



**HAL**  
open science

# Perturbation chimique du transport de Tumor Necrosis Factor

Khadija Oukacha

► **To cite this version:**

Khadija Oukacha. Perturbation chimique du transport de Tumor Necrosis Factor. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris sciences et lettres, 2023. Français. NNT : 2023UPSLS067 . tel-04564155

**HAL Id: tel-04564155**

**<https://theses.hal.science/tel-04564155>**

Submitted on 30 Apr 2024

**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.

**THÈSE DE DOCTORAT**  
**DE L'UNIVERSITÉ PSL**

Préparée à l'Institut Curie UMR 144 - Biologie Cellulaire et  
Cancer

**Perturbation chimique du transport de Tumor Necrosis  
Factor (TNF)**

Soutenue par

**Khadija OUKACHA**

Le 29 Mars 2023

Ecole doctorale n° 515

**Complexité du vivant**

Spécialité

**Biologie Cellulaire**

Composition du jury :

Philippe, BENAROCH DR, Institut Curie	<i>Président du jury</i>
Marlène, DREUX DR, C.I.R.I	<i>Rapporteur</i>
Bénédicte, MANOURY DR, Institut Necker	<i>Rapporteur</i>
Alexandre, BOISSONNAS DR, C.I.M.I	<i>Examineur</i>
Nathalie, SAUVONNET DR, Institut Pasteur	<i>Examineur</i>
Andres, ALCOVER PR, Institut Pasteur	<i>Examineur</i>
Gaëlle, BONCOMPAIN DR, Institut Curie	<i>Directeur de thèse</i>



## TABLE DES MATIERES

Introduction .....	5
1.1. Le système immunitaire et inflammation .....	5
1.1.1. Le système immunitaire inné .....	6
1.1.2. Le système immunitaire adaptatif .....	9
1.1.2.1. Cellules T .....	10
1.1.2.2. Cellule B .....	11
1.1.3. Les macrophages dans l'inflammation .....	12
1.1.3.1. Fonction des macrophages .....	14
1.1.3.2. Initiation de l'inflammation .....	17
1.1.3.3. Activation des macrophages .....	17
1.1.3.4. Résolution de l'inflammation .....	18
1.2. Tumor Necrosis Factor (TNF) .....	23
1.2.1. Les cytokines de l'inflammation/pro-inflammatoire .....	23
1.2.1.1. Les interleukines .....	24
1.2.1.2. Les chimiokines .....	25
1.2.1.3. Les Interférons .....	25
1.2.1.4. Facteur de nécrose tumorale .....	26
1.2.2. Généralités du Tumeur Necrosis Factor .....	27
1.2.2.1. Découverte de TNF .....	27
1.2.2.2. Structure de TNF .....	29
1.2.2.3. Biosynthèse de TNF .....	30
1.2.2.4. Cascades de signalisation des récepteurs du TNF .....	36
1.3. Rôle de TNF dans les maladies inflammatoires chroniques .....	40
1.3.1. Implication de TNF dans la maladie de Crohn .....	41
1.3.1.1. La maladie de Crohn .....	41

1.3.1.2.	Le rôle de TNF dans la maladie de Crohn .....	42
1.3.1.3.	Traitements anti-TNF actuels .....	43
1.3.1.4.	Inconvénients des traitements anti-TNF .....	47
1.3.2.	La polyarthrite rhumatoïde.....	50
1.3.2.1.	Rôles des cytokines inflammatoires dans la polyarthrite rhumatoïde 51	
1.3.2.2.	Traitements de la polyarthrite rhumatoïde.....	51
1.4.	Trafic intracellulaire des protéines et diversité des voies de sécrétion.....	54
1.4.1.	Le réticulum endoplasmique : entrée de la voie de sécrétion .....	54
1.4.1.1.	Structure et fonctions du réticulum endoplasmique .....	54
1.4.1.2.	La translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique ..	55
1.4.1.3.	Le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi .....	55
1.4.2.	L'appareil de Golgi.....	57
1.4.2.1.	Structure et fonctions de l'appareil de Golgi.....	57
1.4.2.2.	Le transport intra-Golgi.....	59
1.4.3.	Le transport depuis l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire et l'exocytose .....	61
1.4.4.	L'étude des voies de sécrétion .....	62
1.4.5.	Mécanismes de sécrétion de TNF .....	68
RESULTATS .....		73
1.5.	Manuscrit d'article .....	75
	<b>Abstract</b> .....	75
	<b>Introduction</b> .....	76
	<b>Results</b> .....	78
	<b>Discussion</b> .....	83
	<b>Materials and Methods</b> .....	86
	<b>References</b> .....	89

<b>Figures</b> .....	92
Discussion.....	107
1.6. Le rôle d'IL-6 dans les maladies inflammatoires chroniques .....	107
1.6.1. Les mécanismes communs au transport intracellulaire de TNF et d'IL-6 108	
1.6.2. Les mécanismes différents au transport intracellulaire de TNF et d'IL-6 110	
1.7. Cibles cellulaires des molécules inhibant TNF chez les macrophages et monocytes primaires humains.....	111
1.7.1. L'Imatinib .....	111
1.7.2. L'Azelastine .....	114
1.7.3. Cisapride .....	116
1.7.4. Oxyacanthine.....	117
1.7.5. NSC308835 .....	117
1.8. Expression versus. Sécrétion .....	118
1.9. Test in vivo des molécules.....	119
Bibliographies.....	121

# Introduction

## 1.1. Le système immunitaire et inflammation

Le système immunitaire définit un ensemble de cellules, de molécules et de processus dont la fonction est de protéger l'organisme contre des éléments étrangers tels que les micro-organismes (bactéries, parasites ou champignons, par exemple), les toxines, les cellules cancéreuses et les virus.

En plus des barrières structurales et chimiques qui nous protègent des infections, le système immunitaire peut être décrit simplement comme deux « lignes de défense » : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Ce mécanisme est indépendant de l'antigène (non spécifique) mis en œuvre immédiatement ou dans les heures suivant la rencontre avec l'élément étranger. La réponse immunitaire innée n'a pas de mémoire immunitaire contrairement à l'immunité adaptative.

L'immunité adaptative est dépendante et spécifique de l'antigène, ce qui implique un décalage temporel entre l'exposition à l'antigène et la réponse immunitaire. Une caractéristique de l'immunité adaptative est la capacité de mémorisation, permettant à l'hôte de déclencher une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace lors d'une exposition ultérieure à un antigène rencontré précédemment.

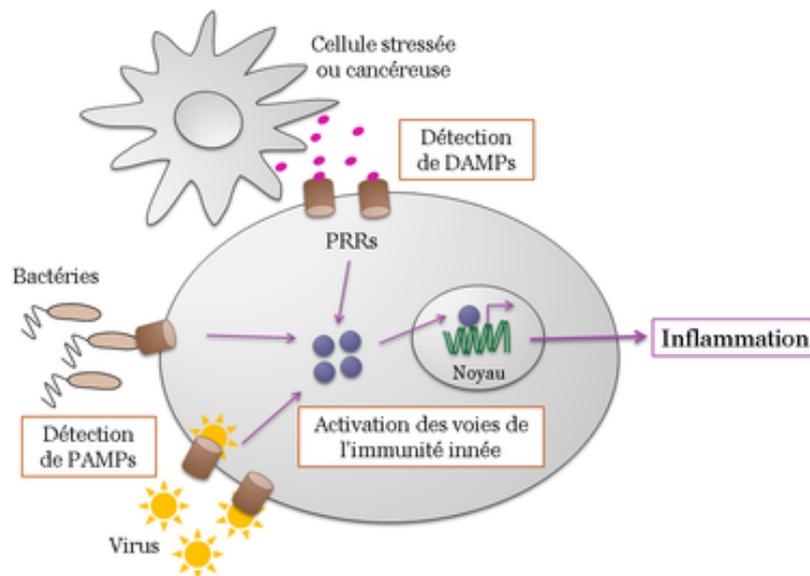
L'immunité innée et l'immunité adaptative ne sont pas des mécanismes de défense mutuellement exclusifs, mais sont complémentaires. Les déficiences de l'un ou l'autre des systèmes entraînent des réponses insuffisantes ou inappropriées de l'hôte (Bonilla and Oettgen, 2010; Turvey and Broide, 2010).

### 1.1.1. Le système immunitaire inné

L'immunité innée comprend plusieurs types de barrières de défense : anatomique (peau et muqueuses), physiologique (température, pH acide et médiateurs chimiques), phagocytaire, inflammation ...

Au niveau anatomique, la peau agit comme une barrière mécanique et son acidité retarde la croissance des microbes. De plus, les muqueuses piègent les microbes étrangers et les cils propulsent les microbes hors du corps.

A l'échelle physiologique, la fièvre permet d'inhiber la croissance de certaines pathogènes. L'acidité de l'estomac joue un rôle dans l'élimination de la plupart des microbes ingérés. Les cellules phagocytaires telles que les monocytes, neutrophiles, macrophages ... internalisent et dégradent des organismes entiers. Par ailleurs, les lésions tissulaires et les infections provoquent une libération de protéines sériques à activité antibactérienne et entraînant un afflux de cellules phagocytaires dans la zone touchée. Enfin, des médiateurs chimiques tels que les interférons induit des défenses antivirales dans les cellules non infectées. Les cellules et les processus essentiels à une immunité innée efficace contre les agents pathogènes qui contournent les barrières anatomiques ont été largement étudiés. L'immunité innée repose sur les « récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires » (PRR pour *Pattern Recognition Receptor*), qui permettent aux cellules immunitaires de détecter et de répondre rapidement à plusieurs agents pathogènes partageant une structure commune, appelée « motifs moléculaires associés aux pathogènes » (PAMP pour *Pathogen Associated Molecular Pattern*) (figure 1). Ceux-ci comprennent, par exemple, des composants des parois cellulaires bactériennes tels que le lipopolysaccharide (LPS) et l'acide ribonucléique double brin (ARN) produits lors d'une infection virale.



**Figure 1 : Détection des PAMP par les cellules de l'immunité innée à travers les PRR.** Les signaux de danger DAMPs (Danger Associated Molecular Pattern) et les signaux pathologiques PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) sont reconnus par les récepteurs PRR (Pattern recognition receptor) et permettant l'activation des voies de l'immunité innée

<http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/immunité-innée-barrières-naturelles-et-réaction-inflammatoire/declenchement-de-la-reponse-inflammatoire-role-des-recepteurs-de-l2019immunité-innée>

Un des rôles importants de l'immunité innée est le recrutement rapide de cellules immunitaires sur les lieux d'infection et d'inflammation grâce à la production de cytokines et de chimiokines (petites protéines impliquées dans la communication intercellulaire et le recrutement d'autres cellules). La libération de cytokines entraîne de nombreux mécanismes de défense dans tout l'organisme tout en activant simultanément des réponses cellulaires locales à une infection ou à une blessure. Au cours de la réponse précoce à une infection bactérienne, les principales cytokines inflammatoires libérées sont le facteur de nécrose tumorale (TNF pour *Tumor Necrosis Factor*), l'interleukine 1 (IL-1) et l'interleukine 6 (IL-6). Ces cytokines sont essentielles pour initier le recrutement cellulaire et l'inflammation locale, requis pour l'élimination de nombreux agents pathogènes. La production dérégulée de ces cytokines inflammatoires est souvent associée à des maladies inflammatoires ou auto-immunes, représentant des cibles thérapeutiques.

Le système du complément décrit un ensemble de protéines contenues dans le sang. Elles induisent une cascade biochimique entraînant l'opsonisation des bactéries et autres agents pathogènes. Ces derniers deviennent alors sensibles à la phagocytose,

permettant aux cellules immunitaires d'engloutir les micro-organismes et éliminer les débris cellulaires. Le complément permet également l'activation du complexe d'attaque membranaire créant des pores à la surface des agents pathogènes et des cellules infectées à la membrane des cellules. Le système du complément donne donc la possibilité de tuer les agents pathogènes ainsi que cellules infectées.

La phagocytose de la réponse immunitaire innée favorise l'élimination des cellules mortes et des complexes d'anticorps, ainsi que des substances étrangères présentes dans les organes, les tissus, le sang et la lymphe. Il peut également activer des réponses immunitaires adaptatives par le recrutement et l'activation de cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

De nombreuses cellules participent à la réponse immunitaire telles que les phagocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles, les cellules NK (pour *Natural Killer*) et les cellules lymphoïdes innés.

La phagocytose est réalisée principalement par deux types cellulaires : les neutrophiles et les macrophages. Ces deux cellules ont la même fonction : absorber les bactéries et les détruire par de multiples voies bactéricides. En plus de leurs propriétés phagocytaires, les neutrophiles contiennent également des granules et des enzymes qui contribuent à l'élimination des bactéries pathogènes.

Contrairement aux neutrophiles, les macrophages sont des cellules à longue durée de vie impliquées non seulement dans la phagocytose mais aussi dans la production d'antigènes pour les cellules T.

Les cellules dendritiques sont également impliquées dans la phagocytose, et fonctionnent comme les cellules présentatrices d'antigènes. En effet, elles initient des réponses immunitaires adaptatives et servent de messagers clés entre l'immunité innée et adaptative.

Les mastocytes et les basophiles partagent de nombreuses caractéristiques communes et déclenchent tous deux des réponses inflammatoires aiguës telles que celles observées dans les allergies et l'asthme. Les mastocytes ont également des fonctions importantes en tant que « cellules sentinelles » du système immunitaire, produisant principalement des cytokines en réponse à une infection et à une blessure. Les basophiles se trouvent dans le système circulatoire, contrairement aux mastocytes, qui se trouvent généralement dans le tissu conjonctif entourant les

vaisseaux sanguins et sont particulièrement fréquents sur les surfaces muqueuses. Les éosinophiles sont des granulocytes aux propriétés phagocytaires et jouent un rôle important dans la destruction des parasites trop gros pour être phagocytés. Avec les mastocytes et les basophiles, les éosinophiles régulent également les mécanismes associés aux allergies et à l'asthme. Les cellules NK jouent un rôle important dans le rejet des tumeurs et la destruction des cellules infectées par les virus. La destruction des cellules infectées est réalisée par la libération de perforine et de granzymes (protéines qui provoquent la lyse des cellules cibles) contenues dans les granules induisant l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Stone et al., 2010). Les cellules NK sont également une source importante d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), qui aide à recruter des CPA et à favoriser le développement d'une forte immunité antivirale. Les cellules lymphoïdes innées (ILC pour *innate lymphoid cells*) jouent un rôle plus régulateur. Selon leur type (ILC-1, ILC-2, ILC-3), elles produisent sélectivement des cytokines telles que l'IL-4, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17 qui aident à diriger et réguler la réponse immunitaire.

### 1.1.2. Le système immunitaire adaptatif

Le développement de l'immunité adaptative est facilité par l'action du système immunitaire inné. Ce dernier joue un rôle clé lorsque l'immunité innée ne peut éliminer la source de l'infection.

Les principales fonctions de la réponse immunitaire adaptative sont :

- la distinction de la reconnaissance d'antigènes spécifiques du « non-soi » des antigènes du « soi » ;
- la génération de voies immunitaires effectrices spécifiques à un pathogène ou à des cellules infectées par des pathogènes ;
- et le développement de systèmes immunologiques "mémoire" pour l'élimination rapide d'agents pathogènes spécifiques en cas d'infection ultérieure.

Les réponses immunitaires adaptatives constituent la base d'une immunité efficace contre les maladies infectieuses. Les cellules du système immunitaire adaptatif comprennent : les lymphocytes T spécifiques de l'antigène, qui sont activés et prolifèrent sous l'action des cellules présentatrices d'antigène, et les lymphocytes B

qui se différencient en plasmocytes pour produire des anticorps et sont la base de l'immunité mémoire.

#### 1.1.2.1. Cellules T

Les cellules T dérivent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et arrivent à maturité dans le thymus.

Chaque cellule T exprime un seul type de TCR (pour *T-cell receptor*) et a la capacité de proliférer et de se différencier rapidement si elle reçoit les signaux appropriés. (Bonilla and Oettgen, 2010)

Les cellules T sont activées lorsqu'elles rencontrent une «CPA qui présentent un fragment d'antigène (peptide) . Cela est possible grâce aux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) présents à la surface des CPA et associés au fragment d'antigène présenté.

Il existe deux types de CMH :

Les CMH de type 1 que l'on trouve sur toutes les cellules nucléées et présentant des peptides endogènes (intracellulaires)

Les CMH de type 2 que l'on ne trouve que sur certaines cellules du système immunitaire, notamment les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B et qui présentent des peptides exogènes.

Ce processus de présentation de l'antigène induit la différenciation des cellules T en cellules T cytotoxiques (CD8+) ou en cellules T auxiliaires (Th) (CD4+) principalement. Les cellules T cytotoxiques CD8+ sont principalement impliquées dans la destruction des cellules infectées par des agents étrangers, tels que les virus. Elles sont activées par l'interaction entre leur TCR et un peptide lié aux molécules du CMH de classe I. L'expansion clonale de ces cellules produit des cellules effectrices qui libèrent des substances induisant l'apoptose des cellules cibles.

Les cellules T auxiliaires CD4+ jouent un rôle important dans l'établissement et l'optimisation de la réponse immunitaire. Les cellules T CD4+ sont activées par la reconnaissance par le TCR d'antigènes liés à des molécules du CMH de classe II. L'activation des lymphocytes T CD4+ peut induire différents types de réponses cellulaires tel que Th1, Th2, Th17 ... Les cellules Th1 par exemple, génèrent une

réponse immunologique qui constitue une défense efficace contre les infections virales et d'autres agents pathogènes intracellulaires. Les cellules Th2 quant à elles exercent leur effet sur les réponses immunitaires aux parasites et aux allergènes en augmentant l'inflammation.

#### *1.1.2.1. Cellules Dendritiques*

Les cellules dendritiques jouent un rôle crucial dans le système immunitaire en tant que cellules sentinelles spécialisées dans la détection et la présentation des antigènes. Leur capacité à capter les antigènes présents dans l'environnement, à migrer vers les ganglions lymphatiques et à présenter ces antigènes aux lymphocytes T en fait des acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative.

Les cellules dendritiques sont également impliquées dans la régulation de la sécrétion du facteur de nécrose tumorale (TNF). En effet, les cellules dendritiques peuvent produire du TNF en réponse à divers stimuli, comme des agents pathogènes ou des signaux inflammatoires. Le TNF sécrété par les cellules dendritiques peut agir de différentes manières dans le système immunitaire, notamment en induisant l'activation d'autres cellules immunitaires, en régulant l'expression de molécules d'adhésion et en favorisant des réponses inflammatoires. Par conséquent, les cellules dendritiques représentent un lien important entre l'immunité innée et adaptative, et leur capacité à produire du TNF aide à orchestrer des réponses immunitaires appropriées aux stimuli environnementaux et aux agents pathogènes.

#### *1.1.2.2. Cellule B*

Les cellules B naissent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et, après maturation, quittent la moelle en exprimant un récepteur unique de liaison à l'antigène. Contrairement aux cellules T, les cellules B peuvent reconnaître les antigènes directement, sans avoir besoin de cellules CPA.

Lorsqu'elles sont activées par des antigènes étrangers pour lesquels elles possèdent un récepteur spécifique approprié, les cellules B subissent une prolifération et se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps ou en cellules B mémoire.

Les cellules B mémoire survivent à l'infection et ont une longue durée de vie. Elles peuvent être appelées à réagir rapidement en produisant des anticorps permettant l'élimination d'un antigène lorsqu'il est de nouveau exposé à l'organisme hôte.

Les plasmocytes sont des cellules à durée de vie relativement courte. Cependant, elles produisent de grandes quantités d'anticorps qui pénètrent dans la circulation et dans les tissus, assurant ainsi une protection efficace contre les agents pathogènes. Lorsque le pathogène est éliminé, les plasmocytes subissent souvent une apoptose.

En conclusion, la coopération des cellules B et des cellules T permet donc une réponse immunitaire efficace contre les différents types de pathogènes.

### 1.1.3. Les macrophages dans l'inflammation

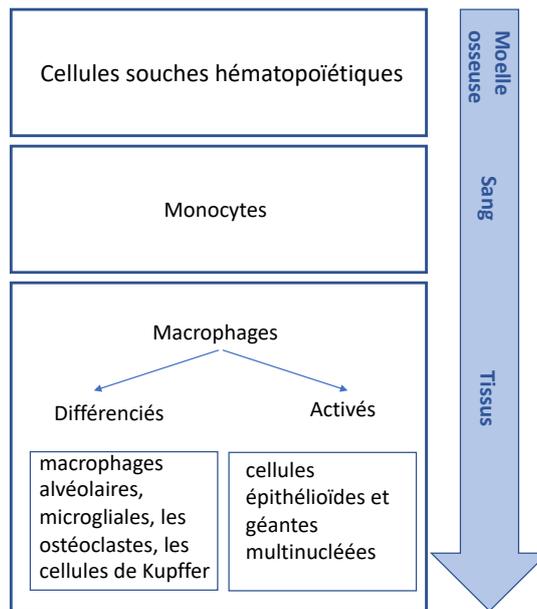
L'inflammation est une série d'événements hautement régulés, déclenchée par une variété de stimuli, tels que des agents pathogènes, des agents mécaniques et chimiques nocifs et des réponses auto-immunes. Cette cascade d'événements entraîne rougeur, une enflure, chaleur et douleur dans la région inflammée. L'inflammation est un processus majeur par lequel le corps répare les tissus endommagés et se défend. Dans des conditions physiologiques, les réponses régulées empêchent d'autres blessures et éliminent les tissus endommagés. Dans des conditions pathologiques, l'inflammation peut entraîner la destruction des tissus et un dysfonctionnement des organes. Les processus inflammatoires sont divisés en deux catégories : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est de courte durée, à l'échelle des minutes, heures ou jours, et se caractérise par une exsudation de fluides corporels et de protéines plasmatiques (œdème) et une augmentation de globules blancs (principalement des neutrophiles). L'inflammation

chronique dure plus longtemps et est histologiquement associée à la présence de lymphocytes et de macrophages, à la prolifération vasculaire, à la fibrose et à la nécrose tissulaire. Les trois fonctions principales des macrophages dans l'inflammation sont : la présentation de l'antigène, la phagocytose et l'immuno-régulation par la production de diverses cytokines et facteurs de croissance.

Les cellules impliquées dans la phagocytose, à savoir les monocytes et les macrophages, prennent naissance dans la moelle osseuse, circulent dans le sang et sont activées dans divers tissus (figure 2). Les monocytes pénètrent dans le sang périphérique après avoir quitté la moelle osseuse. Lorsqu'un monocyte atteint le tissu extravasculaire, il se différencie en macrophage.

Les macrophages ont une capacité phagocytaires accrue. L'activation des monocytes en macrophages entraîne une augmentation de leurs tailles, une production d'enzymes lysosomales, un métabolisme plus actif et une plus grande capacité à englober et à tuer les micro-organismes ingérés que lorsqu'elles sont inactivées. Une fois qu'elles ont colonisé les tissus, ces cellules mûrissent et deviennent des macrophages.

Les macrophages présentent différentes propriétés morphologiques et fonctionnelles après avoir été activés par des stimuli externes, y compris des micro-organismes. L'activation des macrophages peut engendrer des granulomes, caractéristiques de l'inflammation chronique (Kobayashi and Yoshida, 1996). Les macrophages se trouvent dans tous les organes et tissus conjonctifs et portent des noms différents selon leur emplacement, comme les macrophages alvéolaires dans les poumons, les cellules microgliales dans le système nerveux central, les ostéoclastes dans les os et les cellules de Kupffer dans le foie.



**Figure 2 : Maturation des macrophages.** Les cellules du système des phagocytes mononucléaires naissent dans la moelle osseuse, circulent dans le sang, arrivent à maturité et sont activées dans divers tissus. Lorsque le monocyte atteint le tissu extravasculaire, il subit une transformation en une cellule phagocytaire plus grande, le macrophage, qui peut être activé.

### 1.1.3.1. Fonction des macrophages

Comme indiqué précédemment, les macrophages ont trois fonctions principales : la présentation de l'antigène, la phagocytose et la régulation immunitaire. La réponse fonctionnelle des macrophages dans la défense de l'organisme hôte implique les étapes séquentielles suivantes : recrutement de cellules au niveau du site d'infection, reconnaissance, phagocytose et destruction des microbes. De plus, les macrophages produisent des biomolécules actives jouant de nombreux rôles dans les réponses immunitaires innée et adaptative.

#### 1.1.3.1.1. Présentation de l'antigène

La fonction des cellules présentatrices d'antigènes est de présenter des antigènes pour la reconnaissance des éléments étrangers par les lymphocytes et de favoriser

l'activation des lymphocytes. Les cellules présentant l'antigène comprennent les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages. Par exemple, les macrophages contenant des micro-organismes ingérés présentent des antigènes microbiens aux lymphocytes T effecteurs différenciés. Les lymphocytes T effecteurs activent alors les macrophages qui peuvent alors tuer le microbe. L'axe macrophage-cytokine-lymphocyte T joue un rôle clé dans le développement de l'immunité à médiation cellulaire contre les agents pathogènes intracellulaires.

#### 1.1.3.1.2. Phagocytose

Les macrophages ont pour rôle d'ingérer de la matière pour éliminer les déchets et les débris afin de détruire les agents pathogènes envahisseurs. Le mécanisme bactéricide des phagocytes est principalement confiné aux vésicules intracellulaires (lysosomes et phagolysosomes). La première étape de la phagocytose est la reconnaissance des microbes par les récepteurs de la surface cellulaire (Underhill and Ozinsky, 2002). Les macrophages expriment des récepteurs dont la stimulation entraîne la production de cytokines et augmente la migration cellulaire par chimiotaxie vers les sites d'infection. Les récepteurs présents à la surface des macrophages comprennent les récepteurs du mannose, les récepteurs *scavenger*, les récepteurs de l'opsonine, des récepteurs couplés à la protéine G et les récepteurs de type Toll (TLR pour *Toll-like receptors*). La fonction des récepteurs du mannose et des récepteurs *scavenger* est de lier les micro-organismes. Le récepteur du mannose est une lectine qui se lie aux résidus terminaux de mannose et de fucose des glycoprotéines et des glycolipides des parois cellulaires microbiennes. Les récepteurs *scavenger* fixent divers microbes ainsi que des particules de LDL (*low-density lipoprotein*) modifiées par oxydation ou acétylation. Les récepteurs d'opsonine facilitent la phagocytose de micro-organismes recouverts de différents types de protéines (tel que des anticorps), des protéines du complément et des lectines. Les récepteurs Fc et les récepteurs du complément des macrophages contribuent aux processus médiés par l'opsonine. Les récepteurs couplés aux protéines G permettent la reconnaissance de micro-organismes et de certains médiateurs produits en réponse à l'infection et fonctionnent principalement par migration/chimiotaxie des leucocytes vers le site de l'infection (Rot and von Andrian,

2004). Ces récepteurs se trouvent sur les macrophages et sur d'autres types de globules blancs. Comme mentionné précédemment, les TLR sont une famille de récepteurs reconnaissant une variété de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) (Takeda et al., 2003). À ce jour, 10 TLR de mammifères ont été identifiés et sont impliqués dans les réponses à des types de molécules très différents qui sont couramment exprimés par les microbes mais pas par les cellules de mammifères. Les produits microbiens qui stimulent les TLR comprennent le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négatives (TLR4), le peptidoglycane, l'acide lipoteichoïque et le lipoarabinomannane des bactéries gram-positives (TLR2), la flagelline (TLR5) et les motifs CpG non méthylés (TLR9). Les spécificités des TLR sont influencées par des molécules adaptatrices qui ne sont pas des TLR. Par exemple, le LPS se lie d'abord à la protéine soluble de liaison au LPS (LBP) dans le sang ou dans le milieu extracellulaire. Ce complexe sert à faciliter la liaison du LPS à CD14 sur la plupart des cellules, à l'exception des cellules endothéliales. Une fois que le LPS se lie à CD14, la LBP se dissocie, et le complexe LPS-CD14 s'associe physiquement au TLR4. La voie de signalisation prédominante utilisée par les TLR entraîne l'activation du facteur nucléaire (NF)- $\kappa$ B. Les gènes exprimés en réponse à la signalisation des TLR codent pour des protéines importantes dans les composants des réponses immunitaires innées. Il s'agit notamment de cytokines pro-inflammatoires [interleukine (IL)-1, IL-12 et facteur de nécrose tumorale (TNF)], de molécules d'adhésion endothéliale et de protéines impliquées dans les mécanismes microbicides.

#### 1.1.3.1.3. Immunorégulation

L'activation des macrophages permet la sécrétion de nombreuses cytokines telles que IL-1, IL-6, TNF, Interféron (IFN)- $\alpha/\beta$ , IL-10, IL-12, et IL-18. Elles participent à la régulation de la réponse immunitaire et de l'inflammation. En effet, l'IL12 est exprimée majoritairement par les CPA et régule divers angles de la réponse immunitaire en induisant la prolifération et l'activation de cellules T et NK. Ces dernières peuvent alors induire la production d'IFN- $\gamma$ . Parmi les cellules T activées par l'IL12, on retrouve les cellules T auxiliaires de type 1 (Th1) régulatrices de l'immunité (médiation cellulaire de

l'immunité). L'IL-12 permet également l'équilibre entre la résistance de l'immunité innée précoce non spécifique et l'immunité adaptative ultérieure spécifique de l'antigène (Gately et al., 1998).

#### *1.1.3.2. Initiation de l'inflammation*

La réponse inflammatoire débute avec une quantité importante de cellules qui convergent vers le site de l'infection ou du stimulus (e.g lésions). La migration de ces cellules est due à la libération de chimiokines et de médiateurs solubles sécrétés par les cellules résidentes localement telles que les cellules endothéliales vasculaires, les cellules dendritiques, les macrophages et les fibroblastes interstitiels. En effet, les événements de signalisation modifient la distribution locale des molécules d'adhésion et crée un gradient chimiotactique. Les cellules polynucléaires sont les premières à être recrutées suivies de cellules mononucléaires spécialisées, telles que les monocytes/macrophages. Les lymphocytes sont ensuite recrutés par d'autres signaux. Les macrophages ont pour rôle de produire, de mobiliser, d'activer et de réguler les cellules effectrices de l'immunité. Les réponses médiées par les TLR conduisent à l'activation de NF- $\kappa$ B, facteur de transcription qui permet d'induire l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 et TNF. Les macrophages activés, principaux producteurs de ces cytokines inflammatoires, jouent un rôle clé dans le déclenchement de l'inflammation. En plus des réponses immunitaires innées médiées par les TLR, les microbes sont également opsonisés par des voies spécifiques par l'intermédiaire d'anticorps et du système du complément.

#### *1.1.3.3. Activation des macrophages*

L'inflammation induit l'activation des macrophages, leur conférant la capacité d'éliminer les microbes ou encore les cellules cancéreuses. Ces signaux d'activation comprennent les cytokines dérivées des cellules T [IFN- $\gamma$ , facteur de stimulation des colonies de granulocytes-monocytes (GM-CSF) et TNF], les produits microbiens (tels que le LPS), les complexes immuns, les médiateurs chimiques et les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine. L'activation des macrophages entraîne

des modifications phénotypiques (augmentation de leur taille, du nombre de pseudopodes, froissement de la membrane plasmique) mais également physiologiques (production d'éléments biologiquement actifs). La production de ces facteurs doit être finement régulée car ils peuvent devenir délétères pour l'organisme. Comme mentionné précédemment, ce sont les lymphocytes T qui en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires vont permettre l'activation des macrophages. L'axe lymphocyte T -cytokine- macrophage joue donc un rôle essentiel dans le développement de l'immunité à médiation cellulaire.

Les macrophages peuvent également être activés après exposition au LPS bactérien ou à d'autres stimuli inflammatoires, entraînant la libération de TNF. Le TNF peut avoir un effet autocrine en activant lui-même les macrophages qui l'ont sécrété. L'activation des macrophages induit une augmentation de l'expression des récepteurs du TNF. En présence de LPS, les macrophages subissent une activation plus rapide que par le développement de l'immunité à médiation cellulaire, nécessitant le recrutement de lymphocytes Th1 spécifiques de l'antigène. Après stimulation, les macrophages produisent différents éléments impliqués dans l'inflammation. En effet, ils produisent des enzymes engagées dans la résistance aux antimicrobiens, des protéinases, des eicosanoïdes (réparation des tissus), des cytokines telles que l'IL-1 et le TNF.

En cas d'inflammation aigue la durée de vie des macrophages est courte ; le macrophage disparaît lorsque l'agent responsable de l'inflammation est éliminé. Cependant dans certains contextes environnementaux et génétiques, les macrophages peuvent persister et s'accumuler conduisant à une inflammation chronique et à certaines pathologies.

#### *1.1.3.4. Résolution de l'inflammation*

Une réponse inflammatoire qui n'est pas correctement régulée entraîne une cascade d'évènements pouvant aboutir à de graves lésions chez l'hôte. Ainsi une désactivation des médiateurs pro-inflammatoires ou l'élimination des cellules effectrices est nécessaire afin de permettre à l'hôte de réparer les tissus endommagés. Le passage des voies pro-inflammatoires aux voies anti-inflammatoires comprends différents

processus dont l'apoptose, la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires (cytokines, anti-oxydants) et la production d'effecteur directs (inhibiteurs de protéase).

#### 1.1.3.4.1. Apoptose

L'apoptose est un processus qui conduit à la mort cellulaire et laisse des marqueurs de surface qui permet aux corps apoptotiques d'être phagocytés (Marsden and Strasser, 2003). Contrairement à la nécrose, ce processus n'induit pas d'inflammation et permet l'élimination de cellules inflammatoires lorsqu'elles ne sont plus utiles.

L'apoptose est induite par des signaux de mort cellulaire (dommage à l'ADN, accumulation de protéines défectueuses, glucocorticoïdes ...).

Les macrophages jouent un rôle clé dans le processus d'apoptose. Ils permettent la phagocytose et l'élimination des corps apoptotiques. Cette fonction est également réalisée par d'autres cellules phagocytaires telles que les cellules dendritiques, les fibroblastes, les épithéliums, les endothéliums et les myocytes. Les cellules phagocytaires portent différents types de récepteurs qui leur permettent de reconnaître les corps apoptotiques. Les cellules apoptotiques présentent une série de motifs moléculaires distincts des PAMPs.

Une défaillance dans le processus de l'apoptose peut induire à une inflammation chronique et à des maladies auto-immunes car l'apoptose va permettre que les cellules mortes et les débris cellulaires soient retirés par phagocytoses contrairement à la nécrose.

#### 1.1.3.4.2. Médiateurs solubles

##### 1.1.3.4.2.1. Cytokines anti-inflammatoires

Le TGF- $\beta$ , l'IL-4 et l'IL10 sont des cytokines anti-inflammatoires. Elles régulent négativement la réponse inflammatoire. Les macrophages, les cellules T et les fibroblastes sécrètent TGF- $\beta$  et IL-10, tandis que l'IL4 est produite par les cellules NK et les Th2.

Le TGF- $\beta$  induit la prolifération des cellules mésenchymateuses, nécessaires à la cicatrisation des plaies. Il permet également d'augmenter le dépôt de collagène en inhibant la production de collagénase ainsi que réduire l'activité des métalloprotéinases (MMP). Certaines pathologies comme la sclérose systémique est dû à un niveau anormalement élevé de TGF $\beta$  qui entraîne une production accrue de la matrice extracellulaire (Letterio and Roberts, 1998).

L'IL-4 inhibe l'activation des lymphocytes Th1, entraînant une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF. L'IL-4 est un inhibiteur de la production d'IL-6 et d'IL-8 mais augmente la production de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra) (Wynn, 2003).

L'IL-10 régule l'expression des cytokines, des chimiokines et des médiateurs solubles par les macrophages et les monocytes. En effet, l'IL-10 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires essentielles à l'inflammation telles qu'IL-1, IL-6 et TNF (de Waal Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991; Sabat et al., 2010, 10). Il agit également sur la production de chimiokines notamment MCP1 et MCP5 (protéines chimio-attractantes des monocytes) et MIP-1 $\alpha/\beta$ , MIP-3 $\alpha/\beta$  (protéines chimio-attractantes des macrophages) (Couper et al., 2008; Ikeda et al., 2002). En plus d'agir sur la production de cytokines et de chimiokines essentielles à l'inflammation, IL-10 peut également augmenter l'expression de certains antagonistes aux récepteurs de cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'IL-10 augmente l'expression d'antagonistes aux récepteurs de l'IL1 mais aussi ceux du TNF (récepteurs solubles p55 pour TNFR1 et p75 pour TNFR2) (Joyce et al., 1994). Cela empêche donc les macrophages activés de sécréter des cytokines pro-inflammatoires. De plus, l'IL-10 régule l'expression de COX-2 (cyclooxygénase 2) diminuant la production de PGE2 (prostaglandine E2) : l'un des principaux médiateurs de l'inflammation (Park et al., 2006).

Une autre façon de limiter l'action de cytokines pro-inflammatoire est de produire des récepteurs « leurre ». Ces récepteurs ont une grande affinité et spécificité pour certaines cytokines (telles qu'IL-1 et TNF) mais sont incapables de déclencher une cascade de signalisation et donc bloque la fonction biologique de ces cytokines. De plus, les récepteurs du TNF peuvent être libérés des cellules après un clivage protéolytique du domaine transmembranaire pour éliminer la cytokine de l'environnement.

#### 1.1.3.4.2.2. Suppresseur de la signalisation des cytokines (SOCS)

La famille de protéines cytoplasmiques SOCS (suppresseur de la signalisation des cytokines) agit comme une boucle de rétroaction négative pour atténuer la signalisation des cytokines (Alexander and Hilton, 2004). Les phagocytes du système immunitaire inné sont régulés par des cytokines contrôlées par les protéines SOCS, dont l'IL-12 et l'interféron.

#### 1.1.3.4.2.3. Eicosanides

L'induction de COX-2 par les médiateurs inflammatoires contribue à la phase précoce de la réponse inflammatoire mais aussi dans la phase tardive de la réponse inflammatoire (régression de l'inflammation) (Fitzgerald, 2001). Lors de la phase tardive, des prostaglandines se forment et inhibent la transcription de gènes pro-inflammatoires.

Les prostaglandines se lient aux récepteurs PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ) exprimés par les monocytes et les macrophages. Cela a pour conséquence d'inhiber l'activation des macrophages et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF). En effet, les prostaglandines inhibent les voies de transcription AP-1 et STAT mais aussi l'activation de NF- $\kappa$ B.

#### 1.1.3.4.3. Inhibiteurs directs

##### 1.1.3.4.3.1. Antioxydants

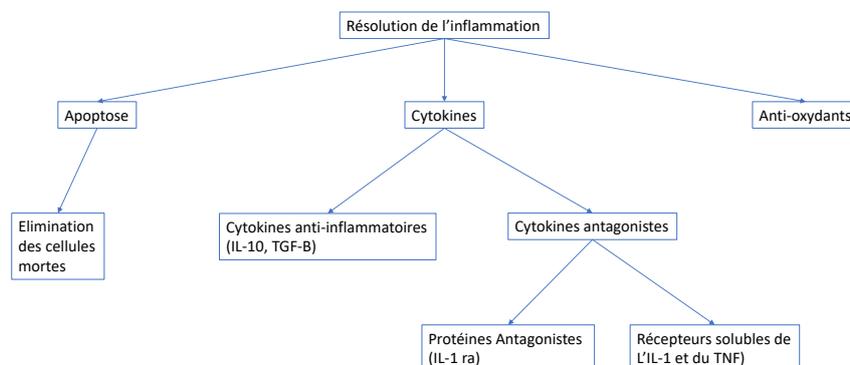
Bien que les ROIs (pour *Reactive Oxygen Intermediates*) contribuent à la défense de l'hôte, une production excessive peut lui être délétère et endommager les tissus. Pour se défendre contre les ROIs, il existe différents types d'anti-oxydants : molécules, enzymes, protéines de liaisons aux métaux ... (Cuzzocrea et al.). Les anti-oxydants peuvent être classés dans la catégorie hydrophile (vitamine C, albumine et glutathion réduit) ou lipidique (vitamine E, caroténoïdes et flavonoïdes). Les enzymes

antioxydantes comprennent la catalase, enzyme peroxysomale qui catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Il existe également la superoxyde dismutase qui permet la dismutation des radicaux superoxydes pour former du dioxygène et du peroxyde d'hydrogène. Les antioxydants briseurs de chaîne sont des molécules qui reçoivent ou donnent un électron ayant pour but de former un sous-produit stable avec un radical qui brise la réaction en chaîne produits par les interactions entre les ROIs et les molécules environnantes. L'ensemble de ces facteurs inhibent indirectement la fonction des macrophages car les ROIs sont produits par des macrophages.

#### 1.1.3.4.3.2. Inhibiteurs de protéases

L'inflammation peut engendrer des lésions tissulaires de l'organisme hôte par l'action de certaines protéases. Afin de protéger l'hôte, des inhibiteurs de ces protéases agissent dans la phase tardive de l'inflammation (réparation et résolution de l'inflammation). C'est le cas des inhibiteurs des protéases à sérine qui jouent un rôle dans la coagulation sanguine.

En conclusion, la résolution de l'inflammation se fait à travers différentes voies de signalisation impliquant une élimination des cellules mortes, des cytokines et des antioxydants (figure 3).



**Figure 3 : Résolution de l'inflammation.** La résolution de l'inflammation se fait via différentes voies de signalisation impliquant l'apoptose, des cytokines ainsi que des anti-oxydants

## 1.2. Tumor Necrosis Factor (TNF)

### 1.2.1. Les cytokines de l'inflammation/pro-inflammatoire

Les cytokines sont des petites protéines sécrétées, régulateurs-clé de l'inflammation. Elles sont produites en réponse aux agents pathogènes envahissants afin de stimuler, recruter et induire la prolifération des cellules immunitaires. Les cytokines comprennent les interleukines (IL), les chimiokines, les interférons et le facteur de nécrose tumorale (TNF). Ces protéines sont réparties selon la nature de leur réponse immunitaire et de leur source de production.

En effet, il existe des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires sont majoritairement sécrétées par les cellules Th1, les cellules CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules sont caractérisées par la production de diverses interleukines (IL), IL-1, IL-2, IL-12, IL-17, IL-18, IFN- $\gamma$  et TNF.

Les principales cytokines pro-inflammatoires sont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF. Elles sont essentielles pour coordonner les réponses immunitaires à médiation cellulaire et jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Les cytokines pro-inflammatoires régulent la croissance des cellules immunitaires, l'activation cellulaire, la différenciation et le ciblage aux sites d'infection dans le but de contrôler et d'éradiquer les agents pathogènes y compris les virus.

Les cellules immunitaires communiquent entre elles par le biais des cytokines.

Les cytokines jouent un rôle essentiel dans l'inflammation, l'hématopoïèse, la neurogenèse, l'embryogenèse et l'oncogenèse. Les cytokines affectent fréquemment l'action d'autres cytokines de manière additive, synergique ou antagoniste (figure 4).



un rôle essentiel dans le système immunitaire. Des déficiences de production de certaines cytokines peuvent conduire à des maladies auto-immunes ou un déficit immunitaire telles que TNF (Adegbola et al., 2018b) ou encore IL-6 (Ishihara and Hirano, 2002). Elles ont pour rôle de promouvoir le développement et la différenciation des cellules T, des cellules B et d'autres cellules hématopoïétiques.

#### 1.2.1.2. *Les chimiokines*

L'efficacité du système immunitaire dépend de la circulation continue des différents types de cellules du système immunitaire. Les cellules doivent pouvoir se déplacer entre le sang, les tissus périphériques et les organes lymphoïdes.

L'activation de ces cellules par un stimuli externe entraîne une modification de leur capacité migratoire leur permettant de se déplacer de l'organe où elles ont été produites (tels que le thymus, moelle osseuse, organes lymphoïdes secondaires ...) aux lieux de l'infection / du stimulus. De nombreuses protéines sont impliquées lors de ce processus telles que des molécules d'adhésion, des protéases mais surtout les chimiokines qui sont des cytokines chimio-attractantes.(Combadière et al., 2007)

#### 1.2.1.3. *Les Interférons*

Les interférons sont des glycoprotéines sécrétées par les cellules de l'immunité mais certains peuvent être également produits par d'autres types de cellules.

L'interféron (IFN) est la première ligne de défense contre les infections microbiennes, en particulier les infections virales (Stanifer et al., 2020). Ils confèrent des propriétés antivirales aux cellules en induisant l'expression de centaines de gènes appelés ISGs (pour *interferon-stimulated genes*). Il existe trois grandes classes d'interférons :

- Interférons de classe I : ils sont généralement produits par les fibroblastes et les macrophages en cas d'infection virale. Il s'agit des interférons IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  and IFN- $\omega$  (Liu, 2005).

- Interférons de classe II : ils sont produits par les cellules T cytotoxiques (CD8+), par les cellules NK (Natural Killer) et par les cellules T Helper 1 (Th1).- Interféron de classe III : ils ont une fonction antivirale similaire aux interférons de classe I mais semblent jouer un rôle particulièrement important dans la première ligne de défense contre les virus au niveau de l'épithélium (Kotenko and Durbin, 2017) .

#### 1.2.1.4. *Facteur de nécrose tumorale*

Les facteurs de nécroses tumorale constituent une superfamille de protéines transmembranaires. Cette famille est composée de 19 ligands et 29 récepteurs. Le membre type de cette superfamille est TNF, également nommée cachexine. TNF est une cytokine qui joue un rôle essentiel dans l'inflammation (voir ci-après).

Chacun des membres de la superfamille du TNF possède une activité pro-inflammatoire, en partie via l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Plusieurs membres de cette famille ont une activité de prolifération sur les cellules hématopoïétiques, notamment grâce à l'activation de plusieurs kinases. Certains membres de la superfamille TNF ont une activité apoptotique tandis que d'autres jouent un rôle dans la morphogénèse et la différenciation (Figure 5). La plupart des membres de la superfamille du TNF ont à la fois des effets bénéfiques et potentiellement délétères (Aggarwal, 2003). Par exemple, si le TNF- $\alpha$  est associé à la prolifération et à la différenciation physiologiques des cellules B dans des conditions stables, il est également associé à diverses maladies, dont le cancer et les troubles cardiovasculaires, neurologiques, pulmonaires, auto-immuns et métaboliques. (Aggarwal et al., 2012)

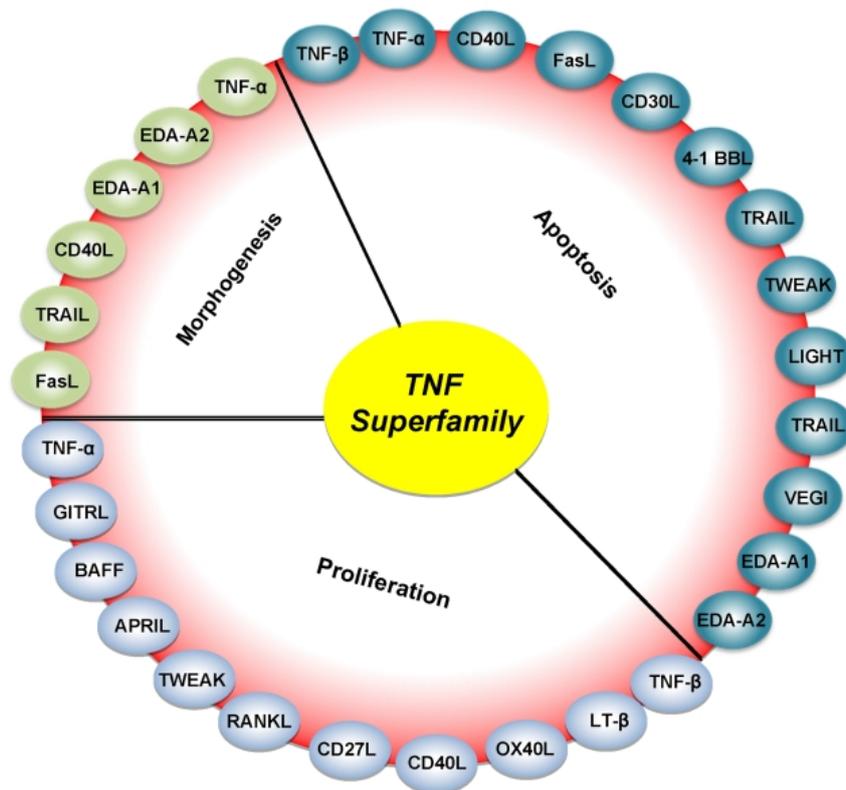


Figure 5 : Différents rôles de la superfamille du TNF dans la morphogénèse, la prolifération et l'apoptose. (Aggarwal et al., 2012)

## 1.2.2. Généralités du Tumeur Necrosis Factor

### 1.2.2.1. Découverte de TNF

Au 18 -ème siècle, les médecins ont noté que certains patients atteints de cancer et ayant subi une infection sévère, voyaient leur tumeur régresser voire disparaître.

A partir de ces cas cliniques, le médecin chercheur Guillaume B. Colley du New-York Cancer Hospital, a proposé un traitement à base de dérivés bactériens (Gram – et Gram +, « toxines de Coley ») pour traiter les patients cancéreux. Cependant, à cause de la montée en puissance des traitements à base de radiations, les travaux de Coley ont été mis de côté bien qu'un certain nombre de rémissions chez les patients atteint de cancer ont été obtenues.

En 1975, le Dr Lloyd Old a mis en évidence l'existence de Tumor Necrosis Factor (TNF) en étudiant la « nécrose hémorragique » des tumeurs productrices d'endotoxines (Carswell et al., 1975a).

En effet, l'injection de lipopolysaccharide (LPS) à des souris infectées avec du "bacille Calmette-Guérin" (BCG) provoquait la libération d'un composant imitant l'effet nécrotique des endotoxines.

Leurs expériences ont montré que cette substance n'était pas une endotoxine mais qu'elle était produite par les cellules de l'hôte. Ils ont ainsi nommé cet élément facteur de nécrose tumorale (TNF) (Carswell et al., 1975b).

TNF est synthétisé sous forme transmembranaire (27 kDa), appelée pro-TNF. Cette protéine est clivée à la surface cellulaire pour libérer la forme sécrétée de TNF (17 kDa). La protéine transmembranaire peut être clivée entre l'alanine 76 et la valine 77 par une métalloprotéase nommée TNF-alpha Converting Enzyme (TACE) également connue sous le nom d'ADAM-17 (Black, 2002).

TACE est une adamalysine, membre d'une classe d'enzymes associées à la membrane plasmique qui contient à la fois des domaines de désintégrine et de métalloprotéinase matricielle (protéines dégradant la matrice). Ces enzymes sont cruciales pour le clivage de plusieurs protéines associées à la membrane, notamment le ligand de Fas, les récepteurs du TNF (TNFR) et le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF-R). TACE semble avoir un certain nombre de fonctions biologiques cruciales en plus de son rôle de clivage de TNF. En effet, les souris déficientes pour TACE ne se développent pas correctement et finissent par mourir (Peschon et al., 1998), alors que les souris déficientes pour TNF ou pour ses deux récepteurs survivent à la gestation.

L'action de TACE produit une protéine TNF soluble sécrétée dans le milieu extracellulaire. L'activité enzymatique de TACE joue donc un rôle clé dans la régulation de la sécrétion de TNF (Colón et al., 2001).

La forme transmembranaire et la forme soluble ont toutes deux une activité biologique. Le TNF soluble agit sur des sites éloignés des cellules qui le produisent (signalisation endocrine), tandis que la forme transmembranaire a une action paracrine sur les cellules environnantes exprimant le récepteur du TNF, transmettant ainsi des signaux via un contact direct cellule-cellule.

TNF est principalement produit par les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T, mais aussi par les mastocytes, les granulocytes, les fibroblastes et plusieurs autres types de cellules (Tracey et al., 2008). Divers stimuli entraînent sa libération, notamment les bactéries, les virus, les complexes immunitaires, les super-antigènes, les cellules tumorales, les radiations et le stress (Van Deventer, 1997).

TNF est une cytokine pléiotropique hautement pro-inflammatoire et est impliquée dans l'induction de la fièvre, la résistance à l'insuline, la résorption osseuse, l'anémie, l'activation des granulocytes/cellules T mais également dans la septicémie.

TNF se lie à deux récepteurs distincts, à savoir le récepteur 1 du TNF, exprimé sur toutes les cellules nucléées, et le récepteur 2 du TNF, exprimé préférentiellement sur les cellules endothéliales et hématopoïétiques (Mitoma et al., 2018a) par lesquels il exerce son effet biologique. Ces effets sont de nature pro-inflammatoire et se manifestent par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine 6 (IL-6), l'expression de molécules d'adhésion, la prolifération de fibroblastes et de facteurs pro-coagulants, ainsi que le déclenchement de réponses en phase aiguë et l'inhibition de l'apoptose des cellules inflammatoires (Begue et al., 2006; Sanchez-Muñoz et al., 2008).

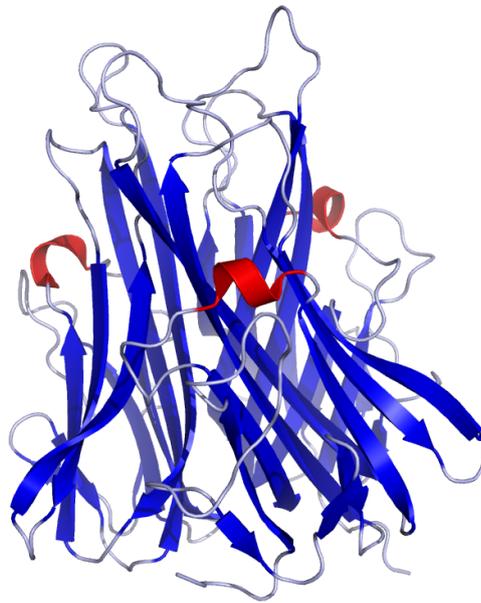
TNF est également impliquée dans des processus clés de l'inflammation, notamment l'activation de la coagulation et des réponses fibrinolytiques, la promotion de l'adhésion entre neutrophile et cellule endothéliale nécessaire au recrutement vers les sites de l'inflammation (Carlos and Harlan, 1994; Kuijpers et al., 1992), et la promotion de l'inflammation granulomateuse (inflammation chronique) par son rôle dans le recrutement des cellules telle que les lymphocytes T, monocytes et macrophages (Kindler et al., 1989; Myatt et al., 1994; Van Deventer, 1997). Il active les leucocytes et induit des réactifs en phase aiguë et des métalloprotéinases et inhibe également l'apoptose des cellules inflammatoires (Poggioli et al.).

#### *1.2.2.2. Structure de TNF*

TNF est une protéine peu hydrophobe, non glycosylé. Sous sa forme native, TNF forme un homotrimerère (Figure 6).

Qu'il soit sous forme sécrétée ou transmembranaire, sa trimérisation est nécessaire pour qu'il soit biologiquement actif.

Chacune des sous-unités est composée de deux feuillets beta antiparallèles connectés de façon « tête bêche ». Le feuillet beta externe est hydrophile et le feuillet beta interne est hydrophobe et contient l'extrémité C-terminale.



**Figure 6 : Structure cristalline de la forme native homotrimerérique du TNF alpha.** Feuillet beta (flèches bleues) Sites de liaisons aux récepteurs du TNF (rouge) (Kindler et al., 1989; Myatt et al., 1994; Van Deventer, 1997)

Les acides aminés reconnus par les récepteurs du TNF sont présents au niveau des trois crevasses entre chaque sous-unité (Fiers, 1991). La dissociation de cet homotrimerère entraîne la perte de son activité biologique (Wajant et al., 2003). Il a été prouvé que la formation de l'homotrimerère se déroule avant son arrivée à la membrane plasmique (Stow et al., 2006). (Wajant et al., 2003)

### 1.2.2.3. Biosynthèse de TNF

Le TNF est produit majoritairement par les macrophages, mais il est également produit par divers types de cellules, y compris les monocytes, les cellules lymphoïdes, les fibroblastes et les cellules du tissu neural.

La stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) ou d'autres produits bactériens tels que l'entérotoxine B, entraîne la production d'une grande quantité de TNF. La biosynthèse du TNF est également régulée par des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-2 et le TNF lui-même. De nombreuses études sur la synthèse de TNF stimulée par le LPS a permis d'identifier le mécanisme de reconnaissance du LPS par les cellules. En effet, le LPS à l'aide d'un complexe se fixe au Toll-Like Receptor 4 (TLR4), jouant un rôle important dans l'immunité innée. (Dauphinee and Karsan, 2006; Li et al., 2003).

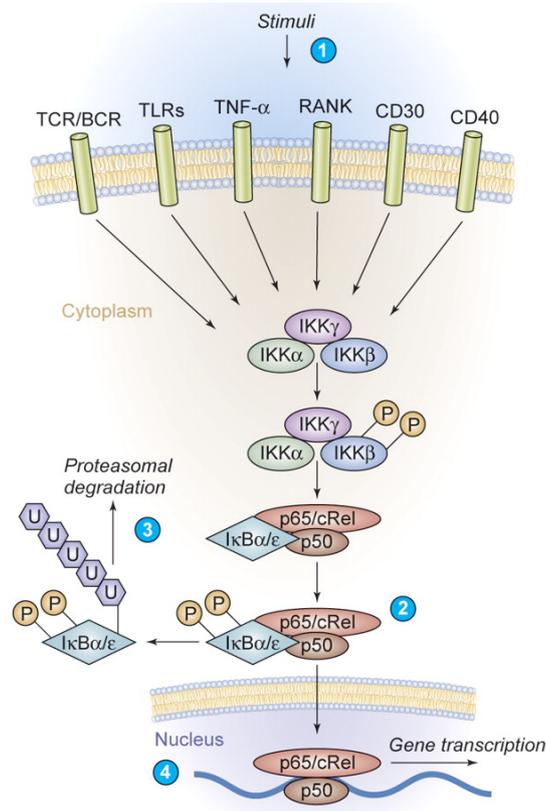
En effet, le complexe LPS-LBP-CD14 est reconnu par le récepteur TLR4, déclenche une cascade de signalisation menant à la synthèse de TNF. Les voies de signalisation impliquant notamment NF- $\kappa$ B et MAPK permettent l'expression du gène de TNF.

#### 1.2.2.3.1. Voie de signalisation NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans l'immunité en permettant l'expression de nombreux gènes du système immunitaire (Müller et al., 1993). NF- $\kappa$ B est formé par l'homo- ou l'hétéro-dimérisation des membres de la famille Rel (protéines de liaison à l'ADN). Chez les mammifères, il s'agit de RelA (p65), c-rel, RelB, p105 (le précurseur de p50) et p100 (le précurseur de p52). Chaque membre de cette famille contient un domaine d'homologie Rel (RHD), qui est lui-même constitué d'une région de liaison à l'ADN, d'une région de dimérisation et d'un signal de localisation nucléaire (Baeuerle and Henkel).

L'activité de NF- $\kappa$ B est régulée par une famille de protéines connues sous le nom de I $\kappa$ Bs qui comprennent I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  et Bcl-3. A leur état inactif, NF- $\kappa$ B est localisé dans le cytoplasme, en complexe avec I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  (IKK $\alpha$ ), I $\kappa$ B kinase- $\beta$  (IKK $\beta$ ) et IKK $\gamma$ /NEMO, une protéine non enzymatique qui peut fonctionner comme un échafaudage. Le complexe IKK peut être activé par diverses cytokines, molécules inflammatoires et signaux de stress dont le LPS (via TLR4) (Akira, 2003) et le TNF (via TNFR) (Figure 7).

Dans la voie canonique, IKKb activé phosphoryle IκB qui est ensuite ubiquitinylé et dégradé. Cela libère NF-κB du complexe contenant IκB et démasque le signal de localisation nucléaire (NLS). Un complexe NF-κB composé de RelA/c-Rel/p50 est transloqué dans le noyau où il peut activer la transcription de ses gènes cibles (Hayden and Ghosh, 2008; Jost and Ruland, 2006).



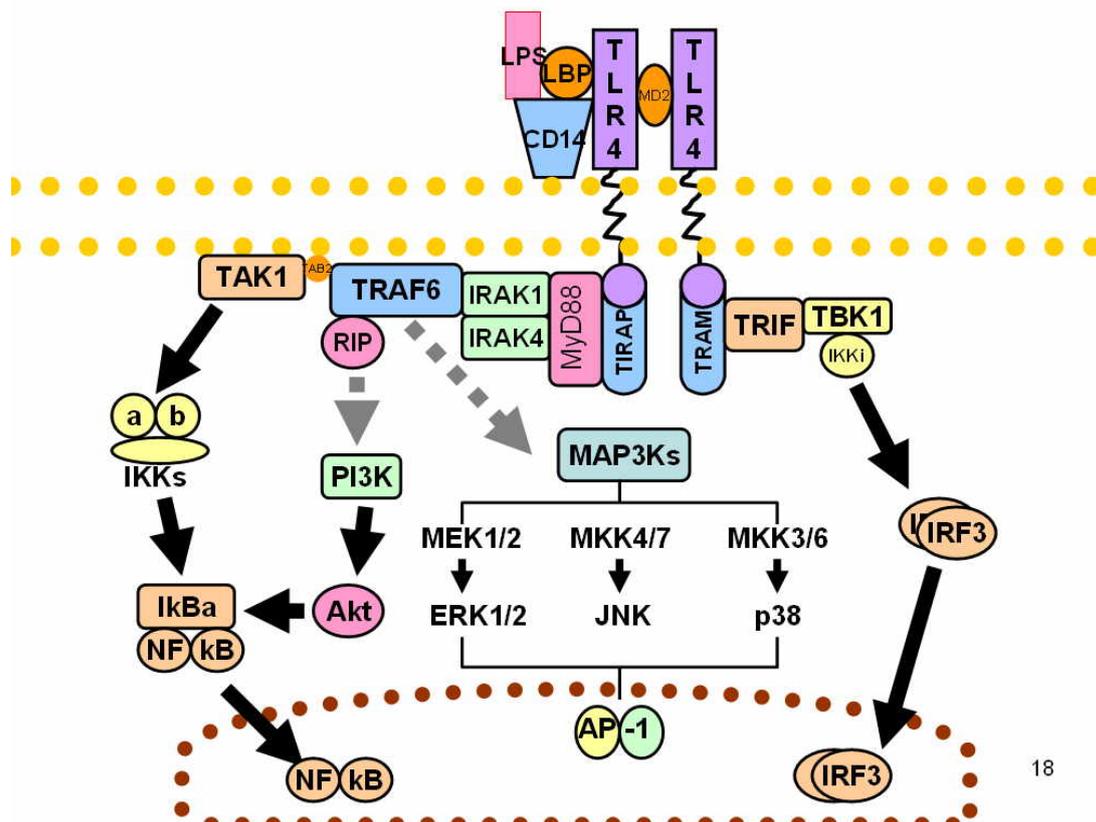
**Figure 7 : Activation de la voie de signalisation NF-κB** 1). L'IKK activé phosphoryle les protéines IκB sur 2 résidus sérine conservés et induit la polyubiquitinylation des IB (2), ce qui induit à son tour leur reconnaissance par le protéasome et provoque leur dégradation protéolytique successive (3). Après la dégradation de l'IκB, les dimères cytoplasmiques du NF-κB sont libérés et transloquent dans le noyau, où la transcription des gènes est activée (4). (Jost and Ruland, 2006)

#### 1.2.2.3.2. Voie de signalisation de la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases)

Une deuxième voie importante dans la biosynthèse du TNF est la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase). Ces protéines sont des sérine/thréonine kinases qui sont activées par phosphorylation suite à un stimulus. La voie MAPK comprend plusieurs intermédiaires séquentiellement activés par la phosphorylation (Figure 8).

Les voies de la MAP kinase partagent une structure commune formée par trois protéines kinases agissant séquentiellement, dont une MAP kinase kinase (MAP2K ou MKK) et une MKK kinase (MAP3K ou MKKK). Le mécanisme canonique d'activation de la MAP kinase est provoqué par la phosphorylation d'un motif pThr-Xaa-pTyr situé dans la boucle en T de la MAP kinase par MAP2K. La séquence de ce motif en T est une caractéristique déterminante des MAP kinases : Thr-Glu-Tyr (ERK) ; Thr-Gly-Tyr (p38) ; et Thr-Pro-Tyr (JNK). Chaque MAP2K, à son tour, est activée par la phosphorylation des résidus Ser et/ou Thr de la boucle en T de MAP2K par un ou plusieurs membres de la famille des protéines MAP3K. La spécificité du substrat des MAP2K et MAP3K, les interactions d'amarrage et les protéines d'échafaudage définissent les différentes voies MAPK. Les MAP kinases activées transforment le stimulus externe en réponses physiologiques correctes par la phosphorylation de substrats en aval, notamment des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, des protéines impliquées dans la traduction de l'ARNm et d'autres protéines kinases qui contribuent à la spécificité, à la diversité et à l'amplification de la cascade des MAP kinases.

Parmi les kinases impliquées dans ces voies de signalisation, la protéine p38 semble jouer un rôle central dans la biosynthèse de TNF (Dodeller and Schulze-Koops, 2006; Zarubin and Han, 2005) tout comme les voies JNK et ERK (Roux and Blenis, 2004; Weston and Davis). Ces voies de signalisation intracellulaire conduisent à l'activation de l'expression de TNF (Sabio and Davis, 2014).



18

Figure 8 : Activation de la voie de signalisation de la MAPK par stimulation du LPS

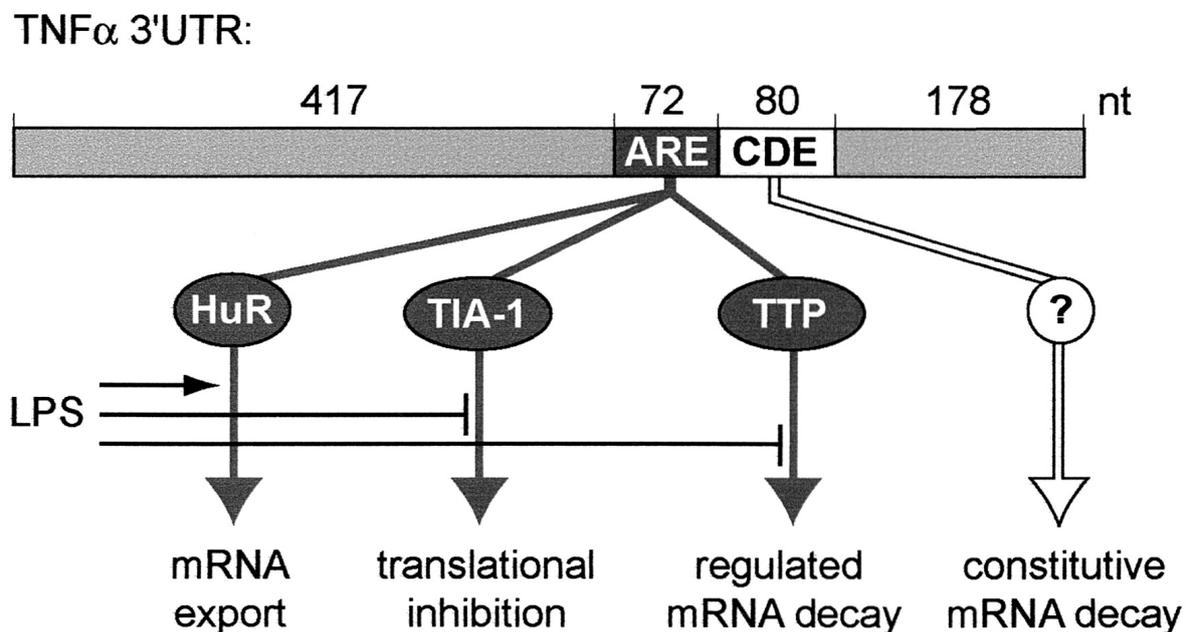
[https://fr.wikipedia.org/wiki/TLR4#/media/Fichier:Tolllike\\_receptor\\_pathways\\_revised.jpg](https://fr.wikipedia.org/wiki/TLR4#/media/Fichier:Tolllike_receptor_pathways_revised.jpg)

### 1.2.2.3.3. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de TNF

#### 1.2.2.3.3.1. AU-Riche-Element et AU Binding Protein

Contrôler la durée de vie de l'ARN messager est l'un des moyens de contrôler l'expression post-transcriptionnelle de TNF. Des séquences consensus riches en « AU » appelé ARE (AU-Riche-Element) sont présentes dans la région 3' UTR (région non traduite) de l'ARN messager. Ces dernières sont impliquées dans la stabilité de l'ARN messager car des protéines stabilisatrices ou déstabilisatrices peuvent s'y fixer. Ces protéines sont appelées AUBP (AU Binding Protein) et peuvent préserver (HuR) ou provoquer (tristetraprolin (TTP)) la dégradation des ARNm contenant des ARE (Ronkina et al., 2010), jouer un rôle dans la traduction de l'ARNm (TIA-1 ou

TIAR)(Phillips et al., 2004; Winzen et al., 2004) . Les protéines AUBP sont elles-mêmes régulées par différentes kinases dont la protéine kinase p38 (Dean et al., 2004). Cette régulation est souvent mise en jeu pour moduler l'expression des cytokines inflammatoires (Clark, 2000; Espel, 2005). Beaucoup de cytokines et chimiokines produites pendant la réponse immunitaire, notamment TNF (Figure 9), IL6, IL1-B, GM-CSF, IL8, sont codées par des ARNm très instables contenant un ARE. Ainsi les ARE et les AUBP sont essentiels dans la régulation de l'expression des gènes de la réponse inflammatoire (Espel, 2005) . Leur absence peut être impliquée dans certaines pathologies. En effet, l'inhibition de l'expression de ces séquences chez les macrophages de souris permet de stabiliser l'ARNm codant pour TNF- et entraîne une production spontanée de sa protéine. Les souris portant cette mutation développent une production d'auto-anticorps, une inflammation intestinale (IBD) et arthrite chronique inflammatoire similaire à la maladie de Crohn chez l'homme (Kontoyiannis et al.). Les mêmes symptômes apparaissent chez les souris mutantes par knock-out n'exprimant pas certaines protéines AUBP (notamment la TTP) (Taylor et al.)



**Figure 9 : Régulation post transcriptionnelle du TNF alpha via les ARE.** Les séquences ARE sont impliquées dans (i) l'exportation de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme, (ii) l'inhibition de la traduction par la liaison de TIA-1, et (iii) le ciblage de l'ARNm pour une désintégration rapide par la liaison de TTP.. (Stoecklin et al., 2003)

#### 1.2.2.3.3.2. Les microARN

Les microARN (miARN) sont des molécules d'ARN simple brin non codantes et de petite taille (comprenant 21 à 23 nucléotides). Présents dans les plantes, les animaux et certains virus, les miARN sont impliqués dans l'inhibition de l'expression de l'ARN et la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. En effet, les miARN sont des répresseurs post-transcriptionnels : en s'appariant à des ARN messagers, ils entraînent leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction en protéine (Bartel, 2009).

Les microARN semblent réguler indirectement l'expression de TNF. Le microRNA miR-346 inhibe indirectement l'expression de TNF (Semaan et al., 2011) en régulant l'expression de la tristetraproline (TTP) (protéine de liaison à l'ARN) via la protéine tyrosine kinase Bruton (BTK). A l'opposé une régulation positive du miR-155 chez les macrophages activés par le LPS permet une augmentation de la traduction de TNF (Tili et al., 2007).

#### 1.2.2.4. Cascades de signalisation des récepteurs du TNF

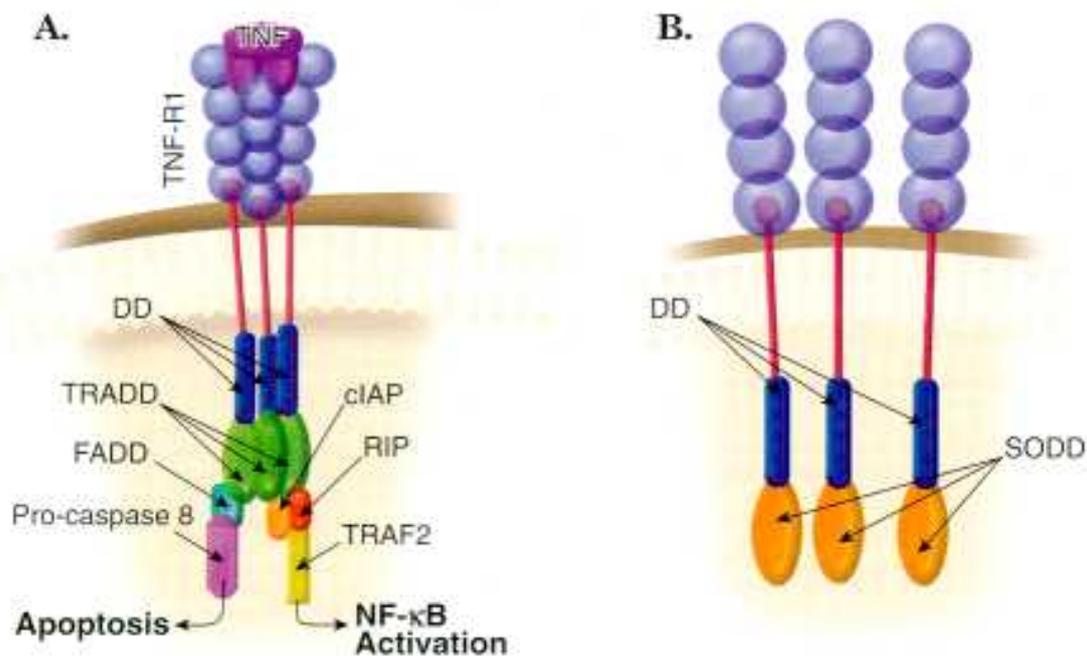
Les cascades de signalisation déclenchées par TNF sont médiées par deux récepteurs structurellement différents : le type I (TNFR1, également appelé p60, p55, CD120a) et le type II (TNFR2, également appelé p80, p75, CD120b) (Theiss et al., 2005).

Toutes les cellules nucléées expriment des récepteurs du TNF, bien que leur distribution varie selon le type de cellule. Le TNFR1 est exprimé de manière constitutive sur la plupart des types cellulaires, alors que l'expression du TNFR2 peut être induite ; le TNFR2 est restreint à certains types de cellules.

Les récepteurs diffèrent également de manière significative dans l'affinité de liaison pour le TNF homotrimérique. TNFR1 peut se lier à TNF sous sa forme transmembranaire et sa forme soluble tandis que TNFR2 semble reconnaître TNF que sous forme transmembranaire (figure 16).

De plus, les deux récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires contenant tous deux quatre répétitions riches en cystéine dans leurs domaines extracellulaires, grâce auxquelles les récepteurs forment un trimère stabilisé par des ponts disulfures. Bien que leurs domaines extracellulaires partagent une homologie structurelle et fonctionnelle, leurs domaines intracellulaires sont différents. Les voies de signalisation induites par l'activation de ces récepteurs sont distinctes. La principale caractéristique qui différencie les domaines intracellulaires des deux récepteurs est la présence d'un domaine de mort dans TNFR1 mais pas dans TNFR2. Le domaine de mort (ou *Death Domain*) est une séquence d'environ 70 acides aminés qui joue un rôle central dans la capacité du TNF à déclencher l'apoptose. Ce domaine de mort intracellulaire fournit des sites d'amarrage pour un certain nombre de protéines accessoires, y compris la protéine de domaine de mort associée à Fas (FADD), la protéine de domaine de mort associée à TNFR1 (TRADD) et le facteur protéique lié au TNFR 2 (TRAF-2). TRADD et TRAF2 représentent des points de ramification pour les voies de signalisation pro-apoptotiques et inflammatoires caractéristiques de TNFR1. En effet, dans des conditions physiologiques, les voies de signalisation induites par le TNFR1 semblent être majoritairement responsables des propriétés pro-inflammatoires du TNF.

Concernant TNFR1, les extrémités du récepteur s'insèrent dans les crevasses entre chaque sous-unité du TNF homotrimère., entraînant la dissociation de la protéine inhibitrice SODD (Silence Of Death Domains). Cela va permettre dans un premier temps la libération du « domaine de mort » qui engendre la trimérisation des récepteurs de TNF mais aussi le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD (TNFR1 Associated Death Domain)(Xiong and Goeddel). La présence de SODD maintient TNFR1 sous forme monomérique et inactif (Figure 10). (Jiang et al., 1999)



**Figure 10 :** Activation et trimérisation de TNFR1 en présence du ligand TNF (A) et maintien de la forme inactive de TNFR1 en présence de SODD (B). DD (death domain), SODD (silencer of death domains), TRADD (TNFR1 associated death domain protein), FADD (Fas-associated death domain protein), TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), RIP (Receptor-interacting protein), cIAP (cellular inhibitor apoptosis) <https://www.rndsystems.com/resources/articles/sodd-silencer-death-domains>

La liaison de la protéine TRADD au « death domain » active différentes voies de signalisation notamment celle impliquant NF $\kappa$ B (Wajant et al., 2003). TRADD recrute TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2) et RIP (Receptor Interacting Protein Kinase). TRAF2 recrute la protéine kinase IKK qui est phosphorylée par RIP. Une fois activée, IKK phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  qui est alors dégradée. Cette action entraîne la libération de NF $\kappa$ B, normalement bloqué par I $\kappa$ B $\alpha$ . NF $\kappa$ B initie alors la transcription de nombreux gènes et déclenche, entre autres, des réponses inflammatoires (Figure 11).

Comme indiqué plus haut, TNFR2 n'a pas de domaine de mort (contrairement à TNFR1). L'activation de TNFR2 recrute TRAF2 qui favorise la prolifération et la survie des cellules (Faustman and Davis, 2010). De plus, TNFR2 peut également induire l'apoptose lorsqu'il interagit avec TNFR1 dans certaines conditions inflammatoires (Fotin-Mlecsek, 2002). Les fonctions distinctes du TNF et de ses récepteurs ont

conduit à l'idée de cibler sélectivement TNFR1 pour inhiber l'apoptose et TNFR2 pour induire la survie cellulaire.

Les deux récepteurs du TNF peuvent être clivés de la surface cellulaire par des membres de la famille des métalloprotéinases matricielles en réponse à des signaux inflammatoires, tels que la liaison à TNF. Les domaines extracellulaires détachés des récepteurs conservent leur capacité à se lier à TNF et fonctionnent donc probablement comme des inhibiteurs ou des facilitateurs endogènes de l'activité biologique du TNF, en fonction de leurs concentrations et de celles du ligand.

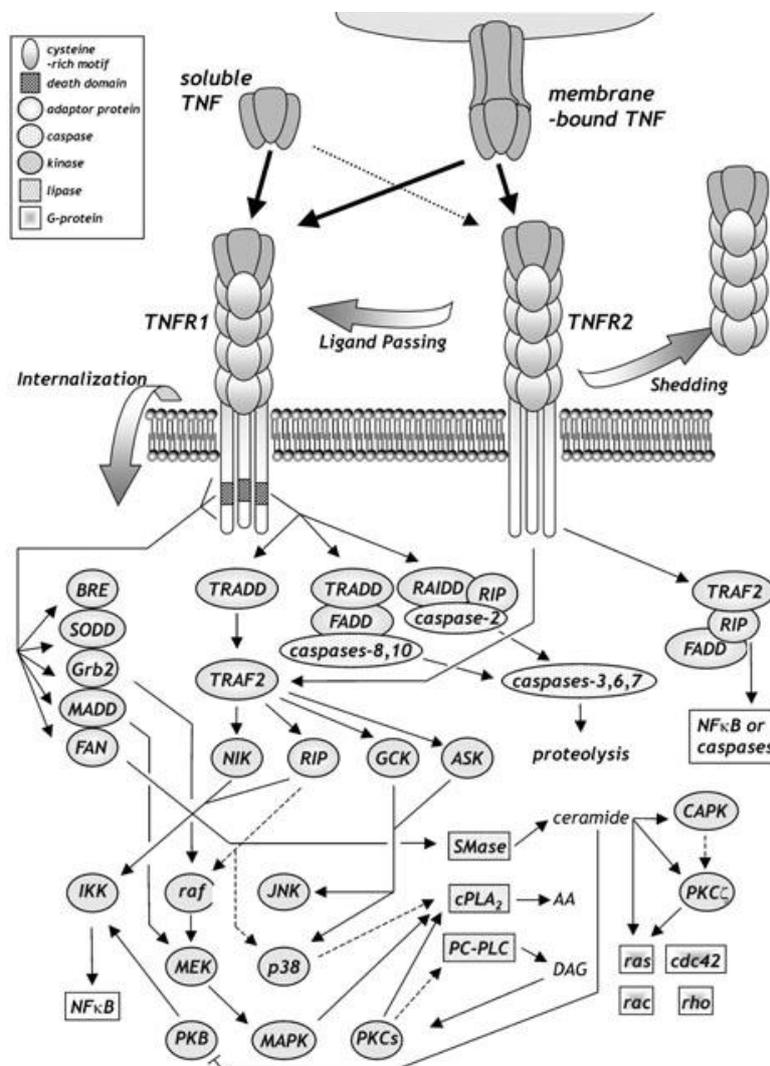
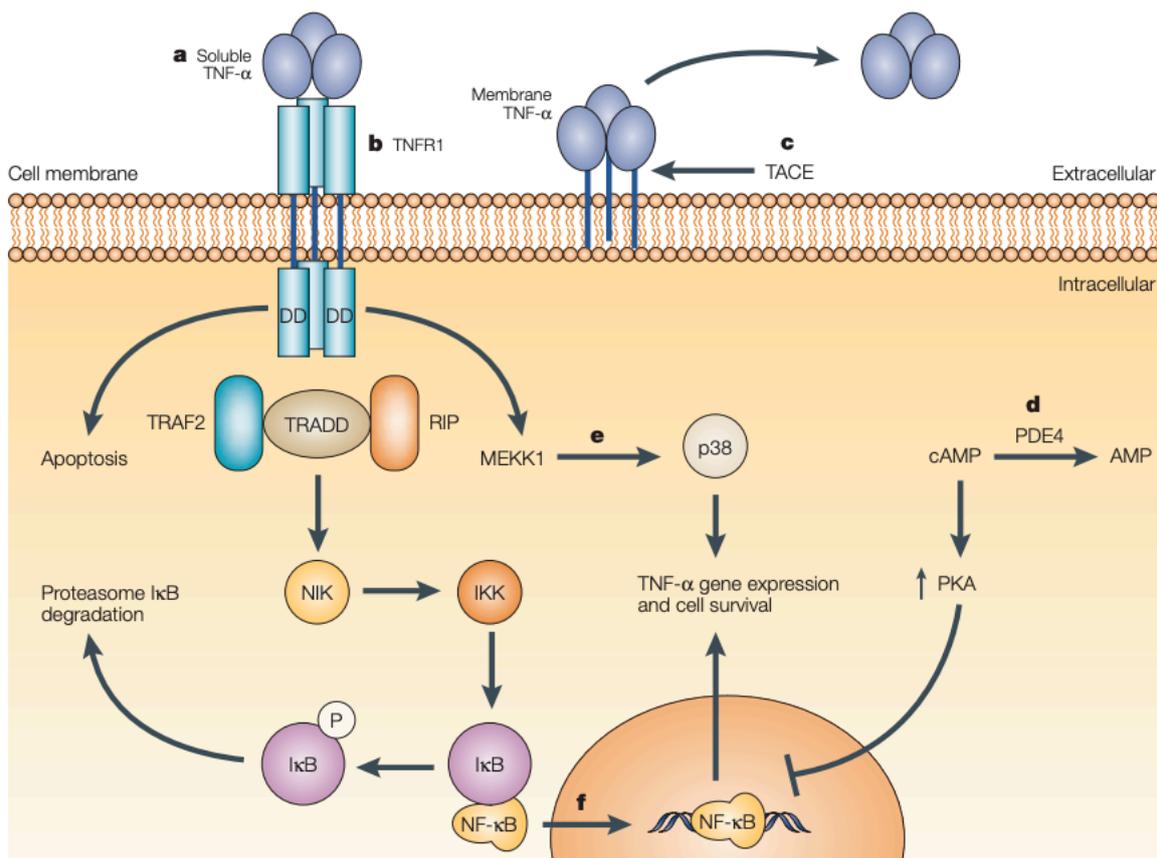


Figure 11 : Voies de signalisation induites par TNF- $\alpha$  (MacEwan, 2002)

### 1.3. Rôle de TNF dans les maladies inflammatoires chroniques

TNF est une cytokine jouant un rôle important dans plusieurs maladies inflammatoires notamment dans la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde ou encore le psoriasis. Les traitements biologiques tels que les anticorps monoclonaux anti-TNF ou encore les récepteurs solubles de TNF sont injectés aux patients atteints de ces maladies inflammatoires chroniques. D'autres traitements visent l'inhibition des voies de transduction (MAP Kinase p38) (Fehr et al., 2015), de production de TNF (phosphodiesterase 4 : PDE4) (Palladino et al., 2003) (Figure 12) ou encore le relargage de TNF dans le milieu (TACE) (Newton et al.).



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

### 1.3.1. Implication de TNF dans la maladie de Crohn

#### 1.3.1.1. *La maladie de Crohn*

La maladie de Crohn fait partie des « maladies inflammatoires chroniques de l'intestin » (MICI) qui comprend également la colite ulcéreuse. Ces maladies sont caractérisées par une inflammation chronique, incontrôlée et récidivante au niveau du tube digestif.

La maladie de Crohn comprend différents phénotypes inflammatoires qui entraînent la destruction des tissus du tube digestif via les cellules T (Gasche and Grundtner, 2005; Sartor, 2006). Cette maladie est également associée à une augmentation de la production de cytokines inflammatoires tels que TNF, IL-12 ou encore IFN  $\gamma$  (Sartor, 2006; Targan and RUTGEERTS, PAUL J., 1997). Les manifestations phénotypiques de la maladie de Crohn sont cliniquement pertinentes (classification phénotypique de Montréal) (Satsangi, 2006) car en fonction du phénotype de la maladie différents options de traitement seront appliqués. Il existe trois différents phénotypes de la maladie de Crohn :

- Le phénotype inflammatoire
- Le phénotype sténosant (rétrécissement de l'organe)
- Le phénotype pénétrant/fistulé (apparition d'un conduit entre deux organes)

La maladie de Crohn peut affecter différentes parties de l'intestin : environ 35% des patients sont touchés au niveau de l'iléon seul (iléite), 45% des cas de la maladie de Crohn touchent à la fois l'iléon et le côlon (iléocolite) et enfin environ 20% des patients sont touchés au niveau du côlon seulement (colite granulomateuse).

Les symptômes comprennent généralement une diarrhée chronique, des douleurs abdominales, de la fièvre, apparition d'une masse (pouvant être palpable) et une perte de poids (voire de l'anorexie).

Cette pathologie est caractérisée par des cycles répétés de rechutes et de rémissions avec inflammation, entraînant des complications telles que des sténoses et des fistules intestinales. La maladie de Crohn périanale est un phénotype pathologique grave affectant un tiers des patients atteints de cette maladie (Adegbola et al., 2018a). Elle comprend un éventail de manifestations telles que la fistule périanale, la sténose du

canal anal, les étiquettes cutanées, les fissures et les ulcères, et représente un fardeau considérable pour les patients qui en sont atteints. Les objectifs du traitement de la maladie de Crohn sont d'induire et de maintenir une rémission, de cicatriser la muqueuse et d'optimiser la qualité de vie du patient (Hart and Ng, 2015).

Les recommandations préconisent un traitement progressif en débutant avec des traitements immunosuppresseurs tels que les corticostéroïdes et immunomodulateurs puis de commencer le traitement à base d'anticorps anti-TNF (Ghazi et al., 2013; Gomollón et al., 2017).

#### *1.3.1.2. Le rôle de TNF dans la maladie de Crohn*

Les origines de la maladie de Crohn ne sont pas encore clairement définies mais il semble qu'elle implique une interaction entre des déclencheurs environnementaux, un déséquilibre de la flore intestinale, des réponses immunitaires aberrantes (immuno-régulation) et une susceptibilité génétique (Sartor, 2006).

La maladie de Crohn entraîne des lésions et une inflammation des muqueuses accompagnées d'une rupture de la barrière épithéliale. Ces perturbations et blessures de la muqueuse sont associés à une dysbiose (déséquilibre de la flore intestinale) qui peut activer et maintenir une cascade de signaux inflammatoires (Torres et al., 2017). La maladie de Crohn est caractérisée par une inflammation médiée par les lymphocytes T et facilitée par une augmentation de la présence de cytokines pro-inflammatoires tels que l'interféron gamma, l'interleukine 12 (Sartor, 2006; Targan and RUTGEERTS, PAUL J., 1997) ainsi que TNF.

Une sécrétion de TNF plus abondante a été constatée au niveau de la muqueuse intestinale. (Murch et al., 1993; Yapali and Hamzaoglu, 2007) Plusieurs études ont démontré que la quantité de TNF est plus importante dans les selles des patients atteints de la maladie de Crohn comparé aux groupes témoins bien qu'il n'y a pas de différence significative concernant les concentrations sériques (Braegger et al., 1992; Murch et al., 1991). TNF est une cytokine pro-inflammatoire précoce, dont le rôle est important dans le processus inflammatoire sous-jacent de la maladie de Crohn (Assche and Rutgeerts, 2000; Murch et al., 1993). En effet, des études in vitro ont démontré que TNF est impliqué dans la formation de granulomes, l'accumulation de

neutrophiles et l'augmentation de la perméabilité épithéliale. (Amiri et al., 1992; Mullin and Snock, 1990; Rampart et al., 1989).

#### *1.3.1.3. Traitements anti-TNF actuels*

Des études utilisant des anticorps neutralisants suggèrent que le TNF joue un rôle important dans la pathogenèse de la maladie de Crohn (Sartor, 2006). Des expériences ont d'abord été réalisées sur des modèles animaux puis un anticorps anti-TNF- $\alpha$  cA2 (nommés par la suite infliximab, IFX) a été administré à des patients atteints de la maladie de Crohn (DERKX et al., 1993; van Dullemen et al., 1995). Ces découvertes ont suscité des études multicentriques et ont conduit à l'approbation par la Food and Drug Administration de médicaments anti-TNF pour le traitement de la maladie de Crohn en 1998 grâce à de nombreux essais cliniques (table 1). Il semble que les anticorps anti-TNF ont de multiples mécanismes d'action, y compris la neutralisation de TNF, la signalisation inverse, l'apoptose et la cytotoxicité (Berns and Hommes, 2016). et agissent au niveau des tissus inflammés (Mitoma et al., 2018b). Ils sont capables d'éliminer la surexpression du TNF en se liant aux formes transmembranaire et soluble de TNF et empêchent sa liaison aux récepteurs. La signalisation pro-inflammatoire ou la production de molécules régulées à la hausse par TNF sont ainsi bloquées. La thérapie anti-TNF a également montré *in vitro* qu'elle entraîne une diminution des cytokines par signalisation inverse (Eissner et al., 2000; Eissner et al., 2004). Ce phénomène se produit lorsque le TNF transmembranaire présent à la surface cellulaire se lie à l'anti-TNF. Ces anticorps agissent comme des ligands sur le TNF transmembranaire pour déclencher l'activation cellulaire, l'inhibition des cytokines ou l'apoptose avec des précurseurs liés à la surface cellulaire (Eissner et al., 2000; Eissner et al., 2004; Harashima et al., 2001). Les récepteurs du TNF présents sur les monocytes induisent un signal inverse empêchant la production de facteurs apoptotiques solubles par les monocytes (Eissner et al., 2000). Une des hypothèses suggère que cela se produit par l'épuisement des produits de signalisation communs lors de l'activation simultanée de la voie de signalisation du LPS (Berns and Hommes, 2016). Les anti-TNF provoquent également l'apoptose des cellules T activées du chorion (ten Hove et al., 2002), alors que dans le cas de la maladie de

Crohn la prolifération des lymphocytes T muqueux l'emporte sur l'apoptose des cellules T (Van den Brande et al., 2007).

La thérapie anti-TNF contenant une région Fc (l'infliximab et l'adalimumab, figure 13) peuvent également induire une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps et du complément (Mitoma et al., 2018b).

Study	Drug	Patient Groups	Response (Where Reported)	Remission
Targan et al. [4] 1997 Multicentre Double-blind placebo controlled trial	IFX	3 Treatment groups: Infliximab-5 or 10 or 20 mg/kg Placebo	At week 4: 5 mg/kg group: 81% (22/27) 10 mg/kg group: 50% (14/28) 20 mg/kg group: 64% (18/28) Placebo: 17% (4/24)	At week 4: All dose treatment group-33% (27/83) Placebo group 4% (1/24)
ACCENT-I (Hanauer et al. [46]) 2002	IFX	3 treatment groups-same induction regimen (IFX 5 mg/kg at week 0) followed by: Group 1-Placebo at weeks 2 & 6 then every 8 weeks through to week 54 Group 2-IFX 5 mg/kg at weeks 2 & 6 then every 8 weeks through to week 54 Group 3-IFX 10 mg/kg at weeks 2 & 6 then every 8 weeks through to week 54	At week 2: For all participants receiving IFX 5 mg/Kg at week 0: 58% (335/573)	At week 30: (in those patients demonstrating clinical response at week 2) Group 1-21% (23/110) Group 2-39% (44/113) Group 3-45% (50/112)
ACCENT-II (Sands et al. [47]) 2004 Multicentre RCT	IFX	2 treatment groups-same induction regimen (IFX 5 mg/kg at week 0, 2, 6) followed by: Group 1-IFX 5 mg/kg every 8 weeks through to week 54 Group 2-Placebo every 8 weeks through to week 54	Median time to loss of response Group 1: >40 weeks Group 2: 14 weeks	At week 54-remission here refers to complete absence of draining fistulas Group 1-36% (50/138) Group 2-19% (27/144)
SONIC (Colombel et al. [51]) 2010 Multicentre RCT	IFX	3 treatment groups-all had IFX 5 mg/kg from weeks 8 through to week 50 In addition: Group 1: IFX 5 mg/kg at weeks 0, 2, 6 and azathioprine placebo daily Group 2: Placebo at weeks 0, 2, 6 and azathioprine 2.5 mg/kg daily Group 3: IFX 5 mg/kg at weeks 0, 2, 6 and azathioprine 2.5 mg/kg daily		At week 26: Group 1-44% (75/169) Group 2-30% (51/170) Group 3-57% (96/169) Mucosal healing in patients with ulcerations at baseline: Group 1 30% (28/93) Group 2 17% (18/109) Group 3 43.9% (47/107)
CLASSIC-I (Hanauer et al. [52]) 2006 Multicentre RCT	ADA	4 treatment groups-initial dose (of ADA for groups 1-3 and placebo for group 4) at week 0, second dose at week 2, i.e., Group 1: ADA 160 mg/80 mg Group 2: ADA 80 mg/40 mg Group 3: ADA 40 mg/20 mg Group 4: Placebo/Placebo		At week 4: Group 1: 36% (27/76) Group 2: 24% (18/75) Group 3: 18% (13/74) Placebo: 12% (9/74)
CLASSIC-II (Sandborn et al. [53]) 2007 Multicentre RCT	ADA	4 treatment groups- (1-3 were in remission at week 0, i.e., week 4 of CLASSIC-I, group 4 were not in clinical remission following treatment in CLASSIC-I) Group 1: ADA 40 mg fortnightly from 0 through to week 56 Group 2: ADA 40 mg weekly from 0 through to week 56 Group 3: Placebo through to week 56 Group 4: ADA 40 mg fortnightly through to week 56 (with allowance for decreased interval, i.e., weekly if continued non-response/flare)		At week 56: Group 1: 79% (15/19) Group 2: 83% (15/18) Group 3: 44% (8/18) Group 4: 46% (93/204)
Study	Drug	Patient Groups	Response (Where Reported)	Remission
CHARM (Colombel et al. [54]) 2007	ADA	3 treatment groups-all groups had ADA 80 mg at week 0, 40 mg at week 2 then: Group 1: 40 mg fortnightly through to week 56 Group 2: 40 mg weekly through to week 56 Group 3: Placebo through to week 56		At week 26: Group 1-40% (69/172) Group 2-47% (74/157) Placebo-17% (29/170) At week 56: Group 1 36% (62/172) Group 2: 41% (64/157) Placebo: 12% (20/170)
GAIN Sandborn et al. [55] 2007 Multicentre RCT	ADA	2 treatment groups Group 1: 160 mg at week 0, 80 mg at week 2 Group 2: Placebo at weeks 0,2	At week 4: Group 1: 52% (82/159) Group 2: 34% (56/166)	At week 4: Group 1: 21% (34/159) Group 2: 7% (12/166)
Schreiber et al. [56] 2005 Multicentre RCT	CZP	3 treatment groups-all with treatment at weeks 0, 4, and 8 weeks. However different drug dosing: Group 1: 400 mg CZP Group 2: 200 mg CZP Group 3: 100 mg CZP Group 4: Placebo	At week 12: Group 1: 44% (32/72) Group 2: 36.1% (26/72) Group 3: 36.4% (27/74) Placebo: 35.6% (26/73)	At week 12: Group 1: 26% (19/72) Group 2: 19% (14/72) Group 3: 27% (20/74) Placebo: 23% (17/73)
PRECISE I (Sandborn et al. [57]) 2007 Multicentre RCT	CZP	2 treatment groups Group 1: 400 mg at week 0, 2, 4 then every 4 weeks through to week 26 Group 2: Placebo at week 0, 2, 4 then every 4 weeks through to week 26	At week 6: Group 1: 35% (115/327) Group 2: 27% (87/325) At week 6 AND 26: Group 1: 23% (75/325) Group 2: 16% (52/325)	At week 6: Group 1: 22% (71/329) Group 2: 17% (57/326) At week 6 AND 26: Group 1: 14% (47/327) Group 2: 10% (32/326)
Sandborn et al. [58] 2011 Multicentre RCT	CZP	2 treatment groups: Group 1: 400 mg at 0, 2, 4 weeks Group 2: Placebo at 0, 2, 4 weeks		At week 6: Group 1: 32% (68/215) Group 2: 25% (53/209)
PRECISE-II (Schreiber et al. [59]) 2007 RCT	CZP	2 treatment groups: all received 400 mg at 0, 2, 4 weeks then following assessment of week 6 response: Group 1: 400 mgs at week 8, 12, 16, 20, 24 Group 2: Placebo at week 8, 12, 16, 20, 24	Maintenance of response at week 26: Group 1: 63% (135/215) Group 2: 36% (76/210)	At week 26 (i.e., remission data in those who demonstrated response at week 6): Group 1: 48% (103/215) Group 2: 29% (61/210)

Table 1 : résumé des essais cliniques des principaux traitements Anti-TNF

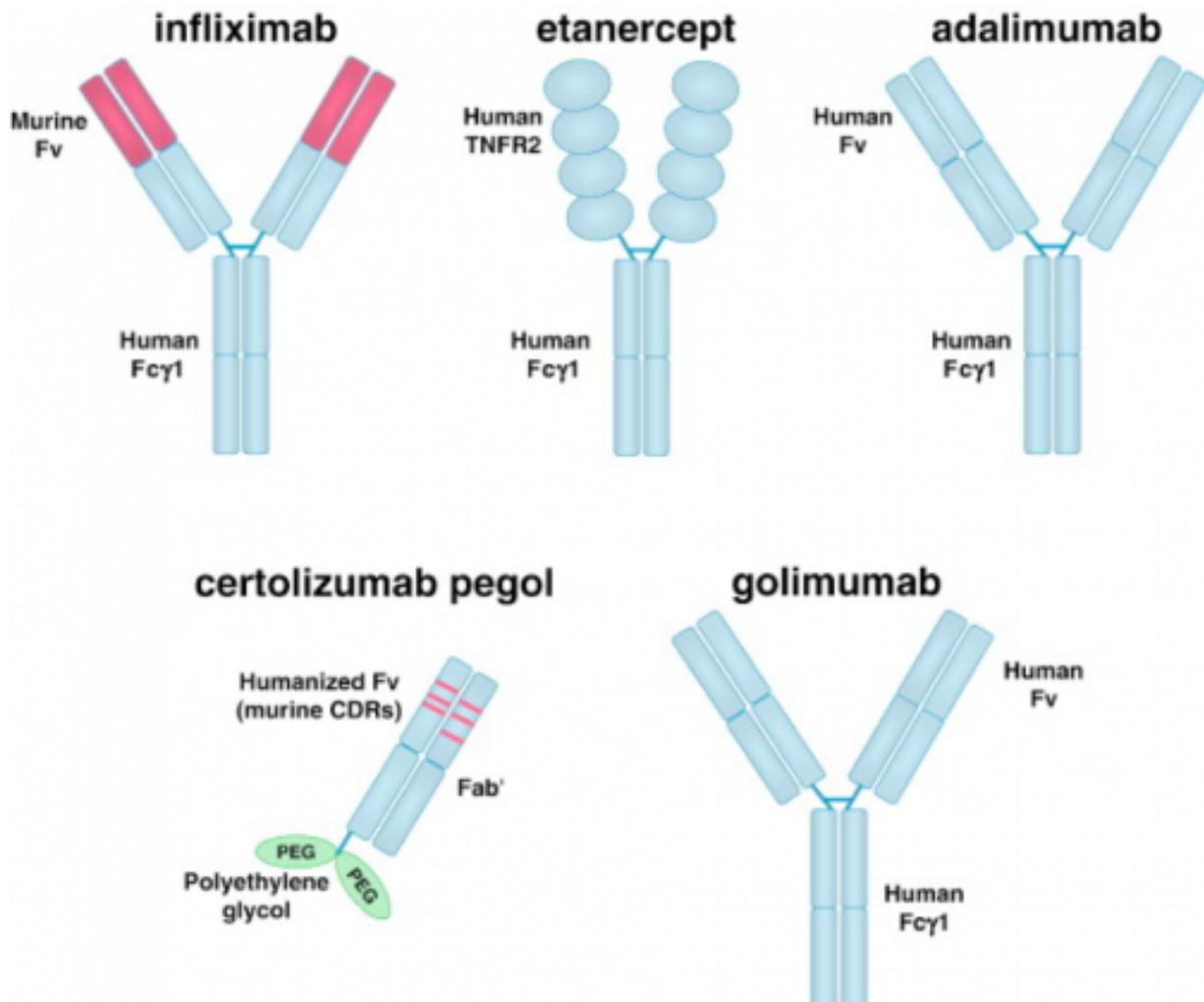


Figure 13 : Structure des anti-TNF (<https://eyewiki.aao.org/Infliximab>)

#### 1.3.1.3.1. Infliximab

L'Infliximab est le premier traitement anti-TNF utilisé pour lutter contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Akobeng and Zachos, 2004).

L'infliximab est une immunoglobuline (Ig)G1 chimérique (souris/humaine) génétiquement modifiée dirigée contre le TNF. Il a la capacité de fixer le complément et de lyser les cellules exprimant le TNF lié à la membrane et d'induire une régulation négative des mécanismes inflammatoires dans toute la couche muqueuse. Des essais cliniques (ACCENT I et II) ont démontré l'efficacité et la sécurité de ce traitement sur le long terme chez les patients atteints de la maladie de Crohn (D'Haens\* et al., 1999; Hanauer et al., 2002; Sands et al., 2004).

### 1.3.1.3.2. Adalimumab

L'adalimumab est un anticorps entièrement humain qui fixe également le complément et lyse les cellules exprimant le TNF. Il est administré par voie sous-cutanée (via un stylo auto-injecteur) toutes les deux semaines. L'efficacité et la sécurité de ce traitement ont été démontrées par de nombreuses études dont l'essai clinique CLASSIC-I (Hanauer et al., 2006). Un autre essai clinique CLASSIC-II a démontré la maintenance de la rémission chez les patients lors de l'utilisation de ce traitement (Sandborn et al., 2007b).

### 1.3.1.3.3. Certolizumab

Le certolizumab pegol est un fragment d'anticorps humanisé chimérique contre le TNF soluble (sécrété) et le TNF transmembranaire. Il est administré par voie sous-cutanée avec une dose d'entretien toutes les quatre semaines. C'est un anticorps neutralisant. Il diffère de l'Infliximab et de l'Adalimumab car il ne contient pas de Fc (figure 13), et ne peut donc pas activer la voie du complément ni induire l'apoptose chez les cellules régulant la sécrétion de TNF. Cependant il possède une plus grande affinité pour le TNF que les deux autres traitements (Nesbitt et al., 2007) et a une demi-vie plus longue (en raison de l'ajout du PEG)

Anti-TNF	Dosing for Induction and Maintenance	Route	Properties	Indications
<b>Infliximab (Remicade)</b>	<b>Induction</b> 5 mg at weeks 0, 2 and 6 <b>Maintenance</b> 5 mg (or 10 mg/kg) every 8 weeks	IV	Chimeric monoclonal antibody	Induction and maintenance of remission
<b>Adalimumab (Humira)</b>	<b>Induction</b> 160 mg (or 80 mg) week 0, 80 mg (or 40 mg) week 2 <b>Maintenance</b> 40 mg every other week or weekly	SC	Humanized monoclonal antibody	Induction and maintenance of remission
<b>Certolizumab (Cimzio)</b>	<b>Induction</b> 400 mg at weeks 0, 2 and 4 <b>Maintenance</b> 400 mg every 4 weeks	SC	PEG-conjugated Fab fragment of recombinant humanised monoclonal antibody	Induction and maintenance of remission

IV—intravenous; SC—subcutaneous, TNF—tumour necrosis factor, PEG—polyethylene glycol, Fab—humanized antibody fragment.

Table 2 : Posologies et modes d'administrations des traitements anti-TNF

### 1.3.1.4. *Inconvénients des traitements anti-TNF*

#### 1.3.1.4.1. Perte de réponse aux traitements

Les réponses individuelles aux anti-TNF des patients atteints de la maladie de Crohn et à des doses spécifiques ne sont pas toujours prévisibles. Jusqu'à 30 % des patients ne répondent pas au traitement anti-TNF (non-répondeurs primaires), et près de la moitié des patients bénéficiant de ces agents perdront leur bénéfice clinique au cours de la première année, nécessitant des augmentations de dose ou des changements de traitement (Sandborn et al., 2007a; Sandborn et al., 2010; Yarur and Rubin, 2015). Ce phénomène est appelé "perte de réaction secondaire". Plusieurs études ont démontré l'intérêt de passer à un autre anti-TNF après une perte de réponse avec un premier traitement. Cependant, les taux de rémission à court terme étaient modestes (Billioud et al., 2011; Cohen and Sachar, 2017; Gisbert and Panés, 2009).

Les raisons pour lesquelles certains patients deviennent insensibles ou perdent leur réponse après un traitement réussi ne sont pas entièrement comprises, mais sont probablement multifactorielles et liées au métabolisme des médicaments ou au développement d'anticorps anti-médicaments (Yarur and Rubin, 2015). Ce processus, appelé immunogénicité, résulte de l'exposition aux anti-TNF. Elle induit une expansion clonale des lymphocytes qui sécrètent des anticorps spécifiques et forment des complexes immuns avec les anti-TNF. Cela augmente généralement la clairance du médicament chez le patient. (Steenholdt et al., 2013) Les patients présentant une perte de réponse secondaire présentent des taux d'anticorps anti-médicament plus élevés que les patients présentant une perte de réponse primaire. Ce processus n'est pas permanent, car il a été constaté que les anticorps anti-médicament disparaissent dans l'année suivant l'arrêt du traitement anti-TNF. De plus, un sous-ensemble de patients peut perdre spontanément des anticorps anti-médicament préexistants tout en recevant un traitement anti-TNF continu (Steenholdt et al., 2013; Vande Casteele et al., 2013). La co-thérapie avec des immunomodulateurs (c'est-à-dire l'azathioprine ou le méthotrexate) réduit le risque de développer des anticorps anti-médicament (Colombel et al., 2010; Mahadevan et al., 2011). Le groupe SONIC (Study of Biologics and Immunomodulator Naive Patients in Crohn's Disease) a rapporté un essai contrôlé

randomisé portant sur l'azathioprine en monothérapie, l'infliximab en monothérapie, la thérapie combinant les deux traitements (Colombel et al., 2010). La formation d'anticorps anti-médicament était significativement moindre avec le traitement combiné (0,9 %) par rapport à l'infliximab en monothérapie (14,6 %). D'autres facteurs peuvent contribuer à la perte de réponse comme les différences potentielles dans les propriétés pharmacocinétiques, y compris la pénétration tissulaire et le mode d'action des différents anti-TNF. La nécessité de développer des biomarqueurs pour prédire la réponse au traitement deviendra de plus en plus importante pour la future prise de décision médicale personnalisée. Bien qu'il y a des recommandations lors de la perte de réponse telles qu'une augmentation de la dose, un raccourcissement de l'intervalle des injections et un changement d'anti-TNF (Gomollón et al., 2017), elles restent limitées . Il est donc nécessaire de développer de nouveaux traitements afin de lutter contre les maladies inflammatoires chroniques

#### 1.3.1.4.2. Effets indésirables de la thérapie anti-TNF

L'utilisation thérapeutique à long terme des anti-TNF pose des problèmes d'innocuité, notamment des risques de réponses immunitaires, de lésions cutanées, de complications péri-opératoires, d'infection, de cancer et de diminution de la fertilité/d'effets indésirables sur la grossesse (Bau et al., 2017; Cohen and Sachar, 2017).

Des réactions à la perfusion ont été associées à l'infliximab et peuvent être classées en fonction de leur timing, leur gravité et leur pathogénie (Feuerstein and Cheifetz, 2014). Ils sont fréquents dans les 1 à 2 heures suivant la perfusion, survenant chez environ 20 % des patients (Poggioli et al.). Les symptômes comprennent des bouffées vasomotrices, des démangeaisons, un essoufflement, une hypertension artérielle, des douleurs thoraciques et des maux de tête.

Des réactions ultérieures peuvent également survenir dans les 1 à 14 jours suivant la perfusion. Elles sont plus rares : elles surviennent chez environ 2 % des patients et se manifestent généralement par des maux de tête, de la fièvre, de la fatigue, des éruptions cutanées, des myalgies et des arthralgies (Miehler et al., 2010; Vermeire et al., 2009). Les réactions sont associées à la présence d'anticorps anti-médicament

(Hayden and Ghosh, 2008; O'Meara et al., 2014), et il a été prouvé que l'utilisation d'anti-TNF en parallèle d'immunomodulateurs réduit le risque d'effets indésirables car cela permet de limiter la production par l'organisme d'anticorps anti-médicament (Berns and Hommes, 2016; Feuerstein and Cheifetz, 2014).

Les risques d'infections sont une préoccupation majeure chez les patients soignés par un traitement anti-TNF. Les patients suivant une thérapie anti-TNF sont immunodéprimés, en particulier lorsque que le traitement est combiné avec des immunosuppresseurs. Les complications infectieuses peuvent aller des infections bactériennes invasives graves et opportunistes aux cas relativement bénins (infections respiratoires et/ou urinaires légères) (Rahier et al., 2014). Dans une étude sur les risques d'utilisation de l'adalimumab comprenant six essais cliniques, 1,8 % des patients avaient des infections opportunistes (majoritairement des candidoses buccales) et 5,8 % des patients avaient des infections graves (le plus souvent des infections gastro-intestinales, des abcès, pulmonaires et des infections virales) (Colombel et al., 2009; Pagnini et al., 2015). En raison du rôle du TNF dans la formation du granulome, le traitement anti-TNF a également été associé à une susceptibilité à l'infection tuberculeuse. Il empêche une séquestration de *M. tuberculosis* (Keane et al., 2001), entraînant un risque accru de réactivation de la tuberculose latente causée par le traitement anti-TNF (Berns and Hommes, 2016).

Théoriquement, le traitement anti-TNF, en raison de la suppression du TNF, devrait augmenter les risques de cancer. Une méta-analyse de 2006 a confirmé cette hypothèse en rapportant un risque de malignité 3 fois plus élevé chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde sous traitement anti-TNF (infliximab/adalimumab) (Bongartz et al.).

#### 1.3.1.4.3. Prix du traitement

Un autre inconvénient des thérapies anti-TNF est le coût de ces traitements. En effet, chaque injection à usage unique d'anti-TNF coûtent plusieurs centaines d'euros et les injections doivent être répétées à une fréquence mensuelle voire hebdomadaire. Il serait donc avantageux de développer un traitement moins coûteux à produire tels que des molécules chimiques.

#### 1.3.1.4.4. Mode d'administration

Le mode d'administration peut également poser problème. En effet, des réactions au niveau du site d'injection ont également été observées après l'administration sous-cutanée d'un traitement anti-TNF (adalimumab/certolizumab) (Hanauer et al., 2006), pouvant provoquer des symptômes tels que brûlure, douleur, démangeaison et lésions cutanées.

### 1.3.2. La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est également une maladie inflammatoire chronique qui concerne entre 0,5 et 1 % de la population. En France, on estime la prévalence à 0,4-0,8% de la population. Comme la plupart des maladies auto-immunes, 75% des personnes atteintes sont des femmes. La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie systémique qui provoque une inflammation de la membrane synoviale des articulations. Cela entraîne une accumulation de liquide et une déformation au niveau des articulations, et pouvant mener à leur destruction. Parfois, des formes extra-articulaires peuvent se développer et atteindre les poumons et le système nerveux ainsi que former des nodules sous-cutanés.

L'inflammation de la membrane synoviale provoque une augmentation anormale du nombre de synoviocytes, entraînant la formation d'un pannus (tissu invasif) et l'érosion des os et du cartilage de l'articulation et pouvant nécessiter des prothèses. L'articulation inflammée a une vascularisation importante. La polyarthrite rhumatoïde peut affecter n'importe quelle articulation du corps, y compris les poignets, les mains, les coudes, les mâchoires ou les genoux. C'est une maladie grave qui a un taux de mortalité élevé et pouvant entraîner la perte d'une carrière professionnelle et une diminution de l'espérance de vie.

### *1.3.2.1. Rôles des cytokines inflammatoires dans la polyarthrite rhumatoïde*

Une articulation chez un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde présente des altérations histologiques : l'inflammation chronique de la membrane synoviale entraîne la formation d'un tissu invasif, le pannus, qui va progressivement dégrader les os et le cartilage. Une vascularisation accrue va faciliter l'afflux des cellules mononucléaires (lymphocytes, macrophages, neutrophiles). Ces cellules produisent des cytokines inflammatoires et ont un effet sur la dégradation de l'articulation.

Parmi les cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 et le TNF interviennent précocement dans la réaction immunitaire. L'IL-1, protéine produite par les monocytes et présente dans l'articulation des patients (Mcguire-Goldring et al., 1984), participe à la dégradation du cartilage. En effet, des taux importants d'IL-1 ont été rapportés dans les articulations des patients (Nouri et al., 1984).

Le TNF est responsable de la production de prostaglandines E2 et de métalloprotéases dans les synoviocytes (Dayer et al., 1985), provoquant une inflammation et finalement la destruction de l'articulation. Le TNF permet également la production de chimiokines (CCL20) (Hirota et al., 2007) qui induit le recrutement de cellules immunitaires au niveau du site de l'inflammation. Parmi les cellules infiltrant l'articulation, on trouve des lymphocytes T activés.

Par ailleurs, l'IL-6 est présente en excès dans les articulations des patients (Hirano et al., 1988) et joue un rôle majeur dans l'arthrite juvénile idiopathique (sans cause identifiable) (Yokota et al., 2005).

### *1.3.2.2. Traitements de la polyarthrite rhumatoïde*

Le traitement de la polyarthrite rhumatoïde vise à réduire la douleur et à ralentir ou arrêter la progression de la maladie.

Les traitements précédant les thérapies anti-TNF consistaient en des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'acétaminophène ou l'ibuprofène. Traiter d'abord l'inflammation pour réduire les douleurs articulaires et l'enflure. Par la suite, des anti-inflammatoires stéroïdiens comme la prednisone et enfin des

antirhumatismaux (DMARD : disease modified antirheumatic drugs) comme les antipaludéens ou le méthotrexate sont ajoutés pour ralentir voire stopper la progression de la maladie.

Aujourd'hui, les DMARD sont recommandés dès le début du traitement en association avec des antalgiques pour réduire les douleurs non soulagées.

Les DMARD ont de nombreux effets secondaires. Les antipaludéens tels que l'hydroxychloroquine sont utilisés pour l'arthrite légère mais peuvent provoquer une rétinopathie potentiellement irréversible à long terme.

Le traitement le plus utilisé aujourd'hui est le méthotrexate. Les effets secondaires sont importants, mais le rapport bénéfice/risque favorise son utilisation.

Depuis plusieurs années, les inhibiteurs du TNF ont été utilisés en association avec le méthotrexate en cas de non-réponse ou de réponse insuffisante aux traitements ci-dessus. Quelques exemples d'anti-TNF utilisés chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde sont décrits ci-après.

#### 1.3.2.2.1. Etanercept

L'éтанercept est une protéine de fusion constituée de la partie extracellulaire du récepteur du TNFR2 et du fragment Fc de l'IgG1 (figure 13). L'éтанercept est un récepteur soluble qui neutralise le TNF. Il a été utilisé en France à partir de 2002 puis sous d'autres formes injectables en 2005 et 2006. L'éтанercept est utilisé pour traiter la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite psoriasique, l'arthrite juvénile idiopathique, le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante. Il n'est pas utilisé dans les maladies inflammatoires de l'intestin car ses effets sont plus faibles que ceux observés avec les anticorps anti-TNF. La différence d'efficacité peut s'expliquer par le fait que l'éтанercept, contrairement aux anticorps monoclonaux anti-TNF, n'induit pas l'apoptose des lymphocytes exprimant le TNF membranaire, présent au niveau de la *lamina propria* (Brandt *et al.*, 2003). L'éтанercept cible uniquement le TNF soluble. La dose habituelle est de 50 mg par semaine en injection sous-cutanée.

#### 1.3.2.2.2. Golimumab

Le golimumab est un anticorps monoclonal IgG1 humanisé dirigé contre TNF (figure 13). Le golimumab a été mis sur le marché en France en 2009 et est utilisé pour la polyarthrite rhumatoïde, le rhumatisme psoriasique et la spondylarthrite ankylosante. Sa validité a été documentée dans plusieurs essais cliniques : GO-BEFORE (Emery et al., 2009), GO-FORWARD (Keystone et al., 2009) et GO-AFTER (Smolen et al., 2012) . La dose habituelle est de 50 mg par voie sous-cutanée une fois par mois.

En conclusion, l'introduction des anti-TNF a conduit à des changements majeurs dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques. En effet, le traitement par anti-TNF représente actuellement une modalité de traitement centrale dans les maladies inflammatoires chroniques et peut être amélioré par une augmentation rapide des doses et l'utilisation d'une thérapie combinée. Cependant des questions subsistent quant à leur utilisation, notamment les facteurs de risques et les problèmes liés à la perte de réponse. De nouvelles stratégies thérapeutiques telles que l'inhibition chimique de la sécrétion de TNF doivent être mises en place afin d'améliorer (thérapie combinée) ou remplacer les traitements anti-TNF.

## 1.4. Trafic intracellulaire des protéines et diversité des voies de sécrétion

### 1.4.1. Le réticulum endoplasmique : entrée de la voie de sécrétion

#### 1.4.1.1. *Structure et fonctions du réticulum endoplasmique*

Le réticulum endoplasmique (RE) est le point d'entrée dans la voie de sécrétion. Il est constitué de tubes membranaires interconnectés qui forment un réseau hétérogène associé à l'enveloppe nucléaire et s'étendant dans toute la cellule (Nixon-Abell et al., 2016; Schwarz and Blower, 2016). Cette distribution à travers la cellule est contrôlée par des interactions avec le réseau de microtubules, notamment par des protéines résidentes du RE, telles que STIM1 (pour *Stromal Interaction Molecule 1*) ou CLIMP-63 (pour *Cytoskeleton-Linking Membrane Protein 63*) (Grigoriev et al., 2008; Vedrenne et al., 2005).

En plus de son rôle dans la voie sécrétoire, le RE joue un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires. En effet, c'est l'un des principaux sites de biosynthèse des lipides, notamment des phospholipides membranaires et du cholestérol (Schwarz and Blower, 2016). Il constitue également un réservoir important de Ca<sup>2+</sup>, dont la concentration est 1000 à 8000 fois plus élevée dans la lumière du RE que dans le cytoplasme (Schwarz and Blower, 2016). La libération de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme par le RE régule de nombreux mécanismes cellulaires et voies de signalisation (Clapham, 2007). Le RE participe également à l'homéostasie d'autres organites par des contacts directs (Eden, 2016). Il régule par exemple les fissions mitochondriales (Kraus and Ryan, 2017), la création d'autophagosomes (Kotani et al., 2018), le positionnement des endosomes (Raiborg et al., 2015) et le gonflement de la membrane plasmique (Petkovic et al., 2014)...

#### *1.4.1.2. La translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique*

Les protéines destinées à être sécrétées entrent dans la voie de sécrétion au niveau du RE. La majorité d'entre elles ont un peptide signal hydrophobe induisant leur translocation dans le RE de façon co-translationnelle. Lors de la traduction de l'ARN messager codant pour ces protéines, le peptide signal est détecté par les protéines SRP (Signal Recognition Particles), qui ancrent les ribosomes à la membrane du RE (Schwarz and Blower, 2016). La traduction continue à travers la membrane du RE, le translocon (complexe protéique transmembranaire) permet de transférer les protéines en cours de synthèse vers la lumière du RE (Jan et al., 2014; Rapoport, 2007).

Les protéines avec des domaines transmembranaires sont insérées dans la membrane lors de la translocation (von Heijne, 2006). (Schwarz and Blower, 2016) Les protéines qui n'ont qu'un seul domaine transmembranaire et dont l'extrémité N-terminale est localisée dans la lumière du RE (N-terminal luminal) sont appelées protéines transmembranaires de type I. Les protéines dont l'extrémité N-terminale est cytoplasmique sont des protéines transmembranaires de type II. Le RE prend en charge les modifications conformationnelles des protéines à l'aide de protéines chaperonnes telles que les Heat shock proteins (Hsps) (Braakman and Hebert, 2013). Le repliement est également assuré par l'ajout de N-glycosylation au niveau de la région luminale du cargo. Le RE dispose également d'un système de dégradation pour éliminer les protéines mal repliées dont le système ERAD (pour ER-associated degradation) (Ruggiano et al., 2014).

#### *1.4.1.3. Le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi*

Le transport des protéines depuis le RE vers l'appareil de Golgi est médié par la formation de vésicules recouvertes du manteau protéique COPII (Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013). La formation de ces vésicules est concentrée dans des régions spécifiques du RE appelés sites de sortie du RE (ERES pour ER-exit sites ; Bannykh, Rowe, & Balch, 1996). Le mécanisme de formation des vésicules COPII, découvert

chez *Saccharomyces cerevisiae* est conservé chez les mammifères (Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013). Il nécessite le recrutement de plusieurs facteurs sur la membrane du RE. Le recrutement de la protéine Sar1 initie ce processus (Lord, Ferro-Novick, & Miller, 2013).

Sar1 fait partie de la superfamille des protéines Ras, (petites GTPases), impliquées dans la régulation de diverses fonctions cellulaires (Rojas et al., 2012). Ce type de protéines alterne entre deux états : 1) actif, lié au GTP et capable de recruter des effecteurs ; 2) inactif ; lié au GDP. L'alternance entre ces deux états est contrôlée par deux régulateurs principaux : les facteurs d'échange de guanine (ou GEF) catalysent la dissociation des petites protéines G du GDP et leur remplacement par le GTP cytoplasmique plus abondant. Les protéines activant la GTPase (ou GAP) augmentent l'activité GTPase des petites protéines G, entraînant l'hydrolyse du GTP et l'inactivation subséquente des petites GTPases (Cherfils et Zeghouf, 2013).

Sar1 est recrutée et activée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique grâce à son facteur d'échange, la protéine membranaire Sec12 (Nakano, Brada, & Schekman, 1988 ; Barlowe & Schekman, 1993). Sar1-GTP recrute alors l'hétérodimère Sec23-Sec24 constituant le manteau interne COPII (Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013). Sec24 permet le recrutement des protéines à transporter par interaction avec divers motifs protéiques cytoplasmiques (Miller et al., 2002, 2003 ; Mossessova, Bickford et Goldberg, 2003 ; Mancias et Goldberg, 2008). La deuxième couche du manteau COPII se compose de Sec13 et Sec31 et est recrutée par Sec23-Sec24. Ensemble, ces protéines déforment la membrane du RE et génèrent des vésicules (Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013). La protéine Sec16 a également été impliquée dans ce phénomène, mais son rôle n'est pas clair. Sec16 peut servir dans l'assemblage de la couche COPII et/ou agir comme un régulateur négatif de l'activité Sar1 GTPase pour la maintenir active sur la membrane du RE (Sprangers et Rabouille, 2015).

Pour certaines protéines, dont les propriétés ne semblent pas en adéquation avec les mécanismes classiques de formation des vésicules COPII, d'autres machineries moléculaires sont mises en jeu. La sécrétion du collagène VII, qui présente une taille plus importante que celle des vésicules COPII typiques, implique TANGO1 (pour le trafic et l'organisation de Golgi 1) et cTAGE5 (antigène 5 associé au lymphome cutané à cellules T). Ces protéines lient le collagène VII ainsi que Sec23-Sec24 et déforment

les vésicules en les adaptant à la taille du collagène VII (Saito et al., 2009, 2011 ; Malhotra et Erlmann, 2011).

Une fois formées, les vésicules COPII sont transportées vers l'appareil de Golgi via un compartiment intermédiaire à l'interface entre l'appareil de Golgi et le RE (ou ERGIC pour) dont la nature n'est pas claire (Girod et al., 1999). Les protéines Rab appartiennent à la superfamille des protéines Ras (Rojas et al., 2012). Elles sont généralement prénylées avec un ou deux groupes géranylgeranyl et sont capables de s'associer aux membranes intracellulaires (Stenmark, 2009). Cette association membranaire est régulée par leur état d'activation : en association avec le GDP, les protéines Rab se dissocient de la membrane et restent soluble dans le cytosol par des interactions avec les protéines GDI (pour les inhibiteurs de dissociation de la guanine ; Stenmark, 2009). Les protéines Rab sont des régulateurs principaux du trafic intracellulaire, principalement en recrutant et en modulant une gamme d'effecteurs (Wandinger-Ness et Zerial, 2014), tels que, les moteurs moléculaires (Jordens et al., 2001 ; Miserey-Lenkei et al., 2010 ; Echard et al., 2013 ; Delevoye et al., 2014), les protéines d'amarrage (Simonsen et al. ., 1998 ; Christoforidis, McBride et al., 1999 ; Wurmser et al., 2000 ; Gomi et al., 2005 ; Reddy et al., 2006), les protéines de remodelage lipidique (Christoforidis, Miaczynska et al., 1999 ; Dambournet et al., 2011), les régulateurs de la protéine SNARE (Nielsen et al., 2000 ; Gomi et al., 2005) et les régulateurs du cytosquelette d'actine (Grigoriev et al., 2011 ; Frémont et al. et al., 2017). Chez les mammifères, il existe plus de 60 protéines Rab réparties sur différentes membranes cellulaires (Stenmark, 2009). Par conséquent, ils font partie des facteurs responsables de la définition et du maintien des différentes propriétés membranaires intracellulaires (Behnia et Munro, 2005 ; Stenmark, 2009 ; Pfeffer, 2013).

## 1.4.2. L'appareil de Golgi

### 1.4.2.1. *Structure et fonctions de l'appareil de Golgi*

L'appareil de Golgi est formé par un empilement de citernes et est généralement localisé près du noyau dans la plupart des cellules de mammifères (Klumperman,

2011). L'appareil de Golgi est polarisé. Cette polarité est caractérisée par des populations d'enzymes distinctes dans différentes citernes (Dunphy and Rothman, 1985; Kleene and Berger, 1993). Cette polarité peut également être illustrée par le transport vectorisé des sécrétions à travers l'appareil de Golgi (Boncompain and Perez, 2013b). La face cis et le réseau cis-Golgi (CGN, réseau cis-Golgi) sont les régions d'entrée des protéines sécrétées, généralement vers le centre de la cellule. La face trans et le réseau trans-Golgien (TGN, réseau trans-Golgien) est la région d'exportation des protéines sécrétées, généralement tournée vers la périphérie (Klumperman, 2011).

L'ancrage des citernes entre elles est réalisé en partie par les protéines GRASP55 (*Golgi Reassembly And Stacking Protein 55*) et GRASP65. Ces deux protéines cytoplasmiques sont attachées à la membrane de l'appareil de Golgi par leur myristoylation. Leur oligomérisation favorise l'attachement des citernes entre elles (Rabouille and Linstedt, 2016). De plus, la face cytoplasmique de la membrane de l'appareil de Golgi est recouverte de la matrice golgienne. Elle se compose de longues protéines contenant des domaines super-enroulés et qui sont appelées « golgines ». Ces dernières jouent un rôle dans l'amarrage des vésicules liées à l'appareil de Golgi et aident à maintenir la structure de l'organite (Barr and Short, 2003; Gillingham and Munro, 2016).

Les membranes golgiennes sont riches en phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) (Schink et al., 2016). Les phosphoinositides sont des dérivés de phosphatidylinositols qui ont été phosphorylés, enrichis dans la couche cytosolique des membranes des compartiments intracellulaires (Matteis and Godi, 2004). Il existe sept phosphoinositides : PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> et PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Chacune de ces formes est distribuée d'une façon qui est propre aux membranes intracellulaires qu'elles composent (Schink et al., 2016). Tout comme les protéines Rab, ces phosphoinositides jouent un rôle important dans l'identité des membranes (Behnia and Munro, 2005) et constituent des plateformes de recrutement d'autres protéines (Behnia et Munro, 2005). Dans l'appareil de Golgi, le PI4P recrute spécifiquement le complexe adaptateur de la clathrine, AP1 (Wang et al., 2003) et les protéines FAPP1 et FAPP2 impliquées dans la fission du TGN (Godi et al., 2004).

La polarité des citernes golgiennes est caractérisée par les différents types d'enzymes présentes dans les citernes (Dunphy and Rothman, 1985; Kleene and Berger, 1993). Cette polarité est également illustrée par le transport vectoriel des protéines à travers l'appareil de Golgi (Boncompain and Perez, 2013b). La face *cis* et le réseau cis-Golgi (CGN, Cis-Golgi Network) sont les régions d'entrée des protéines sécrétées. Le côté *trans* et réseau trans-Golgien (TGN, Trans-Golgien Network), la région d'export des protéines sécrétées (Klumperman, 2011).

L'appareil de Golgi constitue une plateforme de tri des protéines des voies de sécrétion vers leurs destinations finales (Boncompain and Weigel, 2018). Cet organite assure des fonctions importantes pour l'homéostasie cellulaire. En effet, l'appareil de Golgi joue un rôle dans la synthèse et la modification des lipides, notamment des céramides (Futerman and Riezman, 2005). Il assure le remodelage des N-glycanes et l'ajout d'O-glycanes aux protéines (Stanley, 2011). L'appareil de Golgi permet également la maturation de certaines protéines par clivage protéolytique via des protéases luminales comme la furine, S1P (protéase du site 1) ou S2P (Rawson et al., 1997; Seidah et al., 1999; Wise et al., 1990). De plus, les membranes golgiennes constituent un site de nucléation des microtubules (ou MTOC, pour Microtubule Organizing Center) (Chabin-Brion et al., 2001; Efimov et al., 2007; Rivero et al., 2009).

#### 1.4.2.2. *Le transport intra-Golgi*

(Bergmann and Singer, 1983; Bonfanti et al., 1998; Trucco et al., 2004) Les mécanismes qui assurent le transport des cargos à travers l'appareil de Golgi ont fait l'objet d'intenses débats autour des années 1990-2000 (Glick and Nakano, 2009). Les protéines sécrétées pénètrent dans l'appareil de Golgi par la face *cis* puis avancent le long de différentes citernes jusqu'à l'extrémité *trans* (Bergmann and Singer, 1983; Bonfanti et al., 1998; Trucco et al., 2004).

Le premier modèle dit modèle "vésiculaire" propose que les cargos soient transportés séquentiellement par des vésicules d'une citerne à l'autre dans le sens antérograde (Figure 14). Le modèle explique la stabilité apparente des citernes de l'appareil de Golgi. Cependant, ce modèle présente plusieurs défauts (Boncompain and Perez, 2013b). En effet, il ne peut rendre compte du transport de protéines plus grandes que

le diamètre des vésicules COPI , impliquées dans l'échange entre citernes golgiennes (Glick and Nakano, 2009).

Le second modèle est le modèle de maturation, selon lequel, les citernes sont des compartiments dynamiques (Figure 14). Les membranes du RE s'assemblent pour former un complexe membranaire qui acquière progressivement des protéines golgiennes par transport rétrograde. Au niveau du réseau trans-golgien (TGN), le fractionnement des citernes trans produit des intermédiaires de transport (Glick and Nakano, 2009). Dans ce modèle, les protéines sécrétées ne quittent pas les citernes, mais sont transportées avec elles. Le maintien des propriétés enzymatiques de chaque citerne est assuré via un trafic vésiculaire rétrograde (assuré par des vésicules COPI). Ce modèle peut prendre en compte le transport de grandes protéines. De plus, le suivi des citernes de l'appareil de Golgi dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* par vidéo microscopie a permis de démontrer la maturation des citernes (Kurokawa et al., 2019; Losev et al., 2006; Matsuura-Tokita et al., 2006). Mais de tels modèles ne peuvent pas expliquer les différentes cinétiques de transports observées pour différentes protéines (Beznoussenko et al., 2014; Boncompain et al., 2012; Patterson et al., 2008).

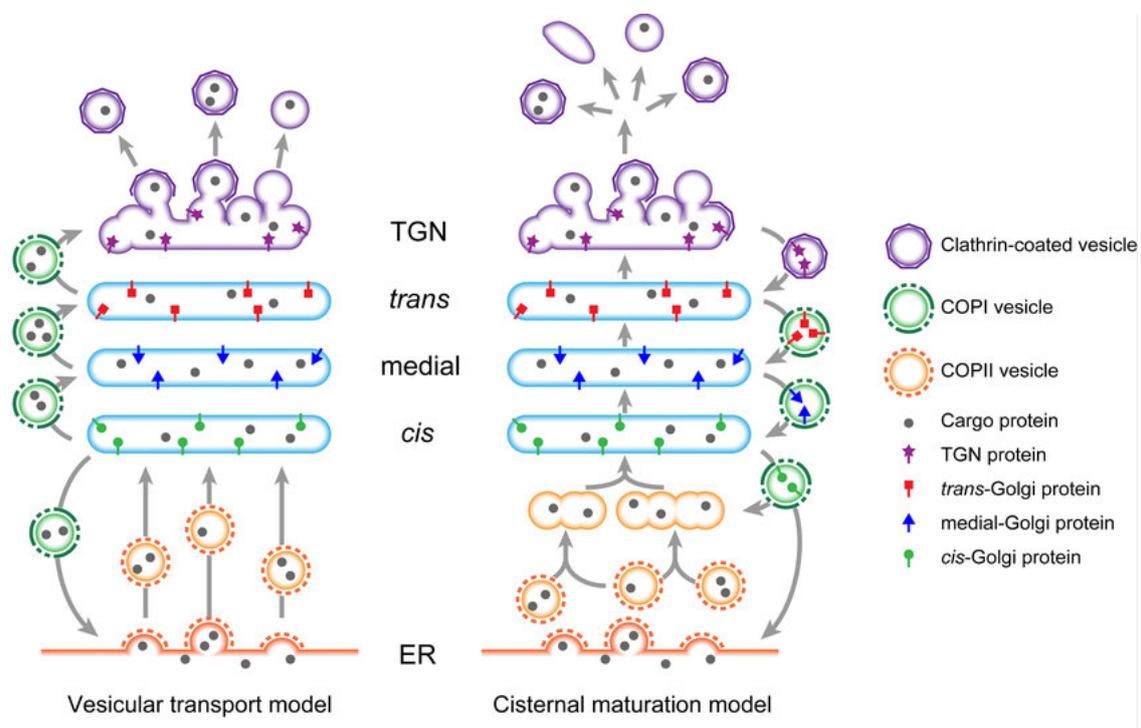


Figure 14 : Modèles de transports intro-Golgi

La microscopie électronique a démontré l'existence de communications entre les citernes (Beznoussenko et al., 2014; Pietro et al., 2009). De petites protéines solubles sont capables d'exploiter ces connexions et de diffuser rapidement à travers différentes citernes (Beznoussenko et al., 2014). En revanche, les grosses protéines telles que le procollagène sont exclues de ces jonctions inter-pools (Beznoussenko et al., 2014).

En combinant le modèle de maturation et la présence de connexions inter-citernes, on peut expliquer à la fois le transport des grosses protéines ainsi que les différences observées dans la cinétique des différents cargos.

(Boncompain and Weigel, 2018).

#### 1.4.3. Le transport depuis l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire et l'exocytose

Le trafic depuis l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique dépend des microtubules et du recrutement des kinésines (Lippincott-Schwartz et al., 2000). Les extrémités positives de certains microtubules sont reliées à la membrane plasmique par un complexe protéique contenant les protéines CLASP, ELKS/RAB6IP2 et LL5 $\beta$  (Lansbergen et al., 2006). Dans ce complexe, LL5 $\beta$  est associé à la membrane plasmique via une interaction avec le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, tandis que ELKS interagit avec la protéine CLASP, associée aux microtubules (Lansbergen et al., 2006).

La petite GTPase Rab6 est présente sur la majorité des intermédiaires de transport post-golgiens (Fourriere et al., 2019; Grigoriev et al., 2007). ELKS est l'un des effecteurs de Rab6 (Monier et al., 2002) et est enrichi au niveau des adhésions focales. Ainsi, Rab6 et ELKS permettent de concentrer l'exocytose des vésicules post-golgiennes au niveau des adhésions focales (Fourriere et al., 2019; Grigoriev et al., 2011).

La GTPase Rab8 joue également un rôle dans l'exocytose des intermédiaires de transport post-golgiens (Hattula et al., 2006; Huber et al., 1993; Sato et al., 2007). Le

recrutement de Rab8 au niveau de ces transporteurs est dépendante de Rab6 et joue un rôle dans leur arrimage à la membrane plasmique (Grigoriev et al., 2011).

La dernière étape de l'exocytose est médiée par le complexe Exocyst, qui se compose de 8 sous-unités (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 et Exo84) (Wu and Guo, 2015). Ce complexe est localisé au niveau de la membrane plasmique via l'interaction avec le PI(4,5)P<sub>2</sub> et régule l'activité des protéines SNARE ainsi que du cytosquelette d'actine (Wu and Guo, 2015).

#### 1.4.4. L'étude des voies de sécrétion

Le marquage seul des protéines endogènes rend difficile la compréhension des voies de transport qu'elles empruntent avant d'atteindre leur compartiment de destination. En effet, la localisation d'une protéine à un instant donné est le reflet d'un état d'équilibre entre son transport antérograde, rétrograde mais aussi sa dynamique de synthèse et de dégradation. Une façon de suivre les protéines lorsqu'elles sont tout juste synthétisées est d'effectuer des expériences dites de *pulse-chase*. Cette méthode consiste en une brève incubation (5-30 min) des cellules avec des acides aminés radioactifs (*pulse*), poursuivie d'un changement de milieu en milieu non radioactif (correspondant au *chase*). Lors du *pulse*, les protéines synthétisées contiennent un élément radioactif (souvent du [<sup>35</sup>S] Met), les rendant détectables. L'utilisation de différents temps d'incubation en milieu non radioactif permet d'évaluer la cinétique de transport des protéines marquées. Cette technique est souvent combinée aux tests de résistance à l'endoglycosidase H. Cette enzyme ne peut cliver que les N-glycosylations ajoutées au niveau du RE, à condition que celles-ci conservent leur structure poly-mannose d'origine. L'enzyme du Golgi  $\alpha$ -mannosidase II digère une partie de cette structure, rendant la protéine glycosylée résistante à l'endoglycosidase H lorsqu'elle atteint l'appareil de Golgi (Stanley, 2011). Ainsi, la combinaison d'expériences de *pulse-chase* radioactif et de digestion par l'endoglycosidase H donne accès à la cinétique de transport du RE vers l'appareil de Golgi (Carlsson et al., 1988; Chen et al., 1985; Granger et al., 1990; Green et al., 1987). De même, l'association du *pulse-chase* radioactif avec des techniques de fractionnement cellulaire ou de marquage des protéines de surface (e.g. par

biotinylation) permet d'étudier la cinétique de transport des protéines du RE vers la membrane plasmique ou les endosomes (Green et al., 1987; Harter and Mellman, 1992).

Le développement des techniques de synchronisation du transport des protéines a permis de visualiser directement les voies de transport, entraînant des progrès dans ce domaine. Une méthode simple pour synchroniser le transport antérograde dans les cellules animales consiste à abaisser la température d'incubation des cellules à des températures non physiologiques. L'incubation à 15°C inhibe le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi. L'incubation des cellules à 20°C les bloque au niveau du TGN (Boncompain and Perez, 2013a). Une augmentation de la température à 37°C permet la reprise de la sécrétion du cargo (Boncompain and Perez, 2013a; Griffiths et al., 1985; Matlin and Simons, 1983; Saraste and Kuismanen, 1984). Cependant, cette méthode présente l'inconvénient d'utiliser des températures non physiologiques pour les cellules de mammifères. Le rétablissement de tous les mécanismes de transport après le retour à une température physiologique peut prendre du temps. Il n'y a donc aucune garantie que les voies de transport observées à l'aide de cette technique correspondent à la réalité physiologique. De plus, l'incubation à une température plus basse que 37°C modifie probablement les propriétés physiques des lipides et pourraient affecter les membranes des compartiments intracellulaires et les mécanismes de formation des intermédiaires de transport.

Une autre façon de suivre le transport des protéines le long de la voie de sécrétion réside dans l'utilisation de la brefeldine A (BFA). L'incubation de cellules animales avec cette molécule inhibe la petite GTPase Arf1 et le recrutement de COPI sur les intermédiaires de transport. Cette molécule induit une disparition de l'appareil de Golgi, les protéines golgiennes se retrouvent localisées au niveau du RE et inhibe les voies de sécrétion (Lippincott-Schwartz et al., 2000; Misumi et al., 1986). L'effet de cette drogue est réversible car un lavage extensif permet de reformer l'appareil de Golgi et de restaurer le transport des protéines (Hutchinson et al., 1983; Janvier and Bonifacino, 2005). Cependant, l'utilisation de la BFA crée une condition de stress cellulaire via le blocage général de la voie de sécrétion et la disparition temporaire de l'appareil de Golgi. De plus, le remodelage de l'appareil de Golgi après le lavage de la

BFA se produit progressivement sur des dizaines de minutes, il est donc difficile d'expliquer la cinétique de transport obtenue avec cette méthode. Enfin, la reformation de l'appareil Golgi se réalise en même temps que la restauration du trafic, suggérant que les mécanismes du transport au niveau de l'appareil de Golgi pourraient ne pas être pleinement opérationnels lors de la sécrétion de la protéine d'intérêt.

Afin d'étudier la cinétique de transport d'une protéine rapportrice, à savoir la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse, un mutant thermosensible de cette protéine (VSVGtsO45) a été utilisé. Cette méthode a permis de pallier certaines lacunes des techniques mentionnées précédemment. La trimérisation de VSVG nécessaire à son export se déroule dans le RE. A 40°C, la protéine VSVGtsO45 se peut pas former de trimères et reste donc bloquée au niveau du RE. Un abaissement de la température à 32°C restaure la trimérisation, induisant ainsi l'export de VSVG vers l'appareil de Golgi puis vers la membrane plasmique (Kreis and Lodish, 1986; Lafay, 1974).

Le développement de cet outil a grandement fait progresser la compréhension de l'étude de la voie de sécrétion. L'étude cinétique du transport de ce mutant thermosensible a été facilitée par le développement de la GFP (pour Green Fluorescent Protein) et les techniques de microscopie à fluorescence en temps réel. Cependant, cet outil permet l'étude de la sécrétion de VSVG uniquement et ne permet pas de d'étudier la diversité des voies de transports antérograde.

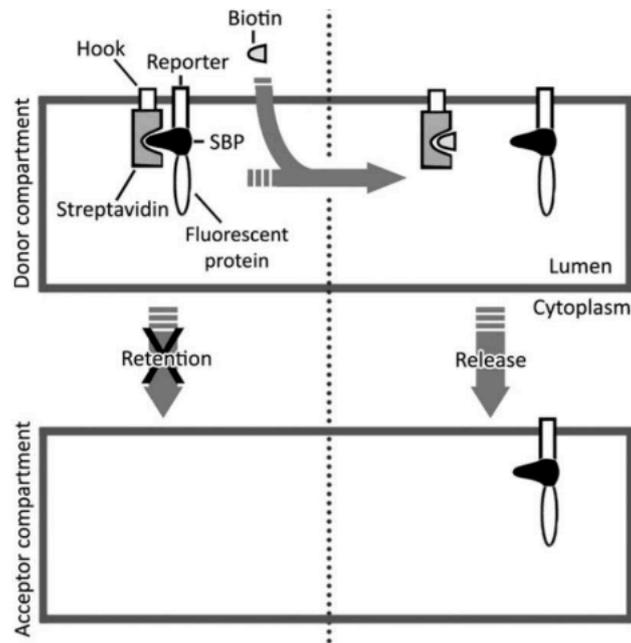
Des systèmes de synchronisation de différentes protéines ont été développés La première méthode est basée sur l'agrégation réversible de la protéine d'intérêt au niveau du RE. Des mutations dans la protéine humaine FKBP12 (FKBP12<sup>F36M</sup>) provoquent l'agrégation de la protéine. qui est abolie par liaison à la rapamycine ou à une petite molécule synthétique (Clackson et al., 1998; Rivera et al., 2000). Lorsque les protéines s'agrègent, elles forment un oligomère composé de quatre domaines FKBP12<sup>F36M</sup> (FM4). Sous cette forme, le complexe reste bloqué dans le RE. L'ajout de petites molécules permet de désagréger les protéines et d'induire leur sortie du RE de façon synchronisée (Rivera et al., 2000).

Cet outil a été utilisé avec succès pour étudier les voies de sécrétion d'une variété de protéines. Cependant, il présente l'inconvénient de provoquer de fortes déformations du RE (Rivera et al., 2000). Il convient également de noter que le tag à ajouter à la protéine d'intérêt ( 4 copies de FKBP12F36M en tandem) est de grande taille (> 400 acides aminés), pouvant entraîner un changement de conformation de la protéine et perturber sa sécrétion.

Une autre technique basée sur l'agrégation réversible de la protéine d'intérêt dans le RE a ensuite été développée et a permis un contrôle optogénétique du transport de la protéine. Il est basé sur la fusion de la protéine cible à une protéine UVR8 photosensible (Chen et al., 2013).

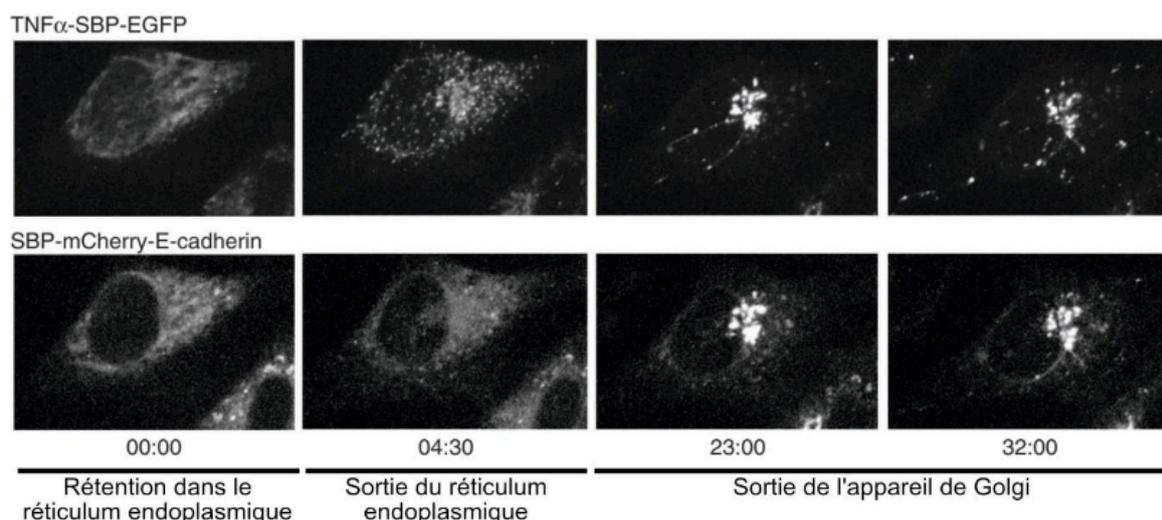
Un autre outil de synchronisation du transport de protéines d'intérêt est la méthode appelée RUSH (pour Retention using selective hooks). Ce système repose sur l'interaction réversible d'une protéine d'intérêt avec un « crochet moléculaire » qui le retient dans un compartiment donneur (le RE par exemple) (Boncompain et al., 2012). En effet, l'outil RUSH utilise l'interaction réversible entre la streptavidine et le SBP (pour Streptavidin Binding Peptide) (Barrette-Ng et al., 2013; Wilson et al., 2001). La protéine d'intérêt est fusionnée au SBP et la streptavidine est fusionnée à une protéine résidente du RE (« crochet moléculaire »). La protéine cible est alors retenue dans le RE via l'interaction du SBP avec la streptavidine (figure 15) (Boncompain et al., 2012). L'ajout de biotine (vitamine soluble et non toxique) dans le milieu permet la libération de la protéine d'intérêt (figure 15). En effet, la streptavidine présente une plus forte affinité pour la biotine que pour le SBP donc la présence de biotine déplace presque immédiatement le SBP de la streptavidine.

Un avantage important de ce système est qu'il ne provoque pas de déformation ou de stress du RE car il ne repose pas sur une agrégation de la protéine d'intérêt. De plus, le domaine requis pour l'outil RUSH, le SBP, est de petite tailles (37 acides aminés).



**Figure 15 : Schéma simplifié de l'outil RUSH.** Le rapporteur est retenu dans le compartiment donneur via son interaction avec le « hook ». Cette interaction est médiée par la streptavidine et la SBP. La libération est induite par l'ajout de biotine pour permettre le trafic du rapporteur vers son compartiment accepteur. Une protéine fluorescente est fusionnée au rapporteur afin de pouvoir suivre le transport du cargo. (Boncompain et al., 2012)

Afin de répondre aux différentes topologies des protéines à étudier et aux différentes orientations d'étiquetage avec le SBP, plusieurs crochets moléculaires ont été développés (Boncompain et al., 2012). Le système RUSH offre également la possibilité de synchroniser simultanément le transport de plusieurs protéines, en utilisant des protéines fluorescentes distinctes. Ceci offre la possibilité de comparer la cinétique et les voies de sécrétion de plusieurs protéines d'intérêt au sein d'une même cellule (Figure 20).



**Figure 16 : Synchronisation du transport de différentes protéines via le système RUSH.** Cellules HeLa exprimant TNF $\alpha$ -SBP-EGFP et SBP-mCherry-cadhérine E. Temps : min:s à partir de l'ajout de biotine. Adapté d'après (Boncompain et al., 2012)

Ainsi, le système RUSH a permis d'améliorer la compréhension de la diversité des voies de sécrétion (Boncompain et al., 2012; Chen et al., 2017; Deng et al., 2018; Fourriere et al., 2019; Tie et al., 2018). Un autre avantage de ce système est qu'il est compatible avec des méthodes de criblage automatisé (Boncompain et al., 2019).

L'ensemble de ces outils a permis des progrès significatifs dans la compréhension des voies de transport intracellulaire. Cependant, il convient de rappeler que ces différentes techniques ont un problème commun et qui est inhérent à la synchronisation elle-même. En raison d'un relargage synchrone de la protéine d'intérêt, elle est localement surexprimée dans les différents compartiments. Cette présence abondante de la protéine peut saturer certains régulateurs des voies de sécrétion (Marks et al., 1996). et donc perturber la cinétique de transport des cargos. Ceci est particulièrement vrai pour les techniques qui affectent la voie sécrétoire globale (blocage et élimination de la BFA incubation à 15°C ou 20°C). Il convient également de noter que les systèmes d'agrégation et l'outil RUSH, nécessitent un étiquetage de la protéine d'intérêt, affectant potentiellement la voie de transport utilisée (par exemple en masquant d'éventuels signaux au sein de la protéine d'intérêt) sans être facilement détecté. Par conséquent, il faut donc interpréter avec prudence les

résultats obtenus à l'aide de ces techniques. Dans l'idéal, il faut privilégier les conditions (orientation, linkers, etc..) de fusion déjà mis en place et, si possible, comparer plusieurs modes de fusion différents.

#### 1.4.5. Mécanismes de sécrétion de TNF

Le TNF est principalement sécrété par les macrophages. La sécrétion du TNF est provoquée par le LPS ou des composés bactériens qui sont reconnus par les TLRs (TLR4 pour le LPS) à la surface des macrophages (voir paragraphe 1.2.2.3).

Le TNF est aussi sécrété par les lymphocytes T (principalement CD4+) mais aussi par les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et certains fibroblastes. Le TNF est également produit en présence de la cytokine pro-inflammatoire IL-1.

Le TNF peut agir sur plusieurs cibles et a différentes fonctions : il peut provoquer l'apoptose, la survie cellulaire, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou encore une diminution du métabolisme des lipides. Ces cibles peuvent être les macrophages eux-mêmes (boucle autocrine) les cellules épithéliales et les fibroblastes favorisant la fabrication de prostaglandines et de collagénase par ces cellules.

Le TNF est principalement sécrété par les macrophages mais il est également sécrété par d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T (principalement CD4+) mais aussi par les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et certains fibroblastes.

De nombreuses cellules immunitaires stockent des cytokines dans des compartiments distincts - à savoir des granules sécrétoires ou des organites liés aux lysosomes (LRO) - qui permettent une libération rapide des cytokines lors de l'activation cellulaire. Cependant, les macrophages ne disposent pas de ces granules, et les cytokines doivent être synthétisées après l'activation cellulaire et sécrétées via la voie de sécrétion constitutive ou via une sécrétion non conventionnelle. Pour répondre à la nécessité de transporter et de libérer de grands volumes de cytokines dans les premières heures suivant l'activation cellulaire, la machinerie cellulaire et les transporteurs impliqués dans la voie constitutive sont régulés à la hausse (Lieu et al., 2008; Pagan et al., 2003). En effet, une augmentation de la sécrétion du TNF par les macrophages est provoquée par le LPS ou des composés bactériens qui sont

reconnus par les TLRs (TLR4 pour le LPS) présent à la surface des macrophages (voir paragraphe 1.2.2.3).

L'activation des macrophages par le LPS conduit à la transcription rapide du TNF, générant une protéine membranaire de type II qui est transporté dans le complexe Golgien (Shurety et al., 2000). Le TNF est ensuite encapsulé exclusivement dans une population de tubules/vésicules dérivés du TGN marqués par le GRIP-golgin p230/golgin245 (Lieu et al., 2008). Les golgins à domaine GRIP sont situés sur des domaines distincts du TGN et régulent le trafic vers et depuis le TGN. Lors de l'activation par le LPS, le nombre de tubules marqués par p230 sortant du TGN sont sélectivement multipliés par trois pour augmenter le transport des cytokines (Lieu et al., 2008). Les transporteurs de TNF marqués par p230 sont également régulés par Rab6 et Rab6a' : deux GTPases qui participent à de multiples étapes du trafic intracellulaire par l'intermédiaire de plusieurs effecteurs. C'est le cas de la Myosine IIA qui déplacent le TNF (séquestré dans tubules marqués au p230) et d'autres cargaisons du TGN vers les endosomes de recyclage (Miserey-Lenkei et al., 2010).

Rab6 est impliqué dans la voie de sécrétion constitutive des macrophages, qui est régulé à la hausse par le LPS, offrant ainsi une plus grande capacité de transport dans les cellules activées.

Malgré la prépondérance de la PI4P (Phosphatidylinositol-4-phosphate) dans les membranes de Golgi, un certain nombre de PI3 kinases (Phosphoinositide 3-kinases) régulent le bourgeonnement et la sortie des vésicules du TGN (De Matteis et al., 2005). Parmi elles, la PI3K $\delta$  se trouve sur les membranes du TGN, où elle régule, avec la dynamine II, le trafic du TNF et sa sortie du TGN (Low et al., 2010).

Un certain nombre de gènes du métabolisme lipidiques sont également régulés à la hausse en réponse aux LPS, notamment la choline cytidyltransférase alpha (CCT $\alpha$ ), la phospholipase D1 (PLD1) et la choline/éthanolamine phosphotransférase C/EPT . Les lipides jouent un rôle actif dans la biogenèse des transporteurs et dans l'organisation des domaines de sortie du TGN (Tian et al., 2008). Ainsi, des changements localisés dans la composition lipidique peuvent considérablement modifier la sécrétion des protéines en recrutant des protéines spécifiques et en favorisant la fission ou la fusion membranaire. La CCT $\alpha$ , une enzyme clé catalysant la biosynthèse du PtdChol dans les macrophages, régule la formation et le

bourgeoisement des vésicules (Tian et al., 2008). Son inactivation réduit la synthèse de PtdChol conduisant à une diminution de la sécrétion de TNF, suggérant que le PtdChol et la CCT $\alpha$  sont également critiques pour le transport à partir du complexe de Golgi (Tian et al., 2008). Ainsi, la régulation de la machinerie lipidique augmente également l'exportation du TNF depuis le TGN.

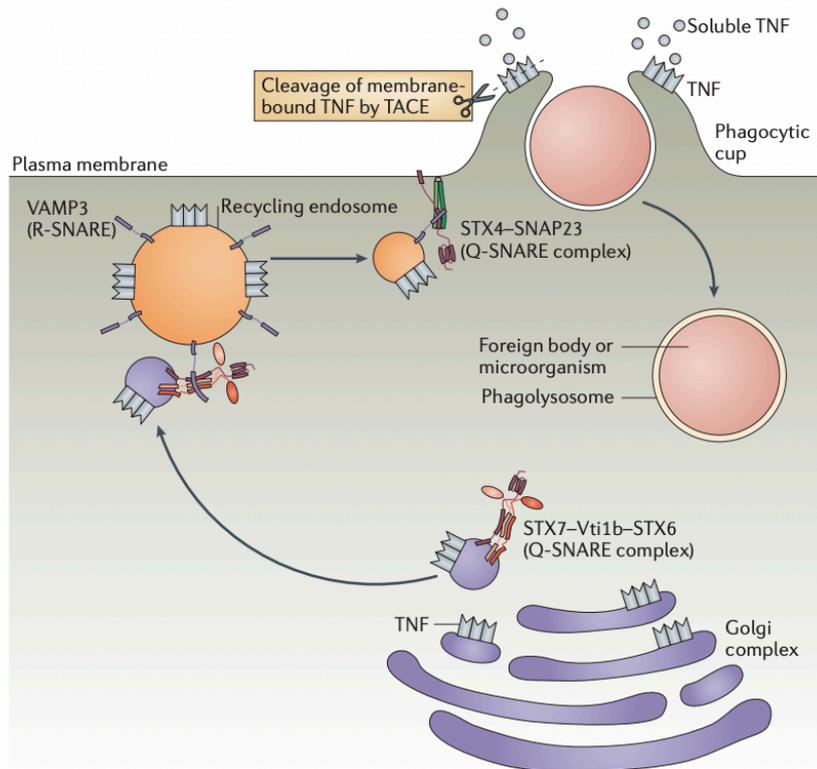
Les transporteurs du TGN transportent le TNF et d'autres cargaisons vers les endosomes de recyclage, qui constituent une deuxième station de transit et de tri. Ce transport est bien défini grâce à l'identification des protéines SNAREs (Murray et al., 2005a; Murray et al., 2005b). Le complexe Q-SNARE Stx6/Stx7/Vti1b est emballé avec le TNF dans des vésicules dérivées du TGN et lorsqu'il atteint l'endosome de recyclage, ce complexe Q-SNARE s'apparie avec le complexe R-SNARE VAMP3 pour fusionner (Murray et al., 2005a; Murray et al., 2005b). Les membres de ce complexe SNARE sont régulés à la hausse et empaquetés dans les vésicules dérivées du TGN en réponse au LPS afin d'accueillir le nombre accru de golgin p230 nécessitant une fusion avec l'endosome de recyclage (Murray et al., 2005a; Murray et al., 2005b). La poursuite du transport vers la surface cellulaire nécessite la fusion des endosomes de recyclage, ou des extensions tubulaires de ce compartiment portant VAMP3, avec la membrane plasmique, via le complexe Q-SNARE de Stx4/SNAP23 (Murray et al., 2005b; Pagan et al., 2003). Cette étape de la voie constitutive, comme les étapes précédentes, est également renforcée dans les macrophages activés par la régulation positive et l'augmentation des niveaux des SNARE de surface (Murray et al., 2005b; Pagan et al., 2003). La perte ou l'inactivation de l'un de ces composants SNARE bloque la sécrétion de TNF. L'emplacement à la surface cellulaire du complexe SNARE joue un rôle clé dans la sécrétion du TNF. Les SNARE à la surface cellulaire, comme Stx4 (Syntaxine 4), sont regroupés dans des radeaux lipidiques riches en cholestérol, qui ornent les filopodes et les coupes phagocytaires à la surface des macrophages activés et la perturbation de ces radeaux lipidiques réduit la sécrétion de TNF (Kay et al., 2006).

Les macrophages utilisent leurs filopodes pour explorer leur environnement et capturer les agents pathogènes ; cette liaison entraîne la rétraction des filopodes et la formation de pseudopodes à partir des lamellipodes sous-jacents pour former la coupe phagocytaire (Mattila and Lappalainen, 2008). La Stx4 se transloque et se concentre

sur ces pseudopodes riches en lipides et régule la fusion focale de l'endosome de recyclage avec la coupe phagocytaire (Kay et al., 2006; Murray et al., 2005b). Cette fusion a deux objectifs : fournir une membrane de surface supplémentaire nécessaire aux macrophages pour englober les microbes tout en délivrant simultanément du TNF aux extrémités des pseudopodes pour une sécrétion rapide (Kay et al., 2006; Murray et al., 2005b). La Stx4 est ensuite éliminée, et vraisemblablement recyclée vers la surface cellulaire, après l'internalisation du phagosome (Kay et al., 2006; Murray et al., 2005b).

Deux GTPases Rab, Rab11 et Rab37, régulent la délivrance du TNF en surface (Mori et al., 2011; Murray et al., 2005b) et ces protéines Rab sont également régulées à la hausse après l'activation des cellules par les LPS. Rab11 est un marqueur bien connu des endosomes de recyclage, qui assure la médiation du transport vers la surface cellulaire et participe de la même manière à la libération du TNF par les endosomes de recyclage vers la membrane plasmique. Rab37 est également situé sur les vésicules chargées de TNF qui fusionnent avec la membrane plasmique et la perte de Rab37 réduit la sécrétion de TNF (Mori et al., 2011).

Pour résumer, le TNF est transporté à la membrane plasmique par la voie de sécrétion conventionnelle. En effet, le TNF est transporté depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi puis de l'appareil de Golgi à la surface cellulaire. Le transport de TNF de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique se fait à l'aide de médiateurs de fusion vésiculaire appelés Q-SNARE (SNAP Receptor). Plus précisément, TNF est transporté via des complexes STX7-Vti1b-STX6, où STX représente les syntaxines (familles de protéines Q-SNARE) . Il a été montré que les vésicules contenant TNF et décorées par ce complexe fusionnent avec des endosomes de recyclage via VAMP3 (Vesicle Associated Membrane Protein) , présent sur les endosomes de recyclage. L'étape suivante consiste en la fusion des endosomes de recyclage (portant VAMP3) à la membrane plasmique grâce au complexe Q-SNARE STX4-SNAP23 présent à la surface cellulaire. TNF est libéré dans le milieu extracellulaire après clivage par la métalloprotéase TACE (Figure 17).



**Figure (17) Schémas du transport de TNF de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique.**  
 Adapté de (Stow et al., 2006)

# RESULTATS

TNF (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine participant à l'inflammation, dont le rôle est essentiel dans la lutte contre les pathogènes. Bien qu'essentiel aux défenses immunitaires, la sécrétion abondante et chronique de TNF est délétère pour l'organisme et est impliquée dans certaines maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn. Les thérapies actuelles pour réduire le niveau de TNF sécrété sont basées sur des injections récurrentes d'anticorps anti-TNF ou de fragments de récepteur du TNF. Cependant, environ 30 % des patients sont résistants à ces traitements, en raison du développement d'anticorps dirigés contre les immunoglobulines anti-TNF injectées. Il existe donc un fort besoin de disposer de traitements moins coûteux et moins dommageables pour les patients comme l'utilisation de molécules chimiques capables de réduire la sécrétion de TNF. L'approche que nous avons choisie consiste à identifier des molécules chimiques capables d'inhiber la sécrétion de TNF en ciblant sa voie de transport intracellulaire.

Les protéines destinées à être sécrétées empruntent la voie de sécrétion. Il est désormais clair que différentes voies de sécrétion co-existent au sein des cellules permettant de prendre en charge la diversité des protéines à transporter. Notre approche vise à tirer avantage de la diversité des voies de sécrétion pour identifier des molécules chimiques ciblant spécifiquement le transport d'une protéine impliquée dans des pathologies.

En amont de ce projet de thèse, l'outil RUSH (Retention Using Selective Hooks) de synchronisation du trafic appliqué au TNF a été combiné au criblage phénotypique automatisé de banques de molécules chimiques (Prestwick et NCI) en cellules HeLa. Le laboratoire de Franck Perez a récemment validé cette approche de ciblage des voies de transport intracellulaire. Des molécules chimiques inhibant le transport antérograde de CCR5, co-récepteur nécessaire à l'entrée du VIH dans les cellules, ont été identifiées et caractérisées (Boncompain et al., 2019). Dans cette étude, afin d'identifier des molécules affectant spécifiquement le transport de CCR5 vers la surface cellulaire, une analyse différentielle a été conduite en utilisant une autre

protéine comme référence, à savoir TNF. Les molécules retenues sont celles inhibant le transport de CCR5 mais pas celui de TNF. Comme mentionné plus haut, ces molécules ont fait l'objet d'une première publication (Boncompain et al., 2019). L'analyse différentielle précédemment décrite a également abouti à la sélection de molécules inhibant spécifiquement le transport de TNF vers la surface cellulaire mais n'affectant pas le transport de CCR5.

### La sélection

Ce projet de thèse a pour but de valider les effets des molécules diminuant le transport antérograde de TNF en modèle hétérologue dans un premier temps, afin de poursuivre par une analyse plus approfondie d'un nombre restreint de molécules. Dans un deuxième temps, les effets des molécules retenues sur la sécrétion endogène de TNF et d'autres cytokines ont été évalués en modèle physiologique. En parallèle, des expériences ont été réalisées pour appréhender les mécanismes d'action des molécules identifiées.

## 1.5. Manuscrit d'article

# Targeting the intracellular transport route of TNF led to the identification of small compounds reducing TNF secretion

Khadija Oukacha<sup>1</sup>, Pierre Gestraud<sup>2</sup>, Elaine Del Nery<sup>3</sup>, Franck Perez<sup>1</sup> and Gaelle Boncompain<sup>1</sup>

1 Institut Curie, PSL Research University, Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 144, Dynamics of Intracellular Organization Laboratory, F-75005 Paris, France

2 Institut Curie, PSL Research University, Bioinformatics Facility, INSERM U900, F-75005 Paris, France.

3 Institut Curie, PSL Research University, Translational Department, Biophenics High-Content Screening Laboratory, F-75005 Paris, France

TNF: Tumor Necrosis factor

EGFP: Enhanced Green Fluorescence Protein

ER: Endoplasmic Reticulum

SBP: Streptavidin Binding Peptide

RUSH: Retention Using Selective Hooks

GPI : glycosylphosphatidylinositol

IL-6 : Interleukin 6

IL-8 : Interleukin 8

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells

LPS: Lipopolysaccharide

hMDMs: Human monocyte-Derived Macrophages

mRNA: Messenger Ribonucleic acid

## Abstract

The inflammatory cytokine Tumor Necrosis Factor (TNF) is essential for the immune response in case of exposure to pathogens. However, abundant and chronic secretion of TNF is detrimental for the organism, participating in the pathophysiology of some inflammatory diseases. Using a synchronization transport assay combined to differential high-content screening of chemical libraries, molecules capable of decreasing TNF secretion were identified. Using a heterologous model of TNF transport, we further selected a reduced number of molecules in regards of their

specificity on the transport of other cargos. The three hit molecules diminished the post-Golgi transport of TNF. Endogenous cytokines secretion has been assessed in the presence of the molecules. Incubation of human primary macrophages and monocytes with the three molecules lead to a reduction of LPS-induced TNF secretion to different extents.

## Introduction

Human Tumor Necrosis Factor (TNF) is an inflammatory cytokine essential for the regulation of the inflammatory immune response (Parameswaran and Patial, 2010). TNF is mainly produced by monocytes, macrophages and T cells, but also by mast cells, granulocytes, fibroblasts and several other cell types (Tracey et al., 2008). In macrophages and monocytes, *TNF* gene is expressed in response to several stimuli such as bacterial lipopolysaccharide (LPS) through the activity of the transcription factor NF- $\kappa$ B (Hayden and Ghosh, 2008; Jost and Ruland, 2006). TNF is produced in the endoplasmic reticulum (ER) as a transmembrane protein of 27 kDa. It is then transported to the Golgi apparatus before reaching the cell surface, where it is cleaved by the TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) expressed in some cell types (Black, 2002). After cleavage, the soluble form of TNF of 17kDa is released in the extracellular space. Both the transmembrane and soluble forms of TNF have biological activity. TNF binds two transmembrane receptors: TNF receptor 1 (TNFR1) and TNF receptor 2 (TNFR2) (Mitoma et al., 2018) through which TNF activates a pro-inflammatory response. TNF is essential for fighting against pathogens. However, its abundant and chronic secretion is deleterious to the organism, as in the case of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis or Crohn's disease (Amiri et al., 1992; Mullin and Snock, 1990; Rampart et al., 1989). Current therapies to reduce the level of TNF are based on recurrent injections of anti-TNF antibodies or TNF receptor fragments. However, about 30% of patients are resistant to these therapies due to the development of antibodies to the injected anti-TNF immunoglobulins (Sandborn et al., 2007; Sandborn et al., 2010; Yarur and Rubin, 2015). Thus, there is a need for alternative/complementary treatments reducing TNF secretion. The development of small compounds capable of diminishing the level of TNF secretion may constitute less harmful and cheaper therapies for patients with rheumatoid arthritis or Crohn's disease.

Protein secretion is a regulated process, which is key for cellular homeostasis. It ensures the delivery of about 30% of total cellular proteins to intracellular compartments and to the cell surface. Proteins destined for secretion enter the secretory pathway at the level of the ER. They are then transported to the Golgi apparatus where processing, such as glycosylation, takes place. Proteins are then exported from the Golgi apparatus to reach their destination compartment such as the plasma membrane. Diversity of Golgi-dependent protein transport routes does exist (Boncompain and Perez, 2013b; Boncompain and Weigel, 2018) and represents an intracellular target for molecules to inhibit specifically the transport of secretory proteins involved in pathologies. Previous work has demonstrated the feasibility of specific chemical inhibition of the transport of CCR5, the co-receptor of HIV-1 (Boncompain et al., 2019).

Given the importance of TNF secretion in the pathological consequences of some inflammatory diseases, we set out a study to identify chemical compounds specifically inhibiting TNF secretion, acting on its intracellular transport route. We used the Retention Using Selective Hooks (RUSH) assay (Boncompain et al., 2012) to synchronize the anterograde transport of TNF and combined it to high-content screening of chemical libraries followed by a differential analysis, using CCR5 synchronized transport as a reference. The molecules that we identified in the screen were first validated in a heterologous model of TNF transport. Then the specificity of their effects on the transport of other cargos was evaluated, further decreasing the hit list of molecules. Incubation of human primary macrophages and monocytes with three hit molecules allowed a reduction of LPS-induced TNF secretion.

Together, our results indicate that the anterograde transport route of TNF might represent a target for the identification of small compounds capable of decreasing TNF secretion.

## Results

### Identification of small molecules inhibiting TNF transport and not affecting the transport of other proteins

In order to identify small compounds specifically decreasing the transport of TNF to the cell surface, automated high-content screening of chemical libraries (1200 molecules from the Prestwick Chemical Library and 2824 molecules obtained from the U.S. National Cancer Institute (NCI)) was conducted as previously described (Boncompain et al., 2019). Briefly, our read-out consisted in the immuno-detection of the cargo of interest at the cell surface of HeLa cells stably expressing RUSH-adapted TNF (Str-KDEL\_TNF-SBP-EGFP) and CCR5 (SBP-EGFP-CCR5) using an antibody against EGFP, which is extracellularly exposed in our constructs, after induction of their synchronized transport by incubation with biotin in combination with 1h30 of pre-treatment with the molecules (from the libraries and control molecules). In addition, the localization of the cargo was detected thanks to the EGFP signal and the nuclei were also stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (**Suppl fig 1A, B**). Of note, TNF is not cleaved by TACE in HeLa cells and TNF-SBP-EGFP is expressed at the cell surface 45 min after the addition of biotin before being internalized in endocytic structures (Boncompain et al., 2019; Fourriere et al., 2016). A visual analysis and a bioinformatics analysis has been conducted using features obtained from image segmentation and a principal component analysis (**Suppl Fig. 1C, D**) led to the identification of 85 molecules inhibiting TNF transport at the cell surface ('TNF hit', **Suppl Fig 1E**) while not affecting the one of CCR5. We further evaluated the effects of these 85 molecules on the synchronized transport of TNF through an end-point analysis using the RUSH assay and flow cytometry by flow cytometry. Twenty-seven molecules decreased surface expression of TNF-SBP-EGFP by 40% compared to the control cells treated with DMSO (**Figure 1A,B**). The screening procedure carried out before (Boncompain et al., 2019) already shown that these molecules do not inhibit the transport of SBP-EGFP-CCR5 to the cell surface. As a secondary screen, we further assessed the effects of the selected 27 molecules on the transport of other proteins,

namely EGFP-GPI (SBP-EGFP-GPI) and IL-6 (IL6-SBP-EGFP) in an end-point assay using the RUSH assay. The synchronized transport of these RUSH-adapted cargos has been monitored by flow cytometry. EGFP-GPI was stably expressed after 90 min of incubation with biotin and IL6-SBP-EGFP was fully secreted after 45 min of incubation with biotin (**Suppl. Fig 2**).

We analyzed the effects of the molecules on the transport of EGFP-GPI and of IL-6 in regard to the transport of TNF. Eleven molecules inhibited TNF transport without strongly inhibiting IL-6 secretion nor EGFP-GPI secretion. Three molecules inhibiting TNF and IL-6 secretion were also retained for potential therapeutic purposes in an inflammatory context. Together, these results highlighted 14 molecules capable of inhibiting the secretion of TNF, among them 11 rather specifically (**Fig. 1C, D**).

### **Three hit molecules inhibit endogenous TNF secretion in human primary macrophages and monocytes**

To validate the effects of the 14 hit molecules on the transport of TNF, we monitored the secretion of endogenous TNF in human monocyte-derived macrophages (hMDMs) obtained from blood donors (see Methods section for details). TNF secretion was stimulated by incubation with bacterial lipopolysaccharide (LPS). The concentration of secreted cytokines, TNF, IL-6 and IL-8 in the culture supernatant was measured by Cytometric Beads Array (CBA) in the same sample. The kinetic measurement of TNF and IL-6 secretion after incubation of hMDMs with LPS showed that secretion of TNF and IL-6 is stable after 16 hours of incubation (**Suppl. Fig. 3**). Then, hMDMs were pre-incubated with the molecules for 1h30 and then incubated with LPS for 16h (in the presence of the molecules). Five molecules significantly inhibited TNF secretion without inhibiting IL-8 secretion (**Figure 2A**). Indeed, the molecules NSC308835, Cisapride, Oxyacanthine, Azelastine and Imatinib inhibited TNF secretion of 37%, 48%, 53%, 60% and 66%, respectively. Among these molecules, NSC308835 and Oxyacanthine inhibited IL-6 secretion by 30% and 51%, respectively (**figure 2B**).

The three strongest TNF hits (Imatinib, Azelastine and Oxyacanthine) were further tested on human primary monocytes. As previously described for experiments with

hMDMs, TNF secretion was stimulated by incubation with LPS. The effects of the molecules on the endogenous secretion of TNF, IL-6 and IL-8 were measured after incubation of monocytes with the molecules for 1h30 and then with LPS for 16h. The three molecules significantly inhibited TNF secretion in human primary monocytes without affecting IL-8 secretion (**figure 3A-C**). Imatinib inhibits TNF secretion by more than 96% in human primary monocytes. Imatinib and Oxyacanthine showed an inhibitory effect on IL-6 secretion (**Fig 3B**). Altogether, the results obtained in hMDMs and in human primary monocytes showed that Azelastine decreased TNF secretion moderately but specifically. Oxyacanthine inhibited TNF and IL-6 secretion by 40% at least. Imatinib strongly (> 90%) inhibited TNF secretion in human primary monocytes and less strongly (about 50 % inhibition) in hMDMs and it also inhibits moderately IL-6 secretion in both cell types.

### **The three hit molecules inhibit post-Golgi transport of TNF**

To better understand the effects of Imatinib, Azelastine and Oxyacanthine on the secretion of TNF, experiments were performed in HeLa cells stably expressing RUSH-adapted TNF (Str-KDEL\_TNF-SBP-EGFP). Indeed, the use of a synchronized transport assay allows to get rid of the equilibrium state of the localization of TNF and to monitor its anterograde transport. The presence of TNF-SBP-EGFP at the cell surface was measured by flow cytometry after pre-incubation of the cells with the molecules for 1h30 followed by addition of biotin for indicated incubation period. The kinetics of secretion of TNF-SBP-EGFP remained similar to the DMSO control condition in presence or absence of the molecules (**Figure 4A**). The presence of TNF-SBP-EGFP at the cell surface was maximal after 45 min of incubation with biotin. However, the amount of TNF-SBP-EGFP reaching the cell surface was reduced in presence of Imatinib, Azelastine and Oxyacanthine and is coherent with results obtained in the end-point assay (**Fig. 1B**). These results show that the molecules decreased the amount of TNF secreted but do not lead to a delay of TNF trafficking. Real-time monitoring of the fluorescence signal of TNF-SBP-EGFP confirmed that a reduced fraction of TNF-SBP-EGFP reaches the plasma membrane after incubation with the molecules (**Figure 4 B**). Twenty minutes after the addition of biotin, TNF-SBP-

EGFP was detected in the Golgi apparatus in the DMSO control condition and in presence of Imatinib, Azelastine and Oxyacanthine. After 45 min of incubation with biotin, TNF-SBP-EGFP was transported from the Golgi apparatus to the plasma membrane in the DMSO control condition. In cells treated with Imatinib, Azelastine and Oxyacanthine, TNF-SBP-EGFP was still observed in intracellular compartments, showing that post-Golgi transport of TNF-SBP-EGFP is reduced.

### **Imatinib and Azelastine show inhibitory effects on TNF secretion at 10 $\mu$ M without significant toxicity in hMDMs**

To better characterize the efficacy of Imatinib, Azelastine and Oxyacanthine on the secretion of endogenous cytokines, especially of TNF but also of IL-6 and IL-8, dose-response experiments were carried out. Human monocyte-derived macrophages were incubated for 1h30 with serial dilutions of the molecules (from 0.37  $\mu$ M to 30  $\mu$ M) and then LPS was added to induce expression and secretion of cytokines. The results confirmed that Imatinib and Azelastine exert stronger inhibitory effects on the secretion of TNF than on the secretion of IL-6 and IL-8 (**Figure 5 A, B**). The effects of the molecules decreased when the concentration is lower than 10  $\mu$ M. However, Oxyacanthine showed less potent effects at 10  $\mu$ M on the secretion of TNF than previously observed (**Fig. 5C**) but lower concentration (1.17  $\mu$ M) appeared to be more efficient in this series of experiments. As experiments were performed in human primary macrophages, this difference might be due to variability between donors. Stronger inhibitory effects on the secretion of cytokines were observed with 30  $\mu$ M of Imatinib and Oxyacanthine but these molecules induce a high cell death at this dose (**Fig 5 D, F**). The percentage of dead cells reached about 50% when hMDMs were incubated with Imatinib or Oxyacanthine at 30  $\mu$ M. The other concentrations tested of Imatinib and Oxyacanthine, Azelastine (from 0.37 to 30  $\mu$ M) and DMSO (from 0.037 to 3%) lead to basal cell death of 25% (**Figure 5B, Suppl. Fig 5**). These results showed that the optimal concentration, regarding efficacy and toxicity, for the use of Azelastine and Imatinib might be 10  $\mu$ M while Oxyacanthine might be used at 1.1  $\mu$ M.

### **The three hit molecules do not reduce TNF mRNA production in hMDMs**

Our screening approach has been designed to identify molecules inhibiting TNF secretion targeting its intracellular anterograde transport route. Using the RUSH assay, TNF is already synthesized and folded before incubation with the small compounds. However, regulation of TNF secretion in physiological models is more complex than in the cellular model used in our screening procedure. In macrophages and monocytes, exposure to LPS (or other TLR ligands) activates signaling cascades leading to transcription of TNF gene (Dauphinee and Karsan, 2006; Li et al., 2003). Therefore, we measured in parallel the mRNA level of TNF in cells and the secretion of TNF in culture supernatants. Quantitative PCR results showed that the Imatinib did not affect TNF transcription compared to DMSO control (**Fig. 6A**), while LPS-induced TNF secretion was inhibited in Imatinib-treated hMDMs (**Fig. 6B**). Incubation with Azelastine and Oxyacanthin led to a sustained TNF mRNA expression for a longer time (until 6 h) compared to DMSO-treated cells. Secretion of TNF after incubation with Azelastine was reduced even if TNF mRNA was higher than the DMSO control condition, reinforcing the results obtained previously on the inhibitory effects of Azelastine on TNF secretion. In this series of experiments, Oxyacanthine did not decrease TNF secretion in response to LPS. This difference with previous results might be due to the variability between donors and to the lack of robustness of the 10  $\mu$ M dose previously observed (**Fig. 5C**). As stronger effects on LPS-induced secretion have been obtained in human primary monocytes, at least for Imatinib (**Fig. 3A**), TNF mRNA expression was also assessed in these cells. Imatinib almost completely inhibited TNF transcription (**Fig. 6C**) resulting in a very low level of TNF secretion in the culture supernatant (**Fig. 6D**). Incubation with Azelastine and Oxyacanthine decreased TNF mRNA production to the level consistent with the level of inhibition of TNF secretion measured. These results suggest that the strong inhibition of TNF secretion observed in primary monocytes incubated with Imatinib (**Fig. 3A**) is linked to the effects of Imatinib on *TNF* transcription. In hMDMs, incubation with Azelastine and Imatinib led to a decrease of TNF secretion without strongly decreasing TNF mRNA expression. This suggests that these molecules exert their effects through acting on the transport of TNF and not at the transcriptional level.

## Discussion

The onset of many diseases relies on the transport of proteins to the cell surface. In the case of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis or Crohn's disease, deleterious physiopathological consequences are caused by abundant and chronic secretion of TNF. Therapies aiming at decreasing the level of TNF are based on the neutralization of the transmembrane or soluble form of TNF by injections of antibodies directed to TNF or fragments of TNF receptors. The targeting of the intracellular transport of TNF represents an interesting therapeutic option and is accessible taking advantage of the diversity of the Golgi-dependent secretory routes. A previous study has demonstrated that the inhibition of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) abolishes TNF trafficking in mouse macrophages. Both RNA depletion of the p110 $\delta$  subunit of PI3K and its chemical inhibition with IC87114 resulted in the blocking of TNF in tubular transporters at the level of the trans-Golgi network (TGN) (Low et al., 2010). This molecule did not affect secretion of mouse IL-6 suggesting specificity for the TNF transport route. In this study, the inhibition of p110 $\delta$  of PI3K in human cells has not been assessed.

Both IL-6 and TNF are important mediators of the immune response. However, detrimental inflammatory reactions, such as cytokine release syndrome during CAR-T cell therapies or COVID-19 infection, involve high secretion of inflammatory cytokines, especially of TNF and IL-6 (Copaescu et al., 2020; Guo et al., 2022). The secretion of these cytokines is therefore an interesting target for the development of new therapies to control inflammatory reactions. For this reason, in our study, we kept Oxyacanthine for further characterization as we showed that incubation of human primary macrophages and monocytes with Oxyacanthine decreased LPS-induced secretion of TNF and IL-6. Moreover, some mechanisms of intracellular transport are common to TNF and IL-6 (Murray and Stow, 2014). One can speculate that some molecules inhibit the anterograde transport of IL-6 and TNF but not of EGFP-GPI (in the heterologous model) nor of IL-8 (in the physiological models). Indeed, both cytokines are transported to the plasma membrane by a process that involves recycling endosomes and the SNARE protein VAMP3 (Revelo et al., 2019; Stow et al., 2006). VAMP3 is a SNARE protein that plays a critical role in vesicle fusion with the plasma membrane. Other

intracellular trafficking machineries are involved in the regulation of IL-6 and TNF secretion, such as SCAMP5 (Secretory carrier-associated membrane protein 5) (Murray and Stow, 2014), Synaptotagmin XI (Arango Duque et al., 2013) or the enzyme Choline cytidyltransferase alpha (CCT $\alpha$ ) (Tian et al., 2008).

However, the entire secretory route is not common to TNF and IL-6. Indeed, within the recycling endosomes, compartmentalization of cargo proteins has been observed where IL-6 is dynamically separated from TNF (Manderson et al., 2007). Subsequently, these cytokines are secreted independently, TNF being delivered to phagocytic cups but not IL-6 (Manderson et al., 2007). Molecules inhibiting only TNF in HeLa cells might affect cellular targets specific to TNF secretion, probably in the late steps of TNF secretion.

Among the five molecules selected, Imatinib has the strongest inhibitory effects on TNF secretion. Imatinib is a tyrosine kinase inhibitor. Many cellular targets of Imatinib have been reported such as BCR-ABL, c-Kit or PDGFR- $\beta$  (Iqbal and Iqbal, 2014). Imatinib is currently used as a treatment against different cancers such as chronic myelogenous leukemia (Claudiani and Apperley, 2018) or gastrointestinal stromal tumors (GIST) (Reichardt, 2018). Since Imatinib inhibits many kinases, one might speculate that PI3K is a new target for Imatinib. In addition, Imatinib has been shown to inhibit TNF transcription. Imatinib negatively regulates the LPS-activated NF- $\kappa$ B signaling pathway (Wolf et al., 2005) responsible for TNF expression.

Another molecule inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway is Azelastine (Nguyen et al., 2021). The latter is a selective histamine H1 receptor antagonist used for the symptomatic treatment of allergies (Bernstein, 2007; Horak, 2008).

Although the H1 receptor is the main target of Azelastine, there are other cellular targets of this molecule such as the histamine H2 receptor (Bernstein, 2007; Horak, 2008), phospholipase A2 and leukotriene C4 synthase (Hamasaki et al., 1996). It can also be hypothesized that Azelastine inhibits TNF via a yet unknown target of the molecule.

In addition, Imatinib has been shown to reduce the level of TNF expression (Wolf et al., 2005). Indeed, according to this study, Imatinib decreased the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and the activation of NF- $\kappa$ B (Imatinib preferentially inhibited DNA binding of the p65 subunit). Our results confirmed that Imatinib strongly inhibits TNF expression in

primary human monocytes (Fig 6, C). Therefore, we can now not decipher whether Imatinib acts only on TNF expression or on both TNF secretion and expression in physiological cellular models. In primary human macrophages, we showed that the impact of imatinib on TNF expression is less important than in monocytes. Indeed, there is a slight decrease of TNF expression 1h after LPS stimulation which corresponds to the peak of TNF expression in the DMSO control condition. Whether this decrease is sufficient to explain the decrease of TNF secretion in the presence of imatinib (Fig 6, D) or whether imatinib acts on TNF secretion in macrophages is still unclear. This would suggest that imatinib has different targets depending on the model being studied.

The assessment of the effects of the hit molecules on mouse macrophages would be needed for further use in in vivo models of inflammatory diseases. Indeed, a mouse model of chronic ileal inflammation has been characterized. The mice develop spontaneously and closely resemble human Crohn's disease in terms of disease location, histological features and clinical response to treatment. Among them are two experimental mouse models of ileitis: the TNF DARE and SAMP1/YitFc strains (Pizarro et al., 2003). The use of these mouse models could be used to test the efficacy of selected molecules inhibiting TNF secretion and further characterizing the effects of the hit molecules.

Altogether, our results confirm the potential therapeutic approach of targeting the secretion of a protein involved in a disease, here TNF for inflammatory diseases, taking advantage of the diversity of the protein transport routes.

## Materials and Methods

### Cells

HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; GE Healthcare), 1 mM sodium pyruvate, and penicillin and streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Thermo Fisher Scientific). HeLa cells stably expressing Str-KDEL as a hook and TNF-SBP-EGFP or IL6-SBP-EGF as a reporter and were obtained by transduction with lentiviral particles produced in human embryonic kidney (HEK) 293T.

Human primary macrophages were isolated from the blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang Ile-de-France, Site Trinité, Site Crozatier or Site Saint Louis) by density gradient sedimentation in Ficoll (Merck/Sigma), followed by negative selection on magnetic beads (catalog No. 130-117-337, Miltenyi) or adhesion on plastic at 37°C for 2 hours. Cells were then cultured in the presence of complete culture medium [RPMI 1640 supplemented with 10% FCS (Eurobio), streptomycin/penicillin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), and 2 mM L-glutamine (Invitrogen/Gibco)] containing recombinant human macrophage colony-stimulating factor (rhM-CSF) (10 ng/ml) (catalog No 130-096-492, Miltenyi) for 6 to 7 days.

### Constructs

Str-KDEL\_TNF-SBP-EGFP and CS-KDEL\_SBP-EGFP-GPI constructs have been described in previous works (Boncompain et al., 2012; Boncompain et al., 2019).

The DNA sequences corresponding to human IL-6 were purchased as synthetic genes with his peptide signal at IDT. It was cloned into RUSH plasmids downstream of Str-KDEL\_TNF-SBP-EGFP using ASCI I and EcoR I restriction enzymes.

### Flow cytometry

Cells ( $1 \times 10^6$ ) expressing RUSH constructs per condition were treated with 40  $\mu\text{M}$  biotin to induce trafficking of the reporter and incubated at 37°C. At the desired time point, cells were washed once with PBS supplemented with 0.5 mM EDTA and incubated with PBS supplemented with 0.5 mM EDTA for 5 min at 37°C. Plates containing cells were then put on ice. Cells were resuspended and transferred to ice-

cold tubes for centrifugation at 300g for 5 min at 4°C. Cell pellets were resuspended in cold PBS supplemented with 1% FCS for blocking and incubated for at least 10 min. After centrifugation, cell pellets were incubated in a solution of Alexa Fluor 647–coupled anti-GFP (catalog no. 565197, BD Pharmingen) prepared in PBS supplemented with 1% serum for 40 min on ice. Cells were washed three times in cold PBS and 1% serum and fixed with 2% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) for 15 min. Cells were washed twice with PBS before acquisition with an MACSQuant 10 flow cytometer. The intensity of the GFP signal (B1) and the Alexa Fluor 647–conjugated antibody (R1) was measured on GFP positive cells. The R1 signal for each condition was then normalized to the DMSO control.

### **Real-time imaging**

HeLa cells expressing either stably or transiently RUSH constructs were grown on 23-mm fluoroDish (FD35-100, WPI). Trafficking was induced by adding 40μM biotin (Sigma-Aldrich) in Leibovitz medium (Life Technologies). Imaging was performed at 37°C in a thermostat-controlled chamber using an Eclipse 80i microscope (Nikon) equipped with a spinning disc confocal head (Perkin) and an Ultra897 iXon camera (Andor). Image acquisition was performed using MetaMorph software (Molecular Devices). Maximum intensity projections of several z slices are shown (Figs. 5, A, B and C).

### **Cytotoxicity assays**

PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells/ well) were plated in 24 wells plates followed by monocytes purification by adhesion. Macrophages were differentiated in presence of recombinant human macrophage colony-stimulating factor (rhM-CSF) (10 ng/ml) (catalog No 130-096-492, Miltenyi) during 6 to 7 days. After treatment, molecules cytotoxicity was measured thanks to the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released from dead cells using CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen). Each sample was normalized to lyse control (supplied with the kit).

### **Cytometric Bead Array**

PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells/ well) were plated in 24 wells plates followed by monocytes purification by adhesion. Macrophages were differentiated in presence of recombinant human macrophage colony-stimulating factor (rhM-CSF) (10 ng/ml) (catalog No 130-096-492, Miltenyi) during 6 to 7 days. After treatment, cytokines concentration in the

culture medium was determined by Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array (CBA) – Kit (Catalog No 551811, BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Samples were measured in duplicate.

### **Elisa**

Human primary macrophages (5x10<sup>5</sup> cells/well) or monocytes (1,5x10<sup>6</sup> cells/well) were plated in 24 wells plates. TNF- $\alpha$  concentration in the culture medium after treatment was determined by ELISA using the Human TNF ELISA Kit II for TNF- $\alpha$  (catalog No 550610, BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Samples were measured in duplicate.

### **RNA extraction**

Human primary macrophages (5x10<sup>5</sup> cells/well) or monocytes (1,5x10<sup>6</sup> cells/well) were plated in 24 wells plates. The cells were detached in the presence of accutase during 30 min at 37°C. RNA was extracted using NucleoSpin RNA (Catalog No 740955.50, Macherey-Nagel).

### **Reverse transcriptase**

Around 500 ng of total extract RNA was converted to cDNA using Hight Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Catalog No : 4368814, Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

### **qPCR**

Primers and TaqMan probes specific for human TNF (Hs00174128\_m1) and human Gapdh (Hs02786624\_g1) were obtained from TaqMan Predeveloped Assay Reagents (Catalog No 4331182, ThermoFisher Scientific) and were diluted to 1/20. The TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG containing mix of components (except primers, probes, template & water) necessary to perform a real-time polymerase chain reaction (PCR) (Catalog No 4440040, Applied Biosystems) was used and diluted to 1/2. 50 ng of total cDNA was used for each sample.

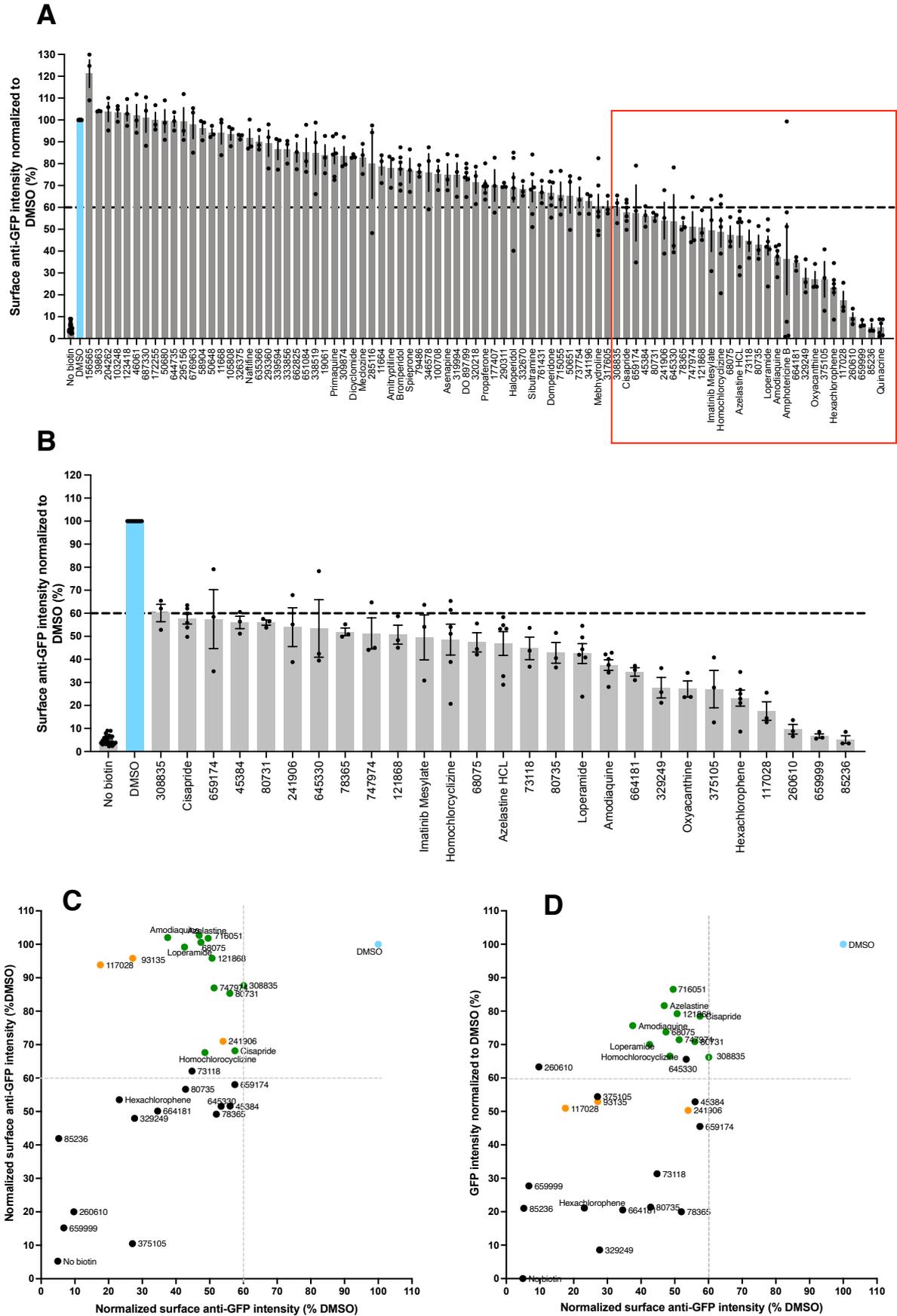
## References

- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadickt, M., Rector, E., Ritter, D. and McKerrow, J. H.** (1992). Tumour necrosis factor  $\alpha$  restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosomiasis-infected SCID mice. *Nature* **356**, 604–607.
- Arango Duque, G., Fukuda, M. and Descoteaux, A.** (2013). Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. *J Immunol* **190**, 1737–1745.
- Bernstein, J. A.** (2007). Azelastine hydrochloride: a review of pharmacology, pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability. *Curr Med Res Opin* **23**, 2441–2452.
- Black, R. A.** (2002). Tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1–5.
- Boncompain, G. and Perez, F.** (2013). The many routes of Golgi-dependent trafficking. *Histochem Cell Biol* **140**, 251–260.
- Boncompain, G. and Weigel, A. V.** (2018). Transport and sorting in the Golgi complex: multiple mechanisms sort diverse cargo. *Current Opinion in Cell Biology* **50**, 94–101.
- Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., de Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G. and Perez, F.** (2012). Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods* **9**, 493–498.
- Boncompain, G., Herit, F., Tessier, S., Lescure, A., Del Nery, E., Gestraud, P., Staropoli, I., Fukata, Y., Fukata, M., Brelot, A., et al.** (2019). Targeting CCR5 trafficking to inhibit HIV-1 infection. *Sci Adv* **5**, eaax0821.
- Claudiani, S. and Apperley, J. F.** (2018). The argument for using imatinib in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2018**, 161–167.
- Copaescu, A., Smibert, O., Gibson, A., Phillips, E. J. and Trubiano, J. A.** (2020). The role of IL-6 and other mediators in the cytokine storm associated with SARS-CoV-2 infection. *J Allergy Clin Immunol* **146**, 518-534.e1.
- Dauphinee, S. M. and Karsan, A.** (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* **86**, 9–22.
- Fourriere, L., Divoux, S., Roceri, M., Perez, F. and Boncompain, G.** (2016). Microtubule-independent secretion requires functional maturation of Golgi elements. *J Cell Sci* **129**, 3238–3250.
- Guo, Y., Hu, K., Li, Y., Lu, C., Ling, K., Cai, C., Wang, W. and Ye, D.** (2022). Targeting TNF- $\alpha$  for COVID-19: Recent Advanced and Controversies. *Front Public Health* **10**, 833967.
- Hamasaki, Y., Shafiqeh, M., Yamamoto, S., Sato, R., Zaitu, M., Muro, E., Kobayashi, I., Ichimaru, T., Tasaki, H. and Miyazaki, S.** (1996). Inhibition of leukotriene synthesis by azelastine. *Ann Allergy Asthma Immunol* **76**, 469–475.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S.** (2008). Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell* **132**, 344–362.
- Horak, F.** (2008). Effectiveness of twice daily azelastine nasal spray in patients with seasonal allergic rhinitis. *Ther Clin Risk Manag* **4**, 1009–1022.
- Iqbal, N. and Iqbal, N.** (2014). Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemother Res Pract* **2014**, 357027.
- Jost, P. J. and Ruland, J.** (2006). Aberrant NF- $\kappa$ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* **109**, 2700–2707.

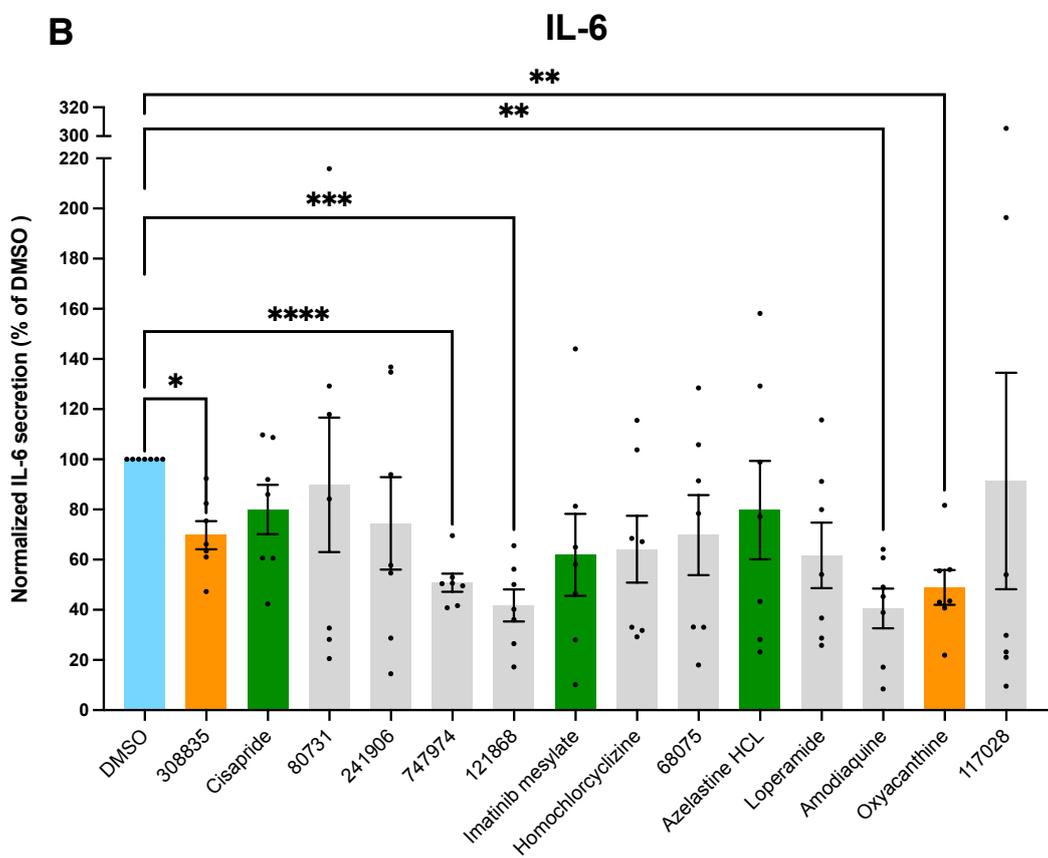
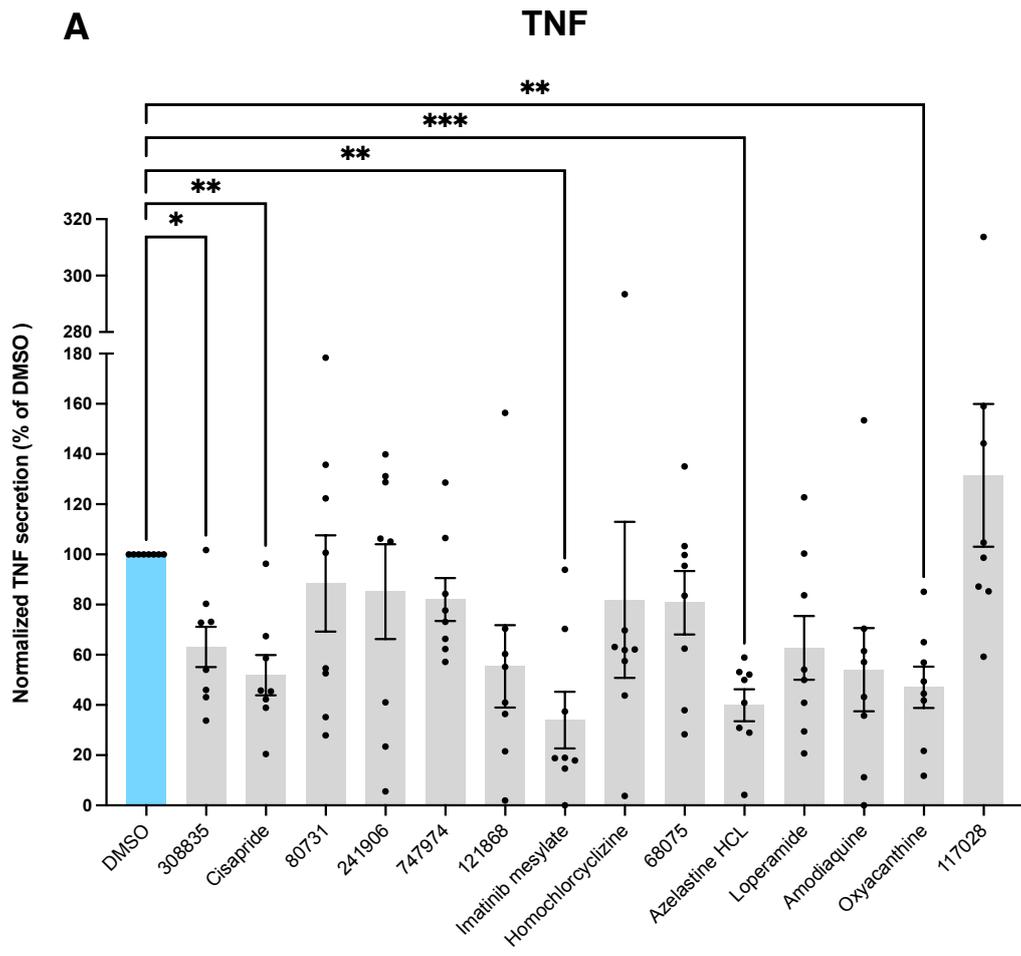
- Li, X., Tupper, J. C., Bannerman, D. D., Winn, R. K., Rhodes, C. J. and Harlan, J. M.** (2003). Phosphoinositide 3 Kinase Mediates Toll-Like Receptor 4-Induced Activation of NF- $\kappa$ B in Endothelial Cells. *Infect Immun* **71**, 4414–4420.
- Low, P. C., Misaki, R., Schroder, K., Stanley, A. C., Sweet, M. J., Teasdale, R. D., Vanhaesebroeck, B., Meunier, F. A., Taguchi, T. and Stow, J. L.** (2010). Phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  regulates membrane fission of Golgi carriers for selective cytokine secretion. *J Cell Biol* **190**, 1053–1065.
- Manderson, A. P., Kay, J. G., Hammond, L. A., Brown, D. L. and Stow, J. L.** (2007). Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF $\alpha$ . *Journal of Cell Biology* **178**, 57–69.
- Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H. and Ueda, N.** (2018). Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents – Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists. *Cytokine* **101**, 56–63.
- Mullin, J. M. and Snock, K. V.** (1990). Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability. *Cancer Res* **50**, 2172–2176.
- Murray, R. Z. and Stow, J. L.** (2014). Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking. *Front. Immunol.* **5**,.
- Nguyen, P. L., Bui, B. P., Duong, M. T. H., Lee, K., Ahn, H.-C. and Cho, J.** (2021). Suppression of LPS-Induced Inflammation and Cell Migration by Azelastine through Inhibition of JNK/NF- $\kappa$ B Pathway in BV2 Microglial Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 9061.
- Parameswaran, N. and Patial, S.** (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukar Gene Expr* **20**, 87–103.
- Pizarro, T. T., Arseneau, K. O., Bamias, G. and Cominelli, F.** (2003). Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 218–222.
- Rampart, M., De Smet, W., Fiers, W. and Herman, A. G.** (1989). Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **169**, 2227–2232.
- Reichardt, P.** (2018). The Story of Imatinib in GIST - a Journey through the Development of a Targeted Therapy. *Oncol Res Treat* **41**, 472–477.
- Revelo, N. H., ter Beest, M. and van den Bogaart, G.** (2019). Membrane trafficking as an active regulator of constitutively secreted cytokines. *Journal of Cell Science* **133**, jcs234781.
- Sandborn, W. J., Rutgeerts, P., Enns, R., Hanauer, S. B., Colombel, J.-F., Panaccione, R., D'Haens, G., Li, J., Rosenfeld, M. R., Kent, J. D., et al.** (2007). Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* **146**, 829–838.
- Sandborn, W. J., Abreu, M. T., D'Haens, G., Colombel, J.-F., Vermeire, S., Mitchev, K., Jamoul, C., Fedorak, R. N., Spehlmann, M. E., Wolf, D. C., et al.** (2010). Certolizumab Pegol in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease and Secondary Failure to Infliximab. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **8**, 688-695.e2.
- Stow, J. L., Manderson, A. P. and Murray, R. Z.** (2006). SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* **6**, 919–929.
- Tian, Y., Pate, C., Andreolotti, A., Wang, L., Tuomanen, E., Boyd, K., Claro, E. and Jackowski, S.** (2008). Cytokine secretion requires phosphatidylcholine synthesis. *Journal of Cell Biology* **181**, 945–957.

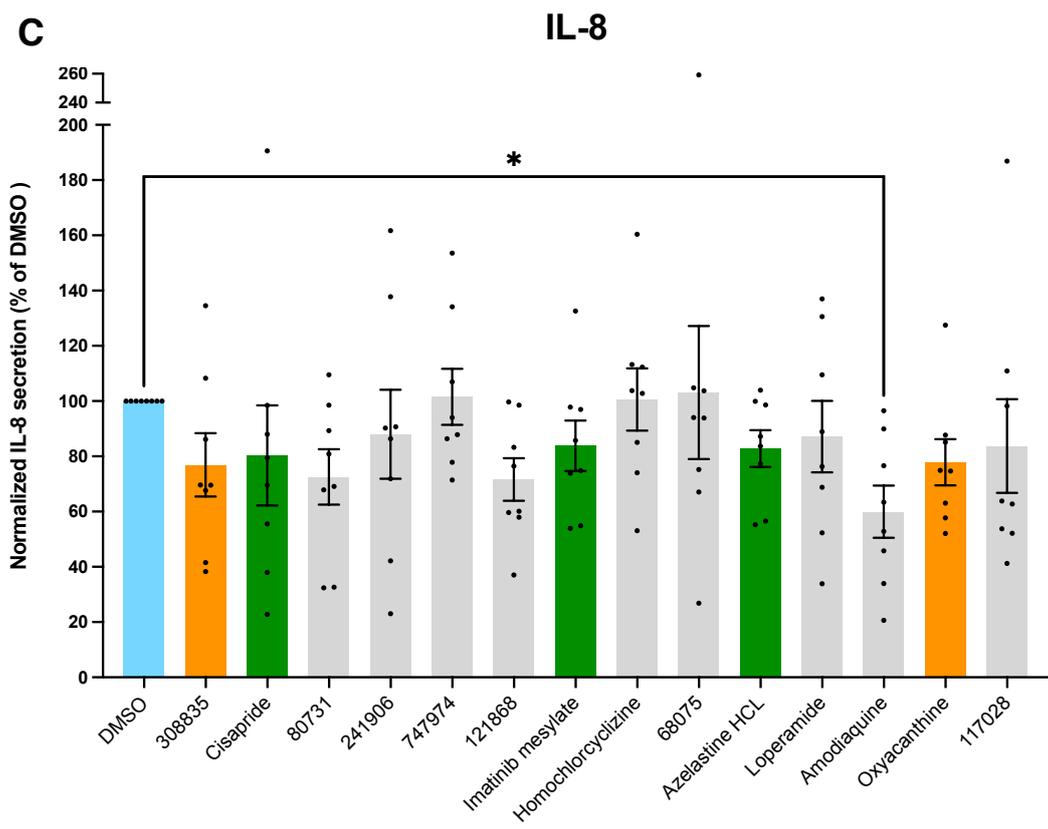
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. and Tak, P. P.** (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* **117**, 244–279.
- Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Ludwiczek, S., Enrich, B., Gastl, G., Weiss, G. and Tilg, H.** (2005). The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF- $\alpha$  production in vitro and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13622–13627.
- Yarur, A. J. and Rubin, D. T.** (2015). Therapeutic Drug Monitoring of Anti-tumor Necrosis Factor Agents in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **21**, 1709–1718.

# Figures

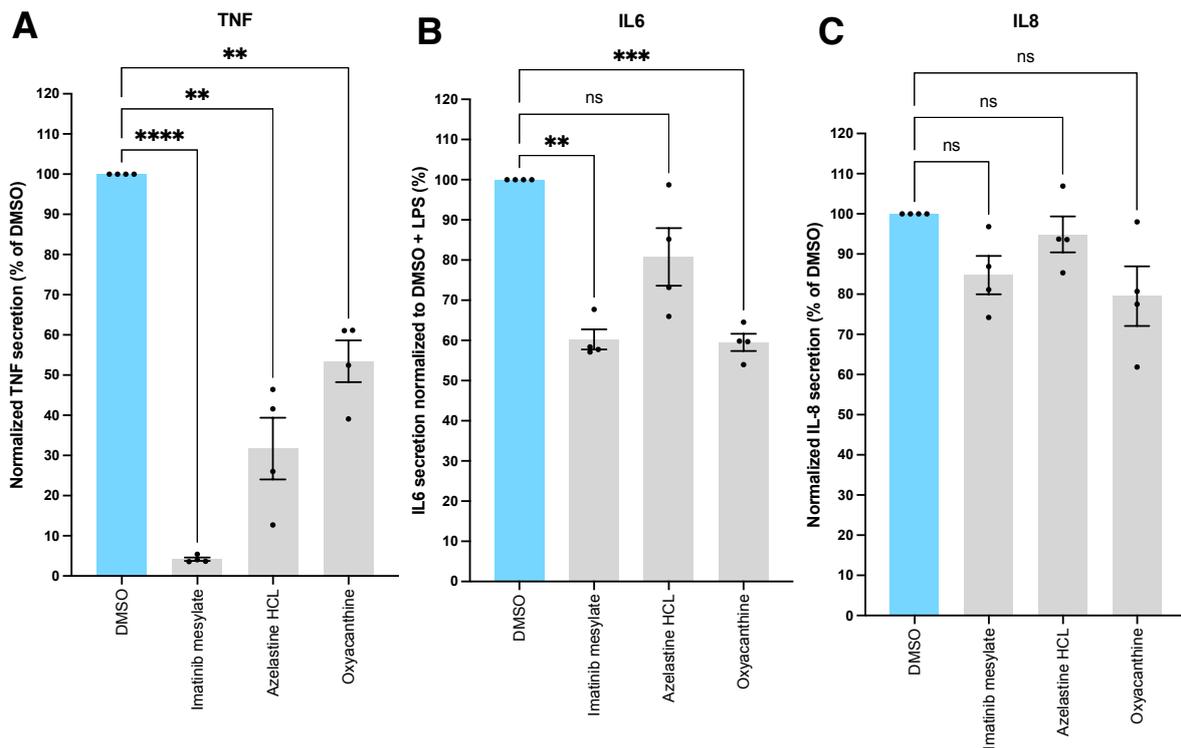


**Figure 1: Twenty-seven molecules inhibit at least 40% of TNF transport and eleven inhibit only TNF.** End-point measurement of the effects of the hit molecules on the TNF trafficking using RUSH assay in HeLa cells expressing STR-KDEL\_TNF-SBP-EGFP **(A,B)**, pA\_CS-KDEL\_SBP-EGFP-GPI **(C)** or pRSFFV-Str-KDEL\_PGK-IL6-SBP-EGFP **(D)**. Cells were pretreated for 1.5 hours with molecules at 10  $\mu$ M then trafficking was induced by addition of biotin (40  $\mu$ M). TNF and GPI present at the cell surface 45 min after release from the ER was measured by flow cytometry using an anti-GFP Alexa 647 antibody. IL-6 secretion was measured by the decrease of GFP signal. Each hit was normalized to DMSO condition. Molecules inhibiting only TNF are highlighted in green and those inhibiting TNF and IL6 are in orange. The number of molecules corresponds to their NSC number. The mean  $\pm$  SEM of three or six experiments is shown.

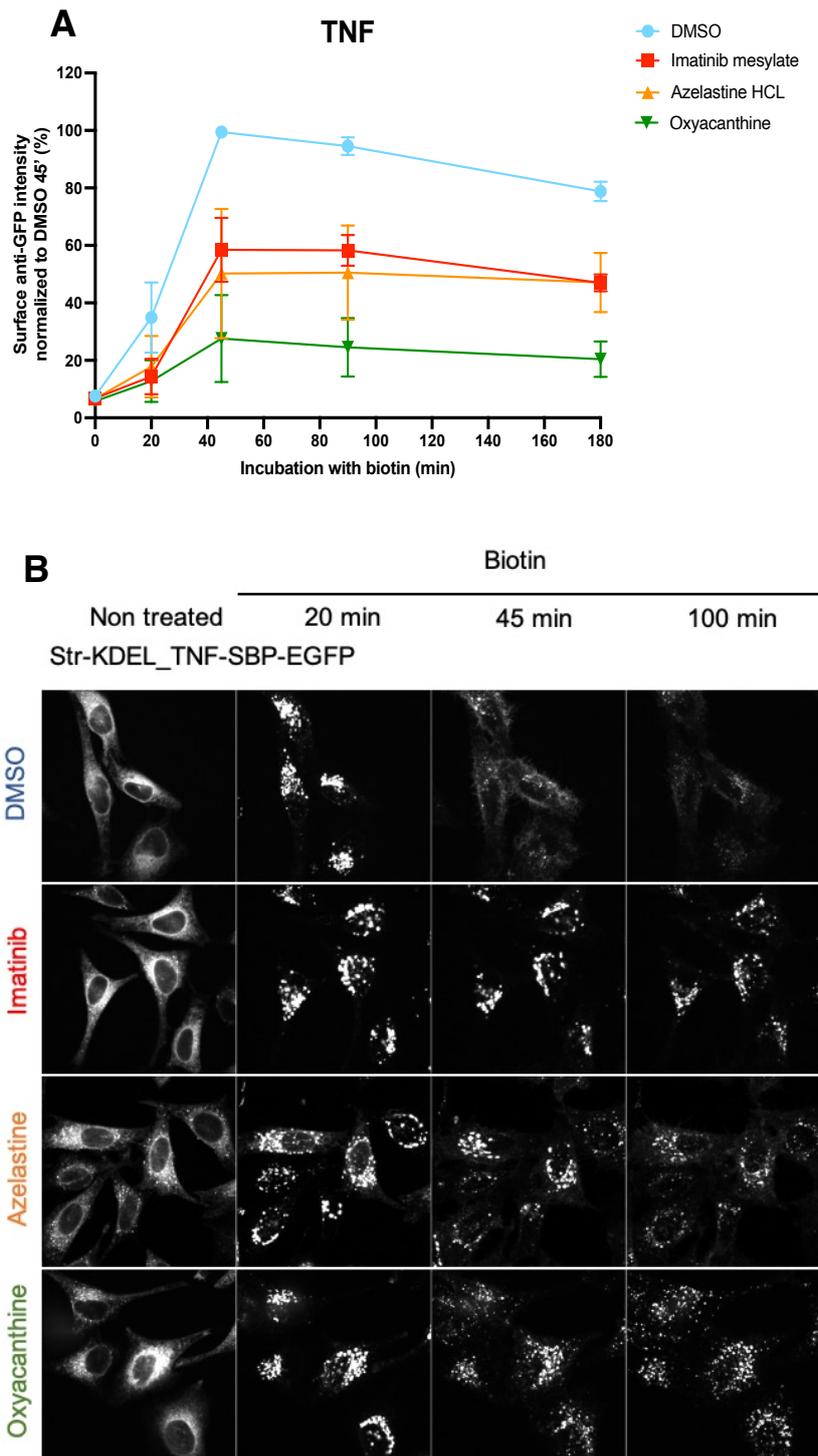




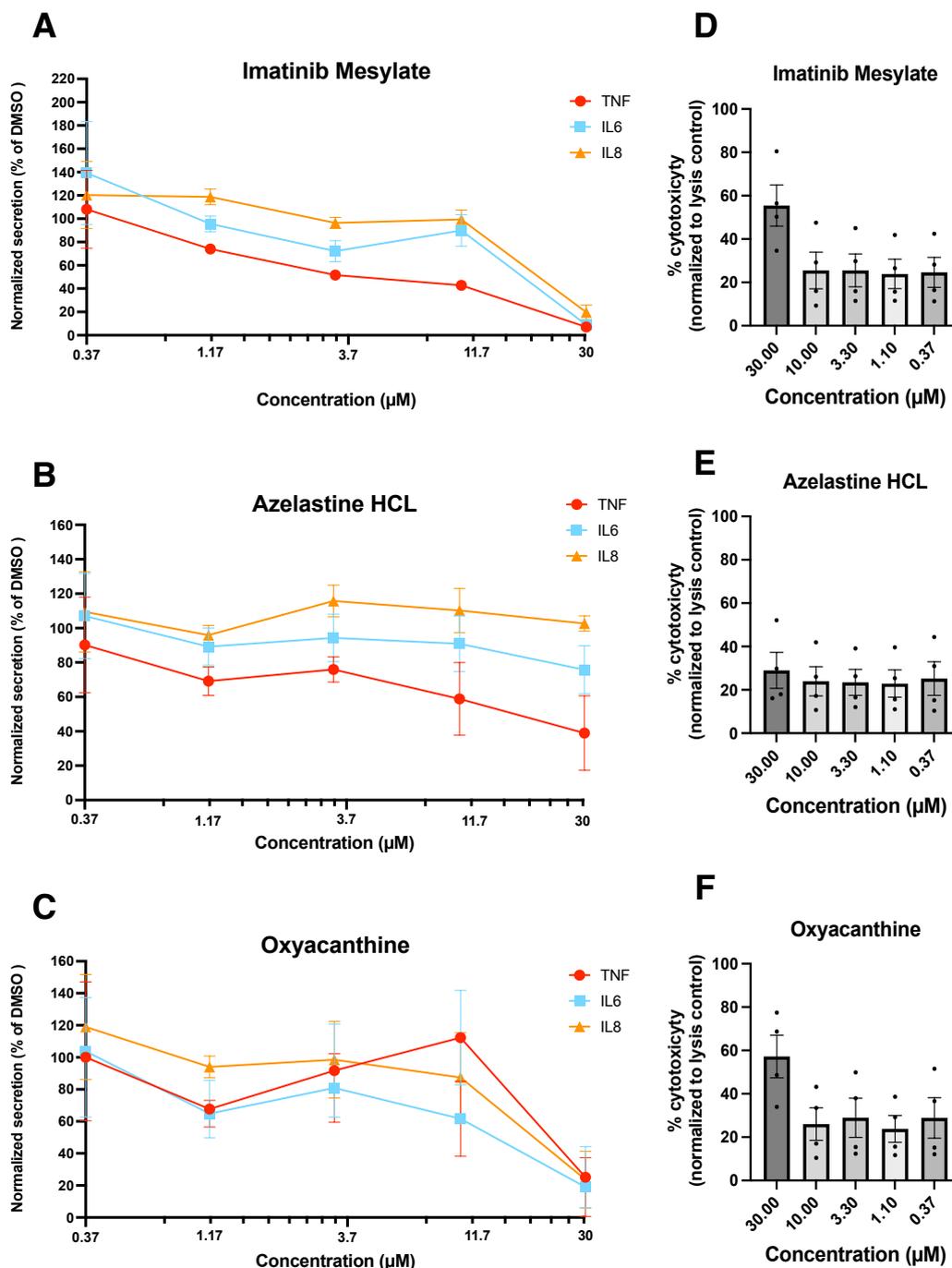
**Figure 2: Molecules inhibit specifically TNF secretion by Human primary monocyte-derived macrophages (hMDMs).** End-point measurement (16h) of the effects of the 14 hit molecules on TNF (A) IL-6 (B) and IL-8 (C) secretion in the supernatant. Primary human monocytes were differentiated into macrophages during 6 days with rhM-CSF. Cells were pretreated for 1.5 hours with molecules at 10  $\mu$ M then 16 hours with LPS (100 nM). Cytokines secretion in the supernatant was measured by cytometric beads array. Each hit was normalized to DMSO condition. A one-way ANOVA was performed to compare the effect of molecules on DMSO condition. The mean  $\pm$  SEM of eight donors is shown.



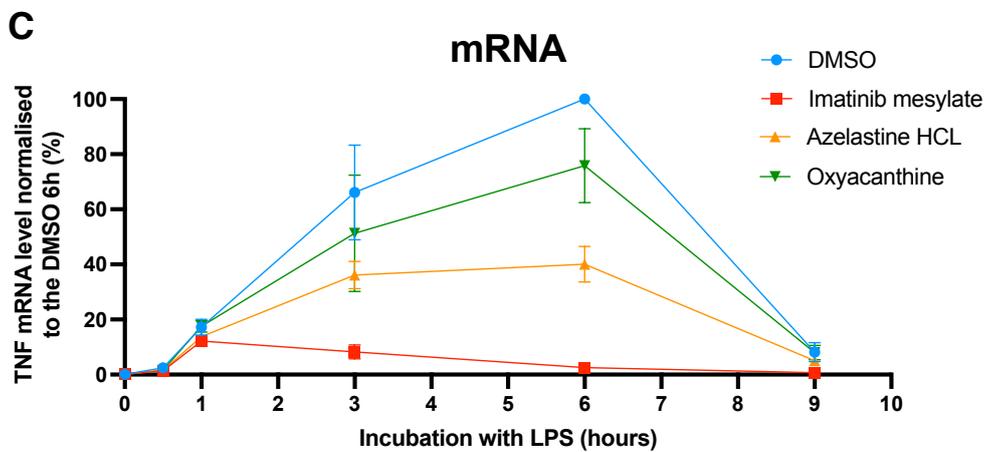
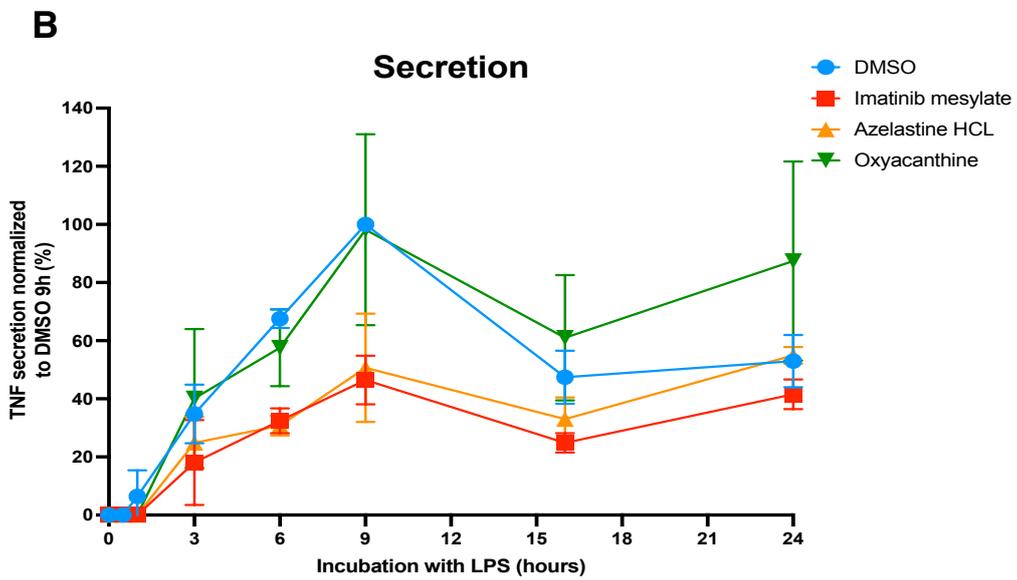
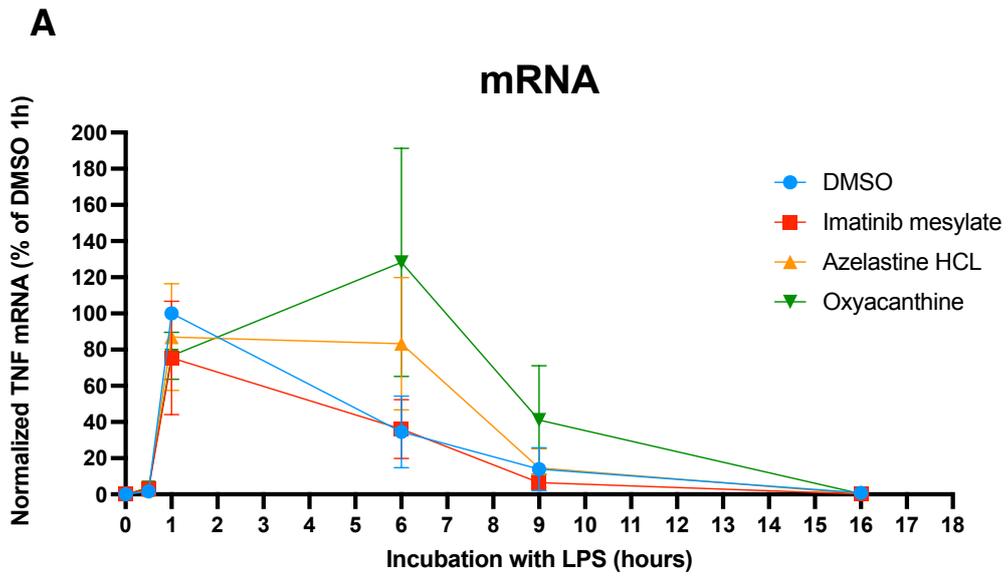
**Figure 3: Three different molecules decrease pro-inflammatory cytokines secretion in human primary monocytes.** End-point measurement (16h) of the effects of the three molecules on pro-inflammatory cytokines TNF (A), IL-6 (B) and IL-8 (C) secretion in the supernatant. Primary human monocytes were isolated from PBMCs by negative selection. Cells were pretreated for 1.5 hours with molecules at 10  $\mu$ M. Cytokines secreted in the supernatant 16 hours after LPS stimulation (100 nM) was measured by cytometric beads array. Each hit was normalized to DMSO condition. A one-way ANOVA was performed to compare the effect of molecules on DMSO condition. The mean  $\pm$  SEM of eight donors is shown.

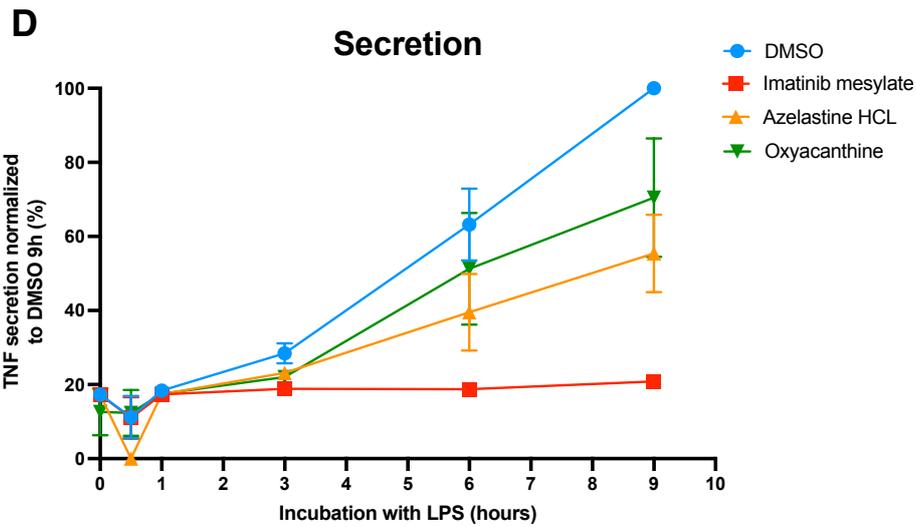


**Figure 4: Kinetic of TNF secretion incubated with three molecules selected in HeLa cells using RUSH assay.** Trafficking was induced by addition of biotin ( $40 \mu\text{M}$ ) in HeLa cells expressing Str-KDEL\_TNF-SBP-EGFP. Cells were pretreated for 1.5 hours with Imatinib, Azelastine and Oxyacanthine at  $10 \mu\text{M}$ . **(A)** Surface expression of TNF was measured by flow cytometry using an anti-GFP antibody and normalized to DMSO at 45' condition. The mean  $\pm$  SEM of three experiments is shown. **(B)** Real time TNF secretion observe by spinning disk confocal microscope at 5-, 20-, 45- and 100-min incubation with biotin.



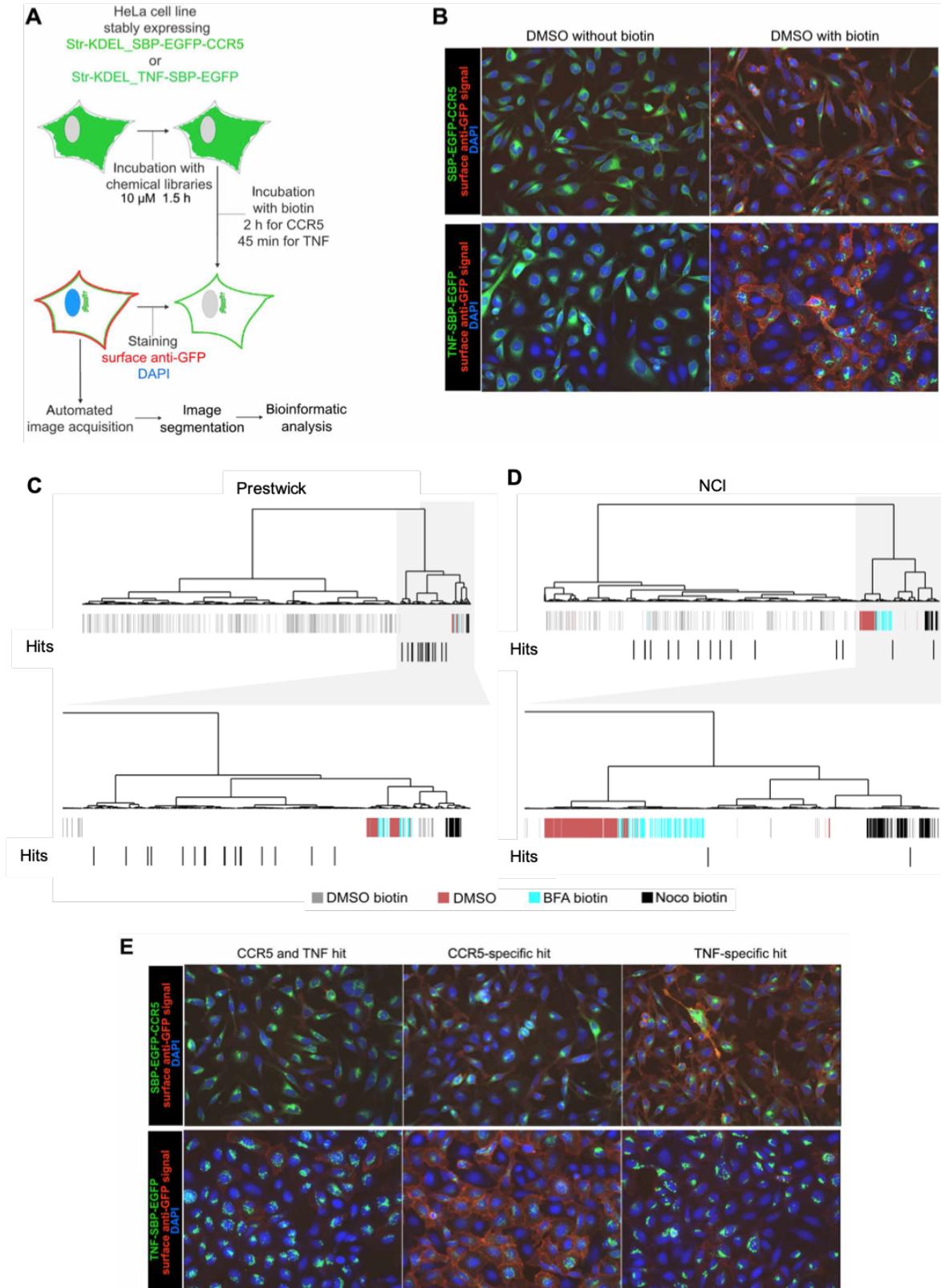
**Figure 5: Dose-response and cytotoxicity of molecules in Human primary monocyte-derived macrophages (hMDMs).** Primary human monocytes were differentiated into macrophages during 6 days with rhM-CSF. Cells were pretreated for 1.5 hours with Imatinib, Azelastine, or Oxyacanthine at different concentration then 16 hours with LPS (100 nM). Cytokines secretion in the supernatant was measured by CBA (**A**, **B**, **C**) and cytotoxicity was evaluated by measuring LDH release in the supernatant (**D**, **E**, **F**). Each hit was normalized to DMSO condition. The mean  $\pm$  SEM of three or four donors is shown.



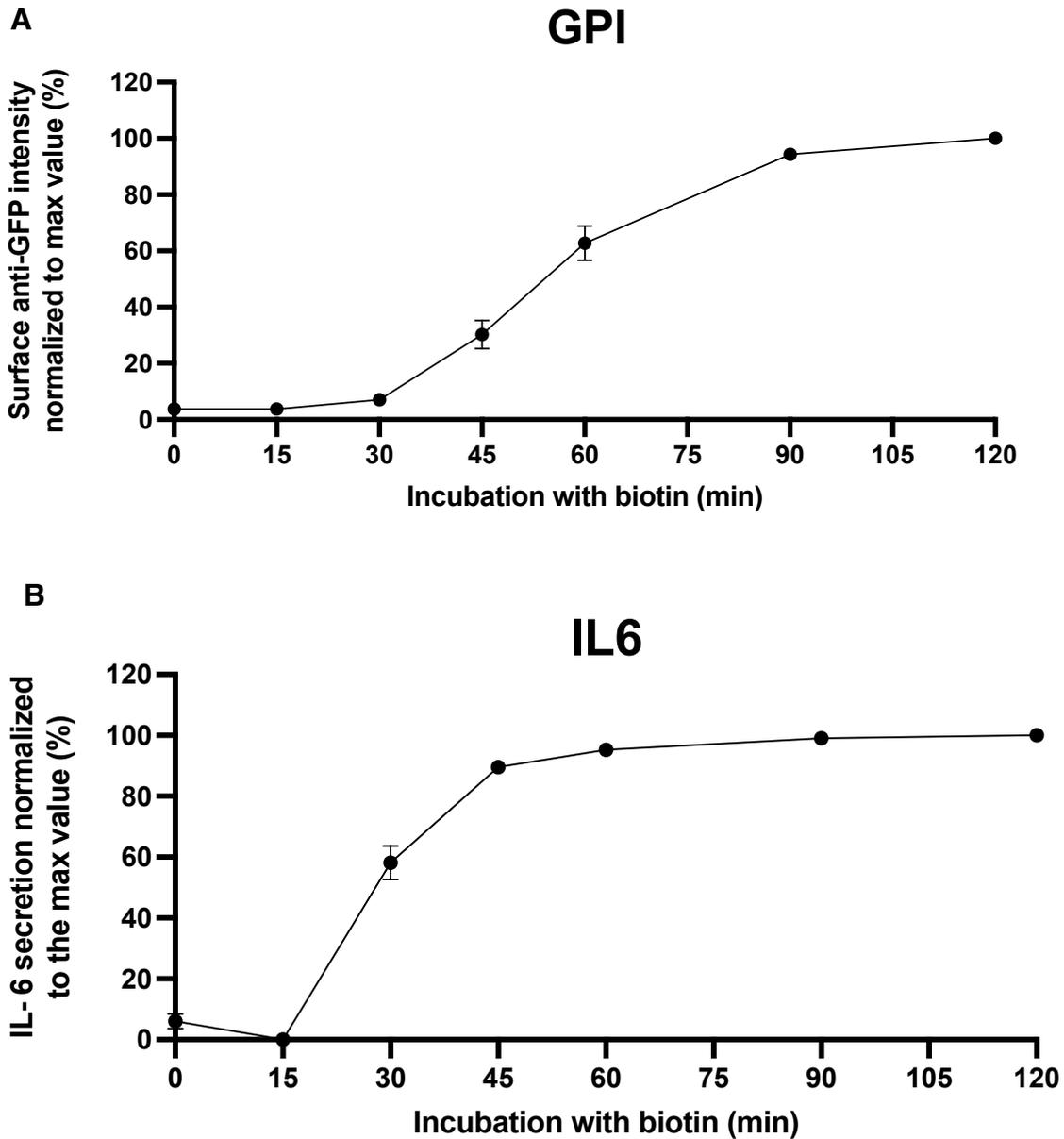


**Figure 6: Kinetic of TNF expression and secretion incubated with three different molecules in Human primary cells.** Primary human monocytes were isolated from PBMCs by negative selection and then differentiated into macrophages during 6 days with rhM-CSF. Macrophages (**A,B**) or monocytes (**C,D**) were pretreated for 1.5 hours with molecules at 10  $\mu$ M. Expression and secretion of was induced by addition of LPS (100 nM) at time 0. (**A,C**) Relative TNF mRNA was measured by quantitative RT-PCR and normalized to GAPDH levels. Data are expressed relative to mRNA levels found in DMSO 1 hour condition. The mean  $\pm$  SEM of three donors is shown. (**B,D**) TNF secreted in the supernatant was measured by cytometric beads array. Each condition was normalized to max DMSO condition. The mean  $\pm$  SEM of two or three donors is shown.

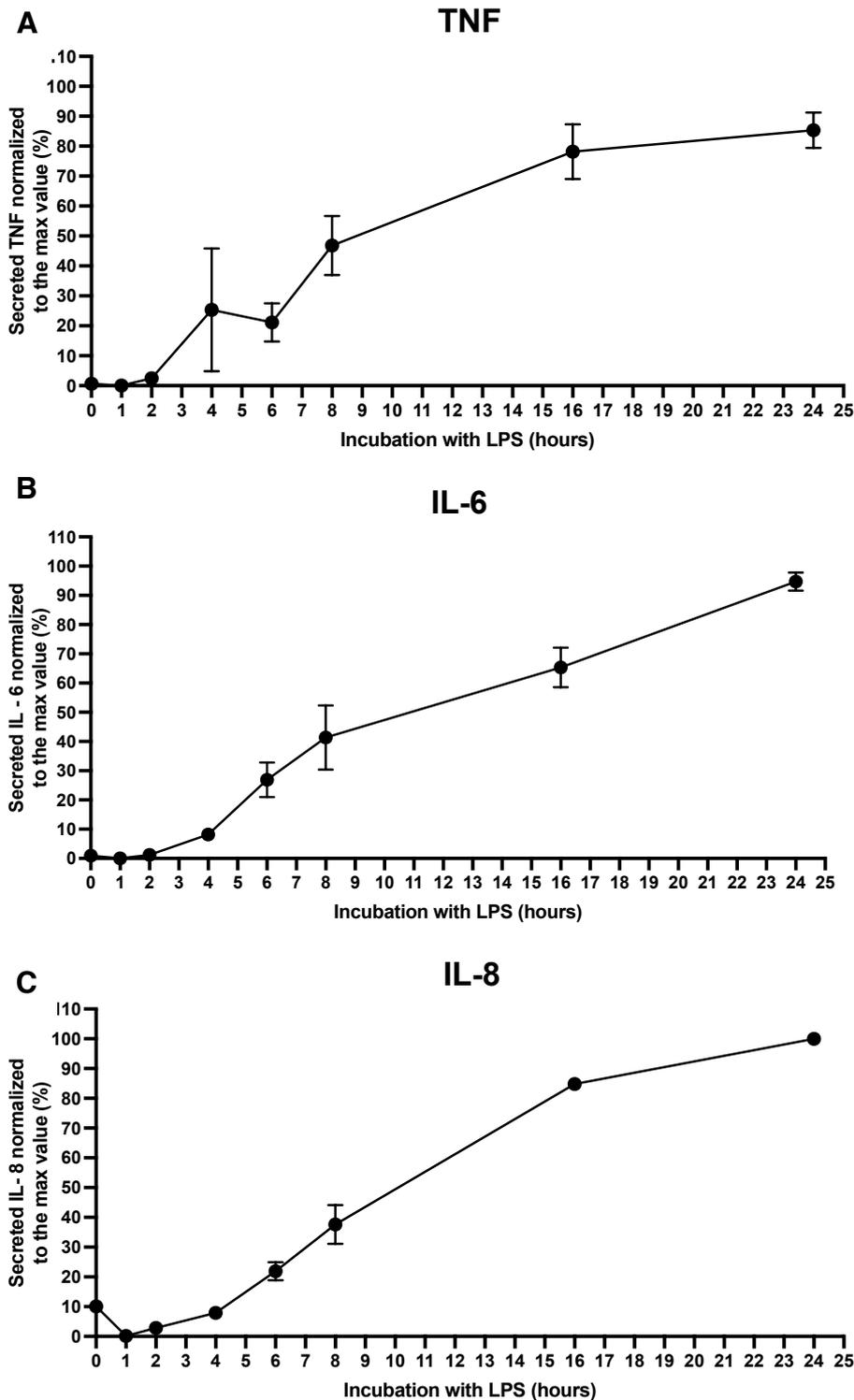
# Supplementary data



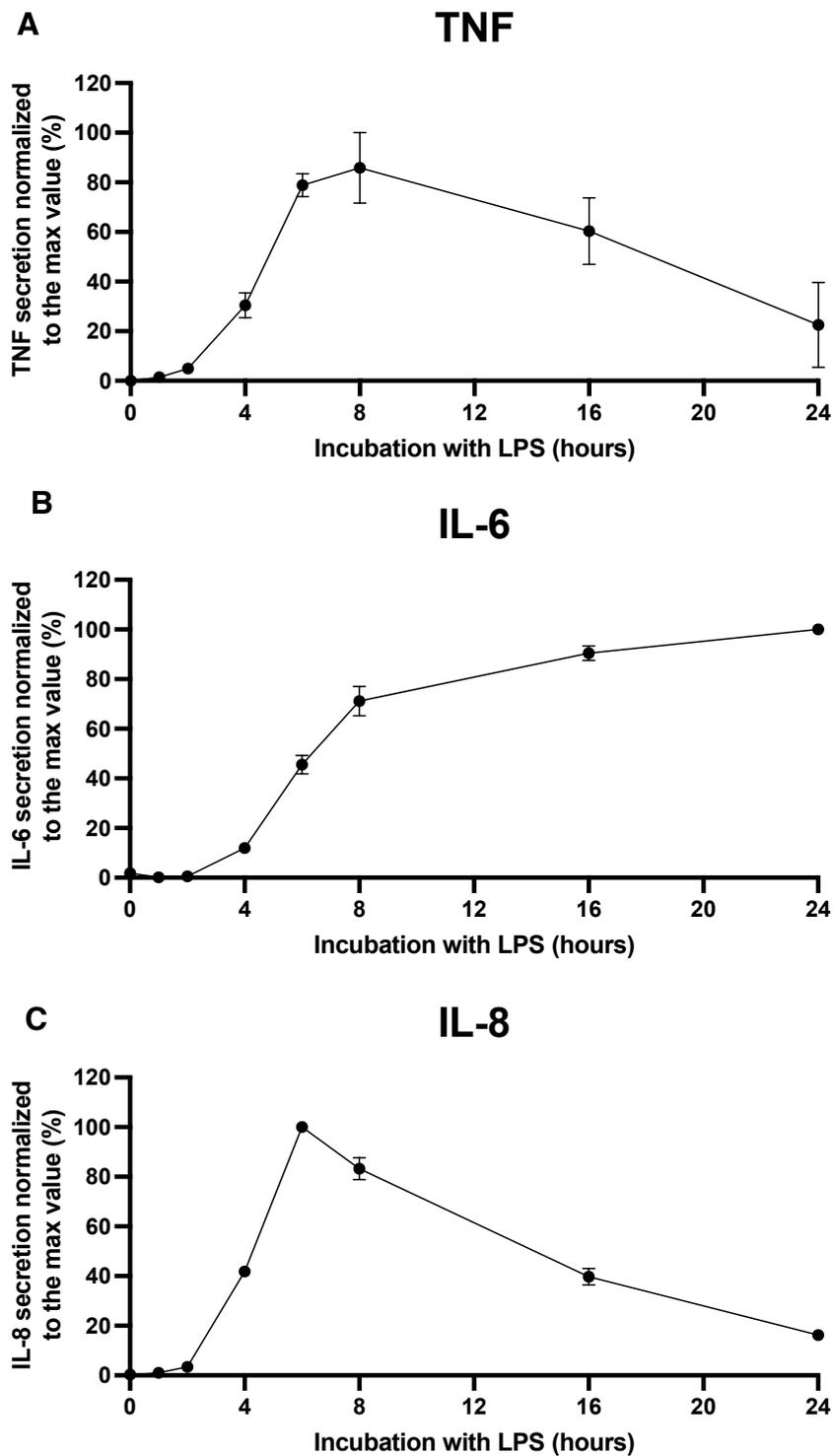
**Supplementary data 1: Identification of molecules inhibiting TNF transport by high-content differential screening.** (A) Outline of the chemical screening strategy. (B) Micrographs from screening plates showing controls. DMSO without biotin and DMSO with biotin correspond to the conditions where no transport and normal transport occurred, respectively. HeLa cells stably expressing Str-KDEL\_SBP-EGFP-CCR5 and Str-KDEL\_TNF-SBP-EGFP are displayed in the top and bottom panels, respectively. Cargo at the plasma membrane was detected using anti-GFP antibodies on non-permeabilized cells. (C and D) Clustering of molecules obtained after bioinformatics analysis of the Prestwick (C) and NCI (D) chemical library screening of TNF secretion. Below the dendrogram, each bar corresponds to a well of the plate. Molecules identified as hits were shifted one lane below for better visualization. BFA, brefeldin A; Noco, nocodazole. (E) Micrographs showing the three classes of hits detected. CCR5 and TNF hit corresponds to a molecule affecting transport of both CCR5 and TNF. CCR5-specific hit or TNF-specific hit corresponds to a molecule inhibiting only CCR5 or only TNF transport. HeLa cells stably expressing Str-KDEL\_SBP-EGFP-CCR5 and Str-KDEL\_TNF-SBP-EGFP are displayed in the top and bottom panels, respectively. Cargo at the plasma membrane was detected using anti-GFP antibodies on nonpermeabilized cells. **Fig Supp 1 A, B and E are from (Boncompain et al., 2019)**



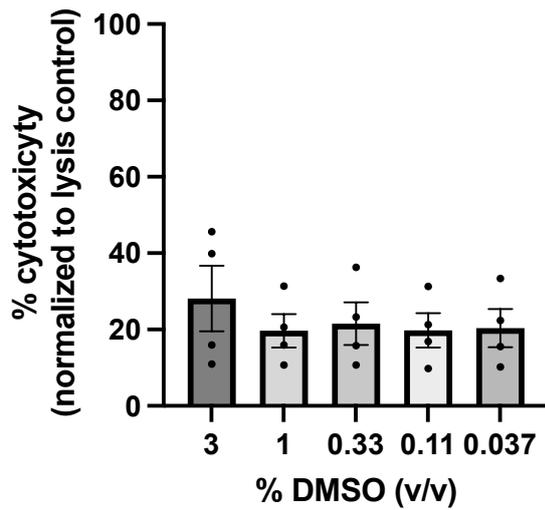
**Supplementary data 2: Kinetics of synchronized transport of two cargos using the RUSH assay in HeLa cells.** Trafficking was induced by addition of biotin (40  $\mu$ M) at time 0. Surface expression of GPI (A) was measured by flow cytometry using an anti-GFP antibody and normalized to the maximum value. Secretion of IL-6 (B) was measured by flow cytometry using intra-cellular GFP decrease. The mean  $\pm$  SEM of three experiments is shown.



**Supplementary data 3: Kinetics of secretion of three cytokines stimulated by LPS in Human primary monocyte-derived macrophages (hMDMs).** Primary human monocytes were differentiated into macrophages during 6 days with rhM-CSF. Trafficking was induced by addition of LPS (100 nM) at time 0. TNF (A), IL-6 (B), IL-8 (C) secretion in the supernatant was measured by cytometric beads array. The mean  $\pm$  SEM of four donors is shown.



**Supplementary data 4: Kinetics of secretion of three cytokines stimulated by LPS in human primary monocytes.** Trafficking was induced by addition of LPS (100 nM) at time 0. TNF (A), IL-6 (B), IL-8 (C) secretion in the supernatant was measured by cytometric beads array in human primary monocytes isolated from PBMCs by negative selection. The mean  $\pm$  SEM of four donors is shown.



**Supplementary data 5: Induced cytotoxicity by DMSO in Human primary monocyte-derived macrophages (hMDMs).** Primary human monocytes were differentiated into macrophages during 6 days with rhM-CSF. Cells were pretreated for 1.5 hours with DMSO at different volume, then 16 hours with LPS (100 nM). Cytotoxicity was evaluated by measuring LDH release in the supernatant.

# Discussion

## 1.6. Le rôle d'IL-6 dans les maladies inflammatoires chroniques

L'IL-6 et le TNF sont tous deux des médiateurs importants de la réponse immunitaire et sont tous deux produits par diverses cellules, notamment les macrophages, les lymphocytes T et les cellules endothéliales. Il a été démontré que leurs fonctions dans la réponse immunitaire peuvent être distinctes mais se chevauchent également.

L'IL-6 joue un rôle essentiel dans la réponse de la phase aiguë à l'infection et aux blessures, en favorisant la production de protéines de la phase aiguë et en régulant la croissance et la différenciation de divers types de cellules. Le TNF, quant à lui, joue un rôle clé dans l'induction de l'inflammation et l'induction directe de l'apoptose dans divers types de cellules.

Cependant les deux cytokines ont également des fonctions communes. En effet, la synthèse transitoire d'IL-6 et de TNF contribue à la défense de l'hôte contre les agents infectieux en induisant des réponses immunitaires. De plus, tout comme pour TNF, la production persistante et incontrôlée d'IL-6 peut conduire au développement d'une variété de maladies à médiation immunitaire. De même que TNF, IL-6 est impliquée dans des maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis. En effet, un niveau élevé d'IL-6 a été observé dans les fluides synoviaux chez les patients atteints de ces maladies (Hirano et al., 1988; Houssiau et al., 1988). Le tocilizumab, un anticorps humanisé anti-récepteur de l'IL-6, s'est révélé efficace et tolérable dans plusieurs essais cliniques ; à la fois en monothérapie ou en association avec d'autres médicaments (Jones, 2010; Jones and Ding, 2010; Scott, 2017). Cela démontre que la cytokine IL-6 joue également un rôle clé dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis.

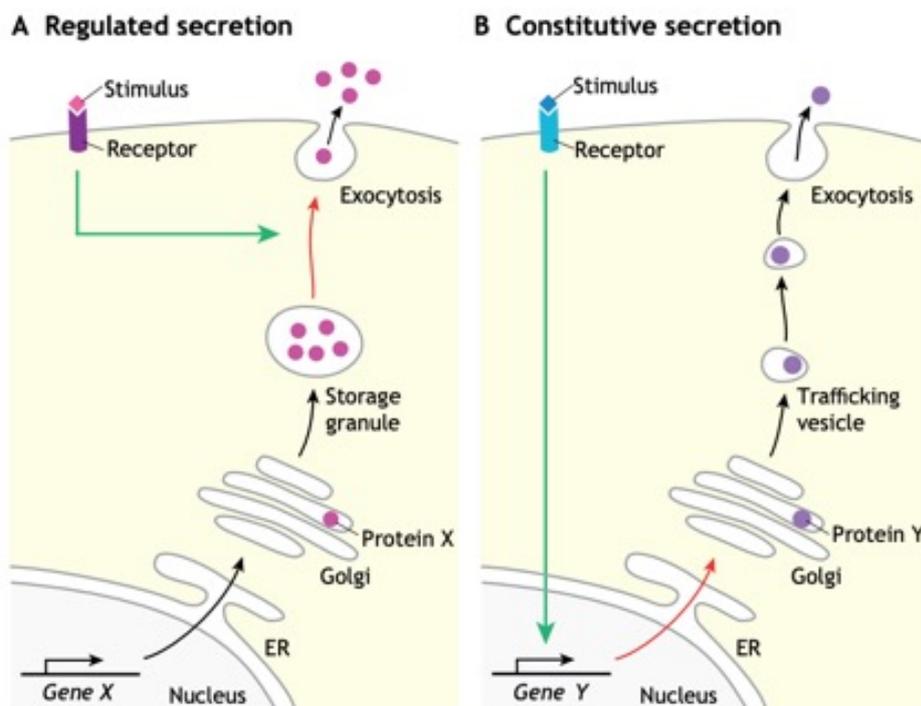
En conclusion, l'IL-6 et le TNF sont deux importantes cytokines pro-inflammatoires qui peuvent être impliquées dans la pathogenèse de maladies chroniques inflammatoires.

Ces cytokines sont donc des cibles essentielles pour le développement de nouvelles thérapies pour ces maladies. C'est pourquoi, il est également intéressant de sélectionner les molécules inhibant à la fois TNF et IL-6.

### 1.6.1. Les mécanismes communs au transport intracellulaire de TNF et d'IL-6

Nous supposons que si certaines molécules peuvent inhiber à la fois IL-6 et TNF ou seulement TNF (en modèle hétérologue) cela est dû au fait que les cibles cellulaires des molécules sont différentes.

L'hypothèse est que les molécules inhibant les deux cytokines ciblent une partie de la voie de sécrétion qui est commune à TNF et IL-6. En effet, les deux cytokines sont sécrétées de manière constitutive (figure 21) mais peuvent être régulées positivement ou négativement.



**Figure 21 : Sécrétion régulée versus constitutive.** (A) Sécrétion régulée. Les protéines s'accumulent dans des granules de stockage post-golgiennes. À l'arrivée d'un stimulus, ces granules de stockage fusionnent avec la membrane plasmique, ce qui

entraîne une exocytose. (B) Sécrétion constitutive. Un stimulus augmente la transcription et/ou la traduction d'un facteur qui est continuellement sécrété (Revelo et al., 2019).

De nombreuses machineries impliquées dans le trafic intracellulaire de TNF sont également impliquées dans la sécrétion d'IL-6 (figure 22) (Murray and Stow, 2014).

De plus, des recherches ont montré que l'IL-6 et le TNF sont tous deux sécrétés vers la membrane plasmique par un processus qui implique les endosomes de recyclage et la protéine SNARE VAMP3 (Revelo et al., 2019; Stow et al., 2006). Les endosomes de recyclage sont des vésicules spécialisées qui recyclent les protéines membranaires et les lipides internalisés. VAMP3 joue un rôle essentiel dans la fusion des vésicules avec la membrane plasmique. D'autres machineries du trafic intracellulaire sont impliquées dans la régulation de la sécrétion d'IL-6 et de TNF (Murray and Stow, 2014) telles que SCAMP5 (Secretory carrier-associated membrane protein 5). En effet, SCAMP5 est impliqué dans la régulation de la sécrétion de cytokines contenant un signal (tel que TNF et IL-6) en réponse aux agonistes TLR (Han et al., 2009). C'est également le cas de la Synaptotagmin XI (Syt XI). Les synaptotagmines (Syts) sont des protéines membranaires de type I qui régulent la réception et la fusion des vésicules dans des processus tels que l'exocytose et la phagocytose. La Syt XI a un effet direct sur la phagocytose et sur la sécrétion de TNF et IL-6 (Arango Duque et al., 2013). C'est également le cas de l'enzyme Choline cytidyltransferase alpha (CCT  $\alpha$ ) qui est impliquée dans la biosynthèse de la phosphatidylcholine. La synthèse de phosphatidylcholine médiée par CCT $\alpha$  est nécessaire pour maintenir une structure et une fonction normale du Golgi ainsi que la sécrétion de cytokines tel que TNF et IL-6 à partir de l'appareil de Golgi (Tian et al., 2008).

Protein	TNF	IL-6	IL-10	Reference
iRhom2	+	NA	NA	(19)
p230	+	+	+	(14)
Golgin-97	-	-	+	(13)
CCT $\alpha$	+	+	ND	(20)
PI3K p110 $\delta$	+	ND	-	(23)
Dynamin 2	+	ND	ND	(23)
Stx4	+	ND	+	(22)
Stx6	+	+	+	(12)
Vti1b	+	+	+	(12)
VAMP3	+	+	+	(11)
SNAP23	+	ND	+	(22)
SCAMP5	+	+	ND	(21)
Rab6	+	ND	ND	(15)
Rab11	+	ND	+	(11)
Rab37	+	ND	ND	(16)
Munc13-1	+	ND	ND	(16)
AP-1	+	ND	ND	(24)
Syt XI	+	+	ND	(25)
PKA	ND	ND	+	(13)
Rac1	+	ND	ND	(26)
CDC42	+	ND	ND	(26)

*NA, not applicable; ND, not determined.*

**Figure 22 : Protéines régulant la sécrétion de cytokines dans les macrophages (Murray and Stow, 2014)**

### 1.6.2. Les mécanismes différents au transport intracellulaire de TNF et d'IL-6

Cependant, toute la voie de sécrétion n'est pas commune à TNF et IL-6. L'endosome de recyclage dans les macrophages sert aux processus d'endocytose et d'exocytose, entraînant le transport de TNF à la surface cellulaire, aux sites de formation de la coupe phagocytaire (Murray et al., 2005b). L'IL-6 nouvellement synthétisée s'accumule dans

l'appareil de Golgi et sort dans des transporteurs tubulovésiculaires, soit seule, soit en présence de TNF. La sortie de l'appareil de Golgi de ces cargos se fait grâce à des protéines SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) spécifiques qui permettent de fusionner avec les endosomes de recyclage. À l'intérieur des endosomes de recyclage, une compartimentation des protéines a été observée. L'IL-6 est séparée du TNF. Par la suite, ces cytokines sont sécrétées indépendamment, le TNF étant délivré aux coupes phagocytaires mais pas l'IL-6 (Manderson et al., 2007). Les molécules inhibant seulement TNF chez les cellules HeLa peuvent donc toucher des cibles cellulaires aux dernières étapes de la sécrétion de TNF.

Puisque le criblage différentiel n'a permis de sélectionner que les molécules inhibant TNF, nous ne pouvons rien affirmer quant à des molécules inhibant uniquement la sécrétion d'IL-6. Cependant notre équipe réalise actuellement un criblage à haut contenu, similaire à celui réalisé sur TNF. Son but étant d'identifier des molécules inhibant spécifiquement la sécrétion d'IL-6 pour lutter contre les tempêtes cytokiniques qui ont lieu lors de l'infection par SRAS-CoV-2 ou lors des traitements par immunothérapie (Copaescu et al., 2020).

## 1.7. Cibles cellulaires des molécules inhibant TNF chez les macrophages et monocytes primaires humains

L'Imatinib, l'Azélastine, l'Oxycanthine, la Cisapride et NSC308835 sont les cinq molécules inhibant la sécrétion de TNF en modèles physiologiques.

### 1.7.1. L'Imatinib

L'Imatinib, commercialisé sous les noms de marque Gleevec et Glivec (vendus dans le monde entier par Novartis), est un médicament oral de thérapie ciblée utilisé dans

le traitement du cancer (Iqbal and Iqbal, 2014). L'Imatinib est une petite molécule qui inhibe plusieurs récepteurs tyrosine kinase tels que CSF1R, ABL, c-KIT, FLT3 et PDGFR- $\beta$ .

L'Imatinib est indiqué pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC)(Claudiani and Apperley, 2018) , de la leucémie lymphocytaire aiguë (LLA) à chromosome Philadelphie positif (Ph+) (Abou Dalle et al., 2019), de certains types de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) (Reichardt, 2018), du syndrome hyperéosinophilique (SEH) (Pardanani and Tefferi, 2004), de la leucémie éosinophilique chronique (LEC) (Arai et al., 2007), de la mastocytose systémique (Yamada and Cancelas, 2010) et du syndrome myélodysplasique (Kovitz et al., 2006). Cette drogue a été découverte par Nicholas Lyndon, chercheur à Ciba-Geigy (maintenant Novartis) et a été approuvée par la FDA en 2001. Elle a été découverte dans un premier temps pour lutter contre la leucémie myéloïde chronique (LMC).

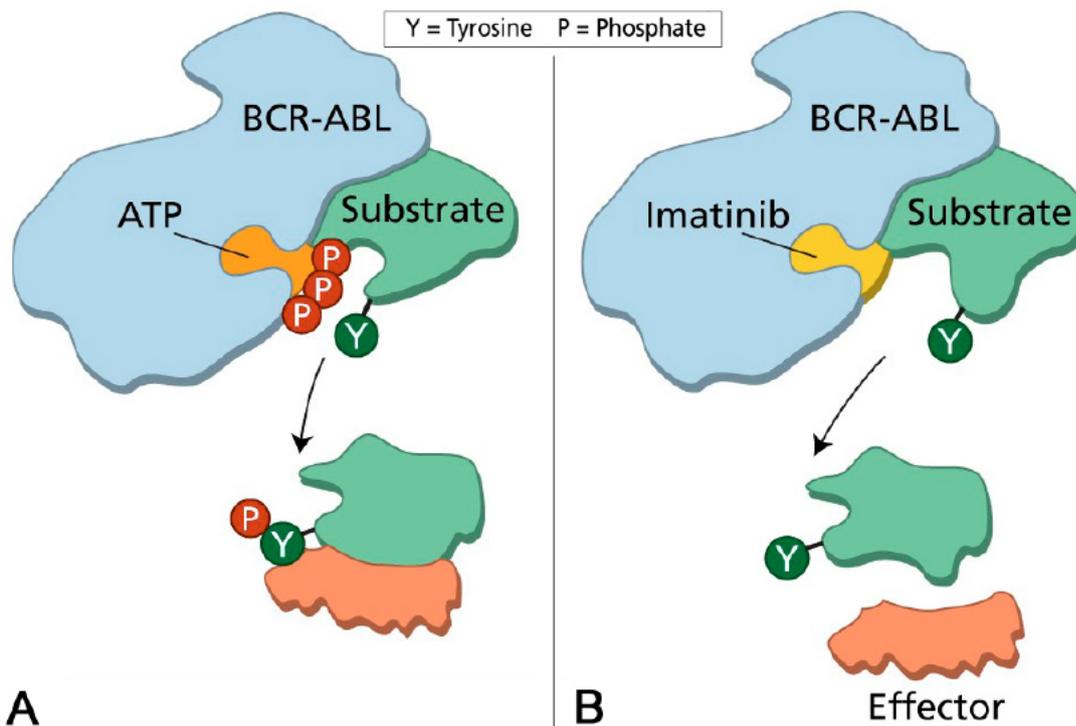
La présence de la mutation BCR-ABL chez tous les patients atteints de LMC et son activité kinase en font une cible particulièrement attrayante pour la conception d'un inhibiteur sélectif de cette kinase.

Comme pour de nombreux inhibiteurs, un premier composé principal a été identifié par criblages aléatoires : plusieurs banques de molécules ont été testées in vitro pour l'inhibition de protéines kinases. Le premier composé principal a été par la suite optimisé : de nombreux composés chimiques apparentés ont été synthétisés et une analyse entre la structure et leur activité a permis de sélectionner le composé le plus « puissant » : STI 571 (l'Imatinib) (Druker and Lydon, 2000; Zimmermann et al., 1996). Les sites actifs des tyrosine kinases possèdent chacun un site de liaison pour l'ATP grâce auquel la phosphorylation du substrat a lieu. L'Imatinib agit en se liant étroitement au site de liaison à l'ATP de BCR-ABL, le verrouillant dans une conformation fermée ou auto-inhibée, et inhibant ainsi l'activité enzymatique de la protéine de manière semi-compétitive (figure 23) (Mughal and Goldman, 2006).

Les cibles de ces molécules sont les suivantes (Iqbal and Iqbal, 2014) :

- BCR-ABL : Il s'agit d'un oncogène résultant de la fusion entre le gène de la tyrosine kinase Abelson (Abl) et le gène break point cluster (Bcr). Cette protéine est la cible principale de l'Imatinib et elle est responsable de la LMC et de la leucémie lymphoblastique aiguë à chromosome Philadelphie positif (Ph+ALL).

- c-Kit : Cette tyrosine kinase joue un rôle dans le développement et la progression de certains types de cancer, dont les GIST (de Silva and Reid, 2003).
- PDGFR (Platelet-derived growth factor receptors) : Ce récepteur de tyrosine kinase joue un rôle dans le développement et la progression de certains types de cancers, notamment les GIST et les LMC
- c-Fms : Ce récepteur de tyrosine kinase est spécifiquement exprimé dans les ostéoclastes et les cellules de la lignée myélomonocytaire, comme les monocytes et les macrophages, et l'activation de la signalisation du c-FMS favorise la prolifération ou la différenciation de ces cellules. C-Fms est impliqué dans le cancer du sein et de l'ovaire mais également dans les maladies inflammatoires telle que la polyarthrite rhumatoïde (Dewar et al., 2005). Il pourrait être intéressant d'inhiber cette cible (soit par siRNA ou en utilisant un autre inhibiteur de c-Fms) afin de voir si la sécrétion de TNF est impactée.



**Figure 23 : Mécanisme d'action de l'Imatinib** (Mughal and Goldman, 2006)

Il est intéressant de noter que la Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) abolit le trafic et la sécrétion du TNF, en piégeant le TNF dans les transporteurs tubulaires au niveau du

réseau transgolgien (TGN) (Low et al., 2010). Puisque l'Imatinib inhibe un grand nombre de kinases, on pourrait supposer que PI3K est une nouvelle cible de l'Imatinib. L'une des questions à approfondir est l'identification de la cible de l'Imatinib, responsable de l'inhibition du transport du TNF. En effet, le mécanisme d'action de l'Imatinib régulant le TNF peut être médié par l'une des cibles connues de l'Imatinib mais il est également possible que l'inhibition du TNF soit due à une cible inconnue/secondaire de l'Imatinib.

En effet, des études ont montré que l'Imatinib pourrait avoir une efficacité considérable contre la polyarthrite rhumatoïde (Eklund and Joensuu, 2003; Pereira et al., 2010) et que la cible cellulaire pourrait être le récepteur c-Kit. Une autre étude montre que l'Imatinib augmente la synthèse de la prostaglandine E2 (PGE2), ce qui permet l'activation du récepteur EP4 et inhibe ainsi l'activation de NF-κB et la libération de cytokines (Park et al., 2006).

Pour ces raisons, il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération tels que le Dasatinib et le Nilotinib (inhibiteur de BCR-ABL (Hořínková et al., 2019 ; Plosker et Robinson, 2008)) pour essayer d'inhiber la sécrétion de TNF. Ces deux molécules font partie de la bibliothèque du NCI mais n'ont pas été identifiées comme des hits lors du criblage à haut contenu. Il existe également d'autres inhibiteurs tels que le malate de sunitinib dont les cibles cellulaires sont VEGFR, c-Kit, fms et PDGFR-B (Ferrari et al., 2019) et qui ne font pas partie des bibliothèques du NCI et de Prestwick.

De plus, il a été démontré que l'Imatinib inhibe la transcription de TNF. L'Imatinib régule négativement la voie de signalisation NF-κB activée par le LPS (Wolf et al., 2005) responsable de l'expression de TNF.

### 1.7.2. L'Azélastine

L'azélastine est principalement un antagoniste sélectif des récepteurs H1 de l'histamine, avec une affinité moindre pour les récepteurs H2, utilisé pour le traitement symptomatique des allergies (Bernstein, 2007; Horak, 2008)

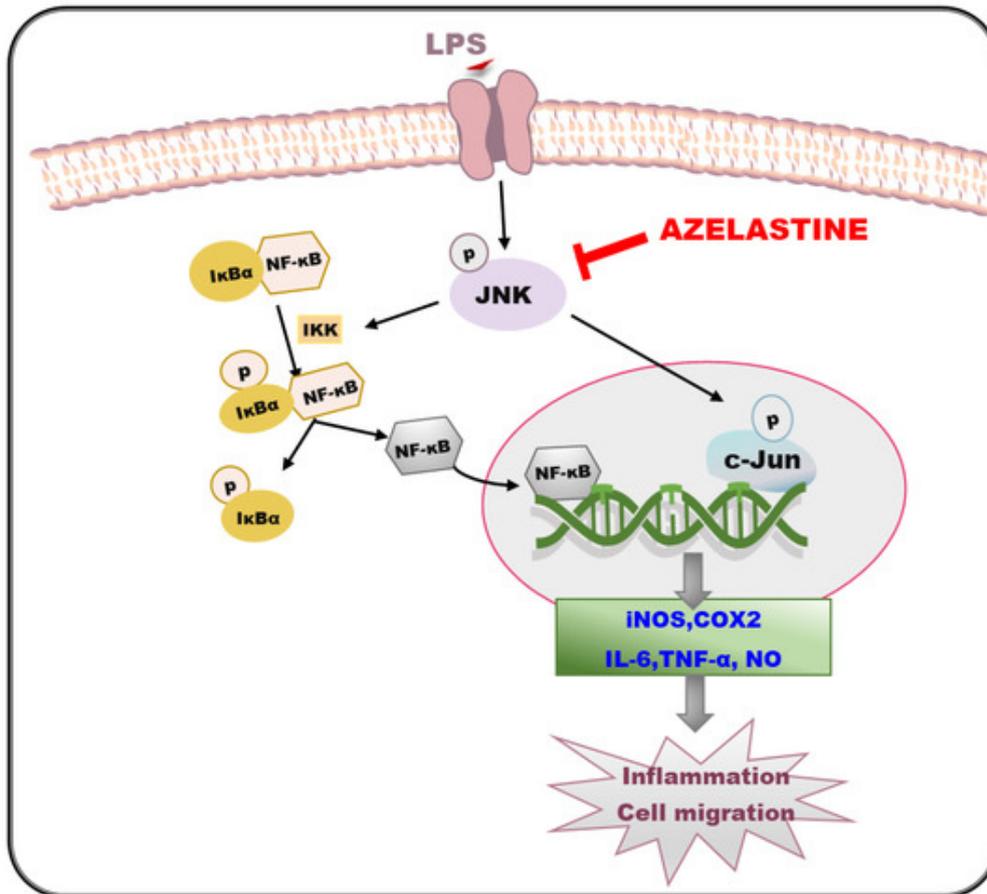
Les récepteurs H1 de l'histamine sont des récepteurs couplés aux protéines G avec 7 domaines transmembranaires (Fukui et al., 2017). Après une exposition aux

allergènes chez les personnes sensibilisées, la liaison croisée des récepteurs IgE sur les mastocytes entraîne la libération d'histamine qui se lie aux récepteurs H1 et contribue aux symptômes allergiques (Baroody and Naclerio, 2000).

Bien que son principal mode d'action est l'antagonisme des récepteurs H1, l'azélastine (comme d'autres antihistaminiques de deuxième génération) semble affecter d'autres médiateurs. L'azélastine possède des propriétés de stabilisation des mastocytes qui empêchent la libération d'IL-6, de tryptase, d'histamine et de TNF (Bernstein, 2007; Matsuo and Takayama, 1998) par les mastocytes.

En effet, l'azélastine inhibe la production de médiateurs pro-inflammatoires induite par le LPS, notamment l'IL-6, TNF et l'oxyde nitrique en régulant négativement la voie de signalisation JNK/NF- $\kappa$ B (Nguyen et al., 2021).

Cependant le mécanisme par lequel l'Azélastine réduit la sécrétion de TNF n'est pas complètement connu. Bien que le récepteur H1 soit la cible principale de l'Azélastine, il existe d'autres cibles cellulaires de cette molécule tels que le récepteur de l'histamine H2 (Bernstein, 2007; Horak, 2008), la phospholipase A2 et la leukotriène C4 synthase (Hamasaki et al., 1996). Comme pour l'imatinib, d'autres antagonistes des récepteurs H1 de l'histamine comme la Loratadine (Haria et al., 1994) peuvent être testés pour observer leurs effets sur la sécrétion de TNF. On peut également émettre l'hypothèse que l'Azélastine inhibe le TNF via une cible encore inconnue de la molécule.



**Figure 24 : Schéma illustrant les mécanismes cellulaires impliqués dans les effets anti-inflammatoires et anti-migratoires de l'Azelastine après traitement LPS.** IKK, IκB kinase ; IκBα, inhibitory kappa Bα ; NF-κB, nuclear factor-kappa B ; iNOS, inducible nitric oxide synthase ; COX2, cyclooxygenase-2 ; IL-6, interleukine-6, TNF-α, tumor necrosis factor-α ; NO, oxyde nitrique.(Nguyen et al., 2021)

### 1.7.3. Cisapride

La Cisapride est un agoniste des récepteurs de la sérotonine 5-HT. Il s'agit d'un agent gastroprocinétique utilisé pour le traitement du reflux gastro-oesophagien (RGO). Cependant ce médicament peut entrainer des arythmies et donc la FDA a émis une lettre d'avertissement aux médecins quant à son utilisation. De ce fait, cette molécule a été retirée du marché américain et son utilisation en Europe a été limitée (Maclennan et al., 2010).

#### 1.7.4. Oxyacanthine

Les extraits obtenus à partir des racines des espèces de *Berberidaceae* ont été utilisés dans la médecine populaire pour traiter les rhumatismes et autres troubles inflammatoires chroniques. Les études de la composition chimique et des propriétés immunologiques montrent que leur activité est principalement due aux constituants alcaloïdes (Ivanovska and Philipov, 1996).

De plus, une étude *in silico* (criblage par « Docking moléculaire ») a mis en évidence l'Oxyacanthine comme l'une des molécules ayant une grande affinité pour les protéines de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 (Joshi et al., 2021). Cette molécule peut potentiellement contribuer à l'inhibition de la réplication du SRAS-CoV-2. Cependant de plus amples études doivent être réalisées afin de valider la candidature de ces inhibiteurs.

#### 1.7.5. NSC308835

NSC308835 est une molécule chimique appartenant la banque NCI. Très peu d'études sur cette dernière sont disponibles. Cependant, une étude *in silico* (criblage par « Docking moléculaire ») a montré que NSC308835 a une certaine affinité avec une séquence du SRAS-CoV-2 (Garcia-Moran et al., 2022). Cette séquence a une faible similitude avec d'autres virus, y compris les coronavirus apparentés au SRAS-CoV2. De plus, elle est hautement conservée ce qui en fait une cible thérapeutique particulièrement intéressante. Encore une fois, de plus amples études doivent être réalisées afin de valider les effets de cette molécule. Tout comme pour l'Oxyacanthine, il serait intéressant d'étudier si son potentiel effet sur le SRAS-CoV-2 peut être lié à la sécrétion de TNF.

En conclusion, chaque molécule possède des cibles cellulaires différentes. Certaines des cibles cellulaires connues peuvent expliquer leurs effets sur la diminution de la sécrétion de TNF mais il serait intéressant de réaliser une spectrométrie de masse en ajoutant groupement azide-biotine aux molécules par « Click-Chemistry ».

Cela permettra d'enrichir les protéines liées à ces molécules modifiées et ainsi de découvrir potentiellement de nouvelles cibles inconnues de ces molécules.

## 1.8. Expression versus. Sécrétion

Parmi les 5 molécules sélectionnées, au moins deux molécules semblent inhiber la voie de signalisation NF-KB. NF-KB est un facteur de transcription pro-inflammatoire induisant l'expression de gènes tels que les cytokines (Ghosh et al., 1998). Par conséquent, NF-KB est une cible thérapeutique potentielle afin de lutter contre les maladies inflammatoires (Yu et al., 2020).

De plus, il a été démontré que l'Imatinib réduit le niveau d'expression du TNF (Wolf et al., 2005). Selon cette étude, l'Imatinib a diminué la phosphorylation d'IkBa et l'activation de NF-KB (l'Imatinib inhibe préférentiellement la liaison à l'ADN de la sous-unité p65). Nos résultats confirment que l'Imatinib inhibe complètement l'expression du TNF dans les monocytes humains primaires (Fig 6, C). Par conséquent, il est difficile de déterminer si l'Imatinib agit uniquement sur l'expression ou si la molécule peut agir à la fois sur la sécrétion et l'expression du TNF dans ce modèle physiologique, puisque nous savons que dans le modèle hétérologue l'Imatinib bloque la sécrétion du TNF. Cependant, dans les macrophages primaires humains, l'impact de l'Imatinib sur l'expression du TNF est moins important que dans les monocytes (Fig 6, A). En effet, on observe une légère diminution de l'expression de TNF à 1h par rapport à la condition DMSO. La question est de savoir si cette diminution est suffisante pour expliquer la diminution de la sécrétion de TNF en présence d'Imatinib (Fig 6, B) ou si l'Imatinib agit sur la sécrétion de TNF chez les macrophages. Cela suggérerait que l'Imatinib a des cibles différentes selon le modèle cellulaire étudié.

On peut également noter que TNF a effet autocrine sur les macrophages et les monocytes permettant un maintien de l'inflammation (Gane et al., 2016; Parameswaran and Patial, 2010; Yarinina et al., 2008). Il serait intéressant d'utiliser des anticorps anti-TNF dans le milieu afin de bloquer la régulation induite par le TNF sécrété en présence des molécules. De plus, au vu des profils d'expression différents

entre les monocytes et les macrophages (Fig 6, A,B) l'effet autocrine de TNF pourrait également différer. Effet, l'expression de TNF chez les monocytes est beaucoup moins transitoire (Fig 6, B), ce qui suggère que la boucle autocrine est plus importante chez les monocytes.

## 1.9. Test in vivo des molécules

Actuellement, des expériences visant à tester l'effet des molécules sur des macrophages de souris (RAW 264.7) sont en cours. Cette étude sera une bonne indication pour de potentielles études in vivo qui seront nécessaires pour la réalisation d'essais cliniques.

L'effet de l'Imatinib a été testé dans des modèles murins bien caractérisés ayant une insuffisance hépatique dépendante du TNF (Wolf et al., 2005). Les résultats montrent que l'Imatinib permet de réduire significativement le niveau de TNF circulant dans le plasma ainsi qu'une baisse significative de l'expression de l'ARNm du TNF hépatique. De plus, le traitement a également empêché les changements histologiques et l'induction de l'apoptose hépatique montrée par une réduction marquée des cellules TUNEL-positives dans le foie. Enfin, le prétraitement par la molécule a permis une inhibition significative de la libération des enzymes hépatiques montrant que l'Imatinib a permis de protéger les animaux des lésions hépatiques (Wolf et al., 2005).

Par ailleurs, de nombreux modèles animaux ont été développés pour étudier les maladies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn. Ceux-ci incluent des modèles d'inflammation intestinale induits chimiquement, génétiquement modifiés et à médiation immunitaire, qui partagent tous des similitudes avec les maladies inflammatoires de l'intestin humain et offrent des avantages uniques pour étudier des aspects spécifiques de cette pathologie. Cependant, la plupart de ces modèles sont caractérisés par une colite et, contrairement à la maladie de Crohn humaine, ils n'impliquent pas l'intestin grêle. Récemment, un modèle murin d'inflammation iléale chronique a été caractérisé. Il ressemble étroitement à la maladie de Crohn humaine

en termes de location de la maladie, de caractéristiques histologiques et de réponse clinique au traitement. Parmi ces modèles *in vivo*, deux modèles murins d'iléite expérimentaux : les souches TNF DARE et SAMP1/YitFc (Pizarro et al., 2003). L'utilisation de ces modèles murins pourrait être utilisée pour tester l'efficacité des molécules sélectionnées inhibant la sécrétion de TNF.

En conclusion, le criblage à haut contenu et l'étude sur un modèle hétérologue nous ont permis d'identifier des molécules inhibant assez spécifiquement TNF. Notre étude confirme que la diversité des voies sécrétoires est suffisamment importante pour bloquer le transport d'un cargo impliqué dans une maladie. Cependant, les molécules inhibant également la sécrétion d'IL-6 ont également été retenues puisque cette cytokine est aussi impliquée dans les maladies inflammatoires chroniques.

L'Imatinib et l'Azélastine ont des cibles cellulaires connues, mais sont utilisées pour traiter des maladies différentes des maladies inflammatoires chroniques. Ces molécules pourraient donc avoir d'autres cibles cellulaires encore inconnues. Une autre possibilité serait que les cibles connues de ces molécules agissent sur la sécrétion de TNF. Les effets de ces molécules sur l'expression de TNF diffèrent d'un modèle cellulaire à l'autre, laissant supposer que ces molécules peuvent agir sur différentes cibles selon le modèle étudié. Enfin, des tests *in vivo* sur des modèles murins d'inflammation sont envisagés puisqu'il s'agit d'une étape préalable à l'utilisation des molécules pour le traitement des maladies inflammatoires chez l'Homme.

# Bibliographies

- Abou Dalle, I., Jabbour, E., Short, N. J. and Ravandi, F.** (2019). Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Treat Options Oncol* **20**, 4.
- Adegbola, S. O., Pisani, A., Sahnun, K., Tozer, P., Ellul, P. and Warusavitarne, J.** (2018a). Medical and surgical management of perianal Crohn's disease. *Ann Gastroenterol* **31**, 129–139.
- Adegbola, S. O., Sahnun, K., Warusavitarne, J., Hart, A. and Tozer, P.** (2018b). Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *IJMS* **19**, 2244.
- Aggarwal, B. B.** (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745–756.
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C. and Kim, J. H.** (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* **119**, 651–665.
- Akira, S.** (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology* **15**, 5–11.
- Akobeng, A. K. and Zachos, M.** (2004). Tumor necrosis factor-alpha antibody for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* **2003**, CD003574.
- Alexander, W. S. and Hilton, D. J.** (2004). THE ROLE OF SUPPRESSORS OF CYTOKINE SIGNALING (SOCS) PROTEINS IN REGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 503–529.
- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. and McKerrow, J. H.** (1992). Tumour necrosis factor  $\alpha$  restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* **356**, 604–607.
- An, X., Tiwari, A. K., Sun, Y., Ding, P.-R., Ashby, C. R. and Chen, Z.-S.** (2010). BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res* **34**, 1255–1268.
- Arai, A., Yan, W., Wakabayashi, S., Hayashi, S., Inazawa, J. and Miura, O.** (2007). Successful imatinib treatment of cardiac involvement of FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -positive chronic eosinophilic leukemia followed by severe hepatotoxicity. *Int J Hematol* **86**, 233–237.
- Arango Duque, G., Fukuda, M. and Descoteaux, A.** (2013). Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. *J Immunol* **190**, 1737–1745.
- Assche, G. V. and Rutgeerts, P.** (2000). Anti-TNF agents in Crohn's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **9**, 103–111.
- Baeuerle, P. A. and Henkel, T.** FUNCTION AND ACTIVATION OF NF-KB IN THE IMMUNE SYSTEM. 39.
- Baroody, F. M. and Naclerio, R. M.** (2000). Antiallergic effects of H1-receptor antagonists. *Allergy* **55 Suppl 64**, 17–27.
- Barr, F. A. and Short, B.** (2003). Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 405–413.
- Barrette-Ng, I. H., Wu, S.-C., Tjia, W.-M., Wong, S.-L. and Ng, K. K. S.** (2013). The structure of the SBP-Tag–streptavidin complex reveals a novel helical scaffold bridging binding pockets on separate subunits. *Acta Cryst D* **69**, 879–887.

- Bartel, D. P.** (2009). MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233.
- Bau, M., Zacharias, P., Ribeiro, D. A., Boaron, L., Steckert Filho, A. and Kotze, P. G.** (2017). SAFETY PROFILE OF ANTI-TNF THERAPY IN CROHN'S DISEASE MANAGEMENT: A BRAZILIAN SINGLE-CENTER DIRECT RETROSPECTIVE COMPARISON BETWEEN INFlixIMAB AND ADALIMUMAB. *Arq Gastroenterol* **54**, 328–332.
- Begue, B., Wajant, H., Bambou, J., Dubuquoy, L., Siegmund, D., Beaulieu, J., Canioni, D., Berrebi, D., Brousse, N., Desreumaux, P., et al.** (2006). Implication of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Inflammatory Intestinal Epithelial Lesions. *Gastroenterology* **130**, 1962–1974.
- Behnia, R. and Munro, S.** (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**, 597–604.
- Bergmann, J. E. and Singer, S. J.** (1983). Immunoelectron microscopic studies of the intracellular transport of the membrane glycoprotein (G) of vesicular stomatitis virus in infected Chinese hamster ovary cells. *Journal of Cell Biology* **97**, 1777–1787.
- Berns, M. and Hommes, D. W.** (2016). Anti-TNF- $\alpha$  therapies for the treatment of Crohn's disease: the past, present and future. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **25**, 129–143.
- Bernstein, J. A.** (2007). Azelastine hydrochloride: a review of pharmacology, pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability. *Curr Med Res Opin* **23**, 2441–2452.
- Beznoussenko, G. V., Parashuraman, S., Rizzo, R., Polishchuk, R., Martella, O., Di Giandomenico, D., Fusella, A., Spaar, A., Sallese, M., Capecstrano, M. G., et al.** (2014). Transport of soluble proteins through the Golgi occurs by diffusion via continuities across cisternae. *eLife* **3**, e02009.
- Billioud, V., Sandborn, W. J. and Peyrin-Biroulet, L.** (2011). Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol* **106**, 674–684.
- Black, R. A.** (2002). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1–5.
- Boncompain, G. and Perez, F.** (2013a). Chapter 11 - Fluorescence-Based Analysis of Trafficking in Mammalian Cells. In *Methods in Cell Biology* (ed. Perez, F.) and Stephens, D. J.), pp. 179–194. Academic Press.
- Boncompain, G. and Perez, F.** (2013b). The many routes of Golgi-dependent trafficking. *Histochem Cell Biol* **140**, 251–260.
- Boncompain, G. and Weigel, A. V.** (2018). Transport and sorting in the Golgi complex: multiple mechanisms sort diverse cargo. *Current Opinion in Cell Biology* **50**, 94–101.
- Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., de Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G. and Perez, F.** (2012). Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods* **9**, 493–498.
- Boncompain, G., Herit, F., Tessier, S., Lescure, A., Del Nery, E., Gestraud, P., Staropoli, I., Fukata, Y., Fukata, M., Brelot, A., et al.** (2019). Targeting CCR5 trafficking to inhibit HIV-1 infection. *Sci Adv* **5**, eaax0821.
- Bonfanti, L., Mironov, A. A., Martínez-Menárguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H. J., Mironov, A. A. and Luini, A.** (1998). Procollagen Traverses the Golgi Stack without Leaving the Lumen of Cisternae: Evidence for Cisternal Maturation. *Cell* **95**, 993–1003.

- Bongartz, T., Sutton, A. J., Sweeting, M. J., Buchan, I., Matteson, E. L. and Montori, V.** Anti-TNF Antibody Therapy in Rheumatoid Arthritis and the Risk of Serious Infections and Malignancies.
- Bonilla, F. A. and Oettgen, H. C.** (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S33–S40.
- Braakman, I. and Hebert, D. N.** (2013). Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a013201.
- Braegger, C. P., Nicholls, S., Murch, S. H., MacDonald, T. T. and Stephens, S.** (1992). Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *The Lancet* **339**, 89–91.
- Brande, J. M. H. V. den, Braat, H., Brink, G. R. van den, Versteeg, H. H., Bauer, C. A., Hoedemaeker, I., Montfrans, C. van, Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P. and Deventer, S. J. H. van** (2003). Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**, 1774–1785.
- Carlos, T. and Harlan, J.** (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**, 2068–2101.
- Carlsson, S. R., Roth, J., Piller, F. and Fukuda, M.** (1988). Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylactosaminoglycan. *J Biol Chem* **263**, 18911–18919.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B.** (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 3666–3670.
- Chabin-Brion, K., Marceiller, J., Perez, F., Settegrana, C., Drechou, A., Durand, G. and Poüs, C.** (2001). The Golgi Complex Is a Microtubule-organizing Organelle. *MBoC* **12**, 2047–2060.
- Chen, J. W., Pan, W., D'souza, M. P. and August, J. T.** (1985). Lysosome-associated membrane proteins: Characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **239**, 574–586.
- Chen, D., Gibson, E. S. and Kennedy, M. J.** (2013). A light-triggered protein secretion system. *Journal of Cell Biology* **201**, 631–640.
- Chen, Y., Gershlick, D. C., Park, S. Y. and Bonifacino, J. S.** (2017). Segregation in the Golgi complex precedes export of endolysosomal proteins in distinct transport carriers. *Journal of Cell Biology* **216**, 4141–4151.
- Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L. W., Hatada, M., Amara, J. F., Rollins, C. T., Stevenson, L. F., Magari, S. R., Wood, S. A., Courage, N. L., et al.** (1998). Redesigning an FKBP–ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 10437–10442.
- Clapham, D. E.** (2007). Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047–1058.
- Clark, A.** (2000). Post-transcriptional regulation of pro-inflammatory gene expression. *Arthritis Res* **2**, 172–174.
- Claudiani, S. and Apperley, J. F.** (2018). The argument for using imatinib in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2018**, 161–167.
- Cohen, B. L. and Sachar, D. B.** (2017). Update on anti-tumor necrosis factor agents and other new drugs for inflammatory bowel disease. *BMJ* **357**, j2505.
- Collins, L., DeCoursey, J., Rochfort, K., Kristek, M. and Loscher, C.** (2015). A Role for Syntaxin 3 in the secretion of IL-6 from Dendritic Cells following activation of Toll-like Receptors. *Frontiers in Immunology* **5**,.

- Colombel, J.-F., Sandborn, W. J., Panaccione, R., Robinson, A. M., Lau, W., Li, J. and Cardoso, A. T.** (2009). Adalimumab Safety in Global Clinical Trials of Patients with Crohn's Disease\*. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 1308–1319.
- Colombel, J. F., Sandborn, W. J., Reinisch, W., Mantzaris, G. J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., Lichtiger, S., D'Haens, G., Diamond, R. H., Broussard, D. L., et al.** (2010). Infliximab, Azathioprine, or Combination Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med* **362**, 1383–1395.
- Colón, A. L., Menchén, L. A., Hurtado, O., De Cristóbal, J., Lizasoain, I., Leza, J. C., Lorenzo, P. and Moro, M. A.** (2001). IMPLICATION OF TNF- $\alpha$  CONVERTASE (TACE/ADAM17) IN INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION AND INFLAMMATION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF COLITIS. *Cytokine* **16**, 220–226.
- Combadière, B., Combadière, C. and Deterre, P.** (2007). Les chimiokines : un réseau sophistiqué de guidage cellulaire. *Med Sci (Paris)* **23**, 173–179.
- Copaescu, A., Smibert, O., Gibson, A., Phillips, E. J. and Trubiano, J. A.** (2020). The role of IL-6 and other mediators in the cytokine storm associated with SARS-CoV-2 infection. *J Allergy Clin Immunol* **146**, 518-534.e1.
- Couper, K. N., Blount, D. G. and Riley, E. M.** (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology* **180**, 5771–5777.
- Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P. and Salvemini, D.** Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. **25**.
- Dauphinee, S. M. and Karsan, A.** (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* **86**, 9–22.
- Dayer, J. M., Beutler, B. and Cerami, A.** (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *Journal of Experimental Medicine* **162**, 2163–2168.
- De Matteis, M. A., Di Campli, A. and Godi, A.** (2005). The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 396–405.
- de Silva, C. M. V. and Reid, R.** (2003). Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib. *Pathol Oncol Res* **9**, 13–19.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. and de Vries, J. E.** (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* **174**, 1209–1220.
- Dean, J. L. E., Sully, G., Clark, A. R. and Saklatvala, J.** (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cellular Signalling* **16**, 1113–1121.
- Deng, Y., Pakdel, M., Blank, B., Sundberg, E. L., Burd, C. G. and von Blume, J.** (2018). Activity of the SPCA1 Calcium Pump Couples Sphingomyelin Synthesis to Sorting of Secretory Proteins in the Trans-Golgi Network. *Dev Cell* **47**, 464-478.e8.
- DERKX, B., TAMINIAU, J., RADEMA, S., STRONKHORST, A., WORTEL, C., TYTGAT, T. and VAN DEVENTER, S.** (1993). Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet (Br. ed.)* **342**, 173–174.
- Dewar, A. L., Zannettino, A. C. W., Hughes, T. P. and Lyons, A. B.** (2005). Inhibition of c-fms by imatinib: expanding the spectrum of treatment. *Cell Cycle* **4**, 851–853.
- D'Haens\*, G., Deventer‡, S. V., Hogezaand §, R. V., Chalmers||, D., Kothe‡, C., Baert\*, F., Braakman¶, T., Schaible¶, T., Geboes\*, K. and Rutgeerts\*, P.** (1999).

Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology* **116**, 1029–1034.

- Dodeller, F. and Schulze-Koops, H.** (2006). The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res Ther* **8**, 205.
- Druker, B. J. and Lydon, N. B.** (2000). Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.* **105**, 3–7.
- Dunphy, W. G. and Rothman, J. E.** (1985). Compartmental organization of the golgi stack. *Cell* **42**, 13–21.
- Eden, E. R.** (2016). The formation and function of ER-endosome membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta* **1861**, 874–879.
- Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P. M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A. R. R., McLeod, I. X., et al.** (2007). Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* **12**, 917–930.
- Eissner, G., Kirchner, S., Lindner, H., Kolch, W., Janosch, P., Grell, M., Scheurich, P., Andreesen, R. and Holler, E.** (2000). Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol* **164**, 6193–6198.
- Eissner, G., Kolch, W. and Scheurich, P.** (2004). Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **15**, 353–366.
- Emery, P., Fleischmann, R. M., Moreland, L. W., Hsia, E. C., Strusberg, I., Durez, P., Nash, P., Amante, E. J. B., Churchill, M., Park, W., et al.** (2009). Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naive patients with active rheumatoid arthritis: twenty-four-week results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of golimumab before methotrexate as first-line therapy for early-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **60**, 2272–2283.
- Espel, E.** (2005). The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**, 59–67.
- Faustman, D. and Davis, M.** (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 482–493.
- Fehr, S., Unger, A., Schaeffeler, E., Herrmann, S., Laufer, S., Schwab, M. and Albrecht, W.** (2015). Impact of p38 MAP Kinase Inhibitors on LPS-Induced Release of TNF- $\alpha$  in Whole Blood and Primary Cells from Different Species.
- Feuerstein, J. D. and Cheifetz, A. S.** (2014). Miscellaneous Adverse Events with Biologic Agents (Excludes Infection and Malignancy). *Gastroenterology Clinics of North America* **43**, 543–563.
- Fiers, W.** (1991). Tumor necrosis factor Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Letters* **285**, 199–212.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. and O'Garra, A.** (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* **147**, 3815–3822.
- Fitzgerald, G. A.** (2001). The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. *DRUG THERAPY* **10**.
- Fotin-Mleczek, M.** (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. **14**.

- Fourriere, L., Divoux, S., Roceri, M., Perez, F. and Boncompain, G.** (2016). Microtubule-independent secretion requires functional maturation of Golgi elements. *J Cell Sci* **129**, 3238–3250.
- Fourriere, L., Kasri, A., Gareil, N., Bardin, S., Bousquet, H., Pereira, D., Perez, F., Goud, B., Boncompain, G. and Miserey-Lenkei, S.** (2019). RAB6 and microtubules restrict protein secretion to focal adhesions. *Journal of Cell Biology* **218**, 2215–2231.
- Fukui, H., Mizuguchi, H., Nemoto, H., Kitamura, Y., Kashiwada, Y. and Takeda, N.** (2017). Histamine H1 Receptor Gene Expression and Drug Action of Antihistamines. *Handb Exp Pharmacol* **241**, 161–169.
- Futerman, A. H. and Riezman, H.** (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends in Cell Biology* **15**, 312–318.
- Gane, J. M., Stockley, R. A. and Sapey, E.** (2016). TNF- $\alpha$  Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF- $\alpha$  Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. *J Immunol Res* **2016**, 1079851.
- Garcia-Moran, E., Hernández, M., Abad, D. and Eiros, J. M.** (2022). Putative Secondary Structure at 5'UTR as a Potential Antiviral Target against SARS-CoV-2. *Rev Esp Quimioter* **35**, 204–212.
- Gasche, C. and Grundtner, P.** (2005). Genotypes and phenotypes in Crohn's disease: do they help in clinical management? *Gut* **54**, 162–167.
- Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U. and Presky, D. H.** (1998). THE INTERLEUKIN-12/INTERLEUKIN-12-RECEPTOR SYSTEM: Role in Normal and Pathologic Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 495–521.
- Ghazi, L. J., Patil, S. A., Rustgi, A., Flasar, M. H., Razeghi, S. and Cross, R. K.** (2013). Step Up Versus Early Biologic Therapy for Crohn's Disease in Clinical Practice: *Inflammatory Bowel Diseases* **19**, 1397–1403.
- Gillingham, A. K. and Munro, S.** (2016). Finding the Golgi: Golgin Coiled-Coil Proteins Show the Way. *Trends in Cell Biology* **26**, 399–408.
- Gisbert, J. P. and Panés, J.** (2009). Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. *Am J Gastroenterol* **104**, 760–767.
- Glick, B. S. and Nakano, A.** (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 113–132.
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J. M. and De Matteis, M. A.** (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol* **6**, 393–404.
- Gomollón, F., Dignass, A., Annese, V., Tilg, H., Van Assche, G., Lindsay, J. O., Peyrin-Biroulet, L., Cullen, G. J., Daperno, M., Kucharzik, T., et al.** (2017). 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *ECCOJC* **11**, 3–25.
- Granger, B. L., Green, S. A., Gabel, C. A., Howe, C. L., Mellman, I. and Helenius, A.** (1990). Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 12036–12043.
- Green, S. A., Zimmer, K. P., Griffiths, G. and Mellman, I.** (1987). Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins. *Journal of Cell Biology* **105**, 1227–1240.

- Griffiths, G., Pfeiffer, S., Simons, K. and Matlin, K.** (1985). Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. *Journal of Cell Biology* **101**, 949–964.
- Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P. S., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I. V., Grosveld, F., Hoogenraad, C. C., et al.** (2007). Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell* **13**, 305–314.
- Grigoriev, I., Gouveia, S. M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J. T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M. O., Putney, J. W., Hoogenraad, C. C., et al.** (2008). STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol* **18**, 177–182.
- Grigoriev, I., Yu, K. L., Martinez-Sanchez, E., Serra-Marques, A., Smal, I., Meijering, E., Demmers, J., Peränen, J., Pasterkamp, R. J., van der Sluijs, P., et al.** (2011). Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr Biol* **21**, 967–974.
- Guo, Y., Hu, K., Li, Y., Lu, C., Ling, K., Cai, C., Wang, W. and Ye, D.** (2022). Targeting TNF- $\alpha$  for COVID-19: Recent Advanced and Controversies. *Front Public Health* **10**, 833967.
- Hamasaki, Y., Shafiqeh, M., Yamamoto, S., Sato, R., Zaitu, M., Muro, E., Kobayashi, I., Ichimaru, T., Tasaki, H. and Miyazaki, S.** (1996). Inhibition of leukotriene synthesis by azelastine. *Ann Allergy Asthma Immunol* **76**, 469–475.
- Han, C., Chen, T., Yang, M., Li, N., Liu, H. and Cao, X.** (2009). Human SCAMP5, a Novel Secretory Carrier Membrane Protein, Facilitates Calcium-Triggered Cytokine Secretion by Interaction with SNARE Machinery1. *The Journal of Immunology* **182**, 2986–2996.
- Hanauer, S. B., Feagan, B. G., Lichtenstein, G. R., Mayer, L. F., Schreiber, S., Colombel, J. F., Rachmilewitz, D., Wolf, D. C., Olson, A., Bao, W., et al.** (2002). Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *The Lancet* **359**, 1541–1549.
- Hanauer, S. B., Sandborn, W. J., Rutgeerts, P., Fedorak, R. N., Lukas, M., MacIntosh, D., Panaccione, R., Wolf, D. and Pollack, P.** (2006). Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* **130**, 323–333; quiz 591.
- Harashima, S., Horiuchi, T., Hatta, N., Morita, C., Higuchi, M., Sawabe, T., Tsukamoto, H., Tahira, T., Hayashi, K., Fujita, S., et al.** (2001). Outside-to-Inside Signal Through the Membrane TNF- $\alpha$  Induces E-Selectin (CD62E) Expression on Activated Human CD4+ T Cells1. *The Journal of Immunology* **166**, 130–136.
- Hart, A. L. and Ng, S. C.** (2015). Crohn's disease. *Medicine* **43**, 282–290.
- Harter, C. and Mellman, I.** (1992). Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (lgp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J Cell Biol* **117**, 311–325.
- Hattula, K., Furuholm, J., Tikkanen, J., Tanhuanpää, K., Laakkonen, P. and Peränen, J.** (2006). Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *Journal of Cell Science* **119**, 4866–4877.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S.** (2008). Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell* **132**, 344–362.
- Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimi, M., Maid, R., Feldmann, M., et al.** (1988). Excessive production of interleukin

- 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* **18**, 1797–1802.
- Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ito, H., Nakamura, T., et al.** (2007). Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* **204**, 2803–2812.
- Horak, F.** (2008). Effectiveness of twice daily azelastine nasal spray in patients with seasonal allergic rhinitis. *Ther Clin Risk Manag* **4**, 1009–1022.
- Houssiau, F. A., Devogelaer, J.-P., Damme, J. V., Deuxchaisnes, C. N. D. and Snick, J. V.** (1988). Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis & Rheumatism* **31**, 784–788.
- Huber, L. A., Pimplikar, S., Parton, R. G., Virta, H., Zerial, M. and Simons, K.** (1993). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *Journal of Cell Biology* **123**, 35–45.
- Hutchinson, C. R., Shu-Wen, L., McInnes, A. G. and Walter, J. A.** (1983). Comparative biochemistry of fatty acid and macrolide antibiotic (brefeldin a). Formation in penicillium brefeldianum. *Tetrahedron* **39**, 3507–3513.
- Ikeda, T., Sato, K., Kuwada, N., Matsumura, T., Yamashita, T., Kimura, F., Hatake, K., Ikeda, K. and Motoyoshi, K.** (2002). Interleukin-10 differently regulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression depending on the environment in a human monoblastic cell line, UG3. *J Leukoc Biol* **72**, 1198–1205.
- Iqbal, N. and Iqbal, N.** (2014). Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemother Res Pract* **2014**, 357027.
- Ishihara, K. and Hirano, T.** (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 357–368.
- Ivanovska, N. and Philipov, S.** (1996). Study on the anti-inflammatory action of Berberis vulgaris root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *International Journal of Immunopharmacology* **18**, 553–561.
- Jan, C. H., Williams, C. C. and Weissman, J. S.** (2014). Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* **346**, 1257521.
- Janvier, K. and Bonifacino, J. S.** (2005). Role of the Endocytic Machinery in the Sorting of Lysosome-associated Membrane Proteins. *Mol Biol Cell* **16**, 4231–4242.
- Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W. and Goeddel, D. V.** (1999). Prevention of Constitutive TNF Receptor 1 Signaling by Silencer of Death Domains. *Science* **283**, 543–546.
- Jones, G.** (2010). The AMBITION trial: tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis. *Expert Review of Clinical Immunology* **6**, 189–195.
- Jones, G. and Ding, C.** (2010). Tocilizumab: A Review of Its Safety and Efficacy in Rheumatoid Arthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* **3**, CMAMD.S4864.
- Joshi, T., Bhat, S., Pundir, H. and Chandra, S.** (2021). Identification of Berbamine, Oxyacanthine and Rutin from Berberis asiatica as anti-SARS-CoV-2 compounds: An in silico study. *J Mol Graph Model* **109**, 108028.
- Jost, P. J. and Ruland, J.** (2006). Aberrant NF- $\kappa$ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* **109**, 2700–2707.
- Joyce, D. A., Gibbons, D. P., Green, P., Steer, J. H., Feldmann, M. and Brennan, F. M.** (1994). Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* **24**, 2699–2705.

- Kaelin, W. G.** (2000). Brian J. Druker<sup>1</sup> and Nicholas B. Lydon<sup>2</sup>. *The Journal of Clinical Investigation* **105**,.
- Kashyap, D., Roy, R., Kar, P. and Jha, H. C.** (2022). Plant-derived active compounds as a potential nucleocapsid protein inhibitor of SARS-CoV-2: an in-silico study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 1–16.
- Kay, J. G., Murray, R. Z., Pagan, J. K. and Stow, J. L.** (2006). Cytokine Secretion via Cholesterol-rich Lipid Raft-associated SNAREs at the Phagocytic Cup\*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 11949–11954.
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N. and Braun, M. M.** (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* **345**, 1098–1104.
- Keystone, E. C., Genovese, M. C., Klareskog, L., Hsia, E. C., Hall, S. T., Miranda, P. C., Pazdur, J., Bae, S.-C., Palmer, W., Zrubeck, J., et al.** (2009). Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor {alpha} given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORWARD Study. *Ann Rheum Dis* **68**, 789–796.
- Kindler, V., Sappino, A.-P., Grau, G. E., Piguet, P.-F. and Vassalli, P.** (1989). The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* **56**, 731–740.
- Kleene, R. and Berger, E. G.** (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1154**, 283–325.
- Klumperman, J.** (2011). Architecture of the mammalian Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a005181.
- Kobayashi, K. and Yoshida, T.** (1996). The Immunopathogenesis of Granulomatous Inflammation Induced by Mycobacterium tuberculosis. *Methods* **9**, 204–214.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F. and Kollias, G.** Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements: Implications for Joint and Gut-Associated Immunopathologies. **12**.
- Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y. and Nakatogawa, H.** (2018). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 10363–10368.
- Kotenko, S. V. and Durbin, J. E.** (2017). Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. *J Biol Chem* **292**, 7295–7303.
- Kovitz, C., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., Abruzzo, L. V. and Cortes, J.** (2006). Myelodysplastic syndromes and acute leukemia developing after imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood* **108**, 2811–2813.
- Kraus, F. and Ryan, M. T.** (2017). The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *J Cell Sci* **130**, 2953–2960.
- Kreis, T. E. and Lodish, H. F.** (1986). Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. *Cell* **46**, 929–937.
- Kuijpers, T. W., Hakkert, B. C., Hart, M. H. and Roos, D.** (1992). Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. *The Journal of Cell Biology* **117**, 565–572.
- Kurokawa, K., Osakada, H., Kojidani, T., Waga, M., Suda, Y., Asakawa, H., Haraguchi, T. and Nakano, A.** (2019). Visualization of secretory cargo transport within the Golgi apparatus. *Journal of Cell Biology* **218**, 1602–1618.

- Lafay, F.** (1974). Envelope Proteins of Vesicular Stomatitis Virus: Effect of Temperature-Sensitive Mutations in Complementation Groups III and V. *J Virol* **14**, 1220–1228.
- Lansbergen, G., Grigoriev, I., Mimori-Kiyosue, Y., Ohtsuka, T., Higa, S., Kitajima, I., Demmers, J., Galjart, N., Houtsmuller, A. B., Grosveld, F., et al.** (2006). CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5beta. *Dev Cell* **11**, 21–32.
- Letterio, J. J. and Roberts, A. B.** (1998). REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- $\beta$ . *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137–161.
- Li, X., Tupper, J. C., Bannerman, D. D., Winn, R. K., Rhodes, C. J. and Harlan, J. M.** (2003). Phosphoinositide 3 Kinase Mediates Toll-Like Receptor 4-Induced Activation of NF- $\kappa$ B in Endothelial Cells. *Infect Immun* **71**, 4414–4420.
- Lieu, Z. Z., Lock, J. G., Hammond, L. A., La Gruta, N. L., Stow, J. L. and Gleeson, P. A.** (2008). A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3351–3356.
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T. H. and Hirschberg, K.** (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 557–589.
- Liu, Y.-J.** (2005). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 275–306.
- Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J. and Glick, B. S.** (2006). Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* **441**, 1002–1006.
- Low, P. C., Misaki, R., Schroder, K., Stanley, A. C., Sweet, M. J., Teasdale, R. D., Vanhaesebroeck, B., Meunier, F. A., Taguchi, T. and Stow, J. L.** (2010). Phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  regulates membrane fission of Golgi carriers for selective cytokine secretion. *J Cell Biol* **190**, 1053–1065.
- MacEwan, D. J.** (2002). TNF ligands and receptors—a matter of life and death. *Br J Pharmacol* **135**, 855–875.
- MacLennan, S., Augood, C., Cash-Gibson, L., Logan, S. and Gilbert, R. E.** (2010). Cisapride treatment for gastro-oesophageal reflux in children. *Cochrane Database Syst Rev* **2010**, CD002300.
- Mahadevan, U., Cucchiara, S., Hyams, J. S., Steinwurz, F., Nuti, F., Travis, S. P. L., Sandborn, W. J. and Colombel, J.-F.** (2011). The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD With the European Crohn's and Colitis Organisation: Pregnancy and Pediatrics. *Official journal of the American College of Gastroenterology / ACG* **106**, 214.
- Manderson, A. P., Kay, J. G., Hammond, L. A., Brown, D. L. and Stow, J. L.** (2007). Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF $\alpha$ . *Journal of Cell Biology* **178**, 57–69.
- Marks, M. S., Woodruff, L., Ohno, H. and Bonifacino, J. S.** (1996). Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *Journal of Cell Biology* **135**, 341–354.
- Marsden, V. S. and Strasser, A.** (2003). Control of Apoptosis in the Immune System: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 71–105.
- Matlin, K. S. and Simons, K.** (1983). Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell* **34**, 233–243.

- Matsuo, S. and Takayama, S.** (1998). Influence of the anti-allergic agent, azelastine, on tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion from cultured mouse mast cells. *In Vivo* **12**, 481–484.
- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. and Nakano, A.** (2006). Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* **441**, 1007–1010.
- Matteis, M. A. D. and Godi, A.** (2004). PI-loting membrane traffic. *Nat Cell Biol* **6**, 487–492.
- Mattila, P. K. and Lappalainen, P.** (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 446–454.
- Mcguire-Goldring, M. B., Meats, J. E., Wood, D. D., Ihrie, E. J., Ebsworth, N. M. and Russell, R. G. G.** (1984). In vitro activation of human chondrocytes and synoviocytes by a human interleukin-1-like factor. *Arthritis & Rheumatism* **27**, 654–662.
- Miehsler, W., Novacek, G., Wenzl, H., Vogelsang, H., Knoflach, P., Kaser, A., Dejaco, C., Petritsch, W., Kapitan, M., Maier, H., et al.** (2010). A decade of infliximab: The Austrian evidence based consensus on the safe use of infliximab in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis* **4**, 221–256.
- Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B. and Echard, A.** (2010). Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* **12**, 645–654.
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G. and Ikehara, Y.** (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 11398–11403.
- Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H. and Ueda, N.** (2018). Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents – Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists. *Cytokine* **101**, 56–63.
- Monier, S., Jollivet, F., Janoueix-Lerosey, I., Johannes, L. and Goud, B.** (2002). Characterization of Novel Rab6-Interacting Proteins Involved in Endosome-to-TGN Transport. *Traffic* **3**, 289–297.
- Mori, R., Ikematsu, K., Kitaguchi, T., Kim, S. E., Okamoto, M., Chiba, T., Miyawaki, A., Shimokawa, I. and Tsuboi, T.** (2011). Release of TNF- $\alpha$  from macrophages is mediated by small GTPase Rab37. *European Journal of Immunology* **41**, 3230–3239.
- Moynagh, P. N.** (2005). The NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Cell Science* **118**, 4589–4592.
- Mughal, T. I. and Goldman, J. M.** (2006). Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: beyond the imatinib era. *Front Biosci* **11**, 209–220.
- Müller, J. M., Ziegler-Heitbrock, H. W. L. and Baeuerle, P. A.** (1993). Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* **187**, 233–256.
- Mullin, J. M. and Snock, K. V.** (1990). Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability. *Cancer Res* **50**, 2172–2176.
- Murch, S. H., Lamkin, V. A., Savage, M. O., Walker-Smith, J. A. and MacDonald, T. T.** (1991). Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **32**, 913–917.
- Murch, S. H., Braegger, C. P., Walker-Smith, J. A. and MacDonald, T. T.** (1993). Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **34**, 1705–1709.
- Murray, R. Z. and Stow, J. L.** (2014). Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking. *Front. Immunol.* **5**,.
- Murray, R. Z., Wylie, F. G., Khromykh, T., Hume, D. A. and Stow, J. L.** (2005a). Syntaxin 6 and Vti1b Form a Novel SNARE Complex, Which Is Up-regulated in Activated

- Macrophages to Facilitate Exocytosis of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ \*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 10478–10483.
- Murray, R. Z., Kay, J. G., Sangermani, D. G. and Stow, J. L.** (2005b). A Role for the Phagosome in Cytokine Secretion. *Science* **310**, 1492–1495.
- Myatt, N., Coghill, G., Morrison, K., Jones, D. and Cree, I. A.** (1994). Detection of tumour necrosis factor alpha in sarcoidosis and tuberculosis granulomas using in situ hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* **47**, 423–426.
- Nesbitt, A., Fossati, G., Bergin, M., Stephens, P., Stephens, S., Foulkes, R., Brown, D., Robinson, M. and Bourne, T.** (2007). Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): In vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  agents. *Inflammatory Bowel Diseases* **13**, 1323–1332.
- Newton, R. C., Solomon, K. A., Covington, M. B., Decicco, C. P., Haley, P. J., Friedman, S. M. and Vaddi, K.** Biology of TACE inhibition.
- Nguyen, P. L., Bui, B. P., Duong, M. T. H., Lee, K., Ahn, H.-C. and Cho, J.** (2021). Suppression of LPS-Induced Inflammation and Cell Migration by Azelastine through Inhibition of JNK/NF- $\kappa$ B Pathway in BV2 Microglial Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 9061.
- Nixon-Abell, J., Obara, C. J., Weigel, A. V., Li, D., Legant, W. R., Xu, C. S., Pasolli, H. A., Harvey, K., Hess, H. F., Betzig, E., et al.** (2016). Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER. *Science* **354**, aaf3928.
- Nouri, A. M., Panayi, G. S. and Goodman, S. M.** (1984). Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. I. The presence of interleukin-1 in synovial fluids. *Clin Exp Immunol* **55**, 295–302.
- O'Meara, S., Nanda, K. S. and Moss, A. C.** (2014). Antibodies to Infliximab and Risk of Infusion Reactions in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases* **20**, 1–6.
- Pagan, J. K., Wylie, F. G., Joseph, S., Widberg, C., Bryant, N. J., James, D. E. and Stow, J. L.** (2003). The t-SNARE Syntaxin 4 Is Regulated during Macrophage Activation to Function in Membrane Traffic and Cytokine Secretion. *Current Biology* **13**, 156–160.
- Pagnini, C., Arseneau, K. O. and Cominelli, F.** (2015). Safety considerations when using anti-TNF $\alpha$  therapy to treat Crohn's disease. *Expert Opinion on Drug Safety* **14**, 31–44.
- Palladino, M. A., Bahjat, F. R., Theodorakis, E. A. and Moldawer, L. L.** (2003). Anti-TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 736–746.
- Parameswaran, N. and Patial, S.** (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukar Gene Expr* **20**, 87–103.
- Pardanani, A. and Tefferi, A.** (2004). Imatinib therapy for hypereosinophilic syndrome and eosinophilia-associated myeloproliferative disorders. *Leuk Res* **28 Suppl 1**, S47-52.
- Park, J. Y., Pillinger, M. H. and Abramson, S. B.** (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology* **119**, 229–240.
- Patterson, G. H., Hirschberg, K., Polishchuk, R. S., Gerlich, D., Phair, R. D. and Lippincott-Schwartz, J.** (2008). Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* **133**, 1055–1067.
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., et al.** (1998). An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* **282**, 1281–1284.

- Petkovic, M., Jemaiel, A., Daste, F., Specht, C. G., Izeddin, I., Vorkel, D., Verbavatz, J.-M., Darzacq, X., Triller, A., Pfenninger, K. H., et al.** (2014). The SNARE Sec22b has a non-fusogenic function in plasma membrane expansion. *Nat Cell Biol* **16**, 434–444.
- Phillips, K., Kedersha, N., Shen, L., Blackshear, P. J. and Anderson, P.** (2004). Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor  $\alpha$ , cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2011–2016.
- Pietro, E. S., Capestrano, M., Polishchuk, E. V., DiPentima, A., Trucco, A., Zizza, P., Marigiò, S., Pulvirenti, T., Sallese, M., Tete, S., et al.** (2009). Group IV Phospholipase A2 $\alpha$  Controls the Formation of Inter-Cisternal Continuities Involved in Intra-Golgi Transport. *PLoS Biology* **7**, e1000194.
- Pizarro, T. T., Arseneau, K. O., Bamias, G. and Cominelli, F.** (2003). Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 218–222.
- Poggioli, G., Laureti, S., Campieri, M., Pierangeli, F., Gionchetti, P., Ugolini, F., Gentilini, L., Bazzi, P., Rizzello, F. and Coscia, M.** Infliximab in the treatment of Crohn's disease. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **8**.
- Rabouille, C. and Linstedt, A. D.** (2016). GRASP: A Multitasking Tether. *Front Cell Dev Biol* **4**, 1.
- Rahier, J. F., Magro, F., Abreu, C., Armuzzi, A., Ben-Horin, S., Chowers, Y., Cottone, M., de Ridder, L., G., D., Ehehalt, R., et al.** (2014). Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis* **8**, 443–468.
- Raiborg, C., Wenzel, E. M., Pedersen, N. M., Olsvik, H., Schink, K. O., Schultz, S. W., Vietri, M., Nisi, V., Bucci, C., Brech, A., et al.** (2015). Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature* **520**, 234–238.
- Rampart, M., De Smet, W., Fiers, W. and Herman, A. G.** (1989). Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **169**, 2227–2232.
- Rapoport, T. A.** (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**, 663–669.
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1997). Complementation Cloning of S2P, a Gene Encoding a Putative Metalloprotease Required for Intramembrane Cleavage of SREBPs. *Molecular Cell* **1**, 47–57.
- Reichardt, P.** (2018). The Story of Imatinib in GIST - a Journey through the Development of a Targeted Therapy. *Oncol Res Treat* **41**, 472–477.
- Revelo, N. H., ter Beest, M. and van den Bogaart, G.** (2019). Membrane trafficking as an active regulator of constitutively secreted cytokines. *Journal of Cell Science* **133**, jcs234781.
- Rivera, V. M., Wang, X., Wardwell, S., Courage, N. L., Volchuk, A., Keenan, T., Holt, D. A., Gilman, M., Orci, L., Cerasoli, F., et al.** (2000). Regulation of Protein Secretion Through Controlled Aggregation in the Endoplasmic Reticulum. *Science* **287**, 826–830.
- Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M. and Rios, R. M.** (2009). Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *The EMBO Journal* **28**, 1016–1028.

- Ronkina, N., Menon, M. B., Schwermann, J., Tiedje, C., Hitti, E., Kotlyarov, A. and Gaestel, M.** (2010). MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: Complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. *Biochemical Pharmacology* **80**, 1915–1920.
- Rot, A. and von Andrian, U. H.** (2004). CHEMOKINES IN INNATE AND ADAPTIVE HOST DEFENSE: Basic Chemokine Grammar for Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 891–928.
- Roux, P. P. and Blenis, J.** (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320–344.
- Ruggiano, A., Foresti, O. and Carvalho, P.** (2014). Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol* **204**, 869–879.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K. and Geginat, J.** (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **21**, 331–344.
- Sabio, G. and Davis, R. J.** (2014). TNF and MAP kinase signaling pathways. *Semin Immunol* **26**, 237–245.
- Sanchez-Muñoz, F., Dominguez-Lopez, A. and Yamamoto-Furusho, J. K.** (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *WJG* **14**, 4280.
- Sandborn, W. J., Rutgeerts, P., Enns, R., Hanauer, S. B., Colombel, J.-F., Panaccione, R., D’Haens, G., Li, J., Rosenfeld, M. R., Kent, J. D., et al.** (2007a). Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* **146**, 829–838.
- Sandborn, W. J., Hanauer, S. B., Rutgeerts, P., Fedorak, R. N., Lukas, M., MacIntosh, D. G., Panaccione, R., Wolf, D., Kent, J. D., Bittle, B., et al.** (2007b). Adalimumab for maintenance treatment of Crohn’s disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* **56**, 1232–1239.
- Sandborn, W. J., Abreu, M. T., D’Haens, G., Colombel, J.-F., Vermeire, S., Mitchev, K., Jamoul, C., Fedorak, R. N., Spehlmann, M. E., Wolf, D. C., et al.** (2010). Certolizumab Pegol in Patients With Moderate to Severe Crohn’s Disease and Secondary Failure to Infliximab. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **8**, 688–695.e2.
- Sands, B. E., Anderson, F. H., Bernstein, C. N., Chey, W. Y., Feagan, B. G., Fedorak, R. N., Kamm, M. A., Korzenik, J. R., Lashner, B. A., Onken, J. E., et al.** (2004). Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn’s disease. *N Engl J Med* **350**, 876–885.
- Saraste, J. and Kuismanen, E.** (1984). Pre- and post-golgi vacuoles operate in the transport of semliki forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* **38**, 535–549.
- Sartor, R. B.** (2006). Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **3**, 390–407.
- Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., et al.** (2007). The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* **448**, 366–369.
- Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S. and Colombel, J.-F.** (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* **55**, 749–753.
- Schink, K. O., Tan, K.-W. and Stenmark, H.** (2016). Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **32**, 143–171.

- Schwarz, D. S. and Blower, M. D.** (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* **73**, 79–94.
- Scott, L. J.** (2017). Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* **77**, 1865–1879.
- Seidah, N. G., Mowla, S. J., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Benjannet, S., Touré, B. B., Basak, A., Munzer, J. S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., et al.** (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1321–1326.
- Semaan, N., Frenzel, L., Alsaleh, G., Suffert, G., Gottenberg, J.-E., Sibilia, J., Pfeffer, S. and Wachsmann, D.** (2011). miR-346 Controls Release of TNF- $\alpha$  Protein and Stability of Its mRNA in Rheumatoid Arthritis via Tristetraprolin Stabilization. *PLoS ONE* **6**, e19827.
- Shurety, W., Merino-Trigo, A., Brown, D., Hume, D. A. and Stow, J. L.** (2000). Localization and Post-Golgi Trafficking of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Macrophages. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **20**, 427–438.
- Smolen, J. S., Kay, J., Landewé, R. B. M., Matteson, E. L., Gaylis, N., Wollenhaupt, J., Murphy, F. T., Zhou, Y., Hsia, E. C. and Doyle, M. K.** (2012). Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis who have previous experience with tumour necrosis factor inhibitors: results of a long-term extension of the randomised, double-blind, placebo-controlled GO-AFTER study through week 160. *Ann Rheum Dis* **71**, 1671–1679.
- Stanifer, M. L., Guo, C., Doldan, P. and Boulant, S.** (2020). Importance of Type I and III Interferons at Respiratory and Intestinal Barrier Surfaces. *Frontiers in Immunology* **11**.
- Stanley, P.** (2011). Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a005199.
- Stanley, A. C. and Lacy, P.** (2010). Pathways for Cytokine Secretion. *Physiology* **25**, 218–229.
- Steenholdt, C., Palarasah, Y., Bendtzen, K., Teisner, A., Brynskov, J., Teisner, B. and Nielsen, C. H.** (2013). Pre-existing IgG antibodies cross-reacting with the Fab region of infliximab predict efficacy and safety of infliximab therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **37**, 1172–1183.
- Stoecklin, G., Lu, M., Rattenbacher, B. and Moroni, C.** (2003). A Constitutive Decay Element Promotes Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Degradation via an AU-Rich Element-Independent Pathway. *Mol Cell Biol* **23**, 3506–3515.
- Stone, K. D., Prussin, C. and Metcalfe, D. D.** (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S73–S80.
- Stow, J. L., Manderson, A. P. and Murray, R. Z.** (2006). SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* **6**, 919–929.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S.** (2003). Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376.
- Targan, S. R. and RUTGEERTS, PAUL J.** (1997). A Short-Term Study of Chimeric Monoclonal Antibody cA2 to Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  for Crohn's Disease. *The New England Journal of Medicine*.
- Taylor, G. A., Carballo, E., Lee, D. M., Lai, W. S., Thompson, M. J., Patel, D. D., Schenkman, D. I., Gilkeson, G. S., Broxmeyer, H. E., Haynes, B. F., et al.** A Pathogenetic Role for TNF $\alpha$  in the Syndrome of Cachexia, Arthritis, and Autoimmunity Resulting from Tristetraprolin (TTP) Deficiency. *Tumor Necrosis Factor* **10**.

- ten Hove, T., van Montfrans, C., Peppelenbosch, M. P. and van Deventer, S. J. H.** (2002). Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* **50**, 206–211.
- Theiss, A. L., Simmons, J. G., Jobin, C. and Lund, P. K.** (2005). Tumor Necrosis Factor (TNF)  $\alpha$  Increases Collagen Accumulation and Proliferation in Intestinal Myofibroblasts via TNF Receptor 2. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 36099–36109.
- Tian, Y., Pate, C., Andreolotti, A., Wang, L., Tuomanen, E., Boyd, K., Claro, E. and Jackowski, S.** (2008). Cytokine secretion requires phosphatidylcholine synthesis. *Journal of Cell Biology* **181**, 945–957.
- Tie, H. C., Ludwig, A., Sandin, S. and Lu, L.** (2018). The spatial separation of processing and transport functions to the interior and periphery of the Golgi stack. *eLife* **7**, e41301.
- Tili, E., Michaille, J.-J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A., et al.** (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *J Immunol* **179**, 5082–5089.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F. and Peyrin-Biroulet, L.** (2017). Crohn's disease. *The Lancet* **389**, 1741–1755.
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. and Tak, P. P.** (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* **117**, 244–279.
- Trucco, A., Polishchuk, R. S., Martella, O., Pentima, A. D., Fusella, A., Giandomenico, D. D., Pietro, E. S., Beznoussenko, G. V., Polishchuk, E. V., Baldassarre, M., et al.** (2004). Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat Cell Biol* **6**, 1071–1081.
- Turvey, S. E. and Broide, D. H.** (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S24–S32.
- Underhill, D. M. and Ozinsky, A.** (2002). Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 825–852.
- Van den Brande, J. M. H., Koehler, T. C., Zelinkova, Z., Bennink, R. J., te Velde, A. A., ten Cate, F. J. W., van Deventer, S. J. H., Peppelenbosch, M. P. and Hommes, D. W.** (2007). Prediction of antitumour necrosis factor clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease. *Gut* **56**, 509–517.
- Van Deventer, S. J.** (1997). Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* **40**, 443–448.
- van Dullemen, H. M., van Deventer, S. J. H., Hommes, D. W., Bijl, H. A., Jansen, J., Tytgat, G. N. J. and Woody, J.** (1995). Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* **109**, 129–135.
- Vande Casteele, N., Breynaert, C., Vermeire, S., Rutgeerts, P. J., Gils, A. and Van Assche, G.** (2011). Incidence of acute severe infusion reactions to infliximab depends on definition used rather than assay. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **34**, 401–403.
- Vande Casteele, N., Gils, A., Singh, S., Ohrmund, L., Hauenstein, S., Rutgeerts, P. and Vermeire, S.** (2013). Antibody Response to Infliximab and its Impact on Pharmacokinetics can be Transient. *American Journal of Gastroenterology* **108**, 962–971.
- Vedrenne, C., Klopfenstein, D. R. and Hauri, H.-P.** (2005). Phosphorylation Controls CLIMP-63-mediated Anchoring of the Endoplasmic Reticulum to Microtubules. *Mol Biol Cell* **16**, 1928–1937.

- Verboogen, D. R. J., González Mancha, N., ter Beest, M. and van den Bogaart, G.** (2017). Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy reveals rerouting of SNARE trafficking driving dendritic cell activation. *eLife* **6**, e23525.
- Vermeire, S., Van Assche, G. and Rutgeerts, P.** (2009). Serum sickness, encephalitis and other complications of anti-cytokine therapy. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **23**, 101–112.
- von Heijne, G.** (2006). Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 909–918.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P.** (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45–65.
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G. and Yin, H. L.** (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299–310.
- Weston, C. R. and Davis, R. J.** The JNK signal transduction pathway. 8.
- Wilson, D. S., Keefe, A. D. and Szostak, J. W.** (2001). The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 3750–3755.
- Winzen, R., Gowrishankar, G., Bollig, F., Redich, N., Resch, K. and Holtmann, H.** (2004). Distinct Domains of AU-Rich Elements Exert Different Functions in mRNA Destabilization and Stabilization by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase or HuR. *Mol Cell Biol* **24**, 4835–4847.
- Wise, R. J., Barr, P. J., Wong, P. A., Kiefer, M. C., Brake, A. J. and Kaufman, R. J.** (1990). Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9378–9382.
- Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Ludwiczek, S., Enrich, B., Gastl, G., Weiss, G. and Tilg, H.** (2005). The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF- $\alpha$  production in vitro and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13622–13627.
- Wu, B. and Guo, W.** (2015). The Exocyst at a Glance. *Journal of Cell Science* **128**, 2957–2964.
- Wynn, T. A.** (2003). IL-13 Effector Functions. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 425–456.
- Xiong, J. and Goeddel, D. V.** The TNF Receptor I-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF-KB Activation. 10.
- Yamada, Y. and Cancelas, J. A.** (2010). FIP1L1/PDGFR alpha-associated systemic mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* **152 Suppl 1**, 101–105.
- Yapali, S. and Hamzaoglu, H. over** (2007). Anti-TNF Treatment in Inflammatory Bowel Disease. *Annals of Gastroenterology*.
- Yarilina, A., Park-Min, K.-H., Antoniv, T., Hu, X. and Ivashkiv, L. B.** (2008). TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol* **9**, 378–387.
- Yarur, A. J. and Rubin, D. T.** (2015). Therapeutic Drug Monitoring of Anti-tumor Necrosis Factor Agents in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **21**, 1709–1718.
- Yokota, S., Miyamae, T., Imagawa, T., Iwata, N., Katakura, S., Mori, M., Woo, P., Nishimoto, N., Yoshizaki, K. and Kishimoto, T.** (2005). Therapeutic efficacy of

humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* **52**, 818–825.

**Yoshida, Y. and Tanaka, T.** (2014). Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Int* **2014**, 698313.

**Zarubin, T. and Han, J.** (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* **15**, 11–18.

**Zimmermann, J., Buchdunger, E., Mett, H., Meyer, T., Lydon, N. B. and Traxler, P.** (1996). Phenylamino-pyrimidine (PAP) — derivatives: a new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **6**, 1221–1226.

*(Dorransoro et al., 2020)*

## RÉSUMÉ

---

Alors qu'il est essentiel pour lutter contre les agents pathogènes, TNF (Tumor Necrosis factor) secrété en excès devient nocif pour l'organisme comme dans le cas de maladies inflammatoires chroniques (polyarthrite rhumatoïde ou maladie de Crohn). Les thérapies actuelles sont basées sur des injections récurrentes d'anti-TNF contre lesquelles 30% des patients développent une résistance. Il existe donc un fort besoin de composés chimiques réduisant la sécrétion de TNF. Nous avons exploité la diversité des voies de sécrétion dépendantes de l'appareil de Golgi pour identifier des molécules inhibant spécifiquement la sécrétion de TNF. L'outil RUSH (Retention Using Selective Hooks) a permis la synchronisation et l'analyse du transport de TNF dans les cellules HeLa. En combinant le test RUSH à un criblage phénotypique différentiel de banques chimiques, 85 molécules inhibant le transport de TNF ont été sélectionnées. Les effets de certaines molécules ont été validés. Seules les molécules inhibantes au moins 40% de la sécrétion de TNF ont été retenues. La spécificité de ces molécules sur le transport d'autres protéines, à savoir EGFP-GPI et IL-6 a été évaluée. Les 14 molécules inhibantes plutôt spécifiquement la sécrétion de TNF ont été retenues pour poursuivre leur caractérisation en modèle physiologique. Les effets des molécules sur la sécrétion endogène de TNF et d'autres cytokines ont été mesurés dans des monocytes et des macrophages primaires humains issus du sang de donneurs après incubation avec du lipopolysaccharide (LPS) bactérien. Ces expériences en modèles physiologiques ont mis en évidence trois molécules capables d'inhiber significativement la sécrétion endogène de TNF sans affecter la sécrétion d'IL-8. Des expériences de dose-réponse et l'évaluation des effets des molécules sur l'expression de TNF ont été réalisées pour aider dans la compréhension du mode d'action de ces molécules.

En conclusion, le criblage chimique, les expériences en modèle hétérologue puis en modèles physiologiques ont permis d'identifier 3 molécules inhibant la sécrétion de TNF. Ces résultats confirment que la diversité des voies sécrétoires est suffisamment grande pour cibler le transport d'une protéine impliquée dans une maladie et pourraient ouvrir la voie à des traitements alternatifs ou complémentaires contre les maladies inflammatoires.

## MOTS CLÉS

---

Facteur de nécrose tumorale (TNF), Inflammation, Trafic intracellulaire, Molécules chimiques, Biologie cellulaire

## ABSTRACT

---

While it is essential to fight against pathogens, TNF (Tumor Necrosis factor) secreted in excess becomes harmful to the body as in the case of chronic inflammatory diseases (rheumatoid arthritis or Crohn's disease). Current therapies are based on recurrent injections of anti-TNF against which 30% of patients develop resistance. There is therefore a strong need for chemical compounds which reduce the secretion of TNF. We have exploited the diversity of secretory pathways dependent on the Golgi apparatus to identify molecules that specifically inhibit TNF secretion. The RUSH (Retention Using Selective Hooks) tool allowed the synchronization and analysis of TNF transport in HeLa cells. By combining the RUSH assay with a differential high content screening of chemical libraries, 85 molecules inhibiting TNF transport were selected. The effects of certain molecules have been validated. Only molecules inhibiting at least 40% of TNF secretion were retained. The specificity of these molecules on the transport of other proteins, namely EGFP-GPI and IL-6 was evaluated. The 14 molecules rather specifically inhibiting the secretion of TNF were selected to continue their characterization in a physiological model. The effects of the molecules on the endogenous secretion of TNF and other cytokines were measured in human primary monocytes and macrophages obtained from blood donors after incubation with bacterial lipopolysaccharide (LPS). These experiments in physiological models have demonstrated three molecules capable of significantly inhibiting the endogenous secretion of TNF without affecting the secretion of IL-8. Dose-response experiments and the evaluation of the effects of molecules on the expression of TNF have been carried out to help in understanding the mode of action of these molecules.

In conclusion, the chemical screening, the experiments in heterologous model then in physiological models made it possible to identify 3 molecules inhibiting the secretion of TNF. These results confirm that the diversity of secretory pathways is large enough to target the transport of a protein involved in a disease and could open the way to alternative or complementary treatments against inflammatory diseases.

## KEYWORDS

---

Tumor Necrosis Factor, Inflammation, Intracellular traffic, Chemical molecules, Cell Biology