

**UNIVERSITE PARIS XIII – SORBONNE PARIS CITE**  
**UFR DE SANTE-MEDECINE-BIOLOGIE HUMAINE**

Année 2018

**THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XIII**

Discipline : Biologie, Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Mécanismes impliqués dans l'activité pro- et anti-inflammatoire des**  
**“Neutrophil Extracellular Traps“ :**  
**implications physiopathologiques dans la polyarthrite rhumatoïde**

Présentée par

**Sarra Sabrina SENINET**

Soutenue publiquement le 29 Août 2018

Jury constitué de

<b>Pr Sylvie CHOLLET-MARTIN</b> (Université Paris Sud)	Rapporteur
<b>Pr Hubert MAROTTE</b> (Université Jean-Monnet de St Etienne)	Rapporteur
<b>Dr Laura GARDANO</b> (Université Paris XIII)	Examineur
<b>Dr Jean-Pierre LEVRAUD</b> (Institut Pasteur de Paris)	Examineur
<b>Pr Patrice DECKER</b> (Université Paris XIII)	Directeur de thèse



**UNIVERSITE PARIS XIII – SORBONNE PARIS CITE**  
**UFR DE SANTE-MEDEGINE-BIOLOGIE HUMAINE**

Année 2018

**THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XIII**

Discipline : Biologie, Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Mécanismes impliqués dans l'activité pro- et anti-inflammatoire des**  
**“Neutrophil Extracellular Traps“ :**  
**implications physiopathologiques dans la polyarthrite rhumatoïde**

Présentée par

**Sarra Sabrina SENINET**

Soutenue publiquement le 29 Août 2018

Jury constitué de

<b>Pr Sylvie CHOLLET-MARTIN</b> (Université Paris Sud)	Rapporteur
<b>Pr Hubert MAROTTE</b> (Université Jean-Monnet de St Etienne)	Rapporteur
<b>Dr Laura GARDANO</b> (Université Paris XIII)	Examineur
<b>Dr Jean-Pierre LEVRAUD</b> (Institut Pasteur de Paris)	Examineur
<b>Pr Patrice DECKER</b> (Université Paris XIII)	Directeur de thèse



*Je dédie cette thèse à mes très chers parents.*

*Aucune dédicace, ni mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte.*

*Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'étude, de longs mois de distance de votre amour et de votre tendresse.*

*Loin de vous, votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie.*

*Chaque lettre de cette thèse vous exprime la reconnaissance et le remerciement d'être ma Mamouna et mon Papouné d'amour.*

*A ma petite sœur, ma Khouti, ma meilleure amie que je ne cesserai jamais de protéger, merci pour toutes ces heures passer à la mise en page de ce lourd manuscrit.*

*A mon âme sœur, mon Mamoure, mon confident pour toujours, à toi qui a supporté mes caprices, merci d'avoir toujours su me redonner le sourire.*

*Sarra Sabrina SENINET*

# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Sylvie CHOLLET-MARTIN, le Pr. Hubert MAROTTE, le Dr. Laura GARDANO et le Dr. Jean-Pierre LEVRAUD d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, qui est venue empiéter sur leurs vacances.

Je remercie le Pr. Marie-Christophe BOISSIER de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire en tant que jeune stagiaire de Master et d'en ressortir plus mûre, en tant que docteure armée pour continuer ce long chemin qu'est la vie.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, le Pr. Patrice DECKER de m'avoir accompagné tout au long de ces années. Je te remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir laissé libre cours à mon imagination concernant les nombreuses interrogations scientifiques que je me posais constamment. Merci d'avoir toujours su me répondre.

Je remercie le Dr. Elodie SEGURA de sa collaboration active au cours de mon travail de thèse, grâce à elle les travaux sur les cellules dendritiques et les macrophages pro-inflammatoires ont pu être réalisés.

Je remercie les grands chercheurs du laboratoire, le Pr. Natacha BESSIS, qui sera à mes yeux un modèle à suivre, le Dr. Éric ASSIER, avec qui j'ai reçu les meilleurs enseignements en Immunologie, le Dr. Jerome BITON, pour ces conseils judicieux, le Dr. Luca SEMERANO et le Dr. Gaëlle CLAVEL.

Je remercie les piliers du laboratoire que sont nos belles ingénieures, Magali BRECKLER, pour sa gentillesse et son rire contagieux, honorée d'être sa BFF à jamais, Roxane HERVE, un Larousse sur pieds, qui m'étonnera toujours par sa culture générale, Delphine LEMEITER, la maman bienveillante et le couteau suisse du laboratoire, et Mylène PETIT, grâce à qui j'ai toujours eu mes prélèvements très tôt et mangé les meilleurs brookies de Paris.

Je remercie Matthieu RIBON, l'ancien thésard qui m'a cédé le flambeau des "NET", pour sa formation qui m'a permis d'être autonome en un temps record.

Je tiens à remercier mes camarades "les thésards" qui sont devenus mes amis, Maxime BATIGNES, le rock and roll de service, François SANTINON, le politicien, Elies RE, le diététicien, Dyhia MELBOUCI, l'émotive, Kirari, mon petit panda, Johanna et notre dernière recrue Majda-Lyna MEBREK, le petit bébé. Grâce à eux, l'ambiance au laboratoire était comparable à des jours de vacances.

Je tiens à remercier l'intégralité du personnel du service de rhumatologie de l'hôpital Avicenne ainsi que l'équipe de l'établissement du sang de Bobigny.

## Résumé

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique et auto-immune, caractérisée par la production d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) et l'infiltration dans la synovite rhumatoïde de neutrophiles (PNN), macrophages (MΦ), cellules dendritiques (DC),.... Parmi ces cellules infiltrées, nous distinguons les PNN qui participent à la pathogénèse de la PR via la production de cytokines, d'espèces réactives de l'oxygène mais aussi comme suggéré récemment via la libération (NETose) de "Neutrophil Extracellular Traps" (NET), un filet de chromatine associé aux protéines des granules et cytoplasmiques. En effet, il a été rapporté que le liquide synovial de patients PR induisait la NETose des PNN et que les ACPA reconnaissaient les protéines citrullinées portées par les NET. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les NET déclenchent ou perpétuent le processus inflammatoire dans la PR restent peu clairs. Par conséquent, nous avons analysé les propriétés antigéniques et immunogènes des NET sur les cellules myéloïdes impliquées dans la PR. Nous avons montré que les PNN de PR produisent plus de NET et ces derniers sont plus actifs. Les NET sont pro-inflammatoires sur les PNN, les MΦ mais aussi sur les monocytes et les DC au repos en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8. Par ailleurs, les NET sont reconnus par les immunoglobulines de patients PR contenant des ACPA mais l'activation des cellules cibles (PNN et MΦ) par les NET est indépendante de leur reconnaissance par ces ACPA ou le récepteur de type Toll 9. Par contre, le C1q et le LL-37 favorisent la reconnaissance des NET par les MΦ. Par ailleurs, en fonction de l'état d'activation des cellules et du type cellulaire, les NET peuvent présenter un rôle anti-inflammatoire qui est observé sur les cellules activées par LPS. Néanmoins, malgré leur possible effet immunomodulateur, les NET agissent préférentiellement sur les MΦ M1 pro-inflammatoires et les activent, confirmant le rôle des NET dans le maintien de l'inflammation observée lors de la PR.

**Mots-clés:** Neutrophil Extracellular Traps, Neutrophiles, Macrophages, Polyarthrite rhumatoïde, Inflammation.

## Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory and autoimmune disease, characterized by the production of antibodies against citrullinated proteins (ACPA) and infiltration of synovial compartment by neutrophils (PMN), macrophages (MΦ), dendritic cells (DC)... Among these infiltrated cells, we distinguish PMN that participate in the pathogenesis of RA via the production of cytokines, reactive oxygen species, but also via the release (NETosis) of Neutrophil Extracellular Traps (NET), a network of chromatin associated with proteins from cytoplasm and granules. Indeed, it has been reported that synovial fluid of RA patients induce NETosis of PMN and that ACPA recognize citrullinated proteins carried by NET. Nevertheless, the mechanisms by which NET trigger or perpetuate the inflammatory process in RA remain unclear. Therefore, we analyzed the antigenic and immunogenic properties of NET on myeloid cells involved in RA. We have shown that RA PMN produce more NET and these NET are more active. NET are pro-inflammatory on resting PMN, MΦ but also on monocytes and DC by inducing the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-8. Moreover, NET are recognized by ACPA but the activation of the target cells (PMN and MΦ) by NET is independent of their recognition by these ACPA and Toll like receptor 9. On the contrary, the C1q and the LL-37 favor the recognition of NET by MΦ. Moreover, depending on the activation state of the cells and the cell type, NET exhibit also an anti-inflammatory role which is observed on LPS-activated MΦ. Nevertheless, despite their possible immunomodulatory effect, NET preferentially act on pro-inflammatory M1 MΦ to induce activation, confirming the role of NET in maintaining the inflammation observed during RA.

**Key words:** Neutrophil Extracellular Traps, Neutrophils, Macrophages, Rheumatoid arthritis, Inflammation.



# Table des matières

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
A. Polyarthrite Rhumatoïde .....	2
1. Introduction.....	2
2. Historique .....	3
3. Aspect clinique et diagnostique de la PR .....	5
4. Facteurs de risque de la PR .....	6
a) Facteurs génétiques.....	6
(1) Gène HLA .....	6
(2) Gène PADI4 .....	8
(3) Gène PTPN22.....	8
(4) Autres gènes.....	9
b) Facteurs environnementaux et comportementaux.....	10
(1) Infections .....	11
(2) Tabagisme .....	12
c) Facteurs hormonaux.....	14
5. Traitement de la PR.....	15
a) DMARD.....	16
(1) DMARD synthétiques conventionnels .....	18
(2) DMARDs synthétiques ciblés .....	18
(3) DMARDs biologiques .....	19
(a) Inhibiteurs du TNF .....	19
(b) Inhibiteurs de l'IL-1 $\beta$ .....	19
(c) Inhibiteurs du récepteur de l'IL-6.....	20
(d) Inhibiteurs de la costimulation des lymphocytes T .....	20
(e) Inhibiteurs des cellules B .....	20
b) AINS.....	21
c) Stéroïdes.....	21
d) Arrêt du traitement .....	21
e) Effets indésirables associés.....	22
6. Modèles animaux.....	23
a) Modèles d'arthrite induite.....	24

(1) Arthrite expérimentale au collagène.....	24
(2) Arthrite induite par adjuvants .....	27
(3) Arthrite induite par l'albumine méthylée de sérum bovin.....	28
(4) Arthrite induite par anti-CII (Collagen-Antibody-Induced Arthritis CAIA))	28
(5) Modèle HLA-Tg.....	29
b) Modèles d'arthrite spontanée.....	31
(1) Modèle TNF-Tg.....	31
(2) Modèle SKG.....	32
(3) Modèle K/BxN.....	33
<b>B. Immunophysiopathologie de la PR.....</b>	<b>34</b>
1. Introduction.....	34
2. Cytokines.....	35
3. Immunité adaptative .....	36
4. Immunité innée.....	41
a) Médiateurs solubles de l'immunité innée .....	41
(1) Complément.....	41
(a) Voies d'activation.....	42
(b) Pathologies liées au complément.....	45
(c) Régulateurs de la cascade du complément.....	45
(d) C1q.....	46
(e) Complément et PR.....	54
(2) Peptides antimicrobiens : LL-37 .....	58
(a) LL-37 dans la PR et autres pathologies.....	60
(b) Effets du LL-37 sur les PNN.....	63
(c) Effet du LL-37 sur les MΦ .....	64
b) Récepteurs et complexes protéiques de l'immunité innée .....	66
(1) Récepteurs : Récepteurs de type Toll .....	66
(a) TLR dans les maladies inflammatoires.....	70
(i) Lupus érythémateux disséminé .....	70
(ii) Psoriasis .....	71
(iii) Polyarthrite rhumatoïde .....	72
1. TLR de surface dans la PR .....	73

2.	TLR endosomaux dans la PR .....	75
3.	Ligands endogènes des TLR dans la PR .....	77
(2)	Complexes protéiques : Inflammasome.....	80
(a)	NLRP3.....	83
(b)	AIM2.....	85
(c)	Pyrine.....	87
(d)	Inflammasome et PR.....	88
c)	Cellules de l'immunité innée.....	92
(1)	Cellules dendritiques .....	92
(2)	Macrophages.....	96
(a)	Polarisation des macrophages.....	96
(b)	Implication des macrophages dans la PR.....	101
(3)	Neutrophiles .....	105
(a)	Granulopoïèse.....	106
(b)	Sortie des PNN de la moelle osseuse .....	108
(c)	Migration vers les tissus endommagés.....	109
(d)	Clairance des PNN .....	110
(e)	Migration inverse.....	112
(f)	Hétérogénéité des neutrophiles .....	113
(g)	Modes d'action des PNN .....	117
(i)	Activation des PNN .....	117
1.	Récepteurs opsoniques .....	119
2.	Autres récepteurs.....	120
(ii)	Destruction du pathogène.....	123
1.	Phagocytose .....	123
2.	Explosion oxydative .....	124
3.	Dégranulation.....	125
(iii)	Présentation antigénique .....	127
(iv)	Résolution de l'inflammation .....	128
(h)	Exemples de pathologies associées aux PNN .....	129

(i) Athérosclérose .....	129
(ii) Polyarthrite rhumatoïde .....	132
<b>C. NETose .....</b>	<b>136</b>
1. Introduction.....	136
2. NETose suicidaire .....	138
3. Libération des NET sans mort du neutrophile.....	140
4. Autres mécanismes apparentés mais à ne pas confondre avec la NETose .....	142
a) Mitophagie défectueuse.....	142
b) Nécroptose.....	143
c) Hypercitrullination leucotoxique .....	145
5. Inducteurs de la NETose.....	145
6. Voies de signalisation des NET .....	148
a) NETose dépendante de la NADPH Oxydase .....	148
b) NETose indépendante de la NADPH oxydase .....	150
7. Composants des NET .....	150
8. Techniques de détection et de quantification des NET.....	151
9. Fonctions physiologiques des NET .....	153
10. Rôles pathologiques des NET : exemples de maladies inflammatoires .....	155
a) NET dans le psoriasis.....	155
b) NET dans le lupus.....	157
c) NET dans la polyarthrite rhumatoïde .....	160
<b>II. OBJECTIFS.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>III. RESULTAT .....</b>	<b>167</b>
A. Article : Article soumis: les NET exercent une activité pro- et anti-inflammatoires dans la PR qui est modulée par C1q et LL-37 .....	168
B. Article en préparation : .....	221
Les NET activent de manière différentielle les sous-populations de cellules myéloïdes .....	221
<b>IV. DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>241</b>
A. Les NET sont antigéniques et reconnus par les ACPA.....	242

B. Les NET sont immunogènes et induisent la sécrétion d'IL-8, -6 et TNF- $\alpha$ .....	244
C. Les NET sont activateurs de l'inflammasome et induisent la sécrétion d'IL-1 $\beta$ .....	246
D. L'activation par les NET est indépendante du TLR9 et des ACPA mais est favorisée par la combinaison C1q/LL-37 sur les M $\Phi$ seulement .....	248
E. Les NET sont anti-inflammatoires sur les M $\Phi$ activés par LPS, inhibant la sécrétion d'IL-6 et augmentant celle d'IL-10 .....	252
F. Les NET favorisent l'activation des M $\Phi$ pro-inflammatoires M1 et n'agissent pas sur les anti-inflammatoires M2 .....	255
<b>V. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>259</b>

# Liste des figures

Figure 1 : Organes et articulations touchés par la PR (Mahatef, 2014) .....	3
Figure 2 : Facteurs de risque de la PR (Smolen et al., 2016a) .....	10
Figure 3 : Traitements dans la PR (London and UK).....	17
Figure 4 : Modèle d'arthrite expérimentale au collagène (Adapté de (Yang et al., 2017)).....	26
Figure 5 : Immunité adaptative dans la PR (Morel, 2014) .....	40
Figure 6 : Voies d'activation du complément (Merle et al., 2015) .....	44
Figure 7 : Représentation schématique de l'assemblage d'une molécule C1q (Frachet et al., 2015).....	47
Figure 8 : Contributions possibles du système du complément dans le développement de la PR (Okroj et al., 2007) .....	57
Figure 9 : Représentation hélicoïdale en roue de LL-37 (Vandamme et al., 2012).....	59
Figure 10 : Effets immunomodulateurs de LL-37 (Kahlenberg and Kaplan, 2013).....	62
Figure 11 : Voies d'activation des TLR (adapté de (Acheh et al., 2016; Goh and Midwood, 2012)).....	68
Figure 12 : TLR dans le maintien de l'inflammation durant la PR (Roelofs et al., 2008) .....	79
Figure 13 : Représentation des différents types d'inflammasomes et leurs ligands (Sharma and Kanneganti, 2016) .....	82
Figure 14 : Inflammasome NLRP3 (Shao et al., 2015) .....	84
Figure 15 : Activation d'AIM2 par de l'ADN bactérien (Moltke et al., 2013) .....	86
Figure 16 : Implication possible des inflammasomes dans la pathogénèse de la PR (Yang and Chiang, 2015).....	90
Figure 17 : Différence de réponse des DC de patients PR en comparaison aux DC de donneurs sains (Radstake et al., 2005b).....	95
Figure 18 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques contrôlant la polarisation macrophagique (Murray, 2017) .....	98
Figure 19 : Représentation des différentes sous-populations de macrophages (adapté de (Klopfleisch, 2016; Mantovani et al., 2004)).....	100
Figure 20 : Rôle des macrophages dans la PR (Udalova et al., 2016) .....	102
Figure 21 : Cytokines produites par les macrophages M1 et M2 lors de la PR (Wang et al., 2017b).....	104
Figure 22 : Granulopoïèse des PNN (Sollberger et al., 2018) .....	107
Figure 23 : Phénotype des PNN en fonction du temps chez la souris (Rosales, 2018).....	111
Figure 24 : Sous populations de PNN dans le sang périphérique (Scapini and Cassatella, 2014) .....	116

Figure 25 : Mécanismes d'action des PNN au site d'inflammation (adapté de (Wright et al., 2014)).....	118
Figure 26 : Rôle des PNN dans l'athérosclérose (Döring et al., 2017) .....	131
Figure 27 : Rôle des PNN dans l'articulation enflammée (Cascão et al., 2010) .....	135
Figure 28 : NETose induisant la mort du PNN (adapté de (Sørensen and Borregaard, 2016)) .....	139
Figure 29 : Etapes clés de la NETose vitale (Delgado-Rizo et al., 2017) .....	141
Figure 30 : Formation des NET avec / sans ROS (Sollberger et al., 2018).....	149
Figure 31 : Observation des NET par microscopie électronique et immunohistochimie (Brinkmann and Zychlinsky, 2007; Sur Chowdhury et al., 2014) .....	152
Figure 32 : Formation des NET dans les plaques psoriasiques (Delgado-Rizo et al., 2017) .	156
Figure 33 : Pathogénèse du lupus (Mahajan et al., 2016).....	158
Figure 34 : Activation possible de l'inflammasome NLRP3 par les NET durant le LES (Kahlenberg et al., 2013) .....	159
Figure 35 : Les NET activent et ont un effet pro-inflammatoire sur les monocytes CD14+ .	228
Figure 36 : Les NET solubles seuls ou en combinaison avec l'ATP activent la sécrétion d'IL- 1 $\beta$ dans PNN et les M $\Phi$ .....	230
Figure 37 : Les NET favorisent l'effet pro-inflammatoire de la sous population de M $\Phi$ M1 inflammatoire .....	232
Figure 38 : Les NET activent la sécrétion d'IL-1 $\beta$ par les M $\Phi$ M1.....	234
Figure 39 : Les NET induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les M $\Phi$ et les DC pro-inflammatoires.....	236
Figure 40 : Caractérisation des NET murins.....	239
Figure 41 : Le TLR9 n'est pas impliqué dans la reconnaissance des NET .....	240
Figure 42 : Effet des NET sur cellules activées .....	254
Figure 43 : Effet des NET sur cellules au repos.....	257

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Dénominations historiques de la PR (Garrod, 1890) .....	4
Tableau 2 : Récepteurs du C1q (Frachet et al., 2015) .....	49
Tableau 3 : Récepteurs de surface des PNN (Futosi et al., 2013) .....	122
Tableau 4 : Différence entre la NETose, l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose (adapté de (Desai et al., 2016b; Valesini et al., 2015)) .....	144
Tableau 5 : Représentation des différentes étapes des ELISA et dilutions de chaque anticorps et enzymes .....	226



# Liste des abbréviations

AA	- Arthrite adjuvante
Ac	- Anticorps
ACPA	- Anticorps anti protéines citrullinées
ADN	- Acide désoxyribonucléique
ADNmt	- Acide désoxyribonucléique mitochondriale
AEC	- Arthrite expérimente au collagène
Ag	- Antigène
AGE	- "Advanced glycation endproducts"
AHR	- "Aryl hydrocarbon recetor"
AIM	- "Absent in melanoma"
AINS	- Anti inflammatoire non stéroïdien
ALAT	- Alanine amino transférase
Anet	- NET attachés
ApoE	- Apolipoprotéine E
APRIL	- Ligand inducteur de la prolifération
ARNdb	- Acide ribonucléique double brin
ARNm	- Acide ribonucléique messenger
ARNsb	- Acide ribonucléique simple brin
ATP	- Adénosine triphosphate
Auto-Ac	- Auto-anticorps
Auto-Ag	- Auto-antigènes
B lys	- Stimulateur des lymphocytes B
BAFF	- Facteur activateur des cellules B
Bcl-xL	- "B-cell lymphoma-extra large"
BTLA	- "B and T lymphocyte attenuator"
c C1q R	- "Receptor of the C1q collagenous domain"
C1q	- Protéine du complément
C1qR	- Récepteur du C1q
C5xR	- Récepteur aux chimiokines de type 5
Ca <sup>2+</sup>	- Calcium
CAIA	- Collagen antibody induced arthritis
CARD	- Domaine d'activation et de recrutement des caspase
cC1qR	- "Receptor of the C1q collagenous domain"
CCP	- "Cyclic citrullinated protein"
CD	- Cluster de différenciation
CDK	- Kinase dépendante des cyclines
CFA	- Adjuvant complet de Freund
CG	- Cathépsine G
CG	- Cathépsine G
CI	- Complexe immun
CII	- Collagène de type 2
CMH	- Complexe majeur d'histocompatibilité
CNX	- Calnéxine

CPA	- Cellule présentatrice d'antigène
CpG	- C-phosphate-G non méthylé de l'ADN
CR1	- Récepteur du complément
CRP	- Protéine C-réactive
CRT	- Calréticuline
Csk	- Kinase dépendante des cyclines
CTLA4	- "Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4"
CVF	- "Cobra Venom Factor"
DAMP	- Motifs moléculaires associés au danger
DAS	- "Disease activity score"
DC	- Cellule dendritique
DC-SIGN	- "Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin"
DMARD	- Médicament antirhumatismal modificateur de la maladie
DNase I	- Désoxyribonucléase 1
DPI	- Diphenyleneiodonium
DS	- Donneurs sains
DUBA	- Enzyme deubiquitinante A
EAE	- Encéphalite auto-immune expérimentale murine
EBV	- Virus d'Epstein-Barr
ELMO1	- "Engulfment and cell mobility 1"
ERK	- "Extracellular Signal-regulated Kinase-1"
EULAR	- Ligue européenne contre les rhumatismes
FITC	- Fluorescéine isothiocyanate
FLS	- Synoviocytes fibroblastiques
FOXP3	- " Forkhead box P3"
FR	- Facteur rhumatoïde
FPR	- Récepteur du peptide formyle
g C1q R/p33	- "Receptor of the C1q globular region"
G6PI	- Glucose 6 phosphate
GCD	- Granulomatose septique chronique
GGT	- Gamma glutamyl transférase
GM-CSF	- "Granulocyte-Macrophage colony stimulating-factor"
G-MDSC	- Cellules suppressives dérivées des myéloïdes granulocytaires
H2O2	- Peroxyde d'hydrogène
HCg P39	- Glycoprotéine du cartilage humain 39
HERV	- Endovirus
HHV	- Herpes virus humain
HLA	- Antigène des leukocytes humains
HMGB1	- "High mobility group box 1"
HOCl	- acide hypochloreux
HSP	- Protéine du choc thermique
ICAM	- "Intercellular adhesion molecule"
IFA	- Adjuvant incomplete de Freund
IFN	- Interferon
Ig	- Immunoglobuline
IgIV	- Immunoglobuline administrée par voie intraveineuse
IL	- Interleukine
IL-1RA	- Récepteur antagoniste de l'interleukine 1

iNOS	- Oxyde nitrique synthase inductible
IRF	- Facteur régulateur de l'interféron
ITAM	- "Immunoreceptor tyrosine based activation motif"
ITIM	- Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs
JAK	- Janus kinase
JNK	- "Jun N-terminal kinase"
KO	- "Knock out" déficient
LB	- Lymphocyte B
LBH	- "Limb bud and heart"
Lck	- "Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase"
LDG	- Granulocytes de faible densité
LDH	- Lactose déshydrogénase
LDL	- Lipoprotéine de faible densité
LES	- Lupus érythémateux systémique
LL-37	- Cathélicidine
LOS	- Lipooligosaccharide
LPS	- Lipopolysaccharide
LRP1	- Récepteur $\alpha$ 2-macroglobuline
LS	- Liquide synovial
LT	- Lymphocyte T
LTB	- Leucotriène B
LTH	- Hypercitrullination leucotoxique
LTxA	- Leucotoxine A
MAC	- Complexe d'attaque membranaire
MAL	- Adaptateur MyD88 like
MAPK	- Protéines kinases activées par des mitogènes
MASP	- "Mannan-associated serine protase"
MBL	- Lécine liant le mannose
mBSA	- "Methylated bovine serum albumin"
MD2	- Protéine de différenciation myéloïde 2
MDA	- "Melanoma differentiation-associated gene"
mDC	- Cellule dendritique myéloïde
MDSC	- Cellules suppressives dérivées des myéloïdes
MII	- Maladies inflammatoires de l'intestin
MMP	- Métalloprotéases matricielles
MPO	- Myéloperoxidase
mT	- Mitochondrial
MyD88	- Protéine de différenciation myéloïde 88
M $\Phi$	- Macrophages
NADPH	- Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NE	- Neutrophile élastase
NE	- Neutrophile élastase
NET	- "Neutrophil Extracellular Traps"
NH <sub>4</sub> Cl	- Chlorure d'ammonium
NK	- Cellule "Natural killer"
NLR	- "Nucleotide-binding domain Like Receptors"
NOD	- "Nucleotide binding domain"
O <sub>2</sub>	- Oxygène

O2-	- Anion superoxyde
OA	- Arthrose
OLFM4	- Olfactoméline-4
ONOO-	- Peroxynitrite
PAD	- Peptidyl arginine déiminase
PAF	- Facteur d'activation plaquettaire
PAMP	- Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
PBMC	- Cellules mononuclées du sang périphérique
pDC	- Cellule dendritique plasmacytoïde
PE	- Phycoérythrine
PGIA	- Protéoglycane
Pin1	- "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1"
PKC	- Protéine kinase C
PKC	- Protéine kinase C
PMA	- Phorbol myristate acétate
PNN	- Polynucléaire neutrophile
Poly I:C	- Acide polyribocytidylic
PR	- Polyarthrite rhumatoïde
PR3	- Protéinase 3
PRR	- Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PTPN22	- "Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22"
PTX3	- Pentraxine 3
PYD	- Domaine pyrine
R848	- Agoniste du TLR7/8
RAGE	- "Receptor for advanced glycation end products"
RANK	- Récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B
RANKL	- Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B
RAUL	- Activateur de la réplication et de la transcription
RCPG	- Récepteurs couplés aux protéines G
RCPG	- Récepteur couplé aux protéines G
RE	- Réticulum endoplasmique
RIG	- Gène rétinolide inducible
ROS	- Espèce réactive de l'oxygène
RP105	- Radioprotective 105
SAP	- Sérum amyloïde P
SAP	- Protéine sérum amyloïde A
SARM	- Motifs $\alpha$ et armadillo stériles
SCPN	- Sérum carboxypeptidase N
SCW	- Paroi cellulaire de streptocoque
SIGIRR	- "Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor"
sNET	- NET solubles
SNP	- "Single nucleotid polymorphism" polymorphisme nucléotidique
SOCS1	- Suppresseur de la signalisation des cytokines 1
SPF	- "Sérine protéinase factor"
SREC	- Récepteur scavenger exprimé par les cellules endothéliales I
STAT	- Signal de transduction et d'activation de la transcription
SVF	- Sérum de veau foetal
TAG	- TRAM avec le domaine GOLD

TAN	- Neutrophiles associés aux tumeurs
TCR	- Récepteur des cellules T
TCZ	- Tocilizumab
TFAM	- Facteur de transcription A des mitochondries
Tg	- Transgénique
TGF- $\beta$	- Facteur de croissance transformant bêta
Th	- "T helper" T auxiliaire
TLR	- Récepteur de type Toll
TNF	- Facteur de nécrose tumorale
TNFAIF	- Protéine inductrice du TNF- $\alpha$
TP NET	- Tampon de préparation des NET
TRAF	- "Tumor necrosis factor receptor associated factor"
TRAM	- Molécule adaptatrice 2 contenant le domaine TIR
Treg	- Lymphocyte T régulateur
TRIF	- Adaptateur contenant le domaine TIR induisant l'interféron- $\beta$
T $\gamma\delta$	- Lymphocyte T gamma delta
ZAP70	- "Zeta chain associated protein kinase of 70 kDa"



---

# INTRODUCTION

---

# A. Polyarthrite Rhumatoïde

## 1. Introduction

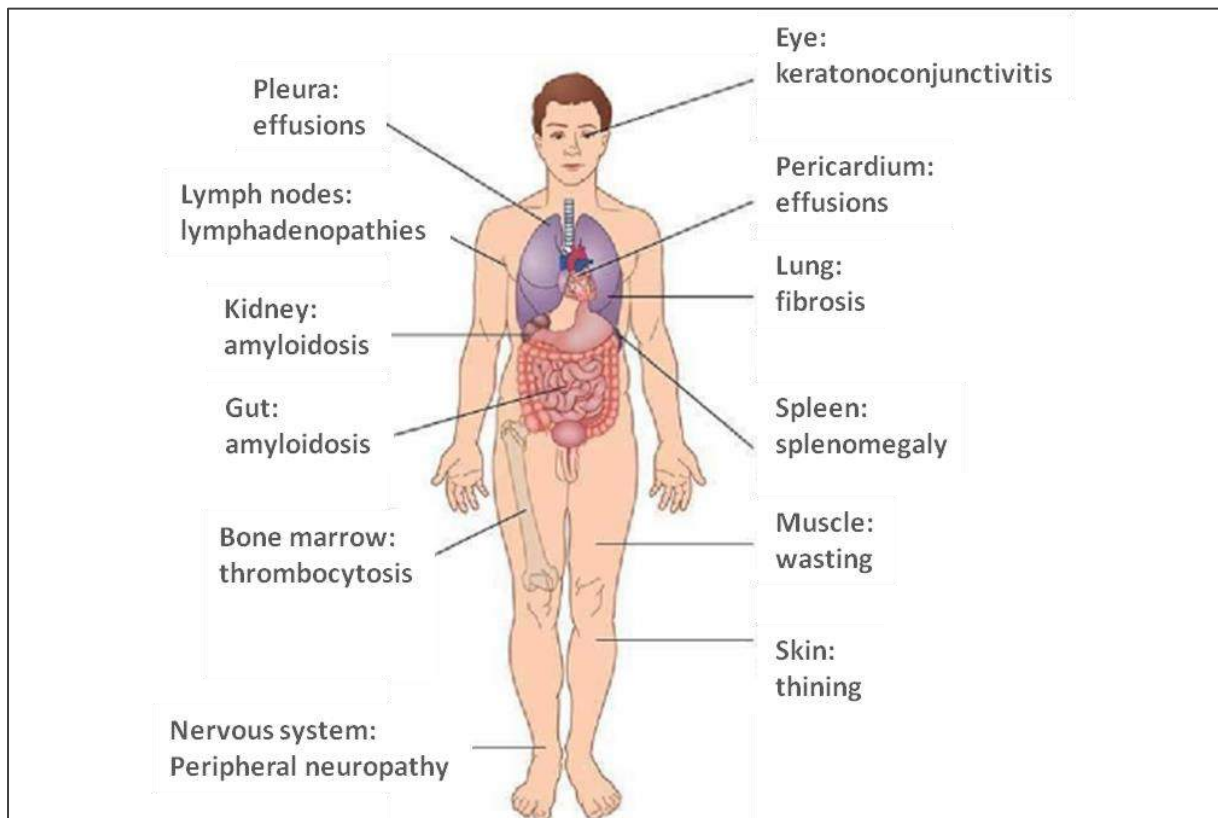
La polyarthrite rhumatoïde (PR) est l'une des maladies inflammatoires chroniques les plus répandues dont l'étiologie est inconnue. Elle implique principalement les articulations, mais devrait être considérée comme un syndrome qui comprend des manifestations systémiques extra-articulaires comme illustré en **Figure 1**, telles que les nodules rhumatoïdes, les atteintes pulmonaires ou vascularites (Smolen et al., 2016a), la morbidité cardiovasculaire, la déficience psychologique, mais aussi le risque de développement de cancer et d'ostéoporose (Firestein, 2014).

Elle est caractérisée par une douleur chronique, une inflammation synoviale, une hyperplasie ("gonflement") et une destruction articulaire (cartilage et os) qui progresse habituellement des articulations distales vers les plus proximales associées à des signes sérologiques d'autoréactivité, une mort précoce, et des coûts socio-économiques élevés (Kourilovitch et al., 2014 ; Schett and McInnes, 2011). On la qualifie également de maladie auto-immune car dans son déclenchement et dans sa pérennisation intervient un dérèglement de l'immunité adaptative avec formation d'auto-anticorps dont le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-protéines carbamylées et anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) (Aletaha et al., 2010; Schett and McInnes, 2011; Shi et al., 2011a). Ces derniers sont présents dans 2/3 des patients et ont une valeur diagnostique et pronostique. Certains ACPA sont pathogènes et les complexes immuns contenant des ACPA reconnaissent le fibrinogène, activent les macrophages (Clavel et al., 2008) et sont donc potentiellement pathogènes. Un dérèglement de l'immunité innée est observé également incluant l'activation des neutrophiles et du complément par des complexes immuns.

De nombreuses études font la distinction entre patients présentant ou pas les ACPA. Par exemple, sur le plan histologique, les patients ACPA-positifs ont plus de lymphocytes dans le tissu synovial, alors que ceux atteints de polyarthrite rhumatoïde ACPA-négative présentent plus de fibrose et une épaisseur accrue de la couche synoviale (van Oosterhout et al., 2008). La PR ACPA<sup>+</sup> est associée à des dommages articulaires accrus et de faibles taux de rémission (Van der Helm-van Mil et al., 2005). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre ACPA et les marqueurs sériques de la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes ; les ostéoclastes expriment les enzymes nécessaires à la citrullination (peptidyl arginine déiminase) et à l'inverse les ACPA induisent leur différenciation et activation (Harre et al., 2012).



La PR est distribuée universellement. Il n'existe pas de zones géographiques ou de groupes ethniques dans lesquels cette maladie n'est pas retrouvée, et sa prévalence ne semble pas varier de manière significative parmi les groupes (Kourilovitch et al., 2014). L'incidence annuelle de la PR est autour de 40/100 000 dans le monde (Klein et al., 2012). Bien que la maladie puisse apparaître à n'importe quel âge, les premiers symptômes surviennent en général vers 40 ans à 60 ans, avec une prépondérance féminine, puisque 4 femmes pour 1 homme sont touchées. Après 60 ans, la fréquence est identique pour les deux sexes (Cutolo, 2007).



*Figure 1 : Organes et articulations touchés par la PR (Mahatef, 2014)*

## 2. Historique

Comme pour la majorité des maladies chroniques, les malformations osseuses caractéristiques de la PR ont été découvertes dans des os datant de plus de 1500 ans avant Jésus Christ, retrouvés dans des ruines de Pompéi, dans le cimetière de l'ancien couvent de Marienthon en Poméranie, dans des sarcophages romains, mais aussi sur des momies égyptiennes de la période Ptoméaïque (Kourilovitch et al., 2014).

Mais l'honneur d'avoir reconnu les caractères distinctifs de cette pathologie revient à Landré Beauvais qui avait décrit la PR sous le nom de goutte asthénique primitive comme étant une des formes de la goutte. De plus, il attira l'attention sur la sensibilité particulière des femmes à

la goutte asthénique, sur l'évolution chronique de la maladie, sur la destruction du cartilage articulaire qu'elle provoque, sur l'élargissement et la déformation des articulations du patient. Ces manifestations ne pouvaient pas être dues aux dépôts tophacés, tels qu'ils se rencontrent dans la goutte réelle (Garrod, 1890).

En 1804, Heberden suggéra qu'il était désirable de séparer cette pathologie des rhumatismes et de la goutte. L'année suivante parut la monographie classique de Haygarth, dans laquelle il indiquait les distinctions qui existent entre la PR et le vrai rhumatisme et décrivait la PR comme étant une maladie prédictive, sous le nom de nodosité des articulations.

Par la suite, le Dr Adams et le Dr Smith ont montré que de nombreux cas de lésions de l'articulation de la hanche, résultant d'une blessure, étaient dus à une PR.

La publication de la thèse de MM Charcot et Trastour en 1853 marque le commencement d'une nouvelle ère dans l'étude de la PR. La position qu'ils occupaient autant qu'internes à la Salpêtrière leur a donné des occasions inégalées d'observer la maladie. Tous deux considéraient l'arthrite rhumatoïde comme une forme de rhumatisme chronique, et leur point de vue s'est toujours maintenu en France, trouvant son expression dans les derniers écrits du professeur Charcot, ainsi que dans les précieux articles encyclopédiques de MM. Besnier et Homolle. Cette vue était fortement soutenue par Garrod, qui a montré que l'excès d'acide urique dans le sang était un trait constant dans la goutte (Garrod, 1890).

Avant d'adopter un nom universel cette pathologie a eu différentes dénominations en fonction des chercheurs. Les plus utilisées sont décrites dans le **Tableau 1**.

Dénomination	Auteur
Rhumatisme chronique des articulations	Todd
Nodosité des articulations	Haygarth
Goutte asthénique primitive	Landré Beauvais
Arthrite rhumatoïde chronique	Adams
Goutte rhumatoïde	
Arthrite rhumatoïde	Garrod
Arthrose	Nomenclature du collège royal des physiciens
Rhumatisme chronique primitif	Charcot et Vidal
Arthrite sèche	Deville et Broca
Rhumatisme nouveau	Trousseau
Arthrite déformante	Virchow

**Tableau 1 : Dénominations historiques de la PR (Garrod, 1890)**

### 3. Aspect clinique et diagnostique de la PR

La PR est une maladie qui conduit à l'inflammation des articulations et à leur destruction. Les douleurs articulaires et les gonflements articulaires touchent en premier lieu les petites articulations des mains et des pieds. Ils touchent fréquemment les poignets et/ou les chevilles, mais aussi les épaules, les coudes, les hanches et/ou les genoux.

Les douleurs articulaires sont de nature inflammatoire, occasionnant des réveils en fin de nuit et une sensation de blocage des articulations le matin au lever, pouvant durer pendant plusieurs heures.

Ce gonflement est dû à l'infiltration de cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes. La membrane synoviale qui entoure l'articulation s'épaissit suite à une division des synoviocytes, formant ainsi un pannus. L'inflammation est maintenue dans l'articulation, car de nouveaux vaisseaux sanguins se forment pour l'irriguer. Toutes ces cellules baignent dans le liquide synovial, dont le rôle physiologique est de lubrifier l'articulation, mais lors d'une inflammation il constitue un milieu favorable (cytokines, complément, anticorps) à la différenciation des ostéoclastes, cellules responsables de la destruction du cartilage et de l'os.

La PR peut s'accompagner aussi d'atteintes extra-articulaires telles que la présence de nodules rhumatoïdes et être associée à d'autres syndromes comme des sécheresses oculaires et buccales (syndrome de Gougerot-Sjögren).

Le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde doit être aussi précoce que possible car c'est au stade du début de la maladie que les traitements ont le plus de chances d'être efficaces.

Afin de faciliter le diagnostic, le rhumatologue peut se référer aux critères mis en place par deux organismes européens ("European League Against Rheumatism") et américains ("American College of rheumatology"), respectivement, l'EULAR/ACR 2010 qui reposent sur le dénombrement des articulations gonflées, la présence d'auto-anticorps (FR et ACPA), des examens radiologiques mais aussi des examens biologiques pour évaluer le taux de CRP et la vitesse de sédimentation (Aletaha et al., 2010; Majithia and Geraci, 2007).

Par ailleurs, l'activité de la PR peut se mesurer à l'aide d'une analyse statistique dite DAS 28 ("Disease Activity Score 28"). Le DAS 28 tient compte de l'évaluation de la douleur et du nombre de synovites sur les 28 sites articulaires proposés par l'EULAR, de la valeur de la vitesse de sédimentation et de l'appréciation globale du patient sur une échelle de 0 à 100.

## 4. Facteurs de risque de la PR

### a) Facteurs génétiques

Les causes exactes de la survenue d'une PR ne sont pas encore totalement comprises. On sait cependant, que comme la majorité des rhumatismes inflammatoires, la PR répond à la définition de maladie complexe ou multifactorielle, résultant non pas de l'effet délétère d'une mutation fonctionnelle dont la fréquence est rare dans la population générale, mais de l'interaction de plusieurs facteurs génétiques avec des facteurs environnementaux. Pris séparément, chaque facteur génétique n'a qu'une contribution modeste au risque génétique global pour une maladie complexe donnée. Ainsi, la difficulté réside dans l'identification des différents facteurs de susceptibilité et la détermination des combinaisons d'allèles de susceptibilité pour lesquelles le risque relatif de développer la maladie sera le plus élevé (Dieudé, 2009).

Il est à noter que les antécédents familiaux augmentent le risque de développer une PR d'environ 3 à 5 fois (Frisell et al., 2013), avec une prévalence chez les personnes apparentées du 1<sup>er</sup> degré à un patient PR de 2-12% (Deighton et al., 1989), alors que dans la population générale, elle varie de 0,2-1% (Deighton et al., 1989). Les taux de concordance sont de 15-30% chez les jumeaux monozygotes et de 5% chez les jumeaux dizygotes, ce qui démontre une implication des facteurs génétiques dans la pathogenèse de la PR (Consortium, 2007).

Pris ensemble, les facteurs génétiques semblent expliquer 50-60% du risque de développer une PR séropositive. Le marqueur génétique de la PR le mieux étudié et le plus influant est sans aucun doute une région du gène *HLA-DRB1* (antigènes des leucocytes humains, chaîne bêta du gène DR), souvent surnommé « épitope partagé ».

#### (1) Gène HLA

L'association génétique entre des gènes localisés dans la région HLA et la PR a été suspectée dès 1976 par Stastny (Stastny, 1976). Vers la fin des années 1980, après séquençage du locus *HLA-DRB1*, Gregersen émit l'hypothèse de l'épitope partagé, comme explication à l'association constatée entre la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et la susceptibilité à la PR (Gregersen et al., 1987).

Dans son hypothèse il suppose une implication directe des molécules HLA-DR dans la physiopathologie de la PR, attribuant l'association HLA-DR et PR à certains allèles de prédisposition dont la particularité est de coder pour une séquence homologue d'acides aminés dans la 3<sup>ème</sup> région hypervariable du premier domaine de la chaîne bêta d'HLA-DR.

Cette séquence, qui concerne les acides aminés en position 70 à 74 (<sup>70</sup>QRRAA<sup>74</sup>, <sup>70</sup>KRRAA<sup>74</sup> ou <sup>70</sup>RRRAA<sup>74</sup>), est codée par les allèles DR4 (DRB1\*0401, 0404 et 0405), DR1 (DRB1\*0101 et 0102) et DR10 (DRB1\*1010) et est associée à la PR (Gregersen et al., 1987).

Les différentes variations génétiques de l'épitope partagé ont en commun de charger positivement une zone du HLA qui permet aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de présenter les peptides antigéniques, ce qui augmente sélectivement leur affinité pour les protéines citrullinées (Hill et al., 2008). Ceci pourrait expliquer l'association connue entre la présence de ce facteur de risque génétique et le développement d'une polyarthrite avec la présence d'ACPA (Klareskog et al., 2006).

L'augmentation du risque chez les patients PR avec l'épitope partagé est liée à la séropositivité pour les ACPA et les auto-anticorps dirigés contre les IgG (FR). Les ACPA sont présents chez 50 à 70% des patients au moment du diagnostic, et reste stable tout au long de la maladie (Nell et al., 2005), alors que l'épitope partagé est associé que rarement aux PR ACPA-négatives et FR-négatives (Viatte et al., 2015).

Il existe une hétérogénéité inter-population dans la susceptibilité génétique des allèles codant pour l'épitope partagé. L'association avec la PR n'est pas retrouvée dans certaines populations, notamment les Afro-Américains et les Hispano-Américains (McDaniel et al., 1995 ; Teller et al., 1996). L'épitope partagé est cependant retrouvé chez de nombreuses personnes qui ne seront jamais touchées par la PR, ce qui plaide en faveur d'une interaction entre ces gènes et des facteurs environnementaux (Linn-Rasker et al., 2006).

Si HLA-DRB1 représente le composant génétique principal de la PR, le locus HLA ne contribue qu'à 30% au risque familial global (Seldin et al., 1999). De plus, il faut noter que près de 40 % de la population générale porte un des allèles HLA-DR de prédisposition à la PR, contre plus de 70 % des malades. Les allèles de susceptibilité HLA-DRB1 ne sont donc ni indispensables, ni suffisants au développement de la PR chez un individu donné.

Depuis 1998, sept criblages du génome ont été réalisés au sein des populations Françaises, Anglaises, Américaines et Japonaises confirmant l'implication du locus HLA dans la susceptibilité génétique de la PR (MacKay et al., 2002 ; Okada et al., 2014 ; Osorio y Fortéa et al., 2004), mais aussi mettant en évidence de nombreux autres gènes prédisposant au développement de la PR (Chibnik et al., 2011). De plus, certaines régions chromosomiques d'intérêt semblent communes à différentes maladies auto-immunes comme la PR, le lupus érythémateux systémique (LES), le diabète insulino-dépendant, le vitiligo, et les dysthyroïdies

auto-immunes, suggérant la participation de facteurs génétiques de susceptibilité communs (Jawaheer et al., 2001).

## **(2) Gène *PADI4***

Le gène codant pour la peptidyl arginine déiminase 4 (*PADI4*) a été identifié comme facteur de susceptibilité à la PR dans la population Asiatique (Ikari et al., 2005 ; Suzuki et al., 2003). Ce gène produit des enzymes qui convertissent l'arginine en citrulline, créant de nouveaux antigènes à l'origine de l'apparition d'auto-anticorps (auto-Ac) spécifiques de la PR que sont les ACPA, comme les anticorps anti-filaggrine (Firestein and McInnes, 2017). La spécificité de tels anticorps pour la PR suggère un rôle important de la citrullination et donc des enzymes PAD dans la physiopathologie de la PR.

De plus, un haplotype de *PADI4* défini par cinq polymorphismes exoniques (*padi4\_89\*A/G*, *padi4\_90\*T/C*, *padi4\_92\*G/C*, *padi4\_94\*T/C* et *padi4\_104\*T/C*) a été identifié comme associé à la PR, car jouerait un rôle fonctionnel en modifiant la stabilité de l'ARNm transcrit (action stabilisante) et serait associé à la présence d'anticorps anti-filaggrine citrullinée chez les patients atteints de PR (Suzuki et al., 2003)

Le risque de développer une PR est deux fois plus important avec un polymorphisme de *PADI4* (*padi4\_94\*T/C*) dans les cohortes Asiatiques et Nord-Américaines (Firestein and McInnes, 2017), alors que de nombreuses études réalisées dans les populations Européennes caucasiennes (Françaises et Anglaises) n'ont pas reproduit ces résultats (Barton et al., 2004 ; Caponi et al., 2005). Toutefois, une récente méta-analyse incluant six populations Européennes a montré qu'un unique variant de *PADI4* (*PADI4\_94*) serait associé à la PR (Lee et al., 2007).

## **(3) Gène *PTPN22***

Au sein des facteurs de susceptibilité non-HLA, un polymorphisme fonctionnel du gène *PTPN22* (R620W) qui code pour la protéine "Tyrosine phosphatase non-receptor 22" a été identifié comme facteur de susceptibilité de la PR, où un résidu tryptophane est substitué par un résidu arginine (Begovich et al., 2004 ; Michou et al., 2007).

Cette substitution induit une mutation dans la protéine *PTPN22*, une phosphatase qui régule Lck ("Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase"), ZAP70 ("Zeta-chain-associated protein kinase 70"), et joue un rôle dans la signalisation du récepteur des lymphocytes T (TCR) (Firestein and McInnes, 2017).

Ainsi, ce polymorphisme a pour conséquence la modification du premier domaine riche en proline de la protéine, qui interagit avec la protéine Kinase Csk (Kinase dépendante des cyclines), altérant probablement une régulation négative de l'activation des lymphocytes T (LT), mais aussi la tolérance dans la périphérie (Bottini et al., 2004).

Ce SNP ("Single nucleotide polymorphism") est également associé à de nombreuses autres maladies à médiation immunitaire, y compris le LES, le diabète de type 1 (Rawlings et al., 2015) et les dysthyroïdies auto-immunes (Velaga et al., 2004)

L'allèle PTPN22 avec cette substitution d'acide aminé (R620W) double le risque de développer une PR chez les patients ACPA<sup>+</sup> mais pas chez les ACPA<sup>-</sup> (Firestein and McInnes, 2017).

L'association entre PTPN22 et la PR a été observée dans de nombreuses populations ; toutefois, il est intéressant de noter que le variant à risque n'a pas été observé dans la population Asiatique (Mori et al., 2005).

#### **(4) Autres gènes**

Plusieurs études ont montré qu'un certain nombre de gènes impliqués dans l'immunité adaptative comportent des SNP associés à la PR dans diverses populations (Yamamoto et al., 2015).

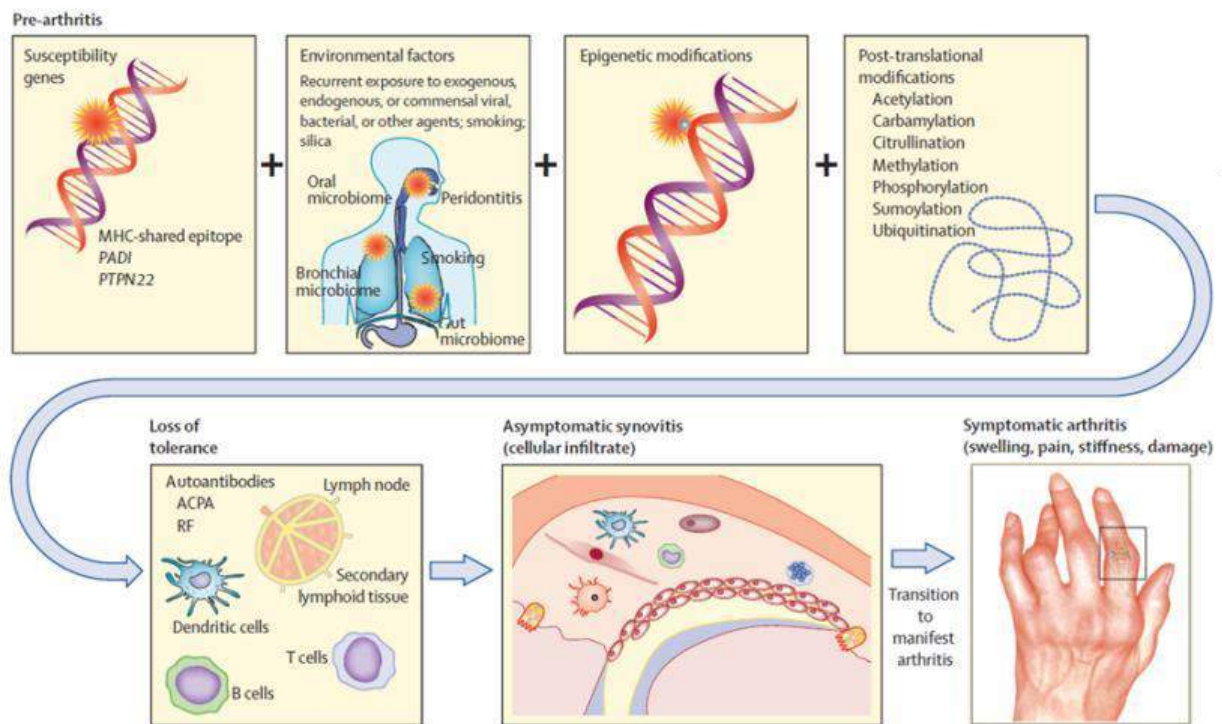
Par exemple, des SNP ont été identifiés dans des gènes codants pour des récepteurs de costimulation tels que CTLA4 (Protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques) et CD28 (Cluster de différenciation 28), et pour les récepteurs Fc (Fragment cristallisable) ont été identifiés, mais aussi dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation telles que *BTLA* ("B- and T-lymphocyte attenuator"), la transduction du signal tels que *TRAF1-C5* ("Tumor necrosis factor-receptor associated factor 1/complement component 5"), la migration cellulaire (*ELMO1* ("Engulfment and cell mobility 1")) et le développement foetal (*LBH* ("Limb-bud-and-heart")) sont également identifiés (Firestein and McInnes, 2017).

Enfin, plusieurs polymorphismes génétiques associés à la PR ont été identifiés dans les loci codant des cytokines tel que le facteur de nécrose tumorale (TNF) (Fonseca et al., 2007) ou les récepteurs de cytokines, comme le récepteur de l'interleukine (IL) 6 (Ferreira et al., 2013)

Le rythme exponentiel de ces études voit chaque mois apparaître de nouveaux facteurs de prédisposition à la PR tels que les gènes *STAT4* (Signal de transduction et d'activation de la transcription 4), *IRF5* (Facteur régulateur de l'interféron 5), *TNFAIP* (Protéine inductrice du TNF- $\alpha$ ) et *CD40* (Gregersen and Olsson, 2009; Plenge, 2009).

## b) Facteurs environnementaux et comportementaux

Il semble possible maintenant de pouvoir dire pour un individu donné s'il est susceptible à développer une PR à l'aide d'une prise de sang et de tests génétiques et sérologiques spécifiques (Chibnik et al., 2011). La précision des tests génétiques seuls reste cependant insuffisante pour qu'ils puissent être utilisés comme moyen de dépistage de la PR. Comme illustré en **Figure 2**, la prédisposition héréditaire de la PR peut être renforcée par différents facteurs environnementaux tels que la pollution de l'air ou certaines infections, des facteurs comportementaux, tels que le tabagisme ou l'alimentation, des facteurs sociaux tels que le niveau socio-économique et éducatif (Callahan and Pincus, 1997; Millar et al., 2013) ou encore des facteurs hormonaux (Oliver and Silman, 2006).



**Figure 2 : Facteurs de risque de la PR (Smolen et al., 2016a)**

**ACPA** : Anticorps anti protéines citrulinées, **MHC** : Complexe majeur d'histocompatibilité, **PADI** : Peptidyl arginine déiminase, **PTPN22** : "Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22", **RF** : Facteur rhumatoïde.

Chez une personne ayant des gènes de susceptibilité à la PR, la présence de certains facteurs environnementaux en plus des modifications épigénétiques et post-traductionnelles peut entraîner une perte de tolérance qui au final conduit à une polyarthrite rhumatoïde.



## (1) Infections

En raison des pics saisonniers de PR, les scientifiques ont suspecté que des infections virales pourraient être un facteur déclenchant de la maladie. A ce jour, les investigations sont restées peu concluantes pour des virus comme le virus d'Epstein-Barr (EBV), les herpesvirus humains (HHV-6), les endovirus (HERV) ou le parvovirus B19 (Costenbader and Karlson, 2006; Draborg et al., 2013)

Néanmoins, plusieurs études ont retrouvé une association entre parodontite (inflammation de la muqueuse buccale) et PR (Hoovestol and Mikuls, 2011), bien que la cause et la nature de cette relation restent mal définie (Scher et al., 2016)

Une hypothèse propose que *Porphyromonas gingivalis* (une bactérie fréquente dans la parodontite) favorise la citrullination aberrante et provoque des ruptures de tolérance aux peptides citrullinés via l'expression endogène de PADI4 dans la muqueuse buccale qui, dans un contexte inflammatoire, pourrait favoriser la génération d'ACPA (Wegner et al., 2010).

Plus récemment, des données ont suggéré que *P. gingivalis* ou d'autres bactéries pourraient agir, en se liant au TLR2 (Aquino et al., 2014). Ce processus pourrait augmenter la production d'IL-1 et stimuler la différenciation locale des lymphocytes T auxiliaires (Th) de type 17. Une étude récente avait identifié qu'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* initie l'hypercitrullination médiée par les neutrophiles (PNN) par l'effet d'une toxine, la leucotoxine A (LtxA), et a été détecté dans le microbiote oral des patients atteints de PR où il pourrait agir comme un déclencheur bactérien de la maladie via la génération de protéines citrullinées (Konig et al., 2016).

La perte de dents sur parodontite a été associée à un doublement du risque de PR (Demmer et al., 2011) et des anticorps dirigés contre *P. gingivalis* sont observés plus fréquemment dans le sang de patients atteints de PR que chez des personnes saines (DS) (Smit et al., 2012).

Comme c'est le cas pour de nombreuses maladies auto-immunes, un intérêt considérable est porté sur l'effet du microbiote sur le risque et la progression de la maladie (Honda and Littman, 2012; Scher et al., 2016).

La relation entre le microbiote et la PR a été suspectée depuis de nombreuses années et soutenue par des études précliniques. Les données provenant de modèles animaux d'arthrite suggèrent un rôle du microbiote intestinal dans le développement de la pathologie (Honda and Littman, 2012). Par exemple, la susceptibilité et la gravité de l'arthrite dans une variété de souches de rongeurs diminuent lorsqu'elles sont maintenues dans un environnement sans germes ("Germ-free") ou avec une flore bactérienne restreinte (Liu et al., 2016). Ces données

suggèrent que les bactéries jouent le rôle d'adjuvant complexe qui amplifie l'auto-immunité, soit directement (par exemple, les parois cellulaires bactériennes ou le lipopolysaccharide (LPS)) ou en modifiant de manière critique l'environnement muqueux immunorégulateur. Ce dernier pourrait soutenir en particulier la génération de réponses de type Th17 en cause dans plusieurs modèles animaux de PR (Miossec and Kolls, 2012).

Dans le côlon de patients PR, la bactérie *Prevotella copri* est retrouvée de manière abondante alors que les bacteroides sont diminuées chez les mêmes patients (Scher et al., 2013). Cette surreprésentation de *Prevotella* n'a pas été observée dans la PR dite chronique (patients avec une PR de plus de 6 ans) ou dans d'autres formes d'arthrite (telle que l'arthrite psoriasique). Des études sur la population Chinoise ont démontré qu'une modification des populations microbiennes de la bouche, la salive et le tractus gastro-intestinale est corrélée avec les niveaux d'ACPA et de CRP (Protéine C réactive) (Scher et al., 2015 ; Zhang et al., 2015b). Les mécanismes qui sous-tendent ces observations et leur importance restent à élucider.

## (2) Tabagisme

En plus de ses effets connus sur les maladies cardiovasculaires, pulmonaires et sur plusieurs formes de cancer, le tabagisme est le facteur de risque le mieux étudié et le plus influant dans la PR.

Depuis les premières études publiées il y a vingt ans, la cigarette a été maintes fois associée à une susceptibilité accrue au développement de la PR (Sugiyama et al., 2010), indiquant un rôle de la muqueuse pulmonaire dans l'étiologie de la maladie. D'autres expositions pulmonaires peuvent augmenter le risque, par exemple, la silice ou les poussières de textile. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents à la relation avec le tabagisme sont incertains (Catrina et al., 2014)

Le risque de développer une PR en réaction au tabac existe surtout chez des personnes génétiquement prédisposées, en particulier les personnes présentant une ou deux copies de l'épitope partagé (Linn-Rasker et al., 2006 ; Padyukov et al., 2004) ou les personnes qui ont un déficit héréditaire des enzymes impliquées dans la détoxification des agents cancérigènes et la protection contre le stress oxydatif (Keenan et al., 2010). Si l'épitope partagé est détecté dans le sang, fumer augmente le risque de développer la maladie d'environ vingt fois (Klareskog et al., 2006).

L'exposition aux produits chimiques toxiques inhalés dans la fumée de cigarette peut potentiellement augmenter l'expression de PADI dans les voies respiratoires et augmenter la citrullination des protéines (Vassallo et al., 2014).

L'immunohistologie broncho-alvéolaire montre des taux élevés de protéines citrullinées dans les macrophages (MΦ) pulmonaires et le tabagisme augmente ces protéines citrullinées dans les fluides des lavages broncho-alvéolaires (Makrygiannakis et al., 2008). Cependant, les protéines citrullinées peuvent également être présentes dans le contexte d'autres maladies ou même dans les poumons cliniquement normaux (Catrina et al., 2014). Ainsi, le risque induit par le tabac serait plus complexe qu'une simple induction de PADI et pourrait probablement promouvoir des altérations épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) avec un potentiel inflammatoire (Tsaprouni et al., 2014). Peut-être la citrullination et la combinaison stochastique de peptides altérés et l'inflammation des muqueuses induit un microenvironnement favorable pour la production d'ACPA. Des études ont démontré une association entre la formation d'ACPA et l'épaississement des bronches des années avant l'apparition des signes cliniques de la PR ("Pre-RA stages") (Reynisdottir et al., 2014). Willis et al. montrent que les ACPA sont détectables dans les expectorations des sujets à risque de développer une PR en l'absence de séropositivité ce qui suggère que le poumon pourrait être un site de génération d'auto-Ac au début de la PR (Willis et al., 2013).

De plus, plusieurs études récentes ont montré des signes d'inflammation locale des bronches de patients atteints de PR non traités (Reynisdottir et al., 2016).

Le tabagisme et d'autres formes de stress bronchique (par exemple, l'exposition à la silice) augmentent le risque de PR chez les personnes présentant l'allèle de susceptibilité HLA-DR4 (Symmons et al., 1997). Par ailleurs, l'épitope partagé des chaînes HLA seul augmentent la probabilité de développement d'une PR de 4 à 6 fois, mais ce risque augmente de 20 à 40 fois en combinaison avec le tabagisme (Lundström et al., 2009).

En outre, le tabagisme et les allèles HLA-DRB1 augmentent de manière synergique le risque d'avoir des ACPA (Klareskog et al., 2006). Ces observations permettent de supposer que les facteurs de stress environnementaux des poumons et d'autres barrières (telles que la muqueuse orale et le tractus gastro-intestinale) peuvent promouvoir des modifications post-traductionnelles (Firestein and McInnes, 2017), à travers PADI4, qui entraînent une altération quantitative ou qualitative de la citrullination des protéines de la muqueuse (Schett and McInnes, 2011).

La perte de tolérance à ces néoépitopes provoque une production d'ACPA (qui peut être reconnue par des tests diagnostics) (De Rycke et al., 2004 ; Vincent et al., 1999). Plusieurs auto-antigènes (auto-Ag) citrullinés sont reconnus dans les tests anti-CCP ("Anti-cyclic citrullinated protein"), y compris l' $\alpha$ -énolase, la kératine, le fibrinogène, la fibronectine, le collagène et la vimentine. On estime que 43-63% des patients avec une PR ACPA-positive

sont séropositifs pour l' $\alpha$ -énolase citrullinée, qui est fortement associé à HLA-DRB1\*04, PTPN22, et au tabagisme (Mahdi et al., 2009). Des interactions similaires sont rapportées pour les épitopes citrullinés de vimentine et de fibrinogène (Woude et al., 2010)

La consommation de tabac ne favorise pas toutes les formes de PR, mais seulement les PR classiques «séropositives», c'est-à-dire présentant des ACPA ou des FR (Pedersen et al., 2006, 2007). Ces résultats confirment le rôle de l'épitope partagé qui interviendrait en favorisant la présentation antigénique des protéines citrullinées induites par le tabac, amplifiant ainsi la production d'ACPA, probablement pathogènes (Klareskog et al., 2006)

Ainsi, une étude prospective réalisée sur une grande cohorte de patients ("Nurse's Health Study") a montré une corrélation linéaire entre l'importance de la consommation de tabac et le risque de développer une PR : les fumeurs ayant une consommation supérieure à 40 paquets/an avaient un risque deux fois plus élevé comparé aux individus non fumeurs. Il est intéressant de noter que ce risque diminue lentement 1 an après l'arrêt du tabagisme, et perdurait jusqu'à 20 ans après le sevrage tabagique, suggérant que les effets ne sont pas uniquement dépendant de la toxine, mais peuvent également survenir en modifiant la fonction immunologique (Costenbader et al., 2006; Källberg et al., 2011).

### *c) Facteurs hormonaux*

Il existe une étroite interaction entre le système endocrinien et le système immunitaire. En effet, certaines hormones peuvent moduler la réponse immunitaire. Plusieurs observations laissent penser que c'est le cas dans la PR.

La PR est à nette prédominance féminine, puisque 4 femmes pour 1 homme sont touchées, avec une rémission fréquente pendant la grossesse et l'allaitement et un risque de PR qui semble réduit dans ces cas là (Karlson et al., 2004 ; Pikwer et al., 2009).

Cette susceptibilité féminine est surtout représentée par les patientes post-ménopausiques. En sachant qu'une diminution du taux d'œstrogènes observé durant la ménopause est associé à une perte de la masse et de la fonction musculaire (Aleixo et al., 2018 ; Messier et al., 2011). De plus, le risque de la maladie augmente chez les femmes ayant eu une ménarche précoce ou qui souffrent de cycles menstruels irréguliers et une poussée d'arthrite est souvent observée dans la période du post-partum (Pikwer et al., 2012).

La possibilité que les contraceptifs oraux offrent un effet protecteur contre le développement de la PR a été longtemps proposée mais le rôle de la pilule contraceptive n'est pas clair pour le moment (Gabriel, 2001; Pikwer et al., 2009) ; cependant, une étude a démontré que les

femmes utilisant la pilule présentent moins souvent des FR dans le sérum (Bhatia et al., 2007).

## 5. Traitement de la PR

Depuis l'introduction des sels d'or dans les années 1920 (Forestier, 1932), de nombreux traitements ont fait leur apparition, enrichissant la palette des médicaments disponibles pour traiter la PR ; agir durant la phase initiale de la maladie « “Windows of opportunity“ » (Quinn and Emery, 2003) et utiliser des traitements ciblés (Smolen et al., 2010) sont les stratégies de gestion actuelles. Cela se traduit par une intervention thérapeutique précoce dans l'intention de modifier un processus pathologique au début, lors de son déclenchement et d'atteindre à long terme la rémission (Kourilovitch et al., 2014).

Dans le cas de la PR, l'inflammation est au sommet des événements cliniques (entraînant des symptômes cliniques, des lésions articulaires, un handicap et une comorbidité) (Smolen et al., 2007). Sa résolution est la cible thérapeutique majeure. Si l'inflammation disparaît rapidement, ses dommages ou sa progression sont empêchés, et la fonction physique peut être améliorée au maximum sans autres séquelles.

Les agents capables d'induire la rémission de cette maladie ont été introduits en clinique dans les années 1990. Ceux-ci incluent des médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie (DMARD), qui ont représenté une révolution dans le traitement de la PR, car les médecins disposaient d'un traitement efficace et il était désormais admis qu'il fallait traiter le plus tôt possible et le plus efficacement possible pour éviter les séquelles. La deuxième grande révolution thérapeutique, était dans les années 2000, avec l'apparition des biothérapies qui ont permis de diversifier encore l'arsenal thérapeutique des médecins ; ainsi aujourd'hui, de plus en plus de patients ont leur maladie bien contrôlée et évitent les séquelles et l'handicap (Kourilovitch et al., 2014; Wabe and Wiese, 2017). Néanmoins, seuls 25% des patients traités par ces thérapies ciblées entrent en rémission et ces traitements sont particulièrement onéreux, avec un coût moyen entre 6 000 et 15 000 euros par patient et par an.

Le traitement de la PR nécessite donc une approche stratégique par laquelle l'évaluation régulière de l'activité de la maladie conduit à des adaptations thérapeutiques ou aux changements de médicaments conformément à l'activité de la PR (traiter pour cibler) (Smolen et al., 2016b).

Les mesures de l'activité de la maladie qui incluent les dénombrements articulaires sont des outils privilégiés dans les approches de traitement ciblées. En pratique, si une faible activité

de la maladie ou une amélioration d'environ 80% dans les index de l'activité de la maladie sont atteints au bout de 3 mois, la probabilité d'atteindre la cible au bout de 6 mois après le début de la thérapie est très élevée (Aletaha et al., 2016).

Par contre, si l'amélioration est faible à 3 mois, ou la rémission n'est pas atteinte à 6 mois, le traitement doit être réévalué et adapté. Cependant, l'adaptation de la thérapie doit être équilibrée nécessitant de prendre en compte les facteurs liés aux patients et les risques liés au traitement (Smolen et al., 2016b).

### *a) DMARD*

Les médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie (DMARD) ciblent l'inflammation et par définition doivent réduire la progression des dommages structurels.

Il existe deux classes majeures de DMARD : les synthétiques et les biologiques, illustré dans *la Figure3*. Les synthétiques sont en outre sous définis en conventionnels synthétiques ou ciblés synthétiques (Smolen et al., 2014a).

L'utilisation de DMARD synthétiques conventionnels tels que le méthotrexate, le sulfasalazine, le leflunamide et l'hydroxychloroquine a évolué empiriquement et leurs modes d'action sont encore largement inconnus.

En revanche, les DMARD synthétiques ciblés ont été développés pour moduler une cible particulière impliquée dans la génération de l'inflammation. Les exemples clés incluent les inhibiteurs de la kinase janus (JAK), tels que le tofacitinib ou le baricitinib (Smolen et al., 2016a).

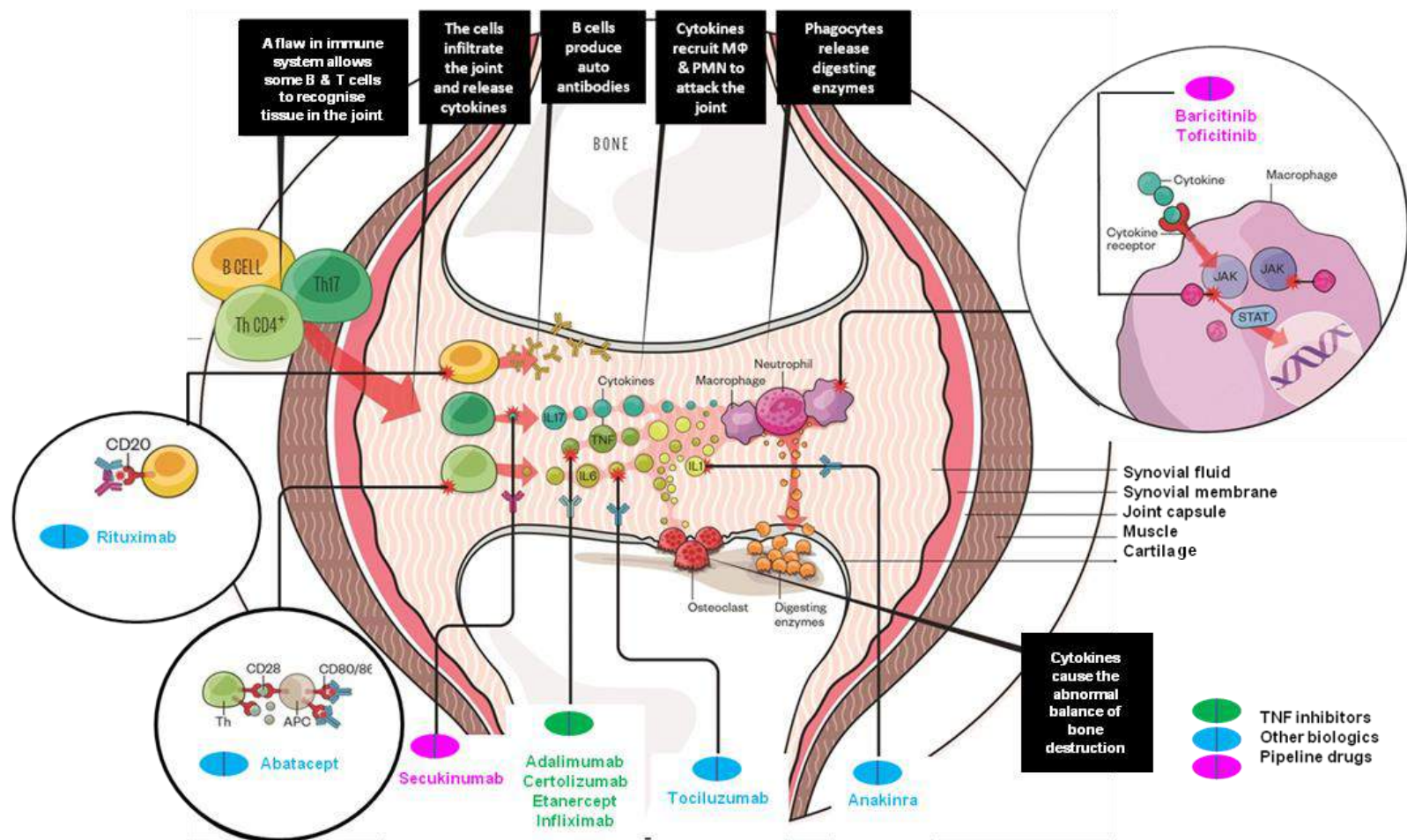


Figure 3 : Traitements dans la PR (London and UK)

APC : Cellules présentatrices d'antigène, CD : Cluster de différenciation, IL : Interleukine, JAK : Janus kinase, STAT : Signal de transduction et d'activation de la transcription, Th : cellules T auxiliaires, TNF : Facteur de nécrose tumorale.

## ***(1) DMARD synthétiques conventionnels***

Selon les recommandations de la ligue européenne contre les rhumatismes (EULAR) (Smolen et al., 2017), le traitement de la PR doit être initié avec un DMARD synthétique conventionnel, idéalement le méthotrexate, plus des glucocorticoïdes à faible dose. Le méthotrexate est un immunosuppresseur anti-folique aux propriétés anti-proliférative (Keyßer and Schäfer, 2018). Cependant, dans la PR, l'un des mécanismes d'action principal serait probablement de favoriser la libération extracellulaire d'adénosine, qui aurait ensuite un effet anti-inflammatoire en se liant aux récepteurs à l'adénosine A2R et A3R (Cutolo et al., 2001).

Il est administré par voie orale ou sous-cutanée une fois par semaine et la prescription d'acide folique après son administration améliore la tolérabilité du traitement. Une surveillance des taux d'alanine amino transférase (ALAT), de créatinine (CRE), et de gamma glutamyl transférase (GGT), est faite chaque semaine durant le premier mois, puis tous les mois, et toutes les six semaines après six mois (Keyßer and Schäfer, 2018).

D'autres DMARD conventionnels synthétiques existent comprenant la sulfasalazine, le leflunamide (pour une maladie très légère) et l'hydroxychloroquine ou chloroquine, bien que ces anti-paludéens ont peu d'effet structurel (Heijde et al., 1989)

Bien qu'il n'ait pas encore été démontré de façon concluante que le méthotrexate est supérieur aux autres DMARD synthétiques conventionnels cliniquement ou structurellement (Dougados et al., 1999), ces autres traitements de fond sont une bonne option dans le cas d'une intolérance au méthotrexate, une contre-indication (Keyßer and Schäfer, 2018) ou insuffisante amélioration de l'activité de la maladie (Goekoop-Ruiterman et al., 2005). Mais le méthotrexate est considéré comme le traitement de fond qui optimise l'efficacité des DMARD biologiques (Singh et al., 2016; Smolen et al., 2017)

## ***(2) DMARDs synthétiques ciblés***

Le tofacitinib, est un inhibiteur des Janus Kinase (JAK1/3 surtout et plus faiblement JAK2). L'inhibition de JAK interfère avec la transduction du signal via l'inhibition de la phosphorylation de STAT et donc l'activation cellulaire déclenchée par l'IL-6, le GM-CSF ("Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor"), les interférons (IFN) de type I et II, et les cytokines à chaîne  $\gamma$  communes (comme l'IL- 2 ou 15) (O'Shea et al., 2015; Semerano et al., 2016).

L'efficacité du tofacitinib plus méthotrexate à la dose approuvée (5 mg deux fois par jour) semble être similaire à celle des biothérapies, alors que la monothérapie au tofacitinib est



cliniquement supérieure au méthotrexate, contrairement à la plupart des DMARD biologiques (Lee et al., 2014).

Un inhibiteur de JAK1/2, le baricitinib, qui est en essais cliniques de phase 3, semble avoir la même efficacité qu'un DMARD biologique et que le tofacitinib. De plus, il semblerait que le baricitinib plus méthotrexate permettrait une amélioration clinique et fonctionnelle (sans amélioration structurelle pour autant) par rapport à l'adalimumab (inhibiteur du TNF) plus méthotrexate (Taylor et al., 2017).

### ***(3) DMARDs biologiques***

Actuellement, les produits thérapeutiques biologiques approuvés pour la PR agissent via l'inhibition du TNF, de l'IL-1 $\beta$  ou du récepteur de l'IL-6 (IL-6R), le blocage de la costimulation des LT ou encore via l'épuisement des cellules B (Smolen et al., 2016a).

#### ***(a) Inhibiteurs du TNF***

Parmi les inhibiteurs du TNF, cinq sont actuellement approuvés pour le traitement de la PR, un pour une utilisation intraveineuse (infliximab) et quatre pour l'application sous-cutanée (adalimumab, certolizumab pegol, étanercept, et golimumab).

L'étanercept n'est pas un Ac monoclonal, mais un récepteur soluble du TNF qui inhibe compétitivement la liaison du TNF à ses récepteurs de surface. L'infliximab (Remicade) est un Ac monoclonal chimérique humain-murin. L'adalimumab (Humira) et le golimumab (Simponi) sont des Ac monoclonaux complètement humanisés. Le certolizumab pegol (Cimzia) est une molécule recombinante pégylée, composée de la fraction de liaison à l'antigène (Fab), mais sans domaine Fc (Smolen et al., 2016a).

L'étanercept semble associé à un risque inférieur (mais non absent) de réactivation de la tuberculose par rapport aux Ac monoclonaux (Winthrop et al., 2005).

#### ***(b) Inhibiteurs de l'IL-1 $\beta$***

L'anakinra est une forme recombinante humaine de l'antagoniste naturel de l'IL-1 $\beta$  (IL-1Ra). Son utilisation dans le traitement de la PR est rare puisqu'il est relativement sûr et son efficacité est moindre comparée aux autres biothérapies. Par contre, nous pouvons observer son utilisation lors du traitement de l'arthrite juvénile idiopathique (Mertens and Singh, 2009; Turkstra et al., 2011).

### *(c) Inhibiteurs du récepteur de l'IL-6*

L'inhibition de la voie de l'IL6 est actuellement obtenue par traitement avec le tocilizumab, un Ac monoclonal humanisé dirigé contre l'IL-6R. L'IL-6 elle-même est ciblée par plusieurs Ac monoclonaux, y compris le sirukumab, qui a passé les essais de phase 3 (Smolen et al., 2016a).

### *(d) Inhibiteurs de la costimulation des lymphocytes T*

L'abatacept est actuellement le seul inhibiteur de costimulation des cellules T approuvé pour la PR ; c'est une protéine de fusion soluble (CTLA4-Ig), comprenant une partie Fc de l'immunoglobuline (Ig) G1 et un domaine extracellulaire de CTLA-4. CTLA4-Ig se lie à des molécules costimulatrices (CD80 et CD86) sur les CPA, inhibant ainsi la stimulation des lymphocytes T (Smolen et al., 2016a).

Cependant, son efficacité pourrait résulter non seulement du ciblage des cellules T, mais aussi de l'inhibition de la fonction des cellules myéloïdes (Bonelli et al., 2013 ; Patakas et al., 2016).

### *(e) Inhibiteurs des cellules B*

Le rituximab est le seul Ac monoclonal (chimérique murin/humain) approuvé pour le traitement de la PR, ciblant la molécule de surface CD20, présente sur les LB et entraînant leur lyse (Smolen et al., 2016a).

Le plus important, malgré les différences de cibles, les cinq principaux modes d'action des biothérapies (en association avec le méthotrexate) ont des taux de réponse similaires (Nam et al., 2014; Schoels et al., 2012; Smolen et al., 2014b), suggérant que tous ces médicaments pourraient médier leur efficacité en interférant avec la voie finale commune - à savoir, la production de cytokines pro-inflammatoires (Smolen and Aletaha, 2013).

Tous les DMARD biologiques présentent une efficacité accrue lorsqu'ils sont combinés avec le méthotrexate ou avec un autre DMARD synthétique conventionnel, en particulier le leflunomide (Burmester et al., 2007 ; Stefano et al., 2010). Aucun DMARD biologique utilisé en monothérapie n'a montré de résultats supérieurs et statistiquement significatifs cliniquement ou fonctionnellement par rapport au méthotrexate (Breedveld et al., 2006 ; Burmester et al., 2015; Klareskog et al., 2004).

L'efficacité clinique et structurelle est similaire pour tous les types de DMARD biologiques. Lorsqu'un patient ne répond pas à un traitement combinant DMARD biologique (plus

méthotrexate), alors tout autre DMARD biologique ou synthétique ciblé pourra être utilisé (Welsing et al., 2004).

Il faut noter, que dans la plupart des recommandations ou des lignes directrices, le rituximab devrait être utilisé après d'autres produits biologiques qui ont échoué ; cependant, il est très efficace dans la PR précoce (Tak et al., 2011) et est souvent utilisé comme premier biologique lorsque les autres sont contre-indiqués (Smolen et al., 2016a).

## ***b) AINS***

À la différence des DMARD, les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), tout en réduisant la douleur et la raideur et en améliorant la fonction physique, n'interfèrent pas avec les dommages causés dans les articulations et ne sont donc pas des modificateurs de la maladie.

Ils peuvent augmenter le risque de survenue de crise cardiaque et d'accident vasculaire cérébral. Les AINS peuvent également augmenter la tension artérielle et provoquer une irritation de l'estomac, des ulcères et des saignements (Crofford, 2013; Smolen et al., 2016a).

## ***c) Stéroïdes***

Les glucocorticoïdes offrent de rapides améliorations symptomatiques de la maladie (soulager la douleur et la raideur des articulations touchées) (Kirwan et al., 1995), mais sont associés à de graves effets secondaires à long terme (Smolen et al., 2016a).

Les glucocorticoïdes sont administrés à des doses orales faibles ou parentérales en application intraveineuse unique ou intramusculaire. Les faibles doses de glucocorticoïdes (<7,5 mg par jour) combinées avec le méthotrexate confèrent une protection structurelle additive contrairement au méthotrexate seul (Wassenberg et al., 2005).

Les glucocorticoïdes oraux doivent être entrecoupés puis arrêtés dans les 6 mois, lorsque les DMARD synthétiques conventionnels ont induit une amélioration significative (Smolen et al., 2016a).

## ***d) Arrêt du traitement***

Après que le traitement ait atteint sa cible comme désiré (faible activité de la maladie ou rémission), cet état devrait être maintenu quelques temps, permettant d'avoir un état normal donnant lieu à une fonction physique et une capacité à travailler au maximum, et une meilleure qualité de vie.

En cas de rémission soutenue à long terme sous DMARD synthétiques conventionnels uniquement, une réduction prudente du traitement peut être considérée, en particulier chez un patient ayant reçu un traitement très précoce et ayant atteint une rémission rapidement.

Quand la rémission (ou une faible activité ciblée de la maladie) est soutenue par des DMARD biologiques pendant un certain temps (habituellement environ 6 mois), le clinicien traitant doit envisager de réduire la thérapie. Il en est de même pour les glucocorticoïdes, qui doivent être réduits et arrêtés au bout de 6 mois, et cela devrait être fait en premier (Smolen et al., 2016a).

Pour les biothérapies, le risque de poussée après avoir réduit la dose de moitié ou doublé l'intervalle entre les doses est faible, alors que le retrait complet conduit souvent la plupart des patients à éprouver une poussée dans l'activité de la maladie (Smolen et al., 2013, 2014c).

Quand la poussée survient, les patients réagissent généralement très bien à la réintroduction du même agent. Cependant, plus de 10% des patients ne retrouveront pas leur bien être d'origine et, par conséquent, soumettre les patients à l'arrêt des produits biologiques et donc risquer d'avoir une détérioration potentiellement permanente de leur état peut être considérée comme éthiquement mal sain. Par conséquent, la réduction progressive des doses devrait être la norme, plutôt que l'arrêt soudain des biothérapies (Smolen et al., 2016a).

### *e) Effets indésirables associés*

Les biothérapies et les DMARD synthétiques ciblés induisent plus d'événements indésirables que les DMARD synthétiques conventionnels. L'incidence des infections graves est augmentée, même si elle diminue avec le temps (Listing et al., 2005 ; Ramiro et al., 2014). Un risque particulier concerne la réactivation de la tuberculose (Winthrop et al., 2005), bien que cela n'ait pas été signalé avec le rituximab.

Les agents biologiques doivent être évités dans les 5 ans qui suivent la guérison d'une maladie maligne (Strangfeld et al., 2010). Cependant, chez les patients ayant des antécédents de lymphome, le rituximab ou éventuellement le tocilizumab seraient des médicaments de choix (Smolen et al., 2016a).

Pendant la grossesse, les médicaments employés sont la sulfasalazine ou éventuellement l'azathioprine, bien que cette dernière semble avoir peu d'efficacité (Gaujoux-Viala et al., 2014 ; Krause et al., 2014). Le méthotrexate et le leflunomide sont contre-indiqués (Østensen and Förger, 2009).

L'utilisation de thérapies biologiques pendant la grossesse est controversée (Raja et al., 2012 ; Verstappen et al., 2011). Des données récentes suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs du TNF n'est pas associée à des effets sur la conception ou le risque tératogène. Des données similaires ont été rapportées pour l'abatacept et le tocilizumab (Flint et al., 2016 ; Götestam Skorpen et al., 2016).

## 6. Modèles animaux

L'utilisation de modèles animaux dans la PR a grandement contribué à l'ensemble des connaissances sur les processus et médiateurs importants dans la génération de l'inflammation, la destruction du cartilage et la résorption de l'os, conduisant ainsi à d'importantes avancées thérapeutiques dans cette maladie destructrice (Bendele, 2001).

Les modèles animaux ont été et continuent à être essentiels aussi bien en recherche fondamentale, pour tester les hypothèses, définir les médiateurs biologiques et les processus cellulaires impliqués dans la maladie humaine (Benson et al., 2017), que dans l'industrie pharmaceutique dans le but de tester de potentiels agents anti-arthritiques (Bendele, 2001).

Dans le cas de la PR, il existe d'excellents modèles qui présentent certaines caractéristiques pathologiques similaires à celles de la maladie humaine tout en ayant des différences. La sélection d'un modèle animal doit être un choix judicieux, tenant compte des critères suivants : 1) la capacité à prédire l'efficacité des agents thérapeutiques chez l'homme, 2) la facilité d'exécution du modèle, prenant en compte la reproductibilité des données et une durée d'expérimentation raisonnable et 3) la similitude avec la pathologie et/ou la pathogenèse humaine (Bendele, 2001).

Des débats peuvent exister concernant la validité des modèles animaux. Il est à noter que dans le cas de la PR (Seok et al., 2013), 1) les modèles animaux progressent beaucoup plus rapidement que les maladies humaines et sont donc caractérisés principalement par des réponses inflammatoires aiguës et 2) que les rongeurs ont tendance à avoir une résorption et une formation osseuses marquées en réponse à l'inflammation des articulations. En comparaison avec les modèles d'arthrose, les modèles de PR sont relativement faciles à réaliser, avec une bonne reproductibilité des données et sont généralement de courte durée (Bendele, 2001).

Parmi les modèles murins les plus utilisés, on retrouve des modèles d'arthrite induite nécessitant soit une immunisation par Ag tels que l'arthrite induite par protéoglycane (PGIA), l'arthrite induite par l'albumine méthylée, et l'arthrite expérimentale au collagène ; soit induite par des agents chimiques – comme l'arthrite induite par le pristane chez le rat ; soit des

modèles transgéniques développant une arthrite spontanée comme les souris transgéniques pour le TNF- $\alpha$  et les souris K/BxN transgéniques pour un récepteur des cellules T (Bessis et al., 2017; Brand, 2005).

## *a) Modèles d'arthrite induite*

### *(1) Arthrite expérimentale au collagène*

L'arthrite expérimentale au collagène (AEC) est un modèle animal de poussée d'auto-immunité utilisé pour étudier la PR (Pietrosimone et al., 2015).

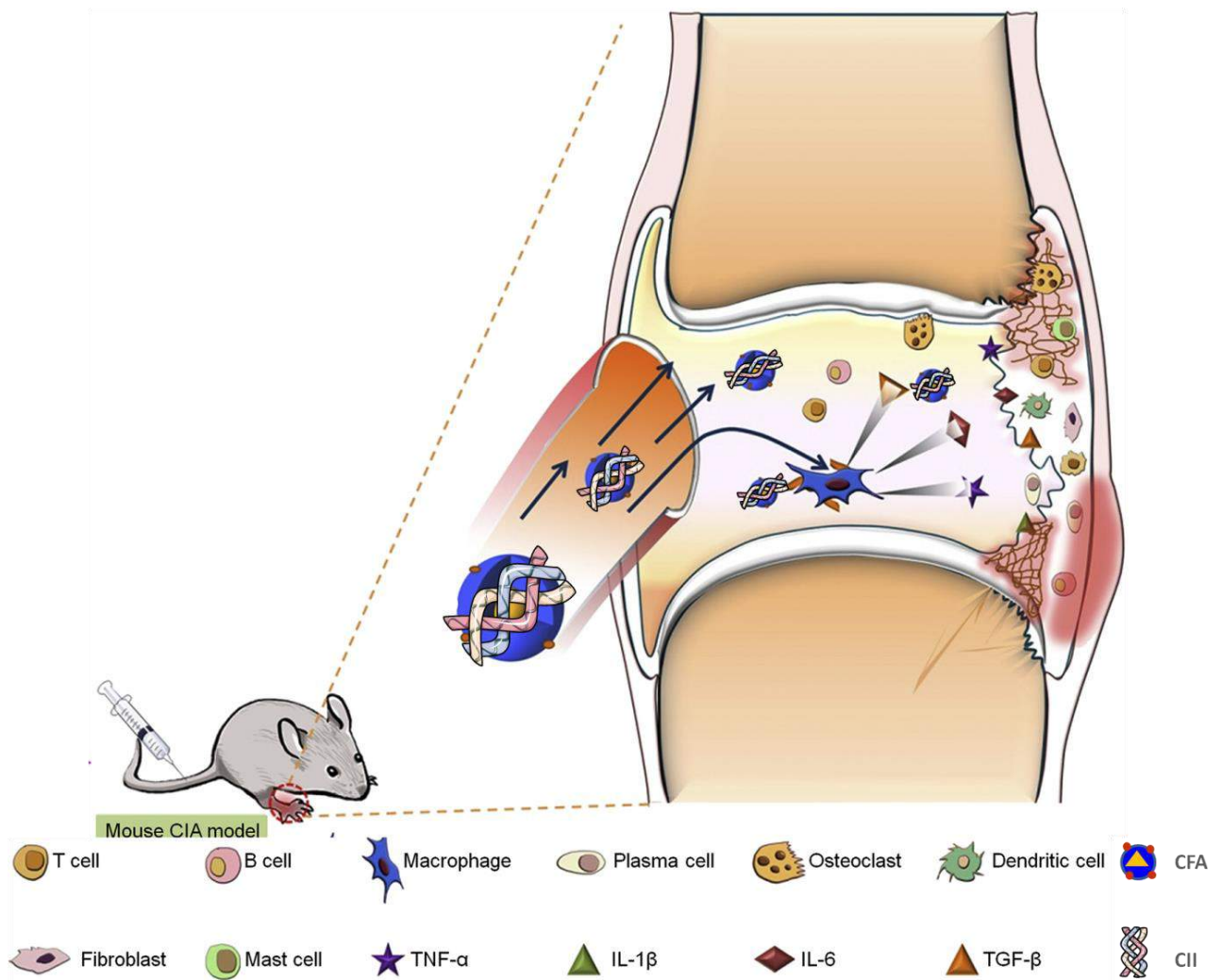
Il partage plusieurs caractéristiques pathologiques avec la PR, comme la rupture de tolérance et la génération d'auto-Ac (Asquith et al., 2009) et le collagène de type 2 (CII) est une protéine majeure dans le cartilage, le tissu cible de la PR. De plus, la durée entre l'immunisation et la manifestation de la maladie est courte. Le modèle AEC a été largement utilisé pour identifier les mécanismes pathogènes potentiels de l'auto-immunité, y compris le rôle des cellules dans l'apparition et la progression de la maladie, ainsi que pour concevoir et tester de nouveaux agents thérapeutiques. Ces dernières années, le modèle AEC a joué un rôle déterminant dans le développement et la mise au point de nouveaux agents thérapeutiques biologiquement actifs ainsi que l'analyse des mécanismes, tels que ceux ciblant le TNF- $\alpha$ , une cytokine produite par les macrophages (M $\Phi$ ) et les LT, et qui est un médiateur inflammatoire dominant dans la pathogenèse de la PR. Le développement de ces thérapies a révolutionné le traitement de la PR (Brand et al., 2007).

Le développement de l'AEC implique l'infiltration des M $\Phi$  et des PNN dans l'articulation, ainsi que des réponses des LT et B au CII (Pietrosimone et al., 2015). Il a été montré que les Ac de patients PR et de souris AEC ciblaient le même épitope de CII (Burkhardt et al., 2002). La pathogenèse qui en résulte partage plusieurs caractéristiques pathologiques avec la PR, dont l'hyperplasie synoviale, l'infiltration des cellules mononucléaires, la dégradation du cartilage et, comme la PR, la susceptibilité est liée à l'expression de gènes spécifiques du CMH de classe II. Les différences les plus notables entre ce modèle et la PR sont que ni le FR, ni les ACPA existent, que peu ou pas de biais sexuel est présent dans le cas de l'AEC, que la maladie expérimentale est généralement monophasique (Boissier et al., 1987; Holmdahl et al., 1986) et que l'arthrite induite au CII provoque une périostite tibiale (Hegen et al., 2008).

La souche de souris utilisée pour l'induction d'une AEC est généralement la souche DBA/1 avec l'haplotype H-2<sup>q</sup> ; toutefois, au cours des dernières années, plusieurs modèles utilisent

des souris transgéniques pour HLA-DR ont été établis dans lesquels l'expression transgénique des gènes HLA-DR1 ou DR4 de classe II associée à la susceptibilité à la PR confère une susceptibilité à l'AEC chez les souche receveuse (C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)) (Rosloniec et al., 1997 ; Rosloniec et al., 1998). Ces données indiquent que les molécules DR associées à la susceptibilité à la PR sont au moins impliquées dans la réponse immunitaire contre le CII (Brand et al., 2007).

Dans le cas des DBA/1, les souris sont immunisées par une injection sous-cutanée de CII bovin émulsionné dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA) et reçoivent un rappel de CII bovin dans l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) 3 semaines après la 1<sup>ère</sup> immunisation. Ces souris développent typiquement la maladie 26 à 35 jours après l'injection initiale. Les souris C57BL/6 sont résistantes à l'arthrite induite par le CII bovin, mais peuvent développer de l'arthrite lorsqu'elles sont immunisées avec CII de poulet dans du CFA et reçoivent une injection de CII de poulet dans de l'IFA ou le CFA 21 jours après la première injection (**Figure 4**). La souche de *Mycobacterium* inactivé par la chaleur dans le CFA diffère également pour chaque souche de souris. Les souris DBA/1 développent une arthrite avec *Mycobacterium butyrium*, tandis que les souris C57BL/6 nécessitent *Mycobacterium tuberculosis*. De plus, l'AEC se développe plus lentement chez les souris C57BL/6 et les arthrites sont moins sévères par rapport aux souris DBA/1 (Pietrosimone et al., 2015). Cependant, l'intérêt des souris C57BL/6 réside essentiellement sur l'utilisation de souris déficientes ou transgéniques.



**Figure 4 : Modèle d'arthrite expérimentale au collagène (Adapté de (Yang et al., 2017))**

*CFA* : Adjuvant complet de Freund, *CII* : Collagène de type 2, *TNF* : Facteur de nécrose tumorale.

*IL* : Interleukine, *TGF* : Facteur de croissance transformant,



## ***(2) Arthrite induite par adjuvants***

L'arthrite adjuvante (AA) est une forme induite d'arthrite (sub) chronique. Les souches de rats ont une susceptibilité génétique variable à l'AA, alors que les souris ne sont généralement pas sensibles (van Eden et al., 2001). Les rats Lewis sont généralement utilisés dans les études de l'AA, plus spécifiquement les femelles qui ont tendance à développer l'arthrite plus facilement que les rats mâles, ce qui est similaire à ce qui se passe dans la PR humaine mais la pathologie est beaucoup plus variable dans l'apparition et la gravité par rapport aux mâles (Bendele, 2001; Hua et al., 2017).

L'AA est le plus facilement induit avec des mycobactéries en suspension dans de l'huile, bien que chez certaines souches de rats, la pathologie peut être induite avec des adjuvants huileux en l'absence de mycobactéries comme dans le cas de l'arthrite induite par pristane, un alcane terpénoïde saturé naturel extrait de l'huile du foie des requins (van Eden et al., 2001 ; Wang et al., 2017a).

L'adjuvant peut être injecté à la base de la queue ou dans un des coussinets plantaires. L'injection dans ce dernier permet l'étude de la réaction inflammatoire aiguë dans cette zone locale ainsi que la réaction immunologique qui se développe généralement après 9 jours dans la patte controlatérale et les divers organes. Les caractéristiques de ce modèle sont l'apparition et la progression rapide de la pathologie, l'inflammation poly-articulaire, la résorption osseuse marquée et la prolifération osseuse périostée. En sachant que la destruction du cartilage se produit mais est disproportionnellement faible en comparaison à l'inflammation et la destruction des os qui se produisent (Bendele, 2001).

Il n'y a pas d'auto-Ag particulièrement bien définis dans l'AA ; à cet égard, le modèle ressemble à des maladies arthritiques spontanées chez l'homme. Une auto-rémission caractérise toutes les souches de rats sensibles à l'AA, bien que la maladie soit généralement grave et entraîne des malformations articulaires permanentes, y compris une ankylose (van Eden et al., 2001).

Le modèle animal d'AA est influencé par plusieurs facteurs dont l'âge de l'animal et la souche mais aussi par divers facteurs liés au stress, y compris les manipulations de l'animal pendant la période d'expérimentation ou le type de véhicule utilisé lors de l'immunisation (Bendele, 2001; Swingle et al., 1969).

L'utilisation du modèle adjuvant offre l'opportunité d'étudier les changements pathologiques dans une variété de tissus autres que les articulations (splénomégalie et hépatomégalie) et de développer la connaissance des profils d'activité de divers agents thérapeutiques (Bendele,

2001). La maladie est une arthrite auto-immune à médiation cellulaire T qui est fréquemment utilisée pour étudier les aspects immunologiques de la PR et d'autres maladies arthritiques ou inflammatoires chez l'homme comme le LES (Sato et al., 1995).

### ***(3) Arthrite induite par l'albumine méthylée de sérum bovin***

La PR peut être étudiée par un modèle expérimental utilisant de l'albumine méthylée (mBSA) issue de sérum bovin et cela par injection intra-articulaire après une immunisation avec du CFA, chez la souris, le lapin et plus rarement le rat (WILLIAMS, 1998).

Le développement de l'arthrite est associé à l'apparition de LT et d'autres cellules inflammatoires telles que les MΦ dans la synoviale provoquant cette hyperplasie caractéristique mais aussi la destruction du cartilage et des os et à la production importante d'Ac anti mBSA. Ce modèle ne présente pas de biais lié au sexe (Griffiths, 1992).

La réactivité des LT contre l'Ag immunisant est un facteur crucial dans le maintien de la chronicité (durée) de la maladie (Brackertz et al., 1977). Par contre, ce modèle présente une limite au niveau du développement de la pathologie car l'arthrite se développe uniquement au niveau de l'articulation injectée par l'Ag et par conséquent ne présente pas de manifestations systémiques comme dans la maladie humaine (Williams, 1998).

### ***(4) Arthrite induite par anti-CII (Collagen-Antibody-Induced Arthritis CAIA))***

La PR est associée à la production d'auto-Ac contre le CII, les ACPA et les FR. Comme pour l'AEC où les anticorps IgG anti-CII sont détectables, le transfert de sérum d'une souris immunisée par du CII dans une souris receveuse non-immunisée peut induire l'arthrite (Stuart and Dixon, 1983), en utilisant de grand volume de sérum concentré. Cela démontre le rôle de l'immunité humorale dans le développement de l'arthrite dans laquelle le CII est considéré comme l'Ag prédominant (Rowley et al., 2008). En outre, des cocktails d'Ac anti-collagène ont permis d'induire le développement de l'arthrite (Holmdahl et al., 1986), on parle alors d'arthrite induite par les Ac contre le collagène ou CAIA.

Bien que le développement clinique de l'arthrite soit similaire à celle de l'AEC et de la PR, la CAIA est caractérisée par une infiltration de MΦ et de PNN (SANTOS et al., 1997), mais n'est pas associée à une réponse des cellules T et B (Nandakumar et al., 2003 ; Yoshino et al., 1990). Par conséquent, la CAIA peut donner un aperçu des rôles distincts des réponses immunitaires innées et adaptatives dans le développement de l'arthrite, et permet d'analyser la phase effectrice, mais pas la rupture de tolérance observée lors de la PR.

La maladie se développe très rapidement, entre 24h à 48 h après l'administration du cocktail d'Ac monoclonaux anti-CII avec 100% d'incidence et est inductible indépendamment de l'haplotype du CMH II. De plus, le plus grand avantage est la possibilité d'utiliser des souris génétiquement modifiées, telles que les transgéniques et les déficientes ("Knockout") (Asquith et al., 2009).

### ***(5) Modèle HLA-Tg***

Compte tenu de la forte association génétique entre les allèles HLA de classe II et la PR, il a été proposé de générer des souris transgéniques (Eming et al., 2002) pour HLA-DR4 et CD4 humain (Fugger et al., 1994), car le CMH compte plus d'un tiers des facteurs de risque génétiques et ce risque est formellement associé aux Ag HLA-DR4 et HLA-DR1 (Deighton et al., 1989).

La fonction initiale des molécules du CMH II est de présenter l'Ag. L'ensemble peptide antigénique-CMH II à la surface de la CPA est ensuite reconnu de façon spécifique par le récepteur à l'antigène de la cellule T CD4<sup>+</sup> (TCR) et forme un trimère CMH-Ag-TCR.

Le modèle de souris transgéniques HLA de classe II a été généré à la base pour servir de modèle animal *in vivo* dans lequel plusieurs aspects des réponses immunitaires des LT CD4<sup>+</sup> humains pourraient être étudiés après immunisation avec un Ag endogène ou exogène (Sønderstrup et al., 1999), mais a été particulièrement utile et pertinent pour l'étude des mécanismes impliqués dans la rupture de la tolérance qui se produit lors de la PR (Taneja and David, 2010).

Dans le cas de l'étude de la PR, la génération de ce modèle nécessite par exemple l'introduction d'un transgène CD4 humain et l'allèle de susceptibilité à la PR HLA-DR\*0401 tout en supprimant les gènes de CMH II murins (Sønderstrup et al., 1999). Cela est réalisé par le croisement d'une lignée transgénique de CD4 humain et de l'allèle de susceptibilité HLA-DR\*0401 avec une lignée dont le CMH de classe II endogène est inactivé (A $\beta$ o) (Cosgrove et al., 1991 ; Killeen et al., 1993). Cela permet d'obtenir des souris dont l'expression cellulaire de la molécule HLA-DR\*0401 et la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> sont élevés (Sønderstrup et al., 1999).

Les LT CD4<sup>+</sup> de ces souris ont une fonction normale et, comme chez l'humain expriment le gène de susceptibilité à la PR HLA-DR4, elles ne développent pas spontanément d'arthrite. Ceci est en accord avec les données mettant en avant le rôle des facteurs environnementaux et stochastiques en plus des facteurs génétiques dans la pathogenèse de la maladie (Holmdahl et al., 1999 ; Sønderstrup et al., 1999).

Cependant, les souris HLA-DR4/CD4/A $\beta$ o sont hautement susceptibles au développement de l'arthrite après immunisation au CII, alors que les souris A $\beta$ o sont résistantes (Holmdahl et al., 1999).

L'apparition de l'arthrite est généralement soudaine, avec un gonflement de l'articulation et un érythème. Le processus inflammatoire se propage ensuite aux autres articulations dans les pattes antérieures et postérieures. L'arthrite clinique dure 3 à 4 semaines et est suivie d'une déformation articulaire.

La phase aiguë est observée dès le 1<sup>er</sup> mois après les 1<sup>ères</sup> manifestations cliniques. L'inflammation est caractérisée par un gonflement important des articulations, qui dans la plupart des cas comprennent une infiltration cellulaire dominée par des PNN et certains M $\Phi$  et lymphocytes. On observe une hyperplasie de la membrane synoviale suivie d'une destruction du cartilage et de l'os.

La phase subaiguë est observée 2 à 4 semaines après le début de l'arthrite, celle-ci présente encore des éléments de l'inflammation aiguë, mais l'œdème et le gonflement sont moins proéminents. La formation du pannus continue, consistant en un tissu de granulation dans la membrane synoviale contenant des PNN et une plus grande fraction de M $\Phi$ , de lymphocytes et de quelques cellules plasmiques. Des érosions prononcées du cartilage et de l'os sous-chondral sont à noter.

La phase de cicatrisation, qui se déroule 2 à 3 mois après les premiers symptômes, est caractérisée par l'organisation du collagène dans le tissu de granulation qui forme le pannus et l'augmentation du remodelage du cartilage et de l'os (Holmdahl et al., 1999).

La phase terminale (après 6 mois) montre une déformation articulaire sévère due à la formation osseuse irrégulière et à la calcification. L'histopathologie est identique à l'AEC classique et ressemble à la PR (Holmdahl et al., 1988; Zvaifler, 1973).

Les souris transgéniques DR4/CD4/A $\beta$ o immunisées avec le CII développent des taux élevés d'anticorps IgG anti-CII, alors qu'aucune réponse anti-CII n'est observée chez les souris A $\beta$ o.

Bien que l'on puisse montrer que les molécules DR4 et DR1 jouent un rôle important dans l'induction de l'arthrite, le rôle d'autres molécules de classe II dans cette maladie n'est pas exclu (Holmdahl et al., 1999).

## *b) Modèles d'arthrite spontanée*

### *(1) Modèle TNF-Tg*

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine majeure de la PR. Cette pathologie a souvent été décrite comme étant une conséquence de l'expression et/ou le dérèglement de la production de cette cytokine ce qui a mené au développement des souris transgéniques pour le TNF- $\alpha$  (TNF-Tg). Les premières souris TNF-Tg ont été décrites et générées par Kollias et ses collègues en 1991 en utilisant des souris hybrides CBA x C57BL/6, exprimant les haplotypes du CMH H-2<sup>k</sup> et H-2<sup>b</sup>. Dans ce modèle, un vecteur contenant un fragment codant entièrement le gène du TNF- $\alpha$  humain dans lequel la région 3'UTR a été remplacée par celle du gène de la  $\beta$ -globine a été utilisé. Cette mutation augmente la stabilité et l'efficacité de traduction de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et donc entraîne une surexpression chronique du TNF- $\alpha$  qui conduit à une polyarthrite érosive sévère et par conséquent, l'administration d'Ac anti-TNF- $\alpha$  empêche le développement de la maladie (Keffer et al., 1991; Li and Schwarz, 2003). Cette inhibition de la maladie a été observée également lors de la vaccination de souris TNF-Tg par un hétérocomplexe hémocyanine-TNF- $\alpha$  humain (TNF- $\alpha$  kinoïde) où ces souris ont développé des Ac neutralisant la cytokine (Buanec et al., 2006)

Plusieurs lignées de souris TNF-Tg ont été générées et 100% de ces lignées développent une arthrite chronique et érosive qui touche toutes les articulations, sans exception. Ainsi, ce modèle constitue, par exemple, le seul modèle d'arthrite touchant l'articulation temporo-mandibulaire (Puzas et al., 2001). Dans ce modèle, les premiers signes cliniques caractérisés par un gonflement des articulations apparaissent à l'âge de 2 mois et la maladie progresse rapidement jusqu'à l'âge d'1 an à condition que les souris puissent vivre jusqu'à cet âge (Li and Schwarz, 2003).

Les caractéristiques histologiques de ce modèle correspondent à une hyperplasie de la membrane synoviale avec une infiltration de l'espace synovial par des lymphocytes et des polynucléaires. La formation de pannus et la destruction du cartilage constituent les caractéristiques du développement de l'arthrite. De plus, la surface des os au niveau des articulations de ces souris se retrouve recouverte d'ostéoclastes qui vont massivement résorber l'os. Ces signes cliniques et histologiques imitent tous ceux de la PR, bien que les taux sériques du FR soient indétectables. Mais il faut noter que la caractéristique la plus distinguée des souris TNF-Tg et qui les distingue de tous les autres modèles animaux est la progression naturelle de l'arthrite, qui est chronique et continue à la différence des modèles d'AEC et d'AA qui développent une arthrite plus aiguë, avec une régression de la pathologie

au final. Ainsi, les souris TNF-Tg constituent le premier modèle animal prédictif de l'arthrite (Li and Schwarz, 2003).

Le modèle s'est avéré particulièrement utile permettant de définir la contribution distincte des cytokines effectrices qui régulent l'inflammation et ceux qui régulent le cartilage et la destruction des os, comme RANKL (Asquith et al., 2009), mais aussi de déterminer la relation entre le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 lors de la PR (Probert et al., 1995).

## **(2) Modèle SKG**

Les souris SKG portent une mutation ponctuelle du gène codant la protéine ZAP70 ("Zeta-chain-Associated Protein kinase of 70kDa"), et ont la capacité de développer spontanément une arthrite auto-immune chronique due à l'altération de la signalisation du TCR et la perturbation de la sélection thymique des cellules T (Benson et al., 2018).

Par ailleurs, le développement des arthrites dans ce modèle est dépendant des stimuli environnementaux. Ainsi, l'élevage de souris SKG dans des conditions spécifiques exemptes de pathogènes ou de germes exigent un microbiote fongique ou intestinal respectivement pour établir le développement de l'arthrite (Maeda et al., 2016 ; Yoshitomi et al., 2005). Ces conditions sont retrouvées dans d'autres modèles incluant les souris déficientes au récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1RA<sup>-/-</sup>) (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008) et les souris K/BxN (Wu et al., 2010b), fournissant des modèles pour définir les mécanismes d'interaction entre dysbiose intestinale et susceptibilité génétique.

Des preuves supplémentaires d'une éventuelle contribution microbienne au développement de la PR sont fournies par le lien observé entre la maladie parodontale et la gravité de l'arthrite. Par exemple, une infection orale par *Porphyromonas gingivalis* permet de mettre en évidence une poussée dans l'inflammation des articulations et les marqueurs systémiques de l'inflammation dans le cas de l'AEC (Leech and Bartold, 2015) et chez les souris SKG (Yamakawa et al., 2016).

Le modèle SKG est caractérisé par l'hyperplasie de la membrane synoviale avec une forte infiltration de l'espace articulaire par les LT CD4<sup>+</sup>, la formation de pannus, l'érosion de l'os et la dégradation du cartilage. De plus, contrairement au modèle TNF-Tg, ce modèle développe des auto-Ac, dont le FR (Sakaguchi et al., 2003).

### ***(3) Modèle K/BxN***

Le modèle d'arthrite spontanée K/BxN chez la souris a été décrit pour la première fois par Kouskoff et al. en 1996 (Kouskoff et al., 1996). Ces souris ont été générées fortuitement par croisement de la lignée transgénique au TCR KRN avec des souris exprimant la molécule de CMH de classe II A<sup>g7</sup> (Asquith et al., 2009).

Les souris K/BxN développent une arthrite inflammatoire sévère et destructrice, avec des titres élevés d'auto-Ac reconnaissant la glucose-6-phosphate isomérase (G6PI). L'examen histologique des articulations de souris sauvages montre que le G6PI est présent dans la cavité articulaire longeant le cartilage, alors que chez les souris arthritiques, des dépôts de G6PI sont amplifiés et colocalisés avec des IgG anti-G6PI. L'accumulation de la G6PI et des anticorps anti-GPI dans les articulations conduit à la formation de complexes immuns à la surface du cartilage (Kouskoff et al., 1996 ; Wipke et al., 2002). Le mécanisme d'action implique l'activation du complément et la dégranulation des mastocytes, et est médié non seulement par le TNF mais aussi par l'IL-1 (Asquith et al., 2009).

La découverte de ce modèle a conduit à plusieurs études sur les titres d'Ac anti-G6PI chez les patients atteints de PR. Cependant, à ce jour, les données restent controversées (van Gaalen et al., 2004 ; Matsumoto et al., 2003).

Le sérum de ces souris est capable d'induire l'arthrite dans un large éventail de souches de souris receveuses, on parle alors d'arthrite induite au sérum de souris K/BxN (Asquith et al., 2009). Contrairement aux souris K/BxN qui développent une arthrite chronique, l'arthrite induite par le transfert de sérum de ces souris est transitoire, montrant une phase de déclin 15 jours après le transfert (Ditzel, 2004). Cependant, l'inflammation peut être maintenue par répétition du transfert de sérum. De plus, il a été montré qu'aussi bien le transfert de sérum que d'IgG purifiées à des souris naïves ou mêmes à des souris déficientes en cellules T ou en cellules B, permet le développement d'une arthrite sévère 24heures après le transfert (Korganow et al., 1999).

## B. Immunopathologie de la PR

### 1. Introduction

En 1996, Thomas et Lipsky ont résumé le processus pathologique de la PR en 3 phases (Thomas and Lipsky, 1996) : 1) l'initiation de la maladie qui peut impliquer la libération de cytokines dans la synoviale conduisant à la différenciation locale des cellules dendritiques (DC) et leur migration ultérieure vers les ganglions lymphatiques ; 2) la perpétuation de la maladie qui peut nécessiter une pré-activation ("Priming") des LT autoréactifs par les DC dans les ganglions lymphatiques, qui migrent ensuite vers l'articulation en tant que cellules T mémoires et sont ainsi localement activés. Les cellules T différenciées de la synoviale stimulent les cellules B et les MΦ, ce qui conduit à des mécanismes bien établis d'inflammation et de destruction tissulaire ; 3) la phase inflammatoire chronique de cette maladie qui peut être due à une dérégulation poly-cellulaire comprenant la croissance anormale des fibroblastes et les réponses des lymphocytes T aux auto-Ag modifiés. Ces phases ont été revues et redéfinies en 2003 par Firestein, où la phase d'initiation fait probablement intervenir la stimulation des synoviocytes fibroblastiques (FLS), des DC, des mastocytes et des MΦ responsables d'une réponse immunitaire innée conduisant à la migration de monocytes et de lymphocytes dans la cavité articulaire. Alors qu'au cours de la phase inflammatoire, l'activation des LT reconnaissant un ou plusieurs antigène(s) du soi ou du non-soi dans l'articulation conduit à la stimulation des LB et à l'amplification de l'activation des MΦ et des FLS. Enfin, la dernière phase consiste en la destruction articulaire qui est essentiellement médiée par les ostéoclastes et des effecteurs libérés par les FLS qui acquièrent un phénotype agressif (Firestein, 2003; Firestein and Zvaifler, 2002).

Ainsi, la stimulation du système immunitaire inné par des agents infectieux et des cytokines peut contribuer à l'initiation de la PR et à l'activation des réponses de l'immunité adaptative. En outre, un défaut dans la régulation des voies du système immunitaire inné peut prédisposer à l'activité persistante des mécanismes immunitaires à la fois innés et adaptatifs dans cette maladie (Arend, 2001).



## 2. Cytokines

Les cytokines sont des médiateurs protéiques locaux, connus pour être impliqués dans presque tous les processus biologiques importants, y compris la croissance et l'activation cellulaires, l'inflammation, et l'immunité (Feldmann et al., 1996). Ainsi, il n'est pas surprenant qu'elles jouent un rôle dans une maladie auto-immune telle que la PR, dans laquelle il existe une inflammation chronique, avec destruction du cartilage et de l'os.

Les cytokines régulent un large éventail de processus inflammatoires qui sont impliqués dans la pathogenèse de la PR. Dans les articulations rhumatoïdes, il est bien connu qu'un déséquilibre entre les activités des cytokines pro- et anti-inflammatoires favorise l'induction de l'auto-immunité, de l'inflammation chronique et donc des lésions articulaires. Ce réseau de cytokines est un domaine complexe, avec beaucoup de cytokines montrant des actions pléiotropes et de nombreuses cibles différentes. Le contrôle de l'équilibre entre ces deux groupes est considéré comme un objectif thérapeutique important.

On parle souvent de dérégulation de la balance cytokinique en faveur des cytokines pro-inflammatoires, car nous pouvons observer par exemple dans la PR une activation et une différenciation des LT vers un profil Th1 et/ou Th17 pro-inflammatoire aux dépens des Treg grâce à la présence dans le tissu synovial de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-15, l'IL-1 et l'IL-6 et en moindre niveau de cytokines anti-inflammatoires comme le facteur de croissance transformant (TGF)  $\beta$ . À leur tour, les cellules T stimulent l'inflammation via la libération d'IL-17 et par des interactions avec les M $\Phi$  adjacents. Ces M $\Phi$  sont d'importants producteurs de cytokines, notamment le TNF (une cytokine clé de la PR), l'IL-1, l'IL-6, l'IL-15 et l'IL-18, entraînant de nombreuses voies pro-inflammatoires dans le tissu synovial. Les ACPA produits par les LB favorisent la différenciation des monocytes en M $\Phi$  et l'activation de ces derniers pour produire du TNF- $\alpha$  (Clavel et al., 2008). Ainsi, les cellules B jouent un rôle essentiel dans la synovite, en partie grâce à la présentation d'antigènes, la production d'auto-Ac et à la libération de cytokines telles que l'IL-6 (Youinou et al., 2009). Par ailleurs, la différenciation et l'expansion des LB résultent de leur stimulation par des cytokines comme l'IL-6, l'IL-10. De plus, RANKL qui est produit par les LB (Yeo et al., 2011), les PNN (Chakravarti et al., 2009) et les fibroblastes (Kim et al., 2009) avec le TNF, l'IL-17 et l'IL-1, sont responsables de la maturation et de l'activation des ostéoclastes, aboutissant à la résorption osseuse (Lubberts and Berg, 2013; McInnes and Schett, 2007). Rappelons que localement les PNN sont abondants, activés et produisent du TNF- $\alpha$  et de l'IL-8, cytokine également associée à la PR, tout comme le GM-CSF (Wright et al., 2014).

Une caractéristique importante de la synovite rhumatoïde est le déficit relatif d'expression de plusieurs cytokines régulatrices, contribuant ainsi au déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans les articulations. Par conséquent, bien que l'IL-10, IL-11 et l'IL-1Ra soient exprimés par les cellules mononucléaires synoviales, elles ne sont pas présentes à des concentrations locales suffisantes pour contrecarrer l'activité pro-inflammatoire dominante. De plus, l'IL-2 et IL-4 dérivées des LT sont presque absentes, ce qui peut nuire à la production de cellules T régulateurs (Treg) et favoriser la différenciation cellulaire Th1 ou Th17, respectivement. Les récepteurs solubles du TNF et de l'IL-1 (TNFR1 et l'IL-1R) sont facilement détectables dans le liquide synovial, mais ne sont pas suffisants pour contenir l'inflammation induite par ces cytokines (Feldmann et al., 1996; Lubberts and Berg, 2013). Dans ce contexte, nous pouvons noter que les thérapies ciblant le TNF et l'IL-6R sont efficaces en partie dans la PR (Wright et al., 2014).

### 3. Immunité adaptative

Nous allons essentiellement discuter de l'implication de l'immunité innée durant la PR, car cette thèse a porté sur le rôle des NET sur les cellules de l'immunité innée.

La réponse adaptative, aussi appelée réponse spécifique ou acquise, tire son nom de l'adaptation de l'organisme face à un agent infectieux particulier. Contrairement à la réponse innée, elle demande un temps de latence pour permettre la prolifération cellulaire. Elle se distingue également par la faculté de mémoire de l'organisme où la réponse s'améliore à chaque nouvelle rencontre de l'antigène. Cette réponse devient plus intense et plus spécifique.

Dans la PR, les gènes de susceptibilité associés à cette pathologie et la présence d'auto-Ac placent clairement l'immunité adaptative au centre de la pathogenèse.

Pendant de nombreuses années, le LT était considéré comme la cellule pivot de la physiopathologie de la PR à cause de la présence presque exclusive de LT CD4<sup>+</sup> activés ou mémoire dans la synovite rhumatoïde, de l'existence d'une proportion de LT autoréactifs circulants plus élevée chez les patients atteints de PR que chez les sujets sains, du déclenchement de la maladie chez des souris normales après injection de LT provenant de modèles murins d'arthrite au collagène et enfin du lien établi entre la PR et les molécules du CMH II (Skapenko et al., 2005). De plus, le LT participe directement ou indirectement en collaboration avec les LB, les DC, les cellules endothéliales ou les ostéoclastes à la production d'auto-Ac, à la libération de cytokines pro-inflammatoires et de métalloprotéases, à l'angiogénèse ou à la destruction ostéocartilagineuse. Bien que les autres acteurs cellulaires aient une place tout aussi importante dans la PR, le LT reste néanmoins l'initiateur des

réponses immunes à l'origine de cette affection, d'où l'intérêt majeur qu'il peut y avoir à moduler son activation (Blache et al., 2011).

Depuis la description de Mosmann et Sad en 1996 (Mosmann and Sad, 1996), deux sous-ensembles de cellules T ont été bien caractérisés. L'un de ces sous-ensembles produit l'IFN- $\gamma$  mais pas l'IL-4 (Th1) et l'autre produit l'IL-4 mais pas l'IFN- $\gamma$  (Th2) (Boissier et al., 2012). Les lymphocytes Th1 dans la synoviale rhumatoïde sont recrutés à partir du sang périphérique et s'organisent en agrégats qui ressemblent par leur morphologie à l'architecture folliculaire des ganglions lymphoïdes. La plupart des LT synoviaux expriment à la fois les marqueurs CD4 et CD45RO, et sont donc des LT auxiliaires mémoires. Ces lymphocytes peuvent être à nouveau activés par les CPA par engagement des molécules du TCR, des molécules HLA-DR mais aussi des molécules de costimulation comme CD28 et CD80/CD86. Un traitement basé sur une administration de CTLA4-Ig (abatacept) qui bloque CD80/CD86 et induit un signal négatif sur les LT effecteurs a démontré son efficacité dans la PR soulignant l'importance de cette voie de costimulation (Kremer et al., 2003).

Cependant, même si les cellules T sont abondantes dans le milieu synovial, leur rôle fonctionnel reste insuffisamment compris. Le ciblage direct des cellules T par la ciclosporine ou l'utilisation d'agents thérapeutiques qui permettent une déplétion de ces cellules montrent une efficacité limitée ou nulle (Panayi, 2006). Cette constatation permet de suggérer la nécessité de cibler les sous-ensembles de cellules T.

Bien que la PR soit classiquement considérée comme une maladie médiée par les cellules Th1, l'attention est de plus en plus axée sur le rôle des Th17, un sous-ensemble qui produit l'IL-17A, 17F, 21, et 22 et le TNF- $\alpha$  (Chabaud et al., 1998a; Miossec et al., 2009). Dans la PR, un environnement cytokinique particulier contenant du TGF- $\beta$ , de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-21 et de l'IL-23 favorise la différenciation des lymphocytes Th0 en Th17 plutôt qu'en Treg (Yang et al., 2008). De plus, l'IL-17A produite par les Th17 a un effet synergique avec le TNF pour activer les fibroblastes et les chondrocytes (Hot and Miossec, 2011).

L'effet des cellules Th17 est directement contrecarré par les cellules Th2, car l'IL-4 est un puissant inhibiteur de la différenciation Th17. Les cellules Th17 ne produisent habituellement pas d'IFN- $\gamma$ , mais des exceptions existent. L'IL-17 induit l'expression par les fibroblastes d'IL-1, d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , de NO synthase inductible, de métalloprotéinases et de chimiokines. L'IL-21 exerce des effets pro-inflammatoires marqués en agissant sur les cellules T, les cellules "Natural Killer" (NK) et les cellules B produisant des auto-Ac (Boissier et al., 2012).

L'activation des LT est sous le contrôle des LTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> exprimant le facteur de transcription FOXP3 ("Forkhead box 3"). Ces Treg sont capables d'inhiber l'expansion

clonale des LT CD4<sup>+</sup>. La molécule CTLA4 exprimée sur les Treg interagit avec la protéine CD28 exprimée sur les LT CD4<sup>+</sup> et induit un message inhibiteur. Dans la PR, les Treg sont présents dans le sang et la synoviale, mais n'exercent pas pleinement leur fonction régulatrice (Behrens et al., 2007). L'administration des antagonistes du TNF- $\alpha$  (anti-TNF- $\alpha$ ) aux patients atteints de PR permet de corriger cette défaillance avec des Treg qui récupèrent une fonction inhibitrice soulignant le rôle du TNF- $\alpha$  sur le contrôle de la fonction des Treg (Nadkarni et al., 2007). De plus, il est à noter que l'amélioration de la PR pendant la grossesse pourrait être due, en partie, à l'expansion des Treg (Quintero et al., 2012).

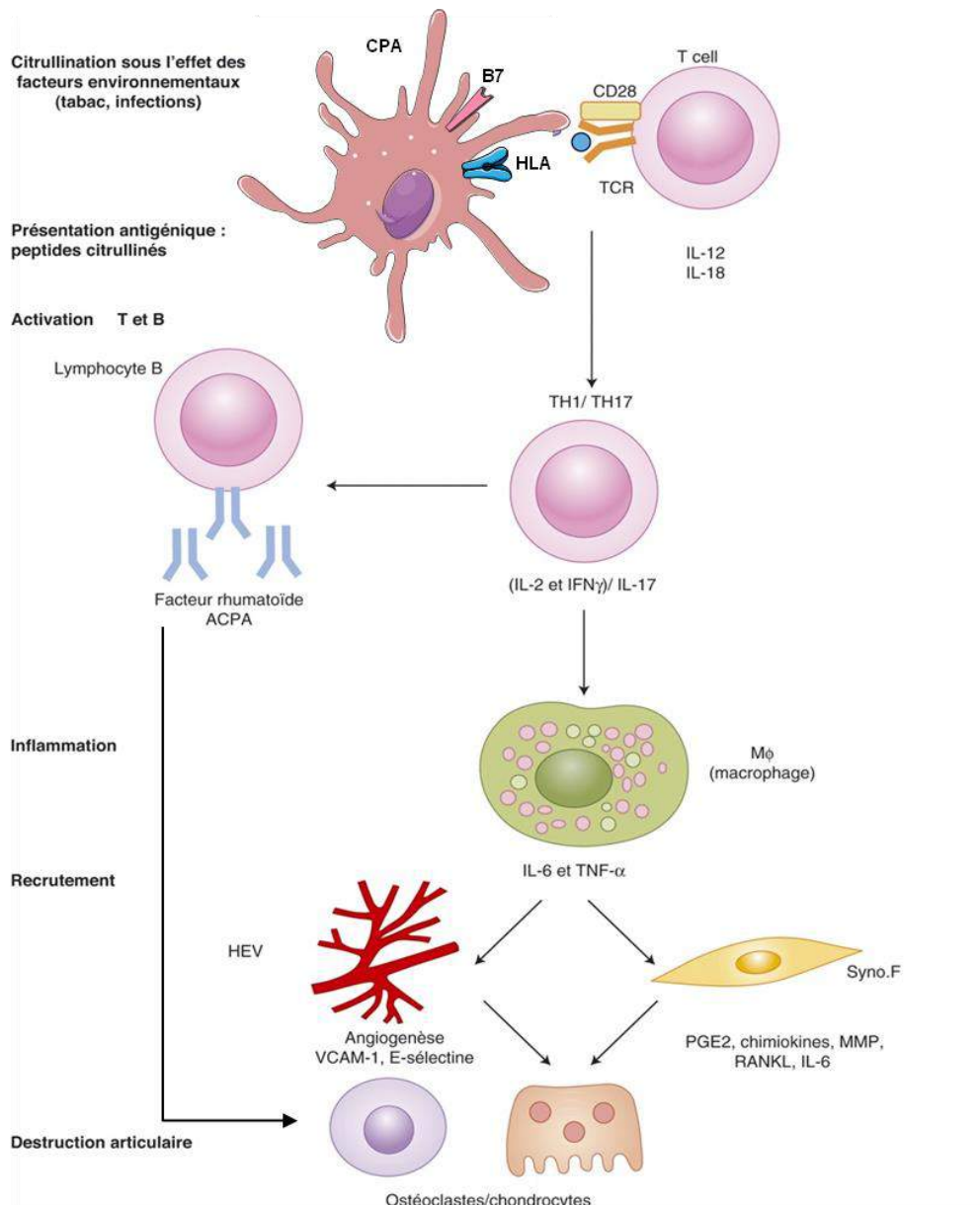
L'immunité adaptative humorale fait partie intégrante de la PR. Les cellules B synoviales sont principalement localisées dans les agrégats de cellules T et B. En effet, ce contact étroit avec les cellules T fait intervenir APRIL (Ligand inducteur de la prolifération), BLyS ( Stimulateur de LB), et les chimiokines CC et CXC (Ohata et al., 2005). Par ailleurs, les plasmablastes et les plasmocytes sont largement distribués dans la synoviale et dans la moelle osseuse juxta-articulaire que les cellules B (Schett and McInnes, 2011).

L'efficacité du rituximab, un Ac monoclonal anti-CD20 dans la PR montre l'importance des LB dans la pathogénèse de cette maladie (Behrens et al., 2011).

Les LB sont avant tout d'importantes CPA dans la PR et Melet et al. ont montré en 2013 que le rituximab peut avoir aussi un impact sur les LT chez l'homme, entraînant une diminution des CD4<sup>+</sup> (Mélet J. et al., 2013). Les LB producteurs de FR ont vraisemblablement un rôle de présentation antigénique particulièrement important. Ils ont en effet la capacité de lier des complexes d'Ig de différentes spécificités reconnaissant des antigènes du soi ou du non-soi. Il a été montré que la diminution du taux de FR sous rituximab est corrélée à la réponse clinique, ce qui laisse penser que les LB producteurs de FR ont un impact important sur l'activité de la maladie (Thurlings et al., 2008; Tsiakalos et al., 2008).

Comme illustré en **Figure 5**, les LB participent également à la pathogénèse de la PR via la production d'auto-Ac (FR et ACPA), les derniers étant d'importants outils pour le diagnostic de la PR. Par exemple, dans les modèles murins d'arthrite, le transfert d'Ac peut induire une arthrite (Monach et al., 2004) soulignant leur importance. Les ACPA apparaissent plusieurs années avant le début de la maladie et augmentent progressivement en quantité et en nombre de sous-types (Sokolove et al., 2012). Les ACPA peuvent avoir un effet pathogène direct en se liant aux précurseurs des ostéoclastes, entraînant leur différenciation en ostéoclastes participant ainsi à la perte osseuse (Harre et al., 2012). De plus, les sujets sains ACPA<sup>+</sup> ont une masse osseuse plus faible que les sujets sains ACPA<sup>-</sup>, ce qui souligne le rôle des ACPA sur le remodelage osseux, indépendamment de l'arthrite (Kleyer et al., 2014).

Le rôle des cellules B dans la pathogenèse de la PR va au-delà de la production d'auto-Ac incluant ainsi la présentation d'auto-Ag mais aussi la production de cytokines (Schett and McInnes, 2011). Ces cellules peuvent produire de nombreuses cytokines telles que l'IL-2, 4, 6, 10, 12, 16 et voire même l'IFN- $\gamma$ , les lymphotoxines  $\alpha$  et  $\beta$ , le TGF- $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . Dans certaines études le LB est défini selon son profil de sécrétion cytokinique. Dans la PR, les analyses des transcrits d'ARNm montrent que les B synoviaux de tous les patients expriment IL-12p35, IL-12p40, IL23p19, IL-7, IL-15, TNF- $\alpha$ , BAFF, APRIL et RANKL alors que rares sont ceux qui produisent de l'IL-1, IL-21, IL-18, IL-6 et IL-10. La production de RANKL par les LB synoviaux pourrait expliquer en partie l'activation des ostéoclastes (Yeo et al., 2011).



**Figure 5 : Immunité adaptative dans la PR (Morel, 2014)**

**ACPA** : Anticorps anti protéines citrulinées, **B7** : Molécule de co-stimulation, **CD** : Cluster de différenciation, **CPA** : Cellule présentatrice d'antigène, **HEV** : Veinule postcapillaire, **HLA** : Antigène des leukocytes humains, **IFN** : Interféron, **IL** : Interleukine, **MMP** : Métalloprotéinase matricielle, **PGE** : Prostaglandine, **RANKL** : Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B, **Syno.F** : synoviocyte fibroblastique, **TCR** : Récepteur des cellules T, **TH** : Lymphocyte T auxiliaire, **TNF** : Facteur de nécrose tumorale, **VCAM** : "Vascular cell adhesion molecule".

Le déclenchement de la PR pourrait faire intervenir l'immunité innée et/ou adaptative. L'activation des TLR stimule les cellules dendritiques, les synoviocytes, les macrophages. L'activation des lymphocytes T dépendrait de la reconnaissance d'un antigène présenté par les CPA. La combinaison des deux, cela aboutirait à l'activation des lymphocytes T en lymphocytes Th1. Ces lymphocytes stimuleraient, par l'intermédiaire des cytokines, les synoviocytes et les macrophages. Les médiateurs (cytokines, enzymes) produits par ces cellules activeraient les ostéoclastes. Ces ostéoclastes, sous l'effet de RANKL, seraient activés et interviendraient dans la destruction ostéoarticulaire. Les ACPA produits par les LB favorise la différenciation en ostéoclaste.

## 4. Immunité innée

Le développement de techniques permettant la détection de cytokines dans le liquide et la membrane synoviale a conduit à reconsidérer le rôle de l'immunité innée dans la pathogénie de la PR. Les cytokines libérées par les MΦ et les FLS (IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$ ) sont présentes en plus grandes quantités par rapport aux cytokines secrétées par les LT (IL-2, IFN- $\gamma$ ). En outre, l'efficacité des stratégies thérapeutiques visant à bloquer ces cytokines (Ac anti-TNF- $\alpha$ , TNFR, IL-1Ra, ...) montre l'importance de ces médiateurs dans l'inflammation chronique et la destruction articulaire observées au cours de la PR.

Au cours de cette partie je me suis focalisée sur quelques éléments de l'immunité innée qui ont été étudiés plus précisément durant ma thèse à savoir le C1q, le LL-37, le TLR-9 et l'inflammasome.

### *a) Médiateurs solubles de l'immunité innée*

#### *(1) Complément*

Le complément ou système du complément a été décrit il y a plus d'un siècle comme étant un facteur sérique thermolabile qui à l'aide d'Ac présents dans le sérum était capable de lyser des bactéries responsables de l'infection. Cette activité, qui complète l'action bactéricide des Ac, lui a valu le nom de complément. Depuis cette définition s'est affinée mettant en avant son appartenance au système immunitaire inné, sa capacité d'éliminer les pathogènes sans avoir besoin d'une exposition antérieure et son activation avant même la synthèse des Ac (Okroj et al., 2007).

Ainsi, le complément non seulement protège contre les agents pathogènes envahissants en raison de ses activités d'opsonisation, inflammatoires et lytiques, mais contribue également à la régulation et la modulation d'autres systèmes biologiques, en particulier la réponse immunitaire adaptative (Köhl, 2006; Walport, 2001).

Cependant, l'activation du système du complément contribue à la pathogénèse de plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires, y compris la PR (Ballanti et al., 2011 ; Okroj et al., 2007).

### *(a) Voies d'activation*

Ce système comprend plus de 30 protéines plasmatiques et membranaires, qui s'activent à travers une cascade enzymatique. Dans une telle cascade, un composant activé active un autre composant jusqu'à l'aboutissement de l'effet biologique (Walport, 2001). L'activation du complément peut se faire par 3 voies distinctes illustrées par la **Figure 6** : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne (Ballanti et al., 2011).

La voie classique peut être initiée par la liaison du C1 via la sous unité C1q directement aux complexes immuns (CI) (Nauta et al., 2004). La liaison du C1q à l'anticorps induit des changements conformationnels dans le complexe C1 et conduit au clivage de C4 en C4a et C4b. L'opsonine C4b clive à son tour C2 en C2a et C2b, entraînant la formation du complexe C4bC2a, dit C3 convertase classique (Gál et al., 2009). Cette voie peut être activée par plusieurs déclencheurs présents dans l'articulation enflammée dans le cas d'une PR, tels que les auto-Ac (IgM ou IgG), liés à leurs cibles formant un CI, les cellules apoptotiques et les protéines du cartilage telles que la fibromoduline. Ainsi, les cellules B produisant des auto-Ac, qui à leur tour forment des CI, contribuent à la pathogenèse de la PR en partie par l'activation du complément (Okroj et al., 2007).

La voie alterne est activée quand un composant du complément activé spontanément se lie à la surface d'un pathogène. On peut observer cela lors de la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) : C3b se forme spontanément et se fixe à la surface contenant le LPS, puis s'associe au facteur B qui est clivé en Bb et Ba par le facteur D. Ba est libéré alors que la sérine protéase Bb reste associée au C3b pour former la C3 convertase alterne (C3bBb) (Rus et al., 2005a).

L'activation de la voie des lectines est initiée par la liaison de la MBL (Lectine liant le mannose), une protéine sérique ou de ficoline, une protéine soluble du système immunitaire innée, aux carbohydrates contenant du mannose sur les micro-organismes (Chen et al., 2010). Cela entraîne l'activation de sérine protéases MASP-1, MASP-2 et MASP-3 ("Mannan-Associated Serine Protase"). MASP-2, une l'enzyme clé de la voie des lectines, clive C4 et ensuite C2, conduisant à la formation de la même C3 convertase que dans la voie classique, c'est-à-dire C4bC2a (Gál et al., 2009).

L'Activation du système du complément par l'une des trois voies conduit au clivage de C3 en C3a et C3b par la C3 convertase pour au final former la C5 convertase (Ballanti et al., 2011).

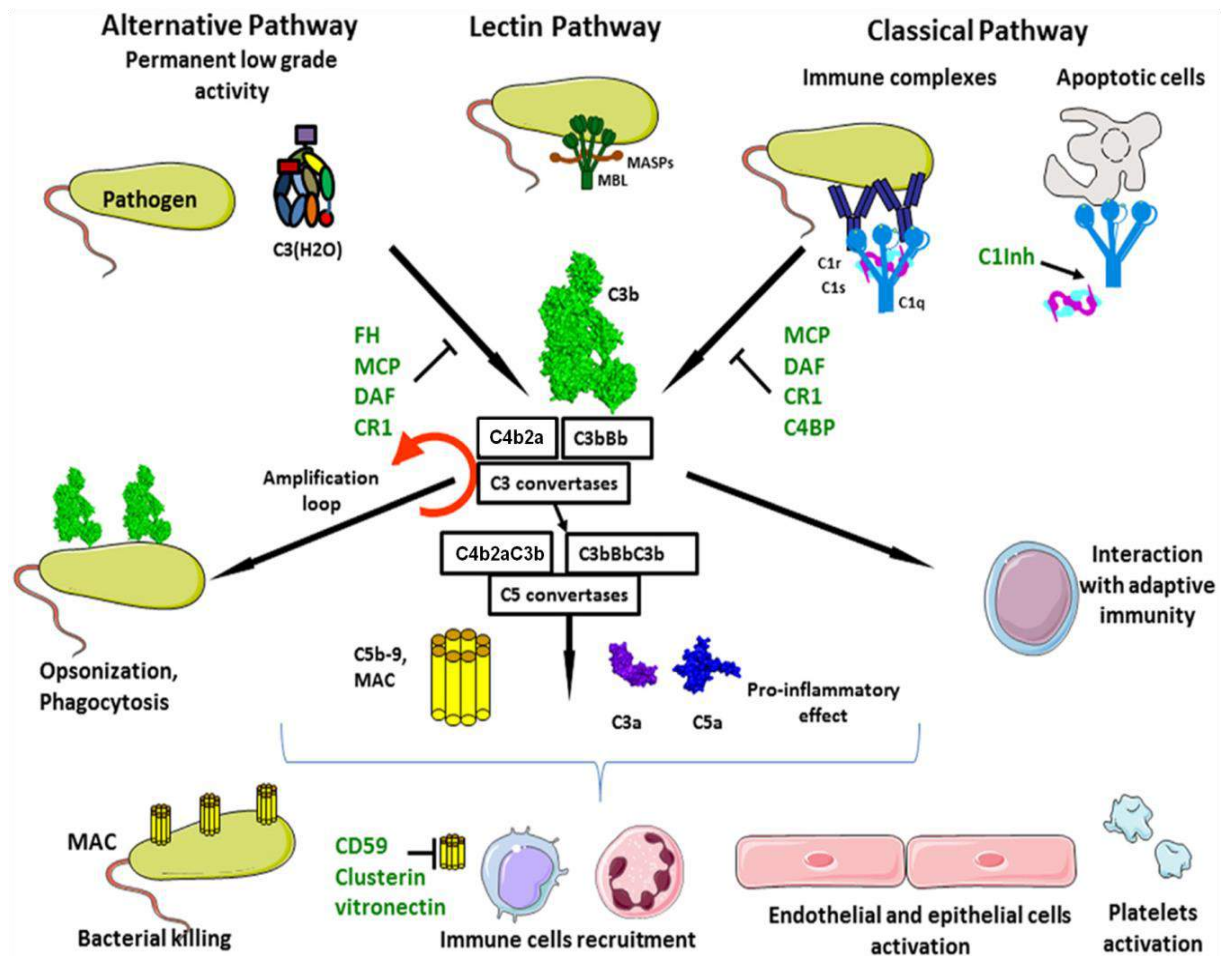
Au centre de l'activation du complément se trouve ainsi la formation de complexes enzymatiques tels que les C3- et C5-convertases suite au clivage des proenzymes conduisant à



leur activation et à la libération concomitante de fragments d'anaphylatoxines chimioattractifs (C3a, C5a) et d'opsonines (C1q et C3b : qui recouvrent les cellules afin de faciliter la phagocytose). Lors de l'activation de C5, le fragment C5a est libéré et agit comme chimioattractif pour les PNN, les monocytes, les MΦ et les éosinophiles. Le C5a induit également la production de cytokines et d'autres médiateurs pro-inflammatoires, et améliore la perméabilité vasculaire (Riedemann et al., 2003). Des effets similaires mais moins prononcés sont induits par les anaphylatoxines C3a et C4a. L'autre produit de l'activation de C5, le C5b, initie l'assemblage du complexe d'attaque membranaire (MAC) après liaison avec C6, C7, C8 et C9 sur la membrane de la cellule cible. Le MAC peut contribuer à l'inflammation en raison de sa capacité à lyser les cellules et à induire des changements drastiques dans les cellules (Fosbrink et al., 2005; Kilgore et al., 1996).

Il semble que l'anaphylatoxine C5a soit le principal produit de l'activation du complément responsable des lésions tissulaires dans la PR, bien que le dépôt du MAC ainsi que l'opsonisation avec des fragments de C3b soient également importants (Okroj et al., 2007).

Les voies classiques et des lectines génèrent la même C3 et C5 convertase (C3bC4bC2a), alors que la voie alternative génère une C3 et C5 (C3bBbC3b) convertase différente. Les trois voies convergent vers l'activation de C5 pour former C5a (un chimioattractant puissant) et le complexe d'attaque membranaire C5b-9, qui peut conduire à la lyse cellulaire (Chen et al., 2010).



**Figure 6 : Voies d'activation du complément (Merle et al., 2015)**

**C1Inh** : Inhibiteur de la C1 esterase, **C4BP** : "C4b binding protein", **CD** : Cluster de différenciation, **CR1** : Recepteur du complément, **DAF** : "decay accelerating factor", **FH** : Facteur H, **MAC** : Complexe d'attaque membranaire, **MASP** : "Mannose-associated serine protease 1", **MBL** : Mannose liant les lectines, **MCP** : Cofacteur protéique membranaire.

Le système du complément est composé de 3 voies. La voie classique est activée par la formation de complexe immunitaire à la surface du pathogène et des cellules apoptotiques, menant à la formation du complexe C1. La voie des lectines reconnaît le mannose du glycanes sur le pathogène conduisant à la formation du complexe MBL MASP. Ces 2 voies mènent à la formation de la convertase C3 classique : C4b2a. La voie alterne est activée en permanence à de faible niveau grâce à l'hydrolyse du C3 en C3(H<sub>2</sub>O). L'absence d'inhibiteur du complément sur le pathogène mène à la formation de la C3 convertase alternative : C3bBb. L'activation du complément permet l'opsonisation et la phagocytose grâce aux dépôts de C3b, la lyse bactérienne par la formation du complexe C5b-9 et l'inflammation en recrutant les cellules immunitaires, endothéliales et épithéliales, et l'activation des plaquettes.

### *(b) Pathologies liées au complément*

La découverte d'individus avec des déficits héréditaires du complément a grandement contribué à une meilleure compréhension du rôle du système du complément dans la défense de l'hôte et de son homéostasie.

Ces pathologies liées à un déficit de complément sont souvent associées à des infections récurrentes par des bactéries encapsulées et des maladies à CI telles que le LES et la glomérulonéphrite (S. Reis et al., 2006). Cependant, les défauts et les déficiences dans les inhibiteurs du complément provoquent également des maladies telles que le syndrome hémolytique et urémique atypique (Richards et al., 2007), la glomérulonéphrite membrano-proliférative et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Schaumberg et al., 2007; Zipfel et al., 2006). Une activation inappropriée ou excessive du complément contribue à la pathogenèse de la glomérulonéphrite (Seelen and Daha, 2006), des lésions d'ischémie (Chan et al., 2006), de la PR (Allegretti et al., 2005), de la sclérose en plaques (Rus et al., 2005b), et beaucoup d'autres maladies inflammatoires aiguës et chroniques.

### *(c) Régulateurs de la cascade du complément*

Pour minimiser les dommages induits par la sur-activation du complément sur le soi, il existe de multiples régulateurs du complément dans le plasma et sur les cellules (Mizuno, 2006).

Les inhibiteurs du complément sont solubles ou liés à la membrane et agissent à différents niveaux de la cascade. Il y a quatre principaux types d'inhibiteurs :

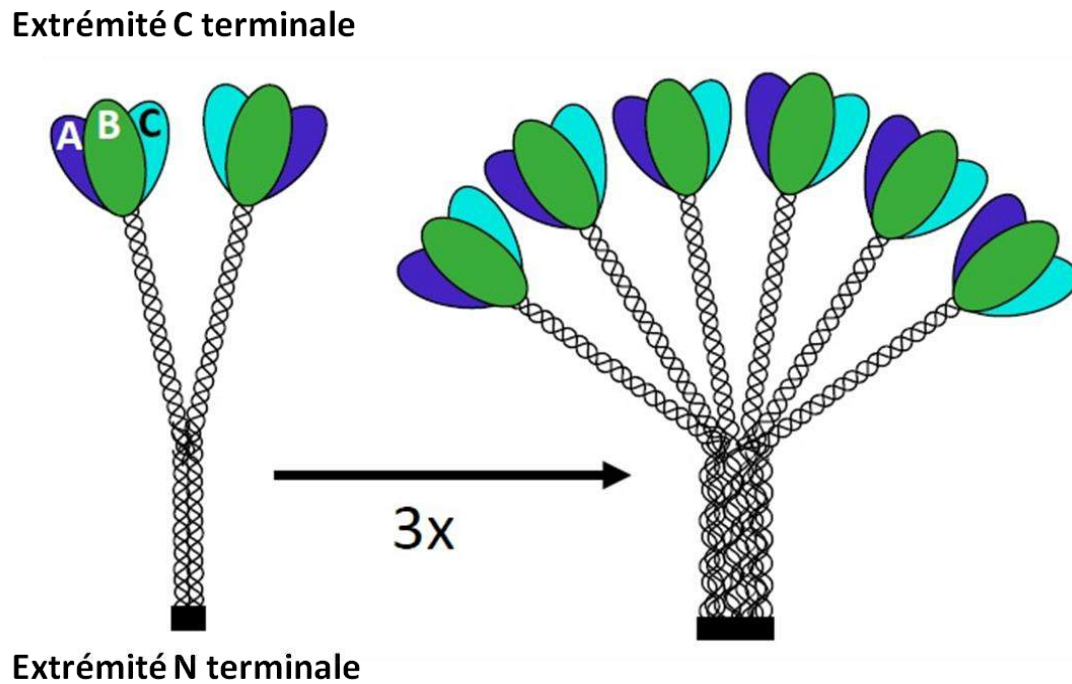
- Les premiers sont les C1 inhibiteurs ou inhibiteurs de la C1 estérase. Ce sont des protéines sériques dont la fonction est d'inhiber les sérines protéases qui appartiennent à la famille des serpinines (Harpel and Cooper, 1975), elles agissent donc sur le C1r et le C1s activés
- Le deuxième type comprend le sérum carboxypeptidase N (SCPN), qui inactive protéolytiquement les anaphylatoxines générées à partir de C5 et C3 : C3a, C4a et C5a (Skidgel et al., 1986).
- Le troisième est la protectine CD59, qui est attachée aux cellules hôtes par l'intermédiaire de glycoposphatidylinositol (GPI) d'ancrage, empêche le C9 de polymériser et de former le MAC (Kim and Song, 2006).
- Le dernier groupe est formé de nombreux inhibiteurs qui agissent sur les convertases C3 et C5 soit en dissociant les complexes enzymatiques (accélération de la désintégration), soit en favorisant la dégradation enzymatique de C3b ou C4b médiée

par SPF (“Serine Proteinase Factor I”) (Kim and Song, 2006; Tsiftoglou et al., 2005).

Plusieurs inhibiteurs du complément ont été reconnus en tant que thérapeutiques potentiels en raison de leurs rôles cardio-protecteurs (Fu et al., 2006), leurs actions anti-inflammatoires (Mulligan et al., 1999), et leur potentiel pour contrecarrer l’hémoglobinurie paroxystique nocturne (Hillmen et al., 2006) ou le rejet hyper-aigu au cours de la xénotransplantation (Kirschfink, 2002). De plus, le succès de l’inhibition du complément dans les modèles expérimentaux de PR identifie le complément comme cible thérapeutique potentielle dans la PR.

### *(d) C1q*

C1q est une protéine de haut poids moléculaire (460 kDa) principalement synthétisée localement par les MΦ et les DC immatures, à la différence des autres facteurs du complément principalement synthétisés dans le foie par les hépatocytes (Loos et al., 1989). C1q est formé de 18 chaînes polypeptidiques : six chaînes de C1qA, six chaînes de C1qB, et six chaînes de C1qC (Arlaud et al., 2002). Les chaînes A, B et C s’associent en six hétérotrimères pour former la molécule C1q mature fonctionnelle. Chaque chaîne contient un domaine N-terminal de type collagène et un domaine C-terminal globulaire. Cette molécule est comparée à un « Bouquet de tulipes » comme illustré en **Figure 7**, où les six régions globulaires du C1q (chacune formée d’une chaîne de C1qA, de C1qB et de C1qC) sont disposées à l’extrémité de tiges collagènes émergeant d’une queue formée des six triples hélices de type collagène. Ces tiges se lient à deux molécules de chacun des composants C1r et C1s, formant le complexe C1 (1<sup>ère</sup> protéine de la voie classique) (Janeway et al., 2009).



**Figure 7 : Représentation schématique de l'assemblage d'une molécule C1q (Frachet et al., 2015)**

Le C1q est assemblé à partir de trois chaînes de polypeptides (A, B et C) codées par 3 gènes différents (C1QA, C1QB et C1QC). Chaque chaîne comprend une séquence collagène like N-terminale et une tête globulaire C-terminale, avec des ponts disulfures reliant les extrémités N-terminales des chaînes A, B et C. Chaque dimère A-B s'associe à une chaîne C, ce qui donne une sous-unité de base composée de deux tiges collagène like hétérotrimériques prolongées par des domaines globulaires. L'association de 3 sous-unités donne lieu à une longue protéine avec sa forme typique de bouquet à six fleurs, les tiges étant maintenues ensemble grâce à leur partie N-terminale et se séparent au niveau des têtes globulaires.

Des changements conformationnels de la molécule C1q induite par la liaison à l'un de ses ligands entraînent la libération de ces enzymes : changement de la conformation de C1r, qui peut alors cliver et activer le zymogène C1s. Ses ligands traditionnels sont les IgG et IgM présentes dans les CI. Les fragments constants de ces Ac sont reconnus par les régions globulaires du C1q qui reconnaissent aussi des structures polyanioniques à la surface de bactéries, de virus ou de parasites et sont capables de lier les cellules apoptotiques (cellules endothéliales, kératinocytes et cellules mononuclées circulantes), alors que la queue de type collagène se lie aux récepteurs au C1q, à l'ADN, à la myéline et au LPS. En plus le C1q a la capacité de se fixer à de nombreux agents de phase aiguë dont la CRP, l'amyloïde P et la PTX3 (pentraxine 3) (Trouw et al., 2013).

Les récepteurs cellulaires pour le complément ont été identifiés en tant que tels sur les leucocytes périphériques par le groupe de Nussenzweig en 1968 (Lay and Nussenzweig,

1968). Depuis, de nombreuses protéines liant le C1q ont été identifiées, certains sont présentés dans le **Tableau 2**.

gC1qR/p33 (“Receptor of the C1q globular region“) est une protéine multi-fonctionnelle de 33 kDa capable de fixer les régions globulaires du C1q (Ghebrehiwet et al., 1994). Ce récepteur se trouve au niveau de la face interne de la matrice mitochondriale. Il a été suggéré que lorsque les cellules sont stressées ou en cours d'apoptose, gC1qR peut se trouver sur les surfaces cellulaires et ainsi être en mesure de se lier au C1q mais aussi à de multiples ligands tels que la thrombine, la vitronectine ou le kininogène de haut poids moléculaire (Ghebrehiwet and Peerschke, 1998; Ghebrehiwet et al., 2001). En plus de son expression à la membrane, gC1qR/p33 peut être détectée dans différents compartiments cellulaires et son expression peut être induite par des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou du LPS.

cC1qR/calréticuline (“Receptor of the C1q collagenous domain“) initialement décrit pour son interaction avec le C1q (Ghebrehiwet et al., 1984), ce récepteur interagit également avec la MBL et les protéines du surfactant SP-A et SP-D, protéines de la famille des collectines. Ces protéines présentent la particularité de posséder comme le C1q un domaine de type collagène. Ce récepteur a été initialement localisé dans le réticulum endoplasmique de la plupart des cellules eucaryotes où il participe à l'homéostasie du calcium et au contrôle de la qualité des glycoprotéines qui y sont formées. Il assure ce rôle de chaperon avec la calnexine, autre protéine résidente du RE (Alberts et al., 2002). La CRT (calréticuline) a également été détectée dans le milieu extra-cellulaire et à la surface cellulaire sous certaines conditions de stress, lors de l'inflammation, d'un choc thermique ou d'une infection virale (Eggleton et al., 1997).

Ces 2 récepteurs identifiés ci-dessus n'ont ni de domaine transmembranaire, ni d'ancrage, ils fonctionnent probablement comme des corécepteurs en association avec des protéines transmembranaires à la surface cellulaire telles que le CD91/LRP1 (CRT) et DC-SIGN (gC1qR), qui ont récemment été reconnues comme pouvant lier directement le C1q (Duus et al., 2010; Hosszu et al., 2012).

Names (CD number)	Receptor type	Ectodomain composition	C1q specificity	Main self ligands /partners	Functional relevance to autoimmunity
<b>gC1qR, C1qBP, p33, p32</b>	Mitochondrial protein	"doughnut-like" trimer	gC1q	DC-SIGN, CRT β1 integrin	Gene deletion in mouse: lethality
<b>cC1qR, calreticulin, CRT</b>	ER lectin-like chaperone	Lectin-like + "arm"	gC1q cC1q	MBL, ficolins, CD91	Gene deletion in mouse: lethality
<b>CR1 (CD35)</b>	Regulator of complement activation	4 long homologous repeats of CCP modules	?	C3b, C4b MBL, ficolins	Marked decline in CR1 observed on erythrocytes from SLE patients
<b>LRP1 α2M receptor (CD91)</b>	LDL receptor	4 clusters of LA, WTD and EGF-like modules	gC1q cC1q	Lipoproteins, ECM proteins, CRT, CR3, protease-inhibitor complexes	MΦ and DCs selective LRP1 KO mice: impaired efferocytosis
<b>α2β1 (CD49bCD29)</b>	β1 integrin	integrin	cC1q gC1q?	Collagen, laminin MBL, SP-A, CRT	KO mice: profound defect in the innate immune response
<b>SREC-I, SCARF1, SR-F</b>	Scavenger receptor	6/7 EGF-like modules	?	oxLDL, HSP CRT	KO mice: autoimmunity, deficient AC uptake
<b>RAGE, SR-J</b>	Scavenger receptor	3 IgG-like modules (V-C1-C2)	gC1q	HMGB1, AGE, PS, CR3	KO mice: deficient AC uptake
<b>CR3, Mac1, αMβ2 (CD11bCD18)</b>	β2 integrin	integrin	?	iC3b, sRAGE, LRPI, collagen	Reduced efferocytosis in CD11b-lupus associated variant
<b>DC-SIGN (CD209)</b>	C-type lectin receptor	Tetramer: neck + C-lectin domain	gC1q cC1q?	ICAM-3, gC1qR	SIGNR1 KO mice: delayed AC clearance
<b>LAIR-1 (CD305)</b>	Inhibitory immune receptor	Ig-like domain (C2)	cC1q gC1q?	MBL, SP-D, collagens	defective expression and function in B lymphocytes from SLE patients

**Tableau 2 : Récepteurs du C1q (Frachet et al., 2015)**

**AC** : Cellules apoptotiques, **AGE** : "Advanced glycation end-products", **C1qBP** : "C1q binding protein", **cC1qR** : "Receptor of the C1q collagenous domain", **CCP** : Protéines de contrôle du complément, **CR1** : Récepteur 1 du complément, **CRT** : Calréticuline, **DC** : Cellules dendritiques, **DC-SIGN** : "DC-specific intercellular adhesion molecule grabbing non integrin", **ECM** : Matrice extracellulaire, **EGF** : Facteur de croissance épidermique, **gC1qR** : "Receptor of the C1q globular region", **HMGB** : "High-mobility group box 1", **HSP** : Protéine de choc thermique, **ICAM** : "Inter cellular adhesion molecule", **KO** : "Knock out", **LA** : Récepteur de type A des LDL, **LAIR** : "Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor", **LDL** : Lipoprotéines de basse densité, **LRP1** : Récepteur α2-macroglobulin, **Mac** : Complexe d'attaque membranaire, **MBL** : "Mannan-binding lectin", **MΦ** : Macrophages, **PS** : Phosphatidyl sérine, **RAGE** : "Receptor for advanced glycation end-products", **SLE** : Lupus érythémateux systémique, **SREC** : Récepteur scavenger exprimé par les cellules endothéliales, **WTD** : Beta propeller, **α2β1** et **αMβ2** : Intégrine.

CR1/CD35, récepteur 1 du complément, est également appelé le récepteur d'adhérence immunitaire, et a été initialement identifié comme récepteur pour les opsonines C4b et C3b (Klickstein et al., 1997), agissant comme un régulateur de l'activation du complément. CR1 est exprimé sur de nombreuses cellules, y compris les érythrocytes, les éosinophiles, les PNN, les monocytes, les MΦ, les LB, certains sous-ensembles de cellules T, les DC folliculaires et les podocytes glomérulaires (Liu and Niu, 2009). Sur les globules rouges, ce récepteur transporte les particules du complément et les CI à la rate et au foie pour être phagocytés par les MΦ résidents. Depuis, CR1 a été identifié comme étant un récepteur pour le C1q, le MBL et les ficolines (Ghiran et al., 2002; Jacquet et al., 2013; Klickstein et al., 1997). Cependant, l'implication de l'interaction C1q-CR1 dans la phagocytose n'a pas été démontrée jusqu'à présent.

L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  est connue pour être un récepteur pour les composants de la matrice extracellulaire, y compris le collagène, et est impliquée dans l'inflammation et l'immunité (Margadant et al., 2011). Elle est exprimée sur de nombreux types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules hématopoïétiques, y compris les plaquettes (Zutter and Edelson, 2007). Il a été démontré que cette intégrine interagissait avec le C1q et d'autres membres de la famille des collectines tels que la MBL et le surfactant protéine-A. L'interaction C1q- $\alpha 2\beta 1$  a été suggérée jouer un rôle dans l'activation des mastocytes et la sécrétion de cytokines (Edelson et al., 2006; Zutter and Edelson, 2007). L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  interagit avec la CRT à la surface de diverses cellules, y compris les plaquettes (Elton et al., 2002). Il a été proposé que cette intégrine interagit avec la partie collagène-like du C1q et des collectines à travers son domaine  $\alpha 2$  (Edelson et al., 2006).

CD91/LRP1 (ou récepteur  $\alpha 2$ -macroglobuline) est un récepteur multifonctionnel d'endocytose et de signalisation cellulaire de la famille des récepteurs des lipoprotéines de basse densité, exprimé à la fois par les phagocytes professionnels (MΦ et DC) et non professionnels (cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes,...). Il est composé de deux chaînes  $\alpha$  (85 kDa, C-terminal, membranaire) et  $\beta$  (515 kDa, N-terminal, extracellulaire) liées de manière non covalente. Il est impliqué dans la liaison à une grande variété de ligands, y compris les lipoprotéines, les protéines de la matrice extracellulaire ou les protéases (Herz and Strickland, 2001). Une interaction directe entre les molécules LRP1 et C1q a été décrite, impliquant à la fois les tiges collagène et les têtes globulaires du C1q (Duus et al., 2010).

SREC-I joue un rôle crucial dans la reconnaissance et l'engloutissement des cellules apoptotiques et dans la prévention de l'auto-immunité. Cette fonction est médiée par



l'interaction de SREC-I à C1q, ce dernier étant lié à la phosphatidyl sérine à la surface des cellules apoptotiques (Ramirez-Ortiz et al., 2013).

RAGE (“Receptor for advanced glycation end-products“ (AGEs)) est un récepteur de 45 kDa de la superfamille des Ig comprenant un domaine extracellulaire avec 3 domaines Ig-like (Type V, C1 et C2), un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique C-terminale (41 acides aminés). L'oligomérisation de RAGE joue un rôle dans la reconnaissance de ligands et la transduction de signal, qui sont médiées par l'association à des protéines adaptatrices cytoplasmiques (Fritz, 2011).

RAGE est exprimé sur les monocytes, les MΦ et les DC, et agit comme un motif de reconnaissance pour les signaux de danger endogènes, y compris les AGE, le HMGB1, les fibrilles β-amyloïdes, la protéine S-100 et l'ADN, connus pour jouer un rôle pathogène dans des maladies inflammatoires chroniques (Sorci et al., 2013). Il participe également à l'efférocytose (Friggeri et al., 2011; He et al., 2011) et contribue à la résolution de l'inflammation.

RAGE se lie aux têtes globulaires du C1q et améliore la phagocytose médiée par C1q, un processus suggérant l'implication de la formation d'un complexe récepteur avec CR3 (Ma et al., 2012). Milutinovic et al. ont rapporté que RAGE pouvait lier le collagène *in vitro* (Milutinovic et al., 2014).

Le récepteur phagocytaire CR3 (alias Mac-1, intégrine  $\alpha_M\beta_2$ , CD11bCD18) est une intégrine exprimée sur la plupart des cellules immunitaires, y compris les PNN, les DC et les MΦ. Il se lie à une large gamme de ligands incluant les fragments C3 du complément (C3b/iC3b), les protéines de la matrice extracellulaire, les molécules d'adhésion (ICAM-1 et -2) et les motifs microbiens (Frachet et al., 2015).

Il a été démontré que CR3 interagit de manière extracellulaire avec d'autres récepteurs C1q y compris LRP1 (Ranganathan et al., 2011) et RAGE (Ma et al., 2012). En outre, une interaction directe entre CR3 et C1q a été rapportée (Ma et al., 2012). Par contre, les domaines impliqués dans cette interaction ne sont pas encore connus. Comme RAGE, CR3 se lie aux collagènes *in vitro* (Lahti et al., 2013).

DC-SIGN (“DC-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 grabbing non integrin“/CD209) est un récepteur lectine de type C avec une courte queue cytoplasmique N-terminale (37 acides aminés) contenant des motifs de recyclage et d'internalisation, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire C-terminal. Il est exprimé par les DC et les MΦ et est un récepteur impliqué dans de multiples fonctions, y compris l'adhésion, la reconnaissance des agents pathogènes et la présentation antigénique (Garcia-Vallejo and

Kooyk, 2013). L'interaction entre les PNN et les DC est médiée par l'interaction de DC-SIGN avec CR3 (Ludwig et al., 2006). Il a été proposé que l'interaction DC-SIGN-C1q faisait intervenir le site de liaison des IgG de la tête globulaire du C1q et la poche de liaison du  $Ca^{2+}$  du domaine lectine de DC-SIGN (Hosszu et al., 2012).

LAIR-1 ("Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1"/CD305) fait partie de la famille des récepteurs immunitaires inhibiteurs et s'exprime à la surface des cellules immunitaires myéloïdes et lymphoïdes. LAIR-1 est un récepteur pour les collagènes membranaires et matriciels et son interaction avec eux dépend de la présence de résidus d'hydroxyproline (Lebbink et al., 2006). Son homologue soluble LAIR-2 interagit avec le C1q, la MBL et la protéine tensioactive D à travers leurs régions collagène-like (Olde Nordkamp et al., 2014; Son et al., 2012), et inhibe la voie classique et lectine du complément (Nordkamp et al., 2014). L'engagement de LAIR-1 par C1q déclenche la phosphorylation de ses motifs ITIMs ("Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs") sur les monocytes, ce qui représente probablement un mécanisme impliqué dans le maintien de la tolérance immunologique (Son and Diamond, 2015; Son et al., 2012).

Le C1q a longtemps été associé à la pathogénèse de la PR. Des études antérieures avaient permis d'identifier une molécule C1q altérée dans les liquides synoviaux des articulations des patients atteints de PR et ceci a été confirmé par les travaux de Trinder et al. où l'immunisation de rats Lewis sensibles à l'arthrite avec du C1q altéré (oxydé) permettait l'induction d'un gonflement et d'un érythème des articulations compatibles avec une réaction inflammatoire semblable à l'arthrite et la production d'Ac réactifs au C1q et au CII (Trinder et al., 1997).

De plus, Trouw et al. ont mis en évidence un polymorphisme nucléotidique associé au développement d'une PR et ont observé que l'allèle rs292001 G, qui protège contre le développement de la PR, s'associe à une concentration sérique plus élevée en C1q (Trouw et al., 2013). Ceci est en accord avec les observations antérieures dans le LES, selon lesquelles les faibles taux de C1q prédisposent à l'auto-immunité (Manderson et al., 2004; Miura-Shimura et al., 2002), et qu'une déficience génétique complète de C1q est fortement associée au développement de cette maladie (Botto and Walport, 2002).

En 2012, Leffler et al. avaient constaté que le sérum d'un sous-groupe de patients atteints de LES actifs avait une capacité réduite à dégrader les "Neutrophil Extracellular Traps" (NET) générés *in vitro*, qui était principalement restaurée lorsque ces patients étaient en rémission. Chez ces patients le C1q se lie aux NET et inhibe leur dégradation, tout en activant le complément. Ceci est dû à l'inhibition de la DNase I, donnant au complément un nouveau

rôle potentiel dans la pathogenèse du LES (Leffler et al., 2012). Cependant, il a été rapporté que le C1q se lie à l'ADN (Jiang et al., 1992) et favorise la dégradation de la chromatine dérivée de cellules nécrotiques (Gaipf et al., 2004). Dans l'étude de Leffler, l'inhibition de la dégradation de l'ADN des NET par le C1q pourrait être due soit à l'interaction directe entre C1q et DNase-I, soit à l'encombrement stérique. C1q est une grosse molécule, et sa liaison aux NET pourrait potentiellement inhiber l'accès à la DNase-I. Des études antérieures liées à ce sujet ont montré que C1q avait un rôle inhibiteur sur la production de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\alpha$  par les pDC, cytokine clé dans le LES (Lood et al., 2009).

Dans la PR, le taux de CI intra-articulaires est plus élevé que les circulants (Roberts-Thomson et al., 1980). Les CI peuvent activer le système du complément et stimuler les phagocytes via les récepteurs des fragments Fc et les récepteurs du complément dans l'articulation, entraînant une libération de médiateurs de l'inflammation comprenant les cytokines pro-inflammatoires, les métalloprotéinases et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la PR. Cependant, les auto-Ag contenus dans les CI rhumatoïdes restent inconnus (Sawada et al., 2009).

Sawada et al. ont démontré que les peptides dans le LS PR, contenus dans des CI reconnus par le FR ou le C1q, ont été citrullinés *in vivo*. Ceci est étayé par les résultats de Zhao et al. démontrant que le fibrinogène citrulliné (principale cible des ACPA) est présent en tant que composant du complexe C1q-CI circulant chez la moitié des patients PR anti-CCP positifs, et que les CI isolés du pannus contenaient également du fibrinogène citrulliné (Zhao et al., 2008). D'autre part, plusieurs peptides peuvent interagir directement avec C1q, y compris les peptides rétroviraux (Spear et al., 1991), l'adiponectine (Peake et al., 2008), la fibronectine (Sorvillo et al., 1985), le peptide bêta-amyloïde (Webster et al., 1997), l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (Edelson et al., 2006), la CRP (Agrawal and Volanakis, 1994) et la protéine Tamm-Horsfall (Rhodes, 2002). Par conséquent, il ne peut être exclu que de tels peptides se liant à C1q soient présents et citrullinés dans le LS PR. Les données suggèrent que les Ag citrullinés peuvent contribuer à la pathogenèse de la PR par la formation de CI dans l'articulation.

### *(e) Complément et PR*

À ce jour, la pathogenèse de la PR n'est pas entièrement comprise, mais il existe des preuves montrant un rôle important des composants de la cascade du complément dans sa physiopathologie (Ballanti et al., 2011). L'importance de ce composé de l'immunité innée a été constatée en 1981 quand l'équipe de Lennox Holt avaient montré que des rats dont le complément a été déplété par du CVF ("Cobra Venom Factor") étaient résistants à l'AEC (Morgan et al., 1981). Depuis, il est connu que l'augmentation de l'activation du complément est potentiellement liée à l'apparition et/ou à l'augmentation de l'inflammation dans la PR, mais aussi qu'un déficit en complément peut induire cette pathologie (Ballanti et al., 2011).

L'activation du complément dans la PR est susceptible de provoquer une inflammation locale due à la libération des anaphylatoxines C3a et C5a comme illustré en **Figure 8**. Moxley et al. avaient démontré que la concentration de C3a dans le liquide synovial de patients PR était 7 fois plus élevée que celle des patients atteints d'une maladie dégénérative des articulations ou d'arthrite traumatique (Moxley and Ruddy, 1985). Alors que Jose et al. avaient quant à eux montré que la concentration du C5a dans le liquide synovial (LS) des patients PR était suffisante pour entraîner l'accumulation des PNN lors de la PR (Jose et al., 1990), ce qui a été confirmé en 2017 sur des modèles expérimentaux montrant que le C5a comme l'élément clé à l'adhésion cellulaire des PNN sur l'endothélium articulaire initiant ainsi l'inflammation (Miyabe et al., 2017). De plus, le récepteur du C5a (C5aR) a été retrouvé sur les MΦ et FLS des patients atteints de PR avec une corrélation significative entre l'expression de ce récepteur et le nombre d'articulations enflées (Yuan et al., 2003).

L'implication du C5 et C3 a été confirmée dans les modèles expérimentaux. Wang et al. avaient montré que l'administration systémique d'Ac monoclonal anti-C5 inhibait efficacement l'activation terminale du complément *in vivo*. En effet, ces Ac empêchaient le clivage de C5 et la libération de C5a. Le traitement des souris ayant une AEC par ces Ac empêchait l'apparition de l'arthrite et améliorait efficacement une maladie déjà établie (Wang et al., 1995). De plus, l'apparition et la gravité de l'AEC sont inhibées chez les souris déficientes en C5, C3 ou au facteur B, et cela malgré des titres élevés d'Ac anti-CII (Hietala et al., 2002; Wang et al., 2000). Ces résultats ont montré que la voie classique et peut-être aussi la voie alterne sont impliquées dans la pathogenèse de l'AEC (Hietala et al., 2002). Il en est de même dans le modèle CAIA, où la résistance au développement de l'arthrite est observée chez les souris C3- ou facteur B-KO ("Knockout") (Hietala et al., 2004).

Cependant, l'enthousiasme concernant l'utilisation des inhibiteurs du complément dans la PR a diminué depuis la constatation que le blocage de C5aR ne réduit pas l'inflammation

synoviale chez les patients atteints de PR (Vergunst et al., 2007). La compréhension croissante des mécanismes complexes de l'immunité sous-jacents de l'inflammation initiale de l'articulation suggère qu'un traitement plus précoce peut être plus efficace (Holers, 2013).

Plusieurs études ont montré que les niveaux de vitronectine et clustérine, deux protéines régulatrices du complément, sont faibles dans le liquide synovial de patients PR. De faibles niveaux d'inhibiteurs du MAC dans le LS ou le tissu synovial ainsi qu'une faible expression de la protectine par les cellules de la membrane synoviale sont retrouvés dans la PR. Le défaut de régulation du complément dans l'articulation pourrait favoriser des attaques lytiques sur les cellules locales (Høgåsen et al., 1995; Kemp et al., 1992; Konttinen et al., 1996).

Il semble que la voie alterne d'activation du complément soit prioritairement induite dans la PR comme le démontre certains résultats chez l'homme (Brodeur et al., 1991) et dans les modèles murins, comme l'arthrite de la souris K/BxN (Ji et al., 2002) et l'AEC sur des souris C5a- ou C3a-KO (Banda et al., 2006). Ceci est surprenant car cette pathologie présente des concentrations élevées d'auto-Ac et de CI activateurs de la voie classique du complément. L'explication de cette incohérence est que le C1q reconnaît et est activé par d'autres ligands présents dans le LS qui sont non CI et donc activateurs d'autres voies du complément.

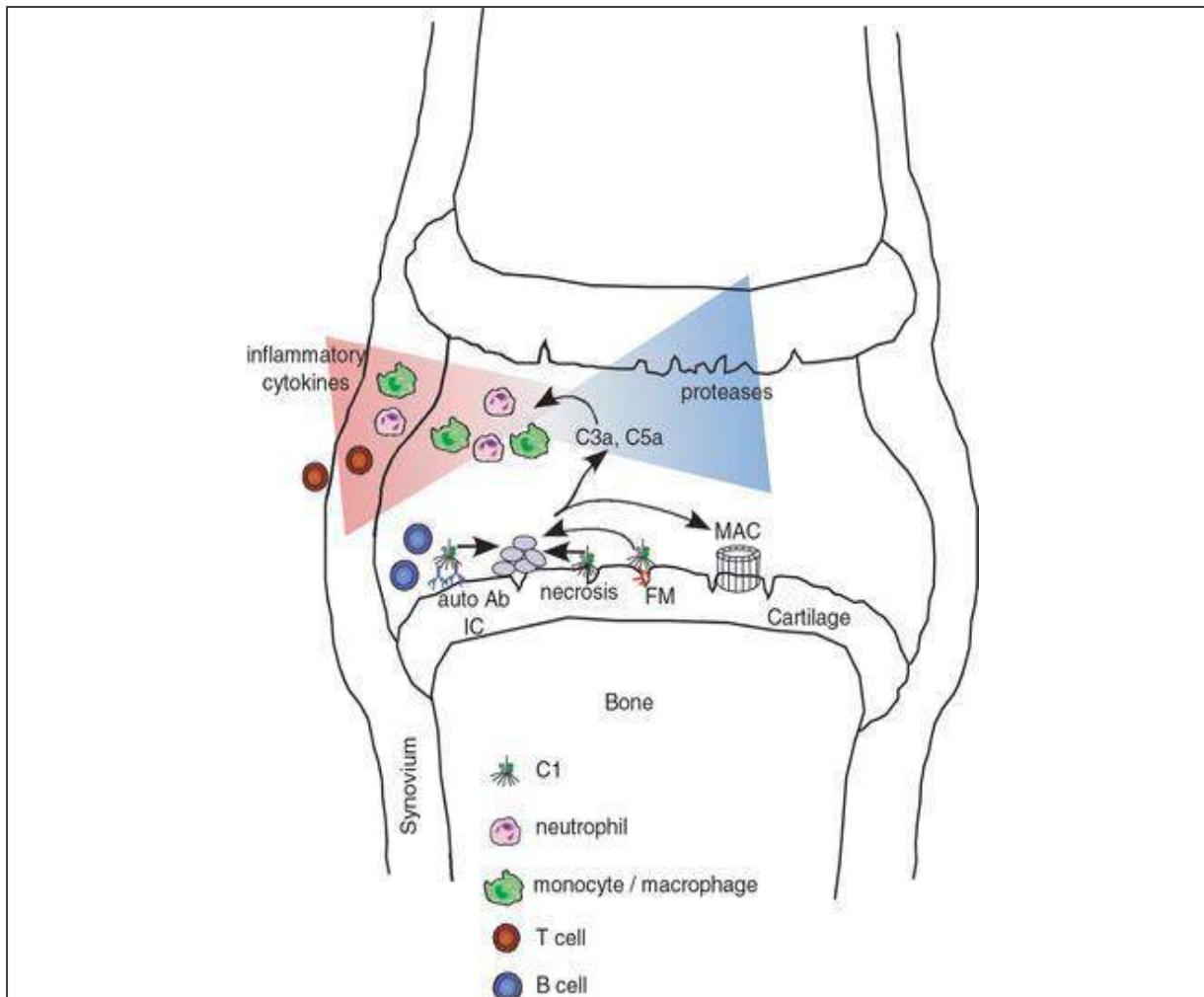
La diminution de la concentration du facteur B et de la properdine dans le LS et une augmentation des niveaux de fragments Ba et Bb générés au cours de la formation de la C3 convertase de la voie alterne (Brodeur et al., 1991; El-Ghobarey and Whaley, 1980) prouve que cette voie est activée dans l'articulation rhumatoïde. Aggarwal et al. ont démontré l'activation de la voie alterne avec la formation de MAC chez les patients atteints de PR juvénile (Aggarwal et al., 2000) mais aussi l'activation de cette voie par des CI contenant des FR de type IgA chez des enfants atteints de maladie polyarticulaire (Jarvis et al., 1993) ainsi que des adultes atteints de PR (van Zeben et al., 1992).

Les contributions de la voie des lectines dans la PR sont relativement peu connues mais il a été rapporté que des changements dans la glycosylation des IgG dans la PR provoquent une augmentation de la liaison de MBL entraînant une augmentation de l'activation du complément (Malhotra et al., 1995).

Il a été montré que les patients atteints de PR avec de faibles concentrations en MBL sont plus jeunes au début de la maladie (Arend, 2001) et ont une maladie articulaire plus sévère par rapport aux patients atteints de PR sans ce déficit (Graudal et al., 1998; Ip et al., 2000). Cela est confirmé par une étude Chinoise où le polymorphisme de MBL induisant des taux diminués de ce type de lectine est associé à la PR (Ip et al., 2000). Dans la voie des lectines, la carence en MBL, n'est pas directement associée à l'apparition de la PR, mais est associée à sa

sévérité (Kilpatrick, 2002). De plus, MBL est l'une des molécules qui reconnaît tardivement les cellules apoptotiques et nécrotiques (Nauta et al., 2003). En l'absence de MBL, la clairance des débris des cellules apoptotiques et nécrotiques dans l'articulation enflammée peut être altérée menant à l'exacerbation de la maladie (Okroj et al., 2007).

Il est connu que les patients atteints de PR ont des niveaux accrus de CI circulants (Hay et al., 1979; Zubler et al., 1976). Une partie de ces complexes dont les FR, sont capables d'activer le complément via la voie classique (Tanimoto et al., 1975). Or Trouw et al. ont suggéré que les ACPA provenant de patients atteints de PR pouvaient activer la voie classique mais aussi alterner du complément (Trouw et al., 2009). On ne sait pas dans quelle mesure les CI circulants contribuent à l'activation du complément dans la PR. Comme il n'y a pas de preuves concluantes que les CI sont les déclencheurs principaux de l'activation du complément dans la PR, d'autres déclencheurs potentiels doivent être envisagés. Un de ces déclencheurs pourrait être la protéine C-réactive (CRP), puisque cette protéine de phase aiguë peut activer le complément à la fois *in vitro* et *in vivo* (Volanakis, 1982; Wolbink et al., 1998). Dans une étude intéressante, Molenaar et al. ont démontré que les niveaux plasmatiques de complément activé et de CRP sont augmentés chez la majorité des patients atteints de PR et que ces taux sont corrélés à l'activité de la maladie (Molenaar et al., 2001). De plus, la CRP participe à toute réaction inflammatoire en activant les MΦ qui ensuite digèrent les cellules apoptotiques opsonisées. Couplée à ces cellules, la CRP active alors la voie classique du complément (Falgarone et al., 2005).



**Figure 8 : Contributions possibles du système du complément dans le développement de la PR (Okroj et al., 2007)**

**Ab** : Anticorps, **FM** : Fibromoduline, **IC** : Complexe immunitaire, **MAC** : Complexe d'attaque membranaire.

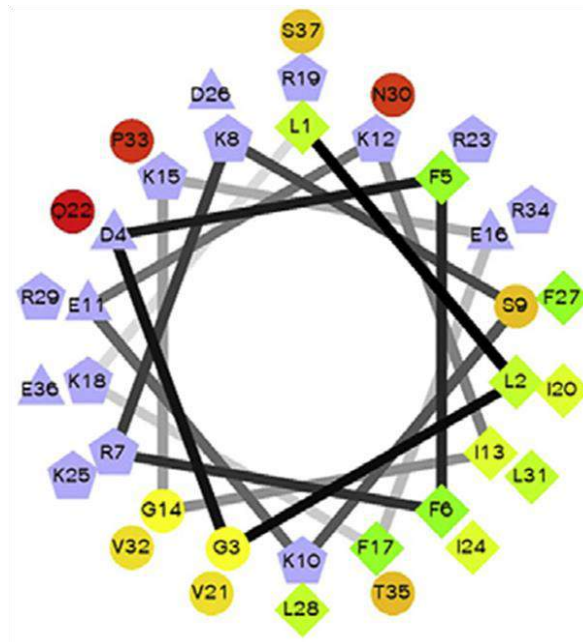
Dans la PR, le complément peut être activé de plusieurs manières dans l'articulation. La présence d'auto-anticorps, de complexes immunitaires, de cellules apoptotiques et nécrotiques, et certains composants du cartilage tels que la fibromoduline pourraient participer à cette activation et donc aux dommages au niveau du cartilage. L'activation du complément conduit à une libération de l'anaphylatoxine pro-inflammatoire C5a qui attire et active les neutrophiles et les macrophages. Ces cellules à leur tour sécrètent des protéases et des cytokines qui attirent les lymphocytes T et B et d'autres cellules inflammatoires, favorisant ainsi le processus inflammatoire. Il s'en suit la formation et l'activation du complexe d'attaque membranaire.

## ***(2) Peptides antimicrobiens : LL-37***

Le système immunitaire inné joue un rôle crucial dans la défense contre les microbes en utilisant les peptides antimicrobiens. Ces peptides représentent un mécanisme important de défense contre l'invasion bactérienne et fongique des organismes eucaryotes. Des centaines de peptides sont synthétisés et parmi eux deux familles sont mieux caractérisées : les défensines et les cathélicidines (Cederlund et al., 2011). Les défensines sont des peptides amphipathiques cationiques. Chez les humains, les rats et la plupart des autres mammifères, les  $\alpha$ -défensines se trouvent principalement dans les granules sécrétoires des PNN. En revanche, les  $\beta$ -défensines ne sont pas exprimées dans les PNN, mais par la plupart des cellules épithéliales, et leur expression est souvent stimulée par des stimuli pro-inflammatoires ou une infection. Semblables aux défensines, les cathélicidines sont synthétisées et stockées comme précurseurs inactifs dans les granules secondaires de PNN et maturées par protéolyse avant d'être libérées comme peptides antimicrobiens actifs (Sørensen et al., 2001). Chez l'homme, il existe une seule protéine précurseur de la cathélicidine connue, hCAP18, qui donne le peptide mature LL-37 (Johansson et al., 1998; Turner et al., 1998) (son orthologue chez le rat est le peptide mature de 43 résidus rCRAMP) (Termén et al., 2003).

LL-37 est un peptide cationique de 37 acides aminés comme illustré en **Figure 9**, généré par clivage extracellulaire de l'extrémité C-terminale de la protéine hCAP18 de 18 kDa par des sérines protéases de la famille des kallikréines dans les kératinocytes (Larrick et al., 1995; Yamasaki et al., 2006) et par la protéinase 3 (PR3) dans les PNN (Sørensen et al., 2001). LL-37 est capable de former des agrégats dans les bicouches lipidiques et en solution et ainsi, contrairement à d'autres peptides antimicrobiens, est protégé de la dégradation protéolytique. Sa charge positive lui permet de s'associer préférentiellement aux membranes de phospholipides chargées négativement (Oren et al., 1999). En outre, il prend une forme principalement hélicoïdale pendant les interactions membranaires, ce qui entraîne une ségrégation unilatérale de ses résidus hydrophobes. Cela permet la pénétration membranaire, la formation de pores transmembranaires et la lyse bactérienne (Lee et al., 2011; Turner et al., 1998). Les membranes cellulaires associées au cholestérol, telles que celles trouvées chez les mammifères, sont protégées contre les effets de formation de pores par LL-37 ; cependant, cela peut être surmonté par des concentrations plus élevées de peptide (Ding et al., 2013; Vandamme et al., 2012).





**Figure 9 : Représentation hélicoïdale en roue de LL-37 (Vandamme et al., 2012)**

Représentation hélicoïdale en roue de LL-37, illustrant sa nature amphipathique et cationique. Les résidus hydrophiles sont présentés sous forme de ronds, les résidus hydrophobes sous forme de diamants, potentiellement chargés négativement sous forme de triangles, et potentiellement chargés positivement sous forme de pentagones. Les résidus les plus hydrophobes sont en vert, la couleur devient plus claire proportionnellement à l'hydrophobicité, avec une hydrophobicité nulle codée en jaune. Les résidus hydrophiles sont codés en rouge, le rouge étant le résidu le plus hydrophile (non chargé) et la couleur s'éclaircit proportionnellement à l'hydrophilie.

Le LL-37 a été caractérisé à l'origine comme exprimé constitutivement dans les granules secondaires des PNN (Larrick et al., 1995). Aujourd'hui, il est admis que ce peptide antimicrobien est produit par de nombreux types cellulaires comprenant les MΦ, les cellules NK et les cellules épithéliales de la peau, des voies aériennes, et de l'intestin (Vandamme et al., 2012). La régulation de son expression est contrôlée par les voies inflammatoires ainsi que par la voie de la vitamine D et du stress du réticulum endoplasmique (Liu et al., 2007; Schaubert and Gallo, 2008). Des études utilisant des souris déficientes en mCRAMP, l'orthologue murin de LL-37, ont démontré des rôles antimicrobiens importants pour ce peptide.

Dans la peau, LL-37/mCRAMP est nécessaire pour prévenir les infections bactériennes invasives (Nizet et al., 2001). De même, les souris déficientes en mCRAMP ont une augmentation de la colonisation et de l'invasion des bactéries pathogènes dans le côlon et sont plus sensibles aux infections des voies urinaires (Chromek et al., 2006).

Par ailleurs, en plus de ses propriétés antimicrobiennes, le LL-37 possède de nombreuses propriétés modulatrices du système immunitaire qui peuvent contribuer au développement de maladies auto-immunes.

### *(a) LL-37 dans la PR et autres pathologies*

LL-37 attire les PNN, les monocytes, les cellules T et les mastocytes, induit un large éventail de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la communication et la mobilité et fixe de nombreux ligands y compris les acides nucléiques (Mookherjee et al., 2009).

Dans le psoriasis, le LL-37 produit par les kératinocytes et les PNN semble contribuer à sa pathogenèse en induisant la production d'IFN de type I par les DC comme illustré en **Figure 10**, en modifiant la fluidité membranaire (Morizane et al., 2012) ou via la formation de complexes avec les ADN et ARN du soi libérés localement, conduisant ainsi à une activation prolongée du TLR9 et TLR7 (Lande et al., 2007, 2011), respectivement.

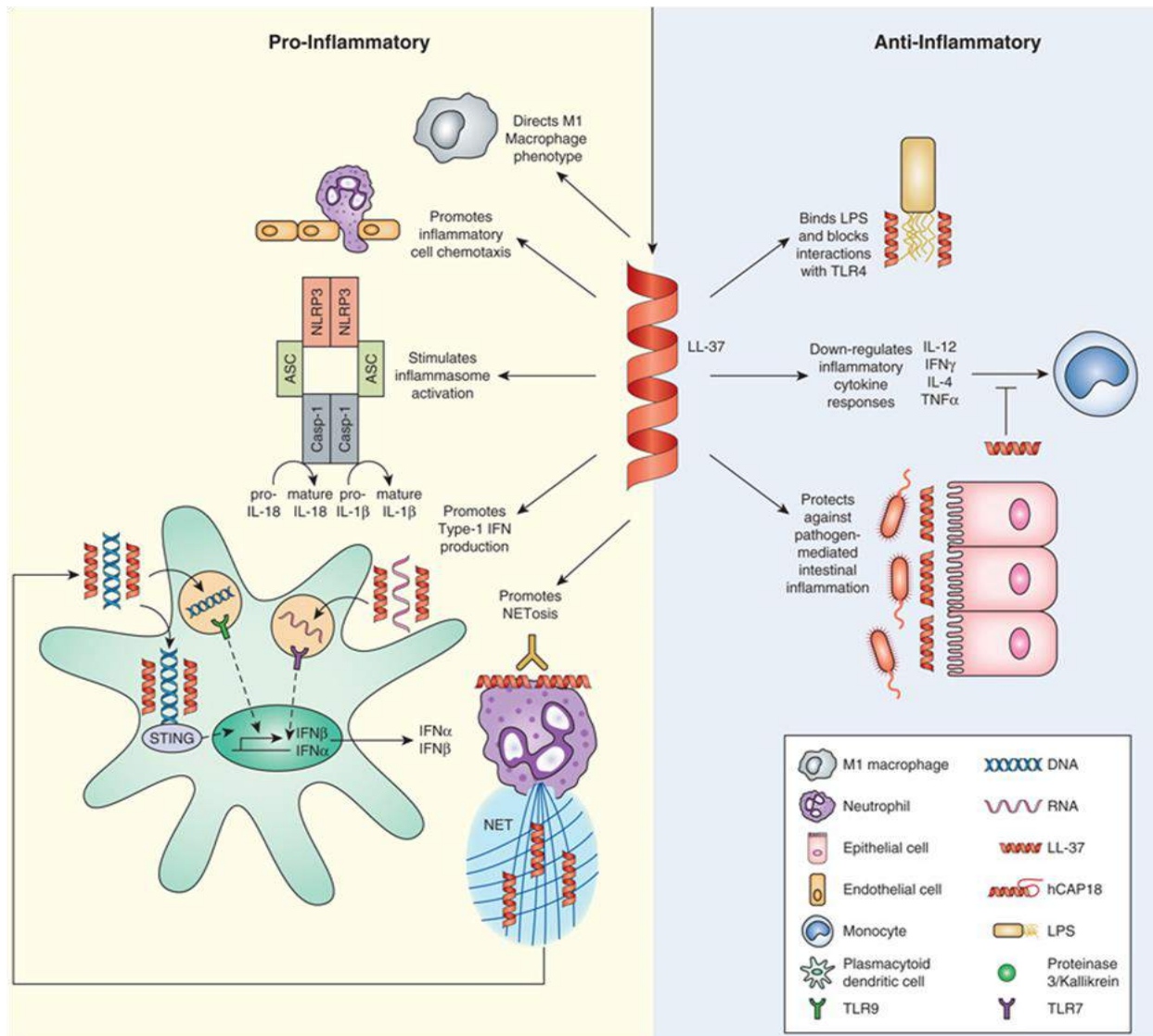
Dans le sérum de patients atteints de LES, les complexes formés de peptides antimicrobiens et d'ADN du soi, produits par des PNN activés sous forme de NET, déclenchent l'activation du TLR9. De plus, les patients atteints de LES développent des auto-Ac contre l'ADN du soi et contre les peptides antimicrobiens (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011).

Compte tenu de l'importance du LL-37 sur le développement du LES et du psoriasis, il peut également stimuler les voies des TLR impliquées dans d'autres maladies auto-immunes tels que la PR.

Dans le cas de la PR, une expression élevée de LL-37 et de sa protéase activatrice (PR 3) a été décrite, plus particulièrement au niveau de la membrane synoviale (Matsumoto et al., 2008; Paulsen Friedrich et al., 2002). L'ostéopénie périarticulaire est fréquente chez les patients atteints de PR (Deal, 2012). Or, le LL-37 induit l'apoptose des ostéoblastes, ce qui pourrait contribuer à la réduction de la formation osseuse dans les articulations arthritiques (Säll et al., 2013). En outre, Hoffman et al. ont rapporté qu'une expression élevée de LL-37 est principalement observée dans les ostéoclastes et les granulocytes dans la synovite de patients PR. En utilisant un modèle d'arthrite induite par le pristane chez le rat, une sur-expression de rCRAMP, l'orthologue murin de LL-37, a été démontrée dans les granulocytes, les MΦ et les cellules T  $\gamma\delta$  du liquide synovial, ainsi qu'une production d'Ac anti-CRAMP (Hoffmann et al., 2013). Ceci suggère que le LL-37 peut contribuer au développement de l'arthrite.

Plusieurs études ont mis en évidence l'association entre maladie parodontale et développement de la PR. En effet, ceci pourrait être expliqué par l'implication du LL37, car il a été rapporté que les niveaux de LL-37 sont augmentés dans le liquide gingival de patient atteint de maladie parodontale chronique (Türkoğlu et al., 2009) et peuvent jouer un rôle dans la promotion de l'inflammation gingivale en augmentant la production de prostaglandines E2 (Chotjumlong et al., 2013).

Le risque de développement de la PR est positivement influencé par le tabagisme, qui est associé au développement d'ACPA et corrèle avec l'activité de la maladie (Wolfe, 2000). La fumée de cigarette est capable d'induire une régulation positive de mCRAMP via les voies NF- $\kappa$ B, et le recrutement des M $\Phi$  et des PNN dans les poumons (Li et al., 2014). En outre, l'exposition à la fumée de cigarette améliore l'activité enzymatique de PAD2, entraînant une citrullination accrue des protéines (Makrygiannakis et al., 2008), y compris LL-37 elle-même, qui augmente ses propriétés chimiotactiques (Kilsgård et al., 2012). Puisque les PNN sont sujets à la NETose chez les patients atteints de PR et que les NET sont une source d'Ag citrullinés dans la PR (Khandpur et al., 2013; Pratesi et al., 2013), le rôle du LL-37 et de sa forme citrullinée dans l'amélioration des facteurs de risque associés à la fumée de cigarette sont à explorer.



**Figure 10 : Effets immunomodulateurs de LL-37 (Kahlenberg and Kaplan, 2013)**

**ASC** : "Apoptosis-associated Speck-like protein containing CARD", **Casp** : Caspase, **DNA** : Acide désoxyribonucléique, **IFN** : Interféron, **IL** : Interleukine, **LL-37** : Cathélicidine, **LPS** : Lipopolysaccharide, **NET** : "Neutrophil Extracellular Traps", **NLRP** : Récepteur de type NOD, **RNA** : Acide ribonucléique, **TLR** : Récepteur de type Toll, **TNF** : Facteur de nécrose tumorale.

La présence de LL-37 entraîne le recrutement de cellules inflammatoires, l'induction de macrophages M1 et la stimulation de réponses inflammatoires telles que l'activation de l'inflammasome et la production d'IFN de type I. La production d'IFN de type I est favorisée par le transport de l'ARN et de l'ADN par le LL-37, permettant l'activation des TLR7 et TLR9 endosomaux, respectivement. Le LL-37, exprimée à la surface des neutrophiles, est reconnue par les autoanticorps anti-LL-37, qui favorisent la NETose. Cependant, LL-37 a de puissants effets anti-inflammatoires tels que la neutralisation de l'activation de TLR4 par le LPS, la modulation des réponses inflammatoires des cytokines et la prévention de l'invasion et des réponses inflammatoires aux bactéries pathogènes.

### *(b) Effets du LL-37 sur les PNN*

La durée de vie moyenne des PNN humains est relativement courte et se termine par une apoptose spontanée (Kolaczowska and Kubes, 2013). Les PNN apoptotiques sont phagocytés sans la libération des médiateurs de leurs granules, ce qui entraîne la restriction de l'inflammation et des lésions tissulaires. Il convient de noter que certaines substances dérivées de l'hôte et d'agents pathogènes peuvent inhiber l'apoptose spontanée du PNN. Cette apoptose retardée supprimée entraîne la libération incontrôlée d'une variété de métabolites cytotoxiques et de médiateurs pro-inflammatoires, qui à leur tour conduisent à l'amélioration de la réponse inflammatoire et des lésions tissulaires. Compte tenu de ces données, Nagaoka et al. ont démontré clairement que le peptide antimicrobien LL-37 pouvait prolonger la durée de vie de ces leucocytes par inhibition de l'apoptose spontanée. Cette inhibition se produit à travers l'expression accrue de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL et le blocage de l'activation de la caspase-3, une protéase clé dans le déclenchement de l'apoptose (Nagaoka et al., 2006, 2012).

*In vitro*, LL-37 prolonge la durée de vie des PNN et ceci en agissant via l'activation du récepteur du peptide formyle (FPR) 1 et du récepteur purinergique P2X7R (Barlow et al., 2006 ; Nagaoka et al., 2012), tous deux décrits comme étant des récepteurs de LL-37. LL-37 peut également augmenter l'expression de P2X7R, et induire la migration et la chimiotaxie des PNN via FPR1 (De Yang et al., 2000; Zhang et al., 2009b).

LL-37 provoque une inhibition presque complète de la chimiotaxie des PNN par la protéine sérum amyloïde A (Lee et al., 2009b). Il réduit l'expression membranaire de CXCR2 sur les PNN, récepteur qui intervient dans leur migration vers les sites inflammatoires par son internalisation. LL-37 active les PNN pour libérer l'IL-1Ra et en même temps induire la libération extracellulaire de  $\alpha$ -défensine (Zhang et al., 2008, 2009b).

Enfin, le LL-37 stimule la génération de ROS et ce processus est médié par une flavoenzyme (très probablement la NADPH oxydase) et via l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Alalwani et al., 2010 ; Zheng et al., 2007). A l'inverse, le LL-37 inhibe la production d'IL-6 par les PNN en réponse au LPS (Li et al., 2009).

### *(c) Effet du LL-37 sur les MΦ*

Il est bien établi que le LL-37 active les molécules FPR2 sur les monocytes, déclenchant un changement de conformation des intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  permettant l'adhésion des monocytes (Wantha et al., 2013).

Comme dans le cas des PNN, les MΦ expriment des récepteurs pour le LL-37 et ce peptide agit comme un puissant agent chimio-attractif pour les monocytes et peut induire la mobilisation du  $Ca^{2+}$  (De Yang et al., 2000). De plus, mCRAMP provoque également la migration des monocytes et des MΦ dérivés des monocytes via un récepteur couplé à une protéine G, probablement la molécule FPR2 (Kurosaka et al., 2005).

De plus en plus de données indiquent que les cathélicidines elles-mêmes stimulent directement la production de cytokines et chimiokines par les monocytes pour moduler le cours et l'intensité de l'inflammation. Il a été démontré que les gènes codant pour les chimiokines essentielles au recrutement cellulaire sur le site de l'inflammation, tels que CXCL1, CXCL8, CCL2 et CCL7 sont significativement surexprimées sur les monocytes activés avec LL-37, alors que celle de CXCR2 est réduite. Il est intéressant de savoir que ce peptide n'augmente pas l'expression d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 $\beta$  et IL-6 mais provoque l'augmentation de la transcription des gènes codant pour des cytokines anti-inflammatoires tels qu'IL-10 et IL-19 (Bowdish et al., 2004; Mookherjee et al., 2009).

Il existe certaines données qui montrent que LL-37 peut influencer la différenciation des monocytes. Le peptide LL-37 (re) dirige la différenciation entraînée par le M-CSF des monocytes vers les MΦ avec un phénotype pro-inflammatoire M1. Ces MΦ ont alors une faible expression de CD163, peu d'IL-10 et une importante production d'IL-12 après stimulation par LPS. LL-37 améliore la différenciation des MΦ par GM-CSF. En outre, il est prouvé que sous l'influence de LL-37, les MΦ M2 (anti-inflammatoires) différenciés produisent moins d'IL-10 et plus d'IL-12 (Does et al., 2010).

Cette cathélicidine, agit via le P2X7R, mobilisant le  $Ca^{2+}$ , activant les MAPK ERK1/2 et p38, et conduisant à une libération précoce de LTB4 (Leucotriène B4) (Agier et al., 2015).

LL-37 diminue significativement l'induction de TNF et de NO (Monoxyde d'azote) par les MΦ stimulés par l'endotoxine lipooligosaccharide (LOS). En revanche, LL-37 et LOS sont en synergie pour améliorer la libération des ROS par ces cellules. Cet effet synergique de LL-37 et du ligand du TLR4 LOS est le résultat d'un effet direct exercé sur la NADPH oxydase (Zughaier et al., 2005).

De plus, la présence de LL-37 pendant la polarisation des MΦ M1 par le LPS et l'IFN- $\gamma$  entraînent une forte inhibition de la production de TNF et de NO et une légère diminution de la synthèse des ROS. De même, la synthèse du TNF par les MΦ M2 polarisés en réponse à la stimulation au LPS est inhibée par LL-37. Par contre, ce peptide n'a aucun effet sur la production de TNF par des MΦ activés par le ligand synthétique du TLR2 : Pam3CSK4, mais inhibe celle induite par l'acide lipotéichoïque (Brown et al., 2011).

Scott et al. ont démontré que le LL-37 provoque une inhibition de la stimulation des MΦ par LPS, mais aussi de la synthèse de TNF induite par l'acide lipotéichoïque et lipoarabinomannane arabinosylé par les MΦ. Il a également été montré que mCRAMP exerce une forte inhibition de la phosphorylation de p38 et ERK induite par le LPS, l'acide lipotéichoïque et la flagelline dans les MΦ (Scott et al., 2002).

Kahlenberg et al. ont observé que le LL-37 active la caspase-1, l'enzyme centrale de l'inflammasome des MΦ humains et murins, entraînant la libération d'IL-1 $\beta$  active et d'IL-18. L'activation de l'inflammasome NLRP3 par LL-37 utilise l'efflux potassique médié par le P2X7R (Kahlenberg et al., 2013). Cependant, Hu et al. montre que le LL-37 inhibe l'expression de l'IL-1 $\beta$  induite par LPS/ATP, l'activation de la caspase-1, la formation d'inflammasome, ainsi que la mort des MΦ par pyroptose (Hu et al., 2014b).

Ces données prouvent que les effets pro- versus anti-inflammatoires du LL-37 dépendent de l'environnement cytokinique.

## *b) Récepteurs et complexes protéiques de l'immunité innée*

### *(1) Récepteurs : Récepteurs de type Toll*

La réponse immunitaire innée fournit la première ligne de défense de l'hôte contre les agents pathogènes. Cette réponse est déclenchée par l'activation de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), qui représentent un lien crucial entre la détection de pathogènes et l'induction d'une cascade pro-inflammatoire visant à supprimer l'agent infectieux (Ospelt et Gay 2010). Parmi les membres de la famille des PRR, les récepteurs de type toll (TLR) ont été les premiers à être identifiés et sont les plus étudiés. Ces récepteurs ont une forte homologie avec le gène Toll chez *Drosophila melanogaster* (Hashimoto et al., 1988), responsable de l'orientation dorso-ventrale des organes durant l'embryogénèse (Anderson et al., 1985), d'où le nom. Diverses cellules immunitaires telles que les monocytes, les MΦ et les DC et non-immunes, y compris les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales expriment ces récepteurs conservés (De Nardo, 2015; Goh and Midwood, 2012; Huang and Pope, 2009).

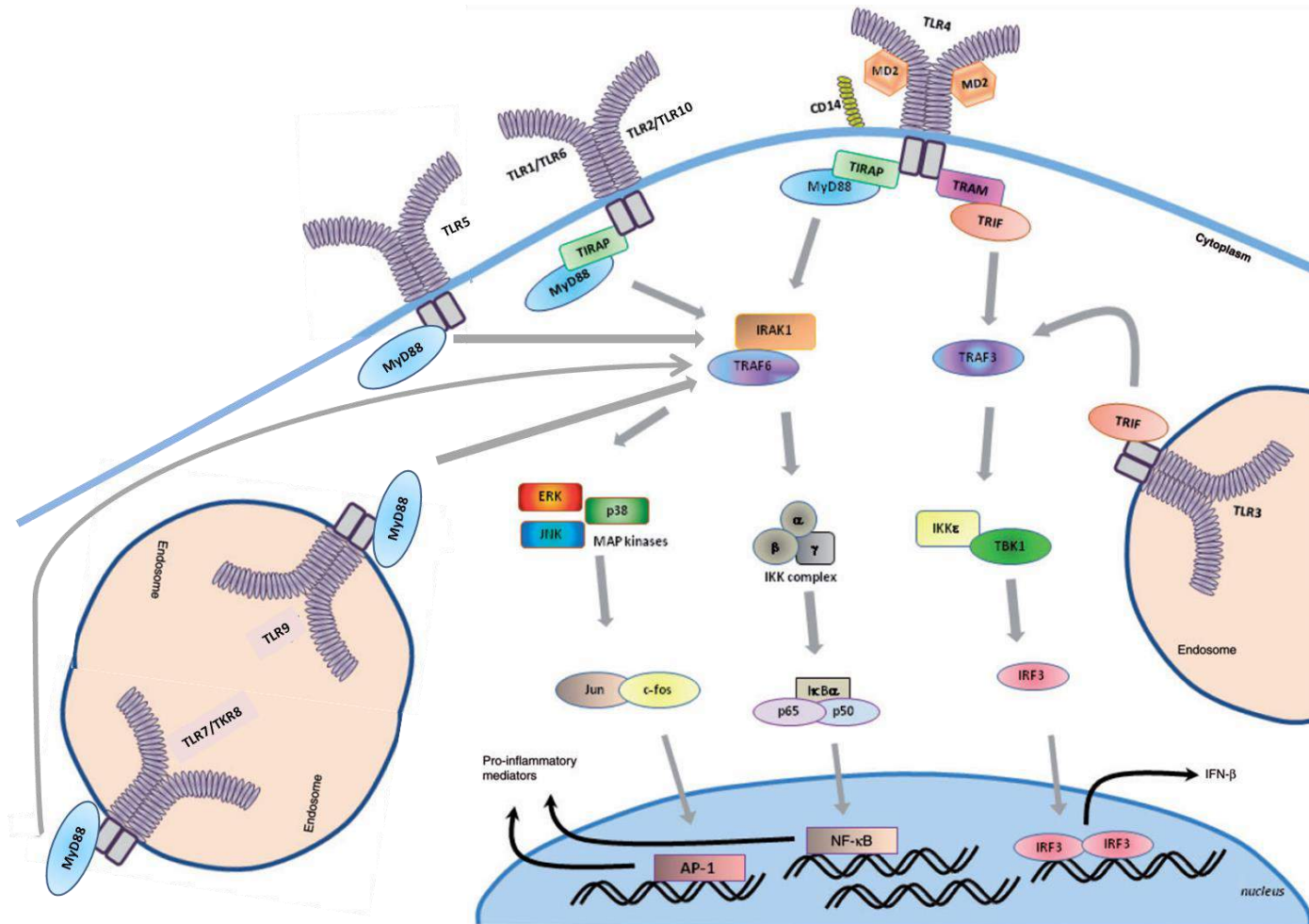
Les TLR détectent les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) dérivés de virus, de bactéries, de protozoaires et de champignons et chaque TLR reconnaît un sous-ensemble spécifique de ligands (O'Neill, 2008; Ostuni et al., 2010). Avec l'addition du TLR13 murin (Shi et al., 2011b), 14 TLR ont été rapportés chez les mammifères dont 10 chez l'homme et nombreux ligands spécifiques ont été largement caractérisés (De Nardo, 2015; Takeda and Akira, 2015). Ces récepteurs sont composés de motifs répétitifs riches en leucines, qui facilitent l'identification des pathogènes et la liaison aux ligands, une seule hélice transmembranaire et un domaine TIR cytoplasmique hautement conservé qui est homologue au récepteur 1 de l'interleukin 1 (O'Neill et al., 2009).

Le TLR4, le récepteur du LPS bactérien, a été le premier TLR humain identifié (Medzhitov et al., 1997) et il reste le mieux caractérisé à ce jour. Il utilise la protéine de différenciation myéloïde 2 (MD2) et le CD14 comme molécules accessoires pour la reconnaissance du LPS (Akashi-Takamura and Miyake, 2008). TLR1, TLR2 et TLR6 détectent les lipoprotéines bactériennes. TLR5 détecte la flagelline, TLR9 reconnaît le C-phosphate-G (CpG) non méthylé de l'ADN bactérien et TLR3, TLR7 et TLR8 se lient aux acides nucléiques viraux, ARNdb (double brin) pour le TLR3 et ARNsb (simple brin) pour les TLR7/8. Par contre, on sait que la situation est plus complexe pour le cas du TLR9, car Haas et al. avaient montré que le squelette de sucre déterminait la reconnaissance de l'ADN par ce TLR (Haas et al., 2008).



La localisation subcellulaire des TLR correspond bien à la nature de leurs ligands pathogènes; comme démontré en **Figure 11** ; TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont exprimés sur la surface cellulaire et détectent les éléments pathogènes de surface, tandis que les TLR3, 7, 8 et 9 sont situés de manière intracellulaire sur les membranes endosomales, et leurs ligands doivent être intériorisés dans l'endosome pour aboutir à l'activation (Goh and Midwood, 2012; Huang and Pope, 2009). La localisation de ces derniers dans l'endosome représente probablement une méthode de séquestration de ces molécules d'une activation par les acides nucléiques de l'hôte (Thwaites et al., 2014). De plus, il a été montré que le TLR9 pouvait avoir en plus d'une forme endosomale, une forme membranaire fonctionnelle à la surface des PNN(Lindau et al., 2013). Par contre, la fonction exacte du TLR10 reste largement inexplorée en raison du fait qu'elle n'est pas présente chez les souris, bien que certaines études indiquent que ce récepteur pourrait coopérer avec le TLR2 dans la détection des lipoprotéines (Guan et al., 2010; Hasan et al., 2005) et son ligand serait des protéines de type profiline (Acheh et al., 2016).

Non seulement, les TLR permettent l'identification d'un répertoire diversifié de PAMP (Janeway and Medzhitov, 1998), ces récepteurs reconnaissent diverses molécules libérées par des cellules endommagées connues sous le nom de motifs moléculaires associés au danger (DAMP) (Bianchi, 2007) incluant des protéines telles que les protéines de choc thermique, HMGB1 (Goh and Midwood, 2012), ou d'autres molécules telles que l'ATP (Adénosine triphosphate) et des cristaux d'acide urique monosodique (Huang and Pope, 2009).



**Figure 11 : Voies d'activation des TLR (adapté de (Aчек et al., 2016; Goh and Midwood, 2012))**

**AP-1** : activation de la protéine-1. **ERK** : kinase régulée par le signal extracellulaire, **IFN** : Interféron, **IKK** : "I-kappa B kinase", **IRAK** : Kinase associée au récepteur de l'interleukine 1, **IRF** : "IFN response factor", **JNK** : "c-jun N-terminal kinase", **MD2** : Protéine de différenciation myéloïde 2, **MyD88** : Protéine 88 de réponse primaire à la différenciation myéloïde, **NF-κB** : Facteur de transcription nucléaire kappa B, **TBK** : Kinase liée à TANK, **TIRAP** : Protéine adaptatrice contenant le domaine TIR, **TLR** : Récepteur de type Toll, **TRAM** : Molécule adaptatrice liée à TRIF, **TRIF** : "TIR domain-containing adapter-inducing IFN-β".

*Les TLR de surface cellulaire sont TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10. Les TLR endosomaux sont TLR3, 7, 8 et 9. MyD88 est une protéine adaptatrice associée soit directement aux TLR (TLR 5, 7, 8, et 9) ou nécessitant une protéine intermédiaire, TIRAP, pour son recrutement (TLR1, 4 et 6). TLR3 et 4, utilisent TRIF pour médier la transduction du signal.*

*La molécule adaptatrice TRAM est une autre molécule associée au TLR4, nécessaire pour l'interaction avec TRIF. Généralement, l'activation de la voie dépendante de MyD88 conduit à l'activation des protéines IRAK, TRAF-6 et TIK-binding kinase (TBK) -1, les MAPK et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'activation de ce dernier entraîne une augmentation de l'expression de diverses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et les chimiokines. La stimulation de la voie TRIF indépendante de MyD88 conduit à l'activation des facteurs de transcription IRF et des réponses IFN. Le recrutement d'IRF3 à son site de liaison à l'ADN déclenche l'activation transcriptionnelle de l'IFN- $\beta$  et des gènes stimulants l'IFN.*

Les TLR forment des homo- ou des hétéro-dimères lors de l'activation et de la liaison du ligand. Cet événement de dimérisation permet aux domaines TIR de s'associer aux molécules adaptatrices qui déclenchent les événements de signalisation en aval. On dénombre quatre protéines adaptatrices principales ; la protéine de différenciation myéloïde 88 (MyD88), l'adaptateur MyD88-like (MAL), l'adaptateur contenant le domaine TIR induisant l'interféron- $\beta$  (TRIF), et la molécule adaptatrice 2 contenant le domaine TIR (TRAM) (Thwaites et al., 2014).

MyD88 est engagé par tous les TLR sauf TLR3, MAL est utilisé par TLR 2 et 4, TRIF par TLR 3 et 4, et TRAM par TLR4. Les molécules adaptatrices déclenchent la signalisation soit via une voie dépendante de MyD88, qui active le NF- $\kappa$ B (Facteur nucléaire kappa B), pour permettre la production des cytokines telles que le TNF et l'IL-1 mais aussi l'activation de protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), y compris JNK ("Jun N-terminal kinase"), p38 et ERK ("Extracellular Signal-regulated Kinase-1") ou par une voie indépendante de cette protéine adaptatrice, conduisant à l'activation des membres de la famille du facteur de régulation de l'interféron (IRF) et donc l'expression des IFN de type I  $\alpha$  et  $\beta$  (IFN  $\alpha$  /  $\beta$ ) (Kaisho and Akira, 2006).

La réponse inflammatoire induite par l'activation des TLR est une réponse protectrice qui assure non seulement l'élimination des stimuli nocifs, mais aussi la réparation des tissus endommagés (Mudaliar et al., 2013). Cette réponse est généralement rapidement terminée une fois que les tissus sont réparés et les pathogènes éradiqués. Cependant, une activation inappropriée de la signalisation TLR due à l'échec de leurs mécanismes de régulation pourrait perturber l'homéostasie en créant une boucle de rétroaction de la sécrétion de cytokines inflammatoires conduisant au développement de maladies auto-immunes et inflammatoires. Par conséquent, les réponses induites par les TLR doivent être étroitement régulées pour une

performance optimale et équilibrée du système immunitaire (Anwar et al., 2013; Piccinini and Midwood, 2010).

### ***(a) TLR dans les maladies inflammatoires***

Les TLR agissent comme une arme à double tranchant : une signalisation TLR déficiente peut rendre l'organisme vulnérable à l'exposition à des pathogènes, tandis qu'une réponse TLR excessive entraîne une libération incontrôlée de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, ce qui pourrait entraîner le développement de maladies inflammatoires, telles que le LES, la PR, le psoriasis, l'asthme, la maladie d'Alzheimer,... (Acheh et al., 2016).

### **(i) Lupus érythémateux disséminé**

Le LES est une maladie auto-immune complexe caractérisée par la perte de tolérance aux antigènes nucléaires du soi et la stimulation continue et répétitive des réponses immunitaires innées et adaptatives due en partie à la libération d'acides nucléiques endogènes lors de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Clancy et al., 2016).

Récemment, de nombreuses études ont porté sur l'implication de l'activation des TLR endosomaux dans le déclenchement du LES (Celhar and Fairhurst, 2014; Clancy et al., 2016). Les TLR endosomaux exprimés dans les cellules B et les pDC seraient responsables de la production d'Ac anti-nucléaires et la production d'IFN de type I (Clancy et al., 2016). Les rôles des TLR7 et 9 dans le LES ont été étudiés dans plusieurs modèles murins où la surexpression de TLR7 a permis de suggérer que ce TLR serait lié à l'apparition de la maladie (Guiducci et al., 2010). De plus, il a été rapporté que la surexpression de ce TLR dans ces modèles était corrélée à la production d'Ac anti-ARN, une augmentation de la réponse des cellules B autoréactives et le développement de phénotypes auto-inflammatoires par les souris (Nündel et al., 2015). Par ailleurs, les modèles murins dépourvus de TLR7 ont montré une amélioration des symptômes de la maladie avec une réduction significative des taux d'auto-Ac circulants et une diminution de la sécrétion d'IL-6 et d'IFN- $\alpha$  (Lee et al., 2008). Dans le cas du lupus murin, les TLR7 et 9 exercent différents rôles, malgré des voies d'expression et de signalisation tissulaire similaires. De ce fait, Christensen et al. montrent qu'en l'absence de TLR9, la maladie auto-immune est exacerbée, les lymphocytes et les pDC sont plus activés, et les IgG sériques ainsi que l'IFN- $\alpha$  sont augmentés. En revanche, les souris déficientes en TLR7 présentent des signes cliniques, avec une activation lymphocytaire réduite et une diminution des IgG sériques (Christensen et al., 2006). Il existe en fait un contrôle du TLR-7 par les TLR-9 qui se résume par l'inhibition de son effet sur les LB, alors qu'un autre TLR endosomal, le TLR-8 contrôle l'effet du TLR-7 sur les DC (Desnues et al., 2014).

Alors que le rôle pathologique du TLR7 dans le LES est relativement connu, le rôle du TLR9 reste controversé. Ce dernier a été étudié car il reconnaît l'ADN et que les Ac anti-ADN sont un marqueur du LES. Des études *in vivo* sur des souris ont rapporté le rôle important du TLR9 dans la production d'auto-Ac par les LB (Nündel et al., 2015). De plus, les cellules B et les monocytes provenant de patients atteints d'une maladie active ont montré une expression plus élevée de TLR9 comparativement à celles provenant de patients atteints de maladie inactive (Lamphier et al., 2014). Cependant, la déplétion de TLR9 dans les modèles de souris sujettes au lupus n'améliore pas les symptômes de la maladie, mais au contraire l'exacerbe, suggérant un rôle protecteur de ce TLR dans cette pathologie (Nickerson et al., 2010). Toute fois, l'activation des PNN par le nucléosome (complexe associant de l'ADN et des protéines), un auto-Ag majeur dans le LES, est indépendante du TLR-9 (Lindau et al., 2011).

En plus de l'implication des TLR endosomaux, des études ont porté sur l'implication des TLR de surface dans la pathogénèse du LES, plus précisément sur le rôle du TLR2 et 4. Récemment, il a été rapporté que les niveaux d'expression des ARNm du TLR2 et 4 dans les cellules mononucléées du sang périphérique des patients atteints de LES étaient beaucoup plus élevés que ceux de sujets sains (Lee et al., 2016). Dans un modèle expérimental, la déficience en TLR4 et/ou TLR2 limite la production d'auto-Ac et donc atténue le développement de symptômes lupiques (Chen et al., 2016). De plus, un polymorphisme du TLR2 humain (Agr753Gln) a été rapporté pour être un facteur de risque pour le LES (Balistreri et al., 2008; Bielinski et al., 2011).

## (ii) Psoriasis

La peau, comme le tractus gastro-intestinal, est constamment mise à l'épreuve par une quantité massive de bactéries. Le psoriasis est une maladie inflammatoire récidivante et persistante de la peau, caractérisée par une hyper-prolifération épidermique et une infiltration de cellules inflammatoires dans le derme et l'épiderme, causant de graves lésions cutanées (Flutter and Nestle, 2013). Physiologiquement, les TLR sont exprimés par trois types de cellules épidermiques : les kératinocytes, les mélanocytes et les cellules de Langerhans.

Les kératinocytes expriment tous les TLR sauf le TLR7 et 8, et leur activation lors de l'exposition aux ligands permet principalement la production d'IL-8, d'oxyde nitrique synthase, de chimiokines et de métalloprotéases matricielles (MMP) 2 et 9, toutes nécessaires pour l'inflammation et le remodelage des tissus endommagés (McInturff et al., 2005). Les mélanocytes humains expriment les TLR2, 3, 4, 7 et 9, qui une fois liés à leur ligand permettent aux mélanocytes la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8, augmentent la production d'ARNm des chimiokines et régulent positivement la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibiteur de NF $\kappa$ B),

favorisant ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B (Yu et al., 2009). Les cellules de Langerhans jouent à leur tour le rôle de CPA cutanée et expriment des niveaux élevés de TLR2, 3, 4, 8 et 10 et de faibles niveaux de TLR1, 5, 6, 7 et 9 (Hari et al., 2010; Renn et al., 2006). De plus, ces dernières jouent un rôle important dans la réponse immunitaire antivirale en raison de leur capacité à induire la sécrétion d'IFN- $\alpha$  et d'IL-18 et l'initiation subséquente d'une réponse Th1 (Renn et al., 2006).

Dans la peau des patients psoriasiques, une augmentation de la prolifération des LT, une sécrétion de cytokines Th1 et Th17, une présentation antigénique et une production élevée d'IFN de type I ont été rapportées (Gilliet et al., 2004). Lors de cette pathologie, une importante libération de peptides antimicrobiens par les kératinocytes est observée. Ces peptides forment des agrégats avec l'ADN extracellulaire du soi qui pénètrent dans les pDC et activent le TLR9, favorisant ainsi la sécrétion d'IFN de type I, la maturation des mDC et l'activation subséquente des LT autoréactifs (Farkas et al., 2008). De plus, plusieurs études ont rapporté que dans les conditions pathologiques, les kératinocytes expriment fortement le TGF- $\alpha$  et les protéines de choc thermique, qui régulent l'expression des TLR2, 4, 5 et 9, entraînant une activation excessive du NF- $\kappa$ B, une stimulation des cytokines inflammatoires, une présentation antigénique aux cellules T autoréactives et, par conséquent, l'aggravation de la maladie (Miller et al., 2005; Seung et al., 2007). Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude immuno-histochimique sur de la peau psoriasique, où les niveaux d'expression de TLR2 et 4 étaient élevés dans les DC dermiques et épidermiques et dans les kératinocytes comparés à la peau normale (Curry et al., 2003).

Au cours des dernières années, un modèle de psoriasis induit par l'imiquimod, un agoniste spécifique des TLR7, a fait son apparition (Fits et al., 2009; Walter et al., 2013), permettant de mettre en évidence l'importance de l'activation de la signalisation de ce TLR dans l'exacerbation et l'aggravation des symptômes pathologiques du psoriasis (Gaspari, 2006).

### **(iii) Polyarthrite rhumatoïde**

La PR est une maladie inflammatoire chronique des articulations, qui provoque la morbidité et réduit l'espérance de vie. Les études sur cette pathologie soulignent le rôle des deux systèmes immunitaires innés et adaptatifs dans la pathogenèse de la maladie. Dans des circonstances physiologiques, la réponse inflammatoire médiée par le système immunitaire inné, avec l'aide de la réponse immunitaire adaptative, élimine le pathogène envahisseur, ce qui entraîne la résolution de la réponse inflammatoire. En revanche, dans le cas de la PR, tous les aspects des réponses de l'immunité innée et adaptative persistent. Par opposition à une infection microbienne qui peut être éliminée, la PR devient chronique, avec persistance de

médiateurs pro-inflammatoires. Les mécanismes responsables de l'activation persistante des cellules immunitaires telles que les MΦ dans l'articulation rhumatoïde ne sont pas clairs ; cependant, un rôle des TLR est possible puisque l'expression de cytokines pro-inflammatoires via NF-κB est médiée par les TLR (Huang and Pope, 2009). De plus, compte tenu de la prédisposition génétique connue pour la PR, des études sur les polymorphismes des TLR ont été menées pour déterminer si les TLR sont impliqués dans la pathogenèse de la PR. Par ailleurs, grâce aux modèles murins *in vivo* et aux modèles de tissus humains de PR *in vitro*, une mine d'informations sur l'activation potentielle des TLR et des composants de leurs voies de signalisation en aval est disponible. En plus des agents extérieurs, des ligands endogènes pourraient activer les TLR dans la PR.

### 1. TLR de surface dans la PR

Pour mieux comprendre le rôle joué par les TLR durant la PR, divers modèles animaux ont été établis. Dans le modèle d'arthrite induit par les parois cellulaires de streptocoque (SCW), une seule injection de SCW dans les articulations de souris induit une inflammation articulaire médiée par le TLR2 et MyD88 (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008; Joosten et al., 2003). Les injections répétées de SCW conduisent à une arthrite chronique destructrice, qui serait médiée par TLR4 (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008). Ces résultats justifient en partie l'implication de l'activation endogène du TLR4 dans l'émergence de l'érosion du cartilage durant la phase tardive de la pathologie. L'inhibition de TLR4 dans un modèle d'arthrite induite par le collagène supprime cliniquement et histologiquement l'arthrite, tandis que l'ajout de LPS renforce la gravité de l'arthrite (Divanovic et al., 2005; Pierer et al., 2011).

Dans l'ensemble, les données disponibles sur le TLR4 et 2 soutiennent fortement leur rôle dans la pathogenèse de la PR. L'analyse des cellules à partir de sang périphérique de patients atteints de PR montre que leurs monocytes présentent une expression accrue des TLR de surface 2 et 4 (Iwahashi et al., 2004; Sørensen et al., 2008) et cette expression est également observée sur les tissus synoviaux PR (Iwahashi et al., 2004; Roelofs et al., 2005). En effet, une augmentation de l'expression et de l'activité du TLR2 et 4 a également été détectée sur des MΦ isolés du LS PR en comparaison aux MΦ contrôles différenciés *in vitro* (Huang et al., 2007). De même, l'augmentation de l'expression de ces deux récepteurs est rapportée sur les FLS de patients PR comparés à ceux des patients souffrant d'arthrose (OA) et leur stimulation entraîne l'activation de l'ostéoclastogénèse et la libération de MMP (Kim et al., 2007, 2009; Wu et al., 2010a).

Les MΦ isolés du LS de patients atteints de PR répondent plus fortement au peptidoglycane et au LPS (Huang et al., 2007). Alors que les TLR2 et 4 sont les deux TLR les plus surexprimés

sur ces cellules, la réponse accrue aux ligands microbiens n'est pas corrélée avec l'expression des TLR de surface cellulaire. En revanche en employant des MΦ normaux, l'expression de TLR2 est corrélée à l'activation par le peptidoglycane, un ligand du TLR2 (Huang et al., 2007), suggérant que la réponse accrue peut être liée à d'autres facteurs, tels que l'augmentation de la réponse des MΦ aux TLR par l'IFN- $\gamma$  via l'inhibition des mécanismes de rétrocontrôles de l'IL-10 et de STAT3 (Hu et al., 2008). Il a été démontré que l'expression de l'ARNm de l'IFN- $\gamma$  par les MΦ du LS PR augmentait après activation du TLR2 (Shahrara et al., 2008).

L'utilisation d'un antagoniste du TLR4 supprime la sécrétion spontanée d'IL1- $\beta$  et de TNF- $\alpha$  *ex vivo* par les cultures de tissu synovial de PR (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008), et ce résultat est reproduit en inhibant MyD88 et Mal/TIRAP, les médiateurs de la signalisation du TLR2 et TLR4 (Sacre et al., 2007).

Huang et al. ont identifié la protéine de réponse au stress gp96 comme activateur des MΦ principalement à travers le TLR2. Cette activation est plus importante sur les MΦ du LS de PR en comparaison des cellules contrôles, et le niveau d'expression du TLR2 sur ces cellules du LS est fortement corrélé au niveau de gp96 dans le LS. Ces observations supportent le rôle potentiel de gp96 en tant que ligand TLR endogène qui peut contribuer à la pathogenèse de la PR (Huang and Pope, 2009).

Le TLR4 pourrait être considéré comme facteur génétique de susceptibilité à la PR, car sa surexpression est observée dans le cas d'une PR récente mais aussi de longue date (Ospelt et al., 2008). Le polymorphisme TLR4 Asp299Gly (rs4986790) est le plus fréquemment étudié dans la PR, et ce polymorphisme est connu pour mettre en évidence les différences ethniques. Les Européens présentent ce SNP à une fréquence de 4-10% (Adam et al., 2006), alors que les Asiatiques ne possèdent pas ce polymorphisme (Zheng et al., 2010). Dans l'étude menée par Lee et al. sur le polymorphisme TLR4 Asp299Gly, aucune association n'a été révélée concernant la susceptibilité à la PR chez les Européens, mais certaines études ont révélé que l'activité de la maladie mesurée par le DAS28 ("Disease Activity Score 28") différait significativement chez les patients atteints de PR en fonction de la présence de ce polymorphisme. Les trois autres études ont échoué à identifier une association entre ce polymorphisme et les caractéristiques cliniques de la PR (Kilding et al., 2003; Radstake et al., 2004b; Sheedy et al., 2008).

Les études menées par Tamaki et al. ont permis d'identifier les TLR exprimés par les cellules dérivées d'articulations de patients atteints de PR. Les TLR1-6, TIRAP et TRIF sont



plus fortement exprimés sur les DC, suivis par les MΦ et un peu moins dans les fibroblastes (Tamaki et al., 2011).

## 2. TLR endosomaux dans la PR

Alors que la plupart des études ont examiné l'implication des TLR de surface cellulaire dans la pathogenèse de la PR, seuls quelques-uns ont mis l'accent sur les TLR endosomaux et leur rôle dans la PR.

Il convient de mentionner que les résultats rapportés sont apparemment contradictoires. Dans un modèle de souris CAIA et sérum KBxN, l'activation de TLR3 supprimait l'arthrite et réduisait l'inflammation (Yarilina et al., 2007). Néanmoins, le ligand utilisé, poly I:C, active également RIG-I (Gène rétinolide inductible 1) et MDA5 ("Melanoma differentiation-associated gene 5") (Palchetti et al., 2015). Cependant, la stimulation de TLR3 *in vitro* induit les facteurs angiogéniques et ostéoclastogènes dans les fibroblastes synoviaux de patients PR (Moon et al., 2010). En conséquence, le "Knockdown" de TLR3 dans un modèle d'arthrite induite par le pristane chez le rat a entraîné une amélioration de la maladie (Meng et al., 2010).

De même, les données sur le rôle du TLR9 dans la PR sont contradictoires. Dans certaines études, l'injection directe de motifs d'ADN CpG dans les articulations des souris en bonne santé a causé le développement d'arthrite légère (Batsford et al., 2011; Deng et al., 1999) et dans le cas de souris AEC, l'injection de ses motifs aggrave l'arthrite en comparaison aux souris non injectées (Miyata et al., 2000). En accord avec ces conclusions, l'inhibition de TLR9 chez le rat dans le modèle d'arthrite par pristane, atténue la maladie (Herman et al., 2011). Cependant, l'administration systémique de CpG chez les souris induit une réponse anti-inflammatoire et réprime l'arthrite (Thwaites et al., 2014; Wu et al., 2007). Cependant, on sait maintenant que le TLR-9 reconnaît d'autres ligands et que l'ADN active d'autres récepteurs.

D'autre part, l'activation de TLR7 a été suggérée pour contribuer à la pathologie de l'AEC et l'aggravation de l'état inflammatoire au cours de la maladie (Alzabin et al., 2012). Mais, dans ce travail les souris contrôles utilisées ne sont pas issues de la même lignée.

Quelques études ont révélé des associations possibles avec les SNP de TLR endosomaux dans des cohortes ethniques distinctes. Le SNP TLR9 rs187084 a été modestement associé à la susceptibilité à la PR dans une population Turque, bien qu'il ne soit pas lié dans les études de cohortes Néerlandaises ou Françaises (Coenen et al., 2010; Etem et al., 2011). Le SNP TLR8 rs5741883 a été associé à la positivité aux FR dans une étude sur la population Européenne (Enevold et al., 2010).

De nombreuses études ont examiné l'expression et la fonction de ces récepteurs dans les cellules du tissu synovial des patients PR par rapport aux tissus des patients arthrosiques (OA) ou des témoins sains (DS). Les TLR3, 7, 8 et 9 sont tous exprimés dans la synoviale rhumatoïde, qui est une population cellulaire mixte (Ospelt et al., 2008; Sacre et al., 2008), avec des niveaux de TLR 3, 7 et 9 élevés par rapport aux tissus OA ou DS, en particulier sur les DC et les MΦ (Brentano et al., 2005; Roelofs et al., 2005). La stimulation des cellules synoviales de PR avec des ligands du TLR3, 7 et 8 peut induire la production de cytokines tels que l'IFN de type I et de MMP, indiquant que ces TLR sont fonctionnels dans le tissu articulaire de PR (Brentano et al., 2005; Ospelt et al., 2008; Roelofs et al., 2005; Sacre et al., 2008). En fait, sur une gamme de ligands TLR, le TLR3 et 8 induit la plus grande sécrétion de TNF- $\alpha$  à partir de cultures synoviales de PR, alors que l'activation de TLR7 ou 9 ne le permet pas (Sacre et al., 2008).

Le CpG, un ligand du TLR9, n'induit pas l'expression d'IL-6 et de CXCL-8 par les fibroblastes synoviaux de PR (Cho et al., 2007; Jung et al., 2007; Kyburz et al., 2003). L'absence d'activation par CpG est compatible avec l'absence de TLR9 dans les fibroblastes synoviaux PR (Ospelt et al., 2008). Le prétraitement des fibroblastes synoviaux de PR avec de l'IFN- $\alpha$  ou l'IFN- $\beta$  induit l'expression du TLR7 et la réponse à l'agoniste du TLR7 : le loxoribine. Le ligand de TLR3 poly I:C (un mimétique pour l'ARNdb viral) induit l'expression de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  dans les fibroblastes synoviaux de patients PR, bien que la protéine IL-1 $\beta$  n'est pas sécrétée (Roelofs et al., 2009).

Pour examiner les voies des TLR endosomaux, les cultures de tissu synovial PR incubées avec de la miansérine ou de la chloroquine pour supprimer la signalisation du TLR3, 7, 8 et 9, ainsi qu'un inhibiteur spécifique du TLR8, a entraîné la suppression de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, tandis qu'un agoniste du TLR3 et 8 a augmenté la sécrétion de TNF- $\alpha$  (Sacre et al., 2008). Ces observations soutiennent le rôle potentiel de TLR8, et 3, dans la persistance de la production de cytokines observée dans l'articulation PR.

Les cellules nécrotiques pourraient être un ligand TLR endogène dans la PR, puisque dans le LS elles induisent l'expression de CXCL10, CCL5 et IL-6 d'une manière dépendante du TLR3, par les fibroblastes synoviaux PR (Brentano et al., 2005). Le TLR3 a récemment été montré comme étant un capteur des tissus nécrosés en employant des souris TLR3<sup>-/-</sup> (Cavassani et al., 2008). Ces observations suggèrent que la présence de ligands endogènes pour le TLR3 et 8 peuvent contribuer au processus inflammatoire en cours.

Par ailleurs, il a été démontré que l'imitation des conditions hypoxiques de l'articulation *in situ* exacerbait la production de cytokines et de MMP après l'activation de TLR3 dans les FLS de

PR (Hu et al., 2014a). Cette réponse élevée à l'hypoxie peut favoriser l'angiogénèse pathogène dans la synoviale grâce à la capacité du TLR3 à induire le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et l'IL-8 (Moon et al., 2010). En outre, l'activation via le TLR3 peut également promouvoir l'ostéoclastogénèse à la fois directement et indirectement via la régulation à la hausse de RANKL sur les FLS de PR (Kim et al., 2009).

### 3. Ligands endogènes des TLR dans la PR

Un nombre croissant de données indique la présence de divers ligands (**Figure 12**) endogènes des TLR dans le liquide synovial inflammatoire obtenu à partir de patients atteints de PR. Parmi ces ligands le fibrinogène, l'hyaluronane, la protéine de choc thermique B8 (HSP22), la fibronectine, la ténascine C, la protéine sérum amyloïde A et la protéine HMGB1 étaient les plus abondants (Goh and Midwood, 2012; Huang and Pope, 2009; Piccinini and Midwood, 2010; Roelofs et al., 2006; Taniguchi et al., 2003).

HSP22 a été identifiée comme ligand potentiel endogène du TLR4 exprimé dans les articulations des patients atteints de PR (Roelofs et al., 2006). En outre, les fragments de faible poids moléculaire d'acide hyaluronique, qui peuvent être retrouvés dans la synoviale inflammatoire, activent les m DC par le TLR4 (Termeer et al., 2002). HMGB-1 est fortement exprimée dans les MΦ tissulaires de PR (Taniguchi et al., 2003). L'activation de NF-κB induite par cette protéine nucléaire peut être médiée par TLR2 et TLR4 (Park et al., 2004) ainsi que RAGE (Taniguchi et al., 2003).

La protéine sérum amyloïde A, une protéine de la phase réactive aiguë de l'inflammation est fortement exprimée dans le sang périphérique et le tissu synovial des patients atteints de PR et a été identifiée comme ligand du TLR2 (Cheng et al., 2008).

Les cellules nécrosées du liquide synovial de PR libèrent de l'ARN qui peut activer le TLR3 sur les fibroblastes (Brentano et al., 2005). De plus, l'ADN libéré par ces mêmes cellules peut induire la production de cytokines d'une manière dépendante du TLR9 (Brentano et al., 2005; Roelofs et al., 2005; Veiko et al., 2006).

De plus, de l'ARNdb est présent dans le LS de patients PR, en particulier chez les patients avec érosion osseuse (Bokarewa et al., 2008).

Les acides nucléiques sont facilement dégradés à l'extérieur de la cellule, mais dans l'articulation rhumatoïde, ils peuvent être protégés par d'autres molécules. Le peptide antimicrobien cationique humain LL-37 de la famille des cathélicidines est présent dans le LS de PR à des niveaux supérieurs et est connu pour lier l'ADN, le protégeant de la dégradation

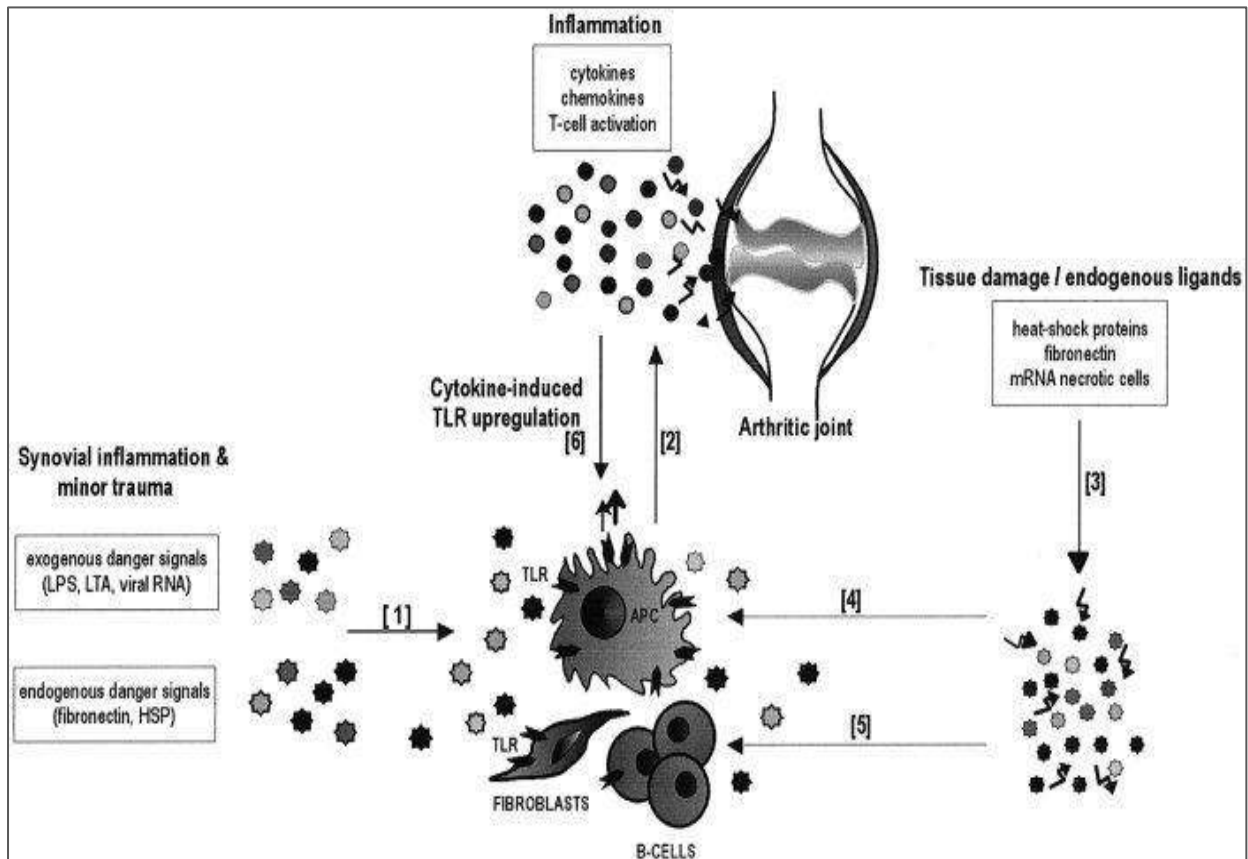
(Lai et al., 2011). En outre, LL-37 est connu pour favoriser la signalisation à travers les TLR3, 7, 8 et 9 (Lai et al., 2011; Lande et al., 2007).

Le fibrinogène citrulliné contenu dans les CI augmente la libération de TNF- $\alpha$  (10 fois plus en comparaison au fibrinogène natif) par les M $\Phi$  via la costimulation de TLR4 et du Fc $\gamma$ -R *in vitro*, donnant un aperçu de comment la citrullination pourrait potentialiser l'effet pro-inflammatoire des DAMP (Clavel et al., 2008; Sokolove et al., 2011). De plus, l'administration de DAMP exogènes induit une inflammation articulaire *in vivo*. Par exemple, l'injection intra-articulaire de fibronectine entraîne un gonflement des articulations (Gondokaryono et al., 2007).

Une autre preuve de la contribution de ces TLR dans la perpétuation de l'inflammation durant la PR provient des médicaments antipaludiens comme la chloroquine, l'hydroxychloroquine et la quinacrine, qui sont utilisés depuis 1950 pour traiter la PR et le LES (Khraishi and Singh, 1996; Maksymowych and Russell, 1987). Certains de ces médicaments agissent comme des inhibiteurs du TLR9 et dans une moindre mesure, des TLR3, 7 et 8 (Kuznik et al., 2011; Sanjuan et al., 2006). Il a été suggéré au paravant que leur mécanisme d'action était dû à l'inhibition de l'acidification endosomale qui est nécessaire à l'activation des TLR endosomaux ; cependant, il a été montré que les antipaludiens interagissaient directement avec les acides nucléiques, provoquant des modifications qui empêchent leur liaison aux TLR endosomaux (Kuznik et al., 2011). Sacre et al. ont constaté que, lorsqu'ils ajoutaient de la chloroquine à des cultures synoviales de PR humaine, celle-ci supprimait la production spontanée de cytokines, indiquant la possibilité que des acides nucléiques entraînaient une inflammation dans ces échantillons (Sacre et al., 2008). En plus de ces résultats, l'antidépresseur miansérine, qui inhibe également les TLR endosomaux, était protecteur dans le modèle d'AEC et supprimait la production spontanée de cytokines dans les cultures de membrane synoviale de PR (Alzabin et al., 2012; Sacre et al., 2010, 2008). Aucune de ces approches ne représente une thérapie cliniquement utile pour la PR, en raison de la dose efficace dépassant les niveaux cliniquement sûrs. Cependant, ces études suggèrent un rôle possible des TLR endosomaux dans le maintien de l'inflammation, ainsi que la possibilité de cibler sélectivement ces récepteurs pour le traitement efficace de la PR (Thwaites et al., 2014).

Les infections ont longtemps été supposées être un facteur sous-jacent dans la pathogenèse de la PR. Les premières études ont signalé la présence de peptidoglycane, d'ADN bactérien et viral dans les articulations de patients atteints de PR, impliquant l'activation des TLR en tant que conducteur potentiel de la maladie (Stahl et al., 2000; Van Der Heijden et al., 2000). Cependant, cette théorie reste controversée, car ces molécules pathogènes sont également

trouvées à des niveaux comparables dans les articulations d'individus sains (Schumacher Jr. et al., 1999).



**Figure 12 : TLR dans le maintien de l'inflammation durant la PR (Roelofs et al., 2008)**

APC : Cellules présentatrices d'antigène, HSP : Protéines de choc thermique, LPS : Lipopolysaccharide, LTA : acide lipoteichoïque, mRNA : Acide ribonucléique messager, TLR : Récepteur de type Toll.

La figure ci-dessus représente les mécanismes permettant l'entretien de l'activation des récepteurs de type Toll (TLR) nécessaire à l'induction de lésions tissulaires lors de l'inflammation chronique de la polyarthrite rhumatoïde (PR).

(1) Les ligands exogènes et endogènes des TLR sont abondants dans les articulations synoviales des patients atteints de PR et induisent une première réponse immunitaire médiée par les TLR. (2) La stimulation d'un seul TLR conduit à la production de médiateurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines, les chimiokines et les métalloprotéinases ; cependant, la stimulation simultanée de plusieurs TLR entraîne une réponse immunitaire induite par une synergie caractérisée par des niveaux extrêmement élevés de médiateurs pro-inflammatoires. (3) Ces médiateurs de l'inflammation peuvent à leur tour provoquer des lésions tissulaires, ce qui conduit à la libération de ligands endogènes de TLR, tels que les protéines de choc thermique (HSP), la fibronectine et l'hyaluronane. (4) Ceci se traduit par une boucle d'auto-entretien de l'activation des TLR et des lésions tissulaires médiées par ces récepteurs. (5) La stimulation subséquente des voies médiées par les TLR entraînent l'activation d'autres cellules immunitaires, telles que les fibroblastes et les cellules B, par des ligands de TLR endogènes et conduit à la sécrétion de métalloprotéinases et d'anticorps, qui contribuent davantage à l'inflammation. (6) De plus, les médiateurs de l'inflammation, principalement les cytokines, peuvent induire une régulation positive des TLR, contribuant également au maintien de l'inflammation.

## ***(2) Complexes protéiques : Inflammasome***

Les inflammasomes sont des complexes multimériques formés en réponse à une variété de stimuli physiologiques et pathogènes. Il existe 3 grandes familles d'inflammasomes définies en fonction de leurs caractéristiques structurales : les récepteurs NLR ("Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptors"), les ALR ("Absent in melanoma 2-Like Receptors") et les plus récemment identifiés les pyrines. Ces récepteurs ont la capacité d'assembler l'inflammasome et d'activer une protéine effectrice de la famille des caspases en association à une protéine adaptatrice ASC ("Apoptosis-associated Speck-like containing a Caspase activation and recruitment domain") composée d'un domaine CARD (Domaine d'activation et de recrutement des caspase) et d'un domaine PYD (Domaine pyrine).

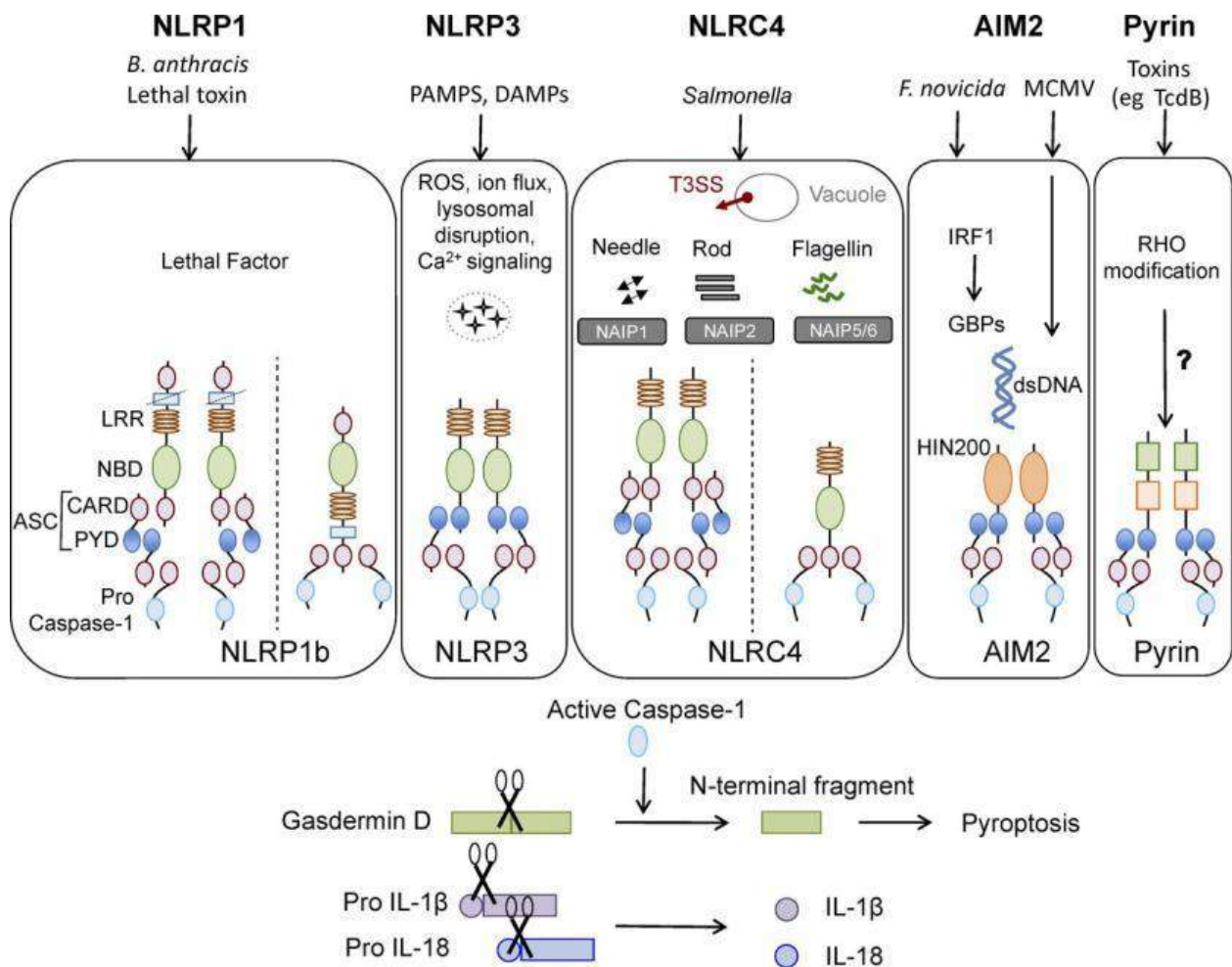
Comme l'inflammasome est impliqué dans la réponse immune aux pathogènes et aux signaux de danger, son assemblage ne s'effectue pas à l'état basal et les caspases restent donc inactives. L'assemblage ne s'effectue que si le récepteur détecte un activateur, ce qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice qui à son tour recrute séquentiellement la protéine effectrice via l'interaction homotypique de leurs domaines CARD. La caspase-1 subit un clivage autocatalytique pour produire les sous-unités actives p10 et p20 qui forment alors des tétramères. Ces sous-unités actives peuvent ensuite cliver de manière protéolytique pour permettre la maturation des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 et induire une forme spécifique de mort cellulaire inflammatoire appelée pyroptose. La caspase-1 activée fournit ainsi à la cellule hôte un double mécanisme de défense par la libération de cytokines matures et l'élimination des cellules infectées ou endommagées (Sharma and Kanneganti, 2016).

Le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans l'inflammation chronique et aiguë a été montré pour la 1<sup>ère</sup> fois par Dinarello en 1998 (Dinarello, 1998). Cette cytokine pro-inflammatoire, produite par les PNN, les M $\Phi$  et les monocytes activés, est initialement synthétisée en une molécule précurseur inactive, la pro-IL-1 $\beta$ , séquestrée dans le cytosol, en réponse à des agonistes de TLR et à des cytokines endogènes. La forme active sécrétée par les cellules est hautement inflammatoire (Meylan et al., 2006). Quant à l'IL-18, cette cytokine qui fait partie de la famille de l'IL-1, est constitutivement exprimée par les monocytes sanguins, les M $\Phi$  tissulaires, les cellules épithéliales et les kératinocytes et est elle aussi produite sous forme de précurseur potentiellement clivable par la caspase-1 (Dinarello, 1998). L'IL-18, une fois maturée, est un inducteur de la production de TNF, d'IFN- $\gamma$  et de chimiokines (Dinarello, 2009). Une fois clivées ces deux cytokines initient une réponse pro-inflammatoire.

Même si les réponses immunes engagées par les différents inflammasomes convergent vers la sécrétion de cytokines proinflammatoires et/ou de pyroptose, chaque inflammasome est

spécialisé dans la détection de DAMP et/ou PAMP bien précis comme représenté en ***Figure 13*** et présente ses propres mécanismes d'activation.

L'activation de l'inflammasome est un composant essentiel de la réponse immunitaire innée et est essentielle pour la clairance des pathogènes ou des cellules endommagées. Cependant, cette activation peut être également un facteur majeur de troubles auto-immuns et métaboliques.



**Figure 13 : Représentation des différents types d'inflammasomes et leurs ligands (Sharma and Kanneganti, 2016)**

**AIM** : "Absent in melanoma", **ASC** : "Apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD", **Ca<sup>2+</sup>** : Calcium, **CARD** : Domaine d'activation et de recrutement des caspase, **DAMP** : Motifs moléculaires associés au danger, **dsDNA** : Acide désoxyribonucléique double brin, **GBP** : protéine de liaison guanylate, **HIN200** : "Hematopoietic interferon-inducible nuclear proteins with 200-amino acid repeat", **IRF** : Facteur de régulation de l'interféron, **LRR** : "Leucine-rich repeat", **MCMV** : Cytomégalo virus murin, **NAIP** : Protéine inhibitrice de l'apoptose neuronale, **NBD** : Domaine lié aux nucléotides, **NLR** : Récepteur de type NOD, **PAMP** : Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes, **PYD** : Domaine pyrine, **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène, **T3SS** : Systèmes de sécrétion de type III, **TcdB** : Toxine B du *Clostridium difficile*.

L'inflammasome NLRP1b répond au facteur létal produit par *B. anthracis* et assemble un inflammasome en recrutant la caspase-1 à travers son domaine CARD ou par ASC en tant qu'adaptateur. L'inflammasome NLRP3 répond aux lésions intracellulaires induites par des agressions pathogènes ou stériles. L'inflammasome NLRC4 s'assemble en réponse à la reconnaissance de la flagelline bactérienne ou des composants du système de sécrétion de type III via les NAIP et peut former des complexes avec ou sans recrutement d'ASC. AIM2 détecte l'ADN double brin à travers son domaine HIN200. La pyrine répond à la modification de Rho induite par les toxines bactériennes. L'activation de l'inflammasome entraîne une activation de la caspase-1 qui, à son tour, clive ses effecteurs en aval.



### (a) NLRP3

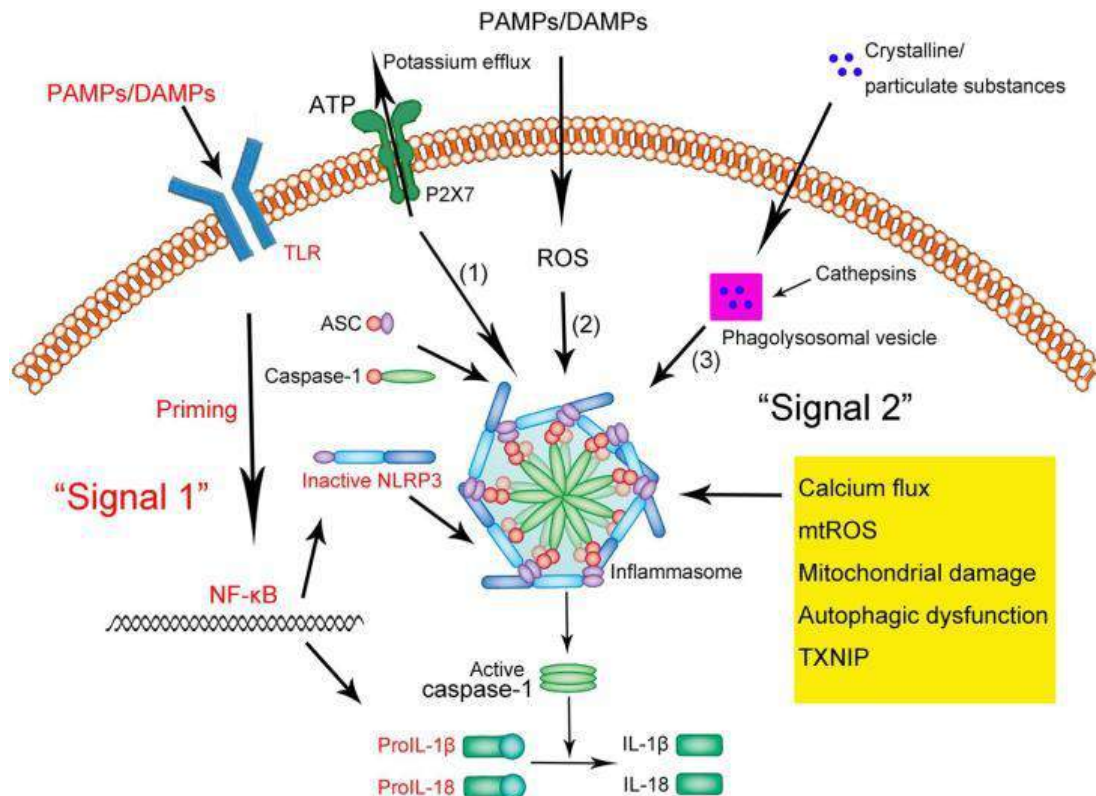
NLRP3 est un NLR inflammatoire qui répond à un large éventail de ligands infectieux et endogènes et est impliqué dans la pathogénèse de plusieurs maladies dont l'arthrite, l'obésité, et la goutte avec les cristaux d'acide urique dans les articulations (Guo et al., 2015).

L'inflammasome NLRP3 est présent principalement dans les cellules immunitaires et inflammatoires après activation par des stimuli inflammatoires ; ces cellules comprennent les MΦ, les monocytes, les DC et les PNN (Guarda et al., 2011; Zhong et al., 2013).

Les déclencheurs qui se sont révélés induire l'activation de NLRP3 comprennent des ligands dérivés de pathogènes tels que des composants de paroi cellulaire microbienne, des acides nucléiques et des toxines formant des pores ; des polluants environnementaux comme la silice, l'amiante et l'alun ; et des signaux de danger endogènes comme l'ATP, la protéine sérum amyloïde A et les cristaux d'acide urique (Man and Kanneganti, 2015). En fait, la diversité de ses activateurs est l'une des caractéristiques les plus distinctives de l'inflammasome NLRP3 et rend peu probable la possibilité d'une interaction directe avec chaque activateur. Il est supposé donc que l'inflammasome NLRP3 détecte un activateur secondaire commun en aval de ces stimuli ou répond à un stress cellulaire associé à une infection ou à un dommage physiologique comme illustré en **Figure 14**. La production de ROS, l'efflux potassique, la signalisation calcique et la perturbation lysosomale ont tous été proposés comme signaux en amont requis pour l'activation de NLRP3 (Cassel et al., 2008; Cruz et al., 2007; Pétrilli et al., 2007; Zhou et al., 2011).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 semble se produire en deux étapes (Sutterwala et al., 2014; Zhong et al., 2013). La première étape implique un signal d'amorçage ou d'initiation dans lequel de nombreux PAMP ou DAMP sont reconnus par les TLR, conduisant à l'activation de la signalisation médiée par le NF-κB, qui régule à son tour la transcription des composants liés à l'inflammasome, y compris NLRP3, pro-IL-1β et pro-IL-18 inactifs (Bauernfeind et al., 2009; Franchi et al., 2012). La deuxième consiste en l'oligomérisation de NLRP3 et l'assemblage subséquent de NLRP3, ASC et procaspase-1 en un complexe. Cela déclenche le clivage de la procaspase-1 en caspase-1, ainsi que la production et la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 actives (Ozaki et al., 2015; Rabeony et al., 2015). Bien que le déclencheur précis de l'activation de cet inflammasome soit inconnu, des études récentes ont identifié de multiples mécanismes cellulaires qui régulent son activation. Dans des conditions de repos, ASC se trouve dans les mitochondries, le cytosol et le noyau, tandis que NLRP3 s'associe au réticulum endoplasmique (Zhou et al., 2011). La nucléation de l'inflammasome nécessite une modification de la localisation subcellulaire de ces molécules pour faciliter leur interaction.

Ce changement est provoqué par le transport des mitochondries médié par la dynéine vers le réticulum endoplasmique, ce qui amène ASC et NLRP3 à proximité (Misawa et al., 2013).



**Figure 14 : Inflammasome NLRP3 (Shao et al., 2015)**

**ASC** : " Adapter protein apoptosis-associated speck-like protein ", **ATP** : Adénosine triphosphate, **DAMP** : Motifs moléculaires liés au danger, **NF-κB** : Facteur de transcription nucléaire kappa B, **NLRP** : Récepteur de type NOD, **P2X7** : Récepteur purinergique, **PAMP** : Motifs moléculaires liés aux pathogènes, **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène, **TLR** : Récepteur de type Toll, **TXNIP** : protéine interagissant avec la thiorédoxine.

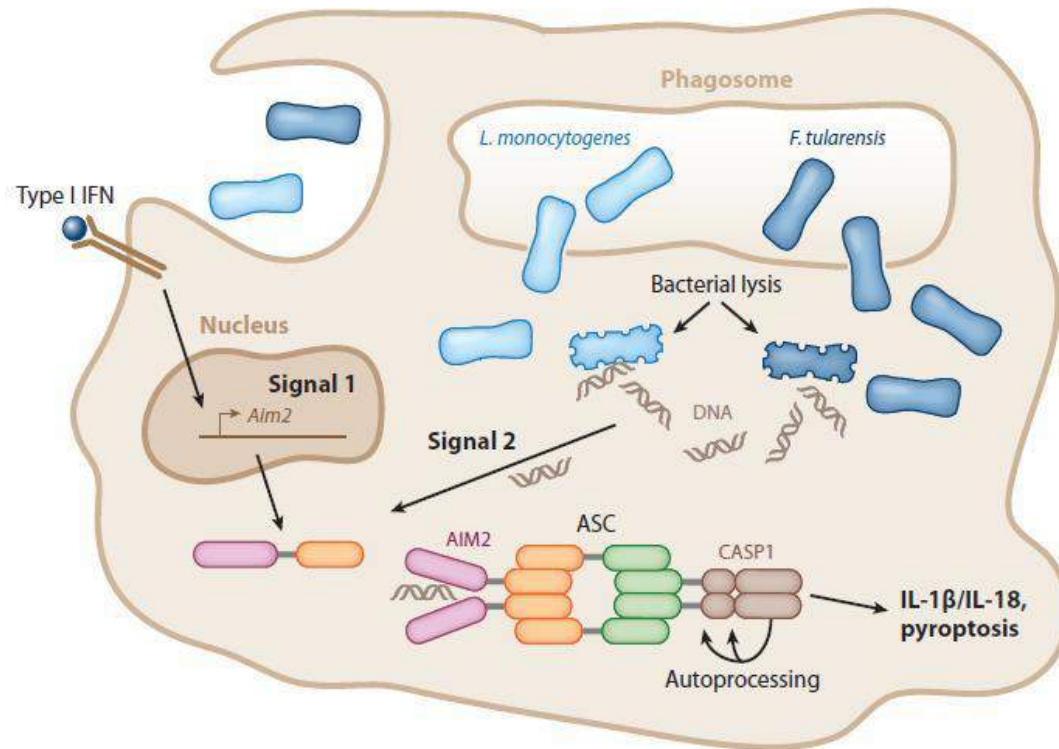
Lors d'une exposition à des PAMP ou à des DAMP, les TLR sont phosphorylés et activent par la suite NF-κB. Dans le noyau, NF-κB favorise la transcription de NLRP3, proIL-1β et proIL-18 qui, après traduction, restent dans le cytoplasme sous forme inactive. Ainsi, ce signal (représenté en rouge par "Signal 1") est un événement de priming. Un autre stimulus (indiqué en tant que "Signal 2" en noir) active l'inflammasome NLRP3 en facilitant l'oligomérisation de NLRP3 inactive, de la protéine ASC et de la procaspase-1. Ce complexe, à son tour, catalyse la conversion de la procaspase-1 en caspase-1, qui contribue à la production et à la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 matures. Trois modèles ont été proposés pour décrire la deuxième étape de l'activation de l'inflammasome : (1) L'ATP extracellulaire peut induire un efflux de potassium K<sup>+</sup> à travers un pore purinergique P2X7, ce qui conduit à l'assemblage et à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Le flux de calcium est également impliqué dans ce processus. (2) Les PAMP et les DAMP déclenchent la génération de ROS qui favorisent l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3. (3) Les irritants environnementaux phagocytés forment des structures intracellulaires cristallines ou particulaires conduisant à une rupture lysosomiale (boîte magenta) et à la libération de contenus lysosomaux comme la cathepsine B. Ces inducteurs provoquent l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3. En outre, d'autres facteurs et mécanismes ont été impliqués dans l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3, y compris les dommages mitochondriaux, la dysfonction autophagique et la protéine interagissant avec la thiorédoxine (TXNIP).

### (b) AIM2

AIM2 a été initialement identifié comme protéine induite par l'IFN- $\gamma$  dans un environnement suppresseur de tumeur. Une étude ultérieure l'a redéfinie comme capteur d'acide nucléique qui s'assemble en un inflammasome, spécifiquement en réponse à l'ADNdb (Bürckstümmer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009). AIM2 est critique pour les réponses immunitaires après infection par divers agents infectieux viraux et bactériens, tels que le virus de la vaccine, le cytomégalo virus de souris (Rathinam et al., 2010), *Francisella tularensis* (Fernandes-Alnemri et al., 2010) et *Listeria* (Kim et al., 2010; Rathinam et al., 2010).

Cet inflammasome contient des domaines PYRIN et HIN-200. Le domaine HIN200 de AIM2 est impliqué dans la liaison du ligand et intervient dans la reconnaissance de l'ADNdb d'une certaine longueur (~ 80 paires de bases) (Jin et al., 2012). Le récepteur AIM2 se lie directement à l'ADNdb d'origine virale ou bactérienne dans le cytosol, via des interactions électrostatiques entre le domaine HIN de cet inflammasome, chargé positivement, et le squelette de l'ADN chargé négativement (Jin et al., 2012; Li et al., 2013). Les analyses structurales attribuent également un rôle auto-inhibiteur au domaine HIN200, car en l'absence de ligand, il interagit avec le domaine PYD de AIM2. La liaison de l'ADN par le domaine HIN200 empêche cette auto-inhibition, permettant à PYD de subir une interaction homotypique avec l'adaptateur ASC (Jin et al., 2013).

La signalisation d'IFN de type I est requise pour l'activation d'AIM2 en réponse à des stimuli bactériens, tels que *Francisella* comme illustré en **Figure 15**, mais pas forcément en réponse à des stimuli viraux, comme le cytomegalovirus de souris (Rathinam et al., 2010). Cette signalisation induit l'expression de gènes régulateurs de l'IFN qui interviennent dans l'échappement bactérien cytosolique et la lyse bactérienne, libérant le ligand pour l'activation d'AIM2 (Man and Kanneganti, 2015; Meunier et al., 2015). Malgré la nature omniprésente de ce ligand, toutes les bactéries et tous les virus ne déclenchent pas l'inflammasome AIM2. Quelques études indiquent que certaines bactéries, telles que *Mycobacterium* et *Legionella*, codent des facteurs de virulence qui peuvent réduire la libération d'ADNdb et ainsi échapper à la détection par AIM2 (Ge et al., 2012; Peng et al., 2011; Shah et al., 2013).



**Figure 15 : Activation d'AIM2 par de l'ADN bactérien (Moltke et al., 2013)**

**AIM2** : Absent in melanoma 2, **ASC** : "Adapter protein apoptosis-associated speck-like protein", **CASP1** : Caspase 1, **DNA** : Acide désoxyribonucléique, **IFN** : Interféron, **IL** : Interleukine.

L'activation de l'inflammasome AIM2 nécessite deux signaux : induction transcriptionnelle d'Aim2 en aval de la signalisation de l'IFN de type I (signal 1) et liaison à l'ADN double brin cytosolique (Signal 2). Dans le cas d'une infection bactérienne, par exemple par *Listeria monocytogenes* ou *Francisella tularensis*, l'ADN est libéré si les bactéries envahissantes subissent une lyse dans le cytosol. Parce qu'AIM2 n'a pas de domaine CARD, l'adaptateur ASC est requis pour le recrutement et l'activation de la caspase 1 (CASP1).

La reconnaissance des acides nucléiques confère également à AIM2 la capacité de répondre à l'ADN de l'hôte libéré en réponse aux dommages cellulaires. Cette reconnaissance et l'activation de l'inflammasome qui s'ensuit, l'impliquent dans diverses maladies inflammatoires, telles que le psoriasis, le LES et l'anévrisme de l'aorte abdominale (Choubey, 2012; Dihlmann et al., 2014; Dombrowski et al., 2011), mettant en avant la possibilité que AIM2 soit une cible thérapeutique pour ces troubles auto-immuns.

### (c) Pyrine

La pyrine est associée à un trouble auto-inflammatoire appelé fièvre méditerranéenne familiale et n'a été identifiée que récemment comme protéine formant un inflammasome. La pyrine a d'abord été impliquée dans l'activation de l'inflammasome à partir d'un modèle de souris exprimant une protéine pyrine mutée responsable de la fièvre méditerranéenne ; ces souris présentaient un trouble auto-inflammatoire médié par ASC et IL-1 (Chae et al., 2011). Une étude plus récente a fourni une preuve définitive en montrant que l'inflammasome pyrine s'assemble en réponse aux toxines modificatrices de Rho produites par diverses espèces bactériennes, notamment *Clostridium difficile*, *Vibrio parahemolyticus*, *Histophilus somni*, *Clostridium botulinum*, et *Burkholderia cenocepacia* (Xu et al., 2014). Ces toxines induisent des modifications covalentes qui incluent la glycosylation, l'adénylylation et la ribosylation de l'ADP (Adénosine diphosphaste) dans la région Switch I des membres de la famille de Rho. Dans une autre étude, la toxine pertussique, par son activité ADP-ribosyltransférase, s'est révélée être impliquée dans l'inflammasome pyrine (Dumas et al., 2014). Bien qu'une interaction directe entre Rho et la pyrine n'a pas été détectée, la modification de Rho semble être essentielle pour l'activation de cet inflammasome, suggérant que la pyrine répond à l'activité fonctionnelle de Rho. Cependant, la conséquence de la modification de Rho et les étapes intermédiaires impliquées dans l'activation de la pyrine sont actuellement inconnues. Comme les modifications de Rho sont étroitement associées à de multiples fonctions cellulaires, y compris la division et la migration, l'activation de la pyrine est probablement contrôlée pendant ces processus.

### *(d) Inflammasome et PR*

Plusieurs cytokines sont impliquées dans la pathogenèse et la persistance de la PR. Parmi elles on distingue l'IL-1 $\beta$ , sécrétée par les monocytes, les M $\Phi$ , les PNN et les DC (Brennan and McInnes, 2008; McInnes and O'Dell, 2010). Cette sécrétion subséquente peut être destructrice pour les tissus, jouant un rôle important dans la résorption osseuse et la destruction du cartilage dans la PR (Joosten et al., 1999). En effet, l'inhibition thérapeutique de l'IL-1 réduit les signes et les symptômes de la PR ainsi que les dommages radiologiques. Les modèles animaux de PR, tels que l'arthrite induite par le collagène et l'arthrite induite par l'antigène, répondent également à l'inhibition de l'IL-1 (Alten et al., 2008; Bresnihan et al., 1998), soulignant l'importance de cette cytokine dans le développement de la maladie.

La sécrétion d'IL-1 $\beta$  est induite par l'activation des inflammasomes. L'assemblage des inflammasomes dépend de l'activation des récepteurs intracellulaires, tels que NLRP1, NLRP3, NLRC4 et AIM2. Lorsqu'ils détectent un PAMP ou un DAMP, ces récepteurs recrutent la protéine adaptatrice ASC, qui déclenche le clivage de la procaspase-1. Une fois activée, la caspase-1 clive les cytokines pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 en leur forme mature et sécrétée. L'activation de l'inflammasome est strictement régulée par des mécanismes transcriptionnels (transcription de NLRP3, AIM2, et IL-1 $\beta$  dépendante de NF- $\kappa$ B), post-transductionnels (ubiquitination, nitrosylation), ainsi que par des protéines endogènes, telles que la protéine contenant le domaine de recrutement des caspases 8 (CARD8), qui inhibe spécifiquement l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Addobbati et al., 2018).

Il est important de noter que les cellules du sang total de PR sécrètent de plus grandes quantités d'IL-1 $\beta$  lors de l'activation de NLRP3, ce qui confirme que l'inflammasome NLRP3 est surexprimé et hyperactif. Ces résultats soutiennent un rôle de ce complexe intracellulaire dans l'inflammation systémique de la PR (Choulaki et al., 2015). Dans le contexte de cette inflammation stérile, il a été montré que de multiples signaux endogènes induisaient l'expression et l'activation de l'inflammasome NLRP3, y compris les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Bauernfeind et al., 2009; Franchi et al., 2009), les DAMP comme l'ATP libéré par les mitochondries des cellules endommagées (Iyer et al., 2009), l'HMGB1 (Andersson et al., 2000) et le S100A (Simard et al., 2013), comme indiqué en **Figure 16**. Par ailleurs, une régulation positive de l'expression des gènes de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique des patients avec une PR active est observée (Mathews et al., 2014) en plus de l'augmentation des ARNm de NLRP3 dans la synoviale de PR comparée à celle d'OA (Rosengren et al., 2005).

L'inflammasome peut sévir dans d'autres maladies auto-immunes, y compris le LES. Kahlenberg et al. ont mis en avant la susceptibilité des MΦ de patients lupiques à l'activation de l'inflammasome en réponse aux NET, par rapport au MΦ de DS, et montré que les produits de l'activation de l'inflammasome, à savoir l'IL-18, améliore considérablement la production de NET. Ces observations suggèrent un nouveau mécanisme par lequel les réponses inflammatoires deviennent amplifiées à travers une boucle où la production d'IL-1β et d'IL-18 induite par les NET améliore l'induction de ces derniers par les PNN recrutés (Kahlenberg et al., 2013).

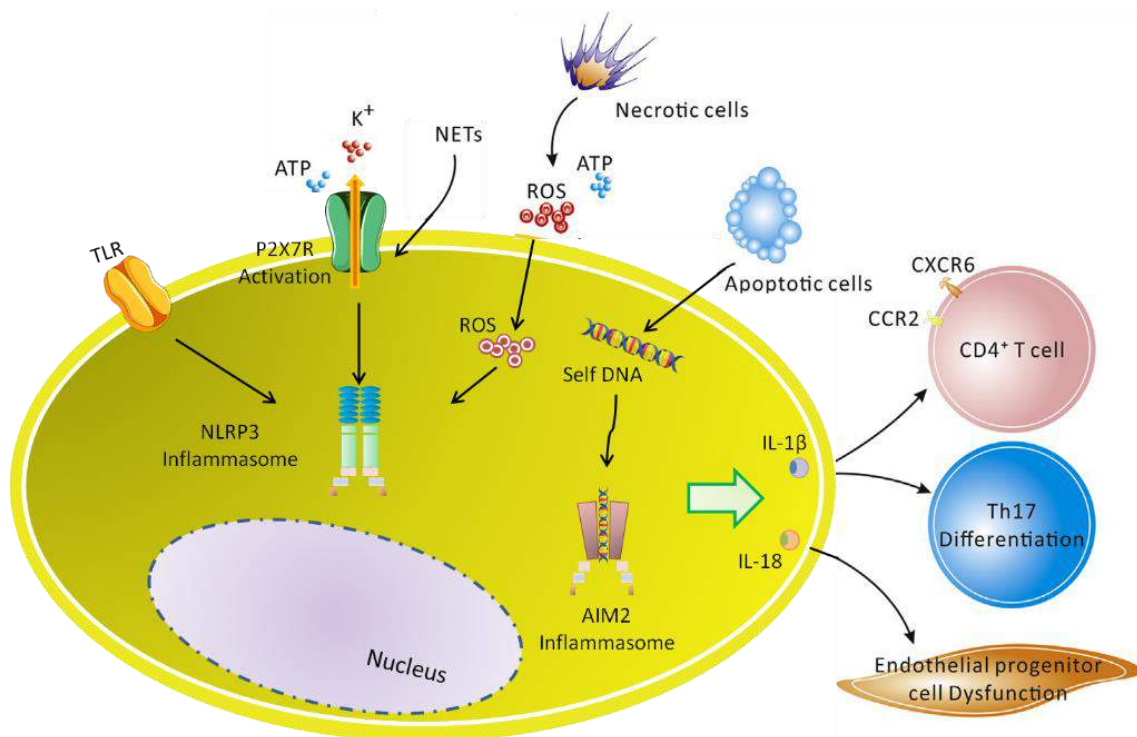
Alternativement, il est possible que d'autres contenus intracellulaires, tels que l'ATP, qui peut activer le P2X7R à des concentrations élevées (Kahlenberg and Dubyak, 2004), puisse être libéré pendant la NETose et ainsi synergiser avec des protéines contenus dans les NET comme la cathélicidine LL-37, pour stimuler l'activation de l'inflammasome. En effet, le P2X7R jouerait un rôle clé dans les réponses inflammatoires dans la PR, et dans l'AEC les souris P2X7R-KO ont une inflammation, une sévérité et une incidence diminuées en comparaison des souris sauvages (Labasi et al., 2002).

Des variations génétiques dans deux protéines de l'inflammasome NLRP3, à savoir NLRP3 et CARD8, ont été rapportées comme influençant la susceptibilité et la sévérité de la PR (Kastbom et al., 2008) dans certaines populations ethniques (Ben Hamad et al., 2012; Fontalba et al., 2007), et malgré leur hétérogénéité, les résultats ont montré un rôle majeur du dérèglement de l'inflammasome NLRP3 dans la pathogenèse de la PR.

Dans la récente étude d'Addobbati et al. sur la population Brésilienne, il a été révélé que le polymorphisme NLRP3 rs10754558 semble conférer un risque accru de développement de PR (Addobbati et al., 2018) et selon Hitomi et al. les analyses fonctionnelles du SNP rs10754558 de NLRP3 ont montré qu'il influençait l'expression de NLRP3 (1,4 fois plus élevé) en modifiant la stabilité de l'ARNm (Hitomi et al., 2009).

De plus le SNP rs2043211 de CARD8 a été associé à la sévérité de la maladie. CARD8 interagit physiquement avec la caspase-1 et régule négativement l'expression de l'IL-1β dépendante de la caspase-1 et de l'activation du facteur nucléaire NFκB (Bouchier-Hayes et al., 2001; Razmara et al., 2002). Le polymorphisme rs2043211 introduit un codon stop prématuré, ce qui entraîne l'expression d'une protéine sévèrement tronquée (Bagnall et al., 2008). Le rôle exact de CARD8 dans la biologie de l'inflammasome n'est toujours pas clair. Il a été proposé que CARD8 agit comme un modulateur de l'activation de NLRP3 ou qu'il exerce un rôle indépendant de l'inflammasome, en tant qu'inducteur de NF-κB (Paramel et al., 2015). Le SNP rs2043211 de CARD8 conduit à une augmentation de la sécrétion d'IL-1β

(Roberts et al., 2010). Cette mutation était associée à une induction accrue de l'activité NFκB et à sa translocation vers le noyau (Fontalba et al., 2007), ce qui conduit à des niveaux élevés de pro-IL-1β et de TNF-α, médiateurs de l'inflammation dans la PR (Moelants et al., 2013). De plus, il a été rapporté que le NF-κB contribue à la prolifération des cellules synoviales et par conséquent, à la destruction des os et du cartilage (Makarov, 2001; Okamoto et al., 2008). Kastbom et al. et Fontalba et al. ont également décrit une association entre le polymorphisme de CARD8 rs2043211 et la sévérité de la PR chez des patients Suédois et Espagnols, respectivement. La combinaison entre les polymorphismes de NLRP3 rs35829419 (Q705K) et de CARD8 rs2043211 (C10X) a été décrite comme étant associée à l'apoptose retardée des PNN (Blomgran et al., 2012), à la susceptibilité et à la sévérité de la PR (Kastbom et al., 2008).



**Figure 16 : Implication possible des inflammasomes dans la pathogénèse de la PR (Yang and Chiang, 2015)**

**AIM** : "Absent in melanoma", **ATP** : Adénosine triphosphate, **CCR** et **CXCR** : Récepteur de chimiokines, **DNA** : Acide désoxyribonucléique, **IL** : Interleukine, **K<sup>+</sup>** : Potassium, **NET** : "Neutrophil Extracellular Traps", **NLR** : Récepteur de type NOD, **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène, **Th** : Lymphocytes Tauxiliaires, **TLR** : Récepteur de type Toll.

La clairance déficiente des NET, des cellules endommagées et apoptotiques dans les maladies auto-immunes comme la PR peut activer (primer) l'inflammasome NLRP3 via l'activation de P2X7R et la génération de ROS. L'ADN cytosolique du soi, issu de cellules apoptotiques par exemple, active l'inflammasome AIM2. L'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2 conduit à la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18, qui intervient ensuite dans la chimiotaxie des cellules T CD4<sup>+</sup>, la polarisation des cellules Th17 et le dysfonctionnement des cellules progénitrices endothéliales.



L'importance de NLRP3 dans la pathogenèse de la PR est confirmée par les résultats de l'augmentation de l'ARNm de NLRP3 dans la synoviale des patients atteints de PR par rapport aux individus souffrant d'OA (Rosengren et al., 2005). L'inflammasome NLRP3 a été décrit comme un activateur de la mort cellulaire à la fois apoptotique et pyroptotique (Sagulenko et al., 2013). Par conséquent, outre la sécrétion excessive d'IL-1 $\beta$ , l'activation dérégulée de ce complexe peut exacerber la mort cellulaire, contribuant au processus inflammatoire dans la PR. Alf Kastbom et al. ont rapporté que le polymorphisme NLRP3-Q705K était associé à un risque accru d'accident vasculaire cérébral et/ou d'accident ischémique transitoire chez les patients atteints de PR (Kastbom et al., 2015).

L'inflammasome AIM2 pourrait contribuer lui aussi à la pathogène de la PR puisque dans un modèle d'arthrite, les souris AIM2-KO présentent des signes fortement diminués d'inflammation articulaire, en plus de la réduction de l'activation de la caspase-1 et de la production de cytokines pro-inflammatoires dans les articulations. Cela permet de supposer que la reconnaissance de l'ADN endogène par AIM2 contribue à la pathogenèse de la maladie (Baum et al., 2015; Jakobs et al., 2015).

## c) Cellules de l'immunité innée

Dans cette partie je mettrai en avant uniquement les cellules sur lesquelles j'ai travaillé.

### (1) Cellules dendritiques

L'implication potentielle des cellules dendritiques (DC) dans la PR a d'abord été reconnue par Thomas et ses collègues. Depuis plusieurs équipes ont confirmé la présence de ces cellules matures et activées dans le liquide et le tissu synovial de patients atteints de PR ; ce résultat a été présenté comme première véritable indication de l'implication des DC dans la cascade inflammatoire de l'arthrite (Page et al., 2004; Radstake et al., 2005a; Thomas et al., 1994). De nos jours, un ensemble important de preuves soutient un rôle essentiel des DC à la fois dans l'initiation et la perpétuation de la PR.

La synoviale rhumatoïde est caractérisée par l'accumulation périvasculaire de sous-ensembles de DC immatures et matures, en étroite association avec les LT et B (Pettit et al., 2000; Thomas et al., 1999; Wenink et al., 2009). Le LS contient un nombre significatif de mDC (Zvaifler et al., 1985) pDC comparé au sang, signifiant un rôle de ces cellules dans la perpétuation de la maladie (Jongbloed et al., 2006). Des études *in vitro* suggèrent que les DC migrent dans l'articulation en réponse aux cytokines et aux chimiokines produites localement, ou se différencient localement à partir des progéniteurs myéloïdes en réponse aux facteurs de croissance contenus dans le LS (van Lieshout et al., 2005; Santiago-Schwarz et al., 2001). De plus, des DC pro-inflammatoires ont été décrites et caractérisées dans le LS de patients PR (Segura et al., 2013).

Il a été postulé que les LT CD4 autoréactifs activés jouent un rôle clé dans le déclenchement et/ou le maintien du processus inflammatoire chronique dans la PR. Les DC sont des CPA qui activent ces cellules T CD4 clonales dans les ganglions lymphatiques. Le processus d'activation implique la formation d'une structure moléculaire à la zone de contact DC-T CD4 appelée synapse immunologique. Dans la PR, la synoviale montre une infiltration massive de DC et de LT CD4. Ainsi, il est possible que les DC peuvent présenter localement des peptides citrullinés à des clones T CD4 naïfs autoréactifs qui, après activation, contribuent à l'initiation ou au développement de la maladie (Rodríguez-Fernández, 2013).

La contribution des DC dans l'inflammation peut se faire par présentation antigénique mais aussi par production de facteurs pro-inflammatoires. Les DC articulaires et dérivées des monocytes peuvent présenter la glycoprotéine du cartilage humain 39 (HCgp39) aux cellules T spécifiques de l'antigène du LS (Steenbakkers et al., 2003; Tsark et al., 2002). En effet, les DC synoviales montrent une activation *in vivo* reflétée par la régulation positive du CMH,

l'expression des molécules co-stimulatrices (CD80 et CD86) (Pettit et al., 2000), l'expression du récepteur activateur du facteur nucléaire  $\kappa$ B (RANK) et de son ligand (RANKL) (Page and Miossec, 2005), et l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires lorsqu'elles sont stimulées *ex vivo* (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) par des CI ou des agonistes de TLR (Wenink et al., 2009). La migration des DC dans le LS peut être la conséquence d'une activation en réponse à des cytokines produites localement, ou à des facteurs endogènes libérés par les cellules mourantes au cours de l'inflammation (Martin et al., 2003). Ces cellules peuvent également contribuer indirectement à la pathogenèse de la PR. CTLA-4 (protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques) est un régulateur négatif de l'activation des LT également exprimé sur les Treg. L'expression de CTLA-4 sur les Treg supprime l'activation des DC en régulant négativement les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 (Wing et al., 2008). Les polymorphismes de CTLA-4 ont été associés à la PR, reflétant soit un manque dans le blocage des cellules T effectrices, ou d'une réduction de l'activité des Treg (Gregersen and Behrens, 2006).

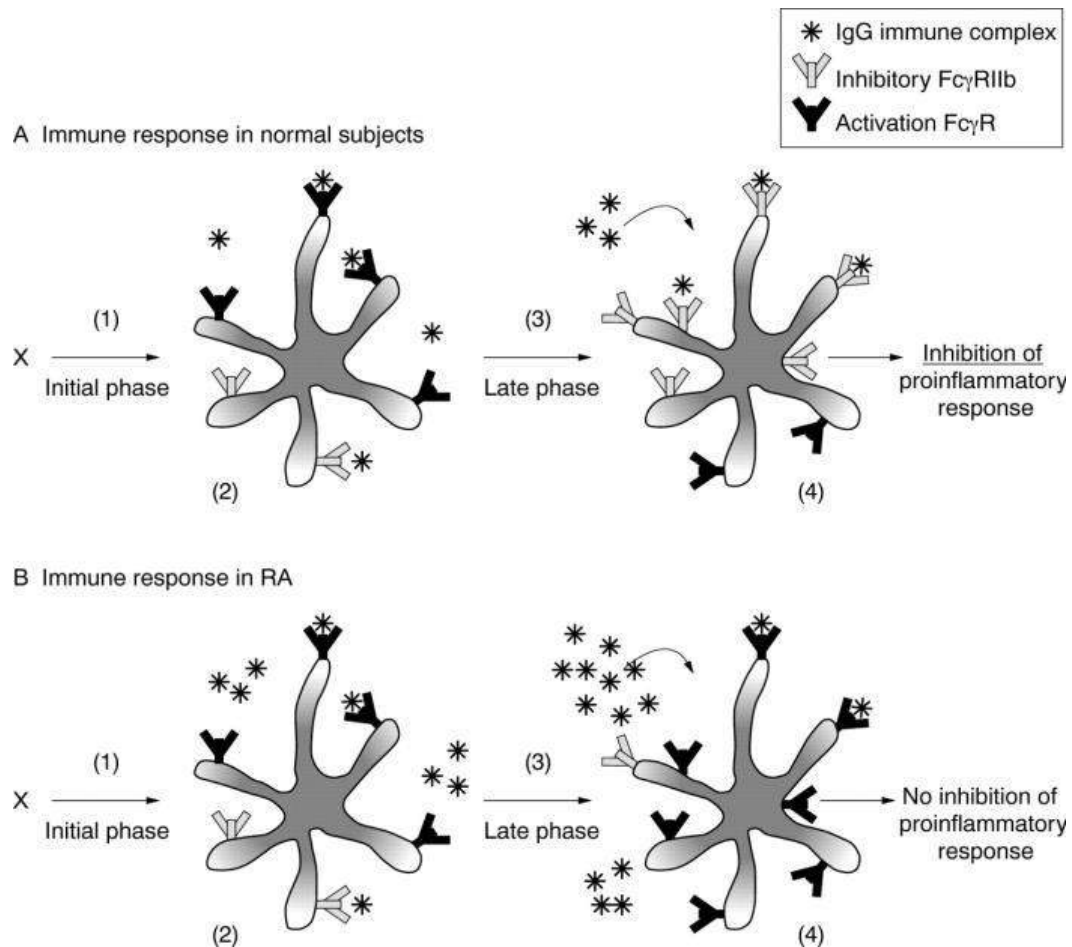
Curieusement, les DC synoviales sont bien organisées dans les structures lymphoïdes, suggérant un rôle potentiel de la synoviale comme un organe lymphoïde ectopique. Ce dernier a été suggéré par Weyand et Goronzy, qui ont caractérisé différents types d'inflammation synoviale basée sur la présence de follicules lymphoïdes, de centres germinatifs, ou des deux (Weyand and Goronzy, 2003). Cependant, les DC ne sont pas seulement situées dans ces tissus lymphoïdes ectopiques, mais sont également très présentes dans les régions périvasculaires, où elles sont potentiellement impliquées dans la chimioattraction d'autres cellules inflammatoires. Un grand intérêt a été porté sur le phénotype des DC montrant des différences phénotypiques et fonctionnelles des DC de l'articulation synoviale et du sang périphérique de patients atteints de PR en comparaison avec celles provenant de donneurs sains (Radstake et al., 2004a).

La découverte que la stimulation des DC de PR avec de IL-13 n'augmente pas l'expression de Fc $\gamma$ RIIb peut suggérer que cette voie de régulation négative est affectée dans la PR, ce qui entraîne un cercle vicieux. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les Ig administrées par voie intraveineuse (IgIV) manquent d'efficacité clinique chez les patients atteints de PR (Kanik et al., 1996; Maksymowych et al., 1996) malgré son succès dans de nombreuses autres affections inflammatoires, dont la myosite inflammatoire, le syndrome de Guillain-Barré (van der Meché et al., 1992) et la sclérose en plaques (Sorensen, 2003). Radstake et al. soulignent que cette inefficacité des IgIV dans le traitement de la PR est due à un défaut de cette voie dans cette maladie, et donc le système immunitaire dans la PR est activé, potentiellement par des voies TLR-dépendantes (par exemple des ligands endogènes), ce qui entraîne l'activation

de diverses cellules inflammatoires et une cascade d'événements pro-inflammatoires. L'inflammation continue ensuite en raison de l'échec d'un mécanisme de rétroaction qui contrebalance normalement la réponse immunitaire pro-inflammatoire, comme illustré en ***Figure 17*** (Radstake et al., 2005b).

Les ACPA et les FR sont supposés se lier aux récepteurs Fc sur les MΦ et les mDC, induisant leur activation et leur production de cytokines pro-inflammatoires (Klareskog et al., 2009). Lebre et al. ont montré une corrélation positive entre le nombre de pDC dans le tissu synovial de PR et le niveau d'ACPA. En sachant que les patients atteints de PR FR<sup>+</sup> ou ACPA<sup>+</sup> présentent une importante infiltration dans le liquide synovial de pDC (Lebre et al., 2008). En effet, un sous-ensemble de patients atteints de PR exprimant de l'IFN de type I était associé à la production d'ACPA (van der Pouw Kraan et al., 2007).

La PR était initialement considérée comme ayant un phénotype Th1. L'identification des cellules Th17 et des cytokines IL-17 et IL-23 dans les tissus et/ou liquides synoviaux a permis de supposer l'implication à la fois des cellules Th1 et Th17 dans sa pathogenèse (Annunziato et al., 2009; Chabaud et al., 1998b). Les DC des tissus synoviaux expriment l'IL-12p70 et l'IL-23p19, cytokines essentielles pour la différenciation complète des cellules Th1 et Th17 respectivement, fournissant ainsi un mécanisme par lequel leur production est localement facilitée ou perpétuée (Lebre et al., 2008).



**Figure 17 : Différence de réponse des DC de patients PR en comparaison aux DC de donneurs sains (Radstake et al., 2005b)**

**Fc $\gamma$ R** : Récepteur de la partie Fc des Ig, **Ig** : Immunoglobuline, **RA** : Polyarthrite rhumatoïde.

(A) Chez des donneurs sains, les voies des TLR sont déclenchées par une multitude de stimuli (1), conduisant à l'activation des DC et à la production de divers médiateurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL12, chimiokines) pour éliminer les pathogènes. La présence de complexes immuns dans cette phase conduit à une activation supplémentaire des DC car l'équilibre entre l'activation et l'inhibition du Fc $\gamma$ R est biaisé (2). Au cours de la phase tardive de la réponse immunitaire, les cytokines anti-inflammatoires, produites pour amortir la réponse immunitaire, conduisent à dévier l'équilibre des Fc $\gamma$ R vers le sous-type inhibiteur (3). La production locale de complexes immuns entraîne à ce moment l'abrogation de la réponse pro-inflammatoire et peut même restaurer la tolérance médiée par les DC (4).

(B) Chez les patients atteints de PR, de nombreux agonistes des TLR sont présents dans le compartiment synovial, menant à un état d'activation accru des DC (1). Cela conduit à une production plus élevée de cytokines et de chimiokines par les DC lors de l'activation à la fois par des stimuli spécifiques et aspécifiques (2). Bien qu'il ait été constaté que les DC des patients atteints de PR expriment un niveau élevé de sous-type inhibiteur de Fc $\gamma$ R, les DC des patients atteints de PR produisent des quantités plus élevées de médiateurs pro-inflammatoires même après stimulation par les complexes immuns (2). Les niveaux d'IL-13 et d'IL-10 sont augmentés pendant l'inflammation de la synoviale. Bien que les complexes immuns sont abondamment présents chez les patients atteints de PR (3), cela conduit à une régulation positive inefficace du Fc $\gamma$ RIIb, et pas d'atténuation de la réponse immunitaire comme il est observé chez les sujets sains, mais au contraire une stimulation des Fc $\gamma$ R activateurs (4).

## (2) Macrophages

Les macrophages (MΦ) ont longtemps été considérés comme des cellules quiescentes à longue durée de vie, à différenciation terminale, et ayant une faible capacité proliférative par rapport à d'autres cellules myéloïdes, telles que les DC. Cependant, plusieurs études et données suggèrent que ces cellules tissulaires peuvent proliférer à des niveaux faibles à l'état d'équilibre (Davies et al., 2013).

Il est important de noter que la capacité de prolifération des MΦ tissulaires est accrue dans des conditions spécifiques, par exemple au cours du développement embryonnaire (Ginhoux et al., 2010; Hoeffel et al., 2012), pendant la grossesse (Tagliani et al., 2011) et les infections par des nématodes (Jenkins et al., 2011). Dans ce dernier cas, l'IL-4 a été identifiée comme étant un moteur de l'expansion proliférative des MΦ pleuraux résidants (Jenkins et al., 2011), alors que le M-CSF ("Macrophage colony-stimulating factors") favoriserait la prolifération ainsi que le recrutement des monocytes (Jenkins et al., 2013). De plus, la population de MΦ dérivés de monocytes résidants dans l'intestin peut également subir une expansion proliférative (Varol et al., 2009). Par contre, le maintien des MΦ dérivés des monocytes lésionnels dans les plaques d'athérome implique principalement leur prolifération locale plutôt qu'un afflux continu de monocytes *de novo* (Robbins et al., 2013).

Il est connu que les monocytes sanguins (et potentiellement d'autres progéniteurs myéloïdes dérivés de la moelle osseuse) sont recrutés dans des tissus enflammés où ils donnent naissance à des populations transitoires de MΦ et DC dérivées de monocytes. Plusieurs facteurs déterminent la nature précise et l'étendue de la contribution de ces MΦ dérivés de monocytes aux populations de MΦ tissulaires, y compris comment et dans quelle mesure l'inflammation (ou sa cause) affecte le pool endogène de MΦ résidants dans les tissus (Ginhoux and Jung, 2014).

### (a) Polarisation des macrophages

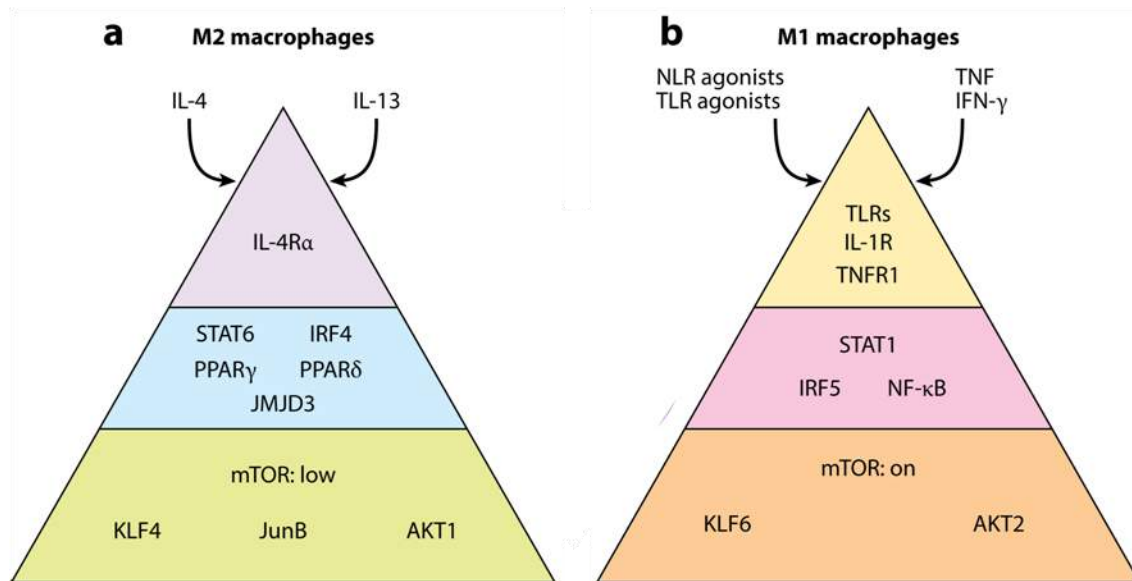
C'est en étudiant les facteurs qui régulent le métabolisme de l'arginine sur les MΦ que Mills et ses collègues ont constaté que les MΦ activés chez des souches de souris Th1 et Th2 différaient qualitativement dans leur capacité à répondre aux stimuli classiques (IFN- $\gamma$  ou LPS). Ils ont ainsi proposé la dénomination M1 et M2 (Mills et al., 2000). Depuis le concept d'activation classique et alternative, également appelé MΦ M1 et M2, respectivement pour imiter la nomenclature des cellules Th, est devenu de plus en plus large et répandu mais affiné.

Le terme d'activation classique des MΦ a été introduit par Mackaness dans les années 1960 dans un contexte d'infection pour décrire l'activité microbicide accrue des MΦ dépendant de l'Ag (Mackaness, 1962). Cette activation a ensuite été liée aux réponses Th1 et à la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules immunitaires activées par l'Ag (Nathan et al., 1983) et étendue aux propriétés cytotoxiques et anti-tumorales (Celada et al., 1984; Pace et al., 1983). À l'époque, l'effet de l'immunité Th2 sur les MΦ était associé à la production d'IgE et la protection contre les parasites extracellulaires alors que l'effet sur les réponses allergiques restait incertain. La découverte que les cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) amplifiées l'expression du récepteur du mannose et des molécules du CMH-II sur les MΦ murins, tout en réduisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires a conduit Stein, Doyle et leurs collègues à proposer que l'IL-4 et l'IL-13 induisent un phénotype d'activation alternatif, un état tout à fait différent de l'activation par l'IFN- $\gamma$  mais loin de la désactivation (Doyle et al., 1994; Stein et al., 1992).

Historiquement, plusieurs propriétés fonctionnelles distinguent les MΦ polarisés M1 (activés classiquement) et M2 (alternativement activés), y compris leurs répertoires de cytokines (sécrétion forte d'IL-12 et d'IL-23 et faible d'IL-10 versus sécrétion faible d'IL-12 et d'IL-23 et forte IL-10), les chimiokines (CXCL9 et CXCL10 contre CCL17 et CCL22), le micro-ARN (miR-155 contre miR-223), le métabolisme du fer, du glucose et du folate, les récepteurs scavengers et les récepteurs du mannose (Murray et al., 2014; Wang et al., 2014).

Cette polarisation se réfère à une estimation de l'état d'activation de ces cellules à un point donné dans l'espace et le temps.

Les MΦ M1 apparaissent dans des milieux inflammatoires dominés par les TLR et la signalisation IFN et sont généralement associés à l'immunité contre les bactéries, les pathogènes intracellulaires et aux tumeurs dans le contexte des réponses Th1, alors que les macrophages M2 se trouvent dans les milieux dominés par les réponses Th2, telles que l'immunité contre les helminthes (parasites), l'asthme et l'allergie. Les MΦ M2 ont des propriétés immunorégulatrices, favorisent la croissance tumorale et invasive et orchestrent la réparation et le remodelage tissulaire (y compris la fibrose) (Gordon and Martinez, 2010; Murray, 2017). Comme illustré en **Figure 18**, les facteurs de transcription impliqués dans la polarisation des MΦ incluent NF-kB, STAT1 et IRF5 pour le phénotype M1, et IRF4, STAT6, c-Myc, et PPAR $\gamma$  pour M2 (Lawrence and Natoli, 2011).



**Figure 18 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques contrôlant la polarisation macrophagique (Murray, 2017)**

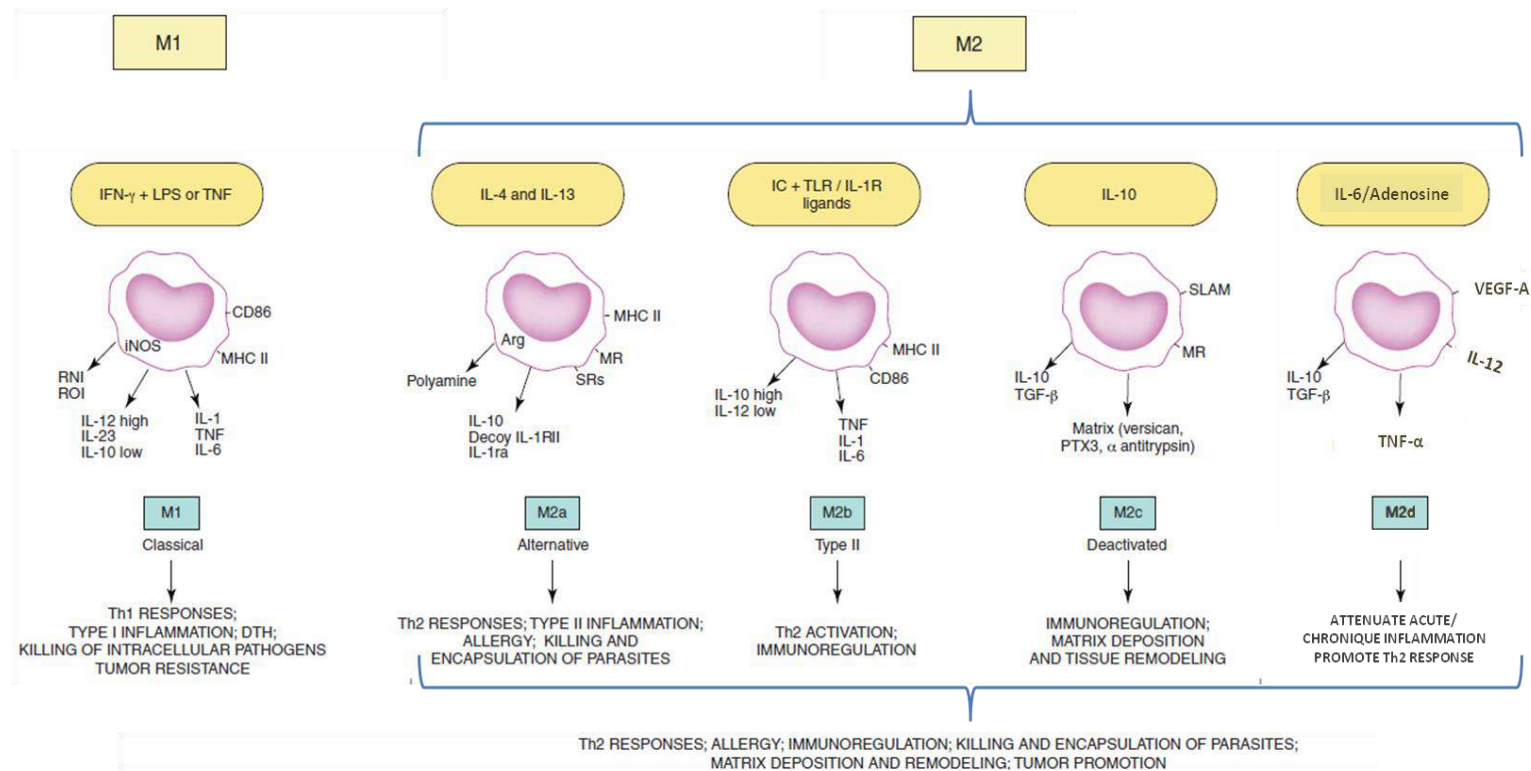
*AKT* : Protéine kinase B, *IL* : Interleukine, *IRF* : Facteur régulateur de l'interféron, *JMJD3* : "Jumonji domain containing-3", *JunB* : Facteur de transcription AP-1, *KLF* : Facteur de type Krüppel, *mTOR* : Cible de la rapamycine, *NF-κB* : Facteur de transcription nucléaire kappa B, *NLR* : Récepteur de type NOD, *PPAR* : Récepteur activé par un proliférateur de peroxydase, *STAT* : Transducteur de signal et activateur de la transcription, *TLR* : Récepteur de type Toll, *TNF* : Facteur de nécrose tumorale.

Le phénotype M1 activé par l'IFN- $\gamma$  ou le LPS (Dalton et al., 1993; Mantovani et al., 2009) joue un rôle important dans l'initiation et le développement de l'inflammation en produisant un grand nombre de facteurs pro-inflammatoires, comme l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF (Oishi et al., 2016), ainsi que l'IL-23 et l'IL-12 (Verreck et al., 2004). Le phénotype M1 exprime fortement le TLR4, le CD86, le CMH-II, l'iNOS/NOS2, et l'IL-1 $\beta$  ; en outre, les chimiokines CCL2 et CCL5 sont associées au phénotype M1. Le phénotype M1 favorise également le recrutement des cellules Th1 et des cellules NK, qui jouent un rôle crucial dans la mort des pathogènes intracellulaires (Li et al., 2015; Mantovani et al., 2004).

Récemment, le phénotype M2 a été divisé en sous-types : M2a, M2b, M2c et M2d, illustré en **Figure 19**. L'IL-4 et/ou l'IL-13 activent les M $\Phi$  M2a, ces derniers sécrètent un grand nombre de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, augmentent l'activité de l'arginase-1 (Arg-1) et expriment spécifiquement le récepteur au mannose (CD206) et la "Chitinase 3-like protein 3" (Chi3l3), qui peut tuer les agents pathogènes extracellulaires, éliminer les débris, favoriser l'angiogenèse, le remodelage tissulaire et la cicatrisation (Ding et al., 2015; de Souza et al., 2017) ; les M $\Phi$  M2b sont activés par les TLR, le ligand de l'IL-1R ou les CI, ces M $\Phi$



sécrètent peu d'IL-12 et énormément d'IL-6, d'IL-10, de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (Colin et al., 2014) ; les M $\Phi$  M2c sont activés par l'IL-10, le TGF- $\beta$  et les glucocorticoïdes, ont une sécrétion élevée d'IL-10 et de TGF- $\beta$ , et jouent un rôle dans la régulation et l'inhibition de l'inflammation (Kim et al., 2015; Lu et al., 2013) ; avec les M $\Phi$  M2b, ils sont également appelés «M $\Phi$  régulateurs» (Mosser and Edwards, 2008) ; les M $\Phi$  M2d sont induits par la co-stimulation avec les TLR et les agonistes des récepteurs A2A de l'adénosine, ils sont caractérisés par des niveaux élevés d'IL-10 et de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de faibles niveaux de TNF et d'IL-12 (Grinberg et al., 2009; Li et al., 2011b). Les quatre sous-types de M $\Phi$  M2 ont leurs propres biomarqueurs pour les distinguer : le CCL17 est un biomarqueur des M $\Phi$  M2a ; CCL1 pour les M2b ; CXCL13 est un biomarqueur des M $\Phi$  M2c (Tsuchimoto et al., 2015) ; et CD206, Ym1, Fizz1, dectine-1, arginase-1 sont des biomarqueurs de M $\Phi$  M2d (Ferrante et al., 2013).



**Figure 19 : Représentation des différentes sous-populations de macrophages (adapté de (Klopffleisch, 2016; Mantovani et al., 2004))**

**DTH** : Hypersensibilité retardée, **IC** : Complexes immuns, **IFN** : Interféron, **IL** : Interleukine, **iNOS** : Oxyde nitrique synthase inductible, **LPS** : Lipopolysaccharide, **MHC** : Complexe majeur d'histocompatibilité, **MR** : Récepteur du mannose, **PTX3** : Pentraxin, **RNI** : Intermédiaires réactifs de l'azote, **ROI** : Intermédiaires réactifs de l'oxygène, **SLAM** : Molécule d'activation de la signalisation lymphocytaire, **SR** : Récepteurs éboueurs "Scavenger", **TGF** : Facteur de croissance transformant, **TLR** : Récepteur de type Toll, **TNF** : Facteur de nécrose tumorale, **VEGF** : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

Les macrophages se polarisent et acquièrent différentes propriétés fonctionnelles en réponse à des signaux dérivés de l'environnement. L'exposition des macrophages à l'IFN- $\gamma$  et au LPS entraîne une polarisation M1, avec des propriétés cytotoxiques et antitumorales potentialisées, alors que les macrophages M2 sont en général plus sujets aux activités immunorégulatrices et protumorales. En particulier, M2a (induits par l'exposition à IL-4 et IL-13), M2b (induits par l'exposition combinée aux immunocomplexes et aux agonistes TLR ou IL-1R) et M2d (induits par l'IL-6) exercent des fonctions immunorégulatrices et induisent des réponses de type Th2, alors que les macrophages M2c (induits par l'IL-10) sont plus liés à la suppression des réponses immunitaires et au remodelage tissulaire.

### ***(b) Implication des macrophages dans la PR***

La multitude et l'abondance des médiateurs dérivés des MΦ dans la PR et leurs effets paracrine/autocrine les identifient comme des amplificateurs locaux et systémiques de la maladie. Bien que la compréhension de l'étiologie de la PR demeure l'ultime moyen de réduire au silence le processus pathogénétique, les efforts pour comprendre comment les MΦ activés influencent la maladie ont conduit à des stratégies d'optimisation ciblant spécifiquement ces cellules.

Les MΦ sont d'une importance capitale dans la PR en raison de leur nombre important dans la membrane synoviale enflammée et au niveau de la jonction cartilage-pannus, leur clair état d'activation (Bresnihan, 1999; Burmester et al., 1997) et leur réponse aux traitements antirhumatismaux. Bien que le MΦ n'occupe probablement pas une position pathogène causale dans la PR (excepté leur capacité potentielle de présentation d'antigène), il possède un large potentiel pro-inflammatoire, destructif et remodelant et contribue considérablement à l'inflammation et à la destruction articulaire dans la PR aiguë et chronique (Kinne et al., 2000).

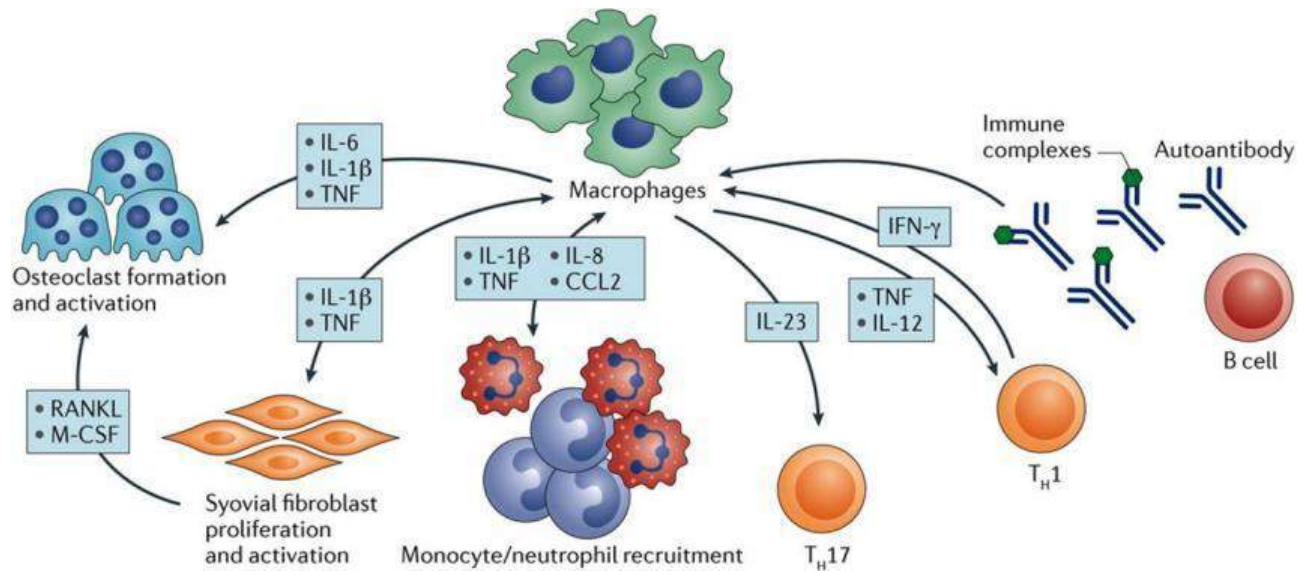
De ce fait, le système monocyte/MΦ fait partie intégrante du système immunitaire naturel et participe à la première ligne de défense contre les agents infectieux. Ce système contribue à l'homéostasie du corps par une fonction d'éboueur "Scavenger" de tous les débris générés par des processus physiologiques ou pathologiques. Ainsi, les monocytes/MΦ possèdent des fonctions biologiques multiples et puissantes qui peuvent grandement affecter l'apparition et le développement de maladies inflammatoires chroniques comme la PR (Hogg et al., 1985).

Une partie importante des réponses effectrices de MΦ est médiée par une signalisation dépendante du contact cellulaire avec différentes cellules inflammatoires ou mésenchymateuses.

En raison du nombre important de MΦ et de fibroblastes et de leur état d'activation dans le tissu synovial de PR, l'interaction entre ces cellules est critique pour l'inflammation et les lésions tissulaires qui en résultent, comme illustré en ***Figure 20***. En effet, le simple contact entre ces cellules provoque la production d'IL-6, d'IL-8 et de GM-CSF. En outre, *in vitro*, une dégradation significative du cartilage se produit dans des co-cultures de fibroblastes et de MΦ de souris, une réponse dépassant nettement celle observée avec un seul de ces types cellulaires (Burmester et al., 1997).

Les fonctions accessoires, inflammatoires, effectrices et inhibitrices des MΦ peuvent être stimulées par des LT pré-activés et exprimant des molécules de surface d'activation. En

réponse à une telle interaction, les MΦ produisent des MMP responsable de la dégradation du cartilage dans la PR, de l'IL-1α et de l'IL-1β (Berg et al., 1996). De plus, les LT pré-stimulés par mimétisme antigénique stimulent la production de TNF-α et d'IL-10 une fois en contact avec les MΦ dans l'arthrite à adjuvant chez le rat (Kinne et al., 1995).



**Figure 20 : Rôle des macrophages dans la PR (Udalova et al., 2016)**

*CCL* : Chimiokine. *IFN* : Interféron, *IL* : Interleukine, *M-CSF* : "Macrophage colony-stimulating factor", *RANKL* : Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B, *T<sub>H</sub>* : Lymphocytes T auxiliaires, *TNF* : Facteur de nécrose tumorale.

Les macrophages produisent des cytokines, qui à leur tour favorisent l'inflammation par le recrutement de cellules immunitaires, la polarisation des lymphocytes T et l'activation des fibroblastes. Les fibroblastes activés sécrètent RANKL et M-CSF, induisant la différenciation des ostéoclastes, qui est renforcée par le TNF dérivé des macrophages et d'autres cytokines. Les complexes immuns formés par les auto-anticorps et les antigènes activent les macrophages. De plus, les macrophages sont influencés par le contact cellule-cellule ou par les cytokines produites par les lymphocytes T, les fibroblastes et les cellules immunitaires innées.

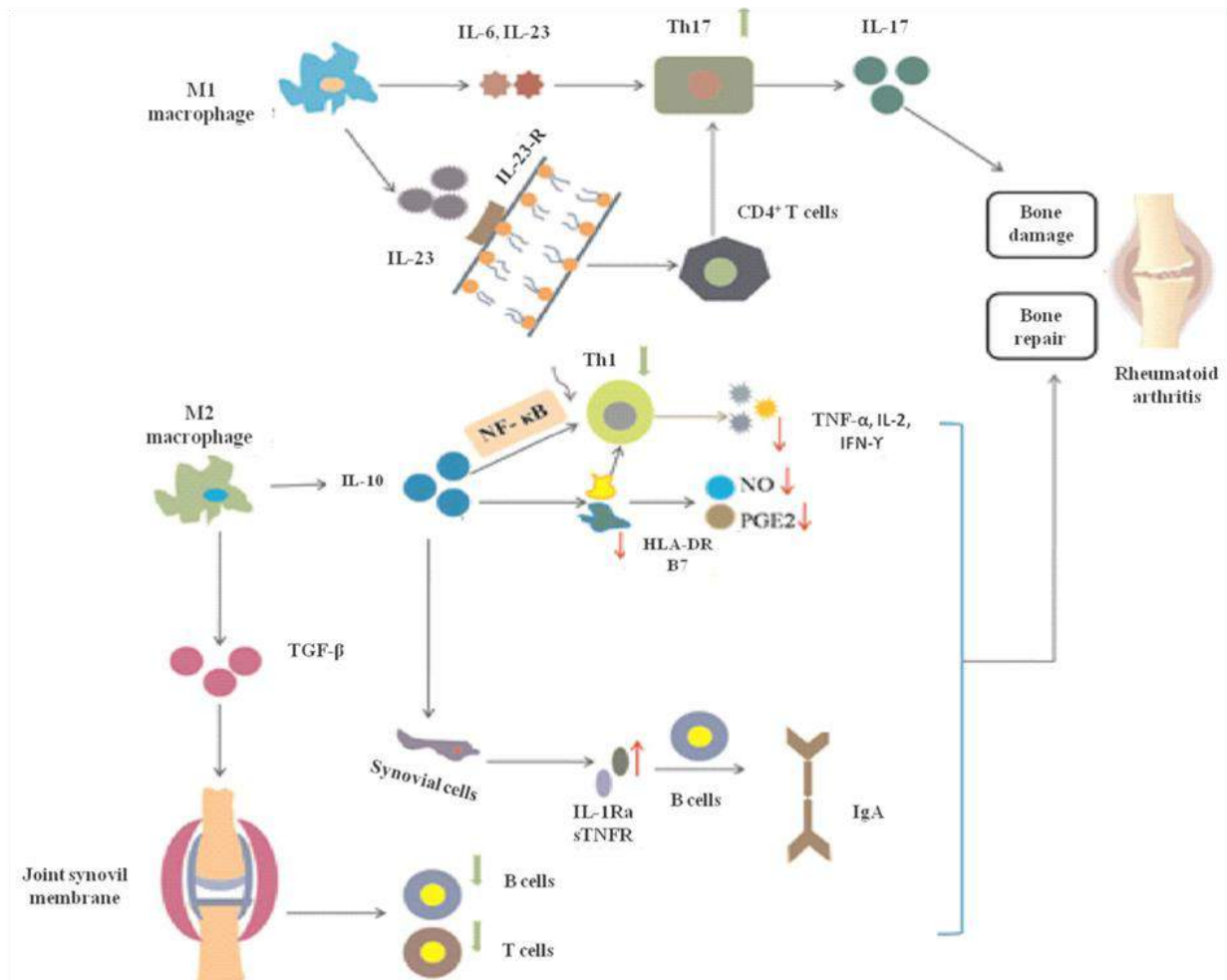
L'augmentation du nombre de MΦ dans la synoviale est une caractéristique précoce de la maladie rhumatismale active, et un nombre élevé de ces cellules est une caractéristique importante des lésions inflammatoires. Le degré d'infiltration des MΦ synoviaux est corrélé avec le degré d'érosion des articulations, et l'épuisement de ces cellules du tissu enflammé présente un avantage thérapeutique profond. La recherche a maintenant découvert un niveau étonnamment élevé d'hétérogénéité dans l'origine et la fonction des MΦ, et a souligné le rôle des facteurs environnementaux dans leur spécialisation fonctionnelle. Bien que les populations hétérogènes de MΦ dans la PR n'aient pas été complètement caractérisées, des résultats préliminaires dans des modèles murins d'arthrite ont contribué à la compréhension du

phénotype et de l'ontogénèse des MΦ synoviaux et à déchiffrer les propriétés de ces phagocytes infiltrés et tissulaires dérivés des monocytes (Udalova et al., 2016).

En général, lorsqu'un pathogène pénètre dans le corps, les DC matures présentent des Ag aux LT naïfs, les MΦ s'activent et effectuent des réponses immunitaires spécifiques en détectant et englobant un corps étranger exogène (Liang et al., 2016). En même temps, les MΦ peuvent sécréter des facteurs inflammatoires pour détruire les pathogènes, et sécréter des facteurs anti-inflammatoires pour protéger les organes. Comme illustré en **Figure 21**, deux états différents de polarisation des MΦ ont été identifiés lors de la PR : les MΦ M1 sécrètent principalement plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1, responsables de la destruction des articulations ; alors que les cytokines anti-inflammatoires IL-10, TGF- $\beta$  nécessaires à la réparation tissulaire sont principalement sécrétées par les MΦ M2 mais à des taux faibles. D'ailleurs le déséquilibre entre M1 et M2 est l'une des principales causes de la PR (Kinne et al., 2007).

Les MΦ infiltrés dans la synoviale ont un phénotype hétérogène et la majorité des cellules co-expriment les marqueurs M1 et M2 (Ambarus et al., 2012a). Des preuves de polarisation des MΦ dans les deux sens sont manquantes dans l'articulation enflammée, mais le TNF et l'IL-1, généralement libérés en quantités plus élevées par les MΦ M1, sont abondants dans la PR, tandis que l'activité IL-10, caractéristique des MΦ M2, est relativement diminuée chez les patients atteints de PR par rapport aux individus non affectés (Kennedy et al., 2011). Les souris déficientes en IL-10 développent une arthrite inflammatoire exacerbée, et le phénotype des MΦ synoviaux chez ces animaux est déplacé vers le phénotype M1 pro-inflammatoire (Ye et al., 2014). Le traitement des patients avec des agents anti-TNF a un effet rapide et prononcé sur l'infiltration des MΦ dans les tissus (De Rycke et al., 2005).

La dominance micro-environnementale observée et la capacité des MΦ dérivés des monocytes à adopter le phénotype des MΦ tissulaires permettent le recrutement de monocytes dans des situations telles que les infections, le vieillissement ou les pathologies où l'auto-renouvellement des MΦ tissulaires pourrait ne pas suffire à soutenir le réapprovisionnement ou le fonctionnement des MΦ (Gentek et al., 2014). La déplétion des monocytes activés par leucaphérèse répétée chez les patients atteints de PR active entraîne une amélioration de l'activité de la maladie qui persiste pendant 10 à 12 semaines (Yeadon and Karsh, 1983). Ce traitement conduit également au repeuplement avec des monocytes ayant un statut d'activation réduit en ce qui concerne la production de cytokines et de médiateurs inflammatoires (Hahn et al., 1993).



**Figure 21 : Cytokines produites par les macrophages M1 et M2 lors de la PR (Wang et al., 2017b)**

**B7** : Molécule de co-stimulation, **HLA** : Antigène des leucocytes humains, **IFN** : Interféron, **Ig** : Immunoglobuline, **IL** : Interleukine, **NF-κB** : Facteur nucléaire kappa B, **NO** : Monoxyde d'azote, **PGE** : Prostaglandine, **TGF** : Facteur de croissance transformant, **Th** : Lymphocytes T auxiliaires, **TNF** : Facteur de nécrose tumorale.

Les macrophages M1 sécrétant des cytokines pro-inflammatoires aggravent les symptômes de la PR, tandis que les macrophages M2 sécrétant des cytokines anti-inflammatoires atténuent les symptômes de cette pathologie. Les M1 sécrètent de l'IL-23 qui se lie à son récepteur IL-23R, exprimé sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cette cytokine en combinaison avec l'IL-6 favorise la différenciation en Th17, qui permet une importante sécrétion d'IL-17, provoquant en outre des lésions osseuses.

Les M2 améliorent principalement les symptômes de la PR de deux façons :

1) en sécrétant la cytokine anti-inflammatoire l'IL-10, qui réduit la production de cytokines inflammatoires par les cellules Th1 et cela en inhibant la voie de signalisation de NF-κB ; l'IL-10 peut également réduire l'expression de l'antigène HLA-DR, de B7 et d'autres molécules de co-stimulation, ce qui entraîne une inhibition de l'activité lymphocytaire à médiation cellulaire Th1, de la synthèse de NO et de la production de PGE2 ; cette cytokine favorise également la production d'IL-1Ra et de sTNFR par les cellules synoviales, favorisant la prolifération des cellules B pour produire des IgA,

2) les macrophages M2 sécrètent le TGF-β en tant que régulateur négatif dans la membrane synoviale via l'inhibition de l'activité des cellules T et B.

### (3) Neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont le type cellulaire le plus abondant dans le sang humain. Ils sont produits dans la moelle osseuse en grand nombre,  $\sim 10^{11}$  cellules par jour. Dans des conditions homéostatiques, les PNN pénètrent dans la circulation, migrent vers les tissus, où ils remplissent leurs fonctions, et sont finalement éliminés par les MΦ par phagocytose ou retournent à la moelle osseuse, initiant la résolution de l'inflammation, le tout au bout d'un jour. Cependant, on sait maintenant que la durée de vie des PNN peut atteindre plus de cinq jours *in vivo* chez l'homme (Pillay et al., 2010). Les PNN sont des cellules effectrices importantes dans le système immunitaire inné (Mayadas et al., 2014). Ils patrouillent constamment dans l'organisme à la recherche de signes d'infections microbiennes et, une fois trouvés, ces cellules réagissent rapidement pour piéger et tuer les agents pathogènes envahissants (Rosales, 2018).

En cas d'infection ou d'inflammation, ces leucocytes sont les premières cellules à sortir de la circulation et migrer vers la zone attaquée. Là, les PNN tuent les microbes, communiquent le statut des dommages à d'autres cellules immunitaires et initient la guérison. Ces cellules sont reconnaissables par leur noyau polylobé caractéristique, d'où le nom de cellules polynucléaires neutrophiles. Une deuxième caractéristique des PNN est l'abondance des granulations dans leur cytoplasme. En effet, à la fin du XIXe siècle, la coloration granulaire avec des colorants neutres a conduit Paul Ehrlich à appeler ces cellules neutrophiles (Sollberger et al., 2018).

L'activité antimicrobienne des PNN est leur fonction la mieux comprise. Quatre principales fonctions antimicrobiennes leurs sont reconnues : la phagocytose, la dégranulation, l'explosion oxydative et la libération de matériel nucléaire sous forme de pièges extracellulaires appelés "Neutrophil Extracellular Traps" (NET) (cette dernière fonction sera détaillée en Chapitre C : NETose).

Les PNN sont des phagocytes professionnels et possèdent dans leurs granules un arsenal antimicrobien (par exemple, LL-37) puissant qui, associé à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), tuent les microbes à l'intérieur du phagosome. Ces protéines antimicrobiennes sont également libérées, par «dégranulation». Les NET sont libérés par les PNN activés et sont constitués de chromatine modifiée et de protéines antimicrobiennes provenant à la fois du cytoplasme et des granules de la cellule. Pour agir par l'un de ces trois mécanismes, les PNN comptent sur leur capacité à s'accumuler rapidement en grand nombre sur le site d'infection ou d'inflammation stérile après leur recrutement du sang (Sollberger et al., 2018).

Ainsi, les PNN sont des médiateurs de l'inflammation. Classiquement, ils sont décrits comme étant une population homogène de cellules différenciées en phase terminale avec une fonction unique : la destruction de micro-organismes. Cependant, les preuves accumulées au cours des dernières années ont révélé que les PNN présentent une grande hétérogénéité phénotypique et une grande polyvalence fonctionnelle, qui les placent en tant que modulateurs importants de l'inflammation et des réponses immunitaires. Les PNN répondent à plusieurs signaux et réagissent en produisant des cytokines et d'autres facteurs inflammatoires qui influencent et régulent l'inflammation et le système immunitaire y compris l'immunité adaptative (Nauseef and Borregaard, 2014; Scapini and Cassatella, 2014). De nos jours, il est reconnu que les PNN sont des cellules complexes transcriptionnellement actives (Ericson et al., 2014) qui produisent des cytokines (Tecchio et al., 2014), modulent les activités des cellules voisines, contribuent à la résolution de l'inflammation (Greenlee-Wacker, 2016), régulent l'activité des MΦ lors des réponses immunitaires à long terme (Chen et al., 2014), participent activement à plusieurs maladies dont le cancer (Mishalian et al., 2017; Uribe-Querol and Rosales, 2015), et jouent même un rôle dans la mémoire immunitaire innée (Netea et al., 2016).

### *(a) Granulopoïèse*

La granulopoïèse a lieu dans les cordons hématopoïétiques de la moelle osseuse où les progéniteurs granulocytaires engagés proviennent de cellules souches hématopoïétiques et subissent une prolifération et une différenciation en PNN. Par exemple, chez l'homme adulte, la moelle osseuse génère  $5-10 \times 10^{10}$  granulocytes par jour à l'état d'équilibre (Summers et al., 2010).

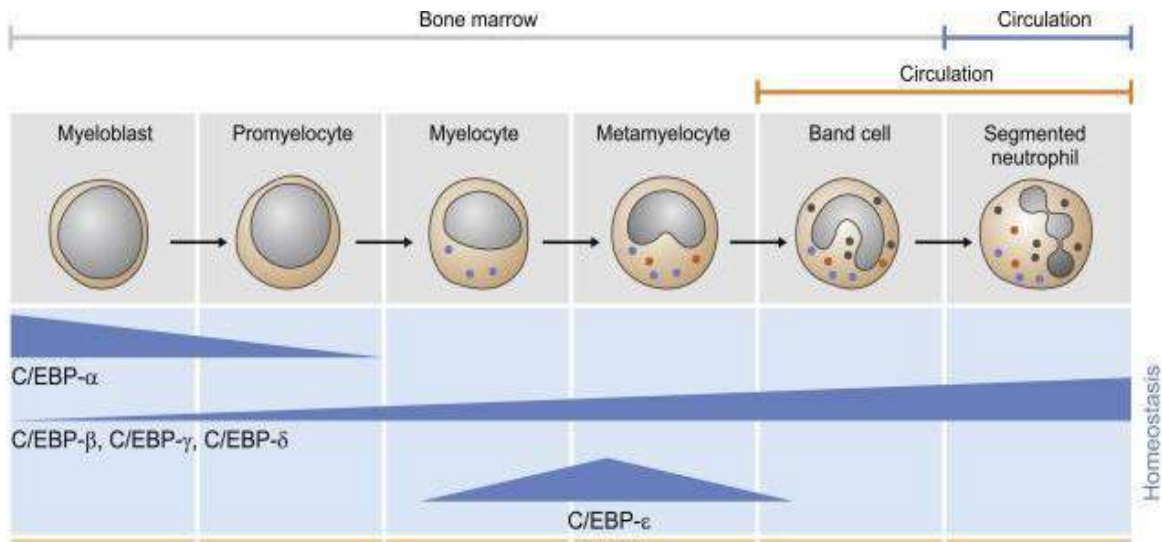
Le principal régulateur de la granulopoïèse physiologique est le facteur de croissance hématopoïétique spécifique de la lignée granulocytaire (G-CSF) (Richards et al., 2003). Chez l'homme, une mutation du récepteur du G-CSF provoque une neutropénie sévère (Sinha et al., 2003), alors que des souris dépourvues de G-CSF, ou de son récepteur, sont presque totalement dépourvues de neutrophiles (Lieschke et al., 1994; Liu et al., 1996). Cependant, certains PNN se développent encore en l'absence de G-CSF, démontrant que d'autres cytokines, y compris le facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et l'IL-6, peuvent partiellement compenser la perte de G-CSF (Liu et al., 1997; Seymour et al., 1997).

Sous le contrôle du G-CSF, les progéniteurs granulocytaires s'engagent dans la génération des PNN en se transformant en myéloblastes. Comme illustré en **Figure 22**, ces cellules suivent ensuite un processus de maturation qui comprend les stades de promyélocytes, de myélocytes,



de métamyélocytes, de cellules en bandes et enfin de PNN matures (Vietinghoff and Ley, 2008). Ce processus prend environ 2 semaines à l'état d'équilibre (Sollberger et al., 2018).

Au cours de la différenciation, les PNN en développement subissent des changements dans la morphologie de leur noyau passant d'un noyau rond en une morphologie en bandes puis en lobules, ainsi que dans l'expression de divers récepteurs. Par exemple, l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  (VLA4) et le récepteur de chimiokine CXC4 (CXCR4) sont moins exprimés, tandis que CXCR2 et le TLR4 sont régulés positivement (Rosales, 2018).



**Figure 22 : Granulopoïèse des PNN (Sollberger et al., 2018)**

*C/EBP* : Facteur de transcription "CCAAT/enhancer-binding proteins".

Au stade promyélocyte, les précurseurs des PNN cessent de se diviser, quittent le cycle cellulaire et se différencient en cellules non cycliques différenciées en phase terminale. Au cours de la différenciation terminale, les PNN acquièrent leurs granules caractéristiques qui stockent des protéines spécifiques pertinentes à leurs fonctions (Häger et al., 2010). Ces granules sont formés à des stades de différenciation particuliers. Les granules primaires (azurophiles) se trouvent au stade myéloblaste et promyélocyte. Les granules secondaires (spécifiques) sont détectés au stade myélocyte et métamyélocyte. Les granules tertiaires (gélatinase) sont trouvés au stade des cellules à bande. Enfin, les vésicules sécrétoires sont détectées uniquement dans les PNN matures (segmentés). Ces granules stockent un arsenal d'enzymes antimicrobiennes, y compris la neutrophile élastase (NE), la myéloperoxydase (MPO), les cathélicidines (LL-37), les défensines et les MMP, qui sont utilisées pour détruire les agents pathogènes envahissants (Rosales, 2018).

Différents facteurs physiologiques et environnementaux régulent la granulopoïèse. Dans les tissus périphériques, une boucle de rétroaction existe dans laquelle la phagocytose macrophagique des PNN apoptotiques amortit la production d'IL-23/IL-17, et par la suite de G-CSF, conduisant à moins de granulopoïèse. Un manque de PNN dans la périphérie stimule par conséquent la production de PNN dans la moelle osseuse via l'IL-23/IL-17 et G-CSF (Stark et al., 2005). Dans la circulation, le nombre de PNN fluctue dans un rythme circadien, entrant dans la circulation sanguine pendant la période active de l'animal et revenant à la moelle osseuse vers la période de repos (Sollberger et al., 2018).

Les PNN âgés ou activés sous expriment le marqueur de surface CD62L et régulent positivement CXCR4, favorisant le retour à la moelle osseuse. Là, les MΦ phagocytent les PNN anciens, déclenchant la libération de cellules fraîchement matures (Casanova-Acebes et al., 2013). En outre, le microbiote est important dans le développement des PNN. Les signaux microbiens qui agissent via l'axe TLR4/TRIF, initient la granulopoïèse. Par conséquent, les souris sans germes ("Germ-free mice") sont sévèrement neutropéniques (Bugl et al., 2013), encore plus que les souris déficientes en G-CSF.

### ***(b) Sortie des PNN de la moelle osseuse***

Une fois que les PNN arrivent à maturité, ils peuvent quitter la moelle osseuse vers la circulation. La libération de PNN est étroitement contrôlée puisque seulement 1 à 2% de tous les PNN dans le corps sont trouvés dans le sang dans des conditions homéostatiques normales. Les PNN matures sont conservés dans la moelle osseuse par l'action de deux récepteurs de chimiokines, CXCR2 et CXCR4. Le G-CSF induit la sortie des PNN de la moelle osseuse en interférant avec l'interaction CXCR4-CXCL12 (Summers et al., 2010). En outre, les ligands de CXCR2, tels que CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8 (chez l'homme) sont exprimés par les cellules endothéliales à l'extérieur de la moelle osseuse lorsque les PNN doivent être mobilisés dans le sang (Eash et al., 2010). Le G-CSF provoque la libération de PNN en induisant une régulation positive des ligands du CXCR2 sur les mégacaryocytes (Köhler et al., 2011), une réduction de l'expression de CXCL12 par les cellules stromales de la moelle osseuse et une réduction de l'expression de CXCR4 sur les PNN eux-mêmes (Kim et al., 2006).

En dehors de la moelle osseuse, la production de PNN est également régulée par un réseau de cytokines impliquant l'IL-23 produite par les phagocytes et l'IL-17 produite par les LT. Dans ce mécanisme, les MΦ et les DC phagocytent les PNN apoptotiques (Gordy et al., 2011; Jiao et al., 2014) conduisant à une réduction de l'IL-23 (Stark et al., 2005), qui contrôle l'expression de l'IL-17 par les LT (Gaffen et al., 2014). Parce que l'IL-17 favorise la

granulopoïèse et la libération de PNN par la régulation positive du G-CSF (Vietinghoff and Ley, 2008), les faibles niveaux d'IL-17 entraînent alors une expression réduite du G-CSF et une libération en régime permanent des PNN. Pendant l'inflammation, l'IL-1 peut également stimuler la production de PNN à travers l'axe IL-17/G-CSF (Ueda et al., 2009) et les PNN eux-mêmes créent une boucle positive pour leur propre recrutement. Les PNN peuvent produire de l'IL-8, une importante chimiokine impliquée dans leur recrutement, de l'IL-17 (Eskan et al., 2012), et attirer des LT produisant de l'IL-17 (cellules Th17) (Weaver et al., 2013). À leur tour, les cellules Th17 recrutent plus de PNN (Pelletier et al., 2010; Zenobia and Hajishengallis, 2015).

### *(c) Migration vers les tissus endommagés*

Après avoir été libérés dans le sang depuis la moelle osseuse, les PNN patrouillent dans la circulation jusqu'à ce qu'ils rencontrent des signaux inflammatoires. Les premiers signaux responsables du recrutement et/ou activation précoce des PNN sont libérés des cellules endommagées et nécrotiques après une lésion tissulaire et sont probablement des DAMP (Pittman and Kubes, 2013), comprenant l'ADN, les histones, l'HMGB1, l'ATP, l'IL-1 $\alpha$  et bien d'autres (Chen and Nuñez, 2010).

Ainsi les PNN adhèrent aux parois vasculaires impliquant l'interaction des sélectines des cellules endothéliales aux intégrines portées par les PNN, puis migrent dans les tissus en remontant le gradient de chimioattractants jusqu'à leur lieu d'action.

La majorité des DAMP peuvent agir comme chimioattractants et sont détectés par les PNN souvent à travers leurs récepteurs couplés aux protéines G et les TLR (Wang, 2018).

Par ailleurs, les DAMP libérés par les cellules endommagées peuvent activer les tissus environnants et induire la production de chimiokines et de médiateurs lipidiques, par exemple CXCL8 et LTB4 (Lämmermann et al., 2013) ; les deux sont de puissants inducteurs de la chimiotaxie des PNN. Une fois libérée par les cellules immunitaires (PNN, M $\Phi$  et LT) et non-immunitaires (cellules épithéliales et endothéliales) en réponse à une blessure ou une infection, CXCL8 peut se lier aux glycosaminoglycanes sur les parois cellulaires et dans la matrice extracellulaire pour créer des gradients de chimiokines tout au long des tissus à travers lesquels les PNN migrent (Webb et al., 1993).

Les DAMP qui sont libérés des cellules endommagées activent la production de ces chimiokines et des médiateurs lipidiques à travers plusieurs mécanismes différents. Par exemple, les DAMP peuvent activer les cellules endothéliales pour libérer les réserves pré-

fabriquées de chimiokines via l'exocytose, ils peuvent également activer des voies transcriptionnelles, telles que celle du NF- $\kappa$ B.

L'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par l'ATP a été associée au recrutement des PNN, vraisemblablement par la libération de molécules d'IL-1 (Rider et al., 2011). L'IL-1 $\alpha$  a été décrite comme étant un DAMP impliqué dans l'initiation d'une inflammation stérile et le recrutement des PNN. Comme démontré par Chen et Nunez, l'IL-1 $\alpha$  libérée par les cellules nécrotiques permet la production de CXCL1, ligand impliqué dans le recrutement de ces leucocytes (Chen and Nuñez, 2010).

#### ***(d) Clairance des PNN***

Afin d'exercer son activité anti-infectieuse tout en évitant la survenue de lésions tissulaires secondaires, le PNN doit être soumis à une régulation fine et précise par apoptose. En sachant que de toutes les cellules du système immunitaire, ce sont les PNN qui possèdent la durée de vie la plus courte. Ces courtes durées de vie s'expliquent par le fait que ces granulocytes circulants rentrent en apoptose spontanément dès leur libération dans la circulation sanguine (ou même déjà avant) sans recevoir de signal extérieur pour être ensuite phagocytés par les M $\Phi$  (Savill et al., 1989). Cette mort constitutive constitue la grande spécificité des PNN par rapport aux autres types cellulaires. La survie des PNN peut être contrôlée par différents médiateurs tels que le PCNA ("Proliferating cell nuclear antigen"), un facteur nucléaire impliqué dans la réplication de l'ADN (Witko-Sarsat et al., 2010).

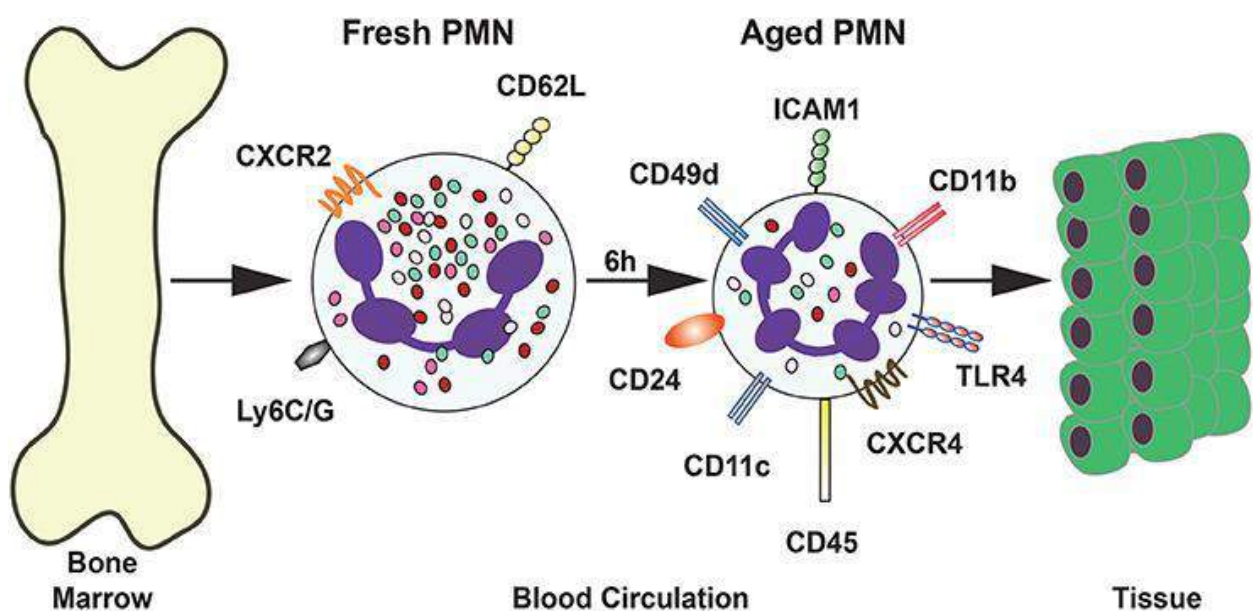
La durée de leur survie dans les tissus n'est pas précisément connue car cela dépend surtout de l'environnement local dans lequel ils se trouvent et de la balance entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques présents dans cet environnement. *In vitro*, les granulocytes peuvent être maintenus en vie plusieurs jours en les exposant à diverses cytokines et on peut supposer que des temps de survie similaires peuvent être observés quand ils sont exposés à des agents identiques dans les tissus (Haslett et al., 1994; Lee and Haslett, 1994; Steinbach et al., 1979; Yousefi et al., 1997).

Les PNN apoptotiques sont incapables de réaliser leurs activités habituelles comme la chimiotaxie, la dégranulation, l'adhérence, la phagocytose et l'activation de l'explosion oxydative (poussée respiratoire) (Gasmi et al., 1996; Haslett et al., 1994; Stringer et al., 1996).

Ces cellules fonctionnellement inertes expriment des récepteurs de surface cellulaire qui permettent leur reconnaissance et leur phagocytose par les M $\Phi$  et d'autres cellules phagocytaires (Savill et al., 1989), comme illustré en ***Figure 23***. Cette méthode d'élimination des PNN apoptotiques des sites inflammatoires empêche la libération de produits cytotoxiques

dans l'environnement tissulaire (et les dommages tissulaires conséquents) qui autrement se produirait si elles mourraient par nécrose, cette dernière étant pro-inflammatoire. L'apoptose efficace des PNN et leur élimination sûre par les cellules phagocytaires sont donc essentielles pour la résolution de l'inflammation. Cette dernière fait intervenir également des médiateurs comme la résolvine (Serhan et al., 2008).

Cependant, une apoptose inefficace des PNN est souvent associée à des maladies inflammatoires. L'augmentation de la survie des PNN dans les tissus enflammés prolonge la libération de cytokines immunorégulatrices, de chimiokines et de produits cytotoxiques dérivés des PNN entraînant une inflammation persistante. De plus, les PNN apoptotiques expriment des auto-Ag à leur surface (Casciola-Rosen et al., 1994) et des défauts dans la clairance des PNN apoptotiques aboutissant à une nécrose secondaire et peuvent donc également conduire à la production d'auto-Ac (Wright et al., 2014).



***Figure 23 : Phénotype des PNN en fonction du temps chez la souris (Rosales, 2018)***

*CD* : Cluster de différenciation, *CXCR* : Récepteur de chimiokine, *PMN* : Neutrophiles, *TLR* : Récepteur de type Toll.

Lors de la libération de la moelle osseuse, un neutrophile ("Fresh PMN") exprime les molécules de surface CD62L et CXCR2. Après plusieurs heures (4-6 h) dans la circulation, les neutrophiles changent l'expression de nombreuses molécules de surface ("Aged PMN"), comme CXCR4. Ces neutrophiles âgés sont ensuite éliminés du sang par migration dans les tissus ou par retour dans la moelle osseuse.

### *(e) Migration inverse*

Dans le cas de la résolution de l'inflammation après une agression, il est nécessaire de prévoir une clairance des PNN (Soehnlein and Lindbom, 2010) qui se produit généralement par apoptose ou nécrose puis phagocytose par les MΦ (Buckley et al., 2013). Cependant, certaines données suggèrent que les PNN sur les sites enflammés ne subissent pas nécessairement de mort cellulaire et qu'il existerait une sous-population de PNN ayant un phénotype particulier ( $CD54^{\text{high}} CXCR1^{\text{low}}$ ) de migrer à travers la couche endothéliale puis à revenir à la circulation (Buckley et al., 2006).

Hughes et al. ont montré grâce à un modèle de lésion capillaire glomérulaire chez le rat que plus de 70% des PNN qui sont entrés dans les capillaires glomérulaires enflammés ont pu retourner dans la circulation principale et n'ont pas subi d'apoptose au site de l'inflammation (Hughes et al., 1997).

Ce processus par lequel les PNN quittent le site de lésions tissulaires, loin de l'inflammation, porte le nom de migration inverse des PNN, phénomène qui a été visualisé pour la première fois *in vivo* chez des larves de poisson zèbre (Mathias Jonathan R. et al., 2006).

Hamza et al. ont montré que plus de 90% des PNN humains peuvent inverser leur direction en s'éloignant d'un agent chimio-attractif et migrer continuellement à l'opposé à une distance de plus de 1000µm (Hamza et al., 2014).

Ces données permettent de suggérer que la migration inverse est un mécanisme possible pour résoudre localement l'inflammation et une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le cas de maladies caractérisées par une infiltration excessive de PNN.

De plus, il est à noter que les stimuli qui déclenchent cette migration inversée restent largement inconnus mais plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'expliquer, y compris une compétition entre les sources de chimioattractants au niveau de la plaie et/ou de la vascularisation, une possible libération de signaux chimiorépulsants au niveau de la plaie pour favoriser le mouvement inverse des PNN, une régulation négative de l'expression de récepteurs aux chimiokines ou au contraire une désensibilisation de ces récepteurs (de Oliveira et al., 2016; Starnes and Huttenlocher, 2012).

Cependant, une mise en garde est à noter car la migration inverse des PNN peut conduire à la redistribution des PNN activés à d'autres endroits dans le corps, contribuant à l'inflammation ailleurs. Il est également important de noter que de nombreux aspects de la migration inverse

des PNN restent controversés, y compris le (s) mécanisme (s) exact (s) et le devenir des cellules inversés.

### *(f) Hétérogénéité des neutrophiles*

Un système immunitaire idéal montre des réponses spécifiques contre tous les événements pathogènes qui mettent en danger l'hôte, ce qui nécessite de la complexité et de la plasticité. Dans ce cas, le système immunitaire adaptatif possède des cellules immunitaires qui se multiplient par clonage lors de la reconnaissance de l'Ag et se développent en différents sous-ensembles en fonction des signaux environnementaux. En revanche, différents sous-ensembles préexistants de cellules immunitaires innées. Par exemple, les MΦ réagissent différemment aux signaux en fonction de leur origine ou du tissu dans lequel ils résident (Okabe and Medzhitov, 2016). Les PNN, en tant que cellules à différenciation terminale et à courte durée de vie, ne peuvent pas se multiplier clonalement ou se différencier davantage en réponse à des signaux de danger, mais il existe cependant différentes populations de PNN résidants dans les tissus.

Ainsi, on retrouve des PNN mobilisés dans le poumon lors d'infections (Devi et al., 2013), des PNN qui résident également dans les tissus lymphoïdes (Beauvillain et al., 2011; Nauseef and Borregaard, 2014) et même dans la rate où deux populations sont distinguées : une population mobile mature qui analyse le tissu et une population immobile immature, qui prolifère lors de l'infection et génère des cellules matures mobiles (Deniset et al., 2017). En outre, le microenvironnement dans différents tissus permet aux PNN d'acquérir des fonctions spécialisées. De plus, les PNN peuvent quitter le site inflammatoire et réintégrer la circulation, ce qui modifie leurs propriétés (Mathias Jonathan R. et al., 2006).

En condition physiologique, une sous-population est capable d'aider les LB à produire des Ac via la sécrétion de BAFF (Puga et al., 2012) alors qu'une autre est caractérisée par l'expression d'un TCR (Puellmann et al., 2006). De plus, au laboratoire nous avons montré qu'une sous-population de PNN sécrète de l'IFN- $\alpha$  (Lindau et al., 2014).

Plusieurs sous populations ont été décrites en association à différentes pathologies. La sous-population de PNN la mieux décrite est la population des granulocytes de faible densité (LDG) qui a d'abord été observée chez des patients atteints de LES (Hacbarth and Kajdacsy-Balla, 1986). Les LDG ont la morphologie d'un PNN mais se retrouvent avec la fraction de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) pendant la centrifugation par densité, comme illustré en **Figure 24**. Les LDG pourraient être des PNN matures «semblables à des cellules en bande» partiellement dégranulées ou immatures qui ont quitté la moelle osseuse en

réponse à des niveaux élevés de cytokines. Il est intéressant de noter que les LDG des patients atteints de LES forment spontanément des NET *in vitro* (Villanueva et al., 2011).

De nombreuses études rapportent des différences dans les marqueurs de surface dans les sous-populations de PNN. Les exemples incluent le CD62L, qui est éliminé par les PNN âgés et lors de l'activation (Casanova-Acebes et al., 2013; Zhang et al., 2015a). Récemment, le CD10 est apparu comme un marqueur de surface qui fait la distinction entre les LDG matures (CD10 positifs) et immatures (CD10 négatifs) trouvées chez les individus ayant reçu une injection de G-CSF. En outre, les cellules exprimant CD10 suppriment les cellules T contrairement aux cellules négatives pour CD10 (Marini et al., 2017).

Dans le cas de cancer, il a été rapporté que le nombre de PNN en circulation augmente, et le phénotype de ces cellules change le long de la progression tumorale. D'ailleurs dans les cancers à des stades avancés, plusieurs sous-populations de PNN circulants présentant différentes caractéristiques de maturité, de cytotoxicité tumorale et de suppression immunitaire ont été décrites (Sagiv et al., 2015), y compris les cellules suppressives dérivées des myéloïdes granulocytaires (G-MDSC). Cependant, ces différents types de cellules ne sont pas clairement définis et leur existence est aujourd'hui un sujet controversé.

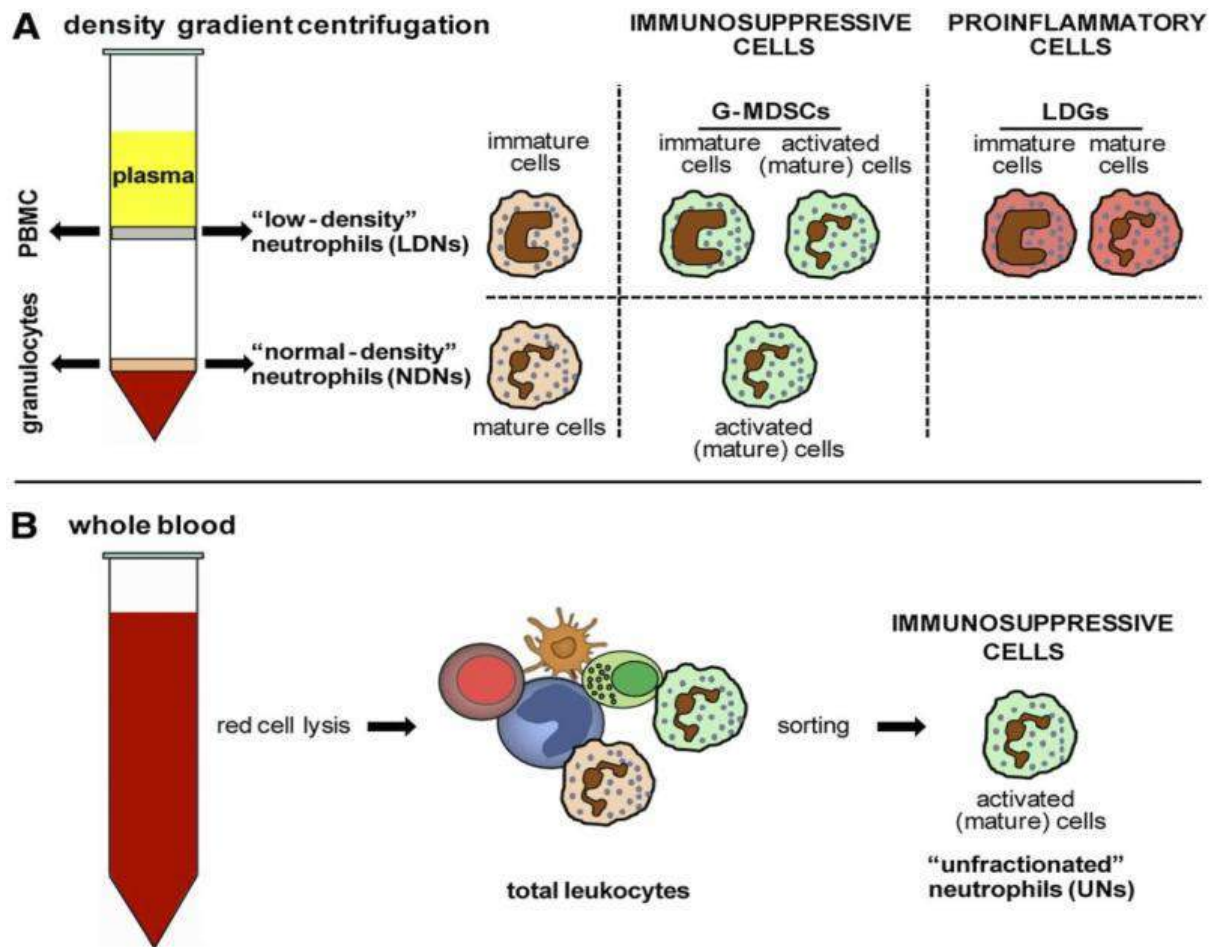
Dans leur étude, Fridlender et ses collègues ont montré que les PNN dans les tumeurs pouvaient être divisés en deux sous-groupes distincts basés sur leurs fonctions pro- et anti-tumorales, ainsi que leur expression et leur morphologie (Fridlender et al., 2009). Ils les ont nommés N1 et N2 en référence aux macrophages «M1» et «M2» (Mills et Ley 2014), et ont démontré que la polarisation en sous-population anti-tumorale N1 et pro-tumoral N2 est influencé par l'IFN- $\gamma$  et le TGF- $\beta$ , respectivement (Andzinski et al., 2016; Jablonska et al., 2010).

Les PNN anti-tumoraux associés aux tumeurs (TAN) N1 sont caractérisés par une production élevée de cytokines pro-inflammatoires, un noyau hypersegmenté et de grandes capacités de destruction des cellules tumorales, tandis que le sous-type N2 est caractérisé par une teneur accrue en arginase, une morphologie immature et présente une fonction de promotion des tumeurs (Fridlender et al., 2009). L'analyse transcriptomique de ces sous-groupes par rapport à la population MDSC et aux PNN naïfs (isolés de souris sans tumeur) a montré qu'il s'agissait bien de trois sous-ensembles distincts (Fridlender et al., 2012), mais la possibilité qu'elles aient le même progéniteur commun n'est pas exclu. En sachant que bon nombre des propriétés attribuées aux TAN, telles que la production élevée d'arginase 1, sont également attribuées aux MDSC ; par conséquent, il peut s'agir uniquement de variants du même type de cellules activés différenciellement (Gregory and Houghton, 2011).



À l'exception des LDG, la capacité des sous-populations de PNN à faire des NET est peu étudiée. Tandis que la transmigration des PNN à travers l'endothélium augmente la formation de NET, ceci est probablement dû à l'activation plutôt qu'à l'action d'une sous-population distincte (Allen et al., 2012). Yipp et al. ont montré dans un modèle murin d'infection bactérienne, que les PNN mobilisés libèrent des NET sans pour autant mourir après NETose (Yipp et al., 2012), ce qui soulève la question de savoir s'il s'agit d'une sous-population de PNN particulière sujette à la NETose. Notamment, dans des conditions inflammatoires, les PNN âgés libèrent plus facilement les NET, ce qui est régulé par le microbiote via l'axe TLR/MyD88 (Zhang et al., 2015a). En utilisant le marquage à la 5-bromo-2'-deoxyