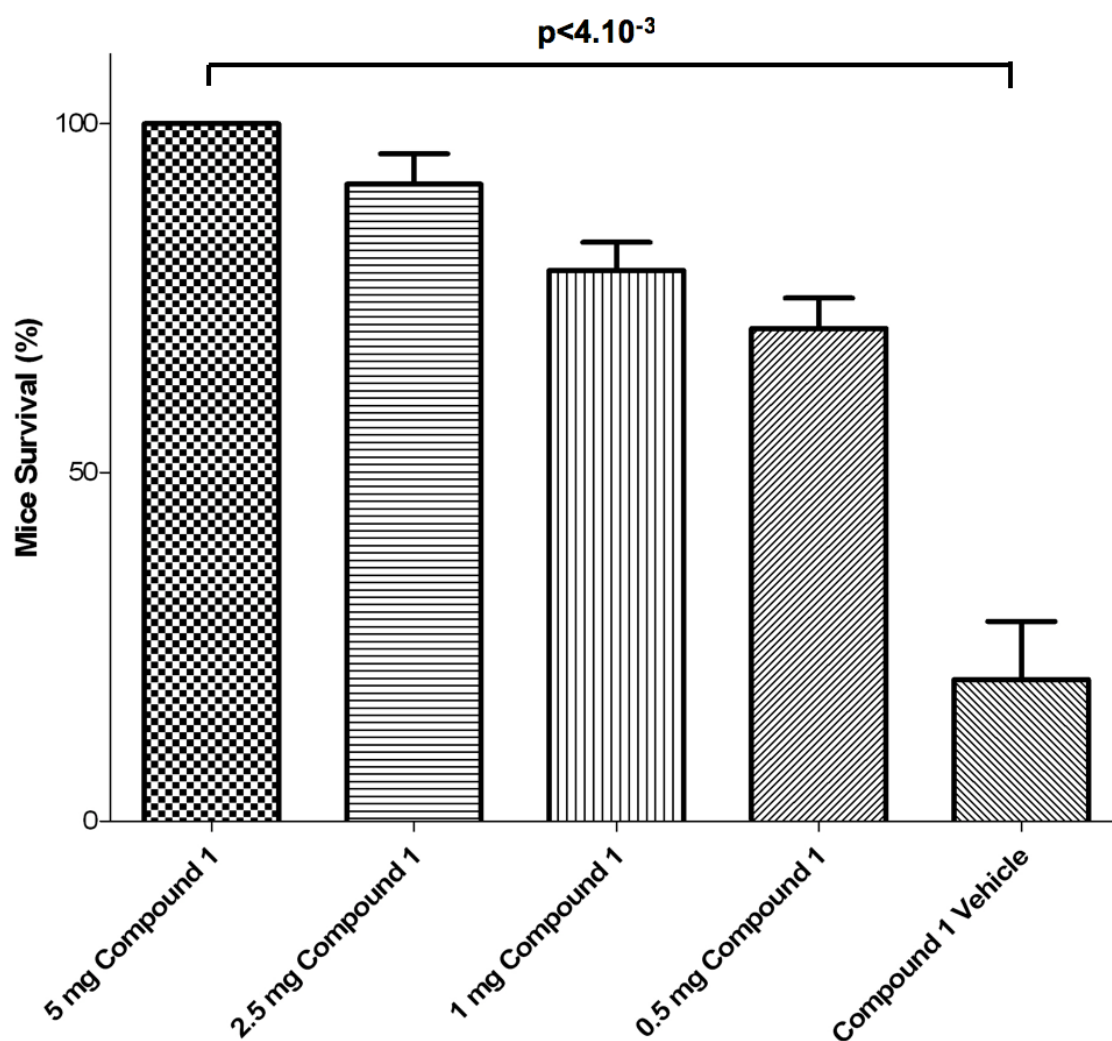


Figure 5: Effect of compound 1 in an *in vivo* murine model of LPS/D-Galactosamine induced septic shock. Mice survival after force-feeding with different doses of compound 1 and an intraperitoneal injection of LPS/D-Galactosamine. Groups of eight mice were used. Values are mean \pm s.e.m.

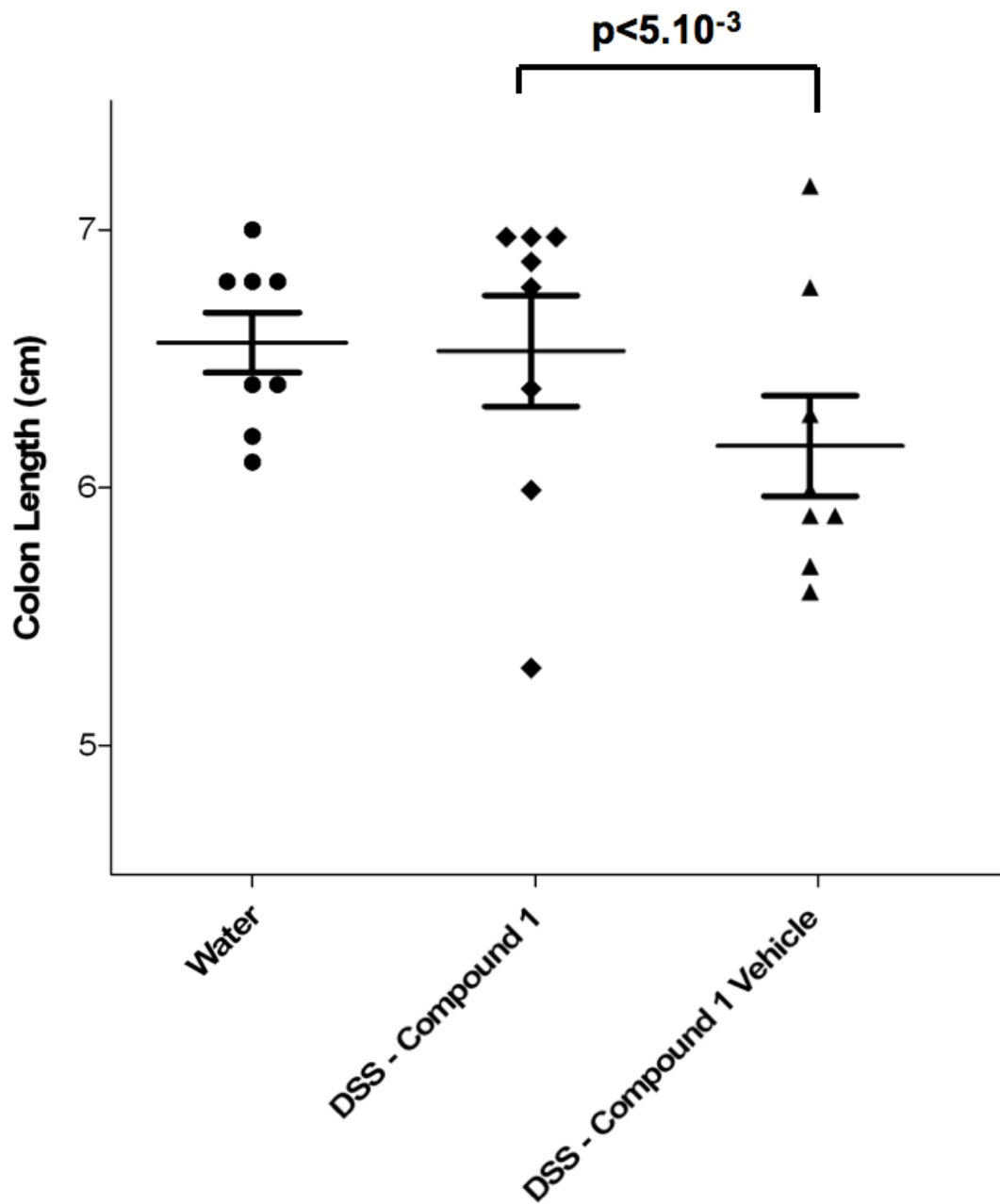
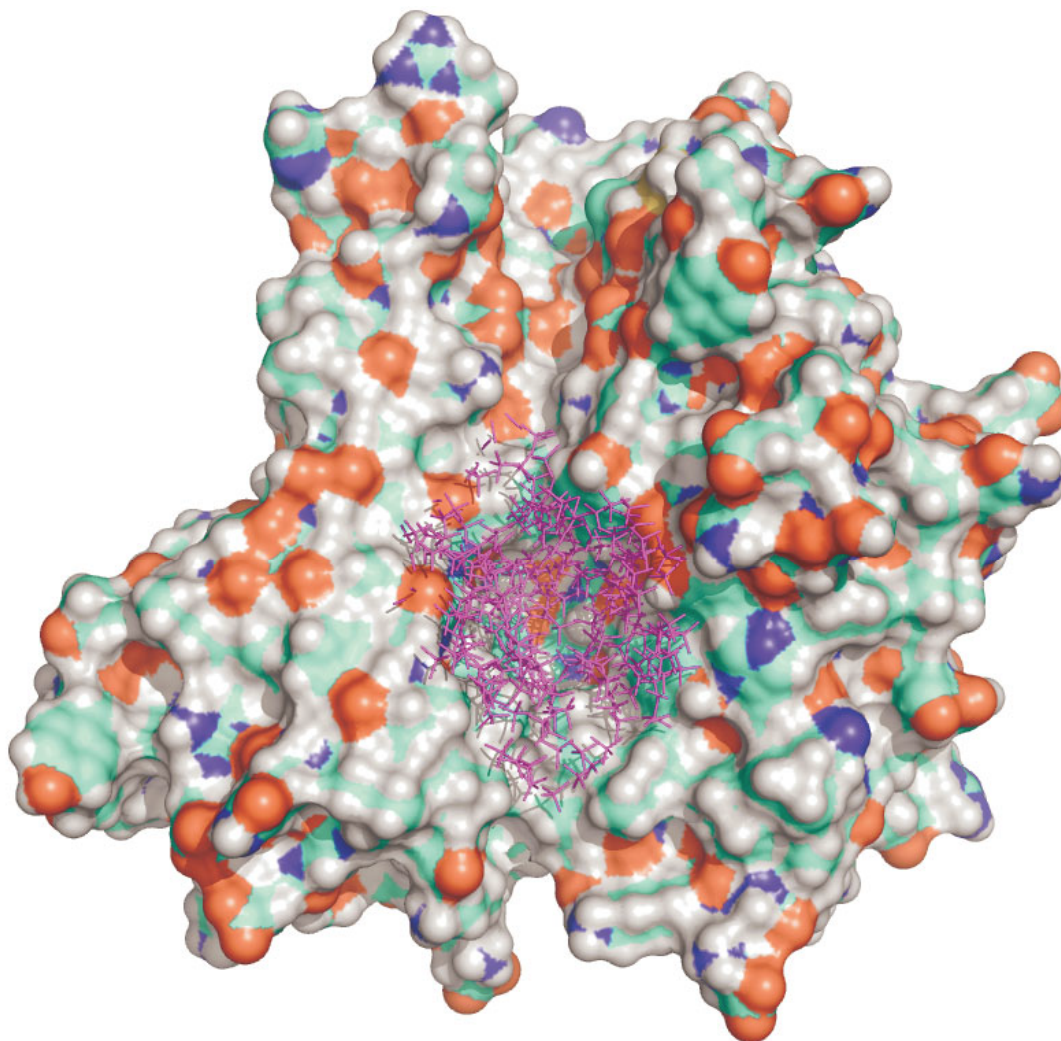
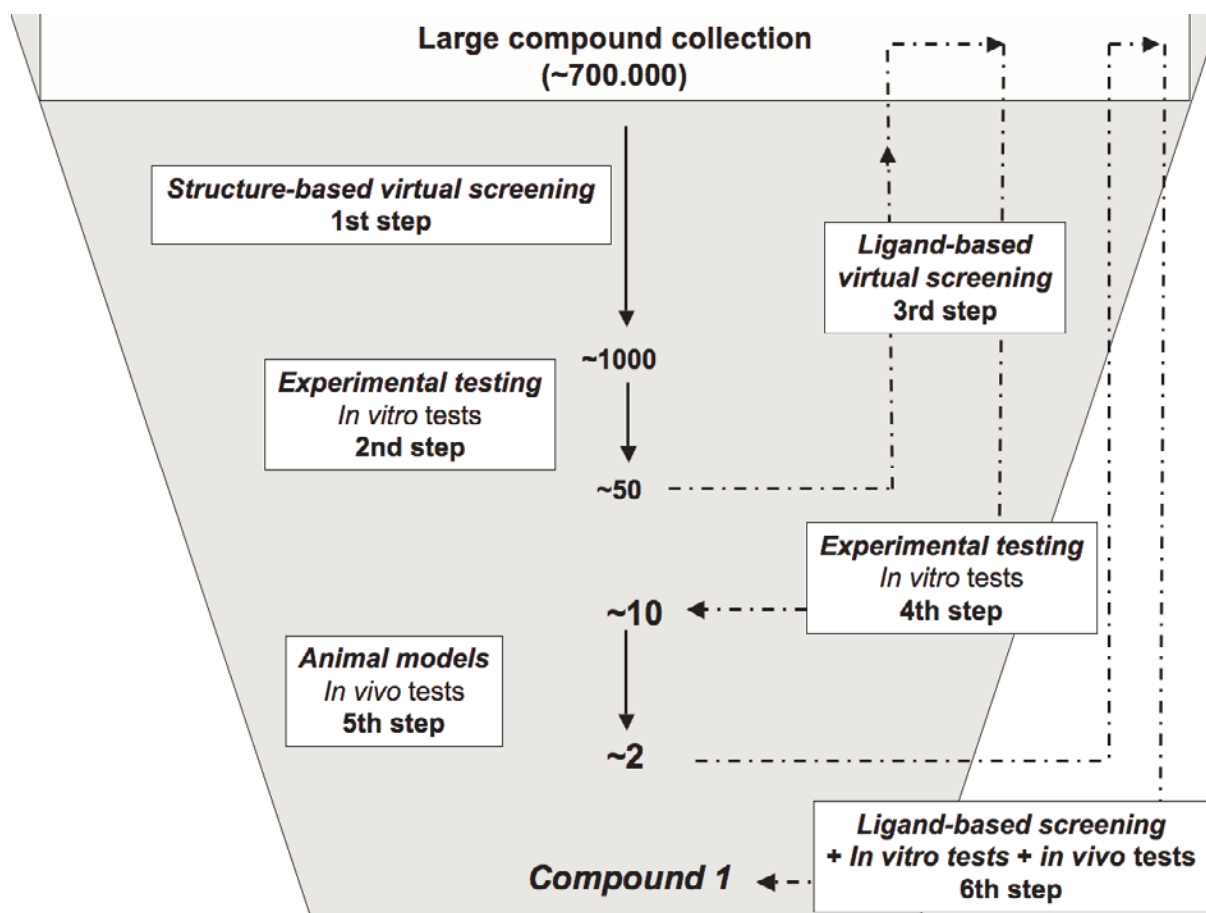


Figure 6: Effect of compound 1 in an *in vivo* murine model of DSS induced acute colitis. Colon length after 5 days of 3% DSS followed by 7 days of water. Compound 1 was injected intraperitoneally every three days as control groups. Groups of eight mice were used. Values are mean \pm s.e.m.



Supplementary Figure 1 : Binding pocket defined for the structure-based virtual screening procedure. The binding pocket was defined as the region 4 Å around the co-crystallized ligand SPD304 in the TNF α structure identified by He *et al.* (PDBid =2AZ5). The « protomol » that constitutes the conformational space, that was explored with surflex-dock is displayed in magenta.



Supplementary Figure 2 : compound 1 identification protocol. 1st step : A collection of 700,000 drug-like commercially available compounds was screened *in silico*. Molecular docking was performed using Surflex-dock version 2.5. A visual inspection of the top scoring compounds was performed in order to select a 1000 compound hit list for experimental testing. 2nd step: The compounds composing the hit list selected were purchased from the chemical supplier. Their inhibitory activity was evaluated *in vitro* on human TNF α . These *in vitro* experiments led to the identification of top hits: active compounds with an IC₅₀ between 1 and 100 μ M. 3rd step: Using ligand-based virtual screening methods, we searched in our compound collection for analogues of the top hits identified after step 2. Up to 100 analogues were found per top hit. 4th step: The analogues were purchased from the chemical supplier. As in step 2, their inhibitory activity was evaluated *in vitro* on human TNF α . Their activity was also confirmed on murine TNF α in view of a further evaluation on mice models. The 10 best compounds after these 4 steps were selected as drug candidates for *in vivo* evaluation on mice models. 5th step: The *in vivo* evaluation of the drug candidates was performed in the TNF α -dependent septic shock model triggered with LPS/D-Galactosamine using two different administration modes: intraperitoneal injection and force feeding. After this step, 2

compounds sharing the same structural scaffold were selected. 6th Step: Using ligand-based screening methods, we searched in our large compound collection for new analogues of the two best compounds identified after step 5. Up to 1000 analogues were identified and purchased from the chemical supplier. As in step 2, their inhibitory activity was evaluated *in vitro* on human and murine TNF α . The 9 best compounds were evaluated *in vivo* in our murine septic shock assay by force feeding as described in step 5. The best compound identified after the 6th step is compound 1.

Lors du criblage *in vitro*, sur cellules L929, un des meilleurs composés ayant une IC₅₀ de 1,5 µM s'est avéré non protecteur lors d'un choc septique au LPS/D-Galactosamine. Toutefois, ce produit ayant un potentiel anti-TNFα fort du fait de sa faible IC₅₀ et de son absence de toxicité à 100 µM, nous avons décidé de l'optimiser et tenter d'obtenir une protection lors d'un choc septique au LPS/D-Galactosamine.

1.2. Deuxième publication

« Design, synthèse et évaluation biologique de composés anti-TNFα à faible concentration »

En préparation pour soumission à *Journal of Medicinal Chemistry*

➤ Résumé français du travail

Depuis plus de 10 ans maintenant, les thérapies biologiques anti-TNFα ont révolutionné le traitement des maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou la maladie de Crohn. Ces traitements ont permis une diminution des symptômes de la maladie ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie des patients. Cependant, ces traitements présentent un certain nombre d'inconvénients comme des effets secondaires (augmentation des infections), l'apparition de résistance (anticorps anti-anticorps monoclonal) et enfin les coûts pouvant atteindre 15 000 € par an et par patient. Des thérapies à base de petites molécules pourraient être une alternative à ces traitements avec notamment des coûts plus raisonnables et la possibilité d'un arrêt du traitement immédiat.

Nous avons travaillé à partir d'une petite molécule identifiée à partir d'un criblage *in silico* et présentant une forte activité *in vitro* dans un test de cytotoxicité du TNFα sur les cellules L929 (IC₅₀ de 1,5 µM), mais ne protégeant pas lors d'un choc septique. Ce composé ayant un potentiel anti-TNFα fort, nous avons décidé de l'optimiser d'abord par une approche de drug design (Ligand-based drug design) et ensuite par une approche ciblée de synthèse chimique. L'étape de drug design a permis de détecter dans la chimiothèque 27 nouveaux composés analogues de la petite molécule que nous avons testés *in vitro* dans le test d'activité du TNFα. Parmi ces composés, aucun n'a montré d'accroissement d'activité par rapport à la molécule initiale.

L'étape d'optimisation chimique a ciblé le changement de groupements méthoxy ou acétyl sur les chaînes carbonées de la molécule. Huit nouveaux composés ont ainsi été synthétisés avec

succès. Parmi eux, l'un possède une IC_{50} inférieure au composé d'origine (à 0.3 μ M). Par le biais ce travail, nous avons pu déterminer que le groupement methoxy était nécessaire à une bonne action anti-TNF α mais que l'absence du groupement acétyl permettait d'augmenter l'effet anti-TNF α du composé.

En conclusion, ce travail nous a permis de déterminer des groupements importants pour l'action anti-TNF α du composé initial et d'améliorer son activité d'un facteur 5 dans un test cellulaire. Le composé optimisé actif à 0.3 μ M est l'inhibiteur direct du TNF α le plus fort décrit dans la littérature.

Design, synthesis and biological evaluation of submicromolar Tumor Necrosis Factor α inhibitors

Nesrine Ben Nasr^{1‡}, Hadley Mouhsine^{1,2‡}, Gabriel Moreau¹, Clotilde Ferroud³, Jean-François Zagury¹, Françoise Dumas⁴, Maité Sylla-Iyarreta Veitia³, Matthieu Montes^{1*}

¹Laboratoire Génomique, Bioinformatique et Applications, EA 4627, Conservatoire National des Arts et Métiers, 292 rue Saint Martin, 75003 Paris, France

²Vaxconsulting SARL, 66 avenue des Champs-Élysées, 75008, Paris, France

³Laboratoire de Transformations Chimiques et Pharmaceutiques, UMR7084, Conservatoire National des Arts et Métiers, 2 rue Conté, 75003 Paris, France.

⁴Laboratoire de Synthèse Organique et Pharmacochimie, BioCIS, CNRS UMR 8076, Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie, 5, rue Jean-Baptiste Clément, F-92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

*These authors contributed equally to this work

ABSTRACT: TNF α is a key cytokine associated with chronic inflammatory diseases, septic shock or cancer. In this work, we have tried and performed an optimization of an anti-TNF α compound 4a originally identified by virtual screening. After a substructure similarity search in a large compound collection, we have identified 27 analogues of compound 4a, 4 of them displaying a submicromolar activity on TNF α . After analyzing their structural features, we have successfully synthesized 7 new chemical derivatives with an original structure. Among these 7 new compounds, one compound exhibited a slight improvement of activity over the initial compound with an IC₅₀ at 0.3 μ M. The 4 best compounds presented in this work are, to our knowledge, the 4 best inhibitors of TNF α described to date, as no compound with submicromolar activity has been identified so far on this challenging target. These compounds could constitute the basis for innovative small molecule TNF α -targeted therapeutics.

INTRODUCTION

Tumor Necrosis Factor α (TNF α) is a key cytokine of the immune system involved in inflammation, host defense against infections, regulation of the immune system and tumor regression^{1,2}. The overproduction of TNF α has been associated with several diseases, notably chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease or Psoriasis². Indeed, biotherapies that block directly TNF α have been a revolution for the treatment of chronic inflammatory diseases, with anti-TNF α monoclonal antibodies (infliximab, adalimumab) or soluble receptors of TNF α (etanercept). However, these biotherapies present several drawbacks including side-effects³, treatment resistance, and prohibitive costs (up to \$20,000 per

patient per year)⁴, that could be addressed by small molecule-based therapies. Since 2005, a few small molecules targeting TNF α have been described in the literature and include SPD304⁵, natural-products-like compounds^{6,7}, FDA-approved repurposed drugs⁸, and metal-based molecules⁹. If these compounds are active *in vitro* and display a low to medium micromolar range affinity, no small molecule blocking directly TNF α has been commercialized so far. However, there are several known small inhibitors blocking indirectly TNF α biological activity either by targeting the production of TNF α such as Thalidomide and Phosphodiesterase 4 inhibitors (Apremilast), or by targeting proteins involved in its signaling pathway such as MAP kinase p38. Phase III

clinical trials are ongoing with Apremilast in the psoriasis and psoriatic arthritis. Small molecules targeting MAP kinases (p38) were evaluated in Crohn's disease and rheumatoid arthritis but were discontinued for lack of efficacy¹⁰⁻¹². Developing direct inhibitors of TNF α thus remains an important goal. Our group has recently identified benzene-sulfonamide derivatives that could inhibit TNF α directly *in vitro* in the micromolar range and that were active *in vivo* in mice disease models¹³. This was the first anti-TNF α small compound active in animal models that directly targets the cytokine in contrary to PDE-4 or p38 inhibitors. In the present work, we have designed and synthesized new benzene-sulfonamide derivatives with an *in vitro* submicromolar activity on TNF α that constitute the most potent compounds on this target to date.

RESULTS AND DISCUSSION

Ligand-based virtual screening and in vitro evaluation. We had previously identified several benzene sulfonamide derivatives after structure-based *in silico* screening followed by *in vitro* screening¹³. One of these compounds has been named compound 4a. In the present work, we have performed a ligand-based virtual screening on the Chembridge compound collection that contains over 700.000 molecules in order to identify structural analogues of compound 4a (see Methods). 27 compounds were identified by this round of screening and tested *in vitro* in a TNF α -induced apoptosis assay on L929 cells. The inhibitory activity of these compounds at 10 μ M and their corresponding IC₅₀s are presented in table 1. Among these 27 selected compounds, 4 displayed IC₅₀s below 10 μ M, the most potent being compounds 8 and 9 with respective IC₅₀s of 1.5 μ M and 1.7 μ M. All these compounds exhibited a moderate toxicity on L929 cells at higher concentrations which explained the discrepancy between the percentage of survival at 10 μ M and the IC₅₀s (Table 1). The products also displayed a moderate to poor solubility in the medium used for *in vitro* experiments. From these results, we could make the following analysis: 1. For the R3 group, there is a striking improvement of the activity when there is a methyl on R3 compared to H (compound 32 vs compound 4a). For the R1 group, halogens did not seem to improve the biological activity compared to their alkoxy or alkyl analogues (compound 12 vs compound 11; compounds 23, 25 and 30 vs compounds 8 and 10). Methoxy seemed optimal compared to ethoxy and methyl but should be further investigated. 2. For the R2 group, methyl/ethyl esters gave the best results with a hydrogen in R3. The only compound with a methyl in R3 is acetylated in R2 (compound 4a). Since compound 4a was the most active compound and since almost no information was available for a methyl on R3, we decided to synthesize structural analogues of compound 4a with a methyl on R3. In order to guide the synthesis of these new analogues of compound 4a, we performed a docking of the top 5 compounds with Surflex-dock (compounds 4a, 8, 9, 10 and 11; figure 1). Visual inspection of the

docked poses of these compounds helped to guide further structural modifications in order to make improved interactions with the binding pocket.

Chemistry: Since the interactions in the pocket were mainly driven by hydrophobic interactions^{8,9}, we decided to 1. Add a methyl group in 3 to optimize the hydrophobic interactions with the binding pocket (4', 5, 6, 7a, 7b, 7c) 2. Validate the importance of the hydrogen bond interaction with the oxygen on R1 (4') while exploring different groups to improve the solubility in the cell medium (5, 6, 7a, 7c). Compound 4a initially found after virtual screening was resynthesized (compound 4a') in order to obtain the analogues 5, 6, 7a, 7b and 7c. We succeeded to produce several derivatives of compound 4a by chemical synthesis: compounds 4', 4b, 5, 6, 7a, 7b and 7c. For that, *N*-(4-hydroxy-2-methylphenyl)-4-methoxybenzenesulfonamide 1 was synthesized according to the literature procedure¹⁴, reacted with tetraacetate to produce (E)-4-methoxy-*N*-(2-methyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienylidene)benzenesulfonamide 2 as in¹⁵ (Scheme 1). An addition of 2 with MeONa produced *N*-(5-(2,4-dioxopentan-3-yl)-4-hydroxy-2-methylphenyl)-4-methoxybenzenesulfonamide 3 according to¹⁵. Boiling of 3 in hydrochloric acid produced *N*-(3-acetyl-2,6-dimethylbenzofuran-5-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide 4a and its desacetylated form 4b similarly to¹⁵ (Scheme 1). 4' was obtained after the same procedure as 4a but starting from the non-substituted benzene sulfonfyl chloride¹⁵ (Scheme 2). 4a reacted with boron tribromide to give *N*-(3-acetyl-2,6-dimethylbenzofuran-5-yl)-4-hydroxybenzenesulfonamide 5 (Scheme 3). Treatment of 5 with NaOH overnight gave Sodium 4-(3-acetyl-2,6-dimethyl-benzofuran-5-ylsulfonamoyl)-phenolate 6 as in¹⁶ (Scheme 3). At least 50 mg of each compound was produced with a >95% purity to be tested in biological assays.

In vitro evaluation of the synthesized compounds: Our initial compound 4a exhibited an IC₅₀ of 1,5 μ M without exhibiting any cellular toxicity at 100 μ M. Compound 4a' is a resynthesis of compound 4a. We also synthesized seven new derived compounds (4', 4b, 5, 6, 7a, 7b and 7c) and assessed their TNF α inhibitory activity *in vitro* in the TNF α -induced apoptosis assay on L929 cells. Compound 4a' exhibited an IC₅₀ of 0.5 μ M, 3 fold below the activity of the purchased compound 4a. Compound 4b exhibited an IC₅₀ of 0.3 μ M. Compounds 5 and 6 exhibited an IC₅₀ of 29 μ M and 72 μ M respectively (table 2). Compound 4b is the deacylated form of compound 4a on R2 which seemed to increase the anti-TNF α properties of the original compound. Neither the salt (6), the trifluoromethyl (7b) or the phosphate (7c) enhanced the inhibitory activity of the benzene sulfonamide on TNF α despite a significant improvement of their solubility in the cell medium (no observable solid in suspension compared to what was observed with compound 4a).

CONCLUSION

This work, at the interface of chemistry, biology and chemoinformatics has dealt with the optimization of an anti-TNF α compound identified originally by virtual screening. After a substructure similarity search, we have retrieved from the chemolibrary 4 analogues of compound 4a with a submicromolar activity on TNF α . After analyzing their structural features, we have successfully synthesized 7 new chemical derivatives with an

original structure. These compounds have been evaluated for their inhibitory activity on TNF α . Among these 7 new compounds, only one compound exhibited a slight improvement of activity over the initial compound with an IC₅₀ at 0.3 μ M. The 4 best compounds presented in this work are, to our knowledge, the 4 best inhibitors of TNF α described to date, as no compound with submicromolar activity has been identified so far on this challenging target.

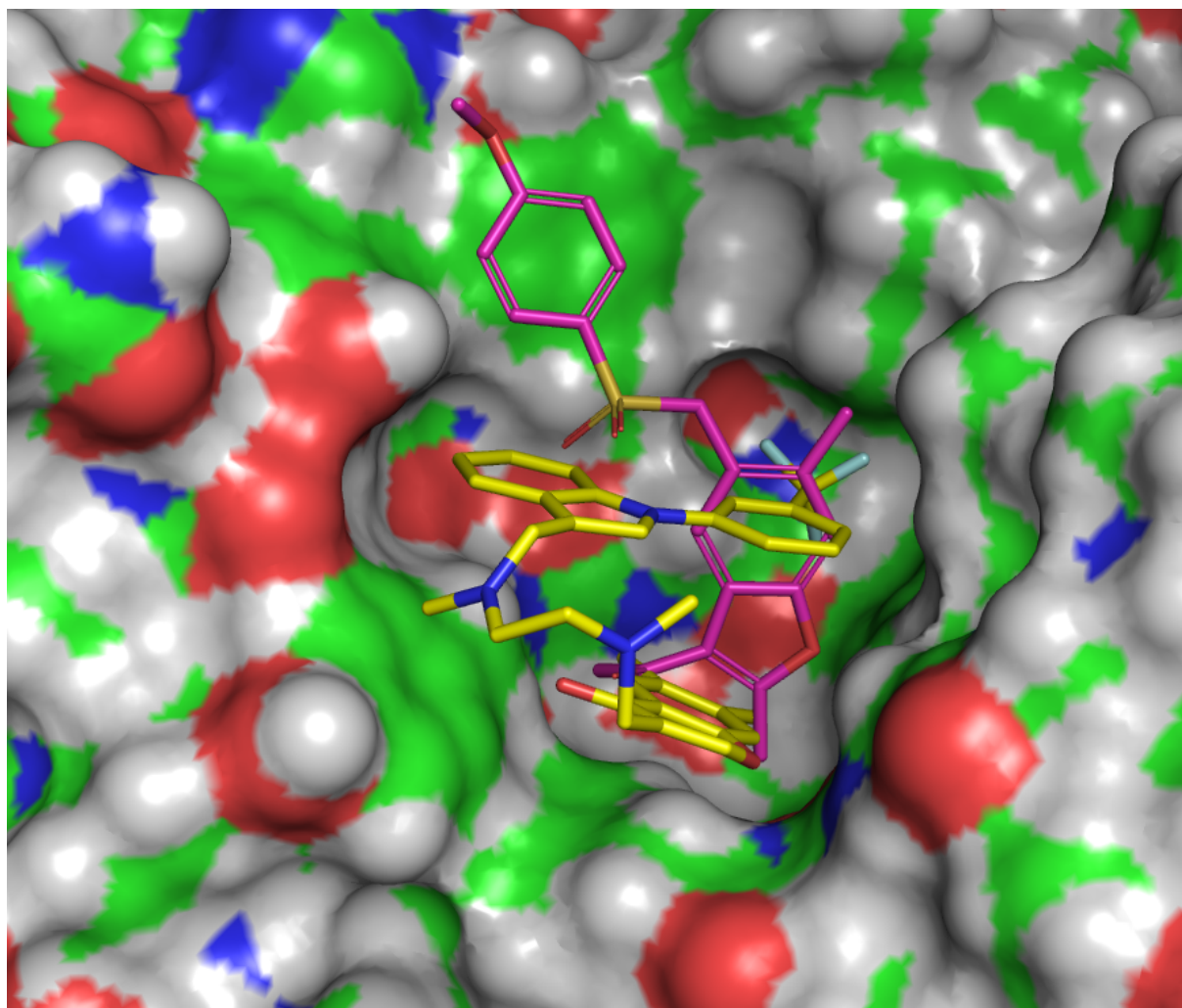
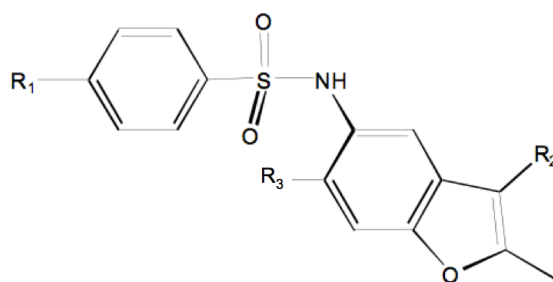
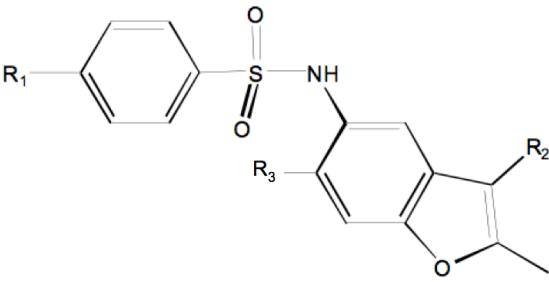


Figure 1. putative binding mode of compound 4a (magenta) proposed by Surflex-dock v2.2 in the co-crystallized structure of TNF α dimer (green) with reference compound SPD304 (yellow).



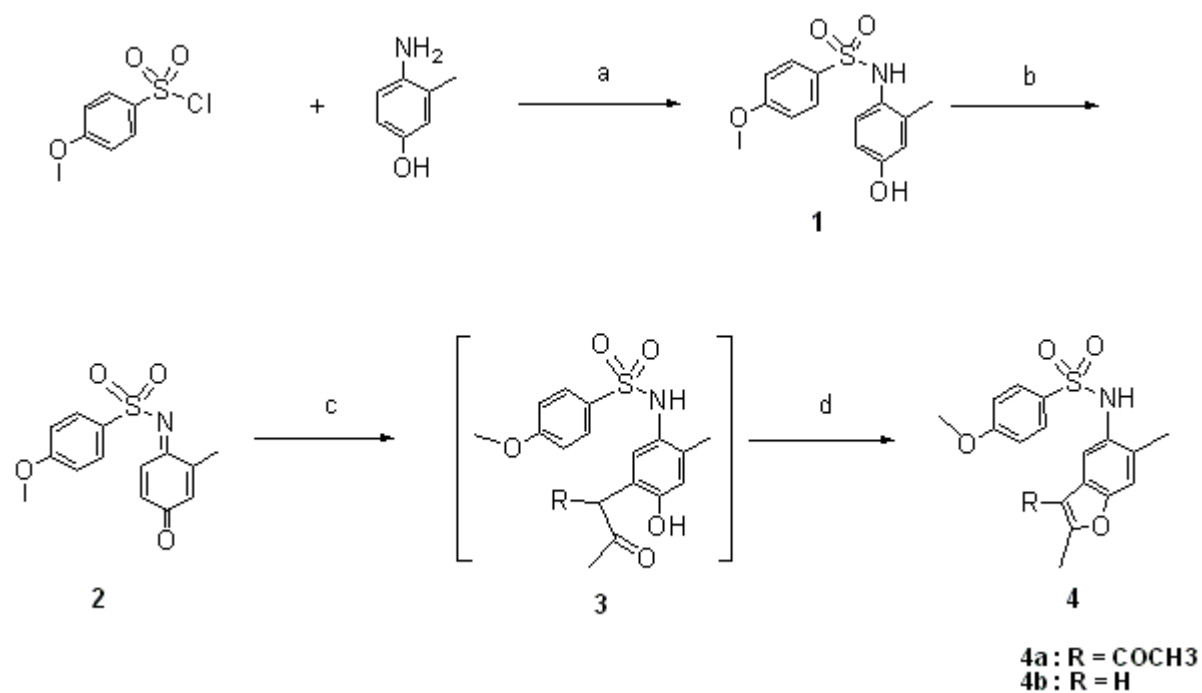
| Compound | R1 | R2 | R3 | MW (g/mol) | % Survival | IC50 |
|----------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------|------------|-------|
| 4a | -O-CH ₃ | -CO-CH ₃ | -CH ₃ | 373.42 | 65.9 | 1.5 |
| 8 | -O-CH ₃ | -CO-O-CH ₃ | -H | 375.40 | 57.5 | 1.5 |
| 9 | -O-CH ₃ | -CO-O-C ₂ H ₅ | -H | 389.42 | 41.6 | 1.7 |
| 10 | -CH ₃ | -CO-O-CH ₃ | -H | 359.40 | 48.1 | 3.1 |
| 11 | -O-C ₂ H ₅ | -CO-O-C ₂ H ₅ | -H | 403.45 | 39.1 | 4.9 |
| 12 | -Br | -CO-O-C ₂ H ₅ | -H | 438.29 | -33 | >50μM |
| 13 | -tBu | -CO-O-CH ₃ | -H | 401.48 | -24 | >50μM |
| 14 | -tBu | -CO-CH ₃ | -H | 385.48 | -9 | >50μM |
| 15 | -Br | -CO-CH ₃ | -H | 408.27 | -6 | >50μM |
| 16 | -iPr | -CO-CH ₃ | -H | 371.45 | -3 | >50μM |
| 17 | -F | -CO-CH ₃ | -H | 347.36 | -2.9 | >50μM |
| 18 | -Cl | -CO-CH ₃ | -H | 363.82 | -2.4 | >50μM |
| 19 | -C ₂ H ₅ | -CO-CH ₃ | -H | 357.42 | 0.7 | >50μM |
| 20 | -F | -CO-OH | -H | 349.33 | 0.8 | >50μM |
| 21 | -CH ₃ | -CO-CH ₃ | -H | 343.40 | 3.8 | >50μM |
| 22 | -Cl | -CO-O-iPr | -H | 407.87 | 5.9 | >50μM |
| 23 | -F | -CO-O-CH ₃ | -H | 363.36 | 5.6 | >50μM |
| 24 | -C ₂ H ₅ | -CO-O-C ₂ H ₅ | -H | 387.45 | -3.7 | >50μM |
| 25 | -Cl | -CO-O-CH ₃ | -H | 379.82 | 0 | >50μM |
| 26 | -O-CH ₃ | -CO-O-iPr | -H | 403.45 | 0.9 | >50μM |
| 27 | -O-C ₂ H ₅ | -CO-O-CH ₃ | -H | 389.42 | 23.9 | >50μM |
| 28 | -F | -O-Bz | -H | 439.46 | 0 | >50μM |
| 29 | -NH-CO-CH ₃ | -CO-O-C ₂ H ₅ | -H | 416.45 | 0.5 | >50μM |
| 30 | -Br | -CO-O-CH ₃ | -H | 424.27 | 2.8 | >50μM |
| 31 | -Br | -CO-CH ₃ | -H | 410.24 | 2.4 | >50μM |
| 32 | -O-CH ₃ | -CO-CH ₃ | -H | 359.40 | 1.9 | >50μM |
| 33 | -O-CH ₃ | -CO-OH | -H | 361.37 | 1.4 | >50μM |
| 34 | -O-C ₂ H ₅ | -CO-CH ₃ | -H | 373.42 | 0.9 | >50μM |

Table 1. Structure and activities of the derivatives of compound 4a identified by substructure similarity search. Percentage of survival and IC₅₀s have been determined on a TNF α induced apoptosis assay on L929 cells. For percentage of survival, the compounds concentration used in the assay was 10 μ M.

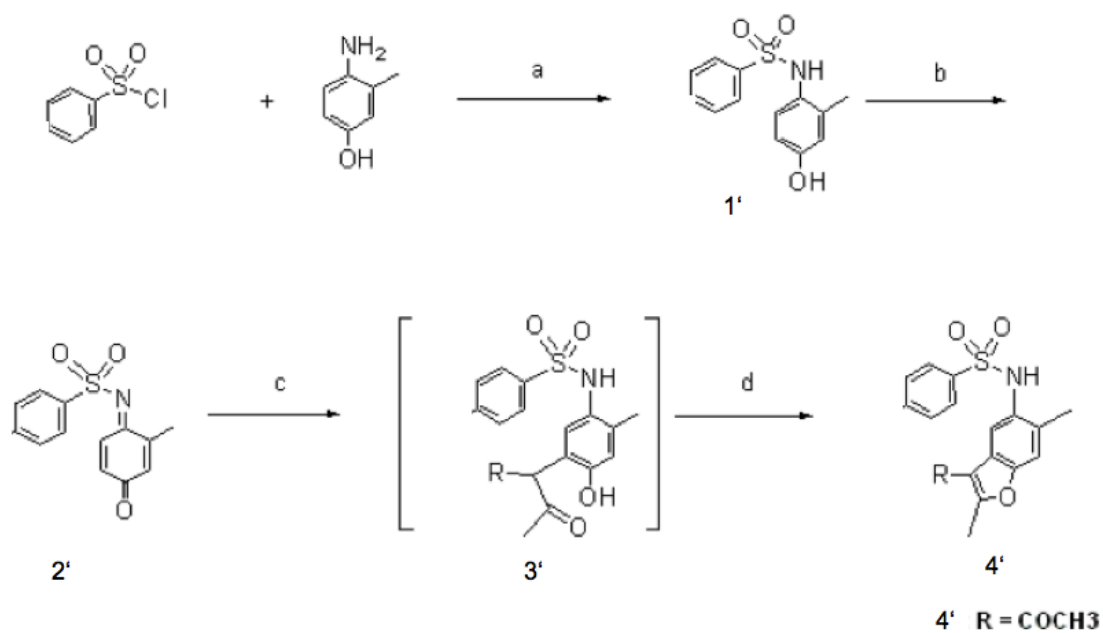


| Compound | R1 | R2 | R3 | MW (g/mol) | % Survival (10μM) | IC50 |
|----------|----------------------------------|---------------------|------------------|------------|-------------------|----------|
| 4' | -H | -CO-CH ₃ | -CH ₃ | 343.40 | -2.4 | >100μM |
| 4a' | -O-CH ₃ | -CO-CH ₃ | -CH ₃ | 373.42 | 83 | 0.5 |
| 4b | -O-CH ₃ | -H | -CH ₃ | 331,39 | 63 | 0.3 - 16 |
| 5 | -OH | -CO-CH ₃ | -CH ₃ | 359,40 | 2 | 29 |
| 6 | -O ⁻ Na ⁺ | -CO-CH ₃ | -CH ₃ | 381.38 | -12 | 72 |
| 7a | -O-C ₂ H ₅ | -CO-CH ₃ | -CH ₃ | 387.45 | 17 | >50μM |
| 7b | -O-CF ₃ | -CO-CH ₃ | -CH ₃ | 427.39 | 8 | >50μM |
| 7c | PO ₄ H ₂ | -CO-CH ₃ | -CH ₃ | 439.38 | 2 | >50μM |

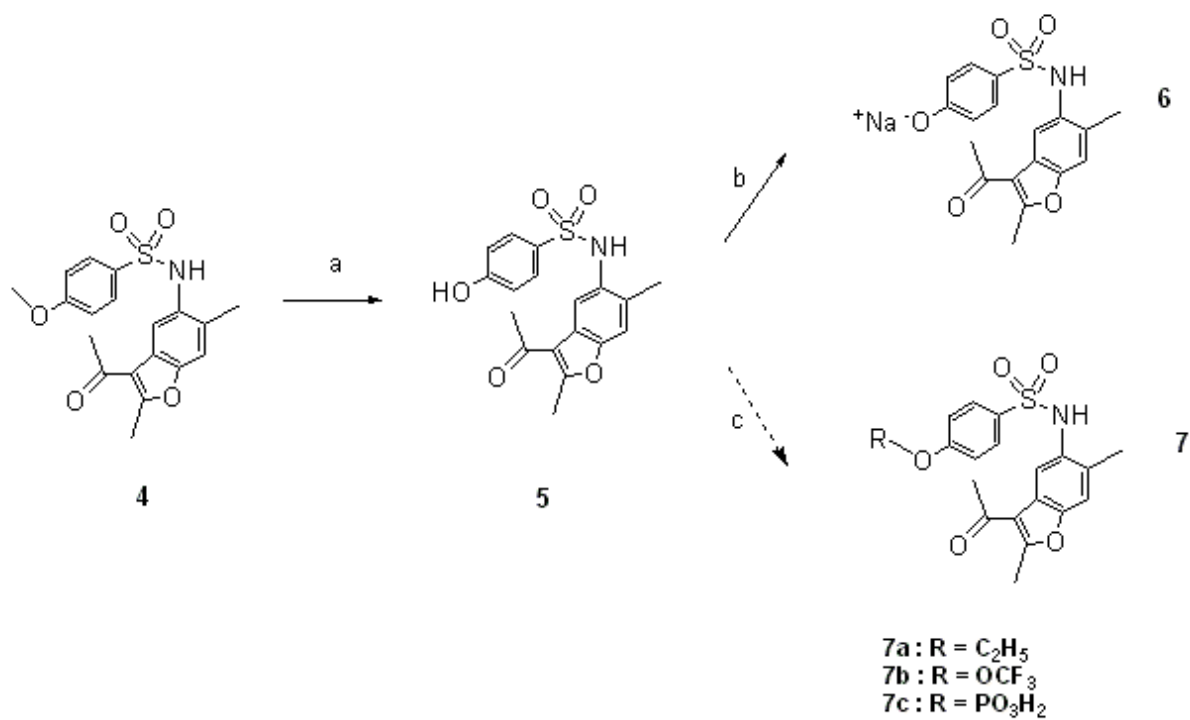
Table 2. Structure and activities of the derivatives of compound 4a that have been newly synthesized. Compound 4a' is a new synthesis of compound 4a. Percentage of survival and IC₅₀'s have been determined on a TNF α induced apoptosis assay on L929 cells. For percentage of survival, the compounds concentration used in the assay was 10 μ M.



Scheme 1. Reagent and conditions (a) anhydrous pyridine, rt, overnight; (b) Pb(OAc)₄, anhydrous acetic acid, rt, 1h; (c) acetylacetone (1,1 equiv), MeONa, Anhydrous dioxane, rt, 15 min (d) HCl 20%, reflux, 5,5h .



Scheme 2. Reagent and conditions (a) anhydrous pyridine, rt, overnight; (b) Pb(OAc)₄, anhydrous acetic acid, rt, 1h; (c) acetylacetone (1,1 equiv), MeONa, Anhydrous dioxane, rt, 30 min (d) HCl 20%, reflux, 5,5h.



Scheme 3. Reagent and conditions : (a) BBr₃, anhydrous CH₂Cl₂, -78°C to rt, 40h ; (b) NaOH 0,5 M.

Experimental section

Chemicals. All reagents were obtained from commercial sources unless otherwise noted, and used as received. All reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) performed on precoated silica gel plates (60 F₂₅₄, Merck). TLC plates were viewed under UV (254 nm) and developed with K₂Cr₂O₇/KMnO₄ or in an iodine chamber; frontal retention values *R_f* have been mentioned when necessary. Flash chromatography was performed on silica gel 60 (particle size 0.063-0.200 mm, Merck).

Physical measurements. ¹H and ¹³C-NMR spectra were acquired on a Bruker BioSpin GmbH spectrometer 400 MHz, at room temperature. Chemical shifts δ are given in ppm and coupling constants *J* are measured in Hz. Coupling patterns are described by abbreviations: s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet). GC analyses and EI-mass spectra were performed with an Agilent 6890N instrument equipped with a 15m x 0.25 mm HP-5MS column and an Agilent 5973N MS detector-column temperature gradient 50-300 °C. Infrared spectra were obtained from solids or neat liquids with a Fourier Transform Bruker Vector 22 spectrometer. High-resolution mass spectra were performed with a Thermo Scientific LTQ Orbitrap mass spectrometer. The mass spectra were taken using electrospray (ESI) in the positive-ion mode. The *m/z* resulting from fragmentation processes were indicated, and sometimes assigned. The corresponding ionic abundances were reported in percentage relative to the more abundance.

Syntheses. *N*-(4-hydroxy-2-methylphenyl)-4-methoxybenzenesulfonamide (1). To a solution of 2 g of 4-amino-3-methylphenol in pyridine, was slowly added with stirring 3.3 g of 4-methoxybenzene-1-sulfonyl chloride. The reaction was exothermic and a red coloration occurred. After standing overnight at room temperature, the

mixture were poured into 80 mL of 1.2 M hydrochloric acid solution and stirred well during 30 minutes. Filtration gave a pink solid in a yield of 4.7 g (99%). No further purification was necessary.¹⁴ (E)-4-methoxy-*N*-(2-methyl-4-

oxocyclohexa-2,5-dienylidene)benzenesulfonamide (2). A suspension of 8.6 g of *N*-(4-hydroxy-2-methylphenyl)-4-methoxybenzenesulfonamide (1) and 13 g of lead tetraacetate in 44 mL of glacial acetic acid was stirred at room temperature. The mixture developed an orange colour immediately. After one hour, 1 mL of ethylene glycol was added and the stirring was continued for 15 minutes. The mixture was cooled in an ice-bath and the imide was removed by filtration and washed with water. Yellow solid, yield 6.8 g (79%).¹⁵ *N*-(5-(2,4-dioxopentan-3-yl)-4-hydroxy-2-methylphenyl)-4-methoxybenzenesulfonamide (3). To a suspension of 394 mg of (E)-4-methoxy-*N*-(2-methyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienylidene)benzenesulfonamide (2) and about 6 mg of MeONa in 6.7 mL of dry dioxane, was added with stirring 0.16 mL of acetylacetone. The reaction, slightly exothermic was allowed to stand at room temperature during 15 minutes. The reaction mixture was filtered and the filtrate was concentrated under vacuum on the steam-bath to the half of the initial volume. Addition of petroleum ether to this solution caused the separation of a yellow oil which solidified on cooling. The yield was 530 mg (99%).¹⁵ *N*-(3-acetyl-2,6-dimethylbenzofuran-5-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide (4). A suspension of 8.2 g of *N*-(5-(2,4-dioxopentan-3-yl)-4-hydroxy-2-methylphenyl)-4-methoxybenzenesulfonamide (3) in 412 mL of constant boiling hydrochloric acid 20% was heated under reflux during 5.5 hours. After cooling, filtration of the mixture gave a brown solid with a yield of 6.9 g (88%). 825 mg of the desacetylated compound (4b) was isolated by column chromatography (CH₂Cl₂/EtOAc, 95/5).¹⁵

N-(4-hydroxy-2-methylphenyl)-benzenesulfonamide (1'). To a solution of 2 g of 4-amino-3-methylphenol in pyridine, was slowly added with stirring 3.3 g of benzene-1-sulfonyl chloride. The reaction was exothermic and a brown coloration occurred. After standing overnight at room temperature, the mixture were poured into 80 mL of 1.2 M hydrochloric acid solution and stirred well during 1 hour. Filtration gave a red solid in a yield of 3.2 g (95%). No further purification was necessary¹⁴. (E)-*N*-(2-methyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienylidene)benzenesulfonamide (2'). A suspension of 8.6 g of *N*-(4-hydroxy-2-methylphenyl)-benzenesulfonamide (1') and 13 g of lead tetraacetate in 44 mL of glacial acetic acid was stirred at room temperature. The mixture developed a brown colour immediately. After one hour, 1 mL of ethylene glycol was added and the stirring was continued for 30 minutes. The mixture was cooled in an ice-bath and the imide was removed by filtration and washed with water. Orange solid, yield 7.2 g (85%)¹⁵. *N*-(5-(2,4-dioxopentan-3-yl)-4-hydroxy-2-methylphenyl)-benzenesulfonamide (3'). To a suspension of 394 mg of (E)-*N*-(2-methyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienylidene)benzenesulfonamide (2') and about 6 mg of MeONa in 6.7 mL of dry dioxane, was added with stirring 0.16 mL of acetylacetone. The reaction, slightly exothermic was allowed to stand at room temperature during 15 minutes. The reaction mixture was filtered and the filtrate was concentrated under vacuum on the steam-bath to the half of the initial volume. Addition of petroleum ether to this solution caused the separation of a orange oil which solidified on cooling. The yield was 530 mg (99%)¹⁵. *N*-(3-acetyl-2,6-dimethylbenzofuran-5-yl)-benzenesulfonamide (4'). A suspension of 8.2 g of *N*-(5-(2,4-dioxopentan-3-yl)-4-hydroxy-2-methylphenyl)-benzene sulfonamide (3') in 412 mL of constant boiling hydrochloric acid 20% was

heated under reflux during 5.5 hours. After cooling, filtration of the mixture gave a red solid with a yield of 6.9 g (88%). *N*-(3-acetyl-2,6-dimethylbenzofuran-5-yl)-4-hydroxybenzenesulfonamide (5). To a solution of 216 mg of the *N*-(3-acetyl-2,6-dimethylbenzofuran-5-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide (4) in 14 mL of anhydrous CH₂Cl₂ at -78°C, was added a solution of boron tribromide (1M, CH₂Cl₂, 2,3 mL) dropwise. An immediate yellow coloration occurred. The reaction mixture was warmed to room temperature gradually and allowed to stir for 24 hours. 47 mL of water was added slowly cooled mixture. It was then extracted with CH₂Cl₂ (4 x 100 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. Column chromatography (CH₂Cl₂/EtOAc) gave the target compound in the yield of 44.6 mg (21%)¹⁶. Sodium 4-(3-acetyl-2,6-dimethyl-benzofuran-5-ylsulfonamoyl)-phenolate (6). 287mg of the *N*-(3-acetyl-2,6-dimethylbenzofuran-5-yl)-4-hydroxybenzenesulfonamide (5) were stirred overnight in 1.6 mL of a solution of NaOH 0.5 M. The reaction mixture was dried in a desiccator to give quantitatively 304 mg of a yellow solid.

Ligand-based virtual screening. Substructure 2D-similarity search experiments were performed with the JChem v2.4. The structure of compound 4a was used as a reference.

Compound collection. The 700.000 compounds Chembridge screening compound collection was retrieved from www.hit2lead.com.

Protein structure preparation. The binding site has been defined at 4 Å around the co-crystallized SPD304 ligand in the structure of the TNFα dimer (PDB id: 2AZ5). Hydrogen atoms were added using Chimera¹⁷.

Docking experiments. Molecular docking of the best compounds after screening was performed using Surflex-dock version 2.5. Surflex-dock is based on a modified Hammerhead fragmentation /

reconstruction algorithm to dock compounds flexibly into the binding site. The query molecule is decomposed into rigid fragments that are superimposed to the Surflex-protomol *i.e.*, molecular fragments covering the entire binding site. The docking poses are evaluated by an empirical scoring function.

Materials, cell line and mice. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Human TNF α was obtained from R&D Systems (Lille, France). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin-Streptomycin, L-Glutamine and Phosphate Buffered Saline were obtained from Pan Biotech (Brumath, France). Actinomycin D was obtained from Fisher (Illkirch, France). L929 cell line has been grown in the Laboratory for years.

Neutralization of cellular TNF α induced apoptosis. The biological activity of TNF α was assessed by its apoptotic activity on L929 cells. The neutralization assay consisted in mixing TNF α with the potential inhibitor, incubating the mixture for 2 hours, and then testing its apoptotic activity.

80 % confluent L929 cells were plated in flat bottom plates at 4×10^5 cells per well in 100 μ l of DMEM medium containing 10 % FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin - 100 μ g/ml Streptomycin and incubated for one night at 37°C, 5 % CO₂. TNF α (150 pg/ml), Actinomycin D (4 μ g/ml) and the compounds at different concentrations (ranging from 100 μ M to 0,1 μ M) were mixed in 150 μ l complete DMEM medium in U-bottom plates. After two hours incubation at 37°C, 5 % CO₂, 100 μ l of the mix was added to the plated cells and incubated at 37°C, 5 % CO₂ for 24 hours. A negative control was also used by incubating TNF α with no compound. Each point was done in duplicate (the test was highly

reproducible). Supernatants were discarded and 100 μ l of MTT at 0,5 mg/ml were added to wells. After two hours, supernatants were discarded and 200 μ l of DMSO were then added. Plates were read at 570 nm with a spectrophotometer providing the optical density (OD) of each well. The percentage of neutralization of TNF α activity (%Neutra) by a compound was calculated as follows :

$$\%Neutra = \frac{OD_{compound} - OD_{TNF\alpha}}{OD_{cells} - OD_{TNF\alpha}} \times 100$$

An IC₅₀ could be computed from the percentage of neutralization for each compound.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding author

* To whom correspondence should be addressed: Dr Matthieu Montes, PhD, e-mail : matthieu.montes@cnam.fr

Author contributions

‡ These authors contributed equally to this work.

REFERENCES

1. Pfeffer, K., Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **2003**, *14*, (3-4), 185-91.
2. Aggarwal, B. B., Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, (9), 745-56.
3. Fleischmann, R. M.; Iqbal, I.; Stern, R. L., Considerations with the use of biological therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Drug Saf* **2004**, *3*, (5), 391-403.
4. Sfrikakis, P. P.; Tsokos, G. C., Towards the next generation of anti-TNF drugs. *Clin Immunol* **2011**, *141*, (3), 231-5.
5. He, M. M.; Smith, A. S.; Oslob, J. D.; Flanagan, W. M.; Braisted, A. C.; Whitty, A.; Cancilla, M. T.; Wang, J.; Lugovskoy, A. A.; Yoburn, J. C.; Fung, A. D.; Farrington, G.; Eldredge, J. K.; Day, E. S.; Cruz, L. A.; Cachero, T. G.; Miller, S. K.; Friedman, J. E.; Choong, I. C.; Cunningham, B. C., Small-molecule inhibition of TNF-alpha. *Science* **2005**, *310*, (5750), 1022-5.
6. Chan, D. S.; Lee, H. M.; Yang, F.; Che, C. M.; Wong, C. C.; Abagyan, R.; Leung, C. H.; Ma, D. L., Structure-Based Discovery of Natural-Product-like TNF-alpha Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49*, (16), 2860-2864.
7. Choi, H.; Lee, Y.; Park, H.; Oh, D. S., Discovery of the inhibitors of tumor necrosis factor alpha with structure-based virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, (21), 6195-8.
8. Leung, C. H.; Chan, D. S.; Kwan, M. H.; Cheng, Z.; Wong, C. Y.; Zhu, G. Y.; Fong, W. F.; Ma, D. L., Structure-based repurposing of FDA-approved drugs as TNF-alpha inhibitors. *ChemMedChem* **2011**, *6*, (5), 765-
9. Leung, C. H.; Zhong, H. J.; Yang, H.; Cheng, Z.; Chan, D. S.; Ma, V. P.; Abagyan, R.; Wong, C. Y.; Ma, D. L., A Metal-Based Inhibitor of Tumor Necrosis Factor-alpha. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51*, (36), 9010-4.
10. Dotan, I.; Rachmilewitz, D.; Schreiber, S.; Eliakim, R.; van der Woude, C. J.; Kornbluth, A.; Buchman, A. L.; Bar-Meir, S.; Bokemeyer, B.; Goldin, E.; Maaser, C.; Mahadevan, U.; Seidler, U.; Hoffman, J. C.; Homoky, D.; Plasse, T.; Powers, B.; Rutgeerts, P.; Hommes, D., A randomised placebo-controlled multicentre trial of intravenous semapimod HCl for moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **2010**, *59*, (6), 760-6.
11. Genovese, M. C.; Cohen, S. B.; Wofsy, D.; Weinblatt, M. E.; Firestein, G. S.; Brahn, E.; Strand, V.; Baker, D. G.; Tong, S. E., A 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study of the efficacy of oral SCIO-469, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **2011**, *38*, (5), 846-54.
12. Damjanov, N.; Kauffman, R. S.; Spencer-Green, G. T., Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum* **2009**, *60*, (5), 1232-41.
13. Montes, M.; Mouhsine, H.; Guillemain, H.; Moreau, G.; Baron, B.; Latouche, A.; Ben Nasr, N.; Desallais, L.; Ratsimandresy, R.; Spadoni, J. L.; Do, H.; England, P.; Zagury, J. F., In vivo orally active small molecule inhibitors of TNFa. **Submitted**.
14. Adams, R.; Wankel, R., Quinone imides. III. 1,4-naphthoquinone disulfonimides. *J Am Chem Soc* **1951**, *73*, 131-134.
15. Adams, R.; Whitaker, L., Quinone Imides. XXXIX. Adducts of Quinone Monoimides and Conversion of Active Methylene Adducts to Benzofurans. *J Am Chem Soc* **1956**, *78*, 658-663.
16. Pu, J.; Kreft, A. F.; Aschmies, S. H.; Atchison, K. P.; Berkowitz, J.; Caggiano, T. J.; Chlenov, M.; Diamantidis, G.; Harrison, B. L.; Hu, Y.; Huryn, D.; Steven Jacobsen, J.; Jin, M.; Lipinski, K.; Lu, P.; Martone, R. L.; Morris, K.; Sonnenberg-Reines, J.; Riddell, D. R.; Sabalski, J.; Sun, S. C.; Wagner, E.; Wang, Y.; Xu, Z.; Zhou, H.; Resnick, L., Synthesis and structure-activity relationship of a novel series of heterocyclic sulfonamide gamma-secretase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, (13), 4708-17.
17. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25*, (13), 1605-12.

1.3. Étude de toxicité des petites molécules anti-TNF α

Après les résultats obtenus sur le choc septique, nous avons entrepris de tester nos composés dans un modèle de colite au DSS. Les souris ont été gavées avec 100 μ l de DMSO contenant 10 mg de produit tous les jours pendant 12 jours. Les animaux ont perdu beaucoup de poids par rapport aux souris contrôles DSS. Certains animaux sont morts avant la fin de l'expérimentation. Nous avons alors supposé que le DMSO, qui est un solvant, a abimé le tractus digestif, en plus de l'effet du DSS.

J'ai alors décidé de faire une expérience préliminaire de toxicité des produits et du DMSO. Des groupes de trois souris ont été gavées avec le produit à différentes doses (10 mg, 5 mg ou 2,5 mg) dans 100 μ l de DMSO ou ont subi des injections intrapéritonéales de 1 mg, 0,5 mg ou 0,25 mg dans 100 μ l de 25 % Cremophor®, 25 % Ethanol, 50 % PBS tous les deux jours. J'ai testé deux produits dans cette expérience. Il y avait donc au total 12 groupes de 3 souris, et après 12 jours de traitement, je les ai sacrifiées, pesées, et j'ai prélevé les principaux organes accessibles (foie, rate, rein, colon) pour étudier leur morphologie macroscopique (aspect et taille).

Sur trois animaux ayant reçu des doses de 10 mg dans 100 μ l de DMSO, deux sont morts avant la fin de l'expérience avec le produit 1 et un avec le produit 2. Les autres doses utilisées en gavage ont provoqué la mort d'un animal dans chaque groupe, les deux produits confondus, sauf pour le groupe à 2,5 mg (plus faible dose) du produit 2 où aucune souris n'est décédée. Les animaux gavés ont perdu du poids au cours de l'expérience, entre 0 et 20 % environ mais le pourcentage de perte n'est pas corrélé avec la dose de produit administrée. Au contraire, chez les animaux injectés intrapéritonéalement, aucune mort n'a été à déplorer et le poids est resté stable tout au long de l'expérience.

Au sacrifice, les organes des animaux ont été inspectés et ne présentaient pas d'anomalie particulière, le poids et la taille du colon étaient globalement identiques entre tous les animaux. Cependant, nous avons pu voir une diminution de la taille de la rate chez les animaux gavés avec de fortes doses de produits (10 mg et 5 mg). On a observé aussi des tâches sur le foie des souris gavées à forte dose.

Suite à ces résultats, nous avons décidé de refaire les expériences de colite au DSS mais en injectant les animaux avec 1 mg de produit tous les trois jours dans 100 μ l de 25 % Cremophor®, 25 % Ethanol, 50 % PBS. Nous avons choisi d'injecter tous les trois jours afin

de ne pas stresser les animaux et d'éviter les injections trop rapprochées avec le Cremophor®, Ethanol, PBS.

2. Résultats additionnels : approche d'immunisation active anti-cytokine.

Mon projet comportait deux parties, d'une part l'inhibition du TNF α par les petites molécules, d'autre part, l'inhibition par la vaccination anti-cytokine.

La vaccination anti-cytokine par peptides implique de choisir le(s) peptide(s) à partir de la structure et de la séquence du TNF α . En effet, nos peptides sont choisis préférentiellement au niveau des boucles de façon à conserver la structure tridimensionnelle en cyclisant les peptides grâce à des cystéines aux extrémités. Après immunisation, on espère que les anticorps anti-peptides produits vont « cross-réagir » avec la cytokine native et permettre sa neutralisation. Plusieurs peptides du TNF α ont été choisis au cours de ma thèse et testés pour leur immunogénicité chez la souris OF1. Les peptides induisant la production d'un fort taux d'anticorps chez la souris ont été utilisés chez le lapin afin de pouvoir disposer d'une grande quantité d'anticorps purifiés à partir du sérum des lapins et de tester leur capacité neutralisante dans un test d'activité biologique du TNF α .

2.1. Choix des peptides

Les peptides ont été choisis au niveau des boucles de la cytokine par un examen de sa structure tridimensionnelle (codes PDB : 1TNF, 3IT8, 2TNF et 3ALQ). Plusieurs peptides ont été synthétisés par la société PolyPeptides Laboratories dont les séquences sont présentées dans le **tableau 2** et dans les **figures 14** (peptides murins) et **15** (peptides humains). Après la synthèse, les peptides sont couplés au KLH (protéine porteuse) grâce à un agent de couplage, le BDB ou le glutaraldéhyde.

Il est important de noter que les peptides hTA502 et hTA503 diffèrent de hTA512 et hTA513 par un acide aminé seulement ; cette différence s'explique par une erreur présente dans le fichier PBD utilisé pour générer les peptides (code PDB : 1TNF). Cette erreur est représentée en vert dans le **tableau 2**.

| Nom du peptide | Séquence du peptide | Séquence d'origine | Cyclisation | Agent de couplage |
|----------------|-----------------------|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| mTA500 | CFAESGC | FAESG | C ₁ -C ₇ | GA |
| mTA501 | CFAESGC-Y | FAESG | C ₁ -C ₇ | BDB |
| mTA502 | CEVNLPKYLDFAESGQVYC | EVNLPKYLDFAESGQVY | C ₁ -C ₁₉ | GA |
| mTA503 | KACFAESGC | KYLDFAESG | C ₃ -C ₉ | GA |
| mTA504 | KACEVNLPKYLDFAESGQVYC | SAEVNLPKYLDFAESGQVY | C ₃ -C ₂₁ | GA |
| hTA502 | CEINRPDYLLFAESGQVYC | EINRPDYLDFAESGQVY | C ₁ -C ₁₉ | GA |
| hTA503 | KACEINRPDYLLFAESGQVYC | SAEINRPDYLDFAESGQVY | C ₃ -C ₂₁ | GA |
| hTA512 | CEINRPDYLDFAESGQVYC | EINRPDYLDFAESGQVY | C ₁ -C ₁₈ | GA |
| hTA513 | KACEINRPDYLDFAESGQVYC | SAEINRPDYLDFAESGQVY | C ₃ -C ₂₁ | GA |

Tableau 2 : Tableau représentant les différents peptides synthétisés au cours de ma thèse ainsi que la séquence d'origine, l'agent de couplage et la cyclisation. En bleu : les cystéines ajoutées afin de permettre la cyclisation, en rouge : les acides aminés ajoutés ou modifiés, en vert : erreurs d'acide aminé dans le fichier PDB 1TNF.

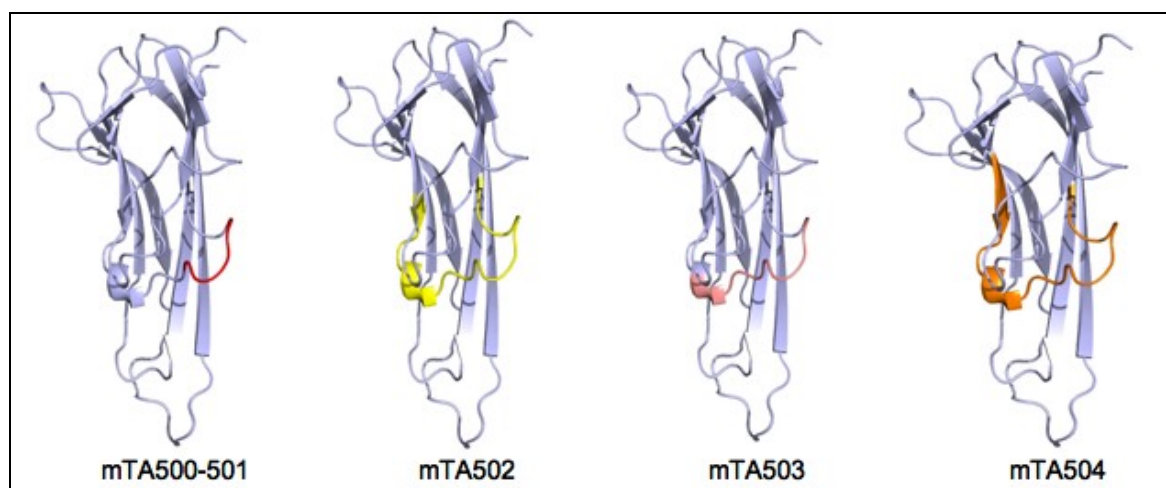


Figure 14 : Peptides murins du TNF α .

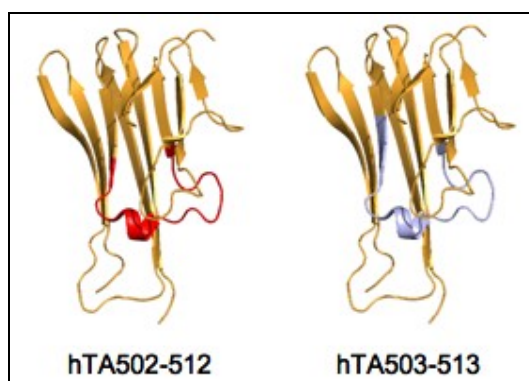


Figure 15 : Peptides humains du TNF α .

2.2. Étude de l'immunogénicité des peptides du TNF α chez la souris OF1

Des souris OF1 femelles ont été immunisées avec les différents peptides du TNF α (**tableau 2**, **figures 14** et **15**) à raison de 100 μ g de peptide par souris dans un volume final de 100 μ l contenant 50 μ l de CFA. Trois rappels sont ensuite effectués avec 100 μ g de peptide dans un volume de 100 μ l contenant 50 μ l d'IFA. Au sacrifice, les sérums sont prélevés et testés par ELISA pour la présence d'anticorps contre le peptide immunisant dans un premier temps afin de déterminer leur immunogénicité puis pour leur reconnaissance de la cytokine native. Quatre animaux par peptide ont été immunisés et les résultats, exprimés en titre₅₀, sont représentés dans le **tableau 3** ci-dessous.

| <i>Peptides</i> | <i>Coating</i> | <i>Titre₅₀ (4 animaux vaccinés) Anti-Peptide</i> |
|-----------------|----------------|---|
| mTA500 | Peptide | 2075 – 4664 3862 – 2310 |
| mTA501 | Peptide | 0 – 8 0 – 42 |
| mTA502 | Peptide | 7578 – 7825 33269 – 9236 |
| mTA503 | Peptide | 10815 – 9643 793 – 6320 |
| mTA504 | Peptide | 12312 – 20435 21564 – 11539 |
| hTA502 | Peptide | 21379 – 12729 3173 – 7265 |
| hTA503 | Peptide | 23776 – 26747 18737 – Décédée |
| hTA512 | Peptide | 9229 – 32116 25664 – 32491 |
| hTA513 | Peptide | 63095 – 58445 63071 – Décédée |

Tableau 3 : Titres₅₀ anticorps anti-peptide des souris immunisées avec les peptides du TNF α .

Les peptides du TNF α utilisés chez la souris sont tous immunogènes à part le mTA501.

Les sérums des animaux immunisés ont ensuite été utilisés pour déterminer les titres₅₀ des anticorps dirigés de la cytokine murine ou humaine du TNF α par ELISA. Les titres₅₀ anticorps anti-cytokine sont regroupés et présentés dans le **tableau 4**.

| <i>Peptides utilisés</i> | <i>Coating</i> | <i>Titre₅₀ (4 animaux vaccinés) Anti-Cytokine</i> |
|--------------------------|---------------------|--|
| mTA500 | TNF α murin | 13 – 0 0 – 26 |
| mTA501 | TNF α murin | 13 – 0 0 – 26 |
| mTA502 | TNF α murin | 5045 – 1151 43321 – 2549 |
| mTA503 | TNF α murin | 118 – 119 0 – 0 |
| mTA504 | TNF α murin | 3685 – 3166 19811 – 10091 |
| hTA502 | TNF α humain | 1665 – 32731 4187 – 3652 |
| hTA503 | TNF α humain | 14784 – 28135 652 – Décédée |
| hTA512 | TNF α humain | 5504 – 24148 17390 - 21444 |
| hTA513 | TNF α humain | 22276 – 19076 19906 - Décédée |

Tableau 4 : Titres₅₀ des anticorps reconnaissant la cytokine murine ou humaine des souris immunisées avec les peptides du TNF α .

En comparant les titres₅₀ anti-peptide et anti-cytokine, nous pouvons voir que seul le peptide mTA501 n'est pas immunogène car on n'observe pas de réponse anti-peptide. Les peptides mTA500, mTA501 et mTA503 n'ont pas permis la production d'anticorps reconnaissant la cytokine native. Par contre, les peptides mTA502 et mTA504 ont provoqué une forte réponse anti-peptide et reconnaissent la cytokine native avec des titres₅₀ élevés, c'est pourquoi nous les avons choisis pour immuniser des lapins afin de produire de grandes quantités d'anticorps purifiés pour pouvoir les évaluer expérimentalement.

2.3. Étude de l'immunogénicité des peptides du TNF α chez le lapin New Zealand

Des lapins New Zealand ont été immunisés avec les peptides mTA502 et mTA504 à raison de 150 μ g par lapin en CFA par injection intradermique. Des rappels sont effectués aux jours 14, 28, 56 et 70 émulsionnés en IFA en injection sous-cutanée. Le lapin immunisé avec le peptide mTA504 a développé un abcès à l'œil, il a été sacrifié au jour 62 contrairement au lapin immunisé avec le peptide mTA502, sacrifié au jour 72. Au sacrifice, les sérums sont prélevés afin de purifier les IgG. Un animal par peptide a été immunisé et les anticorps sont dans un premier temps testés pour leur immunogénicité par un ELISA anti-peptide. Les résultats, exprimés en titres₅₀, sont représentés dans le **tableau 5** ci-dessous.

| <i>Peptides utilisés</i> | <i>Coating</i> | <i>Titre₅₀ (1 animal par groupe) Anti-Peptide</i> |
|--------------------------|----------------|--|
| mTA502 | Peptide | 118787 |
| mTA504 | Peptide | 115225 |

Tableau 5 : Titres₅₀ des anticorps purifiés des lapins immunisées par les peptides mTA502 et mTA504 et reconnaissant les peptides.

Les peptides mTA502 et mTA504 ont été fortement immunogènes et ont permis la génération d'anticorps reconnaissant les peptides avec des titres₅₀ dépassant les 100 000.

Les anticorps purifiés de lapin ont ensuite été utilisés afin de déterminer les titres₅₀ des anticorps en présence de la cytokine native murine. Les résultats sont regroupés et présentés dans le **tableau 6**.

| <i>Peptides</i> | <i>Coating</i> | <i>Titre₅₀ (1 animal par groupe) Anti-Cytokine</i> |
|-----------------|--------------------|---|
| mTA502 | TNF α murin | 149609 |
| mTA504 | TNF α murin | 24925 |

Tableau 6 : Titres₅₀ des anticorps purifiés reconnaissant le TNF α murin des lapins immunisés avec les peptides mTA502 et mTA504.

L'utilisation des peptides mTA502 et mTA504 pour immuniser les lapins a permis la génération d'anticorps reconnaissant le TNF α à des taux élevés. Nous avons ensuite voulu savoir si ces anticorps purifiés de lapin ainsi que les anticorps contenus dans le sérum des

souris étaient capables de neutraliser le TNF α dans un test d'activité biologique du TNF α sur cellules L929.

2.4. Tests de neutralisation de l'activité biologique du TNF α avec les sérums de souris et les anticorps purifiés de lapin

Des tests de neutralisation de l'activité biologique du TNF α par les sérums de souris et les anticorps purifiés de lapin ont été réalisés. L'utilisation directe des sérums de souris n'a donné aucun résultat interprétable, probablement à cause des interférences induites par le sérum murin sur la culture cellulaire du test (données non montrées).

Les résultats obtenus en utilisant des anticorps purifiés de lapin suggèrent qu'il n'y a pas de neutralisation. En effet, les pourcentages de neutralisation obtenus sont quasiment constants entre 5% et 10% quelle que soit la dilution testée (du 1/5^{ème} au 1/500^{ème}), c'est à dire de l'ordre du bruit de fond.

2.5. Conclusion

Les résultats obtenus à partir des peptides sont un peu décevants. Pour certains peptides, les titres₅₀ se sont avérés bons avec une reconnaissance forte de la cytokine. Cependant, nous n'avons pas pu montrer de neutralisation ni par les anticorps des sérums de souris immunisées ni par les anticorps purifiés de lapin. Suite à ces résultats, nous avons réalisé d'autres ELISA en utilisant cette fois pour le coating de la cytokine de la société R&D Systems au lieu de celle de la société Peprtech comme précédemment. Les résultats ont été surprenants car, pour tous les peptides, les anticorps (souris, lapin) ne reconnaissaient plus la cytokine de chez R&D Systems. Comme il faut 20 fois plus de cytokine Peprtech que de cytokine R&D Systems pour arriver au même taux de mortalité cellulaire dans le test L929, nous pensons que nos titres₅₀ ont pu être surévalués en raison d'une dégradation possible de la cytokine Peprtech. Une explication est que cette dégradation facilite la reconnaissance d'épitopes linéaires correspondant à nos peptides immunisants. Les résultats ELISA sur les cytokines Peprtech et R&D Systems ont été obtenus à un an d'intervalle, et afin de confirmer notre hypothèse, il faudrait « réimmuniser » des souris avec les meilleurs peptides pour comparer les titres₅₀ exacts au sacrifice des animaux.

-D-

Discussion

Le TNF α est une cytokine proinflammatoire produite par les macrophages, les lymphocytes mais aussi les fibroblastes. Cette cytokine est devenue la cible de choix pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques. Depuis une dizaine d'années, des anticorps monoclonaux ou récepteurs solubles anti-TNF α sont utilisés en clinique et permettent de traiter les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de psoriasis et de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Cependant, ces traitements biologiques comportent un certain nombre d'inconvénients comme des effets secondaires, des résistances, et un coût non négligeable.

Plusieurs équipes essayent de développer de nouveaux inhibiteurs du TNF α comme les petites molécules ou l'immunisation active contre les cytokines. Ainsi des essais cliniques ont été entrepris avec des petites molécules ciblant la p38 (MAP kinase), la TACE ou la PDE4⁴⁹. Malgré de nombreux essais, aucun inhibiteur de la production ou de la voie de signalisation du TNF α n'est encore commercialisé à ce jour. Des essais cliniques sont également en cours afin d'inhiber le TNF α par immunisation active avec des kinoïdes dans la maladie de Crohn¹⁵⁹ et la polyarthrite rhumatoïde¹⁵⁸ (Neovacs).

C'est dans ce contexte compétitif que j'ai développé deux projets dans mon travail de thèse, le premier étant de développer un inhibiteur direct du TNF α à partir d'un screening *in silico* et le deuxième étant de développer un peptide du TNF α permettant la production d'anticorps neutralisants par immunisation active.

1. Discussion sur l'inhibition du TNF α par les petites molécules

1.1. Sélection *in silico* des produits et efficacité du drug design

Le drug design permet une sélection des produits en amont de l'expérimentation. En effet, là où on pouvait tester un million de produits, le drug design permet de diminuer drastiquement les tests *in vitro* et surtout *in vivo* réduisant ainsi les coûts et le temps d'expérimentation. Ainsi, en ciblant la poche décrite par He *et al.* en 2005¹³⁹, l'équipe de drug design du laboratoire, à partir d'une bibliothèque d'un million de composés, a sélectionné les 1000 meilleures molécules pour leur positionnement dans cette poche. À partir de ces 1000 produits, nous avons identifié un composé actif à la fois *in vitro* et *in vivo* car il protège les animaux dans un modèle de choc septique à la fois en injection intrapéritonéale et par gavage. Ce produit est aussi actif dans un modèle de colite au DSS. Il faut souligner ici que la structure tri-dimensionnelle de la poche de la cytokine murine est identique à celle de la

cytokine humaine, et nous nous attendons donc à ce que les produits actifs reconnaissent aussi bien la cytokine TNF α murine que la cytokine TNF α humaine. C'est effectivement ce que nous avons observé lors du criblage *in vitro*. Un avantage important de cette approche est que les composés identifiés pourront être testés en modèle *in vivo* de souris tout en sachant qu'ils devraient être efficaces de la même manière sur le TNF α humain.

Avec deux experts en drug design et un expérimentateur (moi-même), nous avons donc pu en douze mois identifier un inhibiteur direct du TNF α actif *per os* (chez la souris), ce qui n'avait jamais été décrit auparavant.

1.2. Critiques des expérimentations choisies pour le criblage *in vitro*

L'expérimentation *in vitro* s'est effectuée sur deux paramètres : la neutralisation de l'activité biologique du TNF α dans un test cellulaire (cellules L929) et la mesure de la fluorescence intrinsèque du TNF α .

Nous avons choisi le test cellulaire car il était disponible au laboratoire depuis plusieurs années et il est facile à réaliser à grand débit. Cependant, il a fallu déterminer avec précision une concentration de TNF α suffisante permettant la mortalité cellulaire mais suffisamment basse pour ne pas masquer un effet potentiel d'une petite molécule. J'ai dû tester plusieurs fournisseurs de cytokines, le TNF α présentant le meilleur effet avec une concentration peu élevée provenait de chez R&D Systems.

Le choix d'un test cellulaire pour le criblage expérimental n'est pas usuel en pharmacie. Les chimistes pharmaceutiques préfèrent usuellement un test direct d'activité biochimique car cela montre l'interaction directe du produit avec la protéine ciblée. Nous n'avions pas de tel test à notre disposition quand j'ai débuté le travail. Depuis, j'ai mis au point un test d'inhibition de la fixation du TNF α au récepteur de type ELISA, et nous nous sommes posés la question de savoir si ce test aurait été plus efficace pour le criblage des meilleurs composés. Si l'on compare les avantages et inconvénients des deux tests, la réponse est mitigée :

Le test cellulaire va aboutir à la sélection d'inhibiteurs du TNF α mais aussi d'inhibiteurs agissant en aval au niveau des voies de signalisation. Il y aura donc un excès de composés trouvés et c'est d'ailleurs ce que l'on a observé : le test de mesure de la fluorescence intrinsèque du TNF α a permis d'éliminer 2 composés non spécifiques du TNF α alors qu'ils étaient actifs dans le test L929. Le test cellulaire permet aussi d'éliminer des

composés toxiques *in vitro*, ce qui présente le risque de passer à côté de composés très efficaces et optimisables par la suite.

Le test de liaison au récepteur *in vitro* est certainement plus spécifique, mais il est plus délicat à mettre en œuvre. Son utilisation à grande échelle serait certainement plus difficile à mettre en œuvre que celle du test cellulaire. L'identification de composés actifs par le test de liaison au récepteur ne garantit pas une absence de toxicité.

Compte-tenu des avantages et inconvénients des deux tests (cellulaire versus ELISA), si nous avions à recommencer, nous rechoisirions le test cellulaire car il aboutit a priori à moins de résultats positifs. Un autre argument décisif est le coût : le test cellulaire coûte nettement moins cher que le test ELISA.

Au-delà du test cellulaire pour le criblage, nous avons utilisé la mesure de la fluorescence intrinsèque pour montrer la fixation directe des composés sur le TNF α . Une difficulté majeure a été de gérer la solubilisation des produits dans le PBS avec un minimum de DMSO. Nous nous sommes rendus compte que l'ajout de Tween 20 stabilisait bien la solution et ce problème de solubilisation a été ainsi réglé. Le test de fluorescence intrinsèque a permis d'éliminer 2 des 3 produits les plus actifs sélectionnés suite au criblage sur lignée L929. Ces produits doivent bloquer d'autres étapes en aval de la fixation du TNF α à son récepteur, mais nous ne savons pas quelles sont les cibles précises, ce qui peut poser un problème sur le plan du développement pharmaceutique. L'utilisation de ce test de fixation directe pour le criblage à grande échelle est elle aussi inconcevable car chaque mesure pour un composé prend plusieurs heures et ce test n'apporte pas de réponse quant à la toxicité éventuelle d'un produit.

1.3. Critiques des expérimentations *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* ont été réalisées en deux temps. Dans un premier temps, nos produits ont été testés dans un modèle TNF α -dépendant, le choc septique au LPS/D-Galactosamine puis dans un modèle de colite au DSS où le rôle pathologique du TNF α a été démontré.

1.3.1. Le choc septique au LPS/D-Galactosamine

Le choc septique au LPS-D-Galactosamine consiste à injecter une faible dose de LPS (de l'ordre du microgramme) en association avec 20 mg de D-Galactosamine¹⁸². La D-

Galactosamine va empêcher l'incorporation de l'uridine lors de la synthèse d'ARN au niveau des hépatocytes, et donc bloquer la transcription. En l'absence de signaux de survie (liés à la transcription), le $TNF\alpha$, produit par les macrophages sous l'induction du LPS, va se fixer à son récepteur et induire l'apoptose massive des hépatocytes, conduisant à une défaillance du foie et à la mort de l'animal.

Comme les produits sont peu solubles en PBS et que le DMSO est toxique à forte concentration chez l'animal, nous avons dû trouver des méthodes alternatives. Après discussion avec une pharmacienne du laboratoire, nous avons opté pour le Cremophor® qui est une huile de ricin. Pour des injections intrapéritonéales, nous utilisons donc une émulsion avec 25% de Cremophor®, 25% d'alcool et 50% de PBS. Pour le gavage, nous avons d'abord essayé avec du Cremophor® mais les produits actifs en i.p. ne l'étaient plus. C'est pourquoi nous avons essayé de gaver les souris avec du DMSO pur (dans un volume de 100 μ l) et cela s'est avéré concluant avec nos produits. La différence entre DMSO et Cremophor® en gavage pourrait s'expliquer par plusieurs possibilités: le DMSO pourrait faciliter l'absorption intestinale car il est un peu "abrasif", le Cremophor® peut "piéger" la molécule et l'empêcher d'être absorbé, le Cremophor® en tant qu'huile peut accélérer le transit et réduire la captation du produit.

Le modèle de choc septique au LPS/D-Galactosamine nous a ainsi permis de montrer que nos produits induisaient une protection totale en injection intrapéritonéale avec 1 mg de composé, et en gavage avec 5 mg de composé. Il faut souligner que si le test au LPS-Galactosamine est très fiable, nous avons eu de gros soucis pour le faire fonctionner lorsque nous avons changé de salle d'hébergement. Il y a eu trois mois où les souris témoins n'étaient plus sensibles au choc septique et nous avons essayé de changer tous nos réactifs mais sans succès. Il a simplement suffi de rajouter une semaine d'adaptation en salle suite à la livraison des souris, pour que le test se remette à fonctionner comme auparavant. Il convient donc de bien héberger les animaux en évitant les événements stressants qui peuvent perturber l'expérimentation et augmenter la résistance des souris à l'induction du choc septique.

Même si le test de choc au LPS-Galactosamine est fiable et reproductible, il ne pourrait pas être utilisé directement pour le criblage des produits identifiés par drug design. Ce ne serait pas acceptable éthiquement et de plus cela coûterait trop cher (10 souris par produit au minimum).

1.3.2. Toxicité du DMSO administré en gavage quotidien sur une durée prolongée

Nous avons testé nos meilleurs produits dans le modèle de colite au DSS en gavant les souris tous les jours avec 100 µl de DMSO contenant 10 mg de produit. Ce modèle était important car il représentait cette fois une administration chronique sur douze jours et non plus un choc sur un jour. Les souris ayant reçu les produits ou du DMSO seul ont perdu beaucoup de poids et certaines sont mortes avant la fin de l'expérimentation. Face à ces résultats, nous avons dû réaliser une étude de toxicité (chapitre 1.3. des résultats) pour voir : 1. si l'utilisation du DMSO pur en gavage dans la colite n'était pas la cause de cette surmortalité et 2. rechercher une alternative (injection intrapéritonéale avec le Cremophor®).

Cette expérience a été critique car elle nous a permis de voir que le DMSO était bien toxique dans la colite et le Cremophor® permettait de contourner partiellement ce problème de toxicité pour une administration répétée du produit. En effet, les souris supportent de recevoir des injections tous les 3 jours, mais elles supportent mal une injection tous les 2 jours (perte de poids), et pas une injection quotidienne (mort). Une injection tous les 2 ou 3 jours sera une limitante pour tester l'effet d'un produit.

1.3.3. Critiques de l'expérimentation de colite au DSS

Le DSS est un produit chimique induisant une destruction de la muqueuse intestinale, provoquant une infiltration de la paroi par les bactéries de la flore commensale. Il en résulte une inflammation intestinale avec activation des cellules du système immunitaire, principalement du système immunitaire inné. Des études ont montré que le TNF α était augmenté dans cette pathologie^{185,186} et que les anti-TNF α diminuaient les symptômes de la maladie¹⁸⁷, et c'est pourquoi j'ai testé nos produits dans ce modèle. Suite aux tests de toxicité, nous avons choisi d'injecter les souris avec 100 µl de solution de 25 % Cremophor®, 25 % Ethanol, 50 % PBS contenant 1 mg de composé tous les trois jours.

La petite molécule injectée a permis de modérer la réduction de la longueur du colon. Ces résultats, même si significatifs, ne sont pas aussi flagrants que ceux que nous avons obtenus pour le modèle de choc septique et plusieurs explications peuvent intervenir. En effet, afin de ne pas stresser les souris, les injections sont réalisées tous les trois jours avec 1 mg de produit, les animaux reçoivent donc quatre injections au long de l'expérience, ce qui peut ne pas être suffisant pour traiter les animaux, l'idéal serait de pouvoir injecter les souris tous les

jours. Dans le choc septique au LPS/D-Galactosamine, le TNF α est l'acteur majoritaire dans la mort des animaux, alors que dans la colite, l'acteur chimique est le DSS ainsi que les cellules du système immunitaire qui vont produire des cytokines induisant et maintenant l'inflammation. Le TNF α n'est probablement pas la seule cytokine impliquée dans la pathologie et sa neutralisation, bien que suffisante pour induire l'effet protecteur observé au niveau du colon, n'est pas suffisante pour maintenir un poids normal des animaux.

Le rôle du TNF α reste néanmoins controversé dans la colite au DSS. En effet, un groupe a publié que le traitement des souris par des anticorps monoclonaux anti-TNF α provoque une aggravation des symptômes¹⁰⁸ dans la colite au DSS et un autre groupe a publié que des souris mutées pour les deux récepteurs du TNF α , TNFR1 et TNFR2 n'ont pas de diminution des symptômes de la maladie¹⁸⁸. Cependant, d'autres études ont montré que la neutralisation du TNF α dans un modèle de colite pouvait être bénéfique en termes de poids pour l'animal et de longueur du colon¹⁸⁷. Les résultats dans ce modèle se sont donc montrés variables. Nous sommes néanmoins confiants dans nos expériences car elles ont été reproduites plusieurs fois avec des témoins « bien nets ». Il conviendrait peut-être d'utiliser nos produits dans un modèle de colite où le TNF α a un rôle plus prépondérant, la colite au 2,4,6-trinitrobenzène sulfonate (TNBS). Nous n'avons pas choisi ce modèle il y a trois ans, car il nécessitait un savoir-faire que nous ne maîtrisions pas, à savoir les injections intrarectales. Toutefois, après discussion avec les animaliers de Cochin où nous avons transféré nos expérimentations animales, la mise en place du modèle ne poserait pas de problèmes majeurs et pourrait être réalisé avec leur aide.

1.4. Optimisation chimique

Lors du screening *in vitro*, nous avons identifié un produit possédant une IC₅₀ très basse de 1,5 μ M dans le test L929. Après une recherche d'analogues par une méthode de ligand-based, 27 autres produits ont été identifiés. Quatre de ces produits ont montré des IC₅₀s inférieures à 10 μ M de l'ordre de 1,5-1,7 μ M. Sous le conseil des chimistes de l'équipe, il a été décidé d'optimiser le premier produit ayant une IC₅₀ à 1,5 μ M et possédant un groupement méthoxy en R1, acétyl en R2 et méthyl en R3. Ce produit possède également un groupement furane. Huit produits ont été synthétisés dont l'un est une resynthèse du produit d'origine. Le produit d'origine resynthétisé a montré cette fois une IC₅₀ à 0,5 μ M. Sur les sept produits restant, trois produits se sont révélés actifs dont un possédant une IC₅₀ à 0,3 μ M. Dans ce

composé, le groupement acétyl en R2 a été remplacé par un hydrogène. Le retrait du groupement acétyl sur le furane, a ainsi permis de diminuer l'IC₅₀, passant de 0,5 µM à 0,3 µM. Les deux autres produits ayant une IC₅₀ plus élevée (29 µM et 72 µM) ont vu leur groupement methoxy en R1 remplacé par un sel ou un hydroxy, ce changement a provoqué l'augmentation des IC₅₀s des produits concernés. Nous nous attendions, en modifiant les groupements, à une modification de l'IC₅₀ calculée à partir du test de neutralisation de l'activité biologique du TNFα, cette IC₅₀ a effectivement diminué (pour le retrait du groupement acétyl), cependant, comme pour le produit d'origine, ce composé n'a pas été actif *in vivo* dans le choc septique au LPS/D-Galactosamine. Nous allons devoir poursuivre les investigations concernant les optimisations.

Ce produit d'origine s'est avéré négatif sur le test de fluorescence au tryptophane, et il est possible qu'il n'agisse pas directement sur le TNFα mais en aval. Nous l'avons développé car à l'époque, c'était notre meilleur candidat *in vitro* (et il l'est encore) et nous n'avions pas encore les résultats du test de fluorescence.

1.5. Intérêt de la cible et des petites molécules

Depuis 10 ans maintenant, les traitements des maladies inflammatoires chroniques ont été révolutionnés par l'arrivée des thérapies biologiques comme les anticorps monoclonaux anti-TNFα (infiximab, adalimumab) ou les récepteurs solubles (etanercept). Cependant, ces traitements comportent des inconvénients comme des effets secondaires, l'apparition d'anticorps anti-anticorps monoclonaux réduisant l'efficacité et conduisant à un changement de traitement, un mode d'administration contraignant associé à un coût très élevé. De plus, ces nouvelles thérapies ne sont pas efficaces chez un certain nombre de patients.

Les petites molécules sont des composés chimiques, en général plus faciles et moins chers à produire. Il n'existait pas de petits composés ciblant directement le TNFα et le choix de prendre cette protéine pour cible dans notre criblage vient du succès des anticorps monoclonaux dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques. Elle reste une cible de choix dans le traitement de ces pathologies malgré l'apparition de nouvelles thérapies ciblant d'autres cytokines comme le tocilizumab (IL-6R) ou l'ustekinumab (IL-23).

Nous avons choisi de définir un projet portant sur les petites molécules et ciblant le TNFα en développant de l'inhibition protéine-protéine par un criblage *in silico* puis *in vitro* et enfin *in vivo*. Le travail de 2005 réalisé par He *et al.*¹³⁹ avait déjà montré qu'il était possible de cibler

efficacement une poche dans le trimère de TNF α : ainsi la petite molécule SPD304 semblait induire la détrimérisation du TNF α et sa perte d'activité biologique. Au moment où nous effectuons nos expérimentations, trois articles ont été publiés sur des criblages *in silico* et *in vitro* de petites molécules qui ciblaient cette même poche. Les auteurs ont décrit des composés naturels¹⁴⁰, des composés déjà commercialisés par la Food and Drug Administration (FDA)¹⁴² ou encore des composés sélectionnés à partir d'une banque de produits¹⁴¹ comme étant des inhibiteurs du TNF α . Très récemment, un article est paru sur des produits composés d'un cœur métallique à base d'iridium ou de rhodium¹⁸⁹. Ces petites molécules sont capables d'inhiber la fixation du TNF α sur son récepteur TNFR1 avec des IC₅₀s de l'ordre de 20 μ M et d'inhiber l'activation de NF κ B dans des cellules HepG2¹⁸⁹. Malgré des produits actifs *in vitro*, aucun n'a montré de protection dans des modèles animaux. Les produits que nous avons identifiés présentent donc un intérêt non négligeable car ils ont été sélectionnés pour leur capacité à se positionner dans la poche du TNF α , sont actifs dans un test *in vitro* spécifique du TNF α et protègent les animaux dans deux modèles animaux : le choc septique au LPS/D-Galactosamine et la colite au DSS.

Les résultats obtenus entrouvent la porte d'une nouvelle catégorie de médicaments, les petites molécules inhibitrices directes de cytokines. Jusqu'à présent, à ma connaissance, les inhibiteurs du TNF α ciblaient soit la transcription/traduction de la cytokine (Thalidomide) soit les protéines impliquées dans sa voie de signalisation (MAP kinase) ou encore celle impliquée dans le relargage de la cytokine dans le milieu (TACE). À part le thalidomide, ces produits sont encore en phase d'essai clinique dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques. Les essais sur les produits inhibant la MAP kinase ont même été abandonnés du fait d'un manque d'efficacité des composés^{129,130,131}.

Un inhibiteur direct du TNF α pourrait présenter des avantages importants. Tout d'abord, les coûts de production seraient fortement réduits par rapport aux coûts de production des anticorps monoclonaux. Les coûts de traitements seraient ainsi normalement réduits. En effet, un traitement par anticorps monoclonaux est d'environ \$20 000 par an et par patient.

Comme il est mentionné dans l'introduction, les anticorps monoclonaux ou récepteurs solubles sont des solutions injectables, par voie intraveineuse ou sous-cutanée avec des délais plus ou moins longs entre chaque piqure. L'avantage des petites molécules est la possibilité de faire un médicament en comprimés avec un mode d'administration plus aisé et moins contraignant pour le patient, surtout pour les injections par voie intraveineuse, devant être réalisée par du personnel soignant ; les injections sous-cutanées pouvant être réalisées par le

patient, à l'aide d'un stylo injectable. L'intérêt des petites molécules réside également dans la possibilité de stopper le traitement dès l'apparition d'effets secondaires.

Enfin, comme pour toutes les maladies où des résistances surviennent, il faut disposer d'un arsenal thérapeutique aussi large que possible pour alterner de nouveaux traitements et les petites molécules seraient un plus important dans cet arsenal.

1.6. Perspectives sur le développement des petits composés anti-TNF α

Le travail que j'ai réalisé est à l'interface de plusieurs disciplines : la bioinformatique, la biologie et la chimie. Par des étapes de sélection *in silico*, *in vitro* et *in vivo*, nous avons pu obtenir un composé anti-TNF α protégeant les animaux dans deux modèles de maladies. Des optimisations chimiques ont été réalisées afin d'améliorer les IC₅₀ d'un des meilleurs produits détectés par le criblage mais ces composés optimisés restent non efficaces dans les modèles animaux.

Un des problèmes majeurs auquel nous sommes confrontés est la faible solubilité des produits. Une meilleure solubilité permettrait probablement une meilleure biodisponibilité des composés et surtout de pouvoir les tester de manière plus efficace dans des modèles murins. Par exemple, certains produits sont inactifs *in vivo* alors qu'ils sont très actifs *in vitro* et on peut se demander si ce n'est pas lié à une mauvaise bio-disponibilité. Nous avons eu la chance d'obtenir dans notre travail un composé actif oralement dans le choc septique, mais j'ai bien souligné la difficulté de son utilisation dans un modèle chronique car on ne peut l'administrer qu'une fois tous les deux ou trois jours en injection intrapéritonéale car *per os* son solvant actuel, le DMSO est toxique lors d'administrations répétées. Les pistes pour améliorer ce problème sont bien-sûr l'optimisation chimique (qui est en cours), mais aussi l'utilisation d'autres solvants. En ce moment, nous testons des solutions DMSO/Tween 80 où le DMSO n'est plus qu'à 5% (au lieu de 100%) pour le gavage. L'avantage du gavage est qu'il permettrait une prise quotidienne si le solvant n'est pas toxique.

Aujourd'hui les anti-TNF α sont utilisés en clinique dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, et nous aimerions tester nos composés dans des modèles murins pertinents comme le modèle murin d'arthrite au collagène^{156,155} qui mime la polyarthrite rhumatoïde et le modèle murin d'imiquimod¹⁹⁰ qui mime le psoriasis. Le succès de ces expériences dépendront de notre réussite pour solubiliser et optimiser nos meilleurs composés.

La suite logique de ce travail reste l'optimisation chimique du meilleur composé actif *in vivo* ce qui devrait normalement permettre de gagner un ou deux logs d'activité. Il serait alors possible de traiter les souris avec moins de 50 $\mu\text{g per os}$, soit, en poids comparé, à 2 grammes par jour, ce qui devient raisonnable pour un traitement médicamenteux. L'avantage de développer un tel médicament est qu'on sait qu'il agit directement sur le TNF α humain et seule sa toxicité constituerait un obstacle majeur.

En prenant du recul sur l'approche que j'ai suivie et ses objectifs, je me rends compte que nous avons identifié un inhibiteur parmi les mille meilleurs composés issus du criblage *in silico* d'une banque de un million de composés, soit les 1 pour mille meilleurs. Les publications de drug design montrent généralement un enrichissement en composés actifs dans les 1 % voire 5 % meilleurs composés issus du criblage¹⁹¹. Il est donc très probable que d'autres composés actifs d'intérêt soient présents à la suite des mille meilleurs composés testés expérimentalement, et afin d'élargir l'arsenal de molécules anti-TNF α , il serait probablement astucieux de recommencer un criblage sur ces molécules suivantes.

2. Discussion sur l'inhibition du TNF α par l'immunisation active anti-cytokine

Au cours de ma thèse, j'ai également travaillé sur un autre projet, l'immunisation active à base de peptides de cytokines en ciblant le TNF α . Comme exposé dans la partie C, cette approche n'a donné que peu de résultats. En effet, les peptides sélectionnés à l'aide de la bioinformatique ont permis d'induire une réponse humorale anti-peptide mais nous avons eu des difficultés à montrer une cross-réactivité avec la cytokine native. Plusieurs éléments de réflexion peuvent accompagner ces résultats :

2.1. Taille des peptides

Lors de la reconnaissance croisée avec la cytokine entière (**tableau 4**), nous avons pu observer que seuls les plus grands peptides permettaient de générer des anticorps anti-peptide. En effet, les peptides mTA500, mTA501 et mTA503 sont des peptides d'une taille de 7 à 9 acides aminés, et a fortiori, ils ne reconnaissent pas la cytokine entière. La taille du peptide pourrait donc avoir une importance dans la réponse anti-peptide et anti-cytokine et influencerait l'immunogénicité. Ces résultats sont corroborés par les précédents peptides

réalisés au laboratoire, où les peptides courts (inférieurs à 10 acides aminés) étaient peu immunogènes.

2.2. Importance de la cyclisation des peptides

Par le passé, la cyclisation s'est montrée bénéfique dans l'immunogénicité de peptides synthétisés au sein du laboratoire, de sorte que tous nos peptides sont désormais cycliques. La cyclisation permettrait de stabiliser le peptide et ainsi d'homogénéiser les épitopes tout en essayant de respecter la structure tridimensionnelle de la cytokine native. Les épitopes du peptide pourraient ainsi « mimer » la structure de la cytokine choisie et d'induire une meilleure reconnaissance croisée peptide/cytokine.

2.3. Démarche d'exploration suivie

La réponse humorale est d'abord explorée par les ELISA anti-peptide et anti-cytokine. Le niveau d'étude suivant est un test de neutralisation *in vitro*. Le test dont nous disposons pour TNF α au Laboratoire est le test d'apoptose sur la lignée L929. Le problème est que nous ne pouvons pas tester directement le sérum des souris immunisées sur ce test car il y a trop d'interférence au niveau de dilution où nous nous plaçons (de 1/5 à 1/100). Il faudrait des titres beaucoup plus élevés pour pouvoir éviter ces interférences en diluant beaucoup plus. C'est pourquoi nous avons réalisé des purifications d'anticorps à partir de sérum de lapin immunisé. Au bout du compte, nous avons été très déçus de ne pas obtenir d'anticorps neutralisants. C'est cette absence de réponse neutralisante sur des anticorps de lapin qui nous a conduit à ne pas tester les peptides dans un modèle animal. Néanmoins, la question reste posée de savoir si les résultats obtenus *in vitro* permettent d'extrapoler les résultats obtenus *in vivo*.

2.4. Conclusion

Je n'ai pas été la première à cibler le TNF α par immunisation active. Il y a eu au moins 3 autres équipes qui l'ont fait avant moi. En premier lieu, la société Néovacs qui utilise des kinoïdes, c'est à dire des cytokines entières inactivées chimiquement (sur l'image du toxoïde tétanique de la toxine tétanique). Cette approche s'est révélée prometteuse, avec de

nombreux résultats publiés¹⁹² et des essais cliniques qui se poursuivent actuellement chez l'homme. Il y a eu aussi la société Pharmexa qui a publié des résultats frappants chez la souris^{160, 161} en utilisant une molécule TNF α hybride contenant une séquence d'épitope T helper de l'ovalbumine. Ce travail a été repris en essai clinique chez l'homme pour traiter le mélanome¹⁶³, mais les résultats ont été négatifs dans cet essai car les anticorps ne reconnaissaient pas le TNF α humain natif. Il semble que le peptide hybride introduit comme épitope T ait trop modifié la structure tri-dimensionnelle du TNF α . Il y a eu des essais de vaccination par ADN contre le TNF α dans des modèles murins : les auteurs ont ainsi montré la protection obtenue dans des modèles d'arthrite à l'adjuvant chez le rat et du syndrome expérimentale des antiphospholipides chez la souris^{169,170,171,172}. Nous n'avons pas, à notre connaissance, de suite clinique documentée sur cette approche. Mon équipe avait, elle aussi, publié l'efficacité de l'immunisation contre un peptide dérivé du TNF α ¹⁷³. Mais il avait été montré que ce peptide permettait d'induire la production d'anticorps reconnaissant la cytokine native, et nous n'y sommes pas arrivés avec les peptides que j'ai testés. Il faudra donc repartir sur de nouvelles séquences de peptides ou cibler d'autres cytokines.

-E-

Conclusion

Les objectifs de cette thèse étaient de bloquer les effets néfastes de la surproduction du TNF α par deux approches différentes : l'inhibition du TNF α par les petites molécules et par immunisation avec des peptides dérivés de cette cytokine.

L'approche d'inhibition par les petites molécules s'est avérée très prometteuse. Suite aux différentes étapes de sélection *in silico*, *in vitro* et *in vivo*, nous avons pu mettre en évidence un composé protégeant les animaux lors d'un choc septique au LPS/D-Galactosamine et permettant le maintien de la longueur du colon dans une colite au DSS.

Nous avons aussi débuté l'optimisation des meilleurs composés *in vitro*, et sur une dizaine de molécules produites, nous avons déjà gagné un peu d'activité. Néanmoins, ce sont les composés actifs *in vivo*, qui ont été identifiés plus tardivement, qui sont les plus intéressants aujourd'hui. Leur optimisation a débuté en sous-traitance avec une société spécialisée en chimie médicinale.

L'approche d'immunisation contre des peptides dérivés du TNF α était mon projet initial de thèse qui a été bouleversé par l'arrivée du projet drug design. Même si les peptides testés n'ont pas été actifs, le travail lié à cette approche "vaccin" a présenté un intérêt car il mettait en jeu des concepts et des expérimentations complémentaires de l'approche petite molécule.

Mon travail s'inscrit dans une démarche de développement pharmaceutique en s'appuyant sur des outils à l'interface de la bioinformatique, de la chimie, et de la biologie. Avec une équipe de petite taille (4 personnes travaillant sur le projet), nous avons réussi en deux années à peine à produire un produit prometteur pour cibler la cytokine TNF α . Le fait de travailler dans ce cadre m'a beaucoup appris car nous avons toujours comme objectif d'avancer de manière optimale et cela a nécessité des choix non conventionnels comme celui du criblage sur un test en lignée cellulaire au lieu d'un criblage biochimique direct.

Les deux approches sur lesquelles j'ai travaillées représentent donc des avancées prometteuses pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques qui touchent environ 5 à 8 % de la population et qui, du fait de leur chronicité et des résistances qui surviennent, nécessitent un élargissement constant de l'arsenal thérapeutique.

Bibliographie

1. Bennett, I. L., Jr & Beeson, P. B. Studies on the pathogenesis of fever. I. The effect of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits. *J. Exp. Med.* **98**, 477–492 (1953).
2. Cohen, S., Levi-Montalcini, R. & Hamburger, V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom as 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **40**, 1014–1018 (1954).
3. Ealick, S. *et al.* Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science* **252**, 698–702 (1991).
4. Tang, P., Hung M-C & Klostergaard, J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* **35**, 8216–8225 (1996).
5. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A. & Kuby, J. *Immunologie: le cours de Janis Kuby: avec questions de révision.* (Dunod: Paris, 2008).
6. *The cytokine handbook I.* (Academic Press: Amsterdam [u.a., 2003).
7. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **147**, 258–267 (1957).
8. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163–189 (2004).
9. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
10. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **453**, 1051–1057 (2008).
11. Nandagopal, S., Wu, D. & Lin, F. Combinatorial Guidance by CCR7 Ligands for T Lymphocytes Migration in Co-Existing Chemokine Fields. *PLoS ONE* **6**, e18183 (2011).
12. Khan, I. A. *et al.* CCR5 Is Essential for NK Cell Trafficking and Host Survival following *Toxoplasma gondii* Infection. *PLoS Pathogens* **2**, e49 (2006).
13. Gay, N. J. & Keith, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355–356 (1991).
14. Sims, J. E. *et al.* Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6155–6159 (1993).
15. McMahan, C. J. *et al.* A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.* **10**, 2821–2832 (1991).
16. Korherr, C., Hofmeister, R., Wesche, H. & Falk, W. A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. *Eur. J. Immunol.* **27**, 262–267 (1997).
17. Symons, J. A., Young, P. R. & Duff, G. W. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1714–1718 (1995).
18. Sugamura, K. *et al.* The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 179–205 (1996).
19. Rochman, Y., Spolski, R. & Leonard, W. J. New insights into the regulation of T cells by γc family cytokines. *Nature Reviews Immunology* **9**, 480–490 (2009).
20. Plataniias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 375–386 (2005).
21. Ho, A. S. *et al.* A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11267–11271 (1993).
22. Gross, J. A. *et al.* TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* **404**, 995–999 (2000).
23. Anderson, D. M. *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175–179 (1997).

24. Smith, C. A., Farrah, T. & Goodwin, R. G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959–962 (1994).
25. Zlotnik, A. & Yoshie, O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36**, 705–716 (2012).
26. Zucali, J. R. *et al.* Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J. Clin. Invest.* **77**, 1857–1863 (1986).
27. Matsushima, K. *et al.* Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **167**, 1883–1893 (1988).
28. Wang, K. S., Frank, D. A. & Ritz, J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* **95**, 3183–3190 (2000).
29. Kobayashi, M. *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**, 827–845 (1989).
30. Chan, S. H. *et al.* Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* **173**, 869–879 (1991).
31. Manetti, R. *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* **177**, 1199–1204 (1993).
32. D'Andrea, A. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* **178**, 1041–1048 (1993).
33. Coley, W. B. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.* **14**, 199–220 (1891).
34. Shear, M. J., Turner, F. C., Perrault, A. & Shovelton, T. Chemical Treatment of Tumors. V. Isolation of the Hemorrhage-Producing Fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) Culture Filtrate. *J. Natl. Cancer Inst.* **4**, 81–97 (1943).
35. Algire, G. H., Legallais, F. Y. & Anderson, B. F. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. V. The rôle of hypotension in the action of a bacterial polysaccharide on tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **12**, 1279–1295 (1952).
36. O'Malley, W. E., Achinstein, B. & Shear, M. J. Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. *J. Natl. Cancer Inst.* **29**, 1169–1175 (1962).
37. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 3666–3670 (1975).
38. Williamson, B. D., Carswell, E. A., Rubin, B. Y., Prendergast, J. S. & Old, L. J. Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 5397–5401 (1983).
39. Beutler, B. *et al.* Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552–554 (1985).
40. Pennica, D. *et al.* Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724–729 (1984).
41. Aggarwal, B. B. *et al.* Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **260**, 2345–2354 (1985).
42. Shirai, T., Yamaguchi, H., Ito, H., Todd, C. W. & Wallace, R. B. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* **313**, 803–806 (1985).
43. Nedwin, G. E. *et al.* Structure and chromosomal localization of the human lymphotoxin gene. *J. Cell. Biochem.* **29**, 171–181 (1985).

44. Shirai, T., Shimizu, N., Shiojiri, S., Horiguchi, S. & Ito, H. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for mouse tumor necrosis factor. *DNA* **7**, 193–201 (1988).
45. Nedospasov, S. A. *et al.* The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse. *Nucleic Acids Res.* **14**, 7713–7725 (1986).
46. Smith, R. A. & Baglioni, C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* **262**, 6951–6954 (1987).
47. Wingfield, P., Pain, R. H. & Craig, S. Tumour necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Lett.* **211**, 179–184 (1987).
48. Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729–733 (1997).
49. Palladino, M. A., Bahjat, F. R., Theodorakis, E. A. & Moldawer, L. L. Anti-TNF- α therapies: the next generation. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**, 736–746 (2003).
50. Tartaglia, L. A., Pennica, D. & Goeddel, D. V. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 18542–18548 (1993).
51. McDermott, M. F. *et al.* Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* **97**, 133–144 (1999).
52. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **10**, 45–65 (2003).
53. Hehlgans, T. & Pfeffer, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**, 1–20 (2005).
54. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756 (2003).
55. Pettinelli, C. B. & McFarlin, D. E. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J. Immunol.* **127**, 1420–1423 (1981).
56. Oldstone, M. B. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* **50**, 819–820 (1987).
57. Bernard, C. C., Townsend, E., Randell, V. B. & Williamson, H. G. Do antibodies to myelin basic protein isolated from multiple sclerosis cross-react with measles and other common virus antigens? *Clin. Exp. Immunol.* **52**, 98–106 (1983).
58. Walter, U. *et al.* Pancreatic NOD beta cells express MHC class II protein and the frequency of I-A(g7) mRNA-expressing beta cells strongly increases during progression to autoimmune diabetes. *Diabetologia* **46**, 1106–1114 (2003).
59. Brewerton, D. A. *et al.* Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* **1**, 904–907 (1973).
60. Stastny, P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **298**, 869–871 (1978).
61. Duerr, R. H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461–1463 (2006).
62. Ruiz-Irastorza, G. *et al.* Increased rate of lupus flare during pregnancy and the puerperium: a prospective study of 78 pregnancies. *Rheumatology* **35**, 133–138 (1996).
63. Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M. M., Cortinvis-Tourniaire, P. & Moreau, T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 285–291 (1998).
64. Vasoo, S. Drug-induced lupus: an update. *Lupus* **15**, 757–761 (2006).
65. Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**, 1580–1588 (2010).

66. McGuire-Goldring, M. B. *et al.* In vitro activation of human chondrocytes and synoviocytes by a human interleukin-1-like factor. *Arthritis & Rheumatism* **27**, 654–662 (1984).
67. Nouri, A. M., Panayi, G. S. & Goodman, S. M. Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. I. The presence of interleukin-1 in synovial fluids. *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 295–302 (1984).
68. Dayer, J. M. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *Journal of Experimental Medicine* **162**, 2163–2168 (1985).
69. Hirota, K. *et al.* Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 2803–2812 (2007).
70. Romas, E., Gillespie, M. T. & Martin, T. J. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* **30**, 340–346 (2002).
71. DeGré, M., Mellbye, O. J. & Clarke-Jensen, O. Immune interferon in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis and related disorders. *Ann. Rheum. Dis.* **42**, 672–676 (1983).
72. Rosenbach, T. O., Moshonov, S., Zor, U. & Yaron, M. Interferon triggers experimental synovitis and may potentiate auto-immune disease in humans. *Clin. Rheumatol.* **3**, 361–364 (1984).
73. Germann, T. *et al.* Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4823–4827 (1995).
74. Murphy, C. A. Divergent Pro- and Antiinflammatory Roles for IL-23 and IL-12 in Joint Autoimmune Inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 1951–1957 (2003).
75. Kotake, S. *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **103**, 1345–1352 (1999).
76. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFβ in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
77. Hirano, T. *et al.* Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* **18**, 1797–1802 (1988).
78. Yokota, S. *et al.* Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **52**, 818–825 (2005).
79. Truelove, S. C. & Witts, L. J. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* **2**, 1041–1048 (1955).
80. Best, W. R., Beckett, J. M., Singleton, J. W. & Kern, F., Jr Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* **70**, 439–444 (1976).
81. Ogura, Y. *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 603–606 (2001).
82. Duchmann, R. *et al.* Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 448–455 (1995).
83. Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* **115**, 182–205 (1998).
84. Tanner, A. R., Arthur, M. J. & Wright, R. Macrophage activation, chronic inflammation and gastrointestinal disease. *Gut* **25**, 760–783 (1984).
85. Stevens, C. *et al.* Tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* **37**, 818–826 (1992).

86. Maeda, M. *et al.* Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **14**, 451–461 (1992).
87. Niessner, M. & Volk, B. A. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin. Exp. Immunol.* **101**, 428–435 (1995).
88. Wiekowski, M. T. *et al.* Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J. Immunol.* **166**, 7563–7570 (2001).
89. Schmidt, C. *et al.* Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: Elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* **11**, 16–23 (2006).
90. Fujino, S. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 65–70 (2003).
91. Hueber, W. *et al.* Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* **61**, 1693–1700 (2012).
92. Brenner, W., Gschnait, F. & Mayr, W. R. HLA B13, B17, B37 and Cw6 in psoriasis vulgaris: association with the age of onset. *Arch. Dermatol. Res.* **262**, 337–339 (1978).
93. Nair, R. P. *et al.* Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- κ B pathways. *Nature Genetics* **41**, 199–204 (2009).
94. Schön, M. P. & Boehncke, W.-H. Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1899–1912 (2005).
95. Luger, T. A., Stadler, B. M., Katz, S. I. & Oppenheim, J. J. Epidermal cell (keratinocyte)-derived thymocyte-activating factor (ETAf). *J. Immunol.* **127**, 1493–1498 (1981).
96. Grossman, R. M. *et al.* Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 6367–6371 (1989).
97. Barker, J. N., Sarma, V., Mitra, R. S., Dixit, V. M. & Nickoloff, B. J. Marked synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors. *J. Clin. Invest.* **85**, 605–608 (1990).
98. Griffiths, C. E., Voorhees, J. J. & Nickoloff, B. J. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J. Am. Acad. Dermatol.* **20**, 617–629 (1989).
99. Schröder, J. M., Gregory, H., Young, J. & Christophers, E. Neutrophil-activating proteins in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 241–247 (1992).
100. Teranishi, Y., Mizutani, H., Murata, M., Shimizu, M. & Matsushima, K. Increased spontaneous production of IL-8 in peripheral blood monocytes from the psoriatic patient: relation to focal infection and response to treatments. *J. Dermatol. Sci.* **10**, 8–15 (1995).
101. Teunissen, M. B. M., Koomen, C. W., de Waal Malefyt, R., Wierenga, E. A. & Bos, J. D. Interleukin-17 and Interferon- γ Synergize in the Enhancement of Proinflammatory Cytokine Production by Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **111**, 645–649 (1998).
102. Ansel, J. *et al.* Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 101S–107S (1990).
103. Nickoloff, B. J. *et al.* Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. *Am. J. Pathol.* **138**, 129–140 (1991).
104. Harper, E. G. *et al.* Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2175–2183 (2009).

105. Chan, J. R. *et al.* IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J. Exp. Med.* **203**, 2577–2587 (2006).
106. Selmaj, K., Raine, C. S. & Cross, A. H. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann. Neurol.* **30**, 694–700 (1991).
107. Williams, R. O., Feldmann, M. & Maini, R. N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9784–9788 (1992).
108. Kojouharoff, G. *et al.* Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **107**, 353–358 (1997).
109. Watkins, P. E., Warren, B. F., Stephens, S., Ward, P. & Foulkes, R. Treatment of ulcerative colitis in the cottontop tamarin using antibody to tumour necrosis factor alpha. *Gut* **40**, 628–633 (1997).
110. Elliott, M. J. *et al.* Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**, 1105–1110 (1994).
111. Targan, S. R. *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1029–1035 (1997).
112. Van den Brande, J. M. H. *et al.* Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**, 1774–1785 (2003).
113. Keystone, E. *et al.* Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum.* **58**, 3319–3329 (2008).
114. Smolen, J. *et al.* Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 797–804 (2009).
115. Emery, P. *et al.* Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naive patients with active rheumatoid arthritis: twenty-four-week results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of golimumab before methotrexate as first-line therapy for early-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 2272–2283 (2009).
116. Keystone, E. C. *et al.* Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor {alpha} given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORWARD Study. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 789–796 (2009).
117. Smolen, J. S. *et al.* Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor alpha inhibitors (GO-AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet* **374**, 210–221 (2009).
118. Smolen, J. S. *et al.* Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis who have previous experience with tumour necrosis factor inhibitors: results of a long-term extension of the randomised, double-blind, placebo-controlled GO-AFTER study through week 160. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1671–1679 (2012).
119. Lin, J. *et al.* TNFalpha blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. *Clin. Immunol.* **126**, 13–30 (2008).
120. Burmester, G. R., Panaccione, R., Gordon, K. B., McIlraith, M. J. & Lacerda, A. P. M. Adalimumab: long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid

- arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Annals of the rheumatic diseases* (2012).doi:10.1136/annrheumdis-2011-201244
121. Leonardi, C. L. *et al.* Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet* **371**, 1665–1674 (2008).
 122. Papp, K. A. *et al.* Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* **371**, 1675–1684 (2008).
 123. Griffiths, C. E. M. *et al.* Comparison of ustekinumab and etanercept for moderate-to-severe psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **362**, 118–128 (2010).
 124. Lachmann, H. J. *et al.* Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2416–2425 (2009).
 125. Emery, P. *et al.* IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1516–1523 (2008).
 126. Moreira, A. L. *et al.* Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.* **177**, 1675–1680 (1993).
 127. Sampaio, E. P., Sarno, E. N., Galilly, R., Cohn, Z. A. & Kaplan, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* **173**, 699–703 (1991).
 128. Majumdar, S., Lamothe, B. & Aggarwal, B. B. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J. Immunol.* **168**, 2644–2651 (2002).
 129. Dotan, I. *et al.* A randomised placebo-controlled multicentre trial of intravenous semapimod HCl for moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **59**, 760–766 (2010).
 130. Genovese, M. C. *et al.* A 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study of the efficacy of oral SCIO-469, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in patients with active rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **38**, 846–854 (2011).
 131. Damjanov, N., Kauffman, R. S. & Spencer-Green, G. T. Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum.* **60**, 1232–1241 (2009).
 132. Sands, B. E. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the oral interleukin-12/23 inhibitor apilimod mesylate for treatment of active Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1209–1218 (2010).
 133. Krausz, S. *et al.* Brief report: a phase IIa, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of apilimod mesylate, an interleukin-12/interleukin-23 inhibitor, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1750–1755 (2012).
 134. Bielekova, B. *et al.* Treatment with the phosphodiesterase type-4 inhibitor rolipram fails to inhibit blood--brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **15**, 1206–1214 (2009).
 135. Brun, R., Blum, J., Chappuis, F. & Burri, C. Human African trypanosomiasis. *Lancet* **375**, 148–159 (2010).
 136. Grazioli, L. *et al.* Inhibitory effect of suramin on receptor binding and cytotoxic activity of tumor necrosis factor alpha. *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 637–642 (1992).
 137. Alzani, R. *et al.* Suramin induces deoligomerization of human tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* **268**, 12526–12529 (1993).

138. Mancini, F. *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)/TNF-alpha receptor binding by structural analogues of suramin. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 851–859 (1999).
139. He, M. M. *et al.* Small-molecule inhibition of TNF-alpha. *Science* **310**, 1022–1025 (2005).
140. Chan, D. S.-H. *et al.* Structure-Based Discovery of Natural-Product-like TNF- α Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 2860–2864 (2010).
141. Choi, H., Lee, Y., Park, H. & Oh, D.-S. Discovery of the inhibitors of tumor necrosis factor alpha with structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 6195–6198 (2010).
142. Leung, C.-H. *et al.* Structure-based repurposing of FDA-approved drugs as TNF- α inhibitors. *ChemMedChem* **6**, 765–768 (2011).
143. Ratsimandresy, R. A., Rappaport, J. & Zagury, J.-F. Anti-cytokine therapeutics: history and update. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1998–2025 (2009).
144. Bendtzen, K., Svenson, M., Jønsson, V. & Hippe, E. Autoantibodies to cytokines--friends or foes? *Immunol. Today* **11**, 167–169 (1990).
145. Wildbaum, G., Nahir, M. A. & Karin, N. Beneficial autoimmunity to proinflammatory mediators restrains the consequences of self-destructive immunity. *Immunity* **19**, 679–688 (2003).
146. Zagury, D. *et al.* One-year follow-up of vaccine therapy in HIV-infected immune-deficient individuals: a new strategy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **5**, 676–681 (1992).
147. Coulaud, I. P. *et al.* A placebo-controlled clinical phase I trial with combined anti-HIV-1 and anti-interferon-alpha immunization. *AIDS* **11**, 937–938 (1997).
148. Gringeri, A. *et al.* Absence of clinical, virological, and immunological signs of progression in HIV-1-infected patients receiving active anti-interferon-alpha immunization: a 30-month follow-up report. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **13**, 55–67 (1996).
149. Gringeri, A. *et al.* A randomized, placebo-controlled, blind anti-AIDS clinical trial: safety and immunogenicity of a specific anti-IFN alpha immunization. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **7**, 978–988 (1994).
150. Gringeri, A. *et al.* Active anti-interferon-alpha immunization: a European-Israeli, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial in 242 HIV-1--infected patients (the EURIS study). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **20**, 358–370 (1999).
151. Zagury, D., Burny, A. & Gallo, R. C. Toward a new generation of vaccines: the anti-cytokine therapeutic vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 8024–8029 (2001).
152. Hansen, M. B., Svenson, M., Diamant, M. & Bendtzen, K. Anti-interleukin-6 antibodies in normal human serum. *Scand. J. Immunol.* **33**, 777–781 (1991).
153. Svenson, M., Poulsen, L. K., Fomsgaard, A. & Bendtzen, K. IgG autoantibodies against interleukin 1 alpha in sera of normal individuals. *Scand. J. Immunol.* **29**, 489–492 (1989).
154. Richard, M., Grecis, R. K., Humphreys, N. E., Renauld, J. C. & Van Snick, J. Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 767–772 (2000).
155. Le Buanec, H. *et al.* TNF kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNF protect mice from autologous TNF -driven chronic and acute inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19442–19447 (2006).
156. Delavallée, L. *et al.* Early and long-lasting protection from arthritis in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) transgenic mice vaccinated against TNFalpha. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1332–1338 (2008).

157. Rad, F. H. *et al.* VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2837–2842 (2007).
158. Communiqué de presse NeoVacs Phase II kinoïde TNFalpha Polyarthrite Rhumatoïde. <http://www.neovacs.fr/files/news/160fd15549b2fe8f072f34c1a1099434.pdf> (2012).
159. Communiqué de presse NeoVacs Phase II kinoïde TNFalpha Maladie de Crohn. <http://www.neovacs.fr/files/news/8bcbf86cb895787c5b4a6d7621dd5813.pdf> (2012).
160. Dalum, I. *et al.* Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF-alpha. *Nat. Biotechnol.* **17**, 666–669 (1999).
161. Waterston, A. M. *et al.* TNF autovaccination induces self anti-TNF antibodies and inhibits metastasis in a murine melanoma model. *Br. J. Cancer* **90**, 1279–1284 (2004).
162. Xue, X. *et al.* Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by BLYS autovaccine. *Vaccine* **26**, 2873–2881 (2008).
163. Waterston, A. M. *et al.* Phase I study of TNFalpha AutoVaccine in patients with metastatic cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 848–857 (2005).
164. Spohn, G. *et al.* Protection against osteoporosis by active immunization with TRANCE/RANKL displayed on virus-like particles. *J. Immunol.* **175**, 6211–6218 (2005).
165. Röhn, T. A. *et al.* Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2857–2867 (2006).
166. Spohn, G. *et al.* A virus-like particle-based vaccine selectively targeting soluble TNF-alpha protects from arthritis without inducing reactivation of latent tuberculosis. *J. Immunol.* **178**, 7450–7457 (2007).
167. Sonderegger, I. *et al.* Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2849–2856 (2006).
168. Spohn, G. *et al.* Active immunization with IL-1 displayed on virus-like particles protects from autoimmune arthritis. *Eur. J. Immunol.* **38**, 877–887 (2008).
169. Youssef, S., Wildbaum, G. & Karin, N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by MIP-1alpha and MCP-1 naked DNA vaccines. *J. Autoimmun.* **13**, 21–29 (1999).
170. Youssef, S. *et al.* Long-lasting protective immunity to experimental autoimmune encephalomyelitis following vaccination with naked DNA encoding C-C chemokines. *J. Immunol.* **161**, 3870–3879 (1998).
171. Wildbaum, G., Youssef, S. & Karin, N. A targeted DNA vaccine augments the natural immune response to self TNF-alpha and suppresses ongoing adjuvant arthritis. *J. Immunol.* **165**, 5860–5866 (2000).
172. Blank, M., Krause, I., Wildbaum, G., Karin, N. & Shoenfeld, Y. TNFalpha DNA vaccination prevents clinical manifestations of experimental antiphospholipid syndrome. *Lupus* **12**, 546–549 (2003).
173. Capini, C. J. *et al.* Active immunization against murine TNFalpha peptides in mice: generation of endogenous antibodies cross-reacting with the native cytokine and in vivo protection. *Vaccine* **22**, 3144–3153 (2004).
174. Bertin-Maghit, S. M. *et al.* Improvement of collagen-induced arthritis by active immunization against murine IL-1beta peptides designed by molecular modelling. *Vaccine* **23**, 4228–4235 (2005).
175. Ratsimandresy, R. A. *et al.* Active immunization against IL-23p19 improves experimental arthritis. *Vaccine* **29**, 9329–9336 (2011).
176. Guan, Q. *et al.* Development of recombinant vaccines against IL-12/IL-23 p40 and in vivo evaluation of their effects in the downregulation of intestinal inflammation in murine colitis. *Vaccine* **27**, 7096–7104 (2009).

177. Guan, Q. *et al.* Targeting IL-12/IL-23 by employing a p40 peptide-based vaccine ameliorates TNBS-induced acute and chronic murine colitis. *Mol. Med.* **17**, 646–656 (2011).
178. Ma, Y. *et al.* Targeting TGF-beta1 by employing a vaccine ameliorates fibrosis in a mouse model of chronic colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1040–1050 (2010).
179. Ma, Y. *et al.* Novel recombinant interleukin-13 peptide-based vaccine reduces airway allergic inflammatory responses in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 439–445 (2007).
180. Ma, Y., Ma, A. G. & Peng, Z. A potential immunotherapy approach: mucosal immunization with an IL-13 peptide-based virus-like particle vaccine in a mouse asthma model. *Vaccine* **25**, 8091–8099 (2007).
181. Fernandez-Botran, R. & Vetvicka, V. *Methods in cellular immunology*. (CRC Press: Boca Raton, Fla., 2001).
182. Freudenberg, M. A. & Galanos, C. Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice. *Infect. Immun.* **59**, 2110–2115 (1991).
183. Melgar, S. *et al.* Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 836–844 (2008).
184. Briand, J. P., Muller, S. & Van Regenmortel, M. H. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods* **78**, 59–69 (1985).
185. Hale, L. P. & Cianciolo, G. Treatment of experimental colitis in mice with LMP-420, an inhibitor of TNF transcription. *J Inflamm (Lond)* **5**, 4 (2008).
186. Alex, P. *et al.* Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 341–352 (2009).
187. Myers, K. J. *et al.* Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor-alpha in two murine models of colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 411–424 (2003).
188. Stillie, R. & Stadnyk, A. W. Role of TNF receptors, TNFR1 and TNFR2, in dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 1515–1525 (2009).
189. Leung, C.-H. *et al.* A Metal-Based Inhibitor of Tumor Necrosis Factor- α . *Angewandte Chemie (International ed. in English)* (2012).doi:10.1002/anie.201202937
190. van der Fits, L. *et al.* Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* **182**, 5836–5845 (2009).
191. Chen, Z. *et al.* Pharmacophore-based virtual screening versus docking-based virtual screening: a benchmark comparison against eight targets. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 1694–1708 (2009).
192. Delavallée, L. *et al.* Vaccination with cytokines in autoimmune diseases. *Ann. Med.* **40**, 343–351 (2008).

Communications scientifiques

Publications

Matthieu Montes, Hadley Mouhsine, Hélène Guillemain, Gabriel Moreau, Bruno Baron, Aur elien Latouche, Nesrine Ben Nasr, Lucille Desallais, Rojo Ratsimandresy, Jean-Louis Spadoni, Hervé Do, Patrick England, Jean-François Zagury (2012).

In vivo orally active small-molecule inhibitors of TNF . En préparation pour soumission à *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

Nesrine Ben Nasr, Hadley Mouhsine, Gabriel Moreau, Clotilde Ferroud, Jean-François Zagury, Françoise Dumas, Maité Sylla-Iyarreta Veitia, Matthieu Montes (2012).

Design, synthesis and biological evaluation of submicromolar Tumor Necrosis Factor   inhibitors. En préparation pour soumission à *J. Med. Chem.*

Brevet

Jean-François Zagury, Matthieu Montes, Hélène Guillemain, Hadley Mouhsine.

Benzenesulfonamide-compound treatment of a pathological condition linked to an excessive effect of TNF .

Déposé le 15 juillet 2010.

Communications orales

Hadley Mouhsine: Les cellules T_H17 chez l'homme et la souris. Décembre 2008. *Colloque International "Genomics, AIDS Pathogenesis and Immunotherapies"*. Ermenonville, France.

Hadley Mouhsine: Nouvelles cibles dans l'immunisation active. Novembre 2009. *Colloque International "Genomics, AIDS Pathogenesis and Immunotherapies"*. Ermenonville, France.

Hadley Mouhsine: Petites molécules inhibitrices du TNF  et immunisation par peptides du TNF . Octobre 2010. *Colloque International "Genomics, AIDS Pathogenesis and Immunotherapies"*. Ermenonville, France.

Hadley Mouhsine: Petites molécules inhibitrices du TNF . Novembre 2011. *Colloque International "Genomics, AIDS Pathogenesis and Immunotherapies"*. Ermenonville, France.

Hadley MOUHSINE

Développement de nouveaux inhibiteurs du TNF α
identifiés par Drug Design

Résumé

Les anticorps monoclonaux ont constitué une révolution dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques, mais ils présentent des inconvénients majeurs (effets secondaires, coûts élevés, résistance).

Notre équipe développe des inhibiteurs du TNF α par deux approches : immunisation active contre des peptides de cytokine pour générer des anticorps neutralisants et petites molécules chimiques pouvant inhiber directement le TNF α .

J'ai évalué *in vitro* les meilleurs composés d'un criblage d'une chimiothèque *in silico* et notamment identifié une petite molécule qui a protégé les animaux dans deux modèles de maladie *in vivo* (choc septique et colite au DSS).

J'ai aussi réalisé l'analyse d'analogues des meilleurs composés identifiés *in vitro*. J'ai également évalué plusieurs peptides de TNF α par immunisation active mais malgré leur design bioinformatique, les anticorps générés n'étaient pas neutralisants *in vitro*.

Mon travail s'est situé à l'interface de la bioinformatique, de la chimie et de la biologie et m'a permis de bien comprendre les enjeux du développement moderne du médicament.

Mots-clés : TNF α , inhibiteurs, petites molécules, criblage, immunisation active

Résumé en anglais

Monoclonal antibodies have been a revolution for the treatment of chronic inflammatory diseases but present several drawbacks (secondary effects, prohibitive costs and resistance).

Our team develops TNF α inhibitors using two approaches : active immunization against cytokine peptides and small molecules having a direct inhibition on TNF α .

I have evaluated *in vitro* the best compounds selected after *in silico* screening of a chemical library and I have identified a small molecule which was protective in two animal models (septic shock and DSS induced colitis). I have also analyzed chemical analogues of the best compounds found *in vitro*.

I have also tested the immunogenicity of TNF α peptides but they did not yield neutralizing antibodies *in vitro*, and we thus did not test them *in vivo*.

My work, at the interface of bioinformatics, chemistry and biology, and this has enabled me to understand the key issues in the modern development of drugs.

Key words : TNF α , inhibitors, small molecules, screening, active immunization