



HAL
open science

Immunisation active à base de peptides, dérivés de l'IL-6 et de l'IL-1 β , dans les maladies inflammatoires chroniques

Lucille Desallais

► To cite this version:

Lucille Desallais. Immunisation active à base de peptides, dérivés de l'IL-6 et de l'IL-1 β , dans les maladies inflammatoires chroniques. Médecine humaine et pathologie. Conservatoire national des arts et métiers - CNAM, 2013. Français. NNT : 2013CNAM0867 . tel-02645240

HAL Id: tel-02645240

<https://theses.hal.science/tel-02645240>

Submitted on 29 May 2020

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 *technologique et professionnelle*
Laboratoire Génomique, Bioinformatique et Applications

THÈSE présentée par :
Lucille DESALLAIS

soutenue le : **13 mai 2013**

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

Immunisation active à base de peptides dérivés de l'IL-6 et de l'IL-1 β dans les maladies inflammatoires chroniques

THÈSE dirigée par :

Monsieur ZAGURY Jean-François

Professeur, Conservatoire National des Arts et Métiers

RAPPORTEURS :

Monsieur THERWATH Amu

Monsieur CHEYNIER Rémi

Professeur, Université Paris-Diderot
Directeur de recherche, INSERM U1016

JURY :

Madame DANE Claire

Monsieur ALLANORE Yannick

Docteur, Service de Santé des Armées
Professeur, Université Paris Descartes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Pr. Jean-François Zagury pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour m'avoir accordé sa confiance et pour m'avoir permis d'entretenir ma passion pour la recherche.

Je suis très reconnaissante envers le Pr. Amu Therwath de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse en tant que rapporteur.

Je tiens à remercier vivement le Dr. Rémi Cheynier d'avoir accepté d'être rapporteur et d'évaluer mon travail.

Je remercie le Dr. Claire Dane pour avoir accepté d'être examinatrice de mon travail et pour l'intérêt qu'elle porte à la stratégie d'immunisation active anti-cytokine.

Je remercie également le Pr. Yannick Allanore d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en tant qu'examineur et de m'avoir fait profiter de ses connaissances sur la sclérodermie systémique.

Merci à la Direction Générale de l'Armement (DGA) pour avoir financé mon travail de thèse.

Un grand merci à l'équipe du Pr. Allanore et tout particulièrement au Dr. Jérôme Avouac, pour avoir partagé ses connaissances et m'avoir aidée à mener à bien le projet sur la sclérodermie. Merci au Pr. Liblau et à son équipe pour avoir rendu possible les tests dans l'EAE. Merci également au Pr. Quintin-Colonna pour avoir permis les tests chez le singe.

J'exprime ma reconnaissance au Dr. Matthieu Montes et au Dr. Rojo Ratsimandresy pour leur aide dans le choix des peptides dérivés de cytokines.

Merci également à toute l'équipe de l'animalerie EOPS de l'hôpital Cochin et tout particulièrement à Laetitia pour s'être occupée de la gestion de nos souris et à Otilia pour m'avoir formée sur les techniques d'expérimentations sur l'animal.

Un grand merci à Christiane Morel pour avoir toujours été là en cas de besoin.

Merci à Julie, qui se rerouvera sous peu dans la même situation que moi, notamment pour la relecture de mon introduction. Un grand merci à mes deux cytokines préférées Gaby et Hady. Gaby, je te remercie pour le partage de ta discothèque : Bibifoc, Inspecteur Gadget et Isabelle Adjani resteront mes amis pour la vie. Merci d'avoir entretenu la bonne ambiance au labo, d'avoir su écouter et de m'avoir aidé. Hady, merci pour tous ces moments partagés ensemble, pour ces week-ends au labo etc. Tu vois, on aura bien fini par l'avoir notre thèse ! Merci encore pour ton implication dans la relecture de mon manuscrit. Je tiens également à manifester une petite pensée pour Unix, qui aura éclairé notre quotidien pendant 1 an.

Je remercie l'équipe GBA du CNAM, à commencer par Sigrid pour son aide occasionnelle lors des sacrifices et des soumissions, Nathalie et Vincent les deux compétiteurs les plus acharnés, Lieng wo de zhongwen tongxue, Hélène pour sa bonne humeur, Hervé (et Caro) qui ont toute mon amitié, saperlipopette !! Merci également à tous les expatriés, Rojo, Sophie et Olivier. Enfin, merci à Damien, Nesrine, Taoufik, Jean-Louis et Pierre. Merci au Léonard et à Espit Chupitos pour avoir su assurer la bonne cohésion de l'équipe.

Merci également à ma tante Michèle et à Jean pour leur soutien, pour m'avoir toujours accueillie à bras ouverts afin de m'octroyer un moment de détente et pour croire en moi.

Merci à mes frères et soeurs Dorothee, Estelle et Mario qui occupent une grande place dans ma vie. Je tiens également à remercier Norbert, Auguste et Totoji pour leur présence.

Un grand merci à Cédric pour sa gentillesse et pour son soutien permanent : sans toi ça aurait été plus compliqué.

Je remercie également mes parents de m'avoir laissé choisir ma voie et chacun à leur manière d'avoir cru en moi.

Résumé

Les anticorps monoclonaux anti-cytokine ont constitué une révolution dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques, mais leur utilisation présente des inconvénients (non réponse, résistance, effets secondaires, coûts élevés).

Notre équipe développe une stratégie alternative originale, l'immunisation active à base de peptides de cytokines. Elle a pour but de faire synthétiser, par l'organisme même du patient, des anticorps neutralisant les effets pathogènes dus à l'excès de cytokines.

Durant ma thèse, j'ai montré que l'immunisation active contre un peptide dérivé de l'IL-6 murine est protectrice dans un modèle murin de sclérodémie systémique. L'immunisation de singes avec l'équivalent humain entraîne une réduction significative des réactions inflammatoires locales suite à l'induction d'une réaction d'HSR. De plus, l'immunisation active contre deux peptides dérivés de l'IL-1 β et de l'IL-23 conduit à la réduction de la sévérité de l'EAE.

Ces résultats confortent l'intérêt de cibler les cytokines par l'approche d'immunisation active à base de peptides, qui pourra permettre de diversifier l'offre thérapeutique actuellement disponible.

Mots clés : Immunisation active, IL-6, IL-1 β , peptide, maladies inflammatoires chroniques

Résumé en anglais

Monoclonal antibodies have been a revolution for the treatment of chronic inflammatory diseases, but their use shows major drawbacks (non-response, resistance, side effects and prohibitive costs).

Our team develops an original alternative strategy: anti-cytokine peptide-based active immunization. The aim of the approach is to make the patient's own organism produce antibodies capable of neutralizing the pathogenic effects of cytokine overproduction.

During my PhD, I have demonstrated that active immunization against an IL-6 murine peptide confers clinical protection in a murine model of systemic sclerosis. Monkeys immunized against the human peptide also showed a significant decrease of local inflammatory reactions following a delayed-type hypersensitivity test. Moreover, active immunization against an IL-1 β and an IL-23 murine peptide led to a reduction of the severity of the EAE in mice.

These results comfort the interest of anti-cytokine peptide-based active immunization, which should eventually widen the choice of therapeutics available for the patients.

Key words: Active immunization, IL-6, IL-1 β , peptide, chronic inflammatory diseases

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	4
Résumé en anglais	5
Table des matières	6
Liste des figures	10
Liste des tableaux	12
Abréviations	13
A. Introduction	17
1. Le système immunitaire	18
1.1. Définition de l'immunité	18
1.1.1. L'immunité innée	18
1.1.2. L'immunité adaptative	19
1.2. Présentation du système immunitaire	19
1.2.1. Les effecteurs cellulaires	20
1.2.1.1. Les cellules granulocytaires	20
1.2.1.2. Les cellules présentatrices d'antigènes	21
1.2.1.3. Les cellules Natural Killer	22
1.2.1.4. Les lymphocytes T	22
1.2.1.5. Les lymphocytes B	24
1.2.2. Les effecteurs moléculaires	25
1.2.2.1. Les anticorps	25
1.2.2.2. Les cytokines	28
1.2.3. Description de l'activation du système immunitaire en réponse à un agent infectieux	28
1.2.3.1. Activation de l'immunité innée	28
1.2.3.2. Activation de l'immunité adaptative	30
1.3. La tolérance immunitaire	31
1.3.1. La tolérance centrale	31
1.3.2. La tolérance périphérique	32
2. Cytokines et immunité	34
2.1. Généralités	34
2.2. Les familles de cytokines	36
2.3. Les récepteurs de cytokines	37
2.4. Le réseau de cytokines	39
2.5. Rôles des cytokines dans la réponse immunitaire	40
3. Deux cytokines centrales de l'immunité : l'IL-6 et l'IL-1β	41
3.1. L'interleukine-6	41
3.1.1. Historique	41
3.1.2. Génétique et caractéristiques structurales	41
3.1.3. Fonctions biologiques de l'IL-6	42
3.1.4. Les récepteurs de l'IL-6	43
3.1.5. Voies de signalisation de l'IL-6	45
3.1.6. Implication de l'IL-6 dans les maladies inflammatoires chroniques	46
3.2. L'interleukine-1β	47
3.2.1. Caractéristiques générales	47
3.2.2. Fonctions biologiques de l'IL-1 β	47
3.2.3. Voies de signalisation de l'IL-1 β	48
3.2.4. Régulation de l'activité de l'IL-1 β	49
3.2.5. Implication de l'IL-1 β dans les maladies inflammatoires chroniques	50

4. Les maladies inflammatoires chroniques	50
4.1. Généralités	50
4.2. Mécanismes lésionnels	51
4.3. Hypothèses mécanistiques	52
4.3.1. Libération des antigènes séquestrés	52
4.3.2. Les antigènes cryptiques	52
4.3.3. Le mimétisme moléculaire	52
4.3.4. Stimulation polyclonale non spécifique des lymphocytes B	53
4.3.5. Expression inappropriée des molécules de CMH	53
4.3.6. Facteurs de risques génétiques	54
4.3.7. Facteurs de risques environnementaux	55
4.4. Exemples de maladies inflammatoires chroniques et leurs traitements conventionnels associés	55
4.4.1. La sclérodémie systémique	55
4.4.2. La polyarthrite rhumatoïde	58
4.4.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	60
4.4.4. La sclérose en plaques	64
5. Une révolution : les traitements ciblés anti-cytokine	65
5.1. L'immunisation passive anti-cytokine	66
5.1.1. Les traitements ciblés anti-TNF α	67
5.1.2. Les traitements ciblés anti-IL-6	70
5.1.3. Les traitements ciblés anti-IL-1	73
5.1.4. Les traitements ciblés anti-IL-23	75
5.2. L'immunisation active anti-cytokine	75
5.2.1. Historique	76
5.2.2. Rationnel de la stratégie d'immunisation active anti-cytokine	77
5.2.3. Stratégies d'immunisation active anti-cytokine	80
5.2.3.1. Les vaccins à base de cytokines entières	81
5.2.3.2. Les vaccins à base d'ADN de cytokines	86
5.2.3.3. Les vaccins à base de peptides de cytokines développés au laboratoire	87
6. Objectifs de ma thèse	92
B. Matériels et Méthodes	94
1. Sélection, synthèse et couplage des peptides de cytokine	95
1.1. Sélection	95
1.2. Synthèse	95
1.3. Couplage	96
2. Étude de l'immunogénicité des peptides chez la souris	97
2.1. Protocole d'immunisation	97
2.2. Sacrifice des souris	98
3. Études de l'immunogénicité des peptides chez le lapin	98
3.1. Protocole d'immunisation	98
3.2. Purification des sérums de lapin	99
3.3. Détermination des titres anticorps par dosage ELISA direct à partir d'échantillons de souris ou de lapin	99
3.4. Neutralisation de l'activité de l'IL-6 par les anticorps purifiés de lapin	100
3.4.1. Entretien des cellules B9	100
3.4.2. Test de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 murine et humaine	101
3.5. Neutralisation de l'activité biologique de l'IL-1 β humaine par les anticorps purifiés de lapin	101
3.5.1. Entretien des cellules HEK-Blue™ IL-1 β	102
3.5.2. Test de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-1 β humaine	102

4.	Expérimentations <i>in vivo</i>	103
4.1.	Étude de l'efficacité de l'immunisation active anti-IL-6 dans un modèle murin de sclérodémie systémique	103
4.1.1.	Induction de la fibrose par injection de bléomycine	103
4.1.2.	Immunisations avec un peptide couplé dérivé de l'IL-6 murine	104
4.1.3.	Traitement avec un anticorps monoclonal anti-IL-6R	105
4.1.4.	Sacrifice des souris	106
4.1.5.	Caractérisations histologique et immunohistochimique	106
4.2.	Étude de l'efficacité de l'immunisation active anti-cytokine dans un modèle murin de sclérose en plaques	109
4.2.2.	Immunisations des souris contre des peptides de cytokines	109
4.3.	Étude d'immunogénicité et de toxicité chez le macaque cynomolgus	110
4.3.1.	Animaux	110
4.3.2.	Période d'acclimatation et identification des animaux	110
4.3.3.	Immunisation des singes	111
4.3.4.	Induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée	112
4.3.5.	Examens cliniques	113
C.	Résultats	114
1.	Approche d'immunisation active anti-IL-6	115
1.1.	Peptides dérivés de l'IL-6 murine	115
1.1.1.	Sélection des peptides	115
1.1.2.	Étude de l'immunogénicité des peptides couplés dérivés de la cytokine IL-6 murine chez un hôte autologue	116
1.1.3.	Étude de l'immunogénicité des peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine chez un hôte hétérologue	118
1.1.4.	Étude de l'activité neutralisante des anticorps anti-cytokine	120
1.2.	Peptide dérivé de l'IL-6 humaine	122
1.2.1.	Étude de l'immunogénicité du peptide couplé hIS200	123
1.2.2.	Étude de l'activité neutralisante des anticorps purifiés	123
1.3.	Modèles animaux murin et macaque	125
1.3.1.	Publication	125
1.3.2.	Résultats complémentaires de l'étude chez le macaque cynomolgus	140
1.3.2.1.	Dosage de l'IL-6 sérique	140
1.3.2.2.	Étude de la capacité neutralisante des anticorps purifiés de singe	140
2.	Approche d'immunisation active anti-IL-1β	142
2.1.	Peptide dérivé de l'IL-1 β murine	142
2.1.1.	Sélection d'un peptide dérivé de l'IL-1 β murine	142
2.1.2.	Étude de l'immunogénicité du peptide couplé mL-1 β 6	142
2.2.	Peptide dérivé de l'IL-1 β humaine	143
2.2.1.	Immunogénicité du peptide couplé hIL-1 β 6	143
2.2.2.	Étude de l'activité neutralisante des anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1 β 6	145
2.3.	Résultats obtenus dans un modèle murin de sclérose en plaques	148
2.3.1.	Titres ₅₀ anti-cytokine des souris C57BL/6 immunisées	148
2.3.2.	Suivi clinique des souris	150
D.	Discussion	152
1.	Expérimentations réalisées dans le cadre du projet d'immunisation active anti-IL-6	154
1.1.	Pertinence de la stratégie de sélection <i>in silico</i> des peptides	154
1.2.	Évaluation de l'immunogénicité des peptides couplés	154
1.3.	Neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 <i>in vitro</i>	155

1.4. Modèle murin de sclérodémie systémique induite par la blémomycine _____	156
1.5. Etude menée chez le macaque cynomolgus _____	158
2. Expérimentations réalisées dans le cadre du projet d'immunisation active anti-IL-1 β _____	160
2.1. Intérêt du peptide humain hIL-1 β 6 identifié _____	160
2.2. Modèle d'EAE induit par le peptide MOG ₃₅₋₅₅ _____	161
3. Intérêt de l'immunisation active à base de peptides de cytokines comparé aux autres stratégies anti-cytokine. _____	163
4. Perspectives _____	164
E. Conclusion _____	165
Bibliographie _____	168
Communications scientifiques _____	183

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Capacité de différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T auxiliaires de type Th1, Th2, Th17 et en lymphocytes T régulateurs, en fonction des cytokines produites dans l'environnement.	24
<u>Figure 2</u> : Représentation schématique de la structure d'un anticorps.	25
<u>Figure 3</u> : Représentation de la structure des cinq classes d'anticorps.	27
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique des sélections positive et négative des lymphocytes T dans le thymus.	32
<u>Figure 5</u> : Schéma représentant les cinq familles de récepteurs de cytokines.	39
<u>Figure 6</u> : Structure de l'IL-6 humaine (en orange) en interaction avec l'IL-6R α (en gris) et la gp130 (en bleu) (code PDB : 1P9M).....	42
<u>Figure 7</u> : Voies de signalisation de l'IL-6.	44
<u>Figure 8</u> : Représentation schématique des cascades de signalisation induites par l'IL-6.	46
<u>Figure 9</u> : Fonctions systémiques de l'IL-1 β	48
<u>Figure 10</u> : Voies de signalisation déclenchées en réponse à l'IL-1 β	49
<u>Figure 11</u> : Mécanisme d'action supposé de l'IL-6 dans les MICI.	62
<u>Figure 12</u> : Rupture de la tolérance par couplage de la cytokine entière à une protéine porteuse.	81
<u>Figure 13</u> : Rupture de la tolérance par insertion d'un épitope T immunodominant au sein de la séquence protéique de la cytokine ciblée.	83
<u>Figure 14</u> : Principaux constituants d'un vaccin à base de VLP	85
<u>Figure 15</u> : Rupture de la tolérance par transfection d'un plasmide codant pour la cytokine ciblée. ...	86
<u>Figure 16</u> : Protocole d'immunisation des souris OF1 contre des peptides dérivés de cytokines.....	98
<u>Figure 17</u> : Protocole expérimental pour la prévention de la fibrose induite par la BLM.....	104
<u>Figure 18</u> : Protocole expérimental pour la prévention de la fibrose induite par la bléomycine.	105
<u>Figure 19</u> : Protocole du modèle d'EAE réalisé chez la souris C57BL/6.	110
<u>Figure 20</u> : Protocole de l'étude d'immunogénicité et de toxicité réalisée chez le macaque cynomolgus.	111
<u>Figure 21</u> : Peptides murins dérivés de l'IL-6.	115
<u>Figure 22</u> : Titres ₅₀ anticorps anti-peptide et anti-cytokine des sérums de souris immunisées contre les peptides couplés de l'IL-6 murine.....	117
<u>Figure 23</u> : Titres ₅₀ anticorps anti-peptide et anti-cytokine des anticorps purifiés de lapin (n=1 par peptide, n=2 pour le peptide mIS200) immunisés contre les peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine.	119
<u>Figure 24</u> : Prolifération dose-dépendante de la lignée cellulaire B9 en réponse à l'IL-6 murine.....	121
<u>Figure 25</u> : Neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 humaine par les anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIS200.	124
<u>Figure 26</u> : Évaluation de la concentration d'IL-6 sérique chez les singes immunisés.	140
<u>Figure 27</u> : Neutralisation de l'activité biologique par les anticorps purifiés de singes immunisés contre le peptide couplé hIS200.	141

<u>Figure 28</u> : Structure tridimensionnelle de l'IL-1 β murine (code PDB : 2MIB). En orange, le peptide mIL-1 β 6.....	142
<u>Figure 29</u> : Structure tridimensionnelle de l'IL-1 β humaine (code PDB : 1ITB). En jaune, le peptide hIL-1 β 6.....	144
<u>Figure 30</u> : Sécrétion dose-dépendante de phosphatase-alcaline par les cellules HEK-Blue™ IL-1 β , en réponse à l'hIL-1 β	146
<u>Figure 31</u> : Neutralisation de l'activité biologique de l'IL-1 β humaine par les anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1 β 6.....	147
<u>Figure 32</u> : Réponse ELISA anti-cytokine des souris immunisées contre les peptides mIL-1 β 6, mIS200 et m2K	149
<u>Figure 33</u> : Courbe de Kaplan-Meier représentant la survenue de la maladie dans les groupes de souris immunisées contre le peptide m2K et contre la KLH.	150
<u>Figure 34</u> : Suivi des scores cliniques des souris immunisées contre les peptides couplés mIL-1 β 6, mIS200 et m2K.	151

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Familles de cytokines, basées sur leurs similarités structurales.	37
<u>Tableau 2</u> : Mimétisme moléculaire entre la protéine humaine de la myéline et la protéine virale P3 de la rougeole.	53
<u>Tableau 3</u> : Effets des cytokines sur le fibroblaste.	57
<u>Tableau 4</u> : Traitements ciblés anti-cytokine ou anti-récepteur de cytokines commercialisés.	66
<u>Tableau 5</u> : Liste des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL-6 actuellement en développement...	73
<u>Tableau 6</u> : Caractéristiques de l'immunité conférée par les stratégies d'immunisation passive et active.	79
<u>Tableau 7</u> : Comparaison des propriétés des différentes protéines porteuses couramment utilisées. ..	90
<u>Tableau 8</u> : Description des groupes de souris.	104
<u>Tableau 9</u> : Description des groupes de souris constitués afin de tester l'efficacité d'un anticorps monoclonal anti-IL-6R dans le modèle de sclérodémie systémique à la BLM.....	105
<u>Tableau 10</u> : Score clinique de la réaction inflammatoire cutanée aux sites d'injections.	112
<u>Tableau 11</u> : Peptides dérivés de l'IL-6 murine sélectionnés.	116
<u>Tableau 12</u> : Titres ₅₀ anticorps anti-peptide et anti-cytokine des sérums de souris immunisées contre les peptides couplés de l'IL-6 murine.	117
<u>Tableau 13</u> : Titres ₅₀ anticorps des sérums et des anticorps purifiés de lapin (n=1 par peptide, n=2 pour le peptide mIS200) immunisés contre les peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine.	120
<u>Tableau 14</u> : Pourcentages de neutralisation obtenus avec les anticorps purifiés de lapin immunisés contre les peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine.	121
<u>Tableau 15</u> : Tableau présentant la séquence du peptide hIS200.	122
<u>Tableau 16</u> : Titres ₅₀ anticorps des sérums de souris ainsi que des sérums et anticorps purifiés de lapin, immunisés contre le peptide couplé hIS200.....	123
<u>Tableau 17</u> : Titres ₅₀ anticorps anti-peptide et anti-cytokine des souris OF1 (n=4) et du lapin immunisé contre le peptide mL-1β6.	143
<u>Tableau 18</u> : Tableau présentant les deux peptides dérivés de l'IL-1β utilisés au cours de cette étude.	144
<u>Tableau 19</u> : Titres ₅₀ anticorps des sérums de souris ainsi que des sérums et anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1β6.....	145
<u>Tableau 20</u> : Pourcentage de neutralisation de l'activité biologique de l'hIL-1β par les anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1β6.....	147
<u>Tableau 21</u> : Nombre de souris décédées suite aux immunisations, et suite à la maladie.	148

Abréviations

5-ASA	Acide 5 amino-salicylique
ADCC	Antibody Dependant Cell Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AICD	Activation Induced Cell Death
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AIRE	AutoImmune Regulator
AJI	Arthrite Juvénile Idiopathique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AP-1	Activator Protein-1
APRIL	A Proliferation-Ingucing Ligand
ARN	Acide RiboNucléique
BAD	Bcl-2 Associated Death promoter
BAFF	B-cell Activating Factor
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BCMA	B-Cell Maturation Antigen
BCR	B-Cell Receptor
BCSF-2	B-Cell Stimulatory Factor-2
BDB	Bis-Diazo-Benzidine
BLM	Bléomycine
BLyS	B-Lymphocyte Stimulator
CDF	Cytotoxic T-cell Differentiation Factor
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CpG	Cytosine phosphate Guanine
CRP	C-Reactive Protein
CSF	Colony Stimulating Factor
CSH	Cellules Souches Hematopoïétiques
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
DAMP	Damaged Associated Molecular Pattern

DAS	Disease Activity Score
DMARD	Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
EBV	Epstein Barr Virus
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EOPS	Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique
ERK1/2	Extracellular signal Related Kinase
ESR	Erythrocyte Sedimentation Rate
EULAR	EUropean League Against Rheumatism
FasL	Fas Ligand
Fc	Fragment constant
FDA	Food and Drug Administration
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GA	GlutarAldéhyde
Gab-1	Grb2 Associated Binder-1
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GWAS	Genome-Wide Association Study
HEL	Hen Egg Lysosyme
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HRP	HorseRadish Peroxidase
HSF	Hepatocyte Stimulating Factor
HSR	Hypersensibilité retardée
IFA	Incomplete Freund's Adjuvant
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IKK	IkB kinase
IL-	Interleukine
IL-1RAcP	IL-1 Receptor Accessory Protein
IL-1RI	IL-1 Receptor type I
IL-1RII	IL-1 Receptor type II

IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	kilo Dalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
KO	Knock-Out
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MAP	Mitogen-Activated Protein
MBP	Myelin Basic Protein
MC	Maladie de Crohn
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MPOC	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
MTX	Méthotrexate
MYD88	MYeloid Differentiation primary response 88
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killer
NOD	Non-Obese Diabetic
OVA	Ovalbumine
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDB	Protein Data Bank
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEG	PolyEthylène Glycol
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase
PR	Polyarthrite Rhumatoïde

PRR	Pathogen Recognition Receptor
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand
RCH	RectoColite Hémorragique
SAA	Serum Amyloid A
ScS	Systemic Sclerosis
SHP2	SH2-domain containing tyrosine phosphatase 2
sIL-6R	soluble IL-6 Receptor
SOS	Son Of Sevenless
SPAC	Syndromes Périodiques Associés à la Cryopirine
STAT	Signal Transducer and Activators of Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TA	Température Ambiante
TAB1	TGF- β Activated protein kinase-Binding protein 1
TAC1	Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor
TAK1	TGF- β Activated protein Kinase 1
TCR	T-Cell Receptor
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Th	T helper
TIR	Toll IL-1 Receptor
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis factor
TPO	Trombopoïétine
TRAF	Tumor necrosis factor-Associated Factor
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg	T régulateurs
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
TTX	Tetanus Toxoïd
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLP	Virus-Like Particule
α-SMA	α -Smooth Muscle Actin

A. Introduction

1. Le système immunitaire

1.1. Définition de l'immunité

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 tels que les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ils permettent également de discriminer le « Soi altéré » à savoir les cellules tumorales. Cette discrimination a pour but de permettre l'élimination des constituants néfastes pour l'organisme sans altérer ses propres constituants.

L'organisme est protégé des agents infectieux par un ensemble de cellules et de molécules effectrices qui constituent le système immunitaire. Ce système a pour fonction de contenir et d'éliminer les infections en détectant les agents pathogènes responsables et de produire une réponse visant à leur neutralisation. La réponse immunitaire, déclenchée suite à la pénétration d'un pathogène dans l'organisme, a deux composantes : l'immunité innée (non spécifique) et l'immunité adaptative (spécifique).

1.1.1. L'immunité innée

La plupart des micro-organismes rencontrés au cours de la vie d'un individu ne conduisent pas au déclenchement d'une maladie. En effet, la majorité d'entre eux sont détectés et détruits rapidement après leur pénétration dans l'organisme.

L'immunité innée est constituée, d'une part, des barrières épithéliales (peau, tractus digestif, respiratoire et génital) qui vont sécréter un ensemble de substances microbicides (lysozyme, phospholipase A) et, d'autre part, d'un ensemble d'effecteurs cellulaires tels que les macrophages, les neutrophiles ou encore les cellules dendritiques permettant de contenir la plupart des infections. L'immunité innée a une diversité limitée : ses effecteurs ne reconnaissent pas un pathogène en particulier mais un ensemble de caractéristiques partagées par différentes classes de pathogènes qui sont absentes des cellules de l'hôte, appelées motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs pour *Pathogen Associated Molecular Pattern*) comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives. Ces PAMPs sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR pour *Pattern Recognition Receptor*) à la surface des macrophages et des neutrophiles tels que les récepteurs Toll-Like (TLR pour *Toll-Like Receptor*). La reconnaissance des tissus endommagés ou des cellules apoptotiques se fait via les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs

pour *Damaged Associated Molecular Patterns*). Cette reconnaissance va permettre d'induire l'inflammation et ainsi l'élimination des pathogènes, des cellules mortes et des corps étrangers. Elle permet également l'induction d'un état antiviral et dans le cas où l'infection ne serait pas entièrement contenue, de stimuler une réponse immunitaire adaptative.

1.1.2. L'immunité adaptative

Contrairement à la réponse immunitaire innée, la réponse immunitaire adaptative est spécifique d'un pathogène et permet la génération d'une mémoire immunologique. Celle-ci permettra, en cas de nouvelle exposition au même agent pathogène, la mise en place d'une réponse immunitaire plus rapide et amplifiée.

L'immunité adaptative est retrouvée uniquement chez les vertébrés. Elle a pour principaux effecteurs cellulaires les lymphocytes T et B qui sont générés dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) et qui se développent dans les organes lymphoïdes centraux, le thymus et la moelle osseuse. Ces lymphocytes T et B possèdent à leur surface des récepteurs (respectivement TCR pour *T-Cell Receptor* et BCR pour *B-Cell Receptor*) capables de reconnaître une structure unique (épitope) portée par un antigène. Les principaux antigènes reconnus par le système adaptatif sont les protéines, les glycoprotéines et les polysaccharides. L'immunité adaptative est également caractérisée par des effecteurs moléculaires : les anticorps, produits par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes, ou encore les cytokines.

C'est l'immunité innée qui permet la mise en place de l'immunité adaptative en présentant les antigènes aux lymphocytes par le biais des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques.

1.2. Présentation du système immunitaire

Les cellules du système immunitaire dérivent toutes des cellules souches hématopoïétiques (CSH) provenant principalement de la moelle osseuse. Ces CSH donnent naissance à deux lignées : la lignée myéloïde à l'origine des cellules dendritiques, des granulocytes, des macrophages et des érythrocytes et la lignée lymphoïde à l'origine des lymphocytes B, T et des cellules Natural Killer (NK). La plupart de ces cellules poursuivent leur développement dans la moelle osseuse hormis les lymphocytes T qui migrent dans le thymus. Une fois leur maturation achevée, les cellules rejoignent les organes lymphoïdes

périphériques tels que les ganglions lymphatiques ou les tissus via le système circulatoire comprenant le système lymphatique et le système sanguin.

1.2.1. Les effecteurs cellulaires

1.2.1.1. Les cellules granulocytaires

Le terme granulocytes regroupe trois types cellulaires : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Ils se distinguent sur la base de leur morphologie cellulaire et de la coloration que prennent leurs granules cytoplasmiques.

Les neutrophiles possèdent un noyau multilobé et des granules qui prennent les colorations acides et basiques. Ils sont produits dans la moelle osseuse, puis libérés dans la circulation sanguine avant de passer dans les tissus où leur durée de vie n'est que de quelques jours. En réponse à une infection, ce sont les premiers effecteurs à être recrutés au site d'inflammation grâce à un ensemble de cytokines à activité chimioattractante, les chimiokines. Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires actives comme les macrophages, mais elles libèrent plus de défensines et génèrent davantage d'intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène ou de l'azote, permettant une meilleure destruction des pathogènes.

Les éosinophiles ont des noyaux bilobés ainsi que des granules qui prennent la coloration acide (éosine). Ce sont également des cellules phagocytaires mobiles qui peuvent migrer du sang vers les tissus. Ils joueraient principalement un rôle dans la défense contre les parasites.

Les basophiles possèdent des granules cytoplasmiques qui prennent la coloration basique (bleu de méthylène). Ce sont des granulocytes non phagocytaires ayant un rôle majeur dans les réponses allergiques. Ils possèdent à leur surface des récepteurs aux fragments constants (Fc) des anticorps qui lient les immunoglobulines de type E (IgE), provoquant une dégranulation des cellules avec libération de substances pharmacologiquement actives telles que l'histamine. Ils agissent de concert avec les mastocytes.

1.2.1.2. Les cellules présentatrices d'antigènes

Les CPA ont pour fonction la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺. Elles sont caractérisées par leur capacité à exprimer des molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ainsi que des molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes.

Trois types de cellules sont classées comme CPA professionnelles : les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B qui diffèrent par leur mécanisme de capture de l'antigène, par l'expression du CMH de classe II ainsi que par l'expression des molécules de co-stimulation.

Il existe plusieurs types de cellules dendritiques, classés en fonction de leur localisation :

- les cellules de Langerhans dans l'épiderme et les muqueuses,
- les cellules dendritiques interstitielles qui peuplent la plupart des organes,
- les cellules dendritiques interdigitées présentes dans les zones de cellules T des organes lymphoïdes périphériques et de la médulla du thymus,
- les cellules dendritiques circulantes.

Elles expriment toutes de façon constitutive des molécules de CMH de classe II ainsi que des molécules de co-stimulation. Elles sont capables de phagocyter les pathogènes mais également de réaliser le phénomène de macropinocytose (endocytose des fluides cellulaires). Elles peuvent également se faire infecter par une grande variété de virus et présenter leurs protéines associées au CMH de classe I. Pour ces raisons, elles sont plus efficaces que les macrophages ou les lymphocytes B qui nécessitent d'être activés avant de fonctionner comme CPA.

Les macrophages doivent phagocyter un micro-organisme avant d'exprimer des molécules de CMH de classe II et la molécule de co-stimulation B7. Les lymphocytes B, quant à eux, expriment constitutivement le CMH de classe II mais doivent être activés afin d'exprimer les molécules de co-stimulation.

Il existe également des CPA non professionnelles qui peuvent être conduites à exprimer des molécules de CMH de classe II ou un signal de co-stimulation (fibroblastes, cellules gliales). Enfin toutes les cellules nucléées du corps expriment le CMH de classe I, elles ont donc potentiellement la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques (lymphocytes T CD8⁺).

1.2.1.3. Les cellules Natural Killer

Les cellules NK se développent dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs communs de la lignée lymphoïde. Ce sont des lymphocytes non B et non T car elles n'expriment pas les molécules membranaires ni les récepteurs qui distinguent ces deux lignées. Elles ont pour rôle, d'une part, la destruction des cellules tumorales et des cellules infectées par un virus et, d'autre part, la régulation immunitaire par la sécrétion de cytokines telles que l'interféron γ (IFN γ). Elles sont activées en réponse à l'IFN γ et aux cytokines produites par les macrophages telles que l'interleukine (IL)-12 et ont la capacité de distinguer une diminution de l'expression du CMH de classe I ou un profil inhabituel des antigènes de surface exposés par des cellules tumorales ou infectées par un virus. Les cellules altérées sont alors détruites suite à la libération de granules cytotoxiques comme la perforine ou le granzyme qui conduisent à l'apoptose des cellules cibles.

Les cellules NK expriment le CD16, un récepteur au Fc des immunoglobulines, elles peuvent ainsi se fixer aux anticorps ayant reconnu des antigènes de surface modifiés et détruire les cellules ; ce processus est appelé cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC pour *Antibody Dependant Cell Cytotoxicity*).

1.2.1.4. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T dérivent de progéniteurs lymphoïdes initialement produits dans la moelle osseuse, qui vont ensuite migrer dans le thymus pour y effectuer leur maturation. Ils vont alors acquérir leur récepteur, le TCR, ainsi que les molécules accessoires CD4 ou CD8. À leur sortie du thymus, les lymphocytes sont appelés lymphocytes T naïfs car ils n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique. Ceux-ci seront présentés par les CPA dans les organes lymphoïdes périphériques où les lymphocytes T acquerront leurs fonctions effectrices.

Il existe différents types de lymphocytes T effecteurs (**Figure 1**) :

- Les lymphocytes T CD8⁺ qui vont se différencier en lymphocytes T cytotoxiques. Ces derniers permettent d'inhiber la réplication virale par la sécrétion d'IFN γ et d'éliminer les cellules infectées par la sécrétion de granules cytotoxiques tels que la perforine ou le granzyme, induisant leur apoptose. Ils reconnaissent un antigène positionné sur le CMH de classe I.
- Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent se différencier en lymphocytes T helper (Th) 1 ou 2, en Th17 ou encore en lymphocytes T régulateurs (Treg) qui se distinguent par leur profil de

sécrétion cytokinique. Ce sont les signaux délivrés par les cellules de l'environnement qui vont entraîner la différenciation des lymphocytes en un type spécifique après reconnaissance d'un antigène positionné sur le CMH de classe II.

En présence d'IFN γ et d'IL-12 secrétés par les macrophages et les cellules NK, les lymphocytes CD4⁺ vont se différencier en lymphocytes Th1 qui vont à leur tour sécréter de l'IFN γ et de l'IL-2. Ils sont principalement impliqués dans l'activation des macrophages dans le cas d'échappement d'un pathogène à la phagocytose. Ils permettent également la production d'anticorps par les lymphocytes B en produisant des signaux de co-stimulation nécessaires à leur activation.

Les lymphocytes T se différencient en sous-type Th2 en réponse à l'IL-4. Son rôle a été mis en évidence grâce aux souris Knock-Out (KO) pour l'IL-4 qui ne possédaient pas ou peu de lymphocytes Th2¹. Il a également été montré que même en présence d'IL-12, si un niveau seuil d'IL-4 est atteint, le développement en lymphocytes Th2 sera favorisé au dépend des lymphocytes Th1². Les lymphocytes Th2 sécrètent une variété de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-10 et ont pour principales fonctions l'activation des lymphocytes B et l'induction de la commutation isotypique.

Les lymphocytes Th17 se différencient en réponse à l'IL-6 et au Transforming Growth Factor- β (TGF- β) chez la souris et en réponse à l'IL-23 et à l'IL-1 β chez l'Homme³. Ils participent au recrutement et à la stimulation des neutrophiles et des macrophages en sécrétant de l'IL-17, de l'IL-6 et de l'IL-22.

Enfin, les Treg permettent de contrôler la réponse immunitaire en inhibant la prolifération des lymphocytes T, ainsi que leur production de cytokines. Ils seront décrits dans la partie 1.3.2.

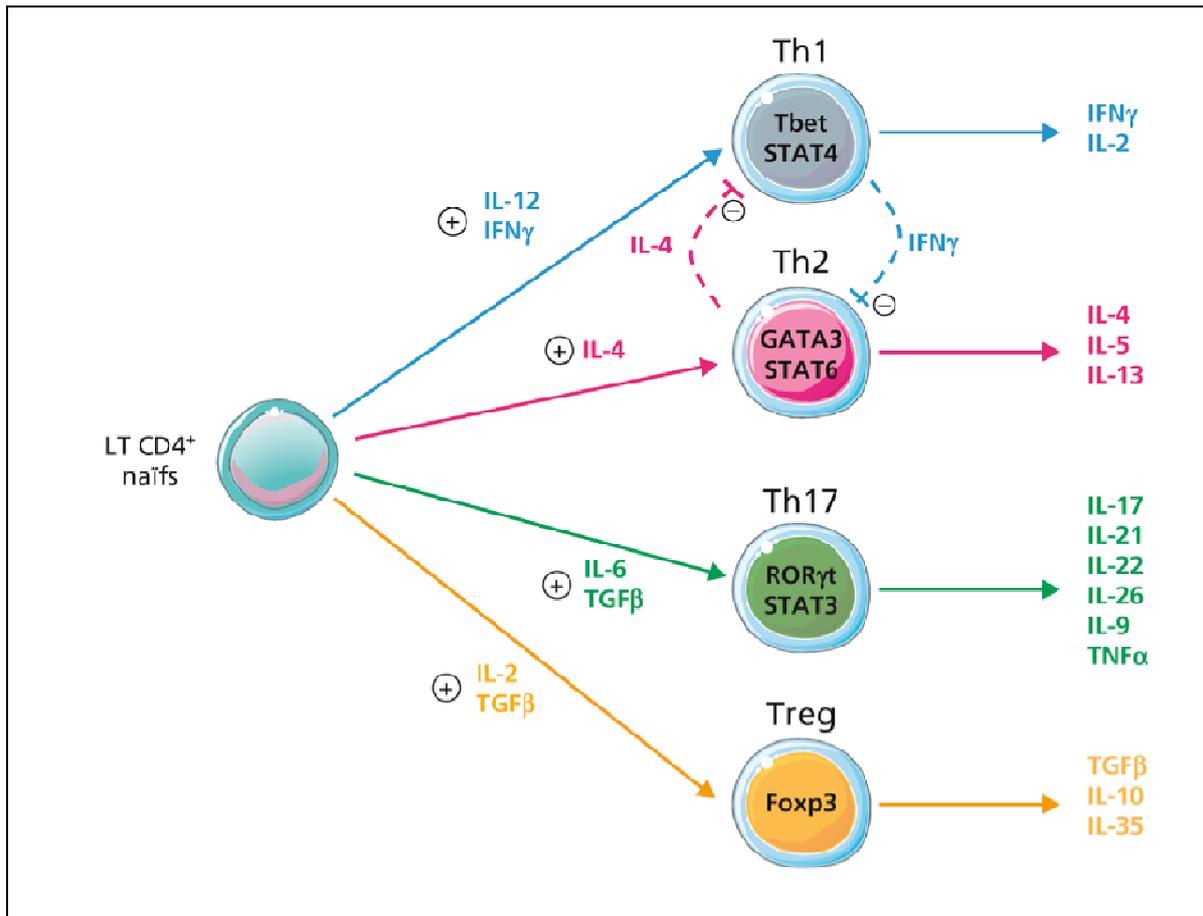


Figure 1 : Capacité de différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T auxiliaires de type Th1, Th2, Th17 et en lymphocytes T régulateurs, en fonction des cytokines produites dans l'environnement. Tirée de Boschetti *et al.*, *HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive.*, 2012⁴

1.2.1.5. Les lymphocytes B

Le lymphocyte B dérive, comme le lymphocyte T, d'un progéniteur lymphoïde issu de la moelle osseuse où il y poursuit l'intégralité de sa maturation. Il y acquiert son récepteur, le BCR constitué d'une immunoglobuline membranaire (IgM).

La plupart des lymphocytes B ont besoin de l'aide des lymphocytes Th pour être activés, ils sont appelés lymphocytes B thymo-dépendants. Toutefois, certains lymphocytes B n'ont pas besoin des lymphocytes Th, ce sont les lymphocytes B thymo-indépendants. En revanche, ces derniers ne peuvent réaliser la commutation isotypique, augmenter l'affinité de leur récepteur pour leur antigène ou encore se différencier en cellules mémoires, car ces mécanismes sont dépendants des lymphocytes T.

Lorsqu'ils ont terminé leur développement, les lymphocytes B entrent dans les organes lymphoïdes périphériques. Après reconnaissance de leur antigène spécifique dans le

sang ou les fluides cellulaires par leur BCR et expression des peptides antigéniques à la surface en association avec le CMH de classe II, les lymphocytes B peuvent être activés par les lymphocytes Th, contenus dans les zones T. Ils migrent alors dans les follicules primaires où ils prolifèrent et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en cellules B mémoires. La plupart des plasmocytes migrent ensuite dans la moelle osseuse.

1.2.2. Les effecteurs moléculaires

1.2.2.1. Les anticorps

Les anticorps ou immunoglobulines sont des protéines produites par les plasmocytes. Ils peuvent être membranaires à la surface des lymphocytes B auxquels ils confèrent leur spécificité antigénique en constituant le BCR, ou bien sécrétés circulant dans le sang, où ils servent d'effecteurs de l'immunité en neutralisant les antigènes ou en marquant ces derniers pour une élimination. Ce sont des protéines d'environ 150 kiloDaltons (kDa), qui sont formées de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde par un pont disulfure et un ensemble de liaisons non covalentes. Les extrémités amino-terminales de ces différentes chaînes sont des extrémités variables. Elles forment les sites de liaison à l'antigène, appelés paratopes, qui reconnaissent de façon spécifique un épitope (**Figure 2**).

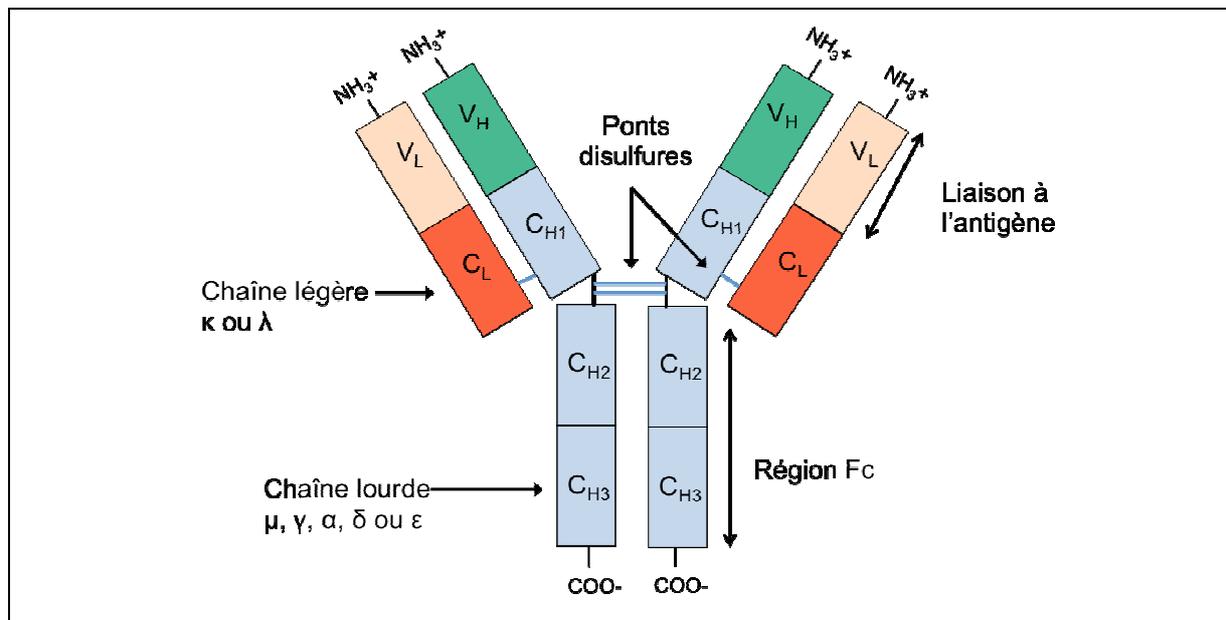


Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'un anticorps. Chaque chaîne lourde et chaque chaîne légère contient une région amino-terminale variable (V), qui est impliquée dans la liaison à l'antigène. Le reste de la molécule est constitué de régions constantes (C).

Les anticorps peuvent être subdivisés en cinq classes (ou isotypes) qui sont caractérisés par des chaînes lourdes différentes : μ , γ , α , δ , ϵ (**Figure 3**).

- L'IgG est la classe la plus abondante du sérum (environ 80 % des Ig sériques totales). Il en existe quatre sous-classes chez l'homme : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 qui se distinguent par des différences dans leurs chaînes lourdes.

- L'IgM monomérique est exprimée sous forme membranaire par les lymphocytes B. Elle est sécrétée par les plasmocytes sous forme de pentamère. C'est la première classe d'Ig produite lors d'une réponse primaire à un antigène.

- L'IgA est la classe prédominante dans les sécrétions telles que le lait, la salive, les larmes et le mucus. Appelée IgA sécrétoire, on peut la retrouver sous forme d'un dimère ou d'un tétramère. Elle assure une importante fonction effectrice au niveau des muqueuses, principaux sites d'entrée des pathogènes.

- L'IgE caractérise les réactions d'hypersensibilité immédiate telles que l'asthme ou l'urticaire. Elle se lie aux récepteurs Fc des basophiles et des mastocytes et induit leur dégranulation et la libération de médiateurs pharmacologiquement actifs tels que l'histamine.

- L'IgD est, avec l'IgM, l'immunoglobuline membranaire essentielle exprimée par les lymphocytes B matures, son rôle est actuellement peu connu, aucune fonction effectrice n'a été décrite.

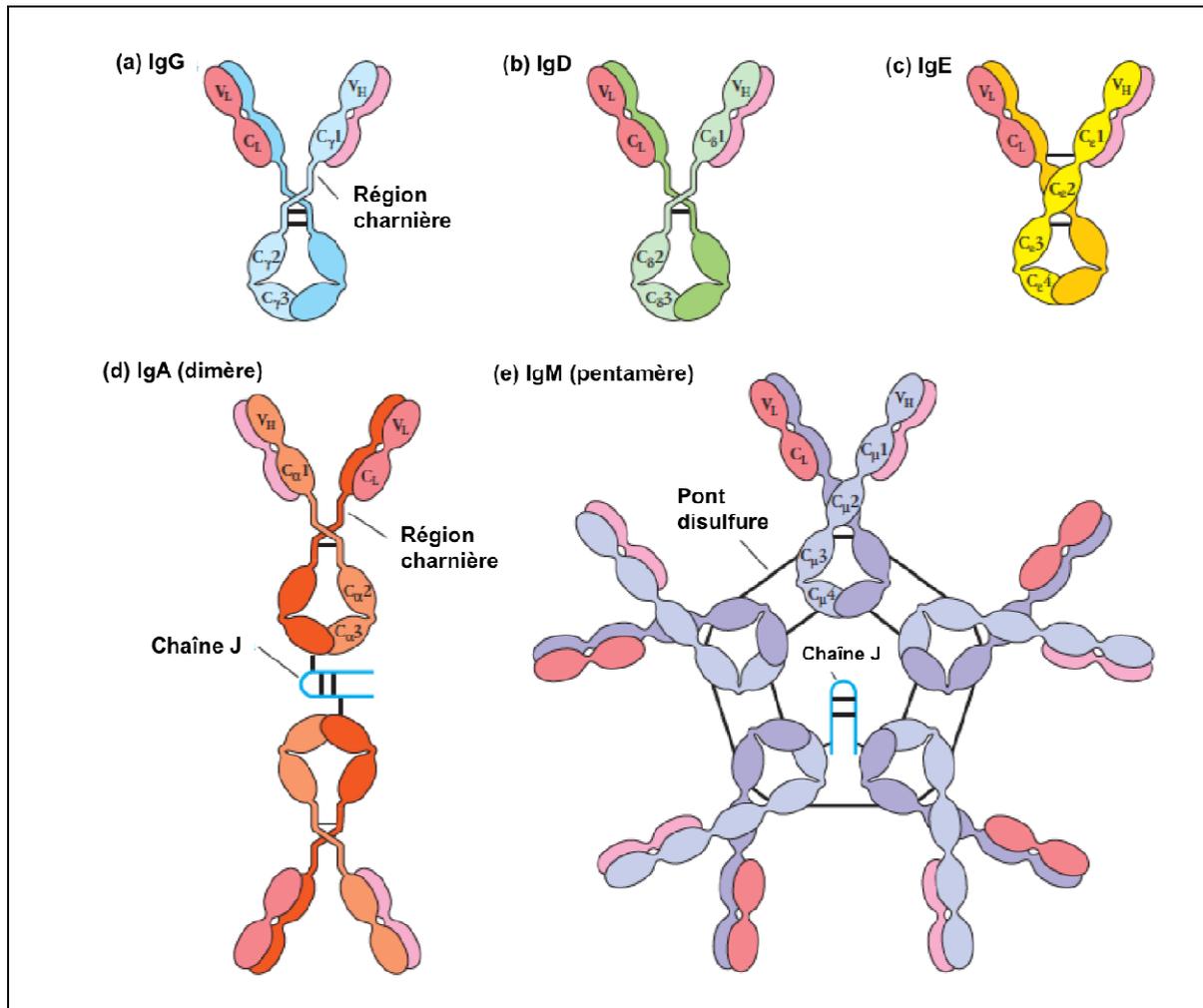


Figure 3 : Représentation de la structure des cinq classes d'anticorps. L'ensemble des Igs est monomérique hormis l'IgM qui est toujours pentamérique lorsqu'il est sécrété par les plasmocytes et l'IgA qui peut parfois exister sous forme de dimère ou de tétramère. V_L : chaîne variable légère, C_L : chaîne constante légère, V_H : chaîne variable lourde. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008⁵.

Les fonctions effectrices médiées par la région constante des anticorps sont :

- **l'opsonisation.** Les macrophages et les neutrophiles ont à leur surface des récepteurs aux fragments constants des anticorps (principalement IgG). Après interaction d'un récepteur aux Fc avec un anticorps lié à un antigène, le complexe antigène-anticorps (complexe immunitaire) formé sera alors phagocyté,
- **l'activation du complément.** L'IgM et la plupart des IgG chez l'homme peuvent activer un ensemble de protéines ayant la capacité de perforer les membranes cellulaires, appelées système du complément. Un des fragments dérivé du système du complément, le C3b peut se lier aux complexes immunitaires. Il est alors reconnu

par les récepteurs au C3b à la surface des macrophages et neutrophiles, conduisant à la phagocytose de ces complexes,

- **la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC.** La liaison des récepteurs Fc des cellules NK à des anticorps fixés sur leur cellule cible, telle qu'une cellule infectée par un virus, peut entraîner la mort de la cellule par apoptose.

1.2.2.2. Les cytokines

Les cytokines sont les messagers moléculaires majeurs impliqués dans les communications intercellulaires. Ce sont des protéines qui ont pour fonction la régulation de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire. La description détaillée de ces effecteurs sera faite dans la partie 2.

1.2.3. Description de l'activation du système immunitaire en réponse à un agent infectieux

1.2.3.1. Activation de l'immunité innée

Malgré les barrières épithéliales, certains pathogènes réussissent à pénétrer dans l'organisme et à coloniser les tissus. L'infection ou la lésion tissulaire induit une cascade d'évènements, connus sous le nom de réponse inflammatoire, qui vont apporter une première protection en limitant les dommages tissulaires au site de l'infection et la dissémination de l'antigène. Cette réponse inflammatoire aiguë implique à la fois une réponse localisée et une réponse systémique.

➤ Réponse localisée

Les symptômes spécifiques d'une réponse inflammatoire aiguë localisée sont le gonflement, la chaleur, la rougeur ou encore la douleur.

Dans les minutes qui suivent la lésion tissulaire une vasoconstriction passagère est observée, suivie rapidement d'une vasodilatation entraînant une augmentation du débit sanguin contribuant aux phénomènes de rougeur et de chaleur. Puis la perméabilité vasculaire augmente et contribue à l'épanchement du plasma sanguin dans les tissus, favorisant l'apparition d'un œdème et de la douleur. Cette exsudation augmente la viscosité sanguine contribuant au ralentissement de la vitesse circulatoire.

Le plasma contient quatre systèmes interconnectés producteurs de médiateurs de l'inflammation. Tout d'abord le système des kinines qui permet la formation de la bradykinine, puissant vasodilatateur qui augmente la perméabilité vasculaire. Une autre cascade enzymatique est déclenchée suite à une lésion des vaisseaux sanguins et conduit à la production de grandes quantités de thrombine. Elle va agir sur le fibrinogène soluble du plasma pour former des brins de fibrine qui s'enchevêtrent entre eux pour former un caillot. Ce système permet alors de prévenir le saignement et de limiter la dissémination du pathogène. Ce caillot de fibrine sera dégradé par le système fibrinolytique. Enfin, le système du complément est activé par les voies classique et alterne et se traduit par la formation de produits qui servent d'importants médiateurs de l'inflammation. Par exemple, la liaison des anaphylatoxines (C3a, C4a et C5a) aux récepteurs de la membrane des mastocytes tissulaires va conduire à la libération d'histamine induisant la contraction des muscles lisses et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Ces changements vasculaires sont indispensables au recrutement des cellules inflammatoires.

Les premières cellules à reconnaître les pathogènes infiltrés sont les macrophages tissulaires résidants. Ces macrophages ont la capacité d'ingérer et de détruire les micro-organismes rencontrés par le phénomène de phagocytose et de sécréter un certain nombre de cytokines et de chimiokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-8 et le TNF α . Ces cytokines peuvent agir localement en induisant la coagulation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Elles facilitent également l'adhésion des cellules immunitaires aux cellules endothéliales vasculaires ainsi que leur migration à travers la paroi des vaisseaux, notamment par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion. Il en résulte un recrutement important de neutrophiles, de macrophages, de basophiles, de mastocytes et de lymphocytes participant à l'élimination du pathogène.

➤ Réponse systémique

La réponse inflammatoire locale est accompagnée d'une réponse systémique connue sous le nom de réponse de la phase aiguë. Elle est marquée parfois par de la fièvre et par la synthèse des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes du foie. Cette synthèse est dirigée par les cytokines IL-1 β , TNF α et IL-6 produites par les macrophages⁶. En réponse à ces protéines, les hépatocytes vont sécréter la Serum Amyloid A (SAA), l' α 1- antichymotrypsine ou encore la protéine C réactive (CRP pour *C-reactive protein*) qui reconnaît la phosphocoline contenue dans les liposaccharides des bactéries et des champignons et permet

l'activation du système du complément. Il en résulte alors un dépôt de l'opsonine C3b à la surface des pathogènes qui vont être reconnus par les cellules phagocytaires.

Ces cytokines, nommées pyrogènes endogènes, sont également à l'origine de l'induction de la fièvre en entraînant la production de prostaglandine E2 (PGE2) qui va agir sur l'hypothalamus. L'augmentation de la température corporelle permet une diminution de la croissance des pathogènes et une réponse adaptative plus intense.

Dans le cas d'une infection virale, les macrophages vont sécréter de l'IFN α et de l'IFN β qui vont se fixer sur les cellules infectées et les cellules adjacentes entraînant l'inhibition de la réplication virale.

1.2.3.2. Activation de l'immunité adaptative

Si l'ensemble des mécanismes de l'immunité innée faillit à éliminer le pathogène, l'immunité adaptative prend le relais. Elle est activée grâce aux CPA, principalement les cellules dendritiques, qui vont capter les antigènes tissulaires et les présenter aux lymphocytes T afin de permettre leur activation. La rencontre d'un lymphocyte T avec une CPA a lieu dans les organes lymphoïdes périphériques où les cellules dendritiques et les lymphocytes sont recrutés par l'action de chimiokines telles que CCL21.

Lorsque les lymphocytes T naïfs migrent dans les régions corticales des ganglions lymphatiques, ils vont se fixer de manière transitoire à toutes les CPA qu'ils rencontrent par le biais de molécules d'adhésion. Cela permet aux lymphocytes T de sonder un grand nombre de molécules de CMH sur les CPA pour la présence de leur antigène spécifique. Si les lymphocytes reconnaissent leur antigène, il y a une augmentation de l'affinité des molécules d'adhésion et ainsi stabilisation de leur association avec la CPA. Un autre signal nécessaire à l'activation des lymphocytes est la reconnaissance des molécules de co-stimulation B7.1 et B7.2 par CD28. Cette reconnaissance permet l'entrée du lymphocyte dans la phase G1 du cycle cellulaire, la synthèse d'IL-2 et de son récepteur. Le lymphocyte peut alors proliférer et devenir effecteur, il n'a plus besoin des signaux de co-stimulation pour remplir ses fonctions effectrices et participer à l'élimination du pathogène.

1.3. La tolérance immunitaire

Dans certains cas, des réponses indésirables du système immunitaire à l'encontre des antigènes du « Soi » peuvent avoir lieu. Ces réponses peuvent entraîner le déclenchement de maladies inflammatoires chroniques qui sont caractérisées par des dommages tissulaires.

En effet, le réarrangement des gènes qui a lieu pendant le développement des lymphocytes, pour conduire à la formation d'un récepteur fonctionnel, est aléatoire. Il entraîne alors inévitablement la formation de lymphocytes ayant une affinité pour les antigènes du « Soi ». Cependant, la plupart sont naturellement éliminés par une variété de mécanismes créant ainsi un état général de tolérance au « Soi ».

1.3.1. La tolérance centrale

Le premier mécanisme mis en jeu par l'organisme a lieu lors du développement des lymphocytes T au sein des organes lymphoïdes centraux, après l'étape de réarrangement des gènes codant les chaînes du TCR. Ces lymphocytes vont tout d'abord être sélectionnés positivement pour leur capacité à reconnaître des molécules de CMH. Survient ensuite une sélection négative qui aboutit à l'élimination par apoptose des lymphocytes dont le TCR a une forte affinité pour des peptides du « Soi » présentés par une molécule du CMH⁷. Ces peptides sont présentés par les cellules de l'environnement qui expriment des antigènes spécifiques des tissus dans le thymus, suite à l'activation de nombreux gènes par le facteur de transcription AutoImmune REgulator (AIRE)⁸. Cette sélection négative permet la suppression, du répertoire de lymphocytes T, des cellules ayant un TCR auto-réactif reconnaissant fortement les complexes CMH-peptide présents dans le thymus. Mais elle laisse échapper les lymphocytes T ayant une faible affinité pour un antigène du « Soi », considérés alors comme ignorants du « Soi » (**Figure 4**).

Les lymphocytes B immatures ayant correctement arrangé les chaînes lourdes et légères de leur BCR, vont subir une sélection négative. Les lymphocytes B dont le BCR a une forte affinité pour un antigène du « Soi », subissent dans un premier temps une modification de l'expression de leurs chaînes légères, appelée *receptor editing*⁹. Cette modification a pour but de changer la spécificité antigénique du BCR en formant un nouveau récepteur et ainsi permettre aux lymphocytes B d'échapper à la sélection négative. Si l'auto-réactivité de leur BCR est maintenue, les lymphocytes B subiront un arrêt de leur différenciation (délétion clonale).

Enfin, lorsqu'un lymphocyte B rencontre dans la moelle osseuse un auto-antigène sous forme soluble, il est anergisé : il sera présent en périphérie mais incapable de proliférer en présence de l'auto-antigène.

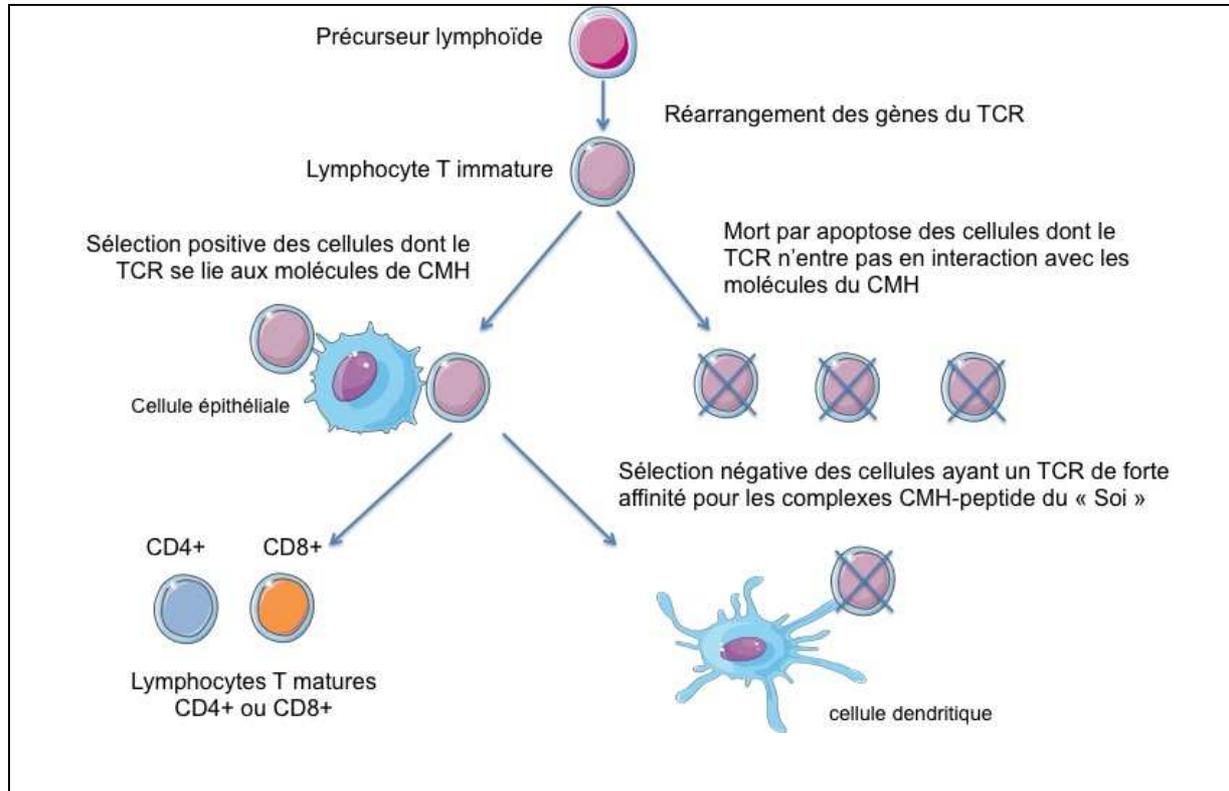


Figure 4 : Représentation schématique des sélections positive et négative des lymphocytes T dans le thymus.

1.3.2. La tolérance périphérique

Les mécanismes de tolérance centrale éliminent les lymphocytes auto-réactifs nouvellement formés. Cependant, on trouve encore en périphérie un certain nombre de lymphocytes potentiellement auto-réactifs qui vont pouvoir être éliminés ou inactivés par différents processus.

Concernant les lymphocytes T, certains antigènes du « Soï » ne sont pas présentés dans le thymus. Les clones dirigés contre ces antigènes auto-réactifs ne vont donc pas être éliminés par les mécanismes impliqués dans la tolérance centrale et sont considérés comme ignorants du système immunitaire. L'antigène spécifique est séquestré dans certaines régions de l'organisme. Le lymphocyte T dont il est spécifique ne sera à priori pas amené à le rencontrer.

De plus, comme précédemment évoqué dans la partie 1.2.1.3, la présence de molécules de co-stimulation à la surface des CPA est un signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T. La rencontre d'un lymphocyte naïf avec un antigène du « Soi », exprimé à la surface d'une CPA dépourvue de molécules de co-stimulation, induira l'anergie du lymphocyte. Ce dernier ne prolifèrera pas et ne produira pas d'IL-2 en présence de l'antigène¹⁰.

Il existe également une délétion clonale périphérique qui entraîne l'élimination des lymphocytes auto-réactifs par apoptose. Cette fonction est remplie par le mécanisme de mort cellulaire induite par activation (AICD pour *Activation Induced Cell Death*). Les lymphocytes stimulés de manière répétitive par l'antigène vont être supprimés par des mécanismes impliquant les récepteurs de mort et notamment le couple Fas/FasL.

Une population cellulaire, les lymphocytes T régulateurs, se distingue des cellules T par l'expression de certains marqueurs de surface tels que le CD25 (récepteur à l'IL-2), exprimé constitutivement, ou le facteur de transcription FoxP3. Il existe plusieurs sous-types de lymphocytes T régulateurs établis suivant leur lieu d'origine¹¹. Une population dite « native » semblerait être constituée de lymphocytes T auto-réactifs qui échappent à la délétion dans le thymus. Lorsqu'ils sont activés par leur auto-antigène, au lieu de se différencier en une cellule capable de produire une réponse auto-immune, ils se différencient en supresseurs capables d'inhiber des lymphocytes T qui reconnaissent des auto-antigènes dans le même tissu. Leur fonction est médiée par des cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- β . Une autre population dite « acquise » serait constituée de lymphocytes régulateurs qui se différencient à partir de lymphocytes T naïfs, non spécifiques d'antigènes présentés dans le thymus.

En ce qui concerne les lymphocytes B, l'absence d'auto-réactivité peut être expliquée par l'anergie ou la délétion des lymphocytes T. La réponse B étant dépendante, dans la plupart des cas d'une coopération avec les lymphocytes T, les lymphocytes B qui ne reçoivent pas les signaux de co-stimulation nécessaires meurent dans les 2-3 jours. Cependant, parce qu'il existe des réponses B thymo-indépendantes et que certains micro-organismes peuvent activer des lymphocytes T par mimétisme moléculaire, il faut que les lymphocytes B soient rendus tolérants également en périphérie et ceci par les mécanismes de délétion clonale ou d'anergie. Seulement 10 % des lymphocytes B immatures nouvellement formés quittent la moelle osseuse pour aller dans la rate où ils peuvent y rencontrer des auto-antigènes non présents dans la moelle osseuse. Une interaction de forte affinité avec un auto-antigène conduira à la délétion du lymphocyte B. En revanche, une interaction de faible ou très faible

affinité avec des auto-antigènes circulants solubles, entraînera respectivement un état d'anergie ou d'ignorance¹². L'anergie est caractérisée par une désensibilisation du BCR, entraînant une diminution de la capacité de réponse du lymphocyte B, une incapacité à présenter un antigène et à produire des anticorps¹³. Cependant, elle peut être réversible si les lymphocytes B rencontrent leurs antigènes à forte concentration et de façon répétée. Ces derniers seront alors capables de ponter les BCR à la surface du lymphocyte et ainsi permettre la transduction du signal¹².

L'ensemble de ces mécanismes agit en synergie pour fournir une protection efficace contre l'auto-immunité, sans inhiber la capacité du système immunitaire à produire une réponse adéquate contre des pathogènes.

2. Cytokines et immunité

2.1. Généralités

Les cytokines sont les messagers moléculaires majeurs impliqués dans les communications intercellulaires. Ce sont des protéines qui ont pour fonction la régulation de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire en stimulant ou en inhibant l'activation, la prolifération et ou la différenciation d'un grand nombre de cellules, mais également en régulant la production des anticorps ou d'autres cytokines. L'identification des premières cytokines a débuté dans les années 1950 avec l'interleukine-1¹⁴ et le facteur de croissance neuronal (NGF pour *Nerve Growth Factor*)¹⁵. À partir des années 1970-1980, grâce aux technologies de séquençage, un grand nombre de protéines ont été identifiées et regroupées dans la famille des cytokines.

On regroupe sous le terme générique de cytokines :

- Les interleukines

Ces cytokines sont appelées interleukines car elles sont sécrétées par certains leucocytes et agissent sur d'autres leucocytes. À ce jour, 37 interleukines ont été identifiées (IL-1 à IL-37). Cette famille comprend par exemple l'IL-1 produite par les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, qui joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire suite à une infection, ainsi que l'IL-6 impliquée dans la production des

protéines de la phase aiguë et dans la stimulation de la production d'anticorps par les lymphocytes B.

- Les interférons

Ce groupe comporte trois membres principaux, l'IFN α , β (interférons de type I) et γ (interféron de type II). Leur nom vient de leur capacité à interférer avec la réplication virale chez l'hôte¹⁶. Les IFN α et β sont principalement impliqués dans la réponse immunitaire innée contre les virus. Ils sont sécrétés par les cellules infectées permettant aux cellules aux alentours de se prémunir contre les infections. L'IFN γ est sécrété par les lymphocytes Th1, les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK. Ses rôles principaux sont de promouvoir l'activité des cellules NK, d'induire la production d'anticorps et la différenciation des lymphocytes en sous-type Th1, mais également d'entraîner une augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe I et II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes¹⁷.

- Les facteurs de croissance

Parmi les facteurs de croissance, on trouve le TGF- β qui a pour principale fonction un rôle d'immunosuppresseur et une implication essentielle dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. En effet, il a été montré que des souris KO pour le TGF- β présentaient une dérégulation du système immunitaire avec une infiltration de cellules inflammatoires dans de nombreux organes conduisant à leur mort trente jours après leur naissance¹⁸.

- Le facteur de nécrose tumorale

Le facteur de nécrose tumorale (TNF) est une cytokine connue pour ses propriétés apoptotiques sur les cellules tumorales, mais également pour ses propriétés antivirales et antiparasitaires. Elle est produite par des types cellulaires variés regroupant les macrophages, les lymphocytes T, mais également les fibroblastes, les synoviocytes ou encore les kératinocytes. C'est la première cytokine libérée lors de la réaction inflammatoire. Elle induit la production des protéines de la phase aiguë par le foie, l'augmentation de la perméabilité vasculaire ou encore l'activation lymphocytaire.

- Les chimiokines

Ce sont des protéines de faible masse moléculaire, impliquées principalement dans le recrutement des cellules de l'immunité au niveau des sites d'intérêts et dans le contrôle de

leur état d'activation. On peut citer par exemple CXCL8 (IL-8) impliquée dans le recrutement des neutrophiles¹⁹. Il existe quatre sous-familles de chimiokines : les CC chimiokines possédant deux 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).

L'ensemble de ces cytokines partage un certain nombre de caractéristiques communes. Leur masse moléculaire se situe généralement autour de 30 kDa. Elles se lient à des récepteurs spécifiques au niveau de la membrane de leurs cellules cibles, induisant le déclenchement de voies de transduction du signal et ainsi la modification de l'expression des gènes. Leur affinité pour leur récepteur est très élevée (constante de dissociation : K_d de l'ordre de 10⁻¹⁰ à 10⁻¹² molaire) et elles sont efficaces à des concentrations très faibles de l'ordre du picomolaire au nanomolaire. Elles peuvent agir de façon autocrine (liaison de la cytokine aux récepteurs de la cellule qui l'a sécrétée), paracrine (liaison aux récepteurs d'une cellule cible très proche de la cellule productrice) ou endocrine (liaison à des cellules cibles dans des régions éloignées de l'organisme, après passage dans le sang).

2.2. Les familles de cytokines

A l'origine, les différentes cytokines ont été nommées suivant leur fonction (comme pour le TNF et le NGF ou bien par un numéro suivant l'ordre de leur découverte (IL-1, IL-2 etc.). De nos jours, on les classifie en fonction de la famille structurale (superfamille) à laquelle elles appartiennent (**Tableau 1**). Cette classification repose sur des caractéristiques communes telles que le partage d'une sous-unité d'un récepteur, d'un mécanisme de transduction du signal, etc.

Prenons l'exemple de la famille de l'IL-1 comprenant l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-1Ra, l'IL-18 et l'IL-33. Ces cytokines ont en commun le mécanisme par lequel elles deviennent matures : elles sont synthétisées sous forme de précurseurs et doivent être clivées par une enzyme, la caspase-1, avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire. L'organisation de leur récepteur ainsi que les voies de transduction du signal utilisées présentent également des similitudes, ces cytokines utilisent une protéine accessoire nécessaire à leur fonction (IL-1RAcP pour l'IL-1 et l'IL-33 et IL-18BP pour l'IL-18)²⁰.

Famille	Membres représentatifs
IL-12	IL-12, IL-23, IL-27, IL-35
IL-6	IL-6, IL-11, IL-27, Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)
IL-2	IL-2, IL-7, IL-15, IL-9, IL-4
IL-1	IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33
TNF	TNF α , TNF β , TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B Ligand (RANKL), B-Lymphocyte Stimulator (BLyS), A Proliferation-Inducing Ligand (APRIL)
IFN	IFN α , IFN β , IFN ω
IL-17	IL-17-A, B, C, D, E, F
TGF	TGF- β
IL-10	IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL28 A/B, IL-29
Chimiokines	Sous-familles CCL, CXCL, CXXXL, CL

Tableau 1 : Familles de cytokines, basées sur leurs similarités structurales.

2.3. Les récepteurs de cytokines

Les progrès dans la caractérisation des récepteurs de cytokines et le clonage des gènes associés ont permis le regroupement de la plupart des récepteurs de cytokines au sein de cinq familles, basées sur leurs caractéristiques structurales communes (**Figure 5**) :

- **Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines** sont constitués de domaines immunoglobulines dans leur partie extracellulaire et de domaines Toll-IL-1 Receptor (TIR) dans leur partie intracytoplasmique (**Figure 5a**), caractéristique partagée avec les TLR²¹. Un des membres de cette famille est le récepteur de l'IL-1. Ce dernier est un hétérodimère constitué du récepteur membranaire IL-1 Receptor type I²² (IL-1RI) qui fixe l'IL-1 avec une forte affinité ($k_{d_{IL-1\alpha}}$: 50pM, $k_{d_{IL-1\beta}}$: 1nM) et de la protéine accessoire IL-1RAcP qui n'interagit pas directement avec la cytokine²³. En revanche, son recrutement est essentiel^{24,25}. En effet, la juxtaposition des domaines TIR de l'IL1-RI et de l'IL-1RAcP après fixation de l'IL-1 va permettre la transduction du signal.

- **Les récepteurs des cytokines de classe I** (ou récepteurs des hématopoïétines) possèdent dans leur domaine extracellulaire des motifs d'acides aminés conservés tels que

quatre résidus cystéine (CCCC) ou une séquence conservée tryptophane-sérine-(un acide aminé non conservé)-tryptophane-sérine (WSXWS où X est l'acide aminé non conservé) (**Figure 5b**). Ils sont en général constitués de sous-unités spécifiques des cytokines et d'une sous-unité de transduction du signal qui n'est souvent pas spécifique de la cytokine mais partagée par une même famille. C'est le cas de la protéine gp130 partagée par l'IL-6, l'IL-11²⁶ et LIF²⁷ et de la chaîne gamma (γ) partagée par l'IL-2, l'IL-15, l'IL-7²⁸, l'IL-9 et l'IL-4²⁹.

- **Les récepteurs de classe II** (ou récepteurs des interférons) possèdent des caractéristiques partagées avec les récepteurs de classe I telles que les quatre cystéines conservées dans leur partie extracellulaire. En revanche, ils sont dépourvus du motif WSXWS (**Figure 5c**). Cette famille inclut les récepteurs hétérodimériques pour l'IFN α/β et l'IFN γ ³⁰, de même que le récepteur à l'IL-10³¹.

- **Les récepteurs des TNF** sont constitués d'un seul type de chaîne organisé sous forme homotrimerique et ayant dans leur région extracellulaire des régions pseudorépétées riches en cystéine (**Figure 5d**). Ces dernières permettent la formation de ponts disulfures qui sont impliqués dans la liaison du ligand sur son récepteur³². Cette famille regroupe les récepteurs des cytokines de la famille du TNF tels que le TNF α et le TNF β mais aussi le récepteur Fas qui se lie à Fas Ligand (FasL)³³. Elle regroupe également les récepteurs de la famille de BLyS, à savoir le Transmembrane Activator Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor (TACI) et le B-Cell Maturation Antigen (BCMA)³⁴.

- **Les récepteurs des chimiokines** sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, impliquées dans la transduction du signal (**Figure 5e**). La nomenclature des récepteurs des chimiokines est basée sur la sous-famille de chimiokines auquel son ligand appartient.

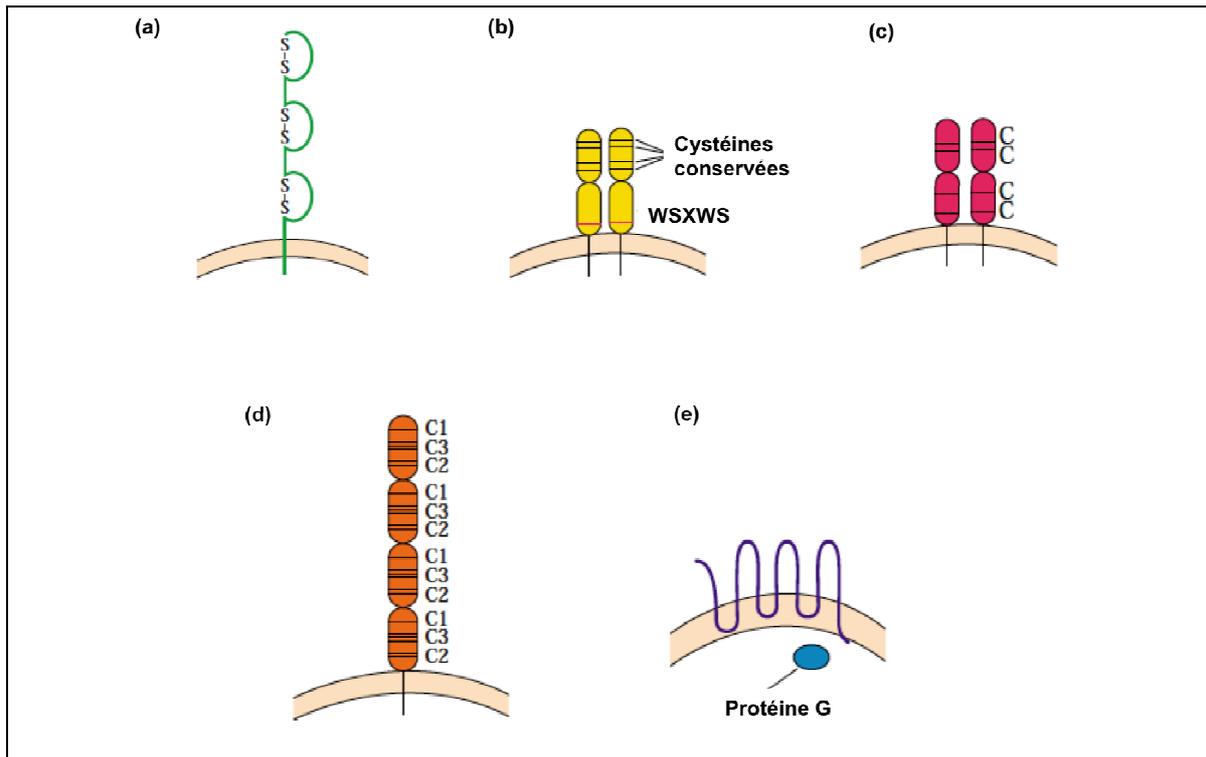


Figure 5 : Schéma représentant les cinq familles de récepteurs de cytokines. (a) Récepteur de la famille des immunoglobulines. (b) Récepteur de cytokines de classe I. (c) Récepteur de cytokines de classe II. (d) Récepteur de la famille du TNF. (e) Récepteur de la famille des chimiokines couplé aux protéines G. Adaptée de Immunologie, le cours de Janis Kuby, Dunod, 2008⁵.

2.4. Le réseau de cytokines

Les cytokines ont la capacité de réguler l'activité cellulaire de façon coordonnée et interactive. Pour cela, elles agissent en réseau par le biais de cinq caractéristiques qui leur sont propres :

- La **pléiotropie** qui se définit comme la capacité d'une cytokine à avoir différents effets biologiques sur diverses cellules cibles. Par exemple, l'IL-4 est à la fois impliquée dans la commutation de classe des anticorps produits par les plasmocytes vers l'IgE³⁵ et dans la différenciation des lymphocytes Th2³⁶.
- Plusieurs cytokines peuvent médier des fonctions semblables, c'est le phénomène de **redondance**. Les cytokines IL-2, IL-4 et IL-5 produites par les cellules Th activées sont toutes impliquées dans la prolifération des lymphocytes B³⁷.
- Lorsque l'effet combiné de deux cytokines sur une activité cellulaire est plus grand que celui qui résulterait de l'addition des effets de chaque cytokine pris séparément, on parle

de **synergie**. Par exemple, L'IL-4 permet de déclencher et d'aider la prolifération des mastocytes en synergie avec l'IL-3³⁸.

- Si les effets d'une cytokine inhibent ceux d'une autre, on parle d'**antagonisme**. C'est le cas par exemple de l'IFN γ et de l'IL-4³⁹.

- Enfin les cytokines sont capables d'agir en **cascades**. L'action d'une cytokine sur une cellule cible va permettre la production par cette cellule cible d'une ou plusieurs cytokines, ce qui est le cas du TNF α , capable d'induire la sécrétion d'IL-1⁴⁰.

2.5. Rôles des cytokines dans la réponse immunitaire

Les cytokines jouent un rôle important à chaque étape de la mise en place de la réponse immunitaire.

On peut citer tout d'abord les cytokines impliquées au cours de l'hématopoïèse telles que les facteurs stimulateurs de colonies (CSF pour *Colony Stimulating Factor*). Ces facteurs de croissance sont identifiés en fonction de leur capacité à stimuler la formation de colonies de cellules hématopoïétiques dans des cultures de moelle osseuse. Ils sont produits par les cellules stromales de la moelle osseuse (adipocytes, fibroblastes et macrophages) et suivant leur type et la quantité sécrétée, ils permettront la différenciation d'une cellule souche pluripotente dans la voie lymphoïde ou myéloïde. Plusieurs facteurs ont été identifiés :

- le CSF multi-spécifique ou IL-3,
- le CSF spécifique des macrophages (M-CSF),
- le CSF spécifique des granulocytes (G-CSF),
- le CSF spécifique de la lignée granulocyte/macrophage (GM-CSF).

Plusieurs cytokines sont principalement impliquées dans l'immunité innée telles que l'IL-1 et l'IL-8 et d'autres dans l'immunité adaptative telles que l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-5. Certaines cytokines sont cependant retrouvées à l'interface des mécanismes d'immunité innée et adaptative (TNF α , IFN γ , IL-12, IL-23, IL-6, IL-10 et TGF- β). Leurs rôles, à différents niveaux de la réponse immunitaire, font de ces cytokines des médiateurs centraux dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. On peut ainsi citer leur implication dans la différenciation des sous-populations de lymphocytes T. L'environnement cytokinique dans lequel se trouvent les cellules T activées détermine en effet le sous-groupe dans lequel elles vont se développer (**Figure 1**).

3. Deux cytokines centrales de l'immunité : l'IL-6 et l'IL-1 β

3.1. L'interleukine-6

3.1.1. Historique

En 1968, Miller⁴¹ et Claman⁴² ont mis en évidence l'importance d'une coopération cellulaire entre les lymphocytes T et les lymphocytes B durant la production d'anticorps. Les recherches menées pour identifier d'éventuels facteurs solubles produits par les lymphocytes T ont contribué à la découverte de l'IL-6^{43,44}. En parallèle, la même protéine a été isolée par d'autres équipes, pour d'autres fonctions biologiques, telles que la croissance des plasmacytomes⁴⁵ ou la production des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes^{46,47}. De nombreux noms ont été initialement attribués à cette cytokine reflétant son action pléiotrope. Parmi eux, on peut citer BCSF-2 (pour *B-Cell Stimulatory Factor-2*), IFN- β 2 (pour *Interferon- β 2*), HSF (pour *Hepatocyte Stimulating Factor*), TPO (pour thrombopoïétine) ou encore CDF (pour *Cytotoxic T-cell Differentiation Factor*).

L'ADNc humain codant pour BSF-2 a été cloné en 1986⁴⁸. Simultanément, l'IFN- β 2⁴⁹ et une protéine de 26 kDa⁵⁰ ont été clonés par différentes équipes et se sont avérées identiques à BSF-2. Compte tenu des dénominations multiples pour une même protéine, une terminologie unique « l'IL-6 » a été adoptée en 1988⁵¹.

3.1.2. Génétique et caractéristiques structurales

Le gène de l'IL-6 est situé sur le chromosome 7p21⁵² chez l'Homme et sur le chromosome 5 chez la souris⁵³. Ce gène a été cloné et séquencé, entre autre, chez l'Homme⁴⁹, la souris⁵⁴ et le rat⁵⁵ et tous contiennent quatre introns et cinq exons.

Suivant les espèces, l'IL-6 possède une séquence signal hydrophobe de 24 à 29 acides aminés située à l'extrémité N-terminale de la protéine entière. Le séquençage de la partie N-terminale de l'IL-6 humaine⁵⁶ en 1985 et murine⁵⁷ en 1987 a permis de mettre en évidence le clivage de ce peptide qui n'est pas conservé dans la forme mature de la protéine. La structure primaire complète de l'IL-6 murine a quant à elle été établie en 1988⁵⁸.

L'IL-6 est une protéine de 26 kDa qui contient 183 acides aminés chez l'Homme dans sa forme mature, organisés en quatre hélices α (**Figure 6**). Parmi les séquences identifiées de l'IL-6, l'identité en acides aminés varie de 34 % (entre la souris et la loutre de mer) à 97 % (entre le singe mangabey et le macaque). Entre les espèces, il existe une identité de séquence

importante au niveau de la portion centrale de la molécule (résidus 40 à 100) et dans la partie proche de l'extrémité C-terminale (résidus 165 à 184). De plus, quatre cystéines sont fortement conservées entre les espèces, les IL-6 murine et humaine présentent en effet des ponts disulfures identiques⁵⁸.

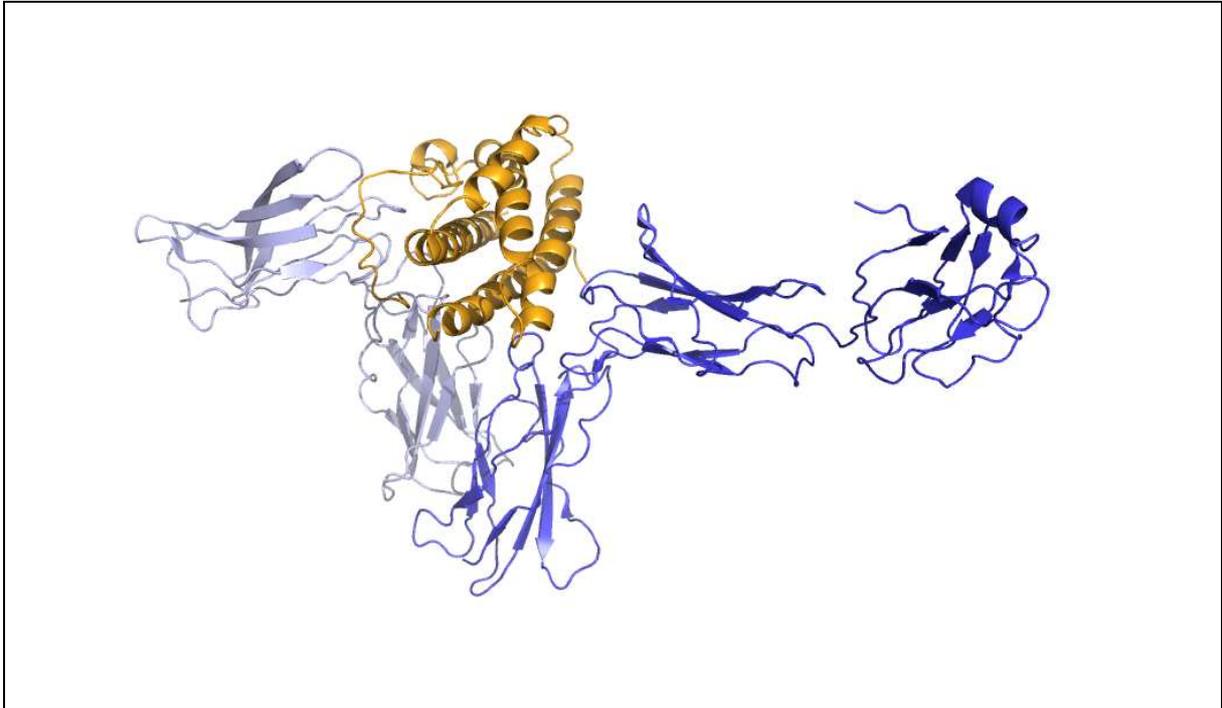


Figure 6 : Structure de l'IL-6 humaine (en orange) en interaction avec l'IL-6R α (en gris) et la gp130 (en bleu) (code PDB : 1P9M).

3.1.3. Fonctions biologiques de l'IL-6

L'IL-6 est produite par une grande variété de types cellulaires tels que les macrophages, les lymphocytes T et B, les fibroblastes, les kératinocytes ou encore les cellules endothéliales. Son répertoire de cellules cibles est également très varié.

L'action de l'IL-6 en synergie avec l'IL-3, conduit à la différenciation de progéniteurs myéloïdes lors de l'hématopoïèse⁵⁹. L'IL-6 stimule également la prolifération et la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques en induisant la production d'IL-2⁶⁰ et de son récepteur⁶¹. Elle peut entraîner la différenciation des macrophages⁶² et stimuler la production d'anticorps par les lymphocytes B.

De plus, l'IL-6 joue un rôle majeur dans l'inflammation, étant le principal inducteur de la synthèse des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes^{46,63}. Les souris IL-6 KO (dépourvues du gène de l'IL-6) se développent normalement mais ont une réponse

immunitaire et une réponse de la phase aiguë altérées^{64,65}. On peut enfin citer le rôle de facteur de croissance de l'IL-6 pour des types variés de cellules tumorales telles que le myélome multiple⁶⁶.

3.1.4. Les récepteurs de l'IL-6

L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle produite par une grande variété de types cellulaires⁶⁷. Elle exerce ses nombreuses fonctions biologiques en interagissant avec ses récepteurs spécifiques, à la surface des cellules cibles. Sa fixation à la surface d'un récepteur a été mise en évidence sur plusieurs lignées cellulaires dès 1988⁶⁸.

Le récepteur de l'IL-6 est un récepteur de classe I hétérodimérique constitué d'une chaîne membranaire spécifique de 80 kDa, l'IL-6R α , et d'une chaîne membranaire non spécifique de 130 kDa, la gp130, responsable de la transduction du signal. Cette dernière a été mise en évidence par immunoprécipitation de l'IL-6R α après stimulation des cellules par l'IL-6⁶⁹. Elle est partagée par les membres de la famille de l'IL-6 (IL-11, oncostatine M, LIF, etc.). Malgré les propriétés pléiotropiques de ces cytokines, les caractéristiques phénotypiques des souris dépourvues d'IL-6⁶⁴, d'IL-11 ou de LIF⁷⁰ sont peu altérées. Ces observations sont sûrement dues au partage de la gp130 par ces différentes cytokines qui possèdent alors des activités redondantes. En revanche, une interruption ciblée de la gp130 chez la souris est létale car elle entraîne un mauvais développement du myocarde et de l'hématopoïèse⁷¹.

L'IL-6 va se fixer dans un premier temps sur l'IL-6R α qui ne possède pas d'activité catalytique intrinsèque. L'IL-6R α n'est d'ailleurs pas nécessaire à la transduction du signal⁷². Ce complexe IL-6/IL-6R α de faible affinité va alors se lier à la gp130 et ainsi former un hétérotrimère de forte affinité permettant la transduction du signal suivie d'une internalisation rapide du complexe ($t_{1/2}$: 15-30 minutes) conduisant à une régulation négative du récepteur. Il a été montré que ce complexe de forte affinité est en réalité un hexamère formé par deux complexes distincts IL-6/IL-6R α /gp130^{73,74} (**Figure 7a**).

L'IL-6R α n'est exprimé que par un nombre restreint de types cellulaires, à savoir les hépatocytes, les phagocytes et quelques lymphocytes. La protéine gp130 est quant à elle ubiquitaire⁷⁵.

Outre ces récepteurs membranaires, il existe une forme soluble de l'IL-6R α aux propriétés agonistes, le sIL-6R. Cette forme a été détectée pour la première fois en faible abondance dans l'urine⁷⁶ et le sérum⁷⁷ chez l'Homme. Il existe deux isoformes du récepteur

soluble, le premier généré par protéolyse de la forme membranaire⁷⁸ et le second par épissage alternatif de l'ARNm codant pour l'IL-6R α ^{79,80}, cette dernière forme étant la forme prédominante circulante⁸¹. Ce récepteur soluble va interagir avec l'IL-6, puis le complexe IL-6/sIL-6 va se lier à la gp130 présente à la surface des cellules. Malgré une expression restreinte de l'IL-6R α , cette forme soluble permet de sensibiliser à l'IL-6 des cellules dépourvues du récepteur membranaire. Ce mécanisme est appelé *trans-signalling* (**Figure 7b**). Le sIL-6R présente la même affinité pour l'IL-6 que l'IL-6R α .

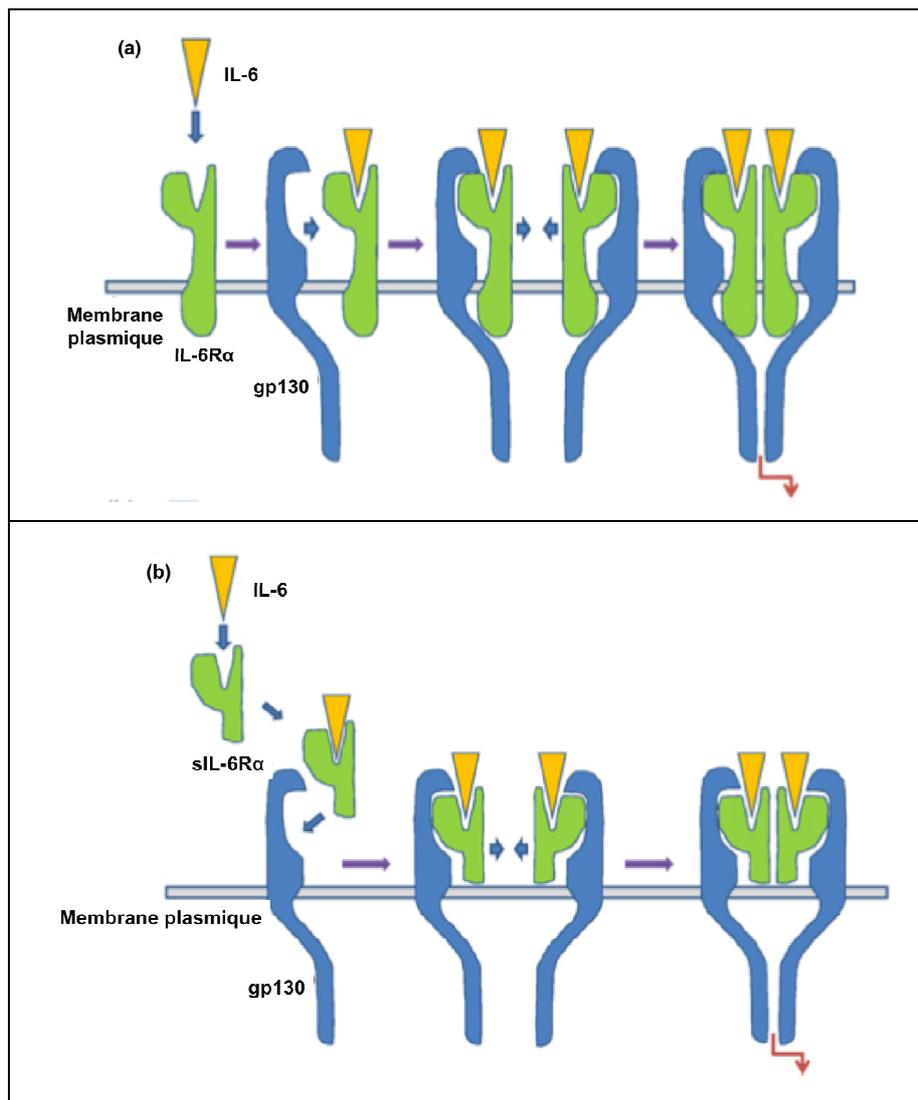


Figure 7 : Voies de signalisation de l'IL-6. (a) Voie de signalisation classique : l'IL-6 (orange) se fixe tout d'abord à la chaîne α spécifique du récepteur de l'IL-6 (vert). Le complexe présente alors une forte affinité pour la chaîne gp130 (bleu). L'association de deux hétérotrimères IL-6/IL-6R α /gp130 permet la transduction du signal via la gp130. (b) Voie de signalisation dite *trans-signalling* de l'IL-6 : l'IL-6 se fixe à la chaîne soluble du récepteur de l'IL-6 issue soit de la protéolyse de sa forme membranaire soit d'un épissage alternatif. Le complexe présente alors une forte affinité pour la gp130 exprimée de façon ubiquitaire. Adaptée de Assier *et al.*, *Joint Bone Spine.*, 2010⁸².

Il existe également une forme soluble de la gp130, la sgp130 qui possède une activité inhibitrice sur la signalisation de l'IL-6. Cette forme a été retrouvée dans le sérum humain⁷⁷ et peut s'associer au complexe IL-6/sIL-6R empêchant ainsi sa fixation à la forme membranaire de la gp130 et donc la transduction du signal. Cette activité inhibitrice peut s'étendre aux autres membres de la famille de l'IL-6.

3.1.5. Voies de signalisation de l'IL-6

La fixation de l'IL-6 sur ses récepteurs conduit à l'activation de trois voies de signalisation différentes : la voie JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*), la voie ras/MAP kinase et la voie PI3K (*Phosphoinositide-3 Kinase*) (**Figure 8**).

L'IL-6 induit rapidement l'activation de tyrosine kinases de la famille JAK. JAK1 joue notamment un rôle essentiel, car des cellules dépourvues de JAK1, stimulées par l'IL-6, ont une transduction du signal altérée^{83,84}. JAK1 se fixe sur la région cytoplasmique de la gp130 qui contient deux motifs appelés Box1 et Box2. La délétion de la Box1 (riche en proline) ou la mutation de deux de ses résidus majeurs empêchent la fixation de JAK1 à la gp130⁸⁵. En se fixant à la gp130, JAK1 est alors activée et va en retour phosphoryler le domaine cytoplasmique de la gp130 et permettre le recrutement du facteur de transcription STAT3^{86,87} (*Signal Transducers and Activators of Transcription-3*). Ce dernier est à son tour phosphorylé, ce qui entraîne la formation de dimères de STAT3 et leur translocation dans le noyau, où ils vont activer la transcription de gènes cibles. Parmi les gènes cibles activés par les STATs, on peut trouver ceux des protéines de la phase aiguë tels que la protéine C-réactive⁸⁸, l' α 1-antichymotrypsine⁸⁹, ou encore des gènes impliqués dans la croissance, la survie et la différenciation cellulaire⁹⁰.

La fixation de l'IL-6 à son récepteur permet également l'induction de la cascade des MAP kinases. La protéine SHP2 (*SH2-domain-containing tyrosine phosphatase 2*) va se fixer sur la tyrosine Y₇₅₉ de la gp130, puis elle va être phosphorylée par JAK1 et lier le complexe Grb2-SOS (*Growth factor receptor bound-protein 2/Son of Sevenless*) et/ou la protéine Gab1 (*Grb2 associated binder-1*) à la gp130. Le recrutement de SOS permet l'activation de Ras qui en retour induit l'activation de la cascade Ras-Raf-ERK1/2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*) impliquée dans la survie cellulaire.

Enfin, l'IL-6 active la cascade PI3K. Cette enzyme va entraîner le recrutement de la sérine/thréonine kinase Akt qui va aller activer ou désactiver un grand nombre de substrats

par son activité kinase. Par exemple, Akt peut promouvoir la survie cellulaire directement ou indirectement. BAD (*Bcl-2 Associated Death promoter*) est une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*). Cette protéine va être phosphorylée par Akt et sera alors dissociée du complexe Bcl-2/Bcl-x, elle perdra ainsi sa fonction pro-apoptotique. Akt peut également activer NFκB en régulant IKK (*IκB kinase*) induisant alors la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire.

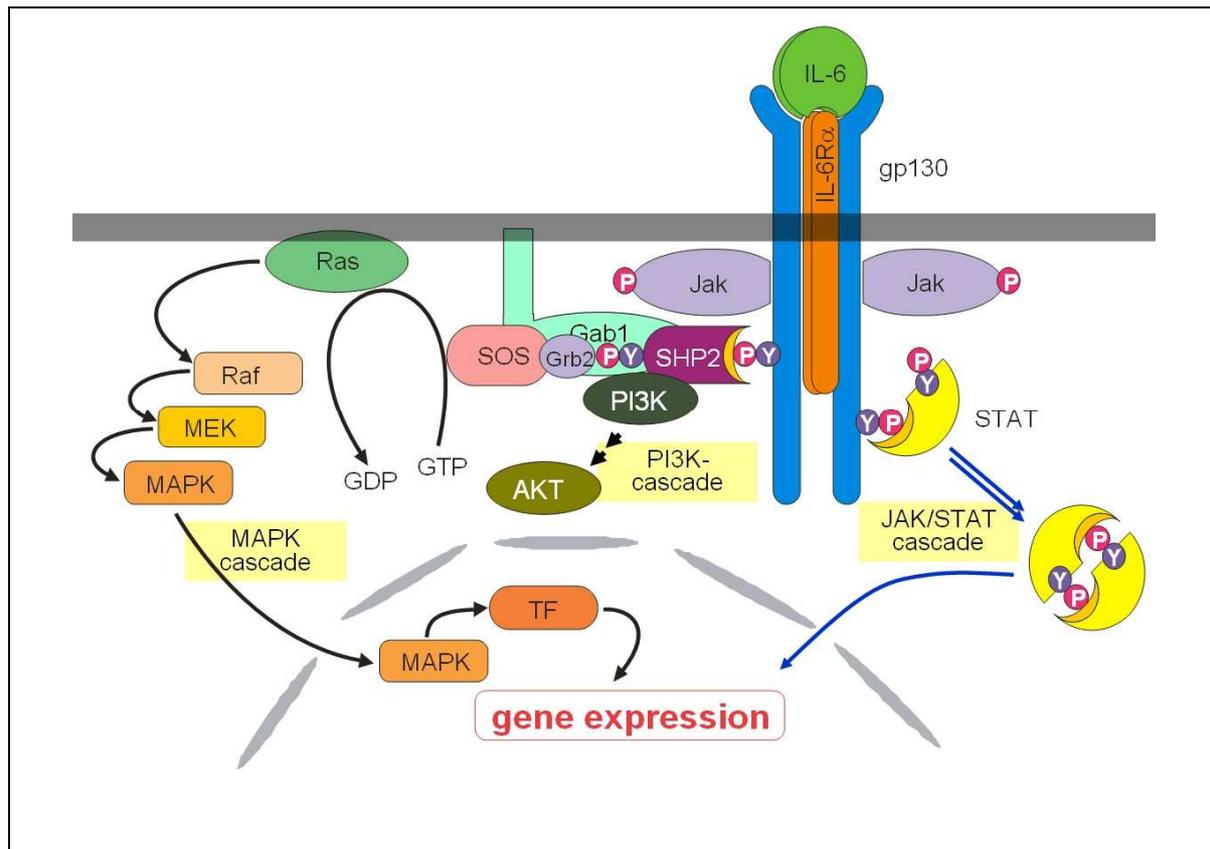


Figure 8 : Représentation schématique des cascades de signalisation induites par l'IL-6. L'activation des voies JAK/STAT, MAP kinase ainsi que PI3K contribue à la régulation de l'expression des gènes induits par l'IL-6. Tirée de Eulendorf *et al.*, *European Journal of Cell Biology.*, 2012⁹¹.

3.1.6. Implication de l'IL-6 dans les maladies inflammatoires chroniques

De nombreuses études ont mis en évidence qu'une surproduction d'IL-6 contribuait au développement de maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite juvénile idiopathique, la maladie de Crohn ou encore la sclérodémie systémique.

L'implication de l'IL-6 dans les maladies inflammatoires chroniques sera décrite dans la partie 4.4.

3.2. L'interleukine-1 β

3.2.1. Caractéristiques générales

L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée dans le cytoplasme des cellules sous la forme d'un précurseur de 31 kDa, appelé pro-IL-1 β , qui est biologiquement inactif⁹². Il doit être converti en une forme mature de 17,5 kDa par une enzyme, la caspase-1⁹³, avant d'être libérée dans le milieu extracellulaire.

3.2.2. Fonctions biologiques de l'IL-1 β

L'IL-1 β est synthétisée par de nombreux types cellulaires tels que les monocytes, les macrophages⁹⁴, les neutrophiles, les hépatocytes et les fibroblastes⁹⁵ en réponse à des stimuli inflammatoires tels que des produits bactériens (LPS) ou encore des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ).

L'IL-1 β possède de nombreuses fonctions systémiques⁹⁶ impliquées dans la réponse inflammatoire (Voir partie 1.2.3) (**Figure 9**). Elle agit au niveau du cerveau en stimulant la production de cyclooxygénase-2 qui va induire une augmentation de la prostaglandine E2 et donc l'apparition de fièvre. Elle est également impliquée dans la synthèse des protéines de la phase aiguë en stimulant la production d'IL-6 par les cellules endothéliales.

L'IL-1 β semble jouer un rôle majeur dans la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th17⁹⁷. Il a été montré que des souris ayant des cellules myéloïdes déficientes en IL-1Ra développaient une arthrite au collagène plus sévère que les souris contrôles⁹⁸. Il a été observé chez ces souris une augmentation de la sécrétion d'IFN γ et d'IL-17 avec un changement de la réponse initiale Th1 en faveur d'une réponse Th1 et Th17.

L'IL-1 β est un facteur angiogénique⁹⁹. Chez des souris déficientes en IL-1 β , la stimulation des cellules endothéliales par le VEGF n'entraîne pas la formation de vaisseaux sanguins ni l'invasion tumorale.

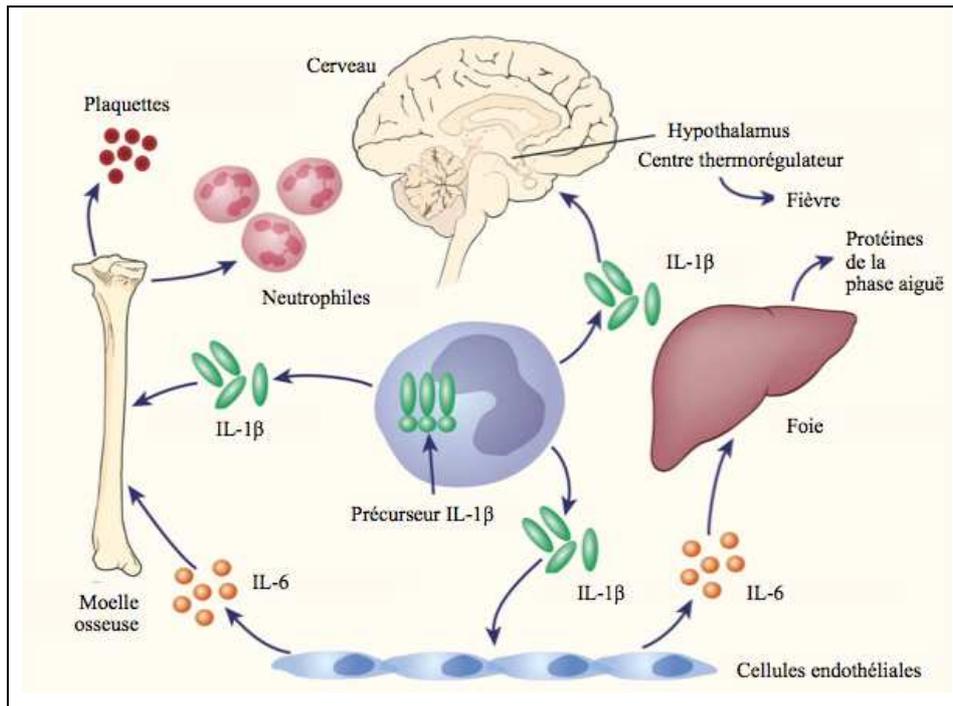


Figure 9 : Fonctions systémiques de l'IL-1 β . Adaptée de Dinarello., *Annu. Rev. Immunol.*, 2009⁹⁶.

3.2.3. Voies de signalisation de l'IL-1 β

Le récepteur transmembranaire de type I²² (IL-1RI) est une protéine de 80 kDa exprimée à la surface des kératinocytes, des cellules endothéliales, des lymphocytes, des fibroblastes, des chondrocytes ou encore des hépatocytes. L'IL-1RI possède une partie cytoplasmique de 213 acides aminés qui permet la transduction du signal.

Lorsque l'IL-1 β se fixe à l'IL-1RI, une protéine accessoire est recrutée, l'IL-1RAcP. Les domaines cytoplasmiques de l'IL-1RI et de l'IL-1RAcP sont tous les deux nécessaires à la transduction du signal.

La fixation de l'IL-1 β à l'IL-RI induit un changement conformationnel qui facilite le recrutement de l'IL-1RAcP. La formation de ce complexe permet le recrutement de la protéine MYD88 (pour *MYeloid Differentiation primary response 88*) suivi de IRAK4¹⁰⁰ (pour *Interleukin-1 Receptor-Activated protein Kinase 4*). La phosphorylation de IRAK4 permet le recrutement des protéines IRAK1 et IRAK2 qui vont à leur tour permettre le recrutement de la protéine TRAF6¹⁰¹ (pour *Tumor necrosis factor-Associated Factor 6*). TRAF6 est capable d'induire l'activation de deux voies de signalisation¹⁰² (**Figure 10**), la voie TAB1/TAK1 (pour *TGF- β Activated protein kinase-Binding protein 1/TGF- β Activated protein Kinase 1*) aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la voie MAP

kinase/JNK (pour *c-Jun N-terminal Kinase*) aboutissant à l'activation du facteur de transcription AP-1 (pour *Activator Protein-1*). Ces deux facteurs de transcription induisent l'expression de nombreux gènes notamment ceux de l'IL-6, du TNF α , de l'IFN α et du TGF- β .

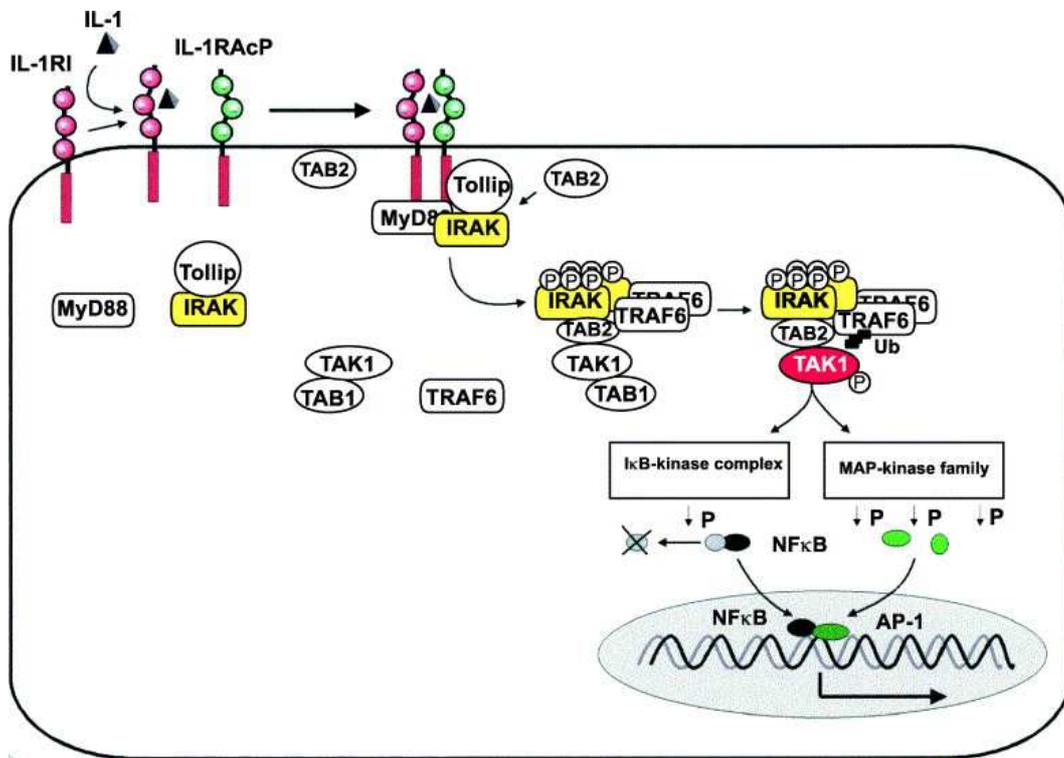


Figure 10 : Voies de signalisation déclenchées en réponse à l'IL-1 β . Adaptée de Martin & Wesche¹⁰³, *Biochim Biophys Acta.*, 2002.

3.2.4. Régulation de l'activité de l'IL-1 β

Plusieurs antagonistes naturels régulent l'activité biologique de l'IL-1 β .

Le récepteur transmembranaire de type II¹⁰⁴ (IL-1RII) est une protéine de 68 kDa exprimée par les lymphocytes B, les neutrophiles et les cellules de la moelle osseuse. Ce récepteur possède une partie cytoplasmique de seulement 29 acides aminés. Il peut lier l'IL-1 β mais ne permet pas la transduction du signal, il joue le rôle de récepteur leurre. De plus, le complexe formé par l'IL-1 β et l'IL-1RII est capable de recruter l'IL-1RAcP, qui ne peut alors plus se fixer à l'IL-1RI. Il existe également une forme soluble de l'IL-1RII, qui comme la forme transmembranaire, peut séquestrer l'IL-1 β et des formes solubles de l'IL-1RI et de l'IL-1RAcP qui inhibent l'activité de l'IL-1 β . L'IL-1RAcP soluble peut se fixer aux complexes membranaires IL-1 β /IL-1RI. Cette forme soluble étant dépourvue de partie

cytoplasmique, elle ne permettra pas l'initiation de la cascade de signalisation, inhibant ainsi l'action de l'IL-1 β ¹⁰⁵.

Enfin, il existe un antagoniste naturel de l'IL-1 β , l'IL-1Ra¹⁰⁶ qui peut se fixer à l'IL-1RI mais ne permet pas le recrutement de l'IL-1RAcP.

3.2.5. Implication de l'IL-1 β dans les maladies inflammatoires chroniques

Les maladies autoinflammatoires sont caractérisées par des fièvres récurrentes, une leucocytose, une augmentation des protéines de la phase aiguë et une fatigue généralisée. On peut citer le syndrome de la fièvre familiale méditerranéenne, les syndromes périodiques associés à la cryopirine (SPAC), ou encore la maladie de Behçet. L'ensemble de ces maladies ont en commun une réduction de leur sévérité après traitement avec un inhibiteur de l'IL-1 β ^{107,108}. En effet, une augmentation de la sécrétion de l'IL-1 β a pu être mise en évidence dans ces maladies suite à une activation dérégulée de la caspase-1.

L'IL-1 β est également impliquée de la pathogenèse de nombreuses maladies auto-immunes inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaques. Son rôle sera détaillé dans la partie 4.4.

4. Les maladies inflammatoires chroniques

4.1. Généralités

Les maladies auto-immunes inflammatoires chroniques résultent d'une réponse immunitaire à l'encontre de constituants du « Soi ». Les lésions tissulaires qui en découlent dépendent de la localisation de l'auto-antigène. S'il est confiné au sein d'un tissu ou d'un organe on parle alors de maladies spécifiques d'organes. En revanche, si l'auto-antigène est largement distribué dans l'organisme et que les lésions sont disséminées au sein de différents tissus, on parle alors de maladies non spécifiques d'organes (ou maladie systémique), ce qui est le cas par exemple du lupus érythémateux disséminé.

Quand une réponse immunitaire est engagée pour lutter contre un pathogène, l'issue est en général l'élimination de ce dernier avec un arrêt de la réponse immunitaire et persistance des cellules mémoires. Dans le cas d'une réaction auto-immune, il y a tout d'abord mise en place d'une phase d'activation précoce qui se poursuit par un état chronique

dû à la persistance de l'auto-antigène. Contrairement à l'inflammation aiguë, les phénomènes vasculaires et cellulaires co-existent tout au long de l'inflammation chronique.

4.2. Mécanismes lésionnels

Les mécanismes lésionnels observés au cours des maladies auto-immunes inflammatoires chroniques peuvent être dus, d'une part, aux auto-anticorps dirigés contre des antigènes du « Soi » et, d'autre part, aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺.

La plupart des maladies inflammatoires chroniques s'accompagnent de la production d'auto-anticorps. Ceux-ci peuvent être cytolytiques ou opsonisants comme dans le purpura thrombopénique auto-immun où la destruction des plaquettes est induite par les auto-anticorps après opsonisation¹⁰⁹. Les auto-anticorps peuvent être également bloquants comme c'est le cas dans la myasthénie. Les auto-anticorps vont se fixer aux récepteurs de l'acétylcholine et empêcher la fixation du ligand, entraînant des troubles de la transmission neuromusculaire¹¹⁰. À titre d'exemple, dans la maladie de Basedow, on retrouve des anticorps stimulants qui vont se fixer au récepteur de l'hormone de stimulation de la thyroïde (TSH pour *Thyroid Stimulating Hormone*) et mimer les effets de la TSH conduisant à une hypersécrétion d'hormones thyroïdiennes¹¹¹.

Enfin, les auto-anticorps peuvent former des complexes immuns. C'est le cas du lupus érythémateux disséminé où des complexes immuns sont retrouvés à la jonction dermo-épidermique et dans les glomérules rénaux. Ces complexes-immuns vont induire la libération de facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles qui en retour vont libérer leurs enzymes protéolytiques, génératrices de lésions.

L'implication des lymphocytes T CD4⁺ a été mise en évidence grâce à la mise en place de modèles de maladies inflammatoires chroniques chez l'animal. Par exemple, dans l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), modèle animal de la sclérose en plaques, la maladie peut être déclenchée par le transfert chez des animaux syngéniques sains de clones T spécifiques de la protéine basique de la myéline (MBP pour *Myelin Basic Protein*) provenant d'animaux malades¹¹². Dans le modèle de diabète insulino-dépendant spontané de la souris Non Obese Diabetic (NOD), on observe au début de la maladie une infiltration de cellules inflammatoires constituée de macrophages, de lymphocytes T CD4⁺ puis de lymphocytes T CD8⁺. L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ joue un rôle majeur dans l'apparition du diabète avec la destruction des îlots β des cellules de Langerhans^{113,114}.

4.3. Hypothèses mécanistiques

La plupart des maladies inflammatoires chroniques résultent d'une rupture ou d'un échec des mécanismes de tolérance au « Soi ». Plusieurs mécanismes peuvent entrer en jeu.

4.3.1. Libération des antigènes séquestrés

Un certain nombre d'antigènes sont ignorés du système immunitaire, ils sont anatomiquement séquestrés et ne rentrent pas en contact avec des cellules immunocompétentes. C'est le cas des antigènes du cristallin ou encore des spermatozoïdes¹¹⁵. Suite à un traumatisme, ils vont être libérés dans les tissus environnants où ils vont pouvoir être pris en charge par des CPA, qui vont migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques et ainsi activer les lymphocytes T et B auto-réactifs. Les cellules effectrices vont alors pouvoir retourner, par la circulation sanguine, au site du traumatisme et rencontrer de nouveau l'antigène.

4.3.2. Les antigènes cryptiques

En temps normal, seuls quelques fragments peptidiques issus de l'apprêtement d'un antigène sont présentés par les molécules du CMH, on les appelle les épitopes immunodominants. D'autres épitopes, appelés épitopes cryptiques, sont ignorés du système immunitaire non pas en raison de leur localisation anatomique mais à cause de leur localisation au sein de la molécule antigénique. Ils ne sont peu ou pas présentés par les CPA et n'ont jamais la possibilité d'entraîner la délétion ou l'anergie des lymphocytes auto-réactifs. Ces antigènes peuvent susciter une réaction auto-immune si, à l'occasion d'une réaction inflammatoire, ils se trouvent présentés par les molécules du CMH à la surface d'une CPA.

4.3.3. Le mimétisme moléculaire

Cette notion a été introduite en 1987 par Michael Oldstone¹¹⁶. Il avait émis l'hypothèse que certains antigènes, d'un agent infectieux viral ou bactérien, peuvent partager des épitopes communs avec des antigènes du « Soi ». En effet, certaines infections virales sont associées au déclenchement ou à l'exacerbation de maladies inflammatoires chroniques. Les peptides encéphalitogènes de la MBP sont connus et leur ressemblance avec d'autres

peptides d'origine virale ou bactérienne a pu être mise en évidence. C'est le cas du peptide de la MBP₆₁₋₆₉ très semblable à un peptide de la protéine P3 du virus de la rougeole (**Tableau 2**) De la même façon, de nombreuses régions de la MBP partagent des similarités de séquence avec la polymérase du virus de l'hépatite B¹¹⁷. L'agent infectieux va présenter des déterminants antigéniques croisés avec des auto-antigènes de l'organisme infecté. La réponse immunitaire induite va favoriser la présentation des auto-antigènes facilitant la levée d'anergie des lymphocytes T notamment par l'expression de molécules de co-stimulation par les CPA.

Protéine	Position du 1 ^{er} résidu	Séquence
Protéine P3 de la rougeole	31	EISDNLGQE
Protéine basique de la myéline	61	EISFKLGQE

Tableau 2 : Mimétisme moléculaire entre la protéine humaine de la myéline et la protéine virale P3 de la rougeole. Les acides aminés communs sont en orange.

4.3.4. Stimulation polyclonale non spécifique des lymphocytes B

Certains virus et bactéries peuvent induire une activation polyclonale non spécifique des lymphocytes B, comme par exemple l'Epstein-Barr Virus¹¹⁸ (EBV). Lorsque les cellules B auto-réactives sont activées par ce mécanisme, des auto-anticorps peuvent être produits. C'est le cas lors de la mononucléose infectieuse causée par l'EBV au cours de laquelle sont produits des anticorps antinucléaires ou des facteurs rhumatoïdes.

4.3.5. Expression inappropriée des molécules de CMH

Les molécules de CMH de classe II, qui ne sont normalement exprimées que sur les cellules présentatrices d'antigènes peuvent, dans certains cas, être exprimées par d'autres types cellulaires. Par exemple, les cellules β du pancréas des individus ayant un diabète insulino-dépendant (diabète de type I) expriment des taux élevés de molécules de CMH de classe II. Cette expression dérégulée peut conduire à l'activation de lymphocytes T auto-réactifs et au développement de la maladie.

4.3.6. Facteurs de risques génétiques

La composante génétique des maladies inflammatoires chroniques a pu être mise en évidence suite à l'apparition de plusieurs cas au sein d'une même famille ou encore par un taux de concordance plus élevé chez les jumeaux monozygotes que chez les dizygotes. Certaines associations avec divers marqueurs génétiques ont alors été trouvées. On peut tout d'abord citer le système HLA (*Human Leukocyte Antigen*) dont les gènes codent pour les molécules du CMH. Cette association HLA/maladies inflammatoires chroniques peut s'expliquer par l'aptitude particulière de certains allèles à coder pour des molécules du CMH capables de présenter des auto-antigènes aux lymphocytes T. Parmi ces éléments de prédisposition génétique, on peut citer HLA-B27 exprimé par 96 % des malades atteints de spondylarthrite ankylosante contre 8 % chez les sujets sains¹¹⁹. De même que l'allèle HLA-DR4 exprimé par 70 % des sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) contre 25 % chez les sujets sains¹²⁰ ou encore HLA-DR2 dans la sclérose en plaques.

D'autres facteurs génétiques peuvent intervenir dans la prédisposition à la maladie tels que des déficits homozygotes de protéines du complément qui sont associés au développement du lupus érythémateux disséminé¹²¹.

Des études d'association « génome entier » (GWAS pour *Genome-Wide Association Study*) ont également montré l'implication de certains variants alléliques de récepteurs de cytokines. Par exemple, certains variants du gène codant pour le récepteur de l'IL-23 (IL-23R) conféreraient une prédisposition aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, maladies regroupant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique¹²². Toutes ces prédispositions génétiques, bien qu'augmentant significativement la probabilité de développer la maladie, n'entraîneront pas nécessairement son apparition.

Il est important de noter que sur la totalité des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques, 80 % environ sont des femmes (92 % pour la sclérodémie systémique, 89 % pour le lupus érythémateux disséminé et 64 % pour la sclérose en plaques¹²³). Des études ont montré que les hormones sexuelles ainsi que les traitements hormonaux étaient impliqués dans le développement de la maladie. Ainsi au cours de la grossesse, des poussées de lupus peuvent être déclenchées¹²⁴.

4.3.7. Facteurs de risques environnementaux

Outre les virus précédemment évoqués, de nombreux médicaments peuvent potentiellement induire l'apparition de maladies inflammatoires chroniques. En effet, un syndrome lupique peut être provoqué par la prise prolongée de médicaments tels que l'hydralazine, la quinidine ou encore les anticorps monoclonaux anti-TNF α ¹²⁵.

4.4. Exemples de maladies inflammatoires chroniques et leurs traitements conventionnels associés

Les maladies inflammatoires chroniques décrites dans cette partie sont celles pour lesquelles un modèle murin d'études expérimentales est disponible au laboratoire ou en collaboration.

4.4.1. La sclérodermie systémique

➤ Généralités

La sclérodermie systémique (ScS) est une affection généralisée du tissu conjonctif caractérisée par des anomalies vasculaires majeures et un épaissement fibreux de la peau. C'est une maladie rare appartenant au groupe des connectivites et sa prévalence varie entre 7 et 500 cas par million d'habitants avec une prédominance féminine¹²⁶. Elle appartient au groupe des maladies orphelines dans la mesure où il n'existe à ce jour aucune thérapie efficace pour traiter la ScS. Son étiologie est inconnue mais il est probable que sur un terrain génétique prédisposé, des facteurs exogènes (environnementaux, viraux etc.) interviennent. Parmi eux, la silice¹²⁷ stimulerait les macrophages alvéolaires provoquant ainsi une libération de médiateurs de l'inflammation, ou encore les solvants¹²⁸ responsables de dénaturations protéiques à l'origine de l'activation des mécanismes auto-immuns.

On distingue deux formes principales de sclérodermie systémique qui se différencient par le degré d'atteinte cutanée¹²⁹ :

- **Les formes cutanées limitées** caractérisées par une atteinte distale des membres et une atteinte du visage. Ces formes ont un meilleur pronostic général, mais exposent au risque de complications tardives telles que l'hypertension artérielle pulmonaire,
- **les formes cutanées diffuses** caractérisées par une atteinte du tronc et une atteinte proximale des membres. Des atteintes viscérales graves notamment rénales, cardiaques et pulmonaires peuvent être observées, pouvant engager le pronostic vital.

➤ Physiopathologie

Elle met en jeu des phénomènes vasculaires, immunitaires et fibrotiques avec l'implication des cellules endothéliales, mononuclées et des fibroblastes.

Les lésions vasculaires précoces sont caractérisées par une atteinte fonctionnelle et structurale des cellules endothéliales. Les cellules se désorganisent et l'expression des molécules d'adhésion est augmentée entraînant un afflux lymphocytaire au niveau de la peau.

L'augmentation des taux plasmatiques d'endothéline-1 et la diminution de l'enzyme de conversion de l'angiotensine témoignent des lésions endothéliales. L'endothéline-1 joue un rôle important dans la physiopathologie de la ScS. Elle stimule en effet la production de collagène par les fibroblastes¹³⁰ et peut induire leur différenciation en myofibroblastes¹³¹ favorisant alors le phénomène de fibrose qui se caractérise par un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la Matrice Extra Cellulaire (MEC).

Une apoptose des cellules endothéliales est également observée, potentiellement impliquée dans le phénomène de fibrose¹³². Ces anomalies sont impliquées dans la survenue du syndrome de Raynaud qui touche environ 95 % des malades atteints de ScS¹³³.

Les phénomènes immunitaires sont caractérisés par l'augmentation de l'infiltrat et de l'état d'activation de lymphocytes de type Th2 et de macrophages dans la peau des patients. Une augmentation du nombre de lymphocytes B circulants est également observée¹³⁴ avec la présence d'auto-anticorps à la fois spécifiques d'organes et non spécifiques d'organes. On retrouve des anticorps anti-nucléaires chez 95 % des malades atteints de ScS. Des anticorps anti-centromères sont présents dans 30 à 60 % des cas de ScS à forme cutanée limitée et des anticorps anti-topoisomérase I sont présents chez 30 % des malades avec une ScS cutanée diffuse. Longtemps considérés comme dépourvus de pouvoir pathogène direct, il a été montré que les auto-anticorps anti-topoisomérase I pourraient se fixer à la surface des fibroblastes, les activer et ainsi contribuer à la production excessive de collagène et donc au phénomène de fibrose¹³⁵.

Les cellules infiltrées vont conduire à la production de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques. On peut ainsi observer chez les patients atteints de ScS une augmentation sérique de l'IL-4¹³⁶, de l'IL-6¹³⁷, de l'IL-13¹³⁸, du TNF α ¹³⁹, du CTGF¹⁴⁰ (pour *Connective Tissue Growth Factor*) et de certaines chimiokines. L'ensemble de ces cytokines ont un effet sur le chimiotactisme, la prolifération ou encore sur l'activation des fibroblastes et donc sur le phénomène de fibrose (**Tableau 3**).

L'IL-4 est impliquée dans la prolifération des fibroblastes et la synthèse de protéines de la MEC telles que le collagène et la ténascine¹⁴¹.

Le TGF- β est produit par les macrophages et les lymphocytes Th2, il joue un rôle important dans le déclenchement et l'entretien de la fibrose. C'est un puissant chimio-attractant pour les fibroblastes et il permet l'augmentation de la synthèse des constituants de la MEC. Il est également capable de stimuler sa propre synthèse par les fibroblastes¹⁴². De plus, il induit la production de CTGF par les fibroblastes activés, cytokine également impliquée dans la synthèse des constituants de la MEC.

L'IL-1 est, quant à elle, produite par les cellules endothéliales activées, les macrophages et les fibroblastes de patients sclérodermiques¹⁴³. Elle augmente la synthèse de collagène par les fibroblastes en accroissant la production d'IL-6 et de PDGF¹⁴⁴ (pour *Platelet Derived Growth Factor*).

L'implication de l'IL-6 dans la pathogenèse de la ScS a pu être mise en évidence en cultivant des fibroblastes isolés de la peau lésionnelle de patients. Ceux-ci produisent constitutivement plus d'IL-6 que des fibroblastes de donneurs sains¹⁴⁵. L'IL-6 est une cytokine pro-fibrogénique qui conduit à l'augmentation de la production des constituants de la MEC par les fibroblastes via le mécanisme de *trans-signalling* (Voir partie 3.1.4), les fibroblastes n'exprimant pas constitutivement l'IL-6R. Cette cytokine permet également la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et la production d'anticorps, ce qui peut expliquer leur expansion clonale ainsi que l'hypergammaglobulinémie observées chez les malades¹⁴⁶. Enfin, l'utilisation du tocilizumab, un anticorps monoclonal anti-IL-6R, chez deux patients atteints de ScS cutanée diffuse, a entraîné une réduction de l'épaisseur de la peau chez ces deux patients ainsi qu'une réduction de la production de collagène¹⁴⁷.

Réponse du fibroblaste	Cytokines
Augmentation du chimiotactisme	TGF- β , IL-4, TNF α , PDGF
Augmentation de la prolifération	IL-1, FGF, PDGF, IL-4, IL-6, TGF- β , IL-17
Différenciation en myofibroblastes	TGF- β , PDGF
Augmentation de la production de collagène	TGF- β , IL-1, IL-4, IL-13, PDGF

Tableau 3 : Effets des cytokines sur le fibroblaste. Adapté du livre Sclérodermies, Y.Allanore, MED-LINE éditions, 2011¹⁴⁸.

➤ Traitements conventionnels

De nombreux traitements de fond ont été proposés mais aucun n'a prouvé son efficacité. Plusieurs molécules ont été testées avec pour objectif l'arrêt de l'évolution voire la régression de la ScS. Parmi elles, les immunosuppresseurs tels que le méthotrexate (MTX) testé chez des patients ayant une forme cutanée récente¹⁴⁹, la D-pénicillamine¹⁵⁰ ou encore la ciclosporine A. Des traitements anti-fibrosants ont également été évalués tels que l'IFN γ , des anti-TNF α (etanercept et infliximab) ou encore le rituximab (anticorps monoclonal qui cible la protéine CD20 à la surface des lymphocytes B).

Seuls les traitements symptomatiques des atteintes viscérales conduisent à une amélioration du pronostic vital. Pour les atteintes rénales, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont utilisés. Pour l'atteinte cardiaque, on utilise des inhibiteurs calciques tels que la nifédipine et pour les atteintes pulmonaires, des anticoagulants et des antagonistes de l'endothéline.

4.4.2. La polyarthrite rhumatoïde

➤ Généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique qui conduit à une destruction articulaire précoce pouvant générer un handicap. Sa prévalence est de 0,5 à 1 % dans la population. C'est la maladie inflammatoire chronique la plus fréquente avec une fréquence plus élevée chez les femmes : elle atteint trois fois plus souvent les femmes que les hommes.

Elle est associée à des facteurs génétiques de susceptibilité tels que la possession de l'allèle HLA-DR4, mais également à des facteurs environnementaux tels que des infections bactériennes, virales ou encore le tabagisme. Il a en effet été montré, chez les patients porteurs des allèles HLA-DR, que le tabac serait capable de citrulliner des protéines du « Soi » dans le poumon et ainsi favoriser une réponse auto-immune¹⁵¹.

➤ Physiopathologie

La PR se caractérise tout d'abord par une phase dite « pré-articulaire » au cours de laquelle la production d'anticorps anti-IgG, appelés facteurs rhumatoïdes, ou encore d'anticorps dirigés contre des protéines cycliques citrullinées est déclenchée. Cette phase précède l'apparition des symptômes cliniques et peut parfois durer plusieurs années.

Les facteurs déclenchant la phase clinique sont inconnus mais ils incluent probablement une série de déséquilibres cytokiniques, enzymatiques et cellulaires.

Les articulations atteintes vont subir des changements histologiques et structuraux. La membrane synoviale va subir une inflammation chronique. Une hyperplasie des synoviocytes conduisant à la formation d'un pannus est observée, entraînant une dégradation osseuse et cartilagineuse. Une augmentation de l'angiogenèse a également lieu favorisant alors le recrutement de cellules inflammatoires (lymphocytes T et B, macrophages, neutrophiles) qui permettent le maintien de l'inflammation et la dégradation tissulaire par la sécrétion de cytokines.

Les cytokines sont impliquées à chaque étape du développement de la maladie : production d'auto-anticorps, maintien de l'inflammation chronique ou encore lors de la destruction des tissus environnant l'articulation.

De nombreuses preuves suggèrent un rôle majeur du TNF α dans la pathogenèse de la PR. Le TNF α a été retrouvé dans la membrane synoviale des patients atteints de PR¹⁵² et est spontanément produit par des synoviocytes de patients en culture¹⁵³. Par ailleurs, les modèles animaux attestent de son implication. En effet, des souris exprimant un transgène pour le TNF α humain développent spontanément une arthrite inflammatoire¹⁵⁴. Des souris traitées avec un anticorps monoclonal anti-TNF α murin développent une arthrite au collagène moins sévère¹⁵⁵. Enfin, il a été montré, sur des synoviocytes de patients, que le blocage du TNF α induit une diminution de l'expression d'autres cytokines telles que l'IL-1, suggérant le concept d'une cascade dépendante du TNF α ¹⁵⁶. L'ensemble des propriétés du TNF α telles que l'inhibition de la synthèse de protéoglycanes et de collagène dans le cartilage, la stimulation de la prolifération des fibroblastes ou encore l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, indique un rôle délétère du TNF α .

L'IL-1 est exprimée dans la synovie des patients atteints de PR et elle a de nombreuses actions communes avec le TNF α . Des souris déficientes pour l'IL-1Ra développent une arthrite spontanée associée à la différenciation des lymphocytes en sous-type Th17¹⁵⁷.

La PR a longtemps été considérée comme une maladie à dominance Th1 (sécrétion d'IFN γ et de TNF α) mais de récentes études suggèrent un rôle prépondérant des lymphocytes de type Th17. Des souris déficientes pour l'IL-6 ou pour la sous-unité IL-23p19 de l'IL-23, cytokines impliquées dans la différenciation des lymphocytes Th17 chez la souris (IL-6) et l'homme (IL-23), sont résistantes au développement d'une arthrite au collagène^{158,159}. L'IL-17

est un promoteur de l'ostéoclastogenèse au niveau de l'articulation¹⁶⁰ et elle contribue à l'inflammation en permettant la production d'IL-6 par les synoviocytes.

L'IL-6 est retrouvée en concentration élevée à la fois dans le sérum, le liquide et la membrane synoviale de patients. Il a été montré que son blocage par un anticorps monoclonal supprimait l'induction de l'arthrite au collagène avec diminution de la population de lymphocytes Th17¹⁶¹.

➤ Traitements conventionnels

Les objectifs des traitements sont un arrêt et une prévention des destructions articulaires, une prévention des pertes de fonction et une diminution des douleurs, l'objectif final étant d'atteindre une rémission complète.

Il existe des traitements symptomatiques constitués d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et si nécessaire de corticoïdes tels que la prednisone.

Utilisés en plus des traitements symptomatiques, il existe des traitements de fond qui ont pour objectif de ralentir l'évolution de la maladie. Ils font partie de la classe des médicaments anti-rhumatiques modifiant le cours de la maladie (DMARD pour *Disease Modifying AntiRheumatic Drug*). On peut citer notamment le méthotrexate, traitement de fond de référence dont l'efficacité est rapide et qui présente un taux de 60 % de malades répondeurs. La sulfasalazine ou encore le léflunomide sont également utilisés. Cependant, il existe de nombreux effets secondaires liés à l'utilisation de ces traitements, c'est pourquoi une surveillance biologique est indispensable tout au long de leur utilisation.

Depuis maintenant 15 ans, en cas de non-réponse ou de réponse insuffisante aux traitements conventionnels, des traitements ciblés sont utilisés. Des inhibiteurs du TNF α peuvent être administrés en association avec le méthotrexate. De la même façon, si les anti-TNF α échouent, d'autres thérapies peuvent être utilisées telles qu'un anticorps monoclonal anti-IL-6R ou un antagoniste du récepteur à l'IL-1.

4.4.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

➤ Généralités

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH). Ces deux pathologies, bien que semblables sur certains points, sont différentes sur les plans physiopathologique, clinique et

thérapeutique. Elles se caractérisent toutes deux par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif. Dans la MC, elle peut toucher l'ensemble du tractus digestif tandis que dans la RCH, elle est limitée au niveau du côlon et du rectum. Lors des poussées inflammatoires, les symptômes sont des douleurs abdominales, des diarrhées fréquentes, parfois sanglantes, avec présence de fissures ou d'abcès. Entre ces poussées, on observe des périodes de rémission avec disparition des symptômes. Dans certains cas, des manifestations extra-digestives peuvent apparaître telles que des rhumatismes, une ostéoporose, un érythème ou encore des manifestations oculaires.

➤ Physiopathologie

En France, 10 nouveaux cas de MICI pour 100000 habitants sont diagnostiqués chaque année. Leur étiologie est inconnue mais elle met potentiellement en jeu des facteurs génétiques, infectieux et immunitaires.

Le gène *nod2* code pour la protéine CARD15, récepteur cytosolique des macrophages, qui reconnaît des composants bactériens. Des études récentes ont mis en évidence des mutations du gène *nod2*¹⁶², entraînant une augmentation de la réaction inflammatoire contre des bactéries de la flore intestinale endogène.

Ces mêmes bactéries sont impliquées dans la pathogenèse des MICI. Des germes de la flore endogène ont en effet pu être observés dans les lésions au cours des MICI et certains, en augmentant la perméabilité intestinale, peuvent stimuler anormalement l'immunité mucoale.

De la même façon, des agents infectieux exogènes pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse des MICI tels que *Mycobacterium paratuberculosis* dont l'ADN a été retrouvé au sein de la muqueuse de patients atteints de MC¹⁶³.

Enfin, une hyper-activation du système immunitaire a été constatée au niveau de l'intestin des patients. Elle est caractérisée par l'infiltration de cellules inflammatoires de l'immunité innée, au niveau de la *lamina propria*, telles que les macrophages qui produisent des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 et IL-6). Ces effecteurs vont activer l'immunité adaptative et ainsi perpétuer la réponse inflammatoire. Cette réponse adaptative est caractérisée par les lymphocytes T qui sont fortement activés et présentent une résistance à l'apoptose. Suivant la maladie, différents types de lymphocytes T sont activés ; les Th1 dans la MC avec sécrétion de TNF α , d'IFN γ et d'IL-2 et les Th2 dans la RCH avec sécrétion de TGF- β et d'IL-5.

Différentes cytokines sont donc impliquées dans la pathogenèse des MICI. Une augmentation du taux sérique de TNF α a été observée chez les patients souffrant de MICI¹⁶⁴. De plus, des anticorps monoclonaux anti-TNF α ont montré leur efficacité depuis maintenant plus de 10 ans.

Par ailleurs, des taux élevés d'IL-6 sont retrouvés chez des patients souffrant de MC et de RCH, ces taux étant corrélés avec l'activité inflammatoire de la maladie dans la MC¹⁶⁵. De plus, l'administration d'un anticorps monoclonal anti-IL-6R, le tocilizumab, entraîne une augmentation du taux de rémission chez les patients présentant une MC active¹¹³ avec une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T. Le mécanisme d'action supposé de l'IL-6 est décrit dans la **Figure 11**.

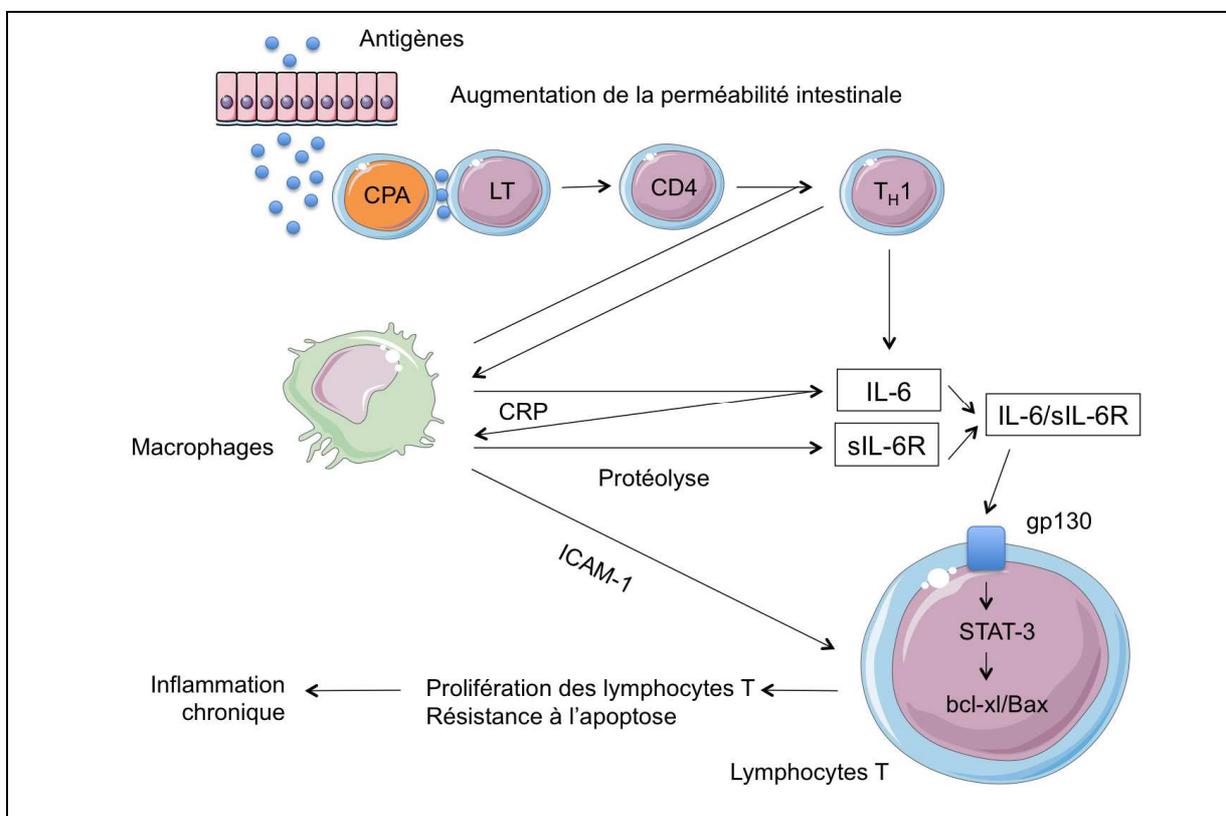


Figure 11 : Mécanisme d'action supposé de l'IL-6 dans les MICI. L'IL-6 produite par les macrophages se fixerait sur son récepteur soluble dont l'élévation dans le sérum a été mise en évidence chez les patients. Les complexes formés vont ensuite se fixer sur la gp130 à la surface des lymphocytes T et induire la transcription des gènes anti-apoptotiques. Les lymphocytes T seraient alors résistants à l'apoptose et permettraient la persistance de l'inflammation. Adaptée de Atreya *et al*, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology.*, 2005¹⁶⁶.

L'IL-12 a longtemps été décrite comme ayant une implication importante dans la pathogenèse des MICI, compte tenu de son rôle majeur dans la polarisation des lymphocytes

Th1. L'administration d'un anticorps dirigé contre la sous-unité IL-12p40, l'ustekinumab, lors d'un essai clinique de phase II¹⁶⁷ a permis une augmentation du taux de rémission chez des patients atteints de MC modérée à sévère.

Cependant, la sous-unité IL-12p40 est partagée avec la cytokine IL-23. Le rôle de cette cytokine dans la pathogenèse des MICI a donc été étudié. L'IL-23 est une cytokine impliquée dans la différenciation des lymphocytes de type Th17 chez l'homme et dans le maintien de la population chez la souris. Des souris IL-23 KO développent une colite expérimentale moins sévère que les souris contrôles, avec une diminution des taux d'IL-6 et d'IL-17^{168,169}. De plus, des souris KO pour ROR γ t, facteur de transcription impliqué dans la différenciation des Th17, sont protégées dans un modèle de colite par transfert adoptif de lymphocytes T¹⁷⁰. Cette colite peut être restaurée par l'administration d'IL-17A. Cependant, des essais cliniques effectués avec un anticorps anti-IL-17 n'ont pas montré d'efficacité dans la maladie de Crohn¹⁷¹. Ces études soulignent ainsi le rôle de l'IL-23 dans la pathogenèse des MICI.

➤ Traitements conventionnels

La prise en charge des MICI repose à la fois sur la prise d'un traitement de fond afin de prévenir l'apparition des poussées et d'un traitement de crise qui permet d'écourter leur durée et de limiter l'apparition des symptômes.

Lors des poussées, les acides 5-aminosalicyliques (5-ASA) sont tout d'abord prescrits en formes locale ou orale. En général, ce sont des traitements très bien tolérés qui ne présentent que peu d'effets secondaires. En deuxième intention, les corticoïdes tels que la prednisone sont prescrits en cas de poussées sévères ou d'échec aux 5-ASA.

En traitements de fond, on trouve les immunosuppresseurs tels que l'azathioprine, le méthotrexate ou encore la ciclosporine.

Enfin, en cas de formes sévères et après échec des traitements médicaux, en cas de formes chroniques invalidantes ou de complications graves, un traitement chirurgical est envisagé. Il consiste en l'ablation des lésions inflammatoires dans le cas de la MC et d'une partie ou de la totalité du côlon dans la RCH.

En cas de résistance aux traitements conventionnels ou en cas de formes très sévères, des anticorps monoclonaux anti-TNF α peuvent être prescrits pour le traitement de la RCH (infliximab) et de la MC (infliximab ou adalimumab).

4.4.4. La sclérose en plaques

➤ Généralités

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du système nerveux central, caractérisée par une démyélinisation des fibres nerveuses du cerveau, de la moelle épinière et du nerf optique. Elle survient, dans 70 % des cas, chez le jeune adulte âgé de 20 à 40 ans, avec une fréquence plus élevée chez les femmes. Elle peut se manifester par des symptômes très variables tels que l'engourdissement et le fourmillement d'un membre, des troubles de la vision ou encore des troubles moteurs. La SEP est une maladie qui évolue par poussées caractérisées par l'apparition, la réapparition ou l'aggravation de symptômes évoquant les manifestations de la maladie. Pour être considérés comme une poussée, ces symptômes doivent durer au minimum 24 heures et être séparés de la précédente poussée d'au moins 30 jours. Il existe trois formes principales de SEP suivant l'évolution de la maladie dans le temps :

- **La forme rémittente** qui évolue par poussées bien individualisables entrecoupées de périodes de rémission,
- **la forme secondairement progressive** au cours de laquelle, après une phase initiale rémittente, on observe une progression du handicap avec ou sans poussées suivies de rémission minimales,
- **la forme primaire progressive** caractérisée par une évolution lente et constante de la maladie sans poussée individualisable.

➤ Physiopathologie

La SEP est caractérisée par des réactions inflammatoires qui sont à l'origine de la destruction de la myéline qui entoure les fibres nerveuses. Cette destruction entraîne une déficience de la transduction des signaux électriques le long des axones.

Les causes de la maladie sont, à ce jour, peu connues. Elle est associée à des facteurs génétiques de susceptibilité tels que la possession de l'allèle HLA-DR2¹⁷², mais également à des facteurs environnementaux tels que des infections virales. En effet, des similarités structurales ont été observées entre des antigènes viraux et des antigènes de la myéline, pouvant conduire à la rupture de tolérance au « Soi », et l'activation de lymphocytes T auto-réactifs par le phénomène de mimétisme moléculaire (Voir partie 4.3.3).

Il a été montré que le liquide céphalo-rachidien de patients présentant une SEP active contient des lymphocytes T activés dirigés contre des antigènes de la myéline¹⁷³ tels que le peptide MOG (pour *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*) et le peptide MBP. Ces lymphocytes vont, par la production de cytokines pro-inflammatoires, induire le recrutement d'autres cellules inflammatoires telles que les macrophages et ainsi amplifier la réponse auto-immune. Plusieurs cytokines semblent être impliquées dans la pathogenèse de la SEP. Des patients atteints de SEP ont des taux augmentés d'IL-1 β , d'IL-17 et d'IL-23¹⁷⁴ dans le sang et les fluides cérébraux. Des souris déficientes en IL-1 β RI¹⁷⁵ et en IL-17¹⁷⁶ développent une EAE moins sévère que les souris contrôles. Une amélioration de l'EAE a pu être observée chez des souris¹⁷⁷ et des singes¹⁷⁸ traités avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité p40 partagée par l'IL-12 et l'IL-23. Il a été montré que des souris déficientes en IL-6 sont résistantes à l'induction de l'EAE avec le peptide MOG^{179,180}. Le blocage de l'IL-6 avec un anticorps monoclonal inhibe le développement de l'EAE chez les souris traitées ainsi que la différenciation des lymphocytes de types Th1 et Th17¹⁸¹.

➤ Traitements conventionnels

Le traitement de la poussée, au cours de la SEP, repose sur l'injection de corticoïdes à fortes doses par voie intraveineuse.

Les immunomodulateurs sont les plus couramment utilisés en traitement de fond tels que l'IFN β et l'acétate de glatiramère. Pendant la phase rémittente, ces traitements réduisent la fréquence des poussées d'environ 30 % et ralentissent la progression du handicap. Il existe également des traitements immunosuppresseurs qui interfèrent avec le cycle cellulaire des cellules immunocompétentes. Le plus couramment utilisé est le mitoxantrone, prescrit en cas de résistance aux traitements immunomodulateurs, mais il présente des effets secondaires importants¹⁸². D'autres immunosuppresseurs sont parfois utilisés mais sans certitude d'efficacité tels que l'azathioprine et le MTX.

5. Une révolution : les traitements ciblés anti-cytokine

Comme cela a été décrit dans les paragraphes précédents, la surexpression de cytokines est associée à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques. Cependant, il est nécessaire de discriminer les cytokines dont la surproduction peut simplement traduire l'état d'avancement de la maladie et celles qui sont liées de façon directe à son développement. Ce

sont ces dernières qui constituent les cibles de choix des thérapies dirigées contre les cytokines.

5.1. L'immunisation passive anti-cytokine

Une des stratégies mise en place pour cibler les cytokines, appelée immunisation passive, est basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou encore de récepteurs solubles injectés directement aux patients. Suite au succès des anticorps monoclonaux anti-cytokines dans les années 1990 dans des modèles animaux de maladies inflammatoires chroniques, leur utilisation en thérapeutique chez l'Homme a été envisagée. Nous avons maintenant un recul de 15 ans pour l'utilisation de certains d'entre eux (**Tableau 4**).

Anticorps monoclonal ou récepteur soluble	Mise sur le Marché (USA)	Type	Cible	Indications
Daclizumab	1997	humanisé	IL-2R α	rejet de greffe
Basiliximab	1998	chimérique	IL-2R α	rejet de greffe
Infliximab	1998	chimérique	TNF α	PR, MC, RCH, psoriasis, spondylarthrite ankylosante.
Etanercept	1998	Récepteur soluble	TNF α	PR, AJI, psoriasis, spondylarthrite ankylosante
Anakinra	2001	Antagoniste du récepteur	IL-1 β	PR
Adalimumab	2002	humain	TNF α	PR, MC, AJI, psoriasis, RCH, spondylarthrite ankylosante.
Cetuximab	2004	chimérique	EGFR	cancer colorectal
Bevacizumab	2004	humanisé	VEGF	DMLA, cancer colorectal
Ranibizumab	2006	humanisé	VEGF-A	DMLA
Panitumumab	2006	humain	EGFR	cancer colorectal
Rilonacept	2008	Protéine de fusion	IL-1 β	SPAC
Certolizumab	2008	humanisé	TNF α	PR, MC (US)
Golimumab	2009	humain	TNF α	PR, spondylarthrite ankylosante
Canakinumab	2009	humain	IL-1 β	SPAC
Ustekinumab	2009	humain	IL-12/IL-23	psoriasis
Denosumab	2010	humain	RANKL	ostéoporose
Tocilizumab	2010	humanisé	IL-6R	PR, AJI
Belimumab	2011	humain	BLyS	lupus érythémateux disséminé

Tableau 4 : Traitements ciblés anti-cytokine ou anti-récepteur de cytokines commercialisés. AJI : arthrite juvénile idiopathique. DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge. SPAC : syndromes périodiques associés à la cryopyrine.

5.1.1. Les traitements ciblés anti-TNF α

➤ Infliximab (Remicade®)

L'infliximab est une immunoglobuline chimérique de type IgG1, liant à la fois le TNF α soluble et membranaire, constitué à 75 % de séquence humaine et à 25 % de séquence murine. La première autorisation de mise sur le marché (AMM) a tout d'abord été obtenue pour le traitement de la maladie de Crohn en 1998 aux Etats-Unis puis en 2000 en France. Cette AMM a ensuite été étendue à d'autres maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la rectocolite hémorragique, la spondylarthrite ankylosante ou encore le psoriasis. L'infliximab est administré par voie intraveineuse pendant deux heures, à une dose de 3 mg/kg. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, le schéma de traitement repose sur une injection d'infliximab aux semaines 0, 2 et 6 puis une injection toutes les 8 semaines uniquement, compte tenu de la persistance des anticorps dans l'organisme pendant 2 à 3 mois. Cependant, cet anticorps monoclonal a l'inconvénient d'être chimérique et l'apparition d'anticorps dirigés contre l'infliximab a pu être observée¹⁸³ chez les patients traités (entre 12 à 44 % chez des patients atteints de PR). Afin d'éviter ce type de réaction induisant une perte d'efficacité du traitement, des stratégies d'humanisation d'anticorps ou de production d'anticorps entièrement humains sont apparues.

➤ Adalimumab (Humira®)

L'adalimumab est le premier anticorps monoclonal entièrement humain à avoir été commercialisé. Il a été approuvé tout d'abord dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde en 2002 aux Etats-Unis et en 2003 en France. L'AMM a ensuite été étendue pour le traitement de la spondylarthrite ankylosante, du psoriasis, de l'arthrite psoriasique, de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique. Il est injecté par voie sous-cutanée à une dose généralement de 40 mg toutes les deux semaines.

➤ Certolizumab pégol (Cimzia®)

Le certolizumab pégol est constitué d'un fragment Fab' PEGylé (polyéthylène glycol) d'un anticorps monoclonal humanisé de sous-classe IgG1 dirigé contre le TNF α . Sa conjugaison avec le PEG permet d'allonger la demi-vie plasmatique du fragment Fab' qui est alors d'une valeur comparable à celle d'un anticorps complet (diminution de la clairance rénale et de la protéolyse). Il a tout d'abord été approuvé en 2008 aux Etats-Unis dans la maladie de Crohn puis dans la polyarthrite rhumatoïde, contrairement à l'Europe où il n'est

approuvé que pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. En raison des améliorations minimales observées en comparaison à l'infliximab et à l'adalimumab et des effets secondaires importants, l'AMM du certolizumab pour le traitement de la maladie de Crohn a été refusée en France.

Sa posologie est de 400 mg en injections sous-cutanées aux semaines 0, 2 et 4 puis 200 mg toutes les deux semaines.

➤ Golimumab (Simponi®)

Le golimumab est un anticorps monoclonal humain de type IgG1 dirigé contre le TNF α . Il a été approuvé, en 2009, pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, du psoriasis arthritique et de la spondylarthrite ankylosante. Sa posologie est de 50 à 100 mg toutes les deux à quatre semaines par voie sous-cutanée. Son efficacité vient d'être testée dans un essai clinique de phase II/III (PURSUIT)¹⁸⁴ pour le traitement de la colite ulcéreuse. Au cours de cette étude, 47 % des patients recevant une dose de 50 mg de golimumab et 51 % des patients recevant 100 mg (toutes les 4 semaines), ont montré une bonne réponse clinique, contrairement au groupe de patients recevant le traitement placebo.

➤ Etanercept (Enbrel®)

Il s'agit d'une protéine de fusion dimérique associant la portion extracellulaire du récepteur humain au TNF α de type II (TNFR2) avec le fragment Fc d'une IgG1. Il fixe le TNF α mais également le TNF β . L'etanercept a été commercialisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde en 1998 peu après l'infliximab, puis dans l'arthrite juvénile idiopathique, le psoriasis arthritique, la spondylarthrite ankylosante et enfin le psoriasis en 2004. L'etanercept va jouer le rôle de récepteur leurre pour le TNF α l'empêchant ainsi d'exercer son activité biologique. Il est administré par voie sous-cutanée à une dose de 50 mg/semaine ou de 25 mg deux fois par semaine. En revanche, contrairement à l'infliximab, l'utilisation de l'etanercept ne montre pas d'efficacité dans le traitement de la maladie de Crohn¹⁸⁵. Il semblerait que l'etanercept ne soit pas capable d'induire l'apoptose des lymphocytes T de la *lamina propria* en se fixant au TNF α membranaire et en entraînant l'activation du complément¹⁸⁶.

- *Efficacité des traitements ciblés anti-TNF α*

Les maladies inflammatoires chroniques sont traitées en première intention avec des traitements dits conventionnels non spécifiques tels que les AINS, les corticoïdes ou encore les immunosuppresseurs classiques comme le méthotrexate. Cependant, en cas d'échec de ces différents traitements, des traitements ciblés de types anticorps monoclonal ou récepteur soluble anti-TNF α peuvent être envisagés pour certaines indications.

L'ensemble des traitements ciblés anti-TNF α présentés ci-dessus ont montré une efficacité au cours d'essais cliniques dans la polyarthrite rhumatoïde modérée à sévère et sont actuellement commercialisés pour cette application. Ces traitements sont administrés en association avec le MTX ou en monothérapie pour certains, s'il existe une intolérance au MTX. La plupart ont également obtenus une AMM pour le traitement de la spondylarthrite ankylosante et du psoriasis. En ce qui concerne les MICI, seule l'utilisation de l'infliximab et de l'adalimumab est actuellement autorisée en France.

- *Effets secondaires des traitements ciblés anti-TNF α*

Compte tenu de la durée et de la taille des échantillons lors des essais cliniques, la plupart des informations disponibles sur les effets secondaires sont issues des études de pharmacovigilance. Il a été montré que l'utilisation d'agents anti-TNF α entraînait un risque accru de développer des infections moyennes et sévères et particulièrement un risque accru d'activation de tuberculose latente¹⁸⁷.

Des réactions d'hypersensibilité ont été observées aux points d'injections, ne nécessitant généralement pas l'arrêt du traitement, de même que l'apparition d'anticorps antinucléaires ne conduisant que rarement à l'apparition d'un syndrome lupique¹⁸⁸.

Il existe toutefois une contre-indication chez les patients atteints de maladies démyélinisantes. En effet l'utilisation d'agents anti-TNF α chez des patients atteints de sclérose en plaques a entraîné l'exacerbation de la maladie¹⁸⁹.

C'est pourquoi avant de débiter tout traitement ciblé anti-TNF α , il est nécessaire de réaliser un bilan biologique afin de valider l'utilisation de ce type de traitement.

D'autres traitements ciblés anti-TNF α ont vu leur développement être stoppé à un stade avancé. En août 2012, AstraZeneca a annoncé l'arrêt du développement du Cytofab,

fragment polyclonal ovin anti-TNF α , qui n'a pas atteint les objectifs fixés lors d'un essai de phase II dans la septicémie sévère¹⁹⁰. Il en va de même pour l'humicade développé par Celltech qui a vu son développement être stoppé suite à un manque d'efficacité lors d'un essai clinique de phase III dans la maladie de Crohn¹⁹¹.

5.1.2. Les traitements ciblés anti-IL-6

➤ Tocilizumab (RoActemra®)

À ce jour, un seul traitement ciblant l'IL-6 a obtenu une autorisation de mise sur le marché. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1, le tocilizumab, dirigé contre les récepteurs de l'IL-6. Il agit en bloquant, par compétition, la fixation de l'IL-6 sur ses récepteurs solubles et membranaires. Cet anticorps monoclonal a tout d'abord été approuvé au Japon en 2005 dans la maladie de Castleman puis en 2008 dans la PR. Il a ensuite été mis sur le marché en 2009 en Europe et en 2010 aux Etats-Unis dans la PR. Enfin, en 2011 il a été approuvé dans le traitement de l'arthrite juvénile idiopathique.

• *Utilisation du tocilizumab dans la polyarthrite rhumatoïde*

Son innocuité et son efficacité dans la PR ont été évaluées dans cinq études internationales de phase III randomisées en double aveugle impliquant au total plus de 4000 patients de plus de 18 ans ayant une PR active¹⁹²⁻¹⁹⁶.

En Europe, son utilisation est indiquée dans le traitement de la PR modérée à sévère, en association avec le MTX en cas de :

- réponse inadéquate ou intolérance à au moins un traitement de fond,
- réponse inadéquate ou intolérance à au moins un antagoniste du TNF α ¹⁹³.

Le tocilizumab peut également être utilisé en monothérapie en cas d'intolérance au MTX, ou lorsque la poursuite du traitement par MTX est inadaptée chez les patients.

Sa posologie est de 8 mg/kg par perfusion intraveineuse d'une heure toutes les quatre semaines.

- *Utilisation du tocilizumab dans l'arthrite juvénile idiopathique*

Le tocilizumab est indiqué chez les patients âgés de deux ans et plus ayant présenté une réponse inadéquate à un précédent traitement par AINS et corticoïdes. Il peut être utilisé en association avec le MTX ou en monothérapie en cas d'intolérance au MTX.

Sa posologie est de 12 mg/kg chez des patients dont le poids est inférieur à 30 kg et de 8 mg/kg chez les patients dont le poids est supérieur ou égal à 30 kg. Il est injecté par voie intraveineuse, toutes les deux semaines.

- *Effets secondaires du tocilizumab*

Les principaux effets secondaires observés suite à l'utilisation du tocilizumab sont des infections fréquentes et notamment des pneumonies avec un facteur de risque plus important chez les personnes âgées de plus de 65 ans ou avec l'utilisation de fortes doses de corticoïdes¹⁹⁷. Des troubles gastriques peuvent également être observés ainsi qu'une élévation transitoire des transaminases hépatiques, rapidement après l'injection de tocilizumab. C'est pourquoi le taux de transaminases doit être fréquemment contrôlé. Enfin, la neutropénie est fréquente mais souvent transitoire¹⁹⁸. Elle intervient également rapidement après l'injection de l'anticorps monoclonal.

- *Comparaison du tocilizumab avec les traitements ciblés anti-TNF α .*

Compte tenu de la récente mise sur le marché du tocilizumab, peu de données sont actuellement disponibles sur son efficacité et son innocuité par rapport aux traitements ciblés anti-TNF α .

Une étude a néanmoins été réalisée au Japon¹⁹⁹ incluant 247 patients atteints de PR, traités soit avec le tocilizumab soit avec des traitements ciblés anti-TNF α (infliximab, etanercept et adalimumab) entre 2003 et 2010. L'étude d'efficacité a permis de mettre en évidence une meilleure efficacité pour le tocilizumab, en prenant en compte les critères DAS 28 ESR (*pour Disease Activity Score 28-Erythrocyte Sedimentation Rate*) et DAS 28 CRP (*pour Disease Activity Score 28-C-reactive protein*). Dans l'analyse d'innocuité, les taux d'effets secondaires sérieux étaient identiques entre les deux groupes. Des pneumonies et des infections des voies urinaires ont été le plus observées pour le groupe traité par des agents

anti-TNF α et des infections des voies urinaires ainsi que des vascularites pour le groupe traité avec le tocilizumab. Cependant, compte tenu de la petite taille du groupe de patients traités avec le tocilizumab comparé à celui traité avec des agents anti-TNF α (n=46 vs n=184) et d'une période de suivi plus courte, d'autres études sont nécessaires pour confirmer l'innocuité du tocilizumab face aux traitements ciblés anti-TNF α .

Une autres étude¹⁹⁸ a mis en évidence des taux d'effets secondaires sévères (engagement du pronostic vital, hospitalisation) identiques (5,7/100 patients/an) avec l'utilisation du tocilizumab ou avec l'utilisation d'inhibiteurs du TNF α .

Enfin, une étude récente²⁰⁰ dont les données ont été présentées à l'EULAR 2012 (congrès annuel de la ligue européenne contre le rhumatisme) a permis de comparer l'efficacité du tocilizumab et de l'adalimumab en monothérapie dans le traitement de la PR. En effet, un tiers des patients présentant une PR reçoivent un traitement ciblé en monothérapie et c'est le premier essai comparant directement un inhibiteur de l'IL-6R à un inhibiteur du TNF α . Cet essai (ADACTA) a été réalisé sur 325 patients n'ayant jamais reçu de traitement ciblé et étant intolérant ou résistant au MTX. Le taux de rémission à la semaine 24 était meilleur dans le groupe de patients traités avec le tocilizumab (39,9 % contre 10,5 %) et les taux d'effets secondaires se sont avérés identiques entre les deux groupes (82,1 % avec le tocilizumab contre 82,7 % avec l'adalimumab). Cependant les changements dans les taux de transaminases et des réductions de neutrophiles étaient plus importants dans le groupe traité avec le tocilizumab. Cette étude permet de mettre en évidence les avantages du tocilizumab par rapport à l'adalimumab en monothérapie dans la PR.

À l'heure actuelle, le tocilizumab est prescrit aux patients après un échec à au moins un traitement ciblé anti-TNF α . Une étude²⁰¹ sur 6 patients réfractaires à une thérapie par un agent anti-TNF α a montré une bonne efficacité du tocilizumab en traitement de seconde intention.

Le tocilizumab est actuellement testé pour d'autres indications thérapeutiques. Un essai clinique de phase III dans la sclérodémie systémique vient de débiter (identifiant clinicaltrials.gov : NCT01532869).

D'autres anticorps monoclonaux anti-IL-6R sont actuellement en développement. Le sarilumab, anticorps monoclonal humain développé par Régénéron et Sanofi, est actuellement testé dans un essai clinique de phase III dans la PR. Il existe également un nanobody® le

ALX-0061 développé par Ablynx qui vient d'être testé en phase I/II dans la PR (NCT01284569). Ces nanobodies® sont issus des camélidés qui possèdent des anticorps fonctionnels dépourvus de chaînes légères. Ils sont constitués d'un domaine variable unique et de deux domaines constants. Ce domaine variable isolé présente une grande stabilité et la capacité de lier l'antigène reconnu par l'anticorps entier. C'est à partir de ces domaines, qui présentent entre 80 et 90 % d'homologie de séquence avec les domaines variables des chaînes lourdes humaines, que sont créés les nanobodies®.

Aucun traitement ciblant directement l'IL-6 n'est actuellement sur le marché. En revanche il en existe plusieurs en développement (**Tableau 5**).

Nom	Société	Type	Stade de développement	Indications
Siltuximab	Centocor	chimérique	Phase II	Cancer de la prostate, maladie de Castleman
Sirukumab	Centocor	humain	Phase II	PR, lupus
ALD518	BMS et Alder	humanisé	Phase II	PR, maladie de Crohn
Olokizumab	UCB	humanisé	Phase II	PR
FM101	Femta	humanisé	Phase I	PR
MEDI5117	Medimmune	humain	Phase I	PR
ARGX-109	Argen-X	humain	Pré-clinique	
VX-30	Vaccinex	humain	Pré-clinique	

Tableau 5 : Liste des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL-6 actuellement en développement.

5.1.3. Les traitements ciblés anti-IL-1

➤ Canakinumab (Ilaris®)

Le canakinumab est un anticorps monoclonal humain de type IgG1 ayant pour cible spécifique l'IL-1 β . Il a été approuvé en 2009 pour le traitement des syndromes périodiques associés à la cryopirine. Ce sont des maladies orphelines qui regroupent le syndrome Muckle-Wells, le syndrome d'urticaire familial au froid et le syndrome chronique, infantile, neurologique, cutané et articulaire (CINCA). Ces maladies sont caractérisées par des mutations permettant une expression continue de la caspase-1 et par conséquent une augmentation de la sécrétion d'IL-1, entraînant l'apparition de symptômes auto-inflammatoires (sans lymphocytes auto-réactifs ni auto-anticorps). Sa posologie est de 150 mg par voie sous-cutanée toutes les 8 semaines chez les patients de plus de 40 kg.

Un essai de phase II est en cours dans le traitement du diabète de type I et dans la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC). Il a également été testé lors d'un essai clinique pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, mais l'étude a été interrompue par manque d'efficacité (NCT00784628).

➤ Anakinra (Kineret®)

L'anakinra est un antagoniste du récepteur de l'IL-1. Il correspond à une forme recombinante humaine de l'IL-1Ra naturel. En se fixant sur l'IL-1RI, il empêche la signalisation de l'IL-1 α et de l'IL-1 β . Il est commercialisé en France depuis 2002 dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde en association avec le MTX. Dans les études cliniques, il a été observé une incidence d'infections graves, en particulier pulmonaires (1,8 %) plus élevée que dans le groupe placebo (0,7 %), notamment chez les patients asthmatiques. Ce traitement a également pour inconvénient d'avoir une demi-vie très courte (6h) et par conséquent de nécessiter des injections quotidiennes.

➤ Riloncept (Arcalyst®)

Le riloncept est une protéine de fusion dimérique (encore appelée IL-1 trap) constituée du domaine extracellulaire du récepteur de type I (IL-1RI) et de la protéine accessoire IL-1RAcP liés à la portion Fc d'une IgG1 humaine. Il bloque à la fois l'IL-1 α et l'IL-1 β . En 2008, la Food and Drug Administration (FDA) a donné au riloncept le statut de médicament orphelin pour le traitement des SPAC mais uniquement pour le syndrome Muckle-Wells et le syndrome d'urticaire familial au froid. Il est également approuvé mais non commercialisé en Europe pour les mêmes indications.

Un essai clinique de phase II vient d'être réalisé²⁰² pour le traitement des fièvres familiales méditerranéennes montrant des résultats prometteurs. Un essai de phase I/II pour le traitement de la sclérodémie systémique va bientôt débiter. Enfin, un essai clinique de phase III de longue durée pour le traitement de la goutte va être réalisé afin de confirmer les bons résultats obtenus en phase II et en phase III de courte durée.

5.1.4. Les traitements ciblés anti-IL-23

➤ Ustekinumab (Stelara®)

L'ustekinumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre la sous-unité p40 partagée par l'IL-12 et l'IL-23. Il a été approuvé en 2009 aux Etats-Unis et en France pour le traitement du psoriasis en plaques, dans les formes modérées à sévères, chez les patients qui n'ont pas répondu ou sont intolérants aux traitements classiques. Trois essais cliniques de phase III ont permis de mettre en évidence son efficacité et son innocuité : PHOENIX 1²⁰³ et PHOENIX 2²⁰⁴ (ustekinumab versus placebo) ainsi que l'essai ACCEPT²⁰⁵ qui a permis de montrer un meilleur taux de réponse clinique chez les patients traités avec l'ustekinumab en comparaison à l'etanercept.

Il est administré par voie sous-cutanée à une dose initiale de 45 mg chez l'adulte. Une seconde injection est réalisée quatre semaines plus tard, suivi d'une injection toutes les douze semaines. Le principal effet secondaire rencontré est l'augmentation du risque d'infection.

Cet anticorps monoclonal est actuellement testé pour d'autres indications, un essai de phase III va en effet bientôt débiter dans la maladie de Crohn. En revanche, un essai de phase II dans la sclérose en plaques a montré une bonne tolérance du traitement mais pas d'efficacité en comparaison avec le groupe placebo²⁰⁶.

D'autres anticorps monoclonaux, spécifiques de la sous-unité p19 de l'IL-23, sont en développement. L'anticorps monoclonal CNTO 1959 (développé par Centocor) va être testé dans un essai de phase II en comparaison avec l'ustekinumab dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et en phase I dans le psoriasis. Un autre anticorps monoclonal, le SCH900222 (développé par Schering-Plough), va être testé en phase III dans le traitement du psoriasis en plaques modéré à sévère (NCT01722331).

5.2. L'immunisation active anti-cytokine

Nous avons décrit dans les paragraphes précédents l'utilisation d'anticorps monoclonaux et de récepteurs solubles dirigés contre des cytokines afin de traiter des maladies inflammatoires chroniques. Ces traitements ciblés ont l'avantage d'induire une protection immédiate mais peuvent entraîner des effets secondaires importants et un certain nombre de contraintes à la fois techniques et financières. Ils doivent être injectés

fréquemment, le plus souvent à l'hôpital, avec un coût pouvant atteindre entre 15 et 20 k€ par an et par patient²⁰⁷. A l'heure actuelle, ces thérapies sont administrées suite à l'échec ou à l'apparition de résistance à un traitement conventionnel. Toutefois, l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de récepteurs solubles anti-cytokine peut conduire à l'apparition d'anticorps dirigés contre ces traitements ciblés, et ainsi les rendre inefficaces. Si l'on prend le cas de la polyarthrite rhumatoïde, 30 % des patients traités par des agents anti-TNF α ne répondent pas aux traitements²⁰⁸. De plus, des anticorps dirigés contre ces traitements ciblés sont retrouvés chez 40 % des patients traités par infliximab et 30 % des patients traités par adalimumab²⁰⁹, ce qui les rend résistants au traitement. Dans cette situation, soit une commutation est réalisée entre des traitements ayant la même cible (anti-TNF α par exemple), soit le traitement est modifié au profit d'une autre cible (IL-6, IL-1).

L'expérience acquise dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques montre qu'il est nécessaire de diversifier l'offre thérapeutique offerte jusqu'à ce jour aux patients en ciblant de nouvelles cytokines ou en développant de nouvelles stratégies d'inhibition.

Dans ce but, une stratégie d'inhibition des cytokines appelée immunisation active anti-cytokine a été développée. En réalité, cette stratégie a été développée et testée chez l'Homme dès 1991²¹⁰, avant même les premiers essais sur les anticorps monoclonaux anti-cytokines. Toutefois, son développement n'a pas été aussi rapide car il fallait faire accepter l'idée de cibler les cytokines et l'idée d'immuniser un patient contre une protéine du « Soi ». En effet, l'immunisation active a pour objectif d'induire la production d'anticorps ciblant la protéine d'intérêt par l'organisme du patient lui-même, afin de neutraliser ses effets biologiques délétères, sans pour autant altérer les conditions physiologiques normales.

5.2.1. Historique

Le principe de rupture de tolérance au « Soi » a été démontré dès les années 1950-1960 en immunisant des animaux avec des antigènes contre lesquels ils sont normalement tolérants²¹¹. Cette rupture de tolérance est obtenue, soit par modification chimique de la protéine du « Soi », soit par son couplage avec une protéine porteuse immunogène. Ce type d'étude a d'ailleurs permis la mise en place de modèles animaux de maladies auto-immunes tels que l'arthrite expérimentale au collagène (utilisation de collagène bovin de type II) ou encore l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (utilisation de la myéline).

Les premiers essais cliniques d'immunisation active anti-cytokine ont été réalisés dans les années 1990 par le Pr. D.Zagury chez des patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine-1 (VIH-1). La surproduction d'IFN α chez les malades pouvait être à l'origine des phénomènes d'immunosuppression observés dans le SIDA. C'est pourquoi un vaccin anti-IFN α a été testé. Une première étude pilote²¹⁰ réalisée sur six patients, traités avec différents composés virologiques et immunologiques, a montré que la stratégie vaccinale anti-cytokine ne présentait pas d'effet toxique. Par la suite, deux essais cliniques de phase I d'immunisation active anti-IFN α ont également montré l'innocuité de cette stratégie et la formation d'anticorps anti-IFN α par les patients traités^{212,213}. Ces études ont abouti à un essai de phase II/III²¹⁴ (étude EURIS) incluant 242 patients sur dix-huit mois qui a permis de confirmer l'innocuité du vaccin avec l'absence d'effet secondaire local et systémique et de confirmer sa bonne immunogénicité. Cet essai a également mis en évidence une augmentation du taux de lymphocytes T CD4⁺ chez les patients traités mais sans pour autant diminuer le taux plasmatique de VIH-1.

Comme, à la même période, les trithérapies ont fait leur apparition et se sont avérées très efficaces, ces dernières ont été adoptées aux dépens de la stratégie d'immunisation active.

Néanmoins, le succès des anticorps monoclonaux anti-TNF α dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, a mis en évidence l'intérêt de cibler les cytokines dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques. Plusieurs équipes se sont ainsi intéressées à l'immunisation active anti-cytokine dans ce contexte. Différentes stratégies ont été mises en place telles que les vaccins à base de cytokine entière, d'ADN de cytokines, ou encore de peptides de cytokines.

5.2.2. Rationnel de la stratégie d'immunisation active anti-cytokine

- ***Cibler des protéines du « Soi » : les cytokines***

Tout d'abord, il est important de préciser qu'il existe, chez des individus sains, des auto-anticorps anti-cytokine naturels tels que des auto-anticorps anti-TNF α ²¹⁵, anti-IL-6²¹⁶ ou encore anti-IL-1 β . Ces auto-anticorps peuvent neutraliser l'activité biologique de leur cytokine correspondante *in vitro*²¹⁷. Ces observations suggèrent que la tolérance immunitaire envers les cytokines n'est pas absolue. Il existe une immunité naturelle anti-

cytokine, avec la présence d'un taux basal d'auto-anticorps potentiellement actifs physiologiquement.

L'immunisation active pourrait donc potentialiser ces effets naturels en augmentant le taux basal d'auto-anticorps, permettant de contrecarrer les effets délétères de la surproduction de certaines cytokines. Il a également été montré que des souris déficientes pour des cytokines, autres que celles impliquées au cours du développement, étaient viables^{64,218}.

De plus, il existe aujourd'hui un recul de plus de dix ans concernant l'utilisation de certains anticorps monoclonaux anti-cytokine, ce qui permet d'affirmer que l'inhibition de ce type de protéine est relativement bien tolérée. Les effets secondaires potentiels sont bien identifiés pour chaque traitement ce qui permet, suivant les profils biologiques des patients, de se tourner vers le type de traitement adapté.

Enfin à ce jour, les études réalisées chez l'animal et chez l'Homme²¹⁹⁻²²² n'ont pas mis en évidence des problèmes majeurs liés à l'utilisation de cette stratégie.

- ***Rupture de la tolérance au « Soi »***

Actuellement, le principal problème est d'arriver à générer une réponse immunitaire suffisamment importante contre des auto-antigènes, en raison du principe de tolérance immunologique. Cependant, cette limitation peut également être un avantage afin de ne pas obtenir une réponse trop forte qui pourrait avoir des effets indésirables sur l'activité normale de l'organisme.

Pour cela, différentes stratégies de vaccination active ont été mises en place afin d'outrepasser la tolérance envers les cytokines. Celles-ci seront décrites ultérieurement dans la partie 5.2.3.

- ***Maintien des conditions physiologiques normales***

Les cytokines agissent localement de façon autocrine et paracrine et rarement de façon systémique, excepté pour le TNF α , l'IL-1 et l'IL-6. Elles sont sécrétées dans la MEC et vont se fixer sur leur récepteur avec une forte affinité, à la surface d'une cellule cible. Ces complexes sont ensuite rapidement internalisés et de nouveaux récepteurs sont synthétisés à la surface de la cellule cible.

En conditions physiologiques normales, le renouvellement lymphatique étant faible, les anticorps produits suite à l'immunisation, présents dans le stroma, sont peu renouvelés.

Lors du processus de sécrétion d'une cytokine, ces anticorps vont être rapidement saturés, ils sont alors incapables de bloquer totalement l'activité de la cytokine nouvellement formée. Ces anticorps libres ne feront au mieux que retarder la fixation de la cytokine sur son récepteur assurant ainsi un maintien des conditions physiologiques normales.

En conditions pathologiques, en cas de surproduction d'une cytokine et de son accumulation dans la MEC, le renouvellement lymphatique va être augmenté. Un meilleur renouvellement des anticorps présents dans le stroma sera alors assuré. En se fixant sur leur cible, ils permettront l'élimination de l'excès de cytokine sans pour autant bloquer totalement son action physiologique normale.

L'idée de vaccination est associée avec la persistance de l'immunité dans le temps. Bien que la persistance des anticorps produits après immunisation active soit plus longue que celle des anticorps monoclonaux, permettant ainsi une diminution de la fréquence d'injection, il a été montré que celle-ci restait transitoire ; les titres diminuant environ au bout de 2-3 mois après le dernier rappel^{222,223}. De plus, une réponse lymphocytaire T à l'encontre de l'antigène du « Soi » n'est pas attendue car ces derniers ont été sélectionnés négativement dans le thymus au cours de leur développement. C'est pourquoi sans rappel, compte tenu de la faible durée de vie des lymphocytes B mémoires, la réponse anticorps est transitoire (**Tableau 6**).

	Immunisation passive	Immunisation active
Principe actif	Anticorps/récepteur soluble	Dérivés cytokiniques
Utilisation	Thérapeutique	Thérapeutique
Type de réponse anticorps	Monoclonale	Polyclonale
Réponse cellulaire	Aucune	Aucune
Induction de l'immunité	Immédiate	3-4 semaines
Déclin des anticorps	3 semaines	Quelques mois
Rappels	1-2/mois	2-4/an
Réponse anti-anticorps	Oui après injections répétées	Non

Tableau 6 : Caractéristiques de l'immunité conférée par les stratégies d'immunisation passive et active.

- *Effets secondaires attendus*

Comme les anticorps anti-cytokine sont produits par l'organisme du patient lui-même, il ne devrait pas apparaître d'anticorps anti-anticorps tels que ceux observés avec l'utilisation de certains anticorps monoclonaux, limitant alors le risque d'échec du traitement.

On ne peut pas présumer d'éventuels effets secondaires avant la réalisation d'essais cliniques. Néanmoins, une récente étude de phase IIa²¹⁹ utilisant un vaccin à base de cytokine entière (le TNF-Kinoïde dans le traitement de la PR chez des patients résistants aux anticorps monoclonaux anti-TNF α) a confirmé le très bon profil d'innocuité de ce dernier. Aucun patient n'a été exclu de l'étude suite à l'apparition d'effet secondaire et aucun effet secondaire majeur n'a été déclaré. De la même façon, l'innocuité de ce vaccin a été confirmée dans un essai clinique de phase II dans le traitement de la maladie de Crohn, portant aujourd'hui à plus de 100, le nombre de patients immunisés avec le TNF-Kinoïde. Ces résultats sont donc encourageants quant à l'innocuité de la stratégie d'immunisation active anti-cytokine chez l'Homme.

- *Coûts*

En raison des petites quantités d'immunogènes nécessaires pour immuniser un patient (entre 100 et 300 μ g par injection utilisés dans les essais cliniques), le coût de fabrication et de traitement d'un vaccin anti-cytokine devrait être moins élevé que ceux des traitements ciblés anti-cytokine actuellement sur le marché.

5.2.3. Stratégies d'immunisation active anti-cytokine

Afin d'induire la production d'auto-anticorps contre les cytokines, il est nécessaire d'activer de façon polyclonale les lymphocytes B qui n'ont pas été sélectionnés négativement et qui sont anergisés. Il est également nécessaire d'outrepasser la tolérance des lymphocytes T envers les auto-antigènes. Pour cela différentes stratégies ont été mises en place.

5.2.3.1. Les vaccins à base de cytokines entières

➤ Couplage à une protéine porteuse

• *Principe*

Les vaccins à base de cytokines entières peuvent être constitués de la cytokine, préalablement inactivée chimiquement, couplée à une protéine porteuse étrangère. Les lymphocytes T vont reconnaître des épitopes de la protéine porteuse présentés par les CPA et sont alors activés. Ils vont pouvoir induire l'activation des lymphocytes B spécifiques de l'auto-antigène, dont l'anergie aura préalablement été levée par le pontage de leur récepteur. Les lymphocytes B vont se différencier en plasmocytes sécrétant d'auto-anticorps spécifiques de la cytokine ciblée (**Figure 12**). Une mémoire immunologique B est alors générée contre l'auto-antigène.

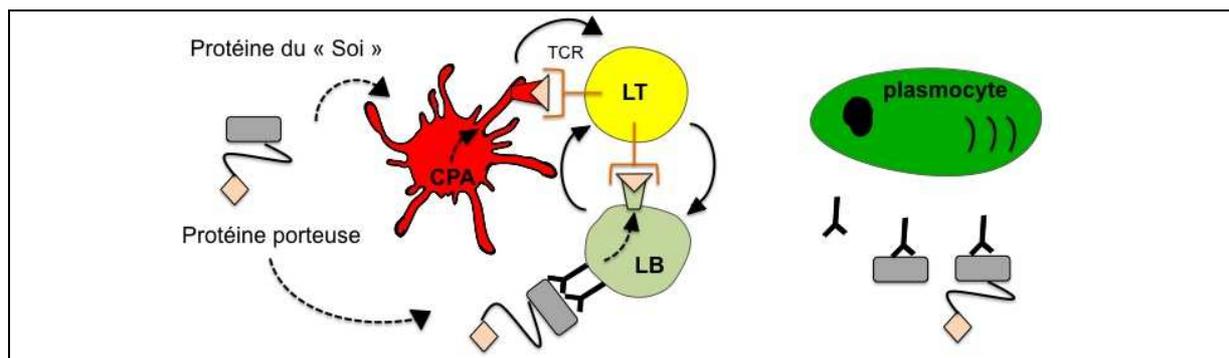


Figure 12: Rupture de la tolérance par couplage de la cytokine entière à une protéine porteuse. Adaptée de Delavallée *et al.*, *Annals of Medicine.*, 2008²²⁴

• *Expérimentations chez l'animal*

Plusieurs types de protéines porteuses ont été utilisés chez l'animal. Parmi elles, on peut citer l'ovalbumine (OVA) ou encore une hémocyanine de mollusque, la Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). En 2000, une équipe belge a montré que des souris immunisées avec de l'IL-9 couplée à l'OVA produisaient des anticorps neutralisant l'activité biologique de la cytokine²²⁵. Ces souris sont devenues susceptibles à l'infection par le nématode *T.muris*, susceptibilité dépendante de l'IL-9. En revanche, elles ont été protégées contre l'éosinophilie induite par le parasite. Utilisant la même protéine porteuse, un vaccin dirigé contre l'IL-17A a permis de protéger des souris de l'EAE²²⁶.

Le couplage avec la KLH a débuté dans les années 1990 par l'équipe du Pr. D.Zagury, le complexe formé étant alors dénommé kinoïde. L'immunisation de souris avec un kinoïde du TNF α humain a entraîné une protection des animaux dans un modèle de choc induit par le TNF α et la galactosamine²²³. Des souris transgéniques pour le TNF α humain, immunisées avec ce même kinoïde, ont été protégées contre le développement d'une arthrite spontanée, même après la déclaration de la maladie²²⁷.

D'autres kinoïdes se sont avérés efficaces tels qu'un kinoïde murin du VEGF dans la prévention de l'angiogenèse tumorale²²⁸ ou de l'IFN α murin dans un modèle de lupus²²⁹.

- *Essais cliniques*

Ces résultats positifs chez l'animal ont donné lieu à des essais cliniques chez l'Homme, menés par la société française Néovacs. Le TNF-kinoïde a été testé dans un essai clinique de phase II dans la maladie de Crohn²²⁰. Ce kinoïde a également été testé dans un essai de phase IIa pour le traitement de la PR²¹⁹ chez des patients ayant tous précédemment reçu au moins un traitement ciblé anti-TNF α . Cette étude a permis de montrer une réduction des symptômes liés à la PR chez les patients ayant développé des anticorps anti-TNF α .

L'IFN α -kinoïde est quant à lui testé dans un essai de phase I/II pour le traitement du lupus érythémateux disséminé (NCT01058343). En revanche, Néovacs n'a pas encore lancé d'essai clinique avec le VEGF-kinoïde.

➤ Insertion d'un épitope T immunodominant

- *Principe*

Une autre possibilité est d'insérer un épitope T étranger immunodominant au sein même de la séquence protéique de la cytokine d'intérêt, afin d'induire l'activation des lymphocytes T auxiliaires (**Figure 13**).

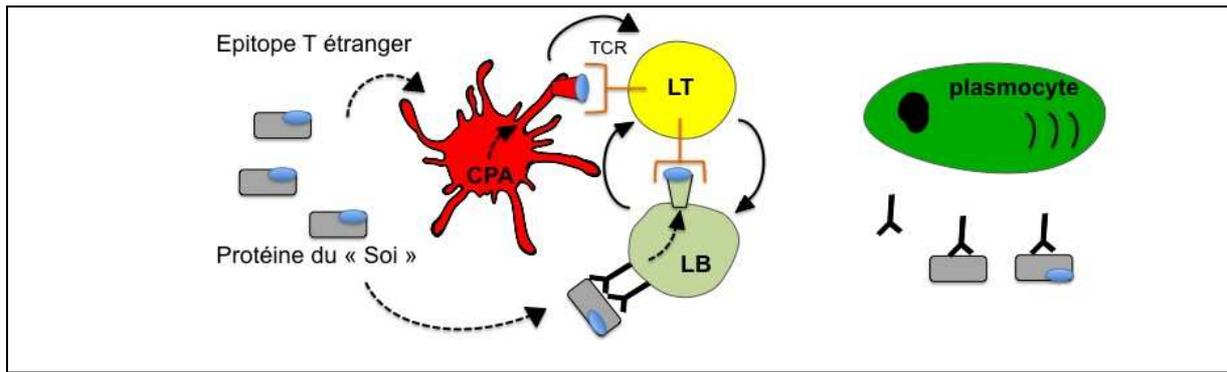


Figure 13 : Rupture de la tolérance par insertion d'un épitope T immunodominant au sein de la séquence protéique de la cytokine ciblée. Adaptée de Delavallée *et al.*, *Annals of Medicine.*, 2008²²⁴.

- **Expérimentations chez l'animal**

Un vaccin dans lequel des segments du TNF α murin ont été remplacés par un épitope immunodominant de l'OVA ou du lysozyme d'œuf (HEL), a entraîné la production d'un fort taux d'anticorps anti-TNF α chez les animaux immunisés²³⁰. Ces anticorps ont permis de protéger les animaux contre une arthrite expérimentale.

De la même façon, l'insertion d'un épitope T dominant de la toxine tétanique, dans deux molécules de TNF α (AutoVaccIne) s'est montré très immunogène chez la souris et capable de conférer une protection face à la progression d'un cancer expérimental²³¹.

Enfin en 2008, l'introduction d'un épitope de la toxine tétanique dans la séquence de la cytokine BLyS²³² a entraîné la production d'anticorps conférant une protection significative dans l'EAE chez des rats immunisés avec ce vaccin.

- **Essais cliniques**

Un essai clinique de phase I a été réalisé avec l'AutoVaccIne, décrit précédemment, dans le traitement du mélanome chez trente-trois patients²³³. Malheureusement les anticorps générés n'étaient capables de reconnaître que le TNF α dénaturé, mais pas le TNF α natif. Par conséquent, l'évaluation de l'innocuité du vaccin et de son efficacité a été compromise.

➤ Couplage à une pseudo-particule virale (VLP)

• **Principe**

Les pseudo-particules virales (VLP pour *Virus Like Particules*) sont des nanoparticules icosaédres. Elles sont constituées de copies multiples d'une ou plusieurs protéines structurales virales qui s'assemblent spontanément en particules dépourvues d'information génétique nécessaire à la capacité répliquative²³⁴. Elles peuvent provenir de sources variées telles que des virus animaux, de plantes ou encore de bactériophages et peuvent être exprimées de manière recombinante dans des bactéries, levures ou cellules d'insectes.

La plupart des vaccins à base de VLPs, utilisés en immunisation active, dérivent du bactériophage Qb qui infecte uniquement *E.coli*, je m'attacherai donc à décrire plus précisément ce type de vaccin.

Les principaux composants sont (**Figure 14**) :

- la capsidite dérivée du bactériophage, composée de 180 monomères,
- l'ARN d'*E.coli* inséré accidentellement dans le VLP lors de l'assemblage des protéines structurales,
- l'agent de couplage qui permet la liaison de l'antigène cible au VLP,
- l'antigène cible,
- et parfois un adjuvant.

Il est à noter que l'ARN simple brin encapsulé fait partie intégrante du VLP. Une fois le VLP internalisé par les CPA, cet ARN simple brin va se fixer aux récepteurs TLR7 et TLR8. Il en résulte une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et par conséquent une stimulation de l'immunité.

L'organisation de la particule permet le couplage répété et organisé de multiples copies de l'auto-antigène cible que ce soit une cytokine entière ou un peptide de cytokine, favorisant alors la stimulation de l'activité des lymphocytes B anergisés.

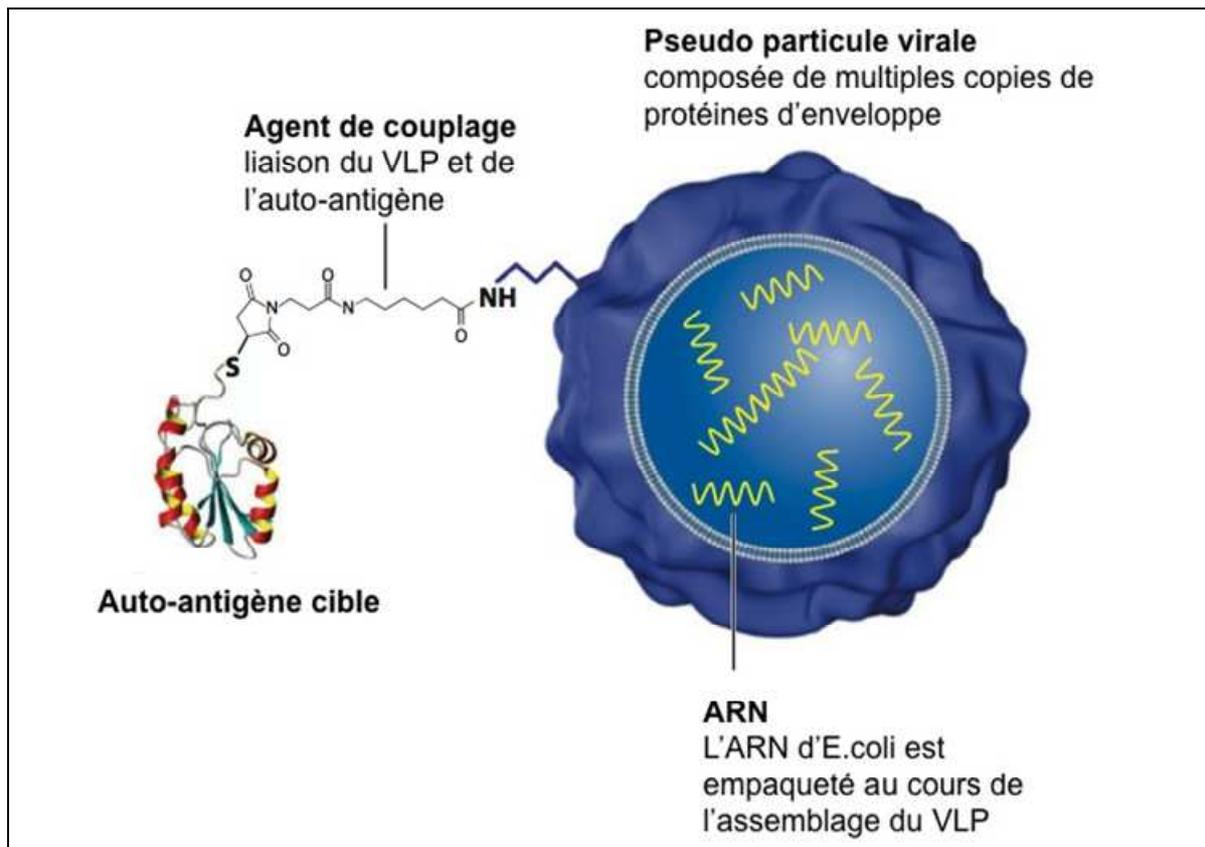


Figure 14 : Principaux constituants d'un vaccin à base de VLP : la pseudo particule virale, l'ARN d'*E.coli* encapsulé, l'agent de couplage et l'auto-antigène cible. Adaptée de Jennings *et al.*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2009²³⁴.

- **Expérimentations chez l'animal**

Des souris immunisées avec la forme extracellulaire de la protéine RANKL couplée au VLP Qb ont produit de forts taux d'anticorps contre la cytokine entière sans l'ajout d'adjuvant²³⁵. Ces anticorps ont été capables de neutraliser l'activité biologique de RANKL *in vitro* et également de prévenir la perte osseuse dans un modèle d'ostéoporose.

Un vaccin formé par l'IL-17 couplée au VLP Qb a permis de protéger des souris contre l'EAE et contre l'arthrite expérimentale au collagène²³⁶. Le couplage de la cytokine entière TNF α , d'un peptide du TNF α ²³⁷ ou encore de l'IL-1 β ²³⁸ au VLP Qb, a permis de protéger des souris contre l'arthrite expérimentale au collagène.

- **Essais cliniques**

Plusieurs essais cliniques, utilisant des vaccins anti-cytokine à base de VLP, ont été menés par la société Cytos Biotechnology, en partenariat avec l'industrie pharmaceutique. Un

essai de phase I/IIa utilisant un vaccin à base d'IL-1 β couplée au VLP Qb, sur 48 patients pendant un an, a montré une bonne tolérance du vaccin, avec la production d'anticorps neutralisant la cytokine *in vitro* (NCT00924105). D'autres vaccins utilisant l'IL-17 et le TNF α sont actuellement à un stade de développement préclinique.

5.2.3.2. Les vaccins à base d'ADN de cytokines

- **Principe**

Une autre méthode d'immunisation active anti-cytokine consiste à administrer un plasmide contenant une séquence d'ADN codant pour la cytokine ciblée ainsi que des séquences CpG (Cytosine-phosphate-Guanine). Il en résulte la génération d'une réponse mémoire contre le produit du gène. Le mécanisme de rupture de tolérance avec cette méthode n'est pas entièrement compris. L'hypothèse actuelle est que les cellules transfectées avec ce plasmide produisent la protéine du « Soi » qui va être reconnue par le BCR des lymphocytes B. De plus, ces lymphocytes B auto-réactifs peuvent être directement transfectés par le plasmide dont les séquences CpG vont se fixer aux TLR9, induisant ainsi leur activation. Une autre hypothèse est l'activation des lymphocytes T par les CPA transfectées avec le plasmide qui vont ensuite permettre l'activation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques de l'auto-antigène (**Figure 15**).

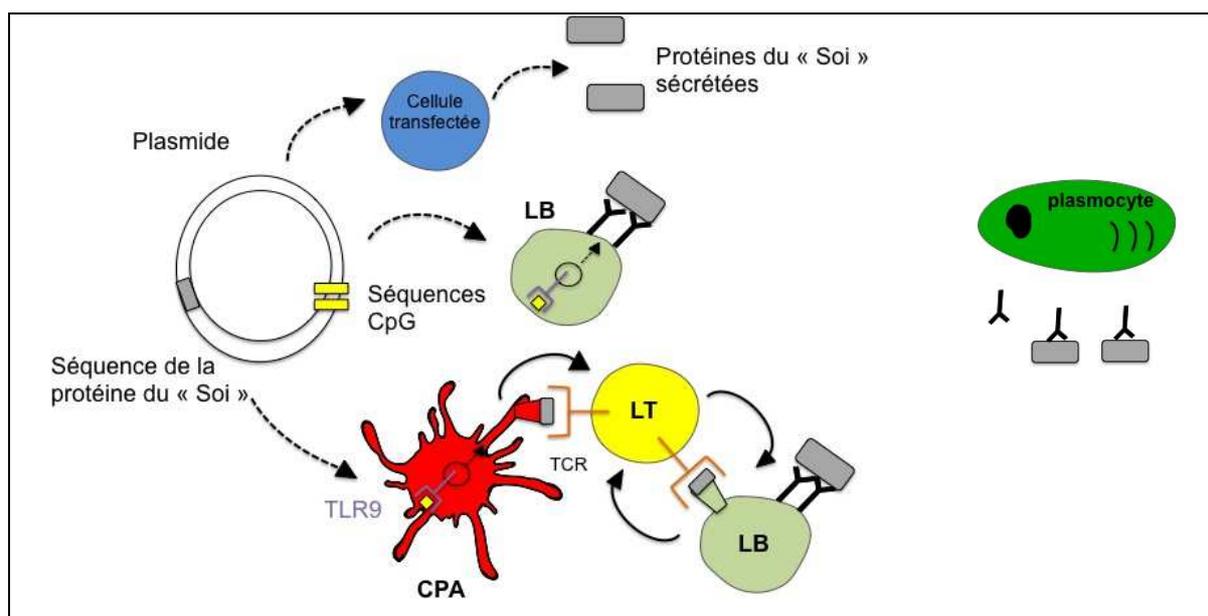


Figure 15 : Rupture de la tolérance par transfection d'un plasmide codant pour la cytokine ciblée. Adaptée de Delavallée *et al.*, *Annals of Medicine.*, 2008²²⁴.

- ***Expérimentations chez l'animal***

De nombreuses études ont montré l'efficacité de cette approche. On peut par exemple citer l'administration d'un ADN codant pour l'IL-18 chez des souris atteintes d'un syndrome lupique²³⁹. Les souris immunisées ont développé des anticorps dirigés contre l'IL-18 et ont montré une réduction de la production d'IFN γ , de même qu'une réduction du nombre de glomérulonéphrites et de dommages rénaux.

Une étude réalisée avec un plasmide codant pour le TNF α humain a été réalisée dans un modèle d'arthrite induite au collagène²⁴⁰. L'administration du vaccin a entraîné une réduction du gonflement des articulations, une réduction du nombre de cellules inflammatoires au niveau du synovium ainsi qu'une réduction du TNF α dans le sérum.

D'autres essais ciblant cette fois-ci des chimiokines telles que MIP-1 α et MCP-1 (pour *Monocyte Chemotactic Protein-1*) ont permis de prévenir le développement de l'EAE^{241,242}.

Cependant, bien que cette approche soit séduisante, elle utilise l'immunité cellulaire T ce qui pourrait poser des problèmes d'innocuité si une mémoire immunologique T était établie contre l'auto-antigène.

À ce jour, aucun essai clinique n'a été réalisé avec des vaccins ADN anti-cytokine.

5.2.3.3. Les vaccins à base de peptides de cytokines développés au laboratoire

➤ Description de mon laboratoire d'accueil

Mon laboratoire d'accueil, le laboratoire Génomique, Bioinformatique et Applications du Conservatoire National des Arts et Métiers dirigé par le Pr. Jean-François Zagury, est constitué d'une équipe pluridisciplinaire qui s'appuie sur la bio-informatique afin de développer de nouveaux médicaments. Il est composé :

- d'un groupe de génomique qui tente 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,
- d'un groupe travaillant dans le domaine de la modélisation moléculaire et dans la conception de petites molécules (*drug design*). Ils essaient notamment de développer des petites molécules anti-cytokine par criblage *in silico*,

- d'un groupe expérimental travaillant sur le développement de la stratégie d'immunisation active à base de peptides de cytokines afin de traiter les maladies inflammatoires chroniques, que j'ai intégré.

➤ Les vaccins à base de peptides de cytokines

Une alternative à l'utilisation de cytokines entières est l'utilisation de peptides de cytokines couplés à une protéine porteuse. C'est la stratégie actuellement développée au sein du laboratoire qui repose sur l'analyse de la structure des cytokines afin d'identifier des peptides d'intérêt. Leur capacité à induire, après immunisation, la production d'anticorps anti-cytokine ayant un effet protecteur est évaluée expérimentalement.

- ***Innocuité de l'approche***

L'utilisation de peptides de cytokines permet de cibler un faible nombre d'épitopes contrairement à l'approche par cytokine entière. Les auto-anticorps produits sont oligoclonaux et non polyclonaux. Le risque de reconnaître de façon non-spécifique d'autres protéines du « Soi » pourrait donc être diminué.

Lors d'une vaccination contre une protéine du « Soi », il est impératif d'éviter l'activation de lymphocytes Th spécifiques de l'antigène qui pourraient stimuler de façon continue et irréversible les lymphocytes B. Il en résulterait une production continue d'auto-anticorps. Cette rupture de tolérance T a déjà été observée lors d'un essai de phase IIa utilisant un vaccin peptidique de la β -amyloïde (42 acides aminés) en combinaison avec un adjuvant dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Au cours de cet essai, 6 % des patients traités ont développé une méningo-encéphalite due à l'activation de lymphocytes Th spécifiques du peptide²⁴³. Par l'utilisation de peptides de cytokines, composés d'un petit nombre d'acides aminés, on limiterait le risque de présence d'épitopes T et l'activation d'une immunité non désirée, contrairement à une immunisation utilisant la cytokine entière. L'absence de lymphocytes T auto-réactifs devra cependant être confirmée dans les futures études menées avec ce type d'approche.

De plus, les réponses cellulaires B spécifiques sont transitoires et réversibles. Sans aide de la part des lymphocytes T, l'antigène cible ne permet pas la stimulation en continu de la production d'anticorps. Les cellules B mémoires, en l'absence de l'aide des lymphocytes T ne répondent pas à une stimulation antigénique et finissent par mourir en 2-3 mois.

- ***Description des composants constituant un vaccin peptidique***

Les peptides de cytokine

Idéalement, l'ensemble des anticorps générés contre les peptides devrait reconnaître de façon croisée la cytokine entière. Cependant, dans la majorité des cas, les anticorps dirigés contre des peptides se fixent avec une forte affinité à ces derniers, mais ne se fixent que faiblement à la protéine entière dont ils dérivent.

Les peptides sont choisis au niveau de parties de la cytokine situées à sa surface afin de permettre l'accessibilité aux anticorps²⁴⁴. Les peptides sélectionnés correspondent généralement à un coude ou une boucle dans la protéine repliée²⁴⁵.

La taille des peptides semble être un facteur important dans la génération d'anticorps reconnaissant la cytokine entière. Une étude réalisée sur 35 peptides de taille variable, couplés à la protéine porteuse KLH, a montré que les peptides inférieurs à 10 acides aminés n'étaient pas capables d'induire une réponse anticorps contrairement aux peptides de taille supérieure²⁴⁶. C'est pourquoi, nous utilisons dans notre approche des peptides de taille supérieure à 10 acides aminés.

Le rôle de la stabilité structurale du peptide est également majeur. C'est pourquoi, nous choisissons nos peptides de cytokines au niveau des boucles, la conservation structurale étant plus importante pour ce type de structure que pour les autres. En effet, la structure d'une boucle dépend moins des éléments environnants (contrairement à un brin β par exemple). Le rôle de la stabilité structurale est également illustré par différentes études montrant une augmentation de la reconnaissance de la protéine entière²⁴⁷ et une plus forte affinité par les anticorps générés²⁴⁸ lorsque des ponts disulfures sont incorporés dans les peptides. De plus, il a été montré qu'un épitope conformationnel a une probabilité très faible d'être retrouvé dans un peptide linéaire issu d'une protéine entière, mais il peut être reconstitué en cyclisant un peptide situé sur une boucle de la protéine native entière²⁴⁹. C'est pourquoi, l'ensemble des peptides utilisés dans le cadre de nos expérimentations a été cyclisé par un pont disulfure soit à l'aide de deux cystéines incluses dans la séquence peptidique, soit par l'ajout d'une ou deux cystéines en N ou en C-terminal. Nous avons observé au laboratoire une meilleure immunogénicité des peptides cycliques comparés à leurs équivalents linéaires pour des peptides du TNF α et de l'IL-1 β ^{222,250}.

Utilisation d'une protéine porteuse

Comme pour toutes les approches précédemment décrites, le problème majeur lié à l'approche d'immunisation active à base de peptides de cytokines est de lever la tolérance existante à l'encontre de ces peptides, qui ne sont pas ou peu immunogènes lorsqu'ils sont utilisés seuls chez un hôte autologue.

Pour cela, nous avons choisis au laboratoire de coupler ces peptides de cytokines avec une protéine porteuse, la KLH, qui va permettre l'activation des lymphocytes Th qui en retour vont stimuler l'activation des lymphocytes B. Celle-ci présente notamment l'avantage de pouvoir lier un plus grand nombre d'antigènes par rapport aux autres protéines porteuses fréquemment utilisées (**Tableau 7**). De plus, son utilisation en clinique est autorisée par les autorités internationales de santé, c'est donc une protéine de choix dans le but de produire un vaccin administrable à l'Homme. Toutefois, il faut tenir compte du fait que des anticorps sont produits à l'encontre de la KLH, ce qui peut entraîner le développement d'une réaction allergique dirigée contre cette protéine par le patient. Une telle réaction pourra être facilement détectée par un test cutané, et ainsi valider la poursuite ou non du traitement.

	KLH	OVA	BSA
Origine	Mollusques	Blanc d'oeuf	Bovins
Poids moléculaire (Da)	$4,5 \times 10^5$ à $1,3 \times 10^7$	$6,7 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
Nombre d'amines primaires accessibles	200-300	30-35	5-15

Tableau 7 : Comparaison des propriétés des différentes protéines porteuses couramment utilisées. Le couplage du peptide à la protéine porteuse se fait par les amines primaires. C'est pourquoi, la KLH permet le couplage d'un plus grand nombre d'auto-antigènes en comparaison avec l'OVA et l'albumine de sérum bovin (BSA).

Utilisation d'un adjuvant vaccinal

Afin d'avoir une réponse immunitaire suffisamment forte pour obtenir un effet protecteur, la composition vaccinale que nous utilisons contient des adjuvants vaccinaux. L'adjuvant vaccinal peut avoir plusieurs effets possibles sur la réponse immunitaire face à un antigène. Il peut tout d'abord modifier sa présentation au système immunitaire, entraîner son

relargage progressif et le protéger contre une dégradation hépatique rapide et contre les protéases sériques²⁵¹. Il peut également stimuler l'activité phagocytaire des CPA. Si l'adjuvant vaccinal contient des éléments d'origine bactérienne, comme c'est le cas pour l'adjuvant complet de Freund (CFA), il pourra stimuler la réponse immunitaire innée via l'activation des PRR, mais également stimuler l'activation de lymphocytes T spécifiques d'épitopes des mycobactéries²⁵². Il favorisera ainsi la création d'un environnement inflammatoire.

Nous utilisons actuellement dans nos compositions vaccinales du CFA lors de la primo-immunisation chez la souris et l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) lors des rappels.

Cependant l'utilisation de CFA peut s'accompagner de complications importantes telles que l'apparition d'abcès, de granulomes, de nécrose cutanée ou encore de symptômes arthritiques. L'IFA peut provoquer des lésions comparables, au niveau du site d'injection, même s'il n'a pas les effets toxiques systémiques du CFA.

Coût

L'utilisation de peptides de cytokines, en immunisation active, constituerait une approche peu onéreuse. En effet, la production de peptides de petite taille par synthèse chimique est une technologie peu coûteuse et maîtrisée, de même que leur couplage avec la protéine porteuse KLH. Cette approche serait notamment beaucoup moins onéreuse que la production d'anticorps monoclonaux, de récepteurs solubles, ou encore de kinoïdes.

Cette stratégie pourrait donc potentiellement fournir des traitements plus abordables que ceux actuellement présents sur le marché.

➤ Contexte scientifique

Trois précédentes études menées par notre laboratoire ont validé la faisabilité de l'immunisation active à base de peptides de cytokines.

Dans une première étude publiée en 2004 par Capini *et al.*²⁵⁰, l'immunisation de souris contre des peptides dérivés du TNF α couplés à la KLH a induit la production d'anticorps dirigés contre la cytokine entière. De plus, des souris immunisées contre l'un des peptides, ont été protégées suite à l'induction d'un choc hépatique au LPS/D-galactosamine dépendant du TNF α . Une seconde étude menée sur des peptides de l'IL-1 β par Bertin-Maghit *et al.*²²² en

2005, a permis d'identifier plusieurs peptides permettant la production d'anticorps anti-cytokine qui se sont avérés protecteurs dans un modèle d'arthrite au collagène.

Enfin, une étude plus récente publiée en 2011 par Ratsimandresy *et al.*²²¹ utilisant des peptides de la sous-unité p19 de l'IL-23, couplés à la protéine porteuse KLH, a montré que l'immunisation des souris contre l'un d'entre eux était efficace dans un modèle d'arthrite au collagène.

Aucun vaccin à base de peptides de l'IL-6 n'était encore en développement et compte-tenu de l'intérêt de cette cytokine dans l'inflammation, il était souhaitable de travailler sur cette approche. En effet, l'IL-6 étant impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, elle constituait une cible thérapeutique de choix. De plus, un anticorps monoclonal anti-IL-6R venait d'être mis sur le marché confirmant l'intérêt de cibler cette cytokine.

Aucune stratégie d'immunisation active dirigée contre l'IL-6 n'était arrivée à un stade de développement avancé. Une méthode de vaccination constituée d'un variant de l'IL-6 humaine, Sant1²⁵³, avait été décrite. Celle-ci avait montré une efficacité chez des souris transgéniques pour l'hIL-6, mais ces travaux ne semblent pas avoir donné lieu à un développement clinique. Par ailleurs, la vaccination de souris à l'aide de mutants de l'IL-6 murine avait permis d'obtenir une réponse immunitaire protectrice vis-à-vis de l'arthrite induite par le collagène ou de l'EAE²⁵⁴. Toutefois, ces travaux ne semblent pas non plus avoir donné lieu à un développement clinique.

6. Objectifs de ma thèse

Dans le contexte de mon arrivée au Laboratoire GBA, précédemment décrit, je me suis donc vue confier deux projets de recherche : l'un sur le développement d'un vaccin peptidique contre l'IL-6, l'autre sur la poursuite du développement du vaccin peptidique contre l'IL-1 β qui avait montré une efficacité dans le modèle murin d'arthrite au collagène²²².

Mes objectifs précis de thèse étaient donc les suivants :

- Identifier des peptides murins dérivés de l'IL-6 en collaboration avec l'équipe de *drug design*,
- tester leur capacité à induire la production d'anticorps anti-peptide reconnaissant également la cytokine entière à la fois chez la souris et le lapin,

- mettre au point des tests d'activité de l'IL-6 *in vitro* et évaluer la capacité des anticorps produits à neutraliser l'activité biologique de la cytokine dans ces tests,
- tester l'effet protecteur potentiel de l'immunisation active contre les peptides les plus immunogènes dans des modèles murins de maladies inflammatoires,
- si possible valider la faisabilité de l'approche chez le singe,
- reprendre le développement du peptide dérivé de l'IL-1 β , qui avait été interrompu, en développant de nouveaux modèles murins et en travaillant sur son équivalent humain (immunogénicité, mise au point d'un test de neutralisation pour la cytokine humaine).

B. Matériels et Méthodes

1. Sélection, synthèse et couplage des peptides de cytokine

1.1. Sélection

En collaboration avec l'équipe *drug design*, les peptides ont été sélectionnés selon les informations structurales contenues dans une banque de données, la Protein Data Bank²⁵⁵ (PDB). En ce qui concerne les peptides de l'IL-6 murine, la structure de l'IL-6 murine étant indisponible au début de l'étude, la sélection des peptides a été réalisée à partir de la structure tridimensionnelle du complexe IL-6 humaine/IL-6R α /gp130 (code PDB : 1P9M). Les cytokines IL-6 murine et humaine ayant une identité de séquence supérieure à 40 %, les équivalents murins des peptides sélectionnés à partir de la cytokine humaine devraient posséder des propriétés structurales et fonctionnelles équivalentes. Ces propriétés ont pu être vérifiées en 2011 après la publication de la structure murine de l'IL-6 (code PDB : 2L3Y).

Les peptides ont été choisis au niveau de boucles de la cytokine. La structure boucle étant la seule, à partir de peptides, qu'il est aisé de mimer afin de se rapprocher de la structure native. Pour cela, les peptides sont cyclisés par le biais de deux cystéines soit pré-existantes, au sein de leur séquence, soit ajoutées aux extrémités N et C-terminales. En se rapprochant au mieux de la structure native du peptide, nous pouvons espérer que les anticorps générés contre ce dernier puissent également reconnaître la cytokine entière. De plus, ces boucles sont exposées à la surface de la protéine, elles sont ainsi accessibles aux éventuels anticorps produits suite aux immunisations.

Certains peptides sont constitués d'acides aminés directement impliqués dans l'interaction de la cytokine avec son récepteur. Cependant, cette condition n'est pas obligatoire pour la sélection des peptides. Un anticorps produit suite aux immunisations pourra également empêcher la liaison de la cytokine à son récepteur par encombrement stérique.

1.2. Synthèse

La synthèse des peptides a été confiée à la société Polypeptide Laboratories (Strasbourg, France). Les peptides ont été assemblés en phase solide en utilisant la stratégie Fmoc/ter-butyl, où le premier acide aminé est chargé sur de la résine Wang.

Les peptides ont été synthétisés sur des synthétiseurs automatiques NPS selon les étapes suivantes de couplage/déprotections des acides aminés : 1/ DMF (Diméthylformamide) 3x30 secondes, 2/ Pipéridine 25 % dans DMF 3x3 minutes, 3/ DMF 6x30 secondes, 4/

Couplage/DMF 1x15 minutes, 5/ Couplage/DMF 1x15 minutes. Les couplages sont effectués en DMF avec cinq équivalents en acide aminés en présence de PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate), HOBt (hydroxybenzotriazole) et DIEA (Diisopropylethylamine). Le DMF est un solvant polaire aprotique, facilitant les réactions qui suivent des mécanismes polaires telles que celles mises en jeu lors de la synthèse peptidique. La pipéridine permet de libérer la fonction amine, protégée par le groupement protecteur Fmoc (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl), permettant ainsi le couplage de l'acide aminé suivant. Le PyBOP est un agent de couplage. Le HOBt est un suppresseur de racémisation, phénomène qui conduit à l'apparition de peptides épimères qui diminuent le rendement de couplage. Le DIEA est une amine tertiaire qui permet également de limiter la racémisation. Lors de l'étape finale, les peptides sont entièrement déprotégés et clivés de la résine par un traitement à l'acide trifluoroacétique en présence de *scavengers* tels que l'eau, le phénol, l'éthanedithiol et le thioanisole. Ces *scavengers* permettent de protéger les peptides des carbocations (intermédiaires réactionnels) formés lors du clivage qui pourrait entraîner des réactions non désirées. Les peptides sont ensuite précipités dans de l'éther t-butyl méthylique et lyophilisés.

L'étape suivante est la purification des peptides par chromatographie liquide haute performance (HPLC pour *High-Performance Liquid Chromatography*), le gradient étant réglé en fonction de l'hydrophobicité du peptide. Seules les fractions ayant une pureté supérieure à 85 % sont rassemblées avant d'être à nouveau lyophilisées. Enfin, les peptides sont analysés par HPLC analytique et par spectrométrie de masse (electrospray) pour s'assurer de leur composition et de leur pureté.

1.3. Couplage

Nous avons choisi de coupler les peptides à la protéine porteuse par leurs extrémités terminales afin de conserver au mieux la structure d'origine et ainsi maximiser la présentation des épitopes.

Les différents peptides ont été couplés à la protéine porteuse KLH via deux agents de couplage principalement utilisés au laboratoire, le Bis-Diazo-Benzidine (BDB) et le glutaraldéhyde (GA). Ces méthodes de couplage sont reconnues comme étant efficaces et peu coûteuses. Selon la composition en acides aminés des peptides de cytokine sélectionnés, le couplage est effectué soit à l'aide du BDB soit du GA²⁵⁶.

- Couplage des peptides à la KLH par le Bis-Diazo-Benzidine (BDB) : Les amines libres du peptide sont préalablement protégées par de l'anhydride citraconique à pH 8,5-9. La solution de BDB est préparée en incubant pendant 2 heures à 4°C de la benzidine, de l'acide chlorhydrique et du nitrate de sodium. Le couplage est ensuite réalisé en mélangeant les peptides, la KLH et la solution de BDB dans un tampon borate pendant 2 heures à 4°C. Deux dialyses contre de l'acide acétique 5 % sont réalisées afin de déprotéger les amines puis quatre dialyses contre du Phosphate Buffer Saline (PBS) stérile sont réalisées pour la purification finale.

- Couplage des peptides à la KLH par le glutaraldéhyde (GA) : dans un tampon KH_2PO_4 , les peptides, la KLH et le GA à 1 % (ou 0,1 % si le peptide comporte des résidus lysine) sont incubés pendant une heure. La réaction est stoppée par l'ajout de NaBH_4 puis le mélange est agité pendant 1 heure de plus. Quatre dialyses contre du PBS sont effectuées afin de réaliser la purification finale.

Suivant l'extrémité où est effectué le couplage avec la protéine porteuse, l'extrémité libre subit soit une acétylation (N-terminale) soit une amidation (C-terminale). Les peptides sont ainsi plus résistants aux dégradations enzymatiques par les aminopeptidases et les carboxypeptidases.

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

2.1. Protocole d'immunisation

Dans un premier temps, des immunisations ont été réalisées chez la souris afin d'évaluer l'immunogénicité des peptides sélectionnés. Cette étape nous a permis d'identifier les meilleurs candidats peptides à tester dans les différents modèles animaux.

De J-5 à J0, des groupes de 4 souris OF1 (Oncin France 1, Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) par peptide sont acclimatées dans l'animalerie Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique (EOPS) de l'Institut Cochin. À J0, une primo-immunisation est réalisée par injection intramusculaire de peptides (100 µg/souris) couplés à la KLH, émulsionnés dans 50 µl d'adjuvant complet de Freund (CFA, Sigma-Aldrich, réf : F5881). Trois rappels aux jours 14, 28 et 42, sont effectués par injection intramusculaire de peptides couplés à la KLH (100 µg/souris), émulsionnés dans 50 µl d'adjuvant incomplet de Freund (IFA, Sigma-Aldrich,

réf : F5506) (**Figure 16**). Des souris injectées uniquement avec de la KLH servent de contrôle négatif.

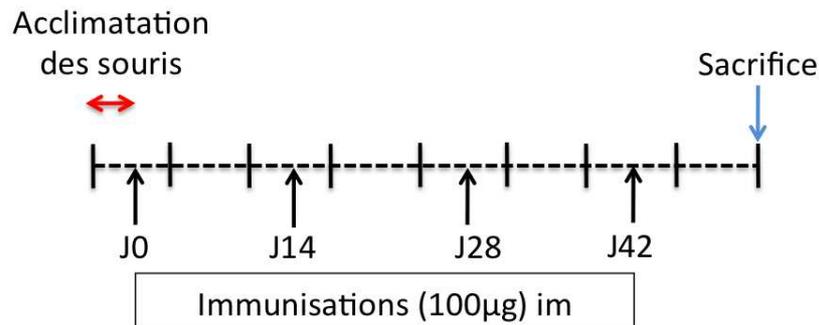


Figure 16: Protocole d'immunisation des souris OF1 contre des peptides dérivés de cytokines.

2.2. Sacrifice des souris

À J52, les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de 1 mg/ml de kétamine et de 10 mg/ml de xylazine (10 µl du mix par gramme) fourni par l'animalerie. Une ponction intracardiaque est réalisée, puis les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les tubes contenant le sang sont incubés à température ambiante (TA) pendant 30 minutes afin de permettre la coagulation. Le sérum est ensuite récupéré par deux centrifugations successives du sang à 14000 rpm (rotation par minute) pendant 10 minutes. Les sérums obtenus sont ensuite congelés à -80°C.

3. Études de l'immunogénicité des peptides chez le lapin

Nous avons décidé d'évaluer l'immunogénicité et la capacité neutralisante des anticorps produits chez un hôte hétérologue : le lapin. En effet, l'immunisation de lapin permet de récupérer une quantité de sérum plus importante que chez la souris, qui pourra être purifiée en vue de la réalisation de tests *in vitro*. Les immunisations ainsi que la purification des sérums ont été confiées à la société BIOTEM (Lyon, France).

3.1. Protocole d'immunisation

À J0, un prélèvement de sérum pré-immun est réalisé suivi d'une primo-immunisation par injection intradermique de peptides couplés à la KLH (150 µg/lapin) émulsionnés en CFA.

À J14, J28, J56 et J70, un rappel est effectué par voie sous-cutanée avec 150 µg de peptides couplés, émulsionnés en IFA. À J82, les animaux sont sacrifiés et le sérum prélevé.

3.2. Purification des sérums de lapin

Les sérums de lapin sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de protéines A et G (les protéines A et G, extraites de la paroi des bactéries *Staphylococcus aureus*, retiennent préférentiellement les IgG). Après élution, les anticorps purifiés sont stérilisés par filtration, aliquotés puis stockés à -20°C dans un tampon phosphate 10 mM-NaCl/0,15 M-pH 7,4.

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

Afin d'estimer la concentration relative, le titre₅₀, des anticorps anti-peptide ou anti-cytokine induits chez des animaux immunisés contre des peptides de cytokine, nous avons réalisé des ELISAs (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays) directs.

Pour cela des plaques de titration 96 puits Nunc à fond plat (Dutscher, réf : 442404) sont recouvertes avec 50 ng de cytokine ou 100 ng de peptide non couplé par puits dans 100 µl de PBS, puis incubées une nuit à 4°C.

Le lendemain les plaques sont lavées puis saturées avec 150 µl/puits d'un tampon PBS contenant 2 % m/v (masse/volume) de Sérum Albumine Bovine ou BSA (Sigma-Aldrich, réf : A7030) pendant 2 heures à TA. Après cette étape de saturation, les plaques sont lavées et incubées avec les sérums à différentes dilutions dans 100 µl/puits de PBS/BSA 1 % pendant 2 heures à TA.

Les plaques sont de nouveau lavées puis mises en présence d'anticorps secondaires anti-IgG couplés à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxidase) (P.A.R.I.S, anti-IgG souris réf : BI2413C – anti-IgG lapin réf : BI2407) à raison de 100 µl/puits au 1/500^{ème}, pendant 2 heures à TA.

Après un dernier lavage, la révélation est effectuée avec 100 µl/puits d'un substrat chromogène, le TMB (pour 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich, réf : T8665). Elle est ensuite stoppée avec 50 µl/puits d'une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) 1M (Sigma-Aldrich, réf : 258105). La densité optique est lue sur un spectrophotomètre (lecteur de plaques Thermo Scientific, modèle : Multiskan Ex) à 450 nm.

Toutes les étapes de lavage préalablement citées sont réalisées 2 fois avec 250 µl/puits d'un tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich, réf : P3563).

Le titre₅₀ est déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Titre}_{50} = \frac{1}{\text{dilution donnant 50\% du signal maximal}}$$

Le titre₅₀ d'un échantillon donne une valeur relative du taux d'anticorps anti-peptide ou anti-cytokine présents dans l'échantillon testé.

3.4. Neutralisation de l'activité de l'IL-6 par les anticorps purifiés de lapin

Le test de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 est le même que la cytokine soit d'origine murine ou humaine. Il se base sur la capacité de l'IL-6 à induire de façon dose-dépendante la prolifération d'hybridomes murins (lignée B9).

3.4.1. Entretien des cellules B9

Les cellules sont mises en culture dans des flasques 75 cm² traitées pour la culture cellulaire (Dutscher, réf : 137787) contenant 10 ml de milieu de culture renouvelé 2 fois par semaine auxquels sont ajoutés 50 pg/ml de cytokine IL-6 humaine (R&D Systems, réf : 206-IL), nécessaires à leur prolifération.

Le milieu de culture est constitué de milieu RPMI 1640 (pour *Roswell Park Memorial Institute*) (Dutscher, réf : P04-16500) avec rouge de phénol complété à 5 % v/v (volume à volume) de sérum de veau fœtal ou SVF (Dutscher réf : 3302-P272405), 2 mM de L-Glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 50 µM de β-mercaptoéthanol (Dutscher, réf : P07-05100). Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, elles sont récupérées et centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min. Une fraction variable (1/5^{ème} généralement) est remise en suspension dans du milieu complet neuf dans une nouvelle flasque.

3.4.2. Test de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 murine et humaine

Mise en plaque (J0) : Une plaque 96 puits à fond plat, traitée pour la culture cellulaire, estensemencée avec 5000 cellules par puits dans 50 µl de milieu de neutralisation. Les cellules sont préalablement rincées deux fois en milieu de neutralisation afin d'éliminer l'IL-6 humaine ajoutée initialement dans le milieu de culture.

Le milieu de neutralisation est identique au milieu de culture excepté le RPMI 1640 qui est dépourvu de rouge de phénol (Dutscher, réf : P04-16515).

En parallèle, une plaque dite de pré-incubation à fond rond est réalisée en incubant les échantillons à tester avec 2 pg/ml d'IL-6 murine ou 3,5 pg/ml d'IL-6 humaine dans un volume final de 100 µl de milieu de neutralisation. Un anticorps commercial anti-IL-6 est utilisé comme contrôle positif de neutralisation (R&D Systems, réf. humain: AF-206-NA, réf. murin : AF-406-NA).

La plaque de pré-incubation est laissée 2 heures à 37°C. 50 µl par puits sont ensuite transférés sur les puits correspondants de la plaque contenant les cellules, puis cette dernière est incubée 96 heures à 37°C, 5 % CO₂. Les effets de bord sont évités en n'utilisant que le centre des plaques et en remplissant les puits en bordure avec 200 µl de tampon PBS.

Révélation (J4) : Afin d'évaluer la prolifération cellulaire, 50 µl d'une solution de XTT (pour 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) - 0,5 % electron coupling reagent (Roche, réf : 11465015001) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée 5 heures à 37°C. En effet, grâce à une de leur enzyme mitochondriale, les cellules viables métabolisent le XTT en un composé soluble : le formazan (couleur orange), dont la densité optique peut ensuite être lue à 450 nm sur un spectrophotomètre.

Détermination du pourcentage de neutralisation : on appelle « pourcentage de neutralisation », la capacité neutralisante d'un échantillon (sérum, anticorps purifiés) pour une concentration en cytokine donnée.

3.5. Neutralisation de l'activité biologique de l'IL-1β humaine par les anticorps purifiés de lapin

Le test de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-1β humaine se base sur la capacité de l'IL-1β à induire de façon dose-dépendante la sécrétion de phosphatase alcaline

par les cellules HEK-Blue™ IL-1β (pour *Human Embryonic Kidney*) (InvivoGen, réf : hkb-tnfill) après une incubation de 24 heures.

3.5.1. Entretien des cellules HEK-Blue™ IL-1β

Les cellules HEK-Blue™ IL-1β utilisées dans ce test sont générées par transfection stable des cellules HEK293 avec le gène rapporteur de la phosphatase alcaline, sous le contrôle d'un promoteur minimal de l'IFNβ fusionné à cinq sites de fixation de NF-κB.

Les cellules sont mises en culture dans des flasques 75 cm² traitées pour la culture cellulaire (Dutscher, réf : 137787) contenant 12 ml de milieu de culture renouvelé 2 fois par semaine auxquels sont ajoutés 100 µg/ml de Zeocin™ (InvivoGen, réf : ant-zn-1). L'ajout de Zeocin™ permet de sélectionner les cellules transfectées avec le plasmide codant pour la phosphatase alcaline.

Le milieu de culture est constitué de milieu DMEM (pour *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Dutscher, réf : P04-03500) avec rouge de phénol complémenté à 10 % v/v de SVF (Dutscher réf : 3302-P272405), 2 mM de L-Glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml de Normocin™ afin d'éviter les contaminations (InvivoGen, réf : ant-nr-1). Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, elles sont récupérées et centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min. Une fraction variable (1/20^{ème} généralement) est remise en suspension dans du milieu de culture neuf, dans une nouvelle flasque.

3.5.2. Test de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-1β humaine

Mise en plaque (J0) : Une plaque 96 puits à fond plat, traitée pour la culture cellulaire, estensemencée avec 50000 cellules par puits dans 100 µl de milieu de neutralisation.

Le milieu de neutralisation est identique au milieu de culture excepté le DMEM qui est dépourvu de rouge de phénol (Dutscher, réf : P04-01161).

En parallèle, une plaque dite de pré-incubation à fond rond est réalisée en incubant les échantillons à tester avec 320 pg/ml d'IL-1β dans un volume final de 200 µl de milieu de neutralisation. Un anticorps commercial anti-IL-1β humaine est utilisé comme contrôle positif de neutralisation (R&D Systems, réf : AF-201-NA).

La plaque de pré-incubation est laissée 2 heures à 37°C. 100 µl par puits sont ensuite transférés sur les puits correspondants de la plaque contenant les cellules, puis cette dernière

est incubée 24 heures à 37°C, 5 % CO₂. Les effets de bord sont évités en n'utilisant que le centre des plaques et en remplissant les puits en bordure avec 200 µl de tampon PBS.

Révélation (J1) : Pour chaque puits, 20 µl de surnageant des cellules stimulées par l'IL-1β sont ajoutés dans 180 µl d'une solution de QUANTI-Blue™ (InvivoGen, réf : rep-qb1). La plaque est ensuite incubée 3 heures à 37°C puis la densité optique est lue à 620 nm sur un spectrophotomètre. Le QUANTI-Blue™, en présence de phosphatase alcaline change de couleur en virant du rose au bleu. Un contrôle de la viabilité cellulaire est réalisé par un test au XTT. Le pourcentage de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-1β est ensuite déterminé.

4. Expérimentations *in vivo*

Les modèles murins de sclérodermie systémique ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Pr. Allanore à l'animalerie de la Faculté dentaire de Montrouge et le modèle d'EAE a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. Liblau au Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan. L'étude chez le macaque cynomolgus a été effectuée en collaboration avec le Pr. Quintin-Colonna (ENVA, Maisons-Alfort) chez CitoxLab à Evreux.

4.1. Étude de l'efficacité de l'immunisation active anti-IL-6 dans un modèle murin de sclérodermie systémique

4.1.1. Induction de la fibrose par injection de bléomycine

Des souris DBA/2 mâles et femelles (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) sont injectées tous les deux jours (J0 à J21) avec 100 µl de bléomycine (Pharmacie centrale, Hôpital Cochin, France), à une concentration de 0,5 mg/ml, dissoute dans du NaCl 0,9 %. Les injections sont réalisées par voie sous-cutanée au niveau d'une zone prédéfinie de 1 cm² située dans la partie dorsale haute de l'animal. Des injections sous-cutanées de 100 µl de NaCl 0,9 % ont servi de contrôle négatif.

4.1.2. Immunisations avec un peptide couplé dérivé de l'IL-6 murine

Les souris ont été immunisées quatre fois à J-31, J-17, J-3 et J11 par injections intramusculaires du peptide mIS200 (100 µg/souris) couplé à la KLH ou de KLH seule (200 µg/souris). La primo-immunisation a été effectuée en CFA et les rappels en IFA. Plusieurs groupes ont été constitués (**Tableau 8**) :

Traitements		Effectif
Intramusculaire	Sous-cutanée	
mIS200	BLM	17
KLH	NaCl	11
KLH	BLM	15

Tableau 8 : Description des groupes de souris. Les effectifs finaux sont indiqués.

Un contrôle négatif a été réalisé, les souris ont été immunisées avec 200 µg/souris de KLH et ont reçu des injections sous-cutanées de NaCl. Un contrôle positif a été réalisé afin de déterminer l'effet de la KLH sur l'induction du modèle. Ces souris ont été immunisées avec 200 µg/souris de KLH puis ont reçu des injections sous-cutanées de BLM. Enfin un groupe de souris traitées a été immunisé contre le peptide mIS200 et a reçu des injections de BLM par voie sous-cutanée.

Toutes les cages comprennent au moins une souris de chaque groupe afin d'éviter les effets de cages. Le protocole expérimental est décrit dans la **figure 17**.

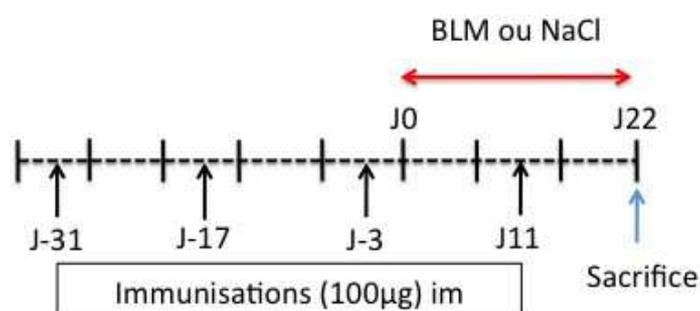


Figure 17 : Protocole expérimental pour la prévention de la fibrose induite par la BLM. Les souris sont immunisées 4 fois à J-31, J-17, J-3 et J11 et reçoivent à partir de J0 une injection de BLM ou de NaCl tous les deux jours par voie sous-cutanée. A J22, les souris sont sacrifiées. im : intramusculaire.

4.1.3. Traitement avec un anticorps monoclonal anti-IL-6R

Des souris DBA/2 ont reçu à J0 une injection intrapéritonéale de 2 mg d'un anticorps monoclonal anti-IL-6R de souris (clone MR16-1, IgG1 de rat) fourni par Roche Chugai Pharmaceuticals, suivie d'une injection de 1 mg toutes les semaines pendant trois semaines (**Figure 18**). Un anticorps purifié de rat IgG1 a été utilisé comme contrôle négatif (MP biomedical, réf : 55951).

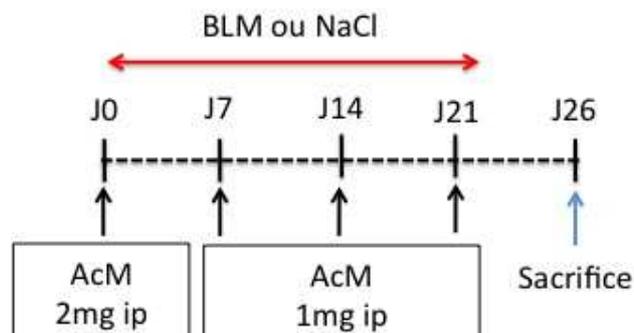


Figure 18 : Protocole expérimental pour la prévention de la fibrose induite par la bléomycine. Les souris reçoivent à J0 une première injection de 2 mg d'anticorps par voie intrapéritonéale (ip) du MR16-1, suivi d'une injection de 1 mg toutes les semaines. En parallèle, à partir de J0, elles reçoivent tous les deux jours des injections de BLM ou NaCl par voie sous-cutanée.

Trois groupes ont été constitués (**Tableau 9**), 2 groupes de souris ayant reçu l'isotype contrôle, par voie intrapéritonéale, puis des injections sous-cutanées de NaCl ou de BLM. Un groupe ayant reçu des injections de l'anticorps monoclonal anti-IL-6R, par voie intrapéritonéale, puis des injections sous-cutanées de BLM.

Traitements		Effectifs
Intrapéritonéale	Sous-cutanée	
MR16-1	BLM	13
Isotype contrôle	BLM	13
Isotype contrôle	NaCl	12

Tableau 9 : Description des groupes de souris constitués afin de tester l'efficacité d'un anticorps monoclonal anti-IL-6R dans le modèle de sclérodémie systémique à la BLM.

4.1.4. Sacrifice des souris

Après trois semaines d'injections de bléomycine, les souris sont euthanasiées au CO₂. Dans un premier temps une ponction intracardiaque est réalisée. Les souris sont ensuite placées en décubitus ventral et la zone d'injection de bléomycine de 1 cm² est rasée puis délicatement sectionnée au scalpel. Une première moitié de cette zone est utilisée pour l'histologie. Cinq biopsies sont réalisées sur l'autre moitié, à l'aide de punch de 3 mm de diamètre (Kai medical, réf : LCH-PUK-30). Ces biopsies sont ensuite conservées en azote liquide le temps de l'expérimentation, avant d'être congelées à -80°C. Le sérum est récupéré par deux centrifugations successives du sang à 14000 rpm pendant 10 minutes. Ce dernier nous permettra de déterminer par ELISA direct la production d'anticorps anti-cytokine.

4.1.5. Caractérisations histologique et immunohistochimique

Traitements des échantillons de peau pour inclusion

Chaque échantillon récupéré est fixé 24 heures dans du formaldéhyde 36 % (Merck, réf : 1.0400.2500) dilué extemporanément à 4 % dans du PBS 1X. Il est ensuite transféré dans de l'éthanol 70° avant inclusion en paraffine. Des coupes de 5 µm sont réalisées au microtome de façon sériée et mises sur lames.

Quantification du collagène par dosage de l'hydroxyproline

Le contenu en collagène est mesuré à partir d'échantillons de peau lésionnelle par dosage de l'hydroxyproline. Celle-ci représente environ 13 % des acides aminés du collagène et son dosage est utilisé comme reflet de sa production²⁵⁷.

Le contenu en collagène est évalué pour 2 biopsies par souris et les manipulations sont réalisées en duplicats.

Dans un premier temps une hydrolyse acide est réalisée avec 500 µl d'HCl (Merck) par biopsie, pendant 3 heures à 120°C afin de libérer les différents acides aminés par rupture des liaisons peptidiques.

L'hydrolyse est stoppée par l'ajout de 10 µl de MéthylRED 0,02 % (Carl Roth GmbH, réf : T120.2) et de 490 µl de NaOH 6M (Prolabo). Le pH est ensuite ajusté à 7.

Les échantillons, ainsi qu'une gamme d'hydroxyproline (Sigma, réf : H5877), sont ensuite incubés avec du Chloramine T 0,06 M (Sigma, réf : C9887) pendant 20 minutes à TA

permettant l'oxydation de l'hydroxyproline. Enfin 125 µl d'acide perchlorique (Sigma Aldrich, réf : 311421) et de 4-(Diméthylamino)benzaldéhyde (DMABA) (Fluka, réf : 39070) sont ajoutés dans chaque échantillon puis incubés 20 minutes à 60°C. La production de dérivés pyrroliques va donner avec le DMABA une coloration rose dont l'absorbance est mesurée à 560 nm avec un spectrophotomètre à microplaques Spectra MAX 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Coloration Trichrome de Masson

La coloration Trichrome de Masson permet une analyse qualitative de la quantité de collagène présente dans le derme, l'intensité de la coloration des tissus augmentant avec le contenu en collagène. Elle est réalisée en complément du dosage de l'hydroxyproline. Elle associe une coloration nucléaire (hématoxyline), une coloration cytoplasmique (ponceau-fuschine) et une coloration des fibres de collagène (bleu d'aniline).

Coloration Hématoxyline-Eosine (HE)

La coloration HE consiste à utiliser une coloration bichrome permettant de visualiser les noyaux des cellules (hématoxyline) ainsi que le cytoplasme et les fibres de collagène (éosine).

Après déparaffinage au xylène (Merck) puis réhydratation par des bains successifs d'éthanol de concentrations décroissantes (98 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 % puis eau), une coloration HE a été réalisée. Les lames (une par prélèvement) sont plongées pendant 10 minutes dans un bain d'hématoxyline (Merck) suivi d'un bain d'1% HCl, 70 % isopropanol pendant quelques secondes. Elles sont ensuite rincées à l'eau courante pendant 10 minutes. Une coloration à l'éosine (Sigma-Aldrich) est ensuite effectuée pendant 3 minutes. Les lames sont enfin rapidement rincées puis déshydratées par passage dans des alcools de concentrations croissantes suivi d'un bain de xylène. Le montage est effectué par apposition d'une lamelle sur chaque lame, fixée à l'aide d'un baume d'inclusion (Carl Roth GmbH, réf : T160.2).

Évaluation de l'épaisseur dermique

Pour chaque souris, l'épaisseur dermique est mesurée en aveugle par deux observateurs indépendants. Les mesures sont effectuées au niveau de cinq sites différents sur une coupe colorée à l'hématoxyline-éosine. L'épaisseur dermique correspond à la distance

entre la jonction épiderme/derme et derme/hypoderme. Toutes les photos sont réalisées avec un microscope optique (x100).

Détection des myofibroblastes par immunohistochimie

Les myofibroblastes sont identifiés par coloration de l' α -Smooth Muscle Actin (α SMA)²⁵⁸. Comme pour la coloration HE, les lames sont déparaffinées puis réhydratées par des bains d'éthanol de concentrations décroissantes. Les lames sont ensuite lavées à l'aide d'une solution tampon (PBS 1X) puis 150 μ l de sérum de veau fœtal à 10 % sont appliqués sur chaque lame afin de bloquer les sites de liaison non-spécifiques.

Les anticorps primaires anti- α SMA (clone 1A4 ; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) sont ajoutés à une dilution de 1/1000^{ème} pendant 3 heures à TA. Une étape de blocage des peroxydases endogènes est réalisée en ajoutant 150 μ l de H₂O₂ à 0,3 % sur chaque section. Les lames sont ensuite lavées au PBS 1X. Les anticorps secondaires polyclonaux de lapin dirigés contre la souris, couplés avec l'enzyme HRP (Dako, réf : P0260), sont ajoutés au 1/200^{ème} dans du PBS/BSA 2 % pendant 1 heure à TA à l'abri de la lumière.

En présence de l'enzyme HRP et d'eau oxygénée H₂O₂, le chromogène diaminobenzidine (DAB) produit un précipité brun. Pour la révélation, 150 μ l d'une solution contenant 0,5 % de DAB, 0,5 % de H₂O₂ à 3 % et 90 % de PBS sont déposés sur chaque section pendant 10 minutes. Le montage est effectué par apposition d'une lamelle sur chaque lame, par fixation à l'aide d'un baume d'inclusion (Merck, réf : 1.08562.0050).

Pour chaque souris, le nombre de myofibroblastes est déterminé au niveau de six sites différents sur une coupe. La couleur brune indique un marquage positif et permet d'évaluer de manière semi-quantitative la proportion de cellules marquées et de comparer les marquages entre eux. Toutes les photos sont réalisées avec un microscope optique (x200) et les comptages par deux examinateurs en aveugle.

4.2. Étude de l'efficacité de l'immunisation active anti-cytokine dans un modèle murin de sclérose en plaques

4.2.1. Induction de l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

Des souris femelles C57BL/6, âgées de 8 semaines (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) sont immunisées par voie sous-cutanée, à la base de la queue, avec 100 µg de peptide MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (Polypeptides Laboratories), émulsifié en CFA. Deux injections de toxine pertussique (Coger, Paris) sont ensuite réalisées par voie-intraveineuse à J0 (200 ng) et J2 (400 ng) après immunisation. La sévérité de la maladie est évaluée chaque jour à partir de l'induction de la maladie, jusqu'au sacrifice, suivant l'échelle de score suivante : 0 : absence de signe clinique, 1 : atonie de la queue, 2 : faiblesse des pattes postérieures, 3 : paralysie totale des pattes postérieures, 4 : tétraplégie, 5 : décès de l'animal. Une moyenne des scores est ensuite calculée pour chaque groupe de souris représentant un traitement.

4.2.2. Immunisations des souris contre des peptides de cytokines

Afin de tester l'effet protecteur des peptides couplés mIL-1β6 (IL-1β), mIS200 (IL-6) et m2K (IL-23) dans un modèle d'EAE, trois groupes (un par peptide) de 10 souris sont immunisés quatre fois à J-50, J-36, J-22 et J-8 par voie intramusculaire, à raison de 100µg/souris. Les groupes contrôles sont composés de 10 souris immunisées avec de la KLH seule (200 µg/souris) et de 10 souris immunisées avec du PBS. Toutes les immunisations ont été réalisées en IFA. Le protocole de l'étude est décrit dans la **figure 19**.

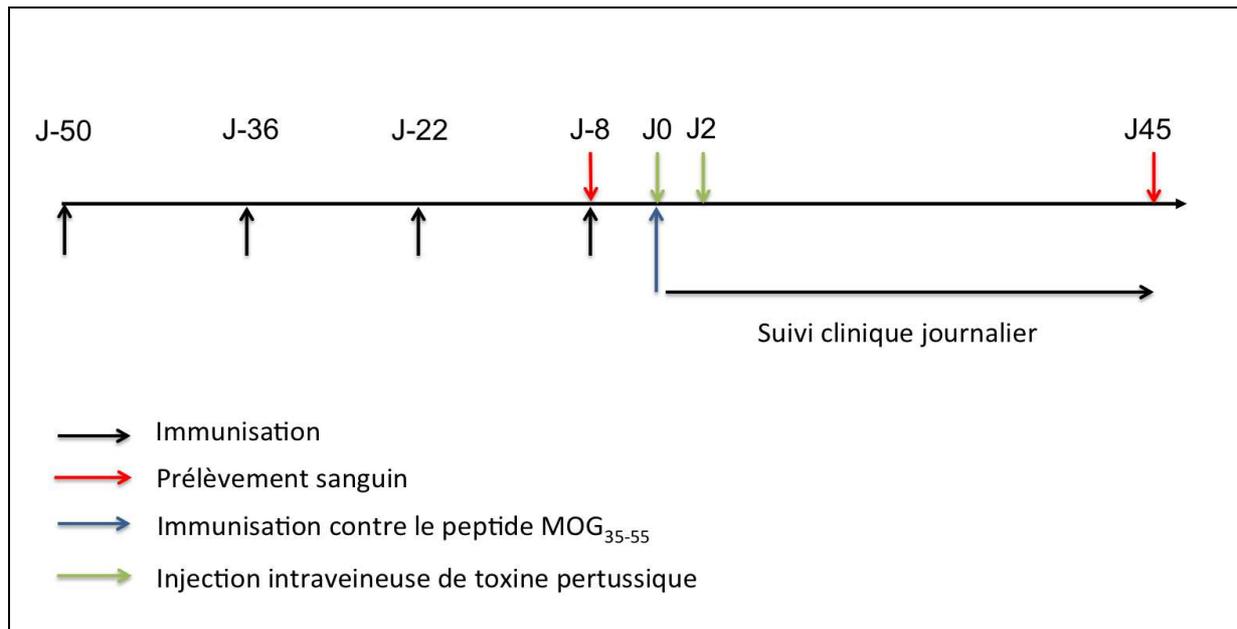


Figure 19 : Protocole du modèle d'EAE réalisé chez la souris C57BL/6.

4.3. Étude d'immunogénicité et de toxicité chez le macaque cynomolgus

4.3.1. Animaux

L'étude est réalisée sur 12 macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) hébergés chez CitoxLab à Evreux. Ces singes proviennent de l'établissement Nafovanny (Tam Phuoc Hamlet, Long Thanh District, Donc Nai, Vietnam). Chez l'éleveur, ces singes ont été traités contre les parasites arthropodes et les helminthes et ont été soumis à un programme de détection de la tuberculose. Après leur transfert à CitoxLab, les singes ont été placés au moins quatre semaines en quarantaine au cours de laquelle ces analyses ont été de nouveau effectuées.

4.3.2. Période d'acclimatation et identification des animaux

Les animaux sont acclimatés aux conditions de l'étude pendant une période de 13 jours avant le début du traitement. Au cours de cette période un nombre de singe supérieur à celui nécessaire pour l'étude est acclimaté pour permettre ensuite la sélection des animaux ou leur remplacement.

Durant la période d'acclimatation, le nombre d'animaux nécessaire est sélectionné d'après les résultats des examens cliniques. Les groupes sont ensuite randomisés suivant le sexe et le poids des animaux. Au début de l'étude, une micro-puce est implantée en sous-

cutané chez chaque animal afin d'automatiser leur identification. Un numéro unique leur est attribué.

4.3.3. Immunisation des singes

Protocole d'immunisation

Trois groupes de 4 singes ont été constitués. Le premier groupe a été immunisé contre le peptide hIS200 (100 % d'identité entre la séquence humaine et macaque) couplé à la KLH, le second immunisé contre la KLH seule et le troisième contre un peptide contrôle.

Une primo-immunisation est réalisée à J1 par injection intramusculaire des peptides couplés à la KLH (150 µg/singe), émulsionnés en Montanide (Seppic, ISA 51 VG). À J15, J30, J45 et J76, quatre rappels sont effectués (**Figure 20**). Un volume constant de 300 µl par animal est injecté.

Prélèvements sanguins

Différents prélèvements sanguins ont été réalisés au cours de l'étude. Un prélèvement pré-immun à J-8 et un prélèvement à J1 avant l'administration des traitements. Un prélèvement toutes les 2 semaines a ensuite été réalisé jusqu'à la fin de l'étude, soit un total de 9 prélèvements. Le sang est centrifugé afin de récupérer le sérum qui est ensuite congelé à -80°C. Ces derniers nous permettront de déterminer par ELISA direct la production d'anticorps anti-cytokine et de doser par ELISA sandwich l'IL-6 sérique (kit U-Cytech, réf : CT145).

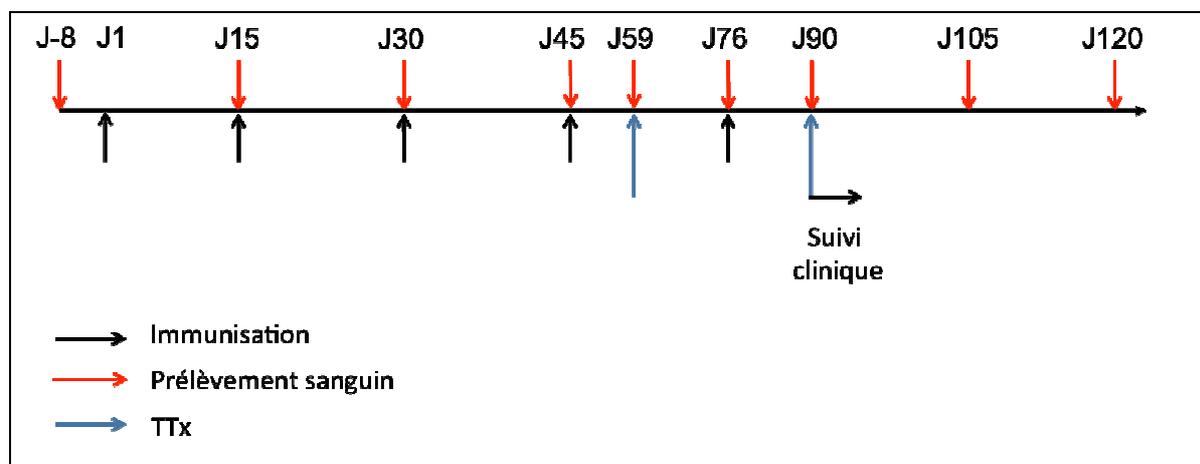


Figure 20 : Protocole de l'étude d'immunogénicité et de toxicité réalisée chez le macaque cynomolgus.

Protocole de purification des sérums de singes

Les sérums de singes sont purifiés de la même façon que les sérums de lapin NZW (paragraphe 3.2)

La capacité des anticorps purifiés à neutraliser l'activité biologique de l'IL-6 est évaluée dans le test de neutralisation *in vitro* réalisé sur la lignée cellulaire B9, précédemment décrit dans le paragraphe 3.4.

4.3.4. Induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée

Au cours de cette étude, nous avons évalué la capacité des anticorps produits, suite à l'immunisation active contre le peptide hIS200, à moduler la réaction inflammatoire locale suite à l'induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée contre le vaccin tétanique Pasteur (TTx)²⁵⁹.

Pour cela, le vaccin tétanique Pasteur constitué de 40 UI de toxine tétanique + 0,6 mg d'aluminium hydroxyde (Sanofi Pasteur) est administré par injection intramusculaire (0,5 ml) dans la cuisse à J59. Un rappel intradermique est réalisé à J90 en injectant 0,05 ml de vaccin dans le dos de l'animal.

Les signes cliniques de la réaction cutanée aux sites d'injection sont évalués une fois par jour pour chaque animal avant le rappel puis 24, 48 et 72h après. Ces mesures sont réalisées en aveugle, par des expérimentateurs initiés à la méthode d'évaluation des scores (**Tableau 10**).

Score	Erythème	Epaissement
1	Erythème très léger (à peine perceptible)	Léger
2	Erythème bien défini	Modéré
3	Erythème modéré	Sévère
4	Erythème sévère (rouge écarlate) avec formation d'escarre	-

Tableau 10 : Score clinique de la réaction inflammatoire cutanée aux sites d'injections.

Toutes autres formes de lésions telles que des nodules sont notées.

4.3.5. Examens cliniques

La mortalité et les signes de morbidité sont vérifiés pour chaque animal au minimum deux fois par jour. De la même façon, l'apparition de rougeurs ou de nodules suite aux immunisations contre les peptides sont évalués. De plus, le poids de chaque singe est déterminé une fois par semaine, tout au long de l'étude. Enfin, la température rectale est mesurée aux semaines 7 et 11 avant et après immunisation contre les peptides.

C. Résultats

1. Approche d'immunisation active anti-IL-6

1.1. Peptides dérivés de l'IL-6 murine

1.1.1. Sélection des peptides

Selon la méthodologie mise au point au laboratoire (décrite dans la partie 1.1 de la section matériels et méthodes), cinq peptides dérivés de l'IL-6 murine ont été sélectionnés puis synthétisés par la société Polypeptides Laboratories (**Figure 21**). Leurs séquences sont présentées dans le **tableau 11**.

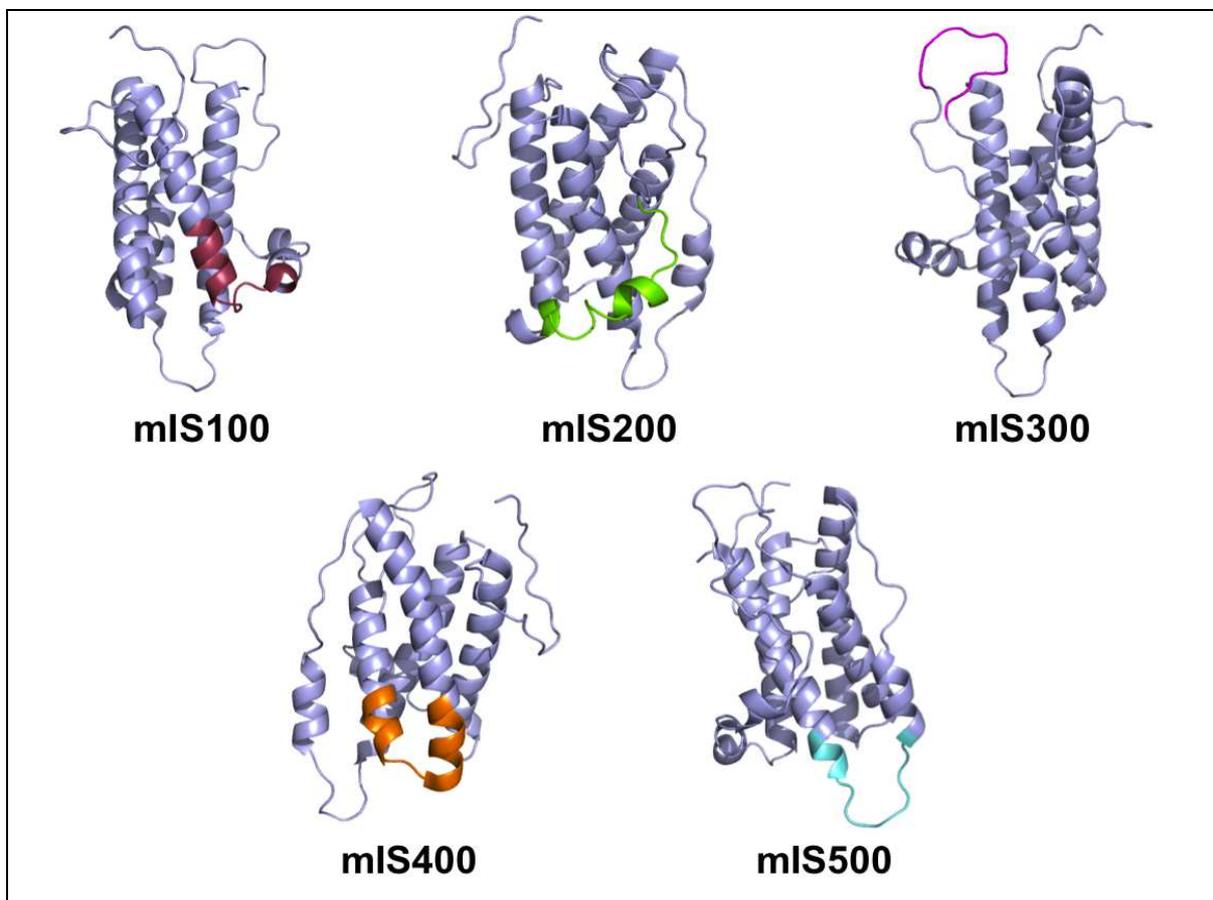


Figure 21 : Peptides murins dérivés de l'IL-6.

Nom du peptide	Séquence du peptide	Agent de couplage
mIS100	Y – E ₆₁ IVEMRKELCNGNSD ₇₅ C _{+Amide}	BDB
mIS200	Acétyl+ C ₇₆ MNNDDALAENNLKLPE ₉₂ C – Y	BDB
mIS300	C ₉₉ YQTGYNQEIC _{109+Amide}	Glu
mIS400	Y – C E ₁₂₅ F MKNNLKDNNKDKAR ₁₄₀ C _{+Amide}	BDB
mIS500	Acétyl+ D ₁₇₆ KCESQKEWLRT K ₁₈₈ C – Y	BDB

Tableau 11 : Peptides dérivés de l'IL-6 murine sélectionnés. L'agent chimique utilisé pour le couplage à la protéine porteuse KLH est précisé. **C** : cystéines utilisées pour la cyclisation, **C** : cystéines non contenues dans la séquence d'origine. **Y** : tyrosines ajoutées pour le couplage par le BDB. Les acides aminés sont annotés à partir de la séquence Swissprot P08505 (mIL-6).

1.1.2. Étude de l'immunogénicité des peptides couplés dérivés de la cytokine IL-6 murine chez un hôte autologue

Pour étudier la capacité des peptides sélectionnés à induire la production d'anticorps anti-peptide et anti-cytokine, des souris OF1 femelles (n=4) ont été immunisées contre les différents peptides dérivés de l'IL-6 murine couplés à la KLH. 100 µg de peptide par souris, émulsionnés en CFA, ont été injectés lors de la primo-immunisation. Trois rappels ont ensuite été effectués, avec 100 µg de peptide par souris, émulsionnés en IFA. Dix jours après le dernier rappel, une ponction intra-cardiaque a été réalisée et les sérums récupérés. Ils ont ensuite été testés en ELISA direct afin d'évaluer d'une part, la production d'anticorps dirigés contre le peptide (**Figure 22a**) et d'autre part, la production d'anticorps dirigés contre la cytokine entière (**Figure 22b**). Les résultats, exprimés en titre₅₀, sont récapitulés dans le **tableau 12**.

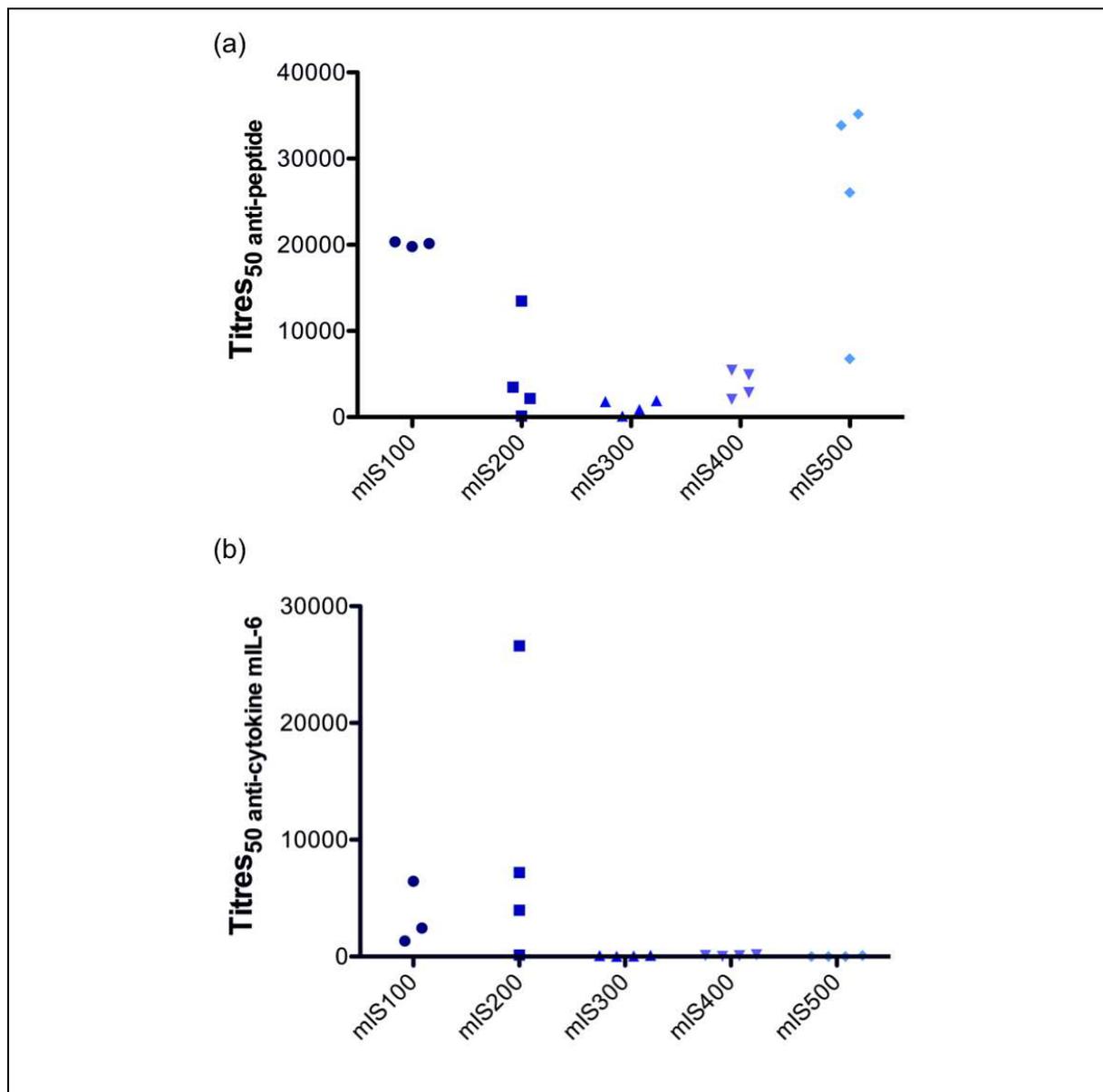


Figure 22 : Titres_{50} anticorps anti-peptide et anti-cytokine des sérums de souris immunisées contre les peptides couplés de l'IL-6 murine.

	Titre₅₀ anti-peptide	Titre₅₀ anti-cytokine
mIS100	20159-19799-20346	1328-2449-6448
mIS200	2157-136-3483-13461	3964-138-7177-26608
mIS300	1803-1923-883-116	45-33-101-87
mIS400	4915-2046-2860-5440	0-88-77-143
mIS500	6783-26051-33851-35156	0-0-0-93

Tableau 12 : Titres_{50} anticorps anti-peptide et anti-cytokine des sérums de souris immunisées contre les peptides couplés de l'IL-6 murine. Une souris est décédée suite à une immunisation dans le groupe immunisé contre le peptide mIS100.

Pour tous les peptides utilisés, les souris immunisées développent des anticorps dirigés contre le peptide. Le peptide couplé le plus immunogène est le mIS500 avec des titres₅₀ anti-peptide compris entre 6500 et 35000. Le peptide couplé le moins immunogène est le mIS300 avec des titres₅₀ anti-peptide compris entre 100 et 2000.

En revanche, seules les souris immunisées contre les peptides couplés mIS100 et mIS200 génèrent des anticorps anti-peptide capables de reconnaître également la cytokine entière IL-6 murine, avec une meilleure réponse pour les souris immunisées contre le peptide mIS200. Il est important de noter que pour ce peptide, contrairement aux autres, les titres₅₀ anti-cytokine sont plus élevés que les titres₅₀ anti-peptide. En effet, le peptide libre mIS200, utilisé pour recouvrir les puits de la plaque ELISA, est peu soluble en PBS. Il est donc probable que la quantité de peptide prélevée à partir de la solution mère en PBS ne corresponde pas à celle nécessaire pour recouvrir les puits. Ainsi, la quantité de peptide mise au fond des puits pourrait être trop faible, expliquant que tous les anticorps anti-peptide ne soient pas retenus et que par conséquent, les titres₅₀ anti-peptide soient plus faibles que les titres₅₀ anti-cytokine.

Au vu des résultats obtenus, le peptide couplé mIS200 est le peptide capable d'induire la plus forte production d'anticorps dirigés contre la cytokine entière, chez la souris. Bien que pour certains peptides, les titres₅₀ anti-peptide soient très élevés, les anticorps produits ne génèrent aucune réaction croisée contre la cytokine. Par conséquent la réponse face au peptide ne garantit pas une réponse face à la cytokine entière.

1.1.3. Étude de l'immunogénicité des peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine chez un hôte hétérologue

En parallèle de l'immunisation des souris OF1, nous avons choisi d'immuniser des lapins New Zealand avec les peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine. Les séquences des peptides murins ne sont pas identiques à celles du lapin, elles présentent entre 0 et 64 % d'identité. Le peptide sera à priori reconnu comme étranger. Il ne sera donc pas nécessaire d'outrepasser les mécanismes de tolérance au « Soi » comme dans un modèle autologue pour induire la production d'anticorps anti-peptide et anti-cytokine. De plus, en immunisant des lapins, une plus grande quantité de sérum peut être récupérée rendant possible la purification en vue de la réalisation de tests cellulaires. Compte tenu des protocoles de purification utilisés de nos jours, il est difficile de purifier des quantités de sérums trop faibles, comme c'est le cas chez la souris.

Les lapins ont été immunisés contre les peptides de l'IL-6 murine à raison de 150 µg de peptide en CFA, par voie intradermique. À J14, J28 et J56 un rappel est effectué par voie sous-cutanée en IFA. À J71 les animaux sont sacrifiés, le sérum prélevé et purifié. Le contenu en anticorps anti-peptide (**Figure 23a**) et anti-cytokine (**Figure 23b**) des sérums et des anticorps purifiés est évalué. Les valeurs des titres₅₀ sont détaillées dans le **tableau 13**.

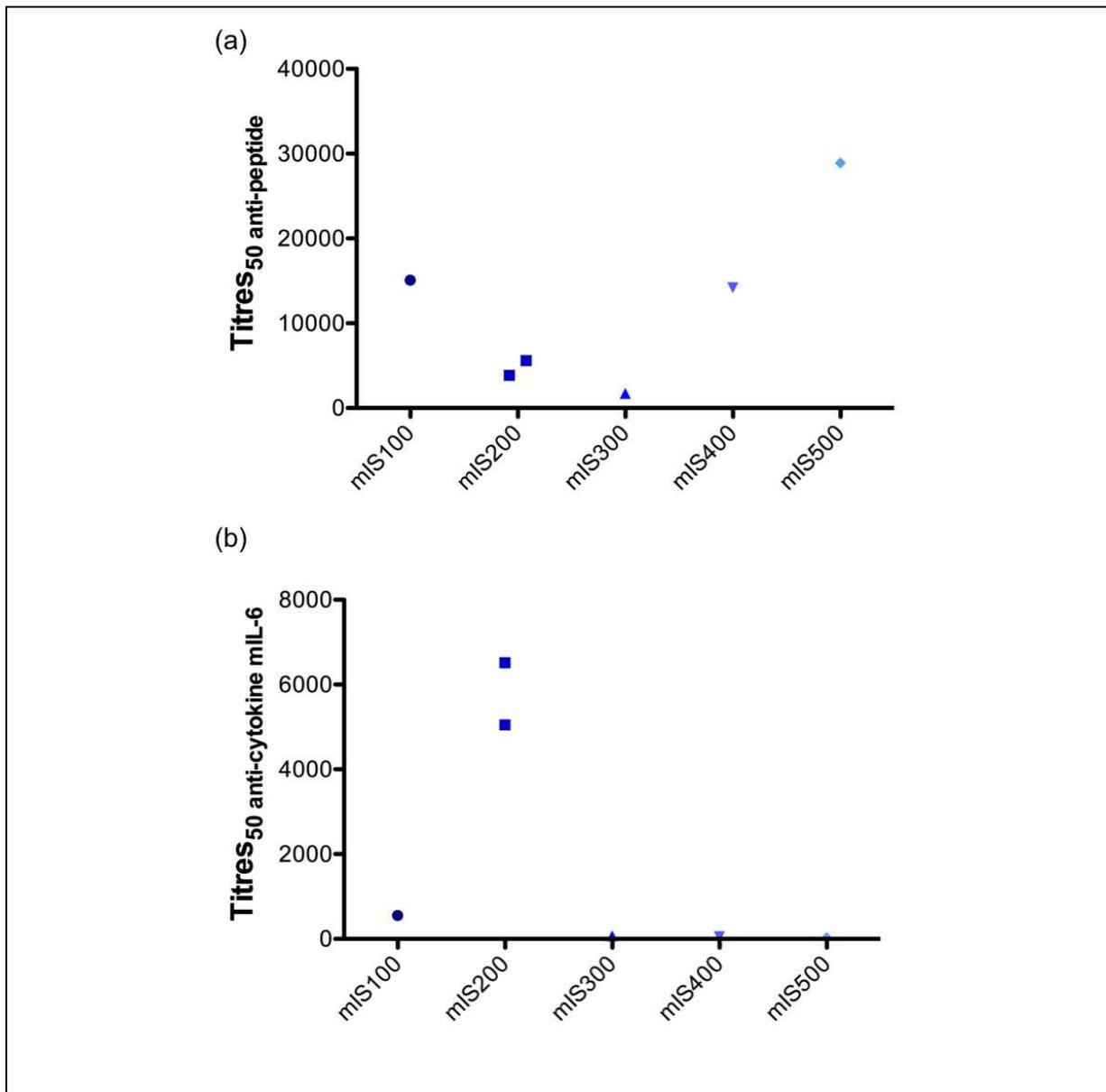


Figure 23 : Titres₅₀ anticorps anti-peptide et anti-cytokine des anticorps purifiés de lapin (n=1 par peptide, n=2 pour le peptide mIS200) immunisés contre les peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine.

	Sérum		Anticorps purifiés	
	Anti-peptide	Anti-cytokine	Anti-peptide	Anti-cytokine
mIS100	7021	460	15070	554
mIS200	3788	5362	3868-5590	6517-5049
mIS300	1275	59	1731	75
mIS400	10239	132	14182	52
mIS500	40372	63	28884	28

Tableau 13 : Titres₅₀ anticorps des sérums et des anticorps purifiés de lapin (n=1 par peptide, n=2 pour le peptide mIS200) immunisés contre les peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine.

L'ensemble des peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine induit une production d'anticorps anti-peptide chez le lapin. Comme chez la souris, les titres₅₀ anti-peptide les plus élevés sont obtenus suite aux immunisations du lapin contre le peptide couplé mIS500.

Seuls les deux lapins immunisés contre le peptide couplé mIS200 développent des anticorps anti-peptide reconnaissant également la cytokine entière mIL-6. Le peptide mIS100 qui entraînait, chez la souris, une production d'anticorps anti-cytokine n'est que faiblement immunogène chez le lapin. L'immunisation contre les peptides mIS300, mIS400 et mIS500 induisent bien la production d'anticorps anti-peptide chez le lapin comme chez la souris, mais ces derniers sont incapables de reconnaître la cytokine entière. Il est possible que la cyclisation des peptides n'ait pas permis de mimer correctement la structure de la cytokine native, expliquant ainsi l'incapacité des anticorps anti-peptide à reconnaître la cytokine entière.

Au vu de ces résultats, les immunisations contre le peptide mIS200 couplé à la KLH sont les seules à induire la production d'anticorps anti-peptide qui reconnaissent la cytokine entière à la fois chez la souris et le lapin.

1.1.4. Étude de l'activité neutralisante des anticorps anti-cytokine

Pour étudier la capacité neutralisante des anticorps purifiés de lapins immunisés contre les peptides dérivés de l'IL-6, j'ai mis en place un test de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 murine sur la lignée cellulaire B9 (hybridomes murins). Ces cellules prolifèrent de manière dose-dépendante en réponse à l'IL-6. Dans un premier temps, j'ai

déterminé la concentration d'IL-6 murine nécessaire pour induire 80 % de la prolifération maximale des cellules sur une durée de 96 heures (**Figure 24**).

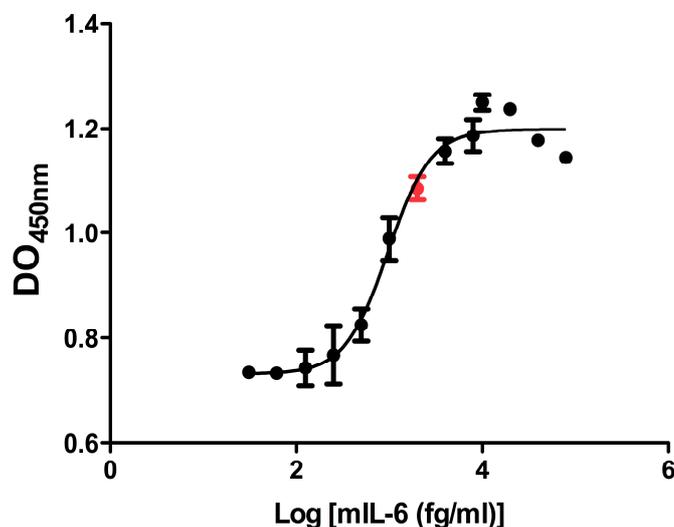


Figure 24: Prolifération dose-dépendante de la lignée cellulaire B9 en réponse à l'IL-6 murine.

D'après l'expérience, 2 pg/ml de cytokine sont nécessaires pour atteindre 80 % de la prolifération maximale. Cette concentration d'IL-6 murine a donc été utilisée afin d'évaluer la capacité neutralisante des anticorps purifiés de lapin immunisés contre les peptides couplés de l'IL-6 murine (**Tableau 14**). À cette dose, les capacités neutralisantes même les plus faibles peuvent être détectées.

	% neutralisation		
	1/10 ^{ème}	1/50 ^{ème}	1/1000 ^{ème}
mIS100	7,4	0	0
mIS200-lapin 1	9	0	0
mIS200-lapin 2	9,7	7,8	0
mIS300	80	33,5	0
mIS400	5	0	0
mIS500	86,5	39,8	0

Tableau 14: Pourcentages de neutralisation obtenus avec les anticorps purifiés de lapin immunisés contre les peptides couplés dérivés de l'IL-6 murine. Trois dilutions, 1/10^{ème}, 1/50^{ème} et 1/1000^{ème} ont été utilisées pour chaque lapin.

Il semblerait, au vu des résultats obtenus, que les anticorps purifiés des lapins immunisés contre les peptides couplés mIS300 et mIS500 bloquent la prolifération de la lignée cellulaire B9 en réponse à l'IL-6. Cependant, nous avons observé une toxicité dose-dépendante de ces anticorps en présence de cellules B9 non stimulées avec de l'IL-6. Cette toxicité n'a pas été observée en utilisant un anticorps commercial anti-IL-6 mis en excès. Par conséquent cet effet neutralisant refléterait en réalité une toxicité des anticorps purifiés de lapin.

De plus, les résultats suggèrent qu'aucun effet neutralisant n'est observé pour les anticorps purifiés des lapins immunisés contre le peptide couplé mIS200, bien que ce dernier induise la production d'anticorps anti-peptide reconnaissant la cytokine entière chez la souris et le lapin. Ces anticorps ne semblent pas pouvoir neutraliser *in vitro* l'interaction de la cytokine avec son récepteur (résultats de l'ordre du bruit de fond).

1.2. Peptide dérivé de l'IL-6 humaine

En parallèle, dans le but de pouvoir transposer la stratégie d'immunisation active anti-IL-6 chez l'Homme, nous avons fait synthétiser l'équivalent humain du peptide murin mIS200, appelé hIS200 (**Tableau 15**). De la même manière que pour le peptide murin, la production d'anticorps anti-peptide et anti-cytokine IL-6 humaine a été évaluée chez la souris OF1 et le lapin New Zealand.

Nom du peptide	Séquence du peptide	Agent de couplage
hIS200	Acétyl+ <u>C</u> ₇₈ ESSKE ALAENNL NLPK ₉₄ <u>C</u> – Y	BDB
mIS200	Acétyl+ <u>C</u> ₇₆ MNNDD ALAENNL KLPE ₉₂ <u>C</u> – Y	BDB

Tableau 15 : Tableau présentant la séquence du peptide hIS200. L'agent chimique utilisé pour le couplage à la protéine porteuse KLH est précisé. C : cystéines utilisées pour la cyclisation, **C** : cystéines non contenues dans la séquence d'origine. **Y** : tyrosines ajoutées pour le couplage par le BDB. En orange : acides aminés identiques entre les séquences des peptides murin et humain. Les acides aminés sont annotés à partir de la séquence Swissprot P05231 (hIL-6).

1.2.1. Étude de l'immunogénicité du peptide couplé hIS200

Quatre souris OF1 ont été immunisées avec 100 µg de peptide par souris, émulsionnés en CFA. Trois rappels ont été ensuite effectués, espacés de 15 jours, avec 100 µg de peptide par souris émulsionnés en IFA. La présence d'anticorps anti-peptide et anti-cytokine IL-6 humaine, contenus dans les sérums, a été testée par ELISA. En parallèle, un lapin New Zealand a également été immunisé avec le peptide. L'ensemble des titres₅₀ anticorps anti-peptide et anti-cytokine sont présentés dans le **tableau 16**.

			Immunisation contre le peptide hIS200
Souris	Sérum	Titre ₅₀ anti-peptide	7132-5025-12081-12273
		Titre ₅₀ anti-cytokine	960-852-2306-7293
Lapin	Sérum	Titre ₅₀ anti-peptide	23625
		Titre ₅₀ anti-cytokine	12697
	Anticorps purifiés	Titre ₅₀ anti-peptide	30519
		Titre ₅₀ anti-cytokine	14342

Tableau 16 : Titres₅₀ anticorps des sérums de souris ainsi que des sérums et anticorps purifiés de lapin, immunisés contre le peptide couplé hIS200.

Le peptide couplé hIS200 est fortement immunogène, il induit la production, à la fois chez la souris et chez le lapin, d'anticorps anti-peptide reconnaissant la cytokine entière hIL-6. Nous avons pu observer que les anticorps produits par les souris immunisées contre le peptide couplé mIS200 reconnaissent également la cytokine humaine (Titres₅₀ anti-IL-6 humaine : 915-151-1055-3961). Or les peptides murin et humain présentent 59 % d'identité de séquence. La partie conservée se trouve au niveau de la partie centrale de la boucle, la plus exposée à la surface. Par conséquent, il n'est pas surprenant que le peptide humain induise la production d'anticorps dirigés contre la cytokine IL-6 humaine.

1.2.2. Étude de l'activité neutralisante des anticorps purifiés

Le test de neutralisation de l'activité biologique de la cytokine IL-6 humaine est réalisé sur la même lignée cellulaire que celle utilisée pour le test de neutralisation de la cytokine murine. En effet, les cellules B9 prolifèrent de manière dose-dépendante en réponse aux cytokines IL-6 murine et humaine. La capacité neutralisante des anticorps anti-cytokine

produits par le lapin immunisé contre le peptide couplé hIS200, a été évaluée. Pour cela, 5000 cellules ont été incubées en présence d'anticorps purifiés de lapin avec 3,5 pg/ml d'IL-6 humaine, pendant 96h. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 25**.

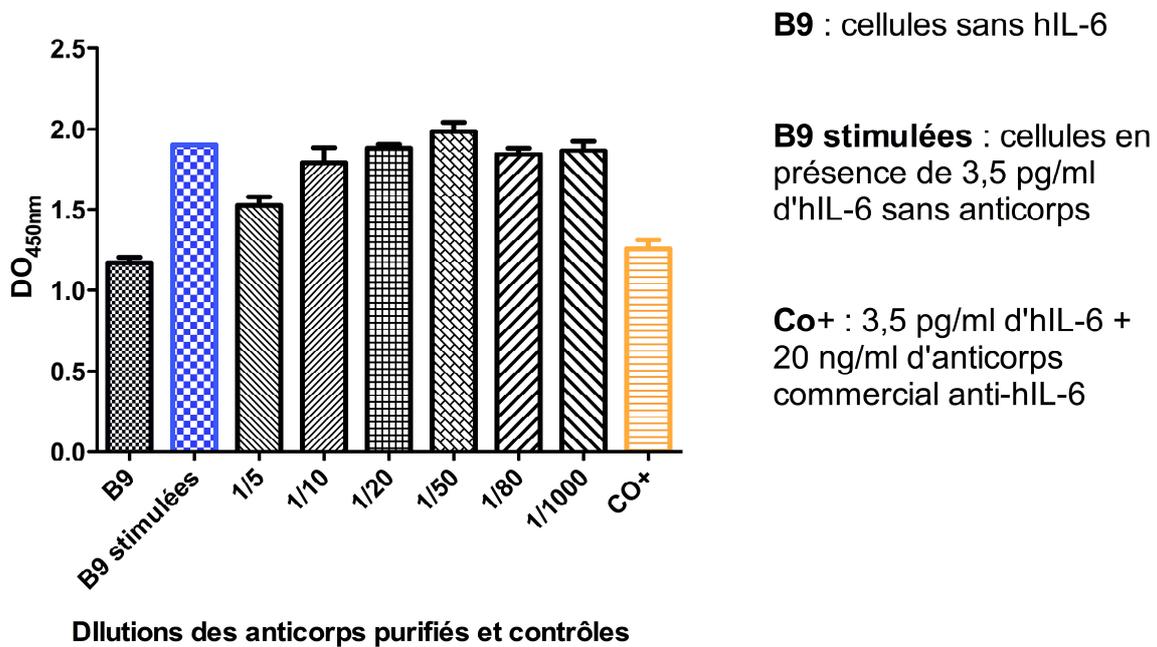


Figure 25 : Neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 humaine par les anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIS200.

Les anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIS200 neutralisent 51,4 % de l'activité biologique de l'IL-6 humaine au 1/5^{ème} et 15,5 % au 1/10^{ème}. Cependant les anticorps purifiés perdent rapidement leur capacité neutralisante aux dilutions plus élevées.

1.3. Modèles animaux murin et macaque

1.3.1. Publication

« Protection conferred by active immunization against an IL-6 peptide in mice and monkeys »

➤ Résumé du travail en français

Depuis maintenant près de 15 ans, les premiers traitements ciblés anti-cytokine ont été commercialisés pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques. Cependant, ils présentent plusieurs inconvénients tels que des effets secondaires, des coûts élevés et surtout l'absence de réponse chez certains patients ou l'apparition de résistance. C'est pourquoi, à ce jour, il est nécessaire de diversifier l'offre thérapeutique existante.

Dans ce travail, nous présentons un peptide dérivé de l'IL-6 murine, le mIS200, sélectionné suite à l'analyse structurale de l'IL-6. Ce peptide, couplé à la KLH, a été testé *in vivo* dans un modèle murin de sclérodémie systémique. Les souris immunisées contre ce peptide couplé ont produits des anticorps capables de reconnaître la cytokine entière. Nous avons montré que les souris traitées présentaient une réduction significative de l'épaississement dermique et du contenu en collagène, ainsi qu'une diminution significative du nombre de myofibroblastes, en comparaison avec les souris contrôles. En parallèle, nous avons comparé l'efficacité de notre composition vaccinale à celle d'un anticorps monoclonal anti-IL-6R, le MR16-1, dont l'efficacité a préalablement été démontrée dans ce modèle²⁶⁰. Un effet protecteur similaire a pu être observé entre les deux traitements.

Nous présentons également une étude réalisée chez une espèce génétiquement plus proche de l'Homme : le macaque cynomolgus, au cours de laquelle nous avons pu observer la production d'anticorps anti-cytokine chez les animaux immunisés contre l'équivalent humain du peptide mIS200 (qui présente 100 % d'identité de séquence avec le peptide de macaque). Ces anticorps produits ont été capables de moduler les réactions inflammatoires locales suite à l'induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée par le vaccin tétanique Pasteur.

Ces résultats valident la possibilité d'élargir l'offre thérapeutique actuelle par la méthode d'immunisation active pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques.

Protection conferred by active immunization against an IL-6 peptide in mice and monkeys

Lucille Desallais^{1*}, Jérôme Avouac^{2*}, Maxime Fréchet², Muriel Elhai², Hadley Mouhsine¹, Gabriel Moreau¹, Caroline Bouchez³, Hervé Do⁴, Rojo Ratsimandresy⁴, Françoise Quintin-Colonna⁵, Matthieu Montes¹, Yannick Allanore², 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.

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, INSERM U1016 and CNRS UMR8104, Institut Cochin, Rheumatology A department, Hôpital Cochin, Paris, France.

³CiToxLaB France, BP503, 27005 Evreux, France

⁴Peptinov, 15 rue Ambroise Thomas, 75009 Paris, France

⁵INSERM U970 PARCC (Paris Cardiovascular Research Center); Université Paris Descartes; Sorbonne Paris Cité; 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

ACKNOWLEDGMENTS

LD was funded by a fellowship from Direction Générale de l'Armement (DGA) and the work was funded in part by Conservatoire National des Arts et Métiers (Cnam).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LD completed most of the experimental work. JA made the analysis of all the mice SSc experimental data. MF, ME, HM, GM, CB, RR, MM participated to some of the experiments. YA supervised the mice SSc experiments. HD, FQC, and JFZ coordinated the monkey experiments. JFZ conceived the whole study. LD, JA, YA, and JFZ wrote the manuscript. All the authors reviewed the manuscript.

ABSTRACT

Anti-cytokine biologics have revolutionized the treatment of chronic inflammatory diseases. However, they exhibit drawbacks and alternative strategies are needed. We identified a mouse IL-6 peptide immunogen inducing the same protection as an anti-IL-6R mAb in a mouse model of systemic sclerosis. Furthermore, we demonstrated for the first time in monkeys a clinical protection induced by the human peptide counterpart, promoting anti-IL-6 active immunization as a promising alternative.

Since the late 90's, anti-cytokine biologics (monoclonal antibodies and soluble receptors) have successfully been used to treat chronic inflammatory diseases¹. These biotherapies present however several drawbacks including repeated injections, side effects^{2,3}, treatment resistance⁴, and prohibitive costs (up to \$20,000 per patient per year)⁵. In order to widen the therapeutic offer to the patients, new anti-cytokine targeted strategies are needed⁶.

Our group has developed a peptide-based vaccine against the pro-inflammatory cytokine IL-6. The overproduction of IL-6 has been associated with several chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis⁷ or systemic sclerosis⁸. IL-6 pathological effects are specifically inhibited by tocilizumab, a commercialized monoclonal antibody directed against IL-6R, approved in 2009 for rheumatoid arthritis and in 2011 for systemic juvenile idiopathic arthritis.

The peptide was chosen by molecular modeling to be close to the cytokine-receptor interaction site (**Supplementary Figure 1**). We first showed that active immunization against this murine IL-6 (mIS200) peptide was protective in a bleomycin (BLM)-induced fibrosis mouse model for systemic sclerosis⁹. DBA/2 mice immunized against the mIL-6 peptide developed autoantibodies against native murine IL-6 as shown by ELISA (**Supplementary Figure 2**). Furthermore, they exhibited a significant reduction of dermal thickness compared to the group immunized with KLH alone ($P = 0.038$) (**Fig. 1a, b**). These mice also exhibited a significant reduction of the collagen content in the lesional skin ($P = 0.012$) (**Fig. 1e, f**), and a significant decrease of the number of myofibroblasts ($P = 0.025$) (**Fig. 1i**). We investigated in parallel the protection obtained with MR16-1, a rat anti-mouse IL-6R monoclonal antibody previously shown to be efficient in this model¹⁰. The mice exhibited a reduction of dermal thickness ($P = 0.1$) (**Fig. 1c, d**), of the collagen content ($P = 0.03$) (**Fig. 1g, h**) and of the number of myofibroblasts ($P = 0.03$) (**Fig. 1j**). Overall, the protection conferred by the anti-IL-6 peptide immunization was identical to the one conferred by the MR16-1 monoclonal antibody.

With the view of adapting this strategy to humans, we decided to test the human IL-6 peptide counterpart (hIS200) in cynomolgus monkeys since the macaque and human peptide sequence are 100 % identical. IL-6 modulation can be assessed through a delayed-type hypersensitivity (DTH) test since the reactions associated with DTH are IL-6-dependent¹¹. Three groups of 4 monkeys were immunized against KLH alone, KLH coupled with a control peptide, and KLH coupled with the hIS200 peptide. No adverse event was reported during this study (**Supplementary Tables 1&2**). We found a significant production of anti-hIL-6 antibodies by ELISA in the four hIS200-immunized monkeys, decreasing after the last boost (**Fig. 2a**),

showing that the self-tolerance was overcome. Following the Tetanus toxoid challenge at day 90, the animals were clinically examined at day 91, 92, and 93 at the sites of injection. In spite of the small size of the groups, the incidence of erythema, dermal thickening, and nodules for the IL-6-immunized group was significantly decreased ($P = 0.003$) (**Fig. 2b**). Furthermore, the size of the nodules was non measurable in the IL-6-immunized group compared to the two other groups (KLH: mean 5.6 mm, control peptide: mean 4.7 mm).

This study is the first one showing the clinical and histological efficacies of active immunization against a small IL-6 peptide in a well-established murine model of systemic sclerosis. Moreover, this protection was shown to be identical to the one conferred by an anti-IL-6R monoclonal antibody already known to be efficient in this model¹⁰. This is also the first demonstration of a successful anti-IL-6 immunization in non-human primates. Indeed, the human counterpart IL-6 peptide was immunogenic in monkeys, well tolerated, and able to strongly modulate the inflammatory reactions following a DTH response induced by TTx.

Our results comfort that active anti-cytokine immunization may be an efficient alternative to anti-cytokine monoclonal antibodies. Compared to the injection of monoclonal antibody, the advantages of the anti-cytokine vaccines are manifold: no anti-idiotypic response meaning less resistance, decrease of the costs considering the small quantities of immunogen required, simplicity of production, and simplicity of administration to the patients. Two anti-cytokine vaccines, based on whole-cytokine immunogens derived from IFN α ¹² and TNF α ¹³ are currently under clinical development. There are several advantages for the use of peptide immunogens over whole-cytokine immunogens: simplicity of production, better characterization of the immunogenic epitopes with less risk of T-cell immunity or cross-reactivity with other proteins.

This work shows the feasibility of targeting IL-6 by active immunization in order to block endogenous IL-6 pathological effects and comforts the previous results obtained with peptide immunogens from TNF α ¹⁴, IL-1 β ¹⁵ and IL-23p19¹⁶ in mice. For the first time, this work demonstrates the feasibility of this original peptide-based strategy in non-human primates paving the way for its future use in humans.

METHODS

Peptide derivatives of mouse IL-6

At the beginning of the study, no structural data on mouse IL-6 was available. Peptide was designed using the human IL-6/IL-6R α /gp130 structure (PDB code 1P9M). We could assume that the chosen site was transposable to mIL-6 due to the high conservation between mIL-6 and hIL-6 amino acid sequences. Peptide was chosen in loops exposed to the protein surface, which corresponded to a region involved in the interaction between the cytokine IL-6 and its receptor IL-6R α .

mIS200 sequence: Acétyl+C₇₆MNNDDALAENNLKLPE₉₂CY

hIS200 sequence: Acétyl+C₇₈ESSKEALAENNLNLPK₉₄CY

Peptide synthesis and coupling

Peptides were synthesized on a solid phase support using the Fmoc/terbutyl strategy by PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, France). Peptides were analyzed by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and mass spectrometry. Only fractions with purity superior to 85 % was conserved. All peptides were produced in a cyclized form, by the formation of intramolecular disulphide bonds between cysteine residues.

Peptide-carrier conjugates were produced by chemical linkage of the targeted peptide to KLH by bis-diazobenzidine (BDB). The coupled peptide was then dialyzed and suspended in phosphate-buffered saline (PBS).

Mice and BLM-induced dermal fibrosis

DBA/2 mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Skin fibrosis was induced in 4-week-old male and female mice by administering local injections of BLM for 3 weeks (d0 to d21), as previously described^{17,18}. Briefly, 100 μ l of BLM dissolved in 0,9 % NaCl at a concentration of 0,5 mg/ml was administered every other day by subcutaneous injection into defined areas of 1 cm² on the upper back. Subcutaneous injections of 100 μ l 0,9 % NaCl were used as negative control. All experimental procedures were conducted in compliance with Animal Health regulations.

Immunizations against the peptides

DBA/2 mice were immunized four times by intramuscular injections with KLH-coupled peptides (100 μ g/mouse) (n=17) or KLH alone (200 μ g/mouse) (n=11 with subcutaneous

injection of NaCl and n=15 with subcutaneous injection of BLM). The primo-injection was completed with Complete Freund Adjuvant (CFA, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and boosts at d-17, d-3 and d11, with Incomplete Freund Adjuvant.

Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody treatment

Rat anti-mouse IL-6 receptor monoclonal Ab (clone MR16-1) described previously¹⁹ was provided by Chugai Pharmaceutical (Japan). Purified rat IgG1 (isotype-matched control Ab) (MP Biomedicals) was administered as a negative control (n=13 with subcutaneous injection of BLM, n=12 with subcutaneous injection of NaCl). Mice received an intraperitoneal injection of 2 mg at day 0 followed by one injection of 1 mg every week for three weeks (n=13).

Mouse anti-IL-6 antibody ELISAs

Serum samples were obtained from mice at day 22 and the IgG response against mouse IL-6 was measured by ELISA. Briefly, 50 ng of mouse IL-6 (R&D Systems, Lille, France) were adsorbed on microtitration plates overnight. After a step of saturation, sera from immunized mice were serially diluted in PBS BSA 1% and added in coated wells. A wash was followed by an incubation with polyclonal anti-mouse IgG as secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP). Plates were revealed with tetramethylbenzidine (TMB) and the reaction was stopped with 1M sulfuric acid before reading on a spectrophotometer (Multiskan Ex, Thermo Scientific) at 450 nm. ELISA titers were expressed as those serum dilutions that lead to half-maximal OD₄₅₀ (titer₅₀).

Collagen measurements

The collagen content in lesional skin samples was evaluated by the hydroxyproline assay²⁰. After digestion of punch biopsy specimens (3 mm diameter) in 6 M HCl for 3 hours at 120°C, the pH of the samples was adjusted to 7. Afterwards, samples were mixed with 0,06 M chloramine T and incubated for 20 minutes at room temperature. Then, 3,15 M perchloric acid and 20 % p-dimethylaminobenzaldehyde were added and samples were incubated for an additional 20 minutes at 60°C. The absorbance was determined at 557 nm with a spectrophotometer. For direct visualization of collagen fibers, trichrome staining was performed.

Evaluation of dermal thickness

Lesional skin specimens were excised 1 day after the final injection of BLM, fixed in 4 % formaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m thickness. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Dermal thickness was measured at 100-fold magnification by measuring the distance between epidermal-dermal junction and the dermal-subcutaneous fat junction at five randomly selected sites in each animal. Two independent examiners performed the evaluation.

Immunohistochemical analysis of α -SMA

For immunohistochemical analysis, sections were deparaffinized by passage through xylene and graded ethanol. Sections were blocked with 10 % bovine serum albumin and 3 % H₂O₂ and stained with anti- α -SMA Ab (clone 1A4; Sigma-Aldrich, 1:1000 dilution) for 3 hours. Polyclonal rabbit anti-mouse antibodies labeled with horseradish peroxidase (Dako) were used as secondary antibodies. The number of α -SMA positive fibroblastic cells was counted at 200-fold magnification at 6 randomly chosen sites in each animal, and the mean number was calculated. Two independent examiners performed the evaluation.

Immunization of macaques

Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) originating from Vietnam were housed at CitoxLab animal facilities (Évreux, France). Groups of four monkeys were immunized intramuscularly every two weeks for four injections, and a last one 1 month later, with 150 μ g of peptide (hIS200) conjugated to KLH in Montanide ISA 51 VG (Seppic, France). A group of monkeys immunized with KLH alone in the adjuvant was used as a positive control and another group immunized with a control peptide was used as a negative control.

All experimental procedures were conducted in compliance with Animal Health regulations.

Induction of DTH response

The Tetanus vaccine (TTx, Sanofi Pasteur, France) was administered by intramuscular injection into the thigh of the monkey on day 59, at a dose-volume of 0,5 mL per animal.

A challenge was performed by intradermal injection on day 90 on the back of each animal with 0,05 mL of TTx on two distinct sites. Animals were slightly anesthetized with ketamine before the injections. 24, 48 and 72 hours after challenge, skin reactions at the challenge sites were recorded daily for each animal. A first score based on the incidence on each site of the

three-recorded parameters (erythema, thickening, and nodules) was established. Furthermore, the size of the nodules was measured using a caliper on day 93, and the intensity of erythema and thickening were established using the following scale: Erythema, 1: very slight (barely perceptible), 2: slight, 3: moderate and 4: severe (injuries in depth). Thickening, 1: very slight (barely perceptible), 2: slight (edges of area well-defined by definite raising), 3: moderate (raised approximately 1 millimeter) and 4: severe (raised more than 1 millimeter).

Animals were also observed for morbidity and mortality at least twice a day during the study and clinical signs of systemic toxicity were noted. Body weights were also recorded once a week and rectal temperature verified after the injections of vaccines.

Dosage of hIL-6 autoantibodies in sera by ELISA

Blood samples were taken in pre-dose, before the first immunization and then every two weeks until the end of the study (total of 9 samples). Autoantibodies production against hIL-6 was assessed by ELISA.

Statistics

For the BLM-induced dermal fibrosis model, results were express as means \pm SD. Mann-Whitney U test was used for statistical analyses. We used a Fisher exact test to compare the scores of the inflammatory response in the various groups of monkey. *P* values $< 0,05$ were considered significant.

REFERENCES

1. Emi Aikawa, N., de Carvalho, J. F., Artur Almeida Silva, C. & Bonfá, E. *Clin Rev Allergy Immunol* **38**, 82–89 (2010).
2. Ratsimandresy, R. A., Rappaport, J. & Zagury, J.-F. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1998–2025 (2009).
3. Sfrikakis, P. P. & Tsokos, G. C. *Clinical Immunology* **141**, 231–235 (2011).
4. Keane, J. *et al.* *N. Engl. J. Med.* **345**, 1098–1104 (2001).
5. Koike, T. *et al.* *Annals of the Rheumatic Diseases* **70**, 2148–2151 (2011).
6. Delavallee, L., Duvallat, E., Semerano, L., Assier, E. & Boissier, M. *Swiss Med Wkly* (2010).doi:10.4414/smw.2010.13108
7. Robak, T., Gladalska, A., Stepien, H. & Robak, E. *Mediators Inflamm.* **7**, 347–353 (1998).
8. Barnes, T. C., Anderson, M. E. & Moots, R. J. *International Journal of Rheumatology* **2011**, 1–6 (2011).
9. Yamamoto, T. *et al.* *J. Invest. Dermatol.* **112**, 456–462 (1999).
10. Kitaba, S. *et al.* *Am. J. Pathol.* **180**, 165–176 (2012).
11. Mihara, M., Nishimoto, N., Yoshizaki, K. & Suzuki, T. *Immunol. Lett.* **84**, 223–229 (2002).
12. Mathian, A. *et al.* *Annals of the Rheumatic Diseases* **70**, 1138–1143 (2011).
13. Delavallee, L. *et al.* *Annals of the Rheumatic Diseases* **67**, 1332–1338 (2007).
14. Capini, C. J. *et al.* *Vaccine* **22**, 3144–3153 (2004).
15. Bertin-Maghit, S. M. *et al.* *Vaccine* **23**, 4228–4235 (2005).
16. Ratsimandresy, R. A. *et al.* *Vaccine* 1–8 (2011).doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.134
17. Avouac, J. *et al.* *Annals of the Rheumatic Diseases* (2012).doi:10.1136/annrheumdis-2012-201759
18. Avouac, J. *et al.* *Arthritis Rheum* **63**, 800–809 (2011).
19. Takagi, N. *et al.* *Arthritis Rheum* **41**, 2117–2121 (1998).
20. Woessner, J. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 440–447 (1961).

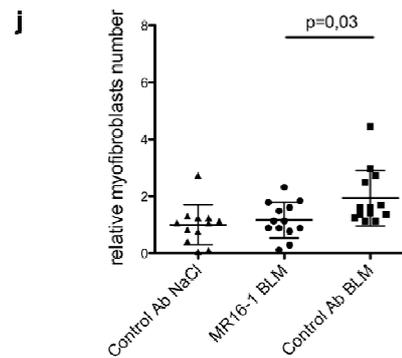
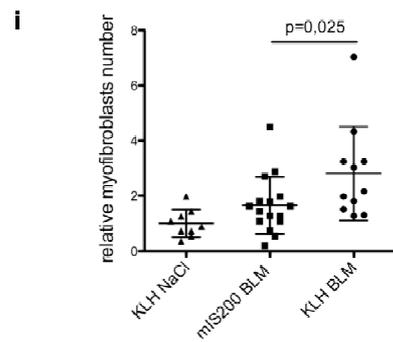
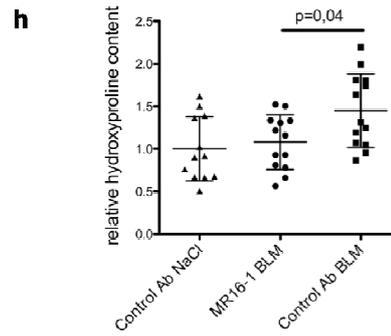
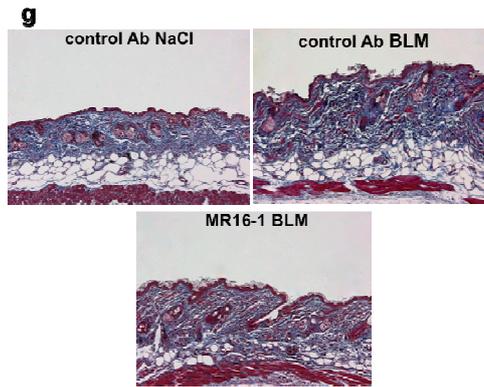
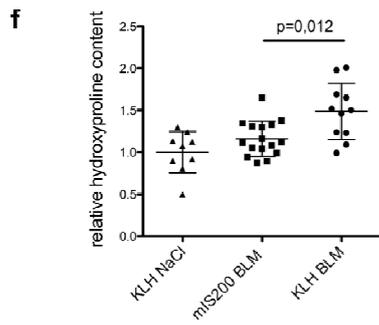
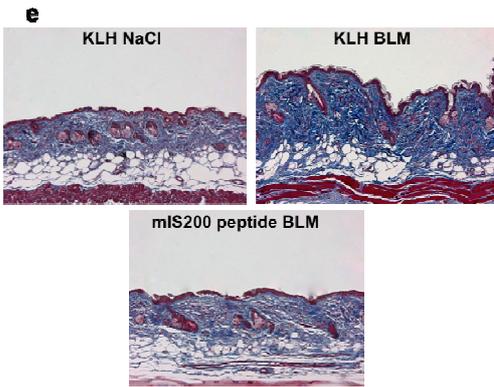
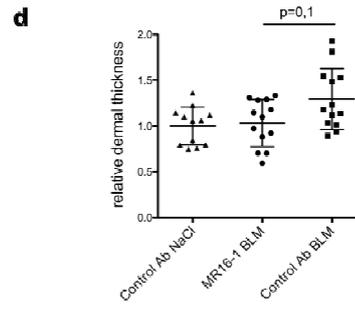
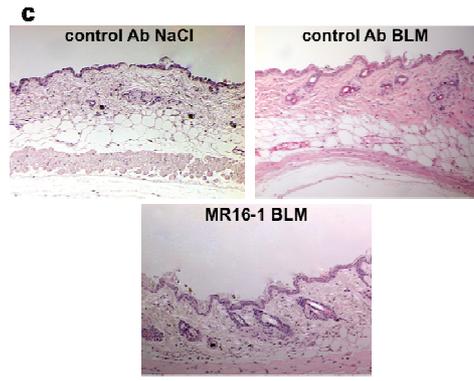
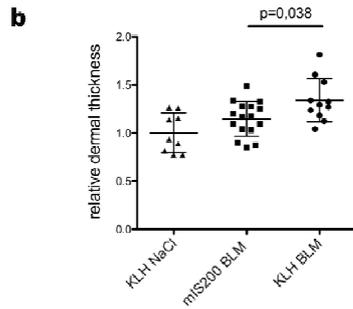
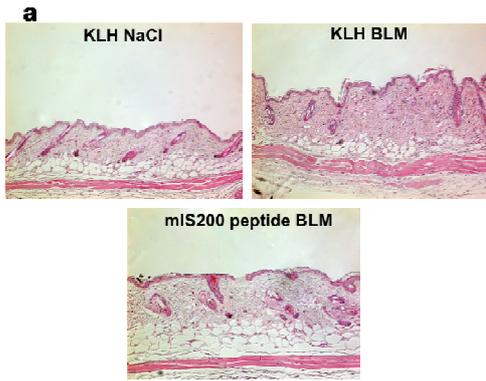


Figure 1: Mice immunized against mIS200 peptide and MR16-1 are protected against BLM-induced dermal fibrosis. **(a, c)** Reduced dermal fibrosis in mice immunized against mIS200 peptide and treated with MR16-1, injected with BLM. Representative hematoxylin and eosin-stained skin sections are shown. **(b, d)** Decreased dermal thickness in mice immunized against mIS200 peptide and treated with MR16-1. **(e, g)** Reduced accumulation of collagen in mice immunized against mIS200 peptide treated with BLM and injected with MR16-1. Collagen fibers visualization by trichrome-staining skin sections is shown. **(f, h)** Reduced hydroxyprolin content in mice immunized against mIS200 peptide and treated with MR16-1 following BLM treatment. **(i, j)** Lower myofibroblast counts in mice immunized against mIS200 peptide and treated with MR16-1 following BLM treatment. Bars represent mean \pm SD. The experiments were performed twice with similar results.

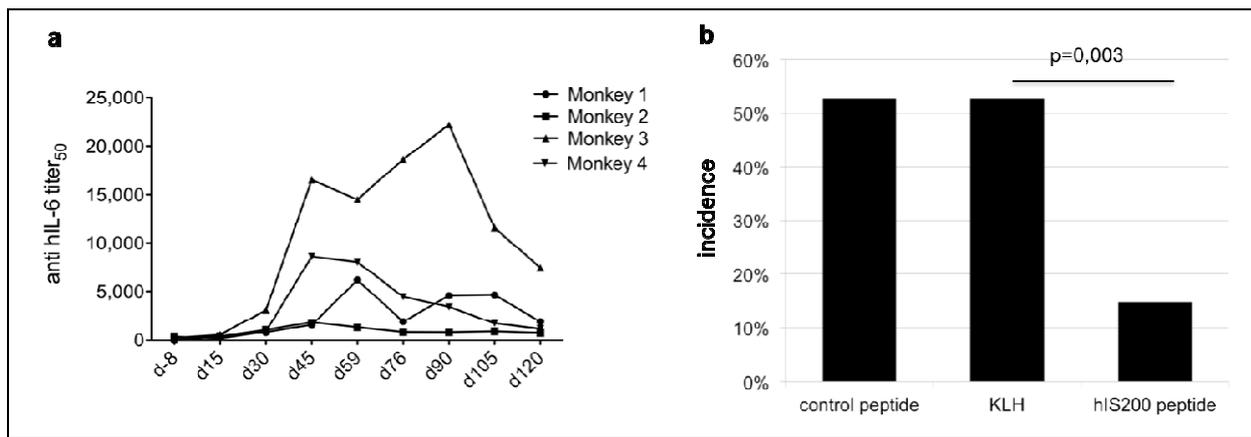
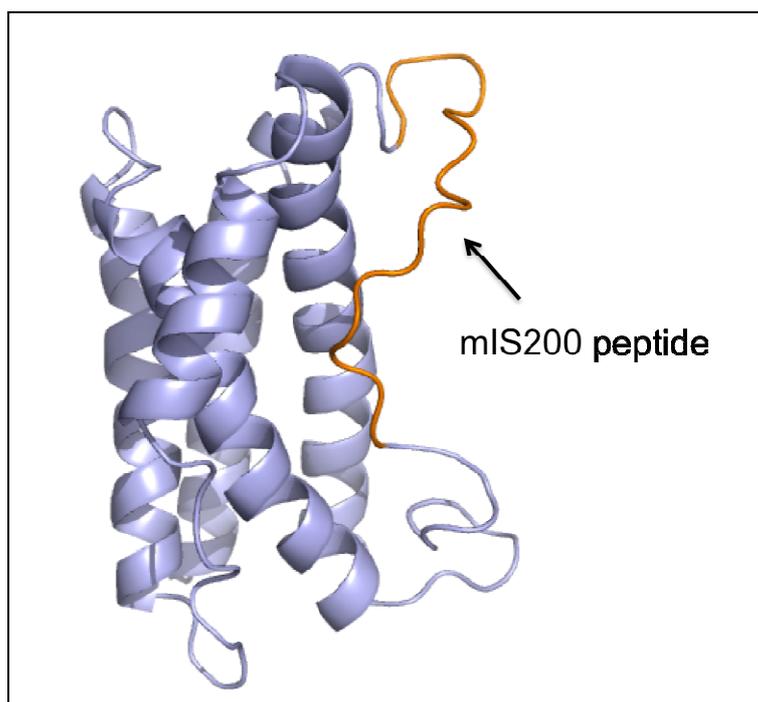
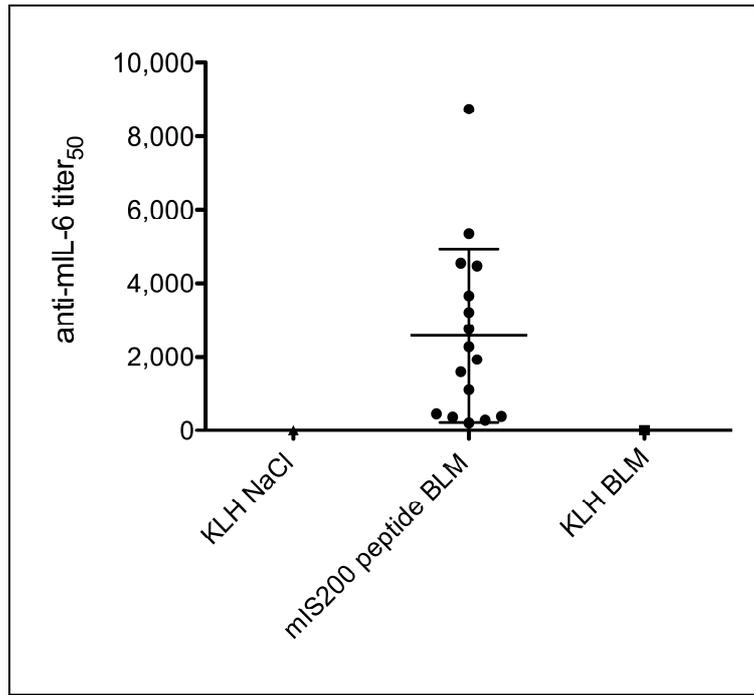


Figure 2: (a) Kinetics of anti-IL-6 antibody production in macaques immunized with 150 μ g of hIS200 peptide coupled with KLH. (b) Cumulative score of the incidence of the local reactions in the immunized monkeys (n=4 per group), based on erythema, thickening, and nodules at the sites challenged with 0,05 ml of TTx vaccine.

SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary figure 1: Localization of the mIS200 peptide (orange) on the human model of IL-6. At the time of the peptide design, there was no available mIL-6 structure. We chose the peptide on the human structure and we could assume that the chosen site was transposable to mIL-6 due to the high conservation between mIL-6 and hIL-6 amino acid sequences. Peptide was chosen in loops exposed to the protein surface, which corresponded to a region involved in the interaction between the cytokine IL-6 and its receptor IL-6R α .



Supplementary figure 2: Anti-mIL-6 autoantibodies production in the group immunized against mIS200 peptide and in the groups immunized against KLH alone. No anti-IL-6 autoantibodies were detected in serum samples from mice immunized against KLH alone compared to the mice immunized against mIS200 peptide. Bars represent mean \pm SD.

	Days							
	1/15	15/29	29/43	43/57	57/71	71/85	85/99	99/120
Monkey 1	-0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	-0.1	0.1
Monkey 2	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.1
Monkey 3	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1
Monkey 4	-0.2	0.1	0.0	0.0	-0.1	0.1	-0.1	0.1

Supplementary table 1: Body weight change (kg) for the four monkeys immunized against the hIS200 peptide during the whole study. No body weight change was observed.

Week	Monkey 1		Monkey 2		Monkey 3		Monkey 4	
	7	11	7	11	7	11	7	11
BD (°C)	39,8	39,8	38,9	39,2	39,3	40,2	40	38,8
T+6h (°C)	39,5	39,7	38,5	38,7	40,5	39,1	39,4	39,1
T+24h (°C)	39,9	39,4	39,1	39,3	39,6	39,8	38,8	38,9

Supplementary table 2: Rectal temperature (°C) for the four monkeys immunized against the hIS200 peptide. The body temperature was measured for all animals on days 45 (week 7) and day 76 (week 11). BD: before dosing, T+6h: 6 hours after treatment, T+24h: 24 hours after treatment. No significant change of the rectal temperature was observed for the four animals.

1.3.2. Résultats complémentaires de l'étude chez le macaque cynomolgus

1.3.2.1. Dosage de l'IL-6 sérique

Afin d'étudier les mécanismes conduisant à la modulation des réactions inflammatoires locales suite à l'induction d'une réaction d'HSR, une évaluation des taux sériques d'IL-6 a été réalisée par ELISA (**Figure 26**).

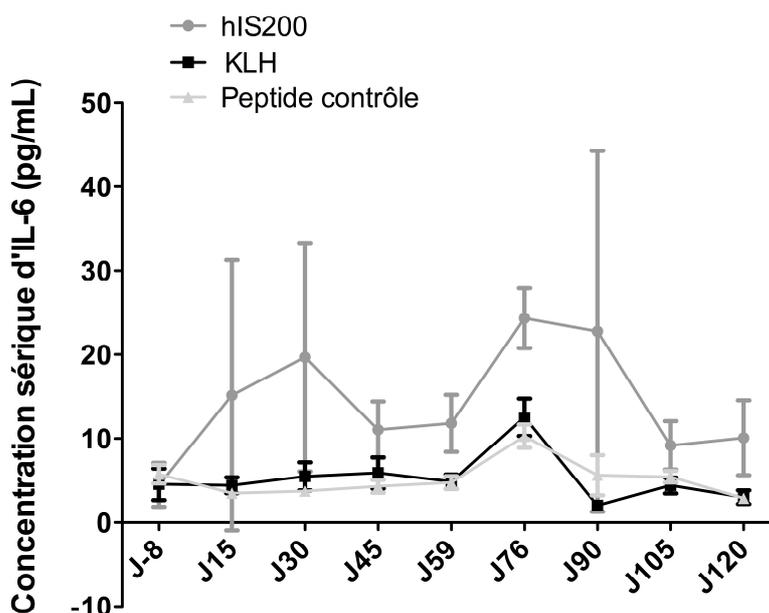


Figure 26 : Évaluation de la concentration d'IL-6 sérique chez les singes immunisés. La moyenne pour les quatre singes par groupe est représentée.

Avant la primo-immunisation, la concentration sérique d'IL-6 est d'environ 5 pg/ml quel que soit le groupe. Après la primo-immunisation, une élévation de la concentration sérique d'IL-6 a été observée dans le groupe de singes immunisés contre le peptide couplé de l'IL-6 humaine, comparé aux deux groupes contrôles.

1.3.2.2. Étude de la capacité neutralisante des anticorps purifiés de singe

La capacité des anticorps purifiés de singe à neutraliser la cytokine humaine a été évaluée dans un test de neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 sur la lignée cellulaire B9 (**Figure 27**). Trois dilutions ont été réalisées ($1/5^{\text{ème}}$, $1/10^{\text{ème}}$ et $1/100^{\text{ème}}$), pour chaque jour de prélèvement testé (J-8, J59, J90, J105 et J120).

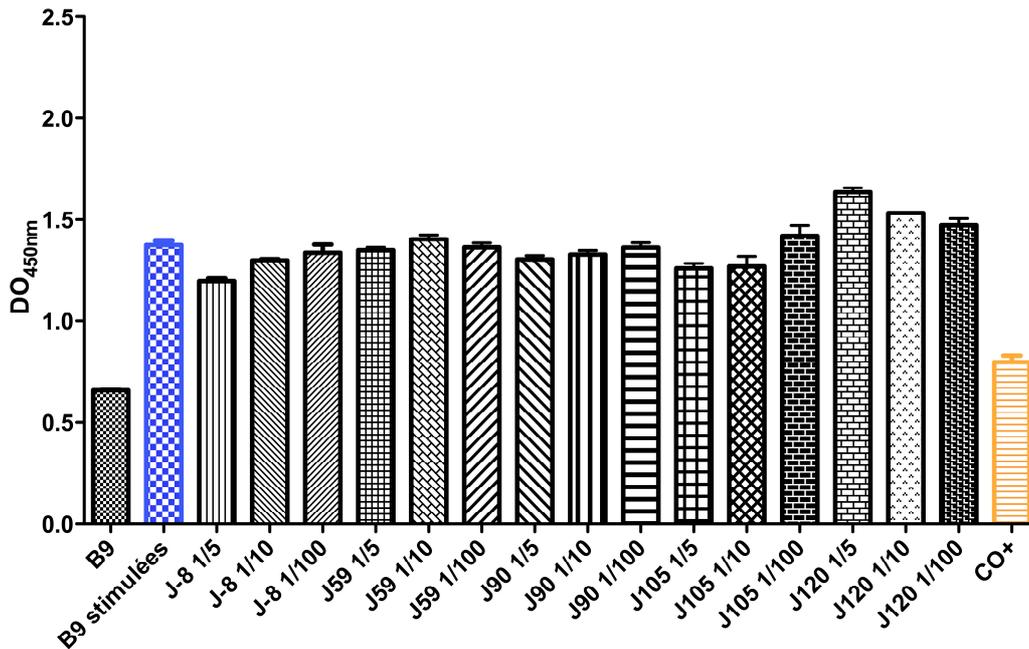


Figure 27: Neutralisation de l'activité biologique par les anticorps purifiés de singes immunisés contre le peptide couplé hIS200. Exemple d'un singe. B9 : cellules sans hIL-6, B9 stimulées : cellules en présence d'hIL-6 à 3,5 pg/ml sans anticorps, CO₊ : 3,5 pg/ml d'hIL-6 + 20 ng/ml d'anticorps commercial anti-hIL-6.

Aucune neutralisation de la prolifération des cellules B9 n'a pu être observée avec les anticorps purifiés de singes à J-8, J59, J90, J105 et J120, même à la dilution la plus faible, quel que soit le groupe.

Nous avons pu montrer que l'immunisation des singes contre le peptide couplé hIS200 induit la production d'anticorps anti-cytokine, qui ne sont pas neutralisants *in vitro*. En revanche, les singes immunisés montrent une diminution significative des réactions inflammatoires locales suite au déclenchement d'une réaction d'HSR. De manière intéressante, les singes immunisés ont un taux d'IL-6 sérique légèrement plus élevé comparé aux groupes contrôles.

2. Approche d'immunisation active anti-IL-1 β

2.1. Peptide dérivé de l'IL-1 β murine

2.1.1. Sélection d'un peptide dérivé de l'IL-1 β murine

Avant mon arrivée au laboratoire, une étude menée par Berthin-Maghit et al²²² a mis en évidence l'intérêt de cibler la cytokine IL-1 β par la stratégie d'immunisation active à base de peptides de cytokine. L'immunisation de souris SWISS contre le peptide couplé mIL-1 β 6 (**Figure 28**), a entraîné la forte production d'anticorps reconnaissant l'IL-1 β murine. Les anticorps produits par ces souris se sont avérés capables de neutraliser l'activité biologique de la cytokine mIL-1 β *in vitro*. L'effet protecteur des anticorps a ensuite été testé *in vivo* dans un modèle d'arthrite expérimentale au collagène. Une réduction de l'inflammation et de la destruction articulaire, chez les souris DBA/1 immunisées, a pu être observée.

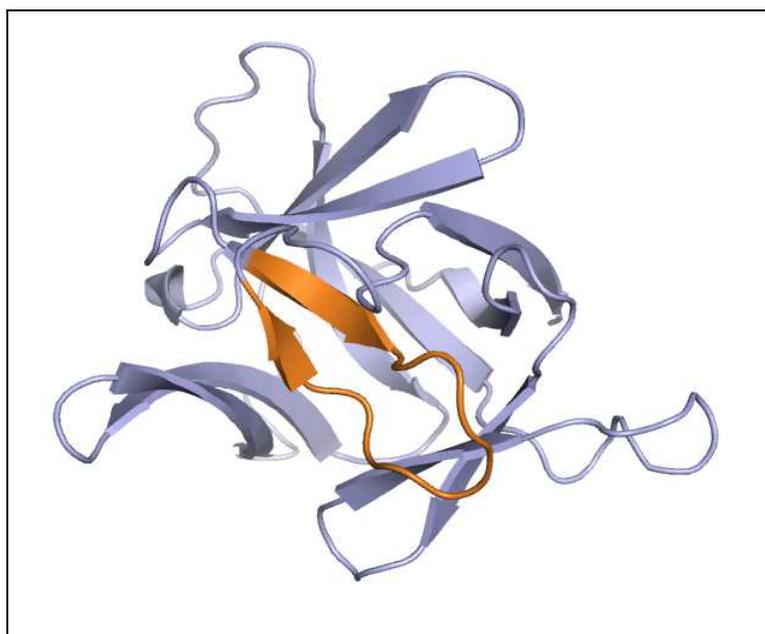


Figure 28 : Structure tridimensionnelle de l'IL-1 β murine (code PDB : 2MIB). En orange, le peptide mIL-1 β 6.

2.1.2. Étude de l'immunogénicité du peptide couplé mIL-1 β 6

Nous avons souhaité évaluer l'effet protecteur des anticorps, produits suite aux immunisations contre le peptide couplé mIL-1 β 6, dans un autre modèle murin de maladie inflammatoire. Pour cela, un nouveau lot de peptide a été synthétisé. Afin de valider la qualité

du lot fourni, l'immunogénicité du peptide couplé a été testée chez des souris OF1 et le lapin NZW. Le protocole est identique à celui utilisé pour les peptides dérivés de l'IL-6 (Voir partie 1.1.2).

À partir des sérums, prélevés au sacrifice, la production d'anticorps dirigés contre le peptide ainsi que la production d'anticorps dirigés contre la cytokine entière ont été évaluées. Les résultats, exprimés en titre₅₀, sont présentés dans le **tableau 17**.

		Immunisation contre le peptide mIL-1β6	
Souris	Sérum	Titre ₅₀ anti-peptide	49-0-6299-4947
		Titre ₅₀ anti-cytokine	0-103-12178-12059
Lapin	Sérum	Titre ₅₀ anti-peptide	21038
		Titre ₅₀ anti-cytokine	14728
	Anticorps purifiés	Titre ₅₀ anti-peptide	38980
		Titre ₅₀ anti-cytokine	24620

Tableau 17 : Titres₅₀ anticorps anti-peptide et anti-cytokine des souris OF1 (n=4) et du lapin immunisé contre le peptide mIL-1β6.

Les titres₅₀ anti-peptide obtenus chez les souris et le lapin immunisés contre le peptide couplé mIL-1β6 confirment l'immunogénicité du peptide couplé. De plus, les anticorps produits sont capables de reconnaître la cytokine entière.

2.2. Peptide dérivé de l'IL-1β humaine

2.2.1. Immunogénicité du peptide couplé hIL-1β6

Dans le but de pouvoir transposer cette stratégie chez l'Homme, nous avons fait synthétiser l'équivalent humain du peptide murin mIL-1β6, appelé hIL-1β6. Sa séquence ainsi que sa structure tridimensionnelle sont présentées dans le **tableau 18** et la **figure 29**.

Nom du peptide	Séquence du peptide	Agent de couplage
mIL-1 β 6	Y-CYISTSQAEHKPVFLGC _{+Amide}	BDB
hIL-1 β 6	Y-CYISTSQAENMPVFLGC _{+Amide}	BDB

Tableau 18 : Tableau présentant les deux peptides dérivés de l'IL-1 β utilisés au cours de cette étude. L'agent chimique utilisé pour le couplage à la protéine porteuse KLH est précisé. C : cystéines utilisées pour la cyclisation, C : cystéines non contenues dans la séquence d'origine. Y : tyrosines ajoutées pour le couplage par le BDB. En orange : acides aminés identiques entre les séquences des peptides murin et humain. Numérotation des acides aminés à partir des séquences Swissprot P10749 (mIL-1 β) et P01584 (hIL-1 β).

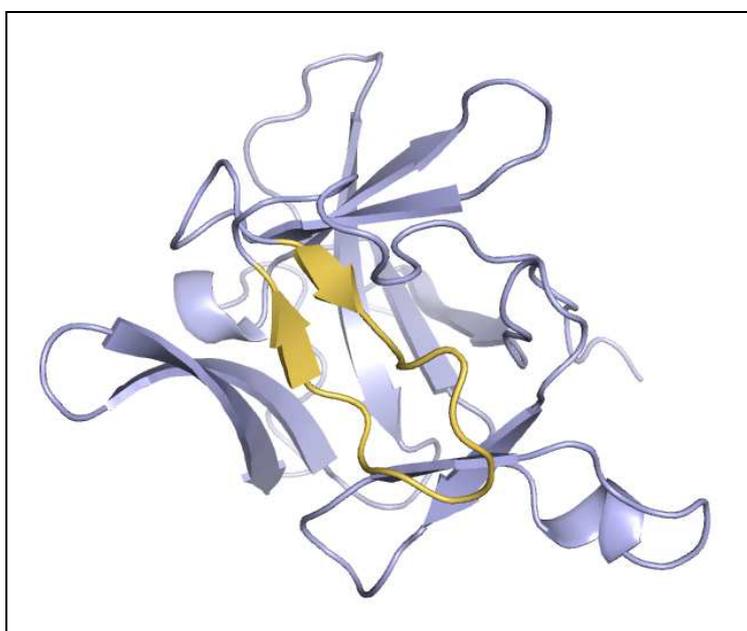


Figure 29 : Structure tridimensionnelle de l'IL-1 β humaine (code PDB : 1ITB). En jaune, le peptide hIL-1 β 6.

La capacité du peptide couplé hIL-1 β 6 à induire la production d'anticorps anti-cytokine, chez des souris OF1 ainsi que chez le lapin NZW, a été évaluée (**Tableau 19**).

			hIL-1β6
Souris	Sérum	Titre ₅₀ anti-peptide	3241-13020-304-10595
		Titre ₅₀ anti-cytokine	0-6171-0-10518
Lapin	Sérum	Titre ₅₀ anti-peptide	56359
		Titre ₅₀ anti-cytokine	36005
	Anticorps purifiés	Titre ₅₀ anti-peptide	109781
		Titre ₅₀ anti-cytokine	79148

Tableau 19 : Titres₅₀ anticorps des sérums de souris ainsi que des sérums et anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1 β 6.

Le peptide couplé hIL-1 β 6 est fortement immunogène, il induit la production, à la fois chez la souris et chez le lapin, d'anticorps anti-peptide reconnaissant la cytokine entière hIL-1 β .

Nous avons pu observer que les anticorps produits par les souris et le lapin immunisé contre le peptide couplé mIL-1 β 6 reconnaissaient également la cytokine humaine (Titres₅₀ anticorps anti-IL-1 β humaine du lapin : 1129). Or les peptides murin et humain présentent 86,7 % d'identité de séquence. Par conséquent, il n'est pas surprenant que le peptide humain induise la production d'anticorps dirigés contre la cytokine IL-1 β humaine.

2.2.2. Étude de l'activité neutralisante des anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1 β 6

La capacité neutralisante des anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide hIL-1 β 6 a été évaluée *in vitro*.

À mon arrivée au laboratoire, aucun test de neutralisation de l'activité biologique de la cytokine IL-1 β humaine n'était disponible. Par conséquent, j'ai mis en place un test sur la lignée cellulaire HEK-Blue™ IL-1 β . Ces cellules sécrètent de manière dose-dépendante de la phosphatase alcaline en réponse à l'IL-1 β humaine.

Dans un premier temps, la dose d'IL-1 β humaine nécessaire pour induire la production d'environ 80 % de la concentration maximale de phosphatase alcaline a été déterminée. D'après l'expérience (**Figure 30**), 320 pg/ml d'IL-1 β humaine sont nécessaires pour induire

cette production. Cette concentration d'hIL-1 β a donc été utilisée pour évaluer la capacité neutralisante des anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1 β 6.

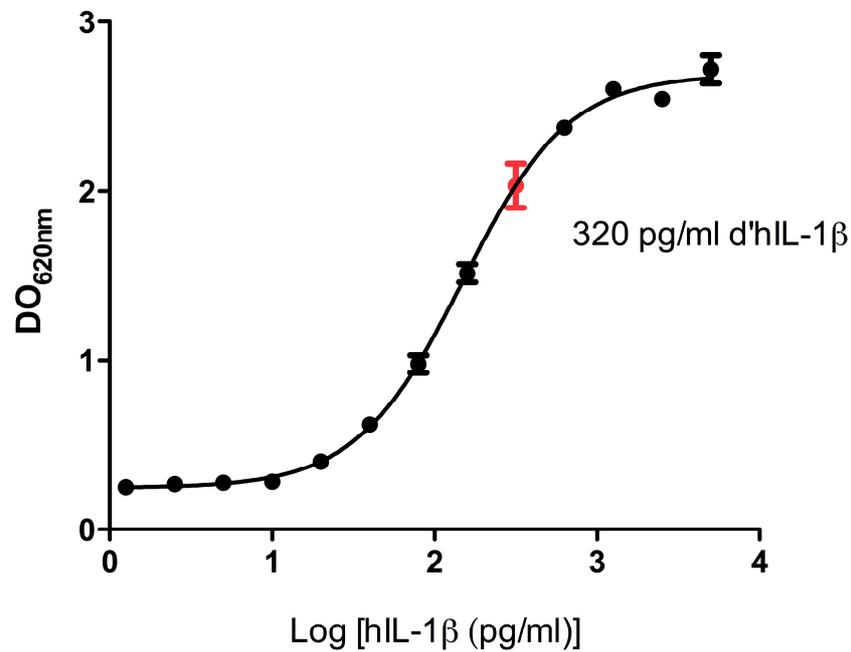


Figure 30 : Sécrétion dose-dépendante de phosphatase-alcaline par les cellules HEK-Blue™ IL-1 β , en réponse à l'hIL-1 β .

Après avoir déterminé la concentration efficace d'hIL-1 β , nous avons testé la capacité neutralisante des anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide hIL-1 β 6. Plusieurs dilutions d'anticorps purifiés ont été testées et les résultats sont présentés dans la **figure 31** et le **tableau 20**.

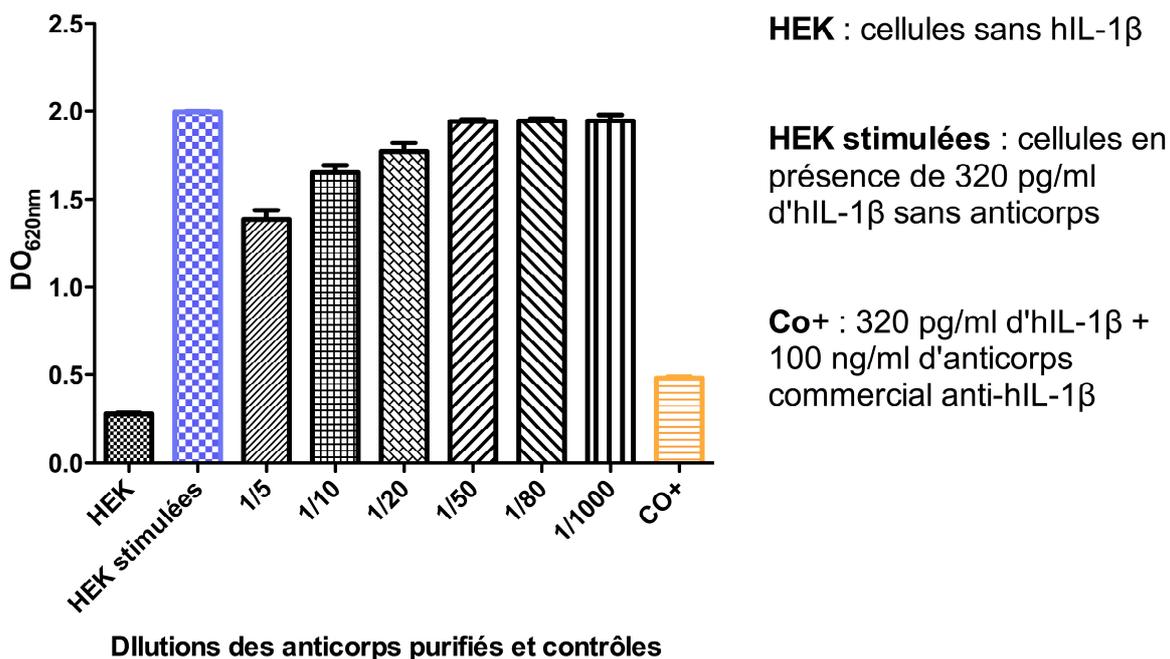


Figure 31 : Neutralisation de l'activité biologique de l'IL-1 β humaine par les anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1 β 6.

Dilutions des anticorps purifiés	% de neutralisation
1/5	35,4 %
1/10	19,8 %
1/20	13 %
1/50	0 %
1/80	0 %
1/1000	0 %
Contrôle de neutralisation (100 ng/ml)	88 %

Tableau 20 : Pourcentage de neutralisation de l'activité biologique de l'hIL-1 β par les anticorps purifiés du lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1 β 6.

Les anticorps purifiés de lapin immunisé contre le peptide couplé hIL-1 β 6 sont neutralisants aux dilutions les plus faibles (1/5, 1/10 et 1/20). À partir d'une dilution plus élevée, aucune neutralisation n'est observée.

L'ensemble de ces expériences *in vitro* démontrent que le peptide couplé hIL-1 β 6 est fortement immunogène et capable d'induire la production d'anticorps anti-peptide reconnaissant la cytokine entière. De plus, ces anticorps sont capables d'inhiber l'activité biologique de l'IL-1 β humaine *in vitro*.

2.3. Résultats obtenus dans un modèle murin de sclérose en plaques

L'effet protecteur des anticorps induits par immunisation active contre différents peptides de cytokine a été évalué dans un modèle murin de sclérose en plaques. Ce modèle, l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE) est réalisé chez des souris femelles C57BL/6, qui développent une EAE suite à une immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ suivie de deux injections de toxine pertussique. Les peptides testés sont :

- le peptide couplé mIL-1 β 6 dérivé de l'IL-1 β murine,
- le peptide couplé mIS200 dérivé de l'IL-6 murine,
- le peptide couplé m2K dérivé de la cytokine IL-23 murine.

2.3.1. Titres₅₀ anti-cytokine des souris C57BL/6 immunisées

Au cours de l'expérience, des souris sont décédées suite aux immunisations ou suite à la maladie (**Tableau 21**):

Groupes	Immunisation	Maladie
mIL-1 β 6	1	4*
m2K	2	2
mIS200	1	1
PBS	3	1
KLH	2	2

Tableau 21 : Nombre de souris décédées suite aux immunisations, et suite à la maladie. * une souris dans le groupe immunisé contre le peptide mIL-1 β 6 est décédée alors qu'elle ne présentait aucun symptôme de la maladie.

Les sérums des souris immunisées ont été prélevés après les quatre immunisations et lors du sacrifice, sur les souris survivantes, puis testés par ELISA pour la production d'anticorps anti-cytokine (**Figure 32**).

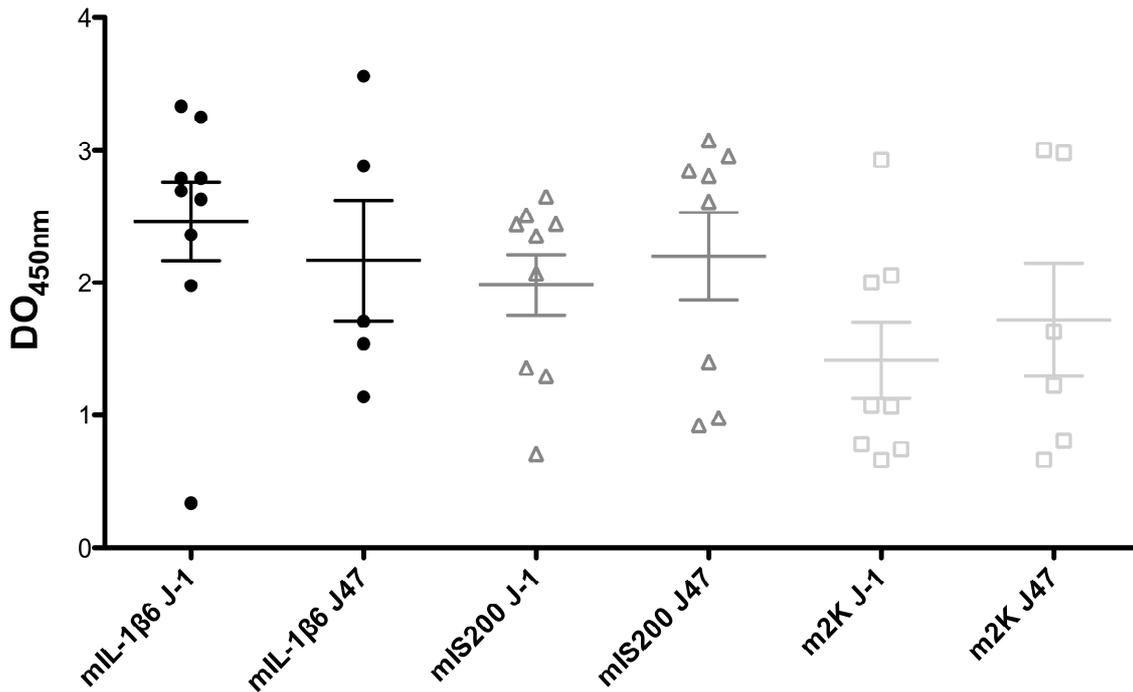


Figure 32 : Réponse ELISA anti-cytokine des souris immunisées contre les peptides mIL-1β6, mIS200 et m2K à J-1 (prélèvement intermédiaire réalisé après la 4^{ème} immunisation) et J45 (prélèvement final réalisé au sacrifice). Les sérums ont été dilués 50 fois.

Les souris immunisées contre les trois peptides ne produisent que peu d'anticorps dirigés contre la cytokine entière (titres₅₀ inférieurs à 1000) contrairement à ce qu'on a pu observer chez les souris OF1. Aucun anticorps anti-cytokine IL-6, IL-1β et IL-23 n'est produit par les souris contrôles immunisées contre le PBS et la KLH.

2.3.2. Suivi clinique des souris

Le temps avant la survenue de la maladie a été évalué entre les différents groupes. Au cours de cette expérience, on observe que la survenue de la maladie est significativement retardée pour le groupe de souris immunisées contre le peptide couplé m2K comparé au groupe de souris immunisées contre la KLH ($p=0,002$, Log-rank test) (**Figure 33**), mais pas entre les autres groupes.

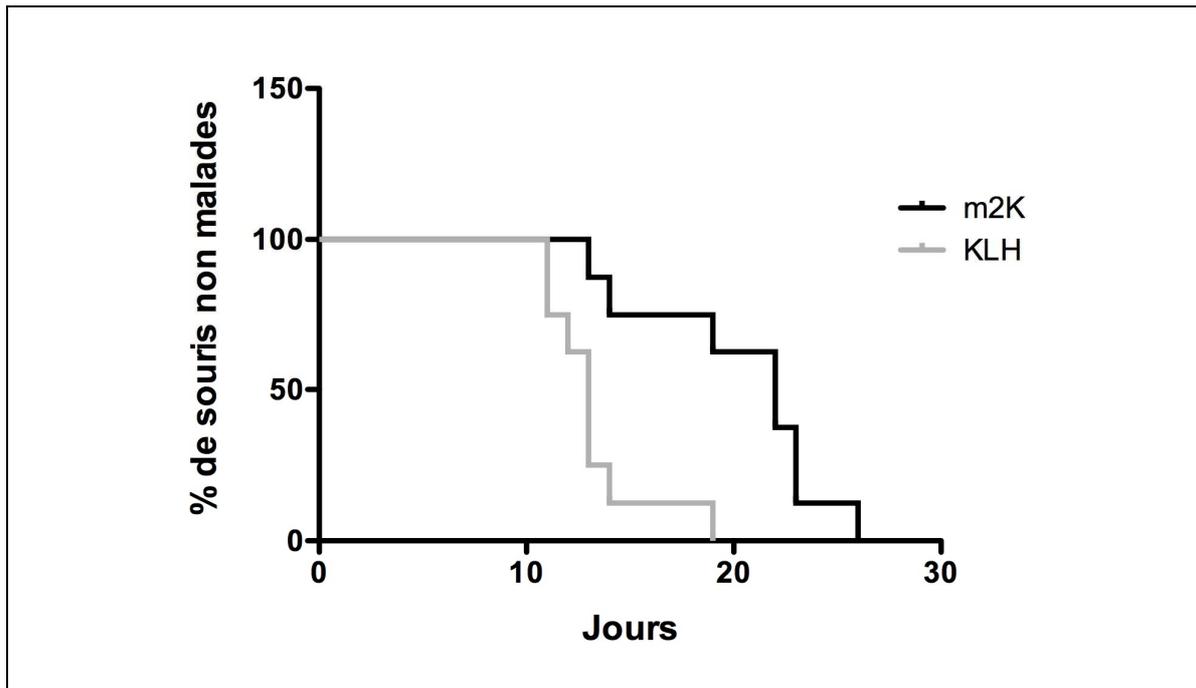


Figure 33 : Courbe de Kaplan-Meier représentant la survenue de la maladie dans les groupes de souris immunisées contre le peptide m2K et contre la KLH.

Durant le protocole d'EAE, l'évolution des signes cliniques, pour chaque souris, a été suivie à partir de l'immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ (J0) jusqu'à J45. (**Figure 34**).

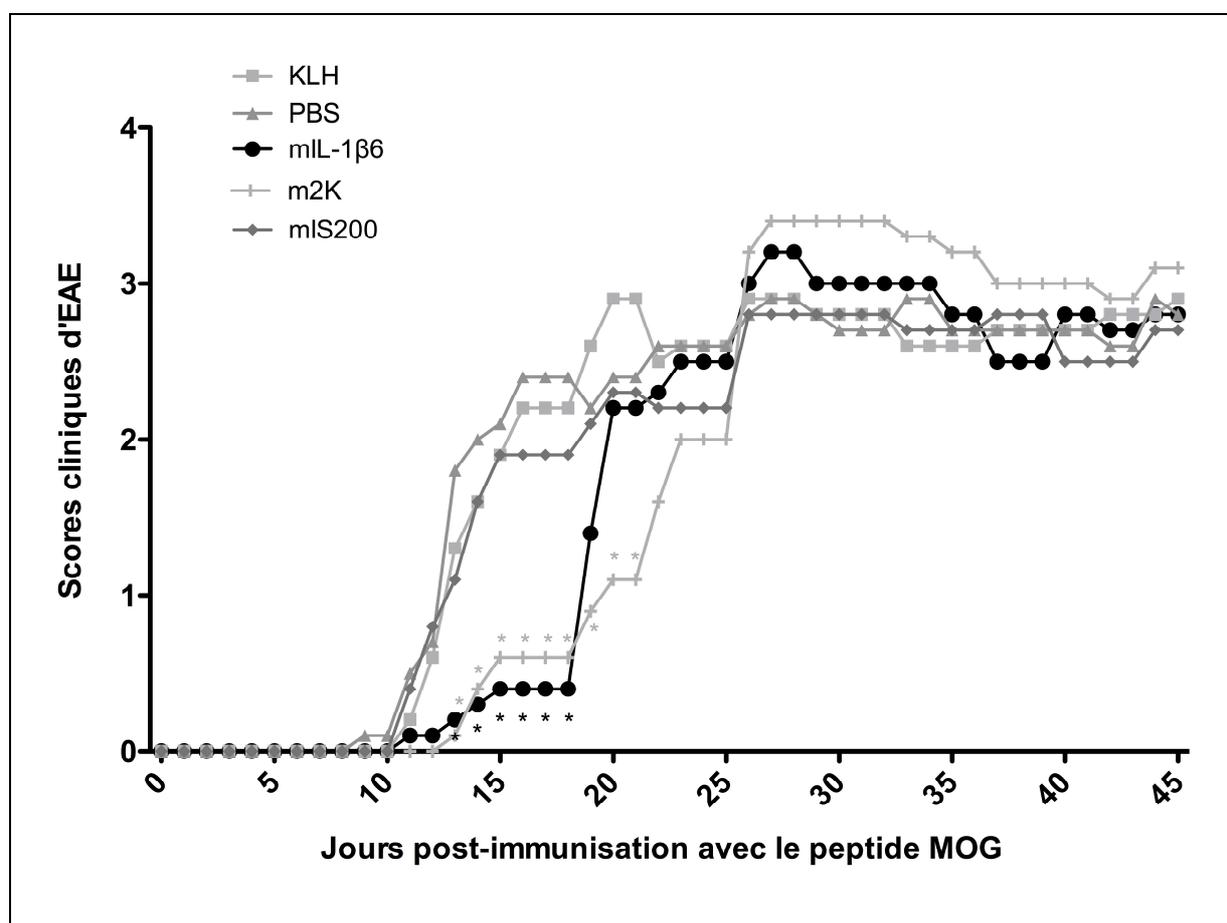


Figure 34 : Suivi des scores cliniques des souris immunisées contre les peptides couplés mIL-1β6, mIS200 et m2K. La moyenne des scores cliniques, au cours du temps, est présentée pour chaque groupe. * : $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney.

D'après le graphique, trois périodes peuvent être définies, une première phase asymptomatique, une phase de développement de la maladie et une phase de chronicité de la maladie. Nous pouvons observer lors de la phase de développement, une réduction significative de la sévérité de la maladie dans le groupe de souris immunisées contre le peptide couplé m2K comparé au groupe contrôle KLH entre J13 et J21. Une réduction significative de la sévérité de la maladie est également observée pour le groupe de souris immunisées contre le peptide mIL-1β6 entre J13 et J18. Aucune différence n'est retrouvée pour les autres groupes. Aucune différence significative n'est retrouvée entre les groupes lors de la phase de chronicité de la maladie.

D. Discussion

De nombreuses études ont mis en évidence l'implication des cytokines dans les maladies inflammatoires chroniques. Depuis quinze ans, les premiers traitements ciblés anti-cytokine ont été commercialisés. Il existe actuellement treize anticorps monoclonaux sur le marché qui ciblent les cytokines majeures (ou leur récepteur) impliquées dans les maladies inflammatoires chroniques telles que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6R ou encore l'IL-23. Ces traitements ciblés présentent plusieurs inconvénients tels que l'apparition d'effets secondaires, des coûts élevés, et surtout la non-réponse au traitement de certains patients et l'apparition de résistance. Ainsi un tiers des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, traités par des agents anti-TNF α , sont non-répondeurs aux traitements²⁰⁸ et un tiers deviennent résistants au cours du temps suite à l'induction d'anticorps anti-anticorps monoclonal²⁰⁹. C'est pourquoi, il reste nécessaire d'élargir l'offre thérapeutique pour les maladies inflammatoires chroniques et de proposer de nouvelles stratégies d'inhibition des cytokines.

L'une des alternatives proposées est la stratégie d'immunisation active anti-cytokine. Celle-ci a pour but d'induire la production, par l'organisme même du patient, d'anticorps capables de neutraliser l'activité biologique de la cytokine produite en excès et donc d'en réduire ses effets délétères. Paradoxalement, cette approche a été développée chez l'Homme dès 1990²¹⁰, avant même les anticorps monoclonaux anti-cytokine, mais elle a mis du temps à s'imposer comme stratégie d'inhibition potentielle des cytokines. Aujourd'hui, plusieurs équipes s'intéressent à cette méthode et les premiers essais cliniques utilisant des molécules entières de TNF α ou d'IFN α semblent confirmer l'innocuité de cette stratégie^{219,220}.

Compte tenu des inconvénients possibles liés à l'utilisation de cytokine entière comme immunogène (voir partie 5.2.3.3), notre laboratoire développe l'immunisation active à partir de peptides dérivés de cytokines. Plusieurs études avaient été menées chez la souris, ciblant le TNF α ²⁵⁰, l'IL-1 β ²²² et l'IL-23²²¹. C'est dans ce contexte que j'ai développé deux projets principaux au cours de ma thèse : le premier étant de développer un immunogène peptidique ciblant l'IL-6, le deuxième étant de continuer les travaux précédemment réalisés sur un peptide couplé dérivé de l'IL-1 β .

1. Expérimentations réalisées dans le cadre du projet d'immunisation active anti-IL-6

1.1. Pertinence de la stratégie de sélection *in silico* des peptides

A partir des cinq peptides sélectionnés dérivés de l'IL-6 murine, nous avons montré que l'immunisation active contre l'un d'entre eux était capable de conférer une protection *in vivo* chez la souris et l'immunisation active contre son équivalent humain était capable de moduler l'inflammation chez le macaque. Ces résultats confirment la pertinence de notre stratégie de sélection des peptides au niveau des boucles de cytokine avec une taille supérieure à 10 acides aminés. Une avancée majeure de ces travaux est la capacité à reproduire avec les peptides humains hIS200 et hIL-1 β 6 les résultats obtenus avec les équivalents murins en terme d'immunogénicité. Jusqu'alors, les équivalents humains des peptides immunogènes, identifiés chez la souris (dérivés du TNF α et de l'IL-23), se sont avérés non immunogènes chez l'animal. En effet, il n'existe qu'une faible identité de séquence entre les peptides murins et humains du TNF α et de l'IL-23. Le (ou les) épitope(s) immunogène(s) présent(s) dans la séquence du peptide murin n'étaient pas forcément retrouvés dans la séquence du peptide humain. Cette observation suggère l'importance de sélectionner des peptides ayant une bonne conservation entre les séquences murine et humaine, dans le but de pouvoir à terme transposer cette approche chez l'Homme.

1.2. Evaluation de l'immunogénicité des peptides couplés

Après l'étape de sélection *in silico* des peptides, ces derniers sont testés pour leur immunogénicité chez la souris et le lapin, autrement dit pour leur capacité à induire la production d'anticorps reconnaissant la cytokine entière.

Nous avons initialement sélectionné cinq peptides dérivés de l'IL-6 murine dont nous avons testé l'immunogénicité après les avoir couplés à une protéine porteuse, la KLH. L'immunisation contre l'un d'entre-eux, le mIS200, a entraîné la production d'anticorps capables de reconnaître la cytokine entière chez la souris (titres₅₀ anti-cytokine : 3964-138-7177-26608) et chez le lapin (titres₅₀ anti-cytokine : 6517-5049).

Pour une question de coût et de capacité d'hébergement dans l'animalerie, nous nous limitons à l'immunisation de quatre souris par peptide testé. Bien que le nombre de souris soit

faible, cette étude nous a permis de discriminer les peptides couplés immunogènes des peptides couplés non immunogènes.

Cependant, dans certains cas, bien que le peptide couplé soit immunogène, seules deux souris sur les quatre immunisées produisent des anticorps anti-peptide reconnaissant la cytokine. Cette hétérogénéité de réponse pourrait être due à la qualité des immunisations. Toutefois, toutes les souris développent des anticorps dirigés contre la KLH. C'est pourquoi l'hétérogénéité de réponse serait plutôt attribuée à la souche de souris utilisée (OF1) qui est non consanguine. Les souris ne présentant pas le même fond génétique, une hétérogénéité de réponse est donc possible. Nous pourrions choisir de travailler sur une lignée consanguine afin d'homogénéiser les réponses anticorps, cependant nous n'aurions plus la possibilité de tester la robustesse de notre protocole face à la diversité génétique, comme elle existe chez l'Homme. Dans tous les cas, il serait préférable de travailler sur un plus grand nombre de souris.

En ce qui concerne les lapins, compte tenu du coût du protocole d'immunisation (1000 euros/lapin), un seul lapin a été immunisé par peptide. L'immunisation de lapins est utilisée en complément de l'immunisation des souris. Elle permet d'une part, de confirmer les résultats obtenus et d'autre part, d'obtenir une quantité de sérum suffisante pour effectuer une purification des anticorps, préférable pour les tests cellulaires. Idéalement, il serait nécessaire à l'avenir d'immuniser plusieurs lapins par peptide par souci de reproductibilité.

1.3. Neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 *in vitro*

La neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 a été évaluée dans un test cellulaire utilisant la lignée d'hybridomes murins (lignée B9) qui prolifèrent en réponse à l'IL-6. J'ai mis au point ce test au laboratoire en déterminant avec précision la concentration d'IL-6 suffisante pour permettre la prolifération des cellules mais suffisamment basse pour ne pas masquer la potentielle capacité neutralisante des anticorps anti-cytokine produits.

Sensibilité du test

L'un des avantages de ce test est sa sensibilité, il ne nécessite en effet que 2 pg/ml et 3,5 pg/ml respectivement de cytokine murine et humaine pour induire 80 % de la prolifération maximale des cellules. Cependant, il ne permet pas d'évaluer la capacité neutralisante des anticorps anti-cytokine contenus dans les sérums de souris. Une première limite est la quantité

de sérum récupérée au sacrifice. Celle-ci est bien souvent insuffisante pour pouvoir réaliser un test de neutralisation. De plus, l'utilisation directe des sérums sans purification conduit souvent à des interférences (mort des cellules, bruit de fond important) rendant difficile la réalisation des tests cellulaires. Enfin, l'IL-6 endogène contenue dans les sérums suffit à induire la prolifération maximale des cellules B9, la cytokine se trouvant alors en excès. Il est par conséquent impossible d'observer les capacités neutralisantes les plus faibles. Il aurait fallu purifier les sérums de souris mais au vu de la faible quantité de sérum récupérée, cette étape n'a pas pu être réalisée.

Capacité neutralisante des anticorps purifiés de lapin

En revanche, nous avons testé la capacité neutralisante des anticorps purifiés de lapins immunisés contre les peptides dérivés de l'IL-6 murine, mais aucun d'entre eux ne s'est avéré neutralisant. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées afin de justifier ces observations :

- les anticorps anti-cytokine produits par les lapins ne sont pas neutralisants,
- la quantité d'anticorps produite ne suffit pas à neutraliser l'activité biologique de la quantité d'IL-6 utilisée pour le test.

1.4. Modèle murin de sclérodémie systémique induite par la blémomycine

Pourquoi avoir choisi de travailler sur la sclérodémie systémique ?

La sclérodémie systémique est une maladie orpheline, il n'existe actuellement aucun traitement disponible. En raison de ses pronostics vital et fonctionnel particulièrement défavorables, il est important de mettre au point une thérapie efficace pour les patients.

L'implication de l'IL-6 dans la pathogenèse de la maladie a été démontrée. Une élévation des taux sériques d'IL-6¹³⁷ et de sIL-6R²⁶¹ a pu être observée chez les patients. L'IL-6 participe, par le mécanisme de *trans-signalling*, à l'activation des cellules endothéliales et des fibroblastes. Les cellules endothéliales vont, en réponse à l'IL-6, augmenter la sécrétion de chimiokines (IL-8, MCP-1) et augmenter l'expression des molécules d'adhésion²⁶², favorisant le recrutement des monocytes. Les fibroblastes vont sécréter des constituants de la MEC²⁶³ en abondance, conduisant au phénomène de fibrose.

Modèle de fibrose induite par la bléomycine

Ce modèle consiste à injecter tous les deux jours 0,5 mg/ml de bléomycine par voie sous-cutanée dans le dos des animaux. La bléomycine entraîne la production de dérivés réactifs de l'oxygène qui vont endommager les cellules environnantes telles que les cellules endothéliales et avoir pour conséquences le recrutement de leucocytes et l'activation des fibroblastes résidents²⁶⁴. Ces derniers sont à l'origine de la production abondante de protéines de la MEC conduisant à la fibrose dermique. Nous avons choisi de tester l'effet protecteur potentiel du peptide couplé mIS200 dans ce modèle pour plusieurs raisons :

- l'intérêt de cibler l'IL-6 a été précédemment démontré par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL-6R qui s'est avéré protecteur,²⁶⁰
- ce modèle était maîtrisé par l'équipe du Pr. Allanore qui travaille également à l'Hôpital Cochin,
- le peptide murin mIS200 était le peptide le plus immunogène chez la souris et le lapin en terme de titres₅₀ évalués en ELISA. Bien que nous n'ayons pas montré de capacité neutralisante *in vitro* des anticorps anti-cytokine produits suite aux immunisations contre ce peptide chez le lapin, nous avons toutefois décidé de tester son effet protecteur potentiel *in vivo*. En effet, nous avons pu observer par le passé qu'on pouvait ne pas observer de neutralisation *in vitro* tout en obtenant un effet protecteur *in vivo*²⁵⁰. Cela pourrait s'expliquer par la quantité d'anticorps utilisée lors des tests de neutralisation *in vitro* qui peut être insuffisante par rapport à la concentration en cytokine utilisée. Une autre explication réside dans le fait que des mécanismes d'élimination des complexes cytokine/anticorps formés, qui ont lieu *in vivo*, tels que l'opsonisation, ne peuvent être observés dans nos tests *in vitro*.

Le modèle de fibrose induite à la bléomycine nous a permis de montrer que l'immunisation active de souris contre le peptide couplé mIS200 entraînait une réduction significative de l'épaississement dermique et du contenu en collagène contrairement aux souris contrôles. De plus, chez ces souris, nous avons observé une réduction significative du nombre de myofibroblastes. Les myofibroblastes sont impliqués dans la production des constituants de la MEC aboutissant au phénomène de fibrose. L'IL-6 semble impliquée dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. La diminution de leur nombre pourrait donc expliquer les résultats obtenus. En parallèle, nous avons comparé l'effet de notre composition vaccinale avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-6R, le MR16-1, dont l'efficacité dans ce modèle avait préalablement été démontrée²⁶⁰. Un effet protecteur similaire

a été observé entre les deux traitements. Enfin, un dosage de l'IL-6 au niveau de la peau a été réalisé. Nous avons pu mettre en évidence une réduction des taux d'IL-6 chez les souris immunisées contre le peptide mIS200. Cependant, ces résultats n'ont pas pu être exploités car la différence entre le groupe contrôle négatif (souris immunisées contre la KLH et injectées avec du NaCl) et le groupe contrôle positif (souris immunisées contre la KLH et injectées avec de la bléomycine) n'était pas significative. Il serait peut être intéressant de reproduire le modèle en induisant une fibrose plus importante en augmentant la fréquence des injections ou la concentration de bléomycine. De plus, il semble important de mettre au point un autre test de neutralisation *in vitro* pouvant permettre de tester la capacité neutralisante des sérums murins. Enfin, ces résultats confirment qu'il est important de continuer à tester *in vivo* des peptides couplés capables d'induire la production d'anticorps anti-cytokine, même s'il n'est pas aisé de démontrer la capacité neutralisante des anticorps produits *in vitro*.

Critique du modèle de fibrose induite par la bléomycine

Le modèle de fibrose induite par la bléomycine utilisé dans cette étude est un modèle où la fibrose se limite au site d'injection et ne reflète pas les propriétés systémiques de la maladie. Il serait donc intéressant de tester l'effet protecteur du peptide couplé mIS200 dans un modèle reflétant les caractéristiques systémiques de la maladie. Il faut également noter que nous avons réalisé un protocole de type préventif. Or, chez l'Homme, le traitement serait fait de façon thérapeutique. Il semble donc important de montrer une efficacité de l'immunisation active anti-IL-6 dans un protocole à calendrier plus « thérapeutique ». Nous pourrions pour cela envisager de réaliser la primo-immunisation des animaux en même temps que la première injection de bléomycine, la maladie persistant au moins 6 semaines au-delà de l'arrêt des injections.

1.5. Etude menée chez le macaque cynomolgus

Dans le but de pouvoir transposer l'approche d'immunisation active anti-IL-6 chez l'Homme, nous avons fait synthétiser l'équivalent humain du peptide murin, le hIS200. Nous avons, dans un premier temps, montré que l'immunisation active avec le peptide couplé hIS200 induisait la forte production d'anticorps anti-hIL-6 chez la souris et chez le lapin (titres₅₀ anti-cytokine : 14342). De plus, les anticorps purifiés anti-cytokine produits chez le

lapin étaient capables de neutraliser *in vitro* 50 % de l'activité biologique de 3,5 pg/ml d'IL-6 humaine au 1/5^{ème}.

Nous avons ensuite réalisé une étude chez une espèce génétiquement plus proche de l'Homme, le macaque cynomolgus, dont les buts étaient d'évaluer :

- l'immunogénicité du peptide couplé hIS200,
- l'innocuité de l'immunisation active contre le peptide couplé hIS200,
- la capacité des anticorps produits à moduler les réactions inflammatoires locales suite à l'induction d'une réaction d'HSR.

Les singes immunisés contre le peptide couplé hIS200 ont produit des taux élevés d'anticorps anti-cytokine et ont montré une réduction significative des signes cliniques de la réaction inflammatoire locale suite à l'induction d'une réaction d'HSR. Aucun effet secondaire n'a été reporté au cours de l'étude.

Tests complémentaires in vitro

Nous avons testé la capacité neutralisante des anticorps purifiés des singes immunisés contre le peptide couplé hIS200 mais ceux-ci se sont avérés non neutralisants *in vitro*. Ces résultats sont en apparence contradiction avec les résultats obtenus chez le lapin. Cependant, les taux d'anticorps anti-cytokine produits chez le lapin sont nettement supérieurs à ceux produits chez le singe. Par conséquent, comme la neutralisation observée chez le lapin n'est que de 50 % au 1/5^{ème} avec des titres₅₀ anti-cytokine de l'ordre de 14000, il est possible que la quantité d'anticorps purifiés chez le singe (titres₅₀ anti-cytokine de l'ordre de 2000) ne suffisent pas à observer une neutralisation de la cytokine *in vitro*.

Afin d'étudier les effets de l'immunisation active anti-IL-6, les taux sériques de la cytokine ont été évalués et nous avons pu observer une légère augmentation chez le groupe de singe immunisé contre le peptide couplé hIS200. Il faut souligner qu'il a été observé avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-IL-6, la formation de complexes immuns conduisant à une augmentation des taux d'IL-6 sériques, ainsi qu'une augmentation de la demi-vie de la cytokine²⁶⁵. Chez la souris, cet effet a été réduit par l'injection simultanée de plusieurs anticorps monoclonaux anti-IL-6 reconnaissant des épitopes différents²⁶⁶. Ainsi, il semble important de vérifier si, chez le singe, le phénomène est reproduit avec un plus grand nombre d'animaux et si l'augmentation est statistiquement significative par rapport aux contrôles.

Enfin, une critique à apporter sur cette étude est bien sur le nombre limité d'animaux immunisés par groupe. En effet, pour des raisons de coût, nous n'avons pu inclure que quatre

singes par groupe. Bien que nous obtenions des résultats statistiquement significatifs avec aussi peu d'animaux, il serait toutefois utile de reproduire cette étude avec un plus grand nombre de singes. Des biopsies cutanées pourraient également être réalisées au niveau des sites d'injection du vaccin tétanique Pasteur afin d'étudier l'infiltrat inflammatoire local ainsi que les cytokines.

2. Expérimentations réalisées dans le cadre du projet d'immunisation active anti-IL-1 β

2.1. Intérêt du peptide humain hIL-1 β 6 identifié

Les remarques générales faites sur le nombre de souris et de lapins utilisés dans le cadre de l'immunisation active anti-IL-6 s'applique également à ce projet.

Dans le but de pouvoir transposer à l'Homme les résultats obtenus chez la souris avec le peptide couplé mIL-1 β 6, l'équivalent humain : le hIL-1 β 6, a été synthétisé. Nous avons pu observer une forte production d'anticorps anti-cytokine chez les souris immunisées (titres₅₀ anti-cytokine : 0-6171-0-10518) ainsi que chez le lapin (titres₅₀ anti-cytokine : 79148). Ces anticorps se sont avérés capables de neutraliser *in vitro* l'activité de 320 pg/ml d'hIL-1 β 6 (35 %, 19,8 % et 13 % respectivement aux dilutions 1/5^{ème}, 1/10^{ème} et 1/20^{ème}). En revanche, aucune neutralisation n'a pu être observée avec les sérums de souris immunisées contre le peptide hIL-1 β 6. Ceci peut s'expliquer par la quantité d'anticorps produits chez la souris et la sensibilité du test. En effet, les anticorps de lapin ayant un titre₅₀ anti-cytokine de 79148, ne sont capables de neutraliser que 35 % de l'activité biologique de 320 pg/ml d'hIL-1 β . Il n'est donc pas surprenant que chez des souris ayant au maximum un titre₅₀ anti-cytokine de 10000 (soit 8 fois moins que le lapin), qu'aucune capacité neutralisante ne soit observée.

Il serait maintenant intéressant de tester, comme pour le peptide hIS200, l'immunogénicité du peptide couplé hIL-1 β 6 chez le macaque cynomolgus et d'évaluer la modulation des réactions inflammatoires locales suite à une réaction d'HSR. Il a en effet été montré chez la souris que l'IL-1 β est impliquée, au cours d'une réaction d'HSR, dans l'activation des cellules T spécifiques de l'antigène²⁶⁷ et elle est retrouvée chez l'Homme, comme l'IL-6, au niveau des sites de rappel sécrétée par les macrophages²⁶⁸.

2.2. Modèle d'EAE induit par le peptide MOG₃₅₋₅₅

Ce modèle consiste à injecter du peptide MOG₃₅₋₅₅ à la base de queue de la souris suivi de deux injections de toxine pertussique. Nous avons choisi de tester dans ce modèle l'effet protecteur de trois peptides couplés : le mIS200 (IL-6), le mIL-1 β 6 (IL-1 β) et le m2K (IL-23).

Les résultats obtenus dans cette première expérience sont encourageants. Un retard significatif de la survenue de la maladie a été observé pour le groupe de souris immunisées contre le peptide m2K. De plus, une diminution significative de la sévérité de la maladie chez les souris immunisées contre les peptides mIL-1 β 6 et m2K a été observée lors de la phase de développement. Toutefois les souris ne sont pas totalement protégées et finissent par présenter des signes cliniques identiques aux contrôles. En revanche, aucune modification des scores cliniques n'a pu être observée chez les souris immunisées contre le peptide mIS200.

Discussion sur les résultats obtenus

Les résultats obtenus avec les peptides couplés mIL-1 β 6 et m2K peuvent s'expliquer par la mise en évidence de l'implication des cytokines IL-1 β et IL-23 dans l'EAE, précédemment démontrée. L'IL-1 joue un rôle central dans la différenciation des lymphocytes en sous-type Th17 qui participent à la pathogenèse de la maladie et des souris déficientes en IL-1 β RI déclenchent une EAE atténuée¹⁷⁵. Une élévation des taux d'IL-23 a été observée dans le sérum et les fluides cérébraux de patients¹⁷⁴. Des souris traitées avec un anticorps anti-IL-23p40 développent une EAE moins sévère que les contrôles¹⁷⁷.

Il a également été montré que des souris KO pour l'IL-6 sont résistantes à l'induction de l'EAE avec le peptide MOG^{179,180} et que le blocage de l'IL-6 avec l'anticorps monoclonal MR16-1 inhibe le développement de l'EAE ainsi que la différenciation des lymphocytes de types Th1 et Th17¹⁸¹. En revanche, une étude d'immunisation active utilisant un ensemble d'analogues de l'IL-6 comme immunogène a permis de retarder le déclenchement de la maladie mais les souris ne sont pas protégées de son développement²⁶⁹ alors que de fortes concentrations d'anticorps neutralisants sont produites.

L'absence de protection observée chez les souris immunisées contre le peptide mIS200 ainsi que la protection partielle obtenue avec les peptides mIL-1 β 6 et m2K pourraient s'expliquer par une production trop faible d'anticorps anti-cytokine (titres₅₀ inférieurs à 1000). Cette observation peut être due, tout d'abord, à la souche de souris utilisée au cours de l'expérience. Nous utilisons ici des souris C57BL/6 chez lesquelles nous avons toujours observé une production plus faible d'anticorps comparés aux souris OF1. De plus, la primo-

immunisation a été réalisée en IFA et non en CFA comme pour les souris OF1 car l'induction de l'EAE nécessite l'injection du peptide MOG₃₅₋₅₅ émulsifié en CFA. Or, il n'est pas possible d'injecter aux souris deux fois du CFA, cela provoque une douleur trop intense et risquerait d'entraîner la formation d'abcès au niveau des sites d'injection. La primo-immunisation a donc été réalisée en IFA ce qui pourrait expliquer la faible production d'anticorps. Pour remédier à ce problème, nous envisageons d'augmenter l'immunogénicité de nos peptides couplés (voir paragraphe 4 ci-dessous).

Critique du modèle murin d'EAE

Plusieurs critiques peuvent être formulées quant à l'utilisation de ce modèle murin d'EAE qui est censé mimer les caractéristiques de la sclérose en plaques. La sclérose en plaques est une maladie complexe présentant des phénotypes cliniques, pathologiques et immunologiques variés. Il existe différentes formes caractérisées par des dommages de types différents, ciblant uniquement la matière blanche ou pouvant aussi toucher la matière grise. L'ensemble des mécanismes à l'origine de ces dommages sont hétérogènes, conduisant à des profils de démyélinisation différents suivant les patients. Bien que les modèles d'EAE permettent de reproduire certains aspects cliniques, neuropathologiques ou encore immunologiques, il reste difficile de transposer directement à l'Homme ce que nous observons chez l'animal. De plus, nous avons réalisé un modèle d'EAE chez la lignée de souris C57BL/6 qui est consanguine. Bien que bénéfique pour la reproductibilité des expérimentations, l'hétérogénéité génétique que l'on retrouve dans une population naturelle n'est pas représentée.

La maladie est induite par immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ émulsionné en CFA. C'est une maladie qui, contrairement à l'Homme, n'est pas spontanée et qui ne reflète que la forme chronique progressive et non la forme rémittente.

L'immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ induit à la fois une réponse T mais également la production d'anticorps dirigés contre la myéline. Ces réponses cellulaires et humorales reproduisent ainsi les manifestations cliniques et pathologiques associées à la sclérose en plaques²⁷⁰. Cependant, les souris C57BL/6 ont une capacité limitée à produire des anticorps dirigés contre la myéline lorsqu'elles sont immunisées avec du peptide MOG₃₅₋₅₅ de rat²⁷¹. La réponse humorale n'est donc que peu représentée dans ce modèle.

Les résultats obtenus au cours de cette expérience, bien que probants, devront être reproduits car ils ne sont issus que d'une seule expérience. Comme pour le modèle de sclérodermie, il pourra être intéressant de réaliser en plus d'une approche préventive une

approche thérapeutique avec ces peptides dans ce modèle d'EAE en décalant le calendrier d'immunisation.

3. Intérêt de l'immunisation active à base de peptides de cytokines comparé aux autres stratégies anti-cytokine.

Ce travail de thèse a montré la possibilité de cibler l'IL-6 et l'IL-1 β par l'approche d'immunisation active à base de peptides de cytokines afin de bloquer leurs effets néfastes au cours du développement de maladies inflammatoires chroniques. Il confirme la pertinence de la méthode mise en place pour sélectionner les peptides de cytokines et pour la première fois, ces travaux montrent la faisabilité de cette stratégie innovante chez des primates non humains, permettant d'envisager une future transposition chez l'Homme. En effet, le peptide humain dérivé de l'IL-6 présente 100 % d'identité avec le peptide de macaque, nous pouvons donc considérer que nous étions dans un modèle "autologue". Les résultats obtenus sont très encourageants et nous pouvons imaginer obtenir des résultats semblables chez l'Homme.

Intérêt face aux anticorps monoclonaux

Compte tenu des résultats obtenus, ce travail de thèse conforte l'intérêt de cibler les cytokines par l'approche d'immunisation active anti-peptide, qui pourrait s'avérer être une bonne alternative à l'utilisation des anticorps monoclonaux. En effet, par cette approche une réponse anti-anticorps n'est pas attendue, il en résulterait une diminution de l'apparition de résistances aux traitements. Cette stratégie a également pour avantage d'avoir des procédés de fabrication et d'administration relativement simples et de ne nécessiter que de faibles quantités d'immunogène (entre 100 et 300 μ g par immunisation), entraînant une diminution des coûts.

Intérêt face à l'utilisation de cytokine entière comme immunogène

Par rapport à l'utilisation de cytokines entières comme immunogènes, la stratégie d'immunisation active à base de peptides présente plusieurs avantages : une plus grande simplicité de production et donc une réduction des coûts, un risque plus faible de développer une immunité T compte tenu de la petite taille des peptides et enfin, un risque plus faible d'entraîner la production d'anticorps pouvant cross-réagir avec d'autres protéines du « Soi ».

4. Perspectives

Aujourd'hui, nous obtenons une réponse clinique significative chez l'animal avec la production d'une quantité d'anticorps anti-cytokine qui reste modeste. La durée de protection n'est pas encore établie clairement car les expérimentations réalisées chez le singe n'ont pu durer que quatre mois, et il faudrait faire de nouvelles études plus longues chez le singe et/ou chez la souris pour déterminer plus précisément la fréquence des rappels.

Afin d'accroître les taux de production d'anticorps anti-cytokine, nous envisageons d'explorer le couplage de nos peptides d'intérêt à une pseudo particule virale (VLP). Il a été montré que l'organisation ainsi que la répétition d'un auto-antigène sont des éléments importants pour l'induction d'une réponse B²⁷². Dans le cas des VLPs la réponse B est identique que ce soit contre le peptide du « Soi » ou contre la pseudo particule virale. Le couplage de nos peptides d'intérêt à un VLP pourrait donc permettre une exposition répétée et organisée et ainsi accroître encore l'amplitude de la réponse B tout en évitant de co-injecter un adjuvant. En effet, les souris comme les hommes immunisés avec la même dose de vaccin développent des taux d'auto-anticorps similaires²³⁴. L'innocuité de la stratégie utilisant les VLPs a été montré au cours de plusieurs essais cliniques^{273,274} où aucun effet secondaire majeur n'a été déclaré.

Enfin, nous continuerons à étendre l'immunisation active à base de peptides dérivés de cytokines à d'autres modèles de maladies inflammatoires chroniques et à élargir notre approche à d'autres cytokines d'intérêt.

E. Conclusion

Compte tenu des inconvénients posés par les traitements conventionnels (efficacité limitée) ou par les anticorps monoclonaux (résistance), il est impératif de diversifier l'offre thérapeutique existante pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques.

Les travaux exposés dans ma thèse correspondent au développement d'une alternative innovante, l'immunisation active à base de peptides de cytokines. Au cours de ma thèse, j'ai été amenée à travailler sur deux cytokines majeures de l'immunité, l'IL-6 et l'IL-1 β dont l'implication dans la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques a précédemment été démontrée.

Pour mener à bien mon projet, j'ai dû mettre au point plusieurs tests *in vitro* et me familiariser avec les techniques d'expérimentations animales. J'ai ainsi été amenée à mettre en place plusieurs modèles animaux de maladies inflammatoires chroniques au laboratoire et à établir des collaborations pour acquérir de nouveaux savoir-faire. Suite à la mise en place de tous ces outils, j'ai pu identifier un peptide dérivé de l'IL-6 murine, le mIS200, fortement immunogène et ayant un effet protecteur dans un modèle murin de sclérodémie systémique identique à celui de l'anticorps anti-IL-6R de référence.

Une des avancées majeures de ces travaux est la réalisation d'une étude chez le macaque cynomolgus. Les singes immunisés contre l'équivalent humain du peptide murin, le hIS200 (identique au peptide de macaque) ont produit des anticorps anti-IL-6 capables de moduler significativement les réactions inflammatoires locales suite à l'induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée.

En parallèle, bien que les résultats doivent être reproduits, j'ai aussi montré que l'immunisation active contre deux peptides dérivés de l'IL-1 β et de l'IL-23 conduit à la réduction de la sévérité des symptômes de l'EAE.

Ce travail conforte l'intérêt de cibler les cytokines par l'approche d'immunisation active à base de peptides de cytokines et confirme la pertinence de notre démarche. Les résultats positifs obtenus avec le peptide couplé hIS200 chez le singe permettent d'envisager, à moyen terme, la réalisation d'un essai clinique anti-IL-6.

Ce travail ouvre aussi de nouvelles pistes de recherche comme l'optimisation de notre approche en augmentant l'immunogénicité de nos peptides (par exemple par VLP), l'extension de l'immunisation active anti-IL-6 à d'autres modèles animaux de maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'élargissement de l'approche à d'autres cytokines d'intérêt.

Pour conclure, ces travaux de thèse auront constitué pour moi un apprentissage particulièrement enrichissant au cours desquels j'ai pu acquérir des compétences très diversifiées. J'ai eu le plaisir de participer aux recherches sur une thématique d'actualité et qui je l'espère pourra, à terme, trouver une application chez l'Homme.

Bibliographie

1. Kopf, M. *et al.* Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* **362**, 245–248 (1993).
2. Schmitt, E., Hoehn, P., Germann, T. & Rüde, E. Differential effects of interleukin-12 on the development of naive mouse CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* **24**, 343–347 (1994).
3. McGeachy, M. J. & Cua, D. J. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity* **28**, 445–453 (2008).
4. Boschetti, G., Nancey, S., Kanjarawi, R. & Almeras, T. Réponses immunitaires au cours des MICI: implication de l'axe IL-23/Th17. *Hépatogastro & ...* (2012).
5. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Kuby, J. & Osborne, B. A. *Immunologie*. (2003).
6. Ramadori, G., Van Damme, J., Rieder, H. & Meyer zum Büschenfelde, K. H. Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1259–1264 (1988).
7. Sprent, J. & Kishimoto, H. The thymus and central tolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **356**, 609–616 (2001).
8. Park, Y., Moon, Y. & Chung, H.-Y. AIRE-1 (autoimmune regulator type 1) as a regulator of the thymic induction of negative selection. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1005**, 431–435 (2003).
9. Halverson, R., Torres, R. M. & Pelanda, R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol* **5**, 645–650 (2004).
10. Schwartz, R. H. T-cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
11. Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 253–257 (2003).
12. Shlomchik, M. J. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* **28**, 18–28 (2008).
13. Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T. & Vilen, B. J. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 633–643 (2007).
14. Bennett, I. J. & Beeson, P. B. Studies on the pathogenesis of fever : I. the effects of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits. *J. Exp. Med.* **98**, 477 (1953).
15. Cohen, S., Levi-Montalcini, R. & Hamburger, V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **40**, 1014 (1954).
16. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **147**, 258–267 (1957).
17. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749–795 (1997).
18. Christ, M. *et al.* Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J. Immunol.* **153**, 1936–1946 (1994).
19. Leonard, E. J. & Yoshimura, T. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2**, 479–486 (1990).
20. Arend, W. P., Palmer, G. & Gabay, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.* **223**, 20–38 (2008).
21. Gay, N. J. & Keith, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* (1991).
22. Sims, J. E. *et al.* cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* **241**, 585–589 (1988).
23. Greenfeder, S. A. *et al.* Molecular cloning and characterization of a second subunit of

- the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 13757–13765 (1995).
24. 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).
 25. Cullinan, E. B. *et al.* IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J. Immunol.* **161**, 5614–5620 (1998).
 26. Yin, T. *et al.* Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *J. Immunol.* **151**, 2555–2561 (1993).
 27. Gearing, D. P. *et al.* The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* **255**, 1434–1437 (1992).
 28. Noguchi, M. *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* **262**, 1877–1880 (1993).
 29. Russell, S. M. *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* **262**, 1880–1883 (1993).
 30. Plataniias, L. C., Uddin, S., Domanski, P. & Colamonici, O. R. Differences in interferon alpha and beta signaling. Interferon beta selectively induces the interaction of the alpha and betaL subunits of the type I interferon receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 23630–23633 (1996).
 31. 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).
 32. 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).
 33. Orlicki, J. R., Vaishnav, A. K. & Elkon, K. B. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int. Rev. Immunol.* **18**, 293–308 (1999).
 34. Gross, J. A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R. & Dillon, S. R. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* (2000).
 35. Lebman, D. A. & Coffman, R. L. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J. Exp. Med.* **168**, 853–862 (1988).
 36. Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M. & Huston, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* **145**, 3796–3806 (1990).
 37. Callard, R. E. B-cell growth and differentiation factors. *Dev. Biol. Stand.* **69**, 43–49 (1988).
 38. Tsuji, K. *et al.* Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of ‘connective tissue-type’ mast cells: interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 triggers and supports their proliferation synergistically with interleukin-3. *Blood* **75**, 421–427 (1990).
 39. Vercelli, D., Jabara, H. H., Lauener, R. P. & Geha, R. S. IL-4 inhibits the synthesis of IFN-gamma and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J. Immunol.* **144**, 570–573 (1990).
 40. Dinarello, C. A. *et al.* Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J. Exp. Med.* **163**, 1433–1450 (1986).
 41. Miller, J. F. & Mitchell, G. F. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 801–820 (1968).
 42. Claman, H. N., Chaperon, E. A. & Selner, J. C. Thymus-marrow immunocompetence. 3. The requirement for living thymus cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **127**, 462–466 (1968).
 43. Muraguchi, A. *et al.* T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J. Immunol.* **127**, 412–

- 416 (1981).
44. Yoshizaki, K. *et al.* Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *J. Immunol.* **128**, 1296–1301 (1982).
 45. Van Damme, J. Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine* **165**, 914–919 (1987).
 46. Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. & Baumann, H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7251–7255 (1987).
 47. Castell, J. V. *et al.* Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Letters* **232**, 347–350 (1988).
 48. Hirano, T. *et al.* Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324**, 73–76 (1986).
 49. Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J. H. & Revel, M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.* **5**, 2529–2537 (1986).
 50. Haegeman, G. *et al.* Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* **159**, 625–632 (1986).
 51. Sehgal, P. B., Grieninger, G. & Tosato, G. Regulation of the acute phase and immune responses. (1989).
 52. Sehgal, P. B. *et al.* Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5219–5222 (1986).
 53. Mock, B. A. *et al.* The murine Il-6 gene maps to the proximal region of chromosome 5. *J. Immunol.* **142**, 1372–1376 (1989).
 54. Tanabe, O. *et al.* Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. (1988).
 55. Northemann, W., Braciak, T. A., Hattori, M., Lee, F. & Fey, G. H. Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *Journal of Biological ...* (1989).
 56. Hirano, T. *et al.* Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proceedings of the ...* (1985).
 57. Nordan, R. P., Pumphrey, J. G. & Rudikoff, S. Purification and NH₂-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1. *The Journal of ...* (1987).
 58. Simpson, R. J., Moritz, R. L., Van Roost & Van Snick, J. Characterization of a recombinant murine interleukin-6: assignment of disulfide bonds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 364–372 (1988).
 59. Ikebuchi, K. *et al.* Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9035–9039 (1987).
 60. Garman, R. D., Jacobs, K. A., Clark, S. C. & Raulet, D. H. B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proceedings of the ...* (1987).
 61. Noma, T. *et al.* Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines. *Immunol. Lett.* **15**, 249–253 (1987).
 62. Nicola, N. A., Metcalf, D., Matsumoto, M. & Johnson, G. R. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as

- granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* **258**, 9017–9023 (1983).
63. Castell, J. V. *et al.* Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Letters* **242**, 237–239 (1989).
 64. Kopf, M. *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**, 339–342 (1994).
 65. Fattori, E. *et al.* Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1243–1250 (1994).
 66. Kawano, M. *et al.* Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* **332**, 83–85 (1988).
 67. Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* **54**, 1–78 (1993).
 68. Coulie, P. G. *et al.* High-affinity binding sites for human 26-kDa protein (interleukin 6, B cell stimulatory factor-2, human hybridoma plasmacytoma growth factor, interferon-beta 2), different from those of type I interferon (alpha, beta), on lymphoblastoid cells. *Eur. J. Immunol.* **17**, 1435–1440 (1987).
 69. Taga, T. *et al.* Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**, 573–581 (1989).
 70. Escary, J. L., Perreau, J., Duménil, D., Ezine, S. & Brûlet, P. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* **363**, 361–364 (1993).
 71. Yoshida, K. *et al.* Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 407–411 (1996).
 72. Yasukawa, K. *et al.* Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. *J. Biochem.* **108**, 673–676 (1990).
 73. Ward, L. D. *et al.* High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J. Biol. Chem.* **269**, 23286–23289 (1994).
 74. Paonessa, G. *et al.* Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *EMBO J.* **14**, 1942–1951 (1995).
 75. Hibi, M. *et al.* Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149–1157 (1990).
 76. Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. & Rubinstein, M. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* **170**, 1409–1414 (1989).
 77. Narazaki, M. *et al.* Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* **82**, 1120–1126 (1993).
 78. Mullberg, J. *et al.* The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* **23**, 473–480 (1993).
 79. Lust, J. A. *et al.* Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* **4**, 96–100 (1992).
 80. Horiuchi, S. *et al.* Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1945–1948 (1994).
 81. Geisterfer, M., Richards, C. D. & Gauldie, J. Cytokines oncostatin M and interleukin 1 regulate the expression of the IL-6 receptor (gp80, gp130). *Cytokine* **7**, 503–509 (1995).
 82. Assier, E., Boissier, M.-C. & Dayer, J.-M. Interleukin-6: From identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine* 1–5

- (2010).doi:10.1016/j.jbspin.2010.07.007
83. Guschin, D. *et al.* A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.* **14**, 1421–1429 (1995).
 84. Rodig, S. J. *et al.* Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* **93**, 373–383 (1998).
 85. Haan, C., Hermanns, H. M., Heinrich, P. C. & Behrmann, I. A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochem. J.* **349**, 261–266 (2000).
 86. Nakajima, K. *et al.* A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J.* **15**, 3651–3658 (1996).
 87. Fukada, T. *et al.* Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* **5**, 449–460 (1996).
 88. Zhang, D., Sun, M., Samols, D. & Kushner, I. STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J. Biol. Chem.* **271**, 9503–9509 (1996).
 89. Kordula, T. *et al.* Oncostatin M and the interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor complex regulate alpha1-antichymotrypsin expression in human cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 4112–4118 (1998).
 90. Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19**, 2548–2556 (2000).
 91. Eulenfeld, R. *et al.* Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs. *European Journal of Cell Biology* **91**, 486–495 (2012).
 92. Hazuda, D., Webb, R. L., Simon, P. & Young, P. Purification and characterization of human recombinant precursor interleukin 1 beta. *J. Biol. Chem.* **264**, 1689–1693 (1989).
 93. Wilson, K. P. *et al.* Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270–275 (1994).
 94. Netea, M. G. *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 in monocytes and macrophages. *Blood* **113**, 2324–2335 (2009).
 95. Holzberg, D. Disruption of the c-JUN-JNK Complex by a Cell-permeable Peptide Containing the c-JUN Domain Induces Apoptosis and Affects a Distinct Set of Interleukin-1-induced Inflammatory Genes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 40213–40223 (2003).
 96. Dinarello, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–550 (2009).
 97. Chung, Y. *et al.* Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* **30**, 576–587 (2009).
 98. Lamacchia, C. L., Palmer, G., Seemayer, C. A., Talabot-Ayer, D. & Gabay, C. Myeloid-cell specific interleukin-1 receptor antagonist deficiency enhances Th1 and Th17 responses and the severity of arthritis. *Arthritis Rheum* NA–NA (2010).doi:10.1002/art.27235
 99. Voronov, E. *et al.* IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 2645–2650 (2003).
 100. Brikos, C., Wait, R., Begum, S., O'Neill, L. A. J. & Saklatvala, J. Mass spectrometric

- analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components. *Mol. Cell Proteomics* **6**, 1551–1559 (2007).
101. Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. & Goeddel, D. V. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443–446 (1996).
 102. Weber, A., Wasiliew, P. & Kracht, M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling* **3**, cm1–cm1 (2010).
 103. Martin, M. U. & Wesche, H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 265–280 (2002).
 104. 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).
 105. Smeets, R. L. *et al.* Effectiveness of the soluble form of the interleukin-1 receptor accessory protein as an inhibitor of interleukin-1 in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 2949–2958 (2003).
 106. Dinarello, C. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.* (1998).
 107. Hoffman, H. M. *et al.* Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet* **364**, 1779–1785 (2004).
 108. Goldbach-Mansky, R. *et al.* Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1 β inhibition. *New England Journal of Medicine* **355**, 581–592 (2006).
 109. Cines, D. B. & Blanchette, V. S. Immune thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* **346**, 995–1008 (2002).
 110. Jayam Trouth, A., Dabi, A., Solieman, N., Kurukumbi, M. & Kalyanam, J. Myasthenia Gravis: A Review. *Autoimmune Diseases* **2012**, 1–10 (2012).
 111. Rapoport, B., Chazenbalk, G. D., Jaume, J. C. & McLachlan, S. M. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr. Rev.* **19**, 673–716 (1998).
 112. Ben-Nun, A., Wekerle, H. & Cohen, I. R. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **11**, 195–199 (1981).
 113. Ito, H. *et al.* A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* **126**, 989–996 (2004).
 114. Pinkse, G. G. M. *et al.* Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 18425–18430 (2005).
 115. Dym, M. & Fawcett, D. W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* **3**, 308–326 (1970).
 116. Oldstone, M. B. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* **50**, 819–820 (1987).
 117. Fujinami, R. S. & Oldstone, M. B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043–1045 (1985).
 118. Tabaa, Al, Y. *et al.* B-cell polyclonal activation and Epstein-Barr viral abortive lytic cycle are two key features in acute infectious mononucleosis. *Journal of Clinical Virology* **52**, 33–37 (2011).
 119. Brewerton, D. A. *et al.* Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* **1**, 904–907 (1973).

120. Stastny, P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **298**, 869–871 (1978).
121. Agnello, V. Association of systemic lupus erythematosus and SLE-like syndromes with hereditary and acquired complement deficiency states. *Arthritis Rheum* **21**, S146–52 (1978).
122. Duerr, R. H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461–1463 (2006).
123. Ackerman, L. S. Sex hormones and the genesis of autoimmunity. *Arch Dermatol* **142**, 371–376 (2006).
124. Ruiz-Irastorza, G. *et al.* Increased rate of lupus flare during pregnancy and the puerperium: a prospective study of 78 pregnancies. *Br. J. Rheumatol.* **35**, 133–138 (1996).
125. Katz, U. & Zandman-Goddard, G. Drug-induced lupus: an update. *Autoimmunity Reviews* **10**, 46–50 (2010).
126. Chiffot, H., Fautrel, B., Sordet, C., Chatelus, E. & Sibilia, J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *YSARH* **37**, 223–235 (2008).
127. Cooper, G. S., Miller, F. W. & Germolec, D. R. Occupational exposures and autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* **2**, 303–313 (2002).
128. Goldman, J. A. Connective tissue disease in people exposed to organic chemical solvents: systemic sclerosis (scleroderma) in dry cleaning plant and aircraft industry workers. *J Clin Rheumatol* **2**, 185–190 (1996).
129. LeRoy, E. C. *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *The Journal of Rheumatology* **15**, 202–205 (1988).
130. Horstmeyer, A., Licht, C., Scherr, G., Eckes, B. & Krieg, T. Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. *FEBS Journal* **272**, 6297–6309 (2005).
131. Shi-Wen, X. *et al.* Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 417–425 (2001).
132. Laplante, P. *et al.* Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J. Immunol.* **174**, 5740–5749 (2005).
133. Belch, J. J. Raynaud's phenomenon: its relevance to scleroderma. *Annals of the Rheumatic Diseases* **50**, 839 (1991).
134. Sato, S., Fujimoto, M., Hasegawa, M. & Takehara, K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* **50**, 1918–1927 (2004).
135. Hénault, J., Robitaille, G., Sénécal, J.-L. & Raymond, Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* **54**, 963–973 (2006).
136. Needleman, B. W., Wigley, F. M. & Stair, R. W. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* **35**, 67–72 (1992).
137. Sato, S., Hasegawa, M. & Takehara, K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J. Dermatol. Sci.* **27**, 140–146 (2001).
138. Riccieri, V. *et al.* Interleukin-13 in systemic sclerosis: relationship to nailfold capillaroscopy abnormalities. *Clin Rheumatol* **22**, 102–106 (2003).
139. Scala, E. *et al.* Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with

- cutaneous and internal organ involvement. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 540–546 (2004).
140. Sato, S. *et al.* Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *The Journal of Rheumatology* **27**, 149–154 (2000).
 141. Makhlef, H. A. *et al.* IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 856–859 (1996).
 142. Van Obberghen-Schilling, E., Roche, N. S., Flanders, K. C., Sporn, M. B. & Roberts, A. B. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 7741–7746 (1988).
 143. Kawaguchi, Y. IL-1 α gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **97**, 445–450 (1994).
 144. Kawaguchi, Y., Hara, M. & Wright, T. M. Endogenous IL-1 α from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J. Clin. Invest.* **103**, 1253–1260 (1999).
 145. Feghali, C. A., Bost, K. L., Boulware, D. W. & Levy, L. S. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *The Journal of Rheumatology* **19**, 1207–1211 (1992).
 146. Jones, S. A., Richards, P. J., Scheller, J. & Rose-John, S. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J. Interferon Cytokine Res.* **25**, 241–253 (2005).
 147. Shima, Y. *et al.* The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology* **49**, 2408–2412 (2010).
 148. Allanore, Y., Cabane, J. & Mouthon, L. *Sclérodermies*. (Med-Line Editions: 2008).
 149. Pope, J. E. *et al.* A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* **44**, 1351–1358 (2001).
 150. Clements, P. J. *et al.* High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis: analysis of a two-year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* **42**, 1194–1203 (1999).
 151. Klareskog, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA–DR (shared epitope)–restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* **54**, 38–46 (2005).
 152. Chu, C. Q., Field, M., Feldmann, M. & Maini, R. N. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **34**, 1125–1132 (1991).
 153. Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A. M., Maini, R. N. & Feldmann, M. Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane. *J. Autoimmun.* **2 Suppl**, 177–186 (1989).
 154. Keffer, J. *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* **10**, 4025–4031 (1991).
 155. 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).
 156. Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. & Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2**, 244–247 (1989).
 157. Horai, R. *et al.* Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191**, 313–320 (2000).
 158. Alonzi, T. *et al.* Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced

- arthritis. *J. Exp. Med.* **187**, 461–468 (1998).
159. Murphy, C. A. *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **198**, 1951–1957 (2003).
160. Kotake, S. *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* **103**, 1345–1352 (1999).
161. Fujimoto, M. *et al.* Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis Rheum* **58**, 3710–3719 (2008).
162. Ogura, Y. *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 603–606 (2001).
163. Sanderson, J. D., Moss, M. T., Tizard, M. L. & Hermon-Taylor, J. Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* **33**, 890–896 (1992).
164. Maeda, M. *et al.* Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **14**, 451–461 (1992).
165. Reinisch, W. *et al.* Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am. J. Gastroenterol.* **94**, 2156–2164 (1999).
166. Atreya, R. & Neurath, M. F. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* **28**, 187–196 (2005).
167. Mannon, P. J. *et al.* Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2069–2079 (2004).
168. Izcue, A. *et al.* Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* **28**, 559–570 (2008).
169. Yen, D. *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest.* **116**, 1310–1316 (2006).
170. Leppkes, M. *et al.* ROR γ -expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* **136**, 257–267 (2009).
171. 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* (2012).doi:10.1136/gutjnl-2011-301668
172. Willer, C. J. & Ebers, G. C. Susceptibility to multiple sclerosis: interplay between genes and environment. *Curr. Opin. Neurol.* **13**, 241–247 (2000).
173. Zhang, J. *et al.* Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* **179**, 973–984 (1994).
174. Wen, S.-R. *et al.* Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* **244**, 94–96 (2012).
175. Schiffenbauer, J. The Induction of EAE Is Only Partially Dependent on TNF Receptor Signaling but Requires the IL-1 Type I Receptor. *Clinical Immunology* **95**, 117–123 (2000).
176. Komiyama, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **177**, 566–573 (2006).
177. Leonard, J. P., Waldburger, K. E. & Goldman, S. J. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J. Exp. Med.* **181**, 381–386 (1995).
178. Brok, H. P. M. *et al.* Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **169**, 6554–6563 (2002).

179. Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T. S. & Chen, Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J. Immunol.* **161**, 6480–6486 (1998).
180. Okuda, Y. *et al.* IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int. Immunol.* **10**, 703–708 (1998).
181. Serada, S. *et al.* IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9041–9046 (2008).
182. Goodin, D. S., Arnason, B. G., Coyle, P. K., Frohman, E. M. & Paty, D. W. The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **61**, 1332–1338 (2003).
183. Emi Aikawa, N., de Carvalho, J. F., Artur Almeida Silva, C. & Bonfá, E. Immunogenicity of Anti-TNF-alpha agents in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* **38**, 82–89 (2010).
184. Johnson, J. New One-Year Phase 3 Study Results Show Anti-Tnf SIMPONI® Maintained Clinical Response In Treatment Of Moderately To Severely Active Ulcerative Colitis. 1–5 (2013).at <<http://www.jnj.com/connect/news/all/new-one-year-phase-3-study-results-show-anti-tnf-simoni-maintained-clinical-response-in-treatment-of-moderately-to-severely-active-ulcerative-colitis>>
185. Sandborn, W. J. *et al.* Etanercept for Active Crohn's Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Gastroenterology* **121**, 1088–1094 (2001).
186. Van den Brande, J. M., Braat, H. & van den Brink, G. R. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. ... (2003).
187. Keane, J. *et al.* Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1098–1104 (2001).
188. Kerbleski, J. F. & Gottlieb, A. B. Dermatological complications and safety of anti-TNF treatments. *Gut* **58**, 1033–1039 (2009).
189. Mohan, N. *et al.* Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* **44**, 2862–2869 (2001).
190. BTG BTG announces data from phase IIb study of AZD9773. *btgplc.com* 1–1 (2013).at <<http://www.btgplc.com/page/21061/btg-announces-data-from-phase-ii-b-study-of-azd9773>>
191. CDP 571: anti-TNF monoclonal antibody, BAY 103356, BAY W 3356, Humicade. *Drugs R D* **4**, 174–178 (2003).
192. Smolen, J. S. *et al.* Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* **371**, 987–997 (2008).
193. 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. *Annals of the Rheumatic Diseases* **67**, 1516–1523 (2008).
194. Genovese, M. C. *et al.* Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: The tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum* **58**, 2968–2980 (2008).
195. Jones, G., Sebba, A., Gu, J. & Lowenstein, M. B. Comparison of tocilizumab

- monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. *Annals of the ...* (2010).
196. Kremer, J. M., Blanco, R. & Brzosko, M. Tocilizumab inhibits structural joint damage in rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to methotrexate: Results from the double-blind treatment phase *Arthritis & ...* (2011).
 197. Koike, T. *et al.* Postmarketing surveillance of tocilizumab for rheumatoid arthritis in Japan: interim analysis of 3881 patients. *Annals of the Rheumatic Diseases* **70**, 2148–2151 (2011).
 198. Nishimoto, N., Ito, K. & Takagi, N. Safety and efficacy profiles of tocilizumab monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis: meta-analysis of six initial trials and five long-term extensions. *Mod Rheumatol* **20**, 222–232 (2010).
 199. Yoshida, K. *et al.* An observational study of tocilizumab and TNF- inhibitor use in a Japanese community hospital: different remission rates, similar drug survival and safety. *Rheumatology* **50**, 2093–2099 (2011).
 200. Roche Tocilizumab_vs_adalimumab_ADACTA_trial. 1–2 (2012).at <http://www.eular.org/index.cfm?framePage=/congress_press_registration.cfm>
 201. Kawashiri, S.-Y. *et al.* Switching to the anti-interleukin-6 receptor antibody tocilizumab in rheumatoid arthritis patients refractory to antitumor necrosis factor biologics. *Mod Rheumatol* **20**, 40–45 (2009).
 202. Hashkes, P. J. *et al.* Riloncept for colchicine-resistant or -intolerant familial mediterranean Fever: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **157**, 533–541 (2012).
 203. 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).
 204. 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).
 205. Griffiths, C. E. M. *et al.* Comparison of ustekinumab and etanercept for moderate-to-severe psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **362**, 118–128 (2010).
 206. Segal, B. M. *et al.* Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol* **7**, 796–804 (2008).
 207. NHS Costing statement: adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. 1–3 (2007).
 208. Rubbert-Roth, A. & Finckh, A. Treatment options in patients with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review. *Arthritis Res Ther* **11 Suppl 1**, S1 (2009).
 209. Bartelds, G. M. *et al.* Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-tumour necrosis factor naive patients: a cohort study. *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**, 817–821 (2010).
 210. 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).
 211. Weigle, W. O. Termination of acquired immunological tolerance to protein antigens following immunization with altered protein antigens. *J. Exp. Med.* **116**, 913–928 (1962).
 212. 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).

213. 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).
214. Gringeri, A., Musicco, M. & Hermans, P. ... -Interferon-[alpha] Immunization: A European-Israeli, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial in 242 HIV-1-Infected Patients (the EURIS Study). *JAIDS Journal of ...* (1999).
215. Fomsgaard, A., Svenson, M. & Bendtzen, K. Auto-antibodies to tumour necrosis factor alpha in healthy humans and patients with inflammatory diseases and gram-negative bacterial infections. *Scand. J. Immunol.* **30**, 219–223 (1989).
216. Hansen, M. B., Svenson, M., Diamant, M. & Bendtzen, K. Anti-interleukin-6 antibodies in normal human serum. *Scand. J. Immunol.* **33**, 777–781 (1991).
217. Hansen, M. B., Svenson, M., Diamant, M. & Bendtzen, K. High-affinity IgG autoantibodies to IL-6 in sera of normal individuals are competitive inhibitors of IL-6 in vitro. *Cytokine* **5**, 72–80 (1993).
218. Marino, M. W. *et al.* Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8093–8098 (1997).
219. Neovacs Communiqué de presse, phase IIa TNF-kinoïde, polyarthrite rhumatoïde. 1–4 (2012).at <<http://www.neovacs.fr/fr/press/news>>
220. Neovacs Communiqué de presse, phaseII TNF-kinoïde, maladie de Crohn. 1–4 (2012).at <<http://www.neovacs.fr/fr/press/news>>
221. Ratsimandresy, R. A. *et al.* Active immunization against IL-23p19 improves experimental arthritis. *Vaccine* 1–8 (2011).doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.134
222. Bertin-Maghit, S. M. *et al.* Improvement of collagen-induced arthritis by active immunization against murine IL-1 β peptides designed by molecular modelling. *Vaccine* **23**, 4228–4235 (2005).
223. Le Buanec, H. *et al.* TNFalpha kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNFalpha protect mice from autologous TNFalpha-driven chronic and acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 19442–19447 (2006).
224. Delavallée, L. *et al.* Vaccination with cytokines in autoimmune diseases. *Ann Med* **40**, 343–351 (2008).
225. Richard, M. & Grecis, R. Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. (2000).
226. Uyttenhove, C. & Van Snick, J. Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2868–2874 (2006).
227. Delavallée, L. *et al.* Active immunization to tumor necrosis factor- α is effective in treating chronic established inflammatory disease: a long-term study in a transgenic model of arthritis. *Arthritis Res Ther* **11**, R195 (2009).
228. 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).
229. Zagury, D. *et al.* IFNalpha kinoid vaccine-induced neutralizing antibodies prevent clinical manifestations in a lupus flare murine model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5294–5299 (2009).
230. Dalum, I. *et al.* Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF-alpha. *Nat. Biotechnol.* **17**, 666–669 (1999).
231. 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).
232. Xue, X. *et al.* Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by BLYS autovaccine. *Vaccine* **26**, 2873–2881 (2008).

233. Waterston, A. M. *et al.* Phase I study of TNF α AutoVaccIne in Patients with metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 848–857 (2005).
234. Jennings, G. T. & Bachmann, M. F. Immunodrugs: therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 303–326 (2009).
235. Spohn, G. *et al.* Protection against osteoporosis by active immunization with TRANCE/RANKL displayed on virus-like particles. *J. Immunol.* **175**, 6211–6218 (2005).
236. Röhn, T. A. *et al.* Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2857–2867 (2006).
237. Spohn, G. *et al.* A virus-like particle-based vaccine selectively targeting soluble TNF- α protects from arthritis without inducing reactivation of latent tuberculosis. *J. Immunol.* **178**, 7450–7457 (2007).
238. 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).
239. Bossu, P. *et al.* IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 14181–14186 (2003).
240. Shen, Y., Chen, J., Zhang, X., Wu, X. & Xu, Q. Human TNF- α gene vaccination prevents collagen-induced arthritis in mice. *International Immunopharmacology* **7**, 1140–1149 (2007).
241. Youssef, S. *et al.* C-C chemokine-encoding DNA vaccines enhance breakdown of tolerance to their gene products and treat ongoing adjuvant arthritis. *J. Clin. Invest.* **106**, 361–371 (2000).
242. 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).
243. Gelinas, D. S., DaSilva, K., Fenili, D., St George-Hyslop, P. & McLaurin, J. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101 Suppl 2**, 14657–14662 (2004).
244. Atassi, M. Z. & Lee, C. L. The precise and entire antigenic structure of native lysozyme. *Biochem. J.* **171**, 429–434 (1978).
245. Westhof, E. *et al.* Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* **311**, 123–126 (1984).
246. Tanaka, T., Slamon, D. J. & Cline, M. J. Efficient generation of antibodies to oncoproteins by using synthetic peptide antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 3400–3404 (1985).
247. Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A. & Cortese, R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* **128**, 51–57 (1993).
248. Cuniasse, P. *et al.* Structural basis of antibody cross-reactivity: solution conformation of an immunogenic peptide fragment containing both T and B epitopes. *Biochemistry* **34**, 12782–12789 (1995).
249. Inhibition of a common human anti-hepatitis B surface antigen idio type by a cyclic synthetic peptide.
250. Capini, C. J. *et al.* Active immunization against murine TNF α peptides in mice: generation of endogenous antibodies cross-reacting with the native cytokine and in vivo protection. *Vaccine* **22**, 3144–3153 (2004).
251. Vermout, S., Denis, M., Losson, B. & Mignon, B. Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann Méd Vét* **147**, 393–401 (2003).
252. Billiau, A. & Matthys, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 849–860 (2001).

253. De Benedetti, F. *et al.* In vivo neutralization of human IL-6 (hIL-6) achieved by immunization of hIL-6-transgenic mice with a hIL-6 receptor antagonist. *J. Immunol.* **166**, 4334–4340 (2001).
254. Galle, P. *et al.* Knocking out IL-6 by vaccination. *Eur. J. Immunol.* **34**, 291–300 (2004).
255. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
256. Briand, J. P., Muller, S. & Van Regenmortel, M. H. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods* **78**, 59–69 (1985).
257. Woessner, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 440–447 (1961).
258. Yamamoto, T. & Nishioka, K. Animal Model of Sclerotic Skin. V: Increased Expression of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblastic Cells in Bleomycin-Induced Scleroderma. *Clinical Immunology* **102**, 77–83 (2002).
259. Bouchez, C. *et al.* Development of a Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) Model in the Cynomolgus Monkey. *J Toxicol Pathol* **25**, 183–188 (2012).
260. Kitaba, S. *et al.* Blockade of Interleukin-6 Receptor Alleviates Disease in Mouse Model of Scleroderma. *Am. J. Pathol.* **180**, 165–176 (2012).
261. Hasegawa, M., Sato, S., Ihn, H. & Takehara, K. Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 612–617 (1999).
262. Romano, M. *et al.* Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* **6**, 315–325 (1997).
263. Duncan, M. R. & Berman, B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 686–692 (1991).
264. Batteux, F., Kavian, N. & Servettaz, A. New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology* **23**, 511–518 (2011).
265. May, L. T. *et al.* Antibodies chaperone circulating IL-6. Paradoxical effects of anti-IL-6 ‘neutralizing’ antibodies in vivo. *J. Immunol.* **151**, 3225–3236 (1993).
266. Montero-Julian, F. A., Klein, B., Gautherot, E. & Brailly, H. Pharmacokinetic study of anti-interleukin-6 (IL-6) therapy with monoclonal antibodies: enhancement of IL-6 clearance by cocktails of anti-IL-6 antibodies. *Blood* **85**, 917–924 (1995).
267. Nambu, A. IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Immunol.* **18**, 701–712 (2005).
268. Chu, C. Q. *et al.* Detection of cytokines at the site of tuberculin-induced delayed-type hypersensitivity in man. *Clin. Exp. Immunol.* **90**, 522–529 (1992).
269. Galle, P. *et al.* Vaccination with IL-6 analogues induces autoantibodies to IL-6 and influences experimentally induced inflammation. *International Immunopharmacology* **7**, 1704–1713 (2007).
270. Storch, M. K. *et al.* Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.* **8**, 681–694 (1998).
271. Bourquin, C. *et al.* Selective unresponsiveness to conformational B cell epitopes of the myelin oligodendrocyte glycoprotein in H-2b mice. *J. Immunol.* **171**, 455–461 (2003).
272. Chackerian, B., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective

- autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **108**, 415–423 (2001).
273. Cytos Communiqué de presse, phase I/IIa CYT007-TNFQb, psoriasis. 1–3 (2007).
274. Tissot, A. C. *et al.* Effect of immunisation against angiotensin II with CYT006-AngQb on ambulatory blood pressure: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase IIa study. *Lancet* **371**, 821–827 (2008).

Communications scientifiques

Publications

Lucille Desallais, Jérôme Avouac, Maxime Fréchet, Muriel Elhai, Hadley Mouhsine, Gabriel Moreau, Caroline Bouchez, Hervé Do, Rojo Ratsimandresy, Françoise Quintin-Colonna, Matthieu Montes, Yannick Allanore, Jean-François Zagury.

Protection conferred by active immunization against an IL-6 peptide in mice and monkeys. En cours de soumission.

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

In vivo orally active small-molecule inhibitors of TNF α . En révision.

Brevet

Lucille Desallais, Matthieu Montes et Jean-François Zagury.

Anti IL-6 vaccine composition

Déposé le 9 août 2011. WO2013/021284

Communications orales

Lucille Desallais : Vaccin anti-cytokines : nouvelles cibles. Novembre 2009. *Colloque International "Genomics, AIDS Pathogenesis and Immunotherapies"*. Ermenonville, France.

Lucille Desallais : Présentation du projet de thèse. Journée DGA : 18 mars 2010 à l'ENSTA.

Lucille Desallais : Présentation du projet d'étude chez le macaque cynomolgus. Novembre 2011. *Colloque International "Genomics, AIDS Pathogenesis and Immunotherapies"*. Ermenonville, France.

Lucille Desallais : A new anti-IL-6 vaccine. Décembre 2012. *Colloque International "Genomics, AIDS Pathogenesis and Immunotherapies"*. Ermenonville, France.

Poster

Lucille Desallais : Immuno-modulation active par vaccins anti-cytokines dans la lutte contre les dérèglements immunitaires. *Doctoriales DGA-Polytechnique* : 25-30 septembre 2011, Fréjus

Lucille DESALLAIS

Immunisation active à base de peptides dérivés de l'IL-6 et de l'IL-1 β dans les maladies inflammatoires chroniques

Résumé

Les anticorps monoclonaux anti-cytokine ont constitué une révolution dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques, mais leur utilisation présente des inconvénients (non réponse, résistance, effets secondaires, coûts élevés).

Notre équipe développe une stratégie alternative originale, l'immunisation active à base de peptides de cytokines. Elle a pour but de faire synthétiser, par l'organisme même du patient, des anticorps neutralisant les effets pathogènes dus à l'excès de cytokines.

Durant ma thèse, j'ai montré que l'immunisation active contre un peptide dérivé de l'IL-6 murine est protectrice dans un modèle murin de sclérodémie systémique. L'immunisation de singes avec l'équivalent humain entraîne une réduction significative des réactions inflammatoires locales suite à l'induction d'une réaction d'HSR. De plus, l'immunisation active contre deux peptides dérivés de l'IL-1 β et de l'IL-23 conduit à la réduction de la sévérité de l'EAE.

Ces résultats confortent l'intérêt de cibler les cytokines par l'approche d'immunisation active à base de peptides, qui pourra permettre de diversifier l'offre thérapeutique actuellement disponible.

Mots clés : Immunisation active, IL-6, IL-1 β , peptide, maladies inflammatoires chroniques

Résumé en anglais

Monoclonal antibodies have been a revolution for the treatment of chronic inflammatory diseases, but their use shows major drawbacks (non-response, resistance, side effects and prohibitive costs).

Our team develops an original alternative strategy: anti-cytokine peptide-based active immunization. The aim of the approach is to make the patient's own organism produce antibodies capable of neutralizing the pathogenic effects of cytokine overproduction.

During my PhD, I have demonstrated that active immunization against an IL-6 murine peptide confers clinical protection in a murine model of systemic sclerosis. Monkeys immunized against the human peptide also showed a significant decrease of local inflammatory reactions following a delayed-type hypersensitivity reaction. Moreover, active immunization against an IL-1 β and an IL-23 murine peptide led to a reduction of the severity of the EAE in mice.

These results comfort the interest of anti-cytokine peptide-based active immunization, which should eventually widen the choice of therapeutics available for the patients.

Key words: Active immunization, IL-6, IL-1 β , peptide, chronic inflammatory diseases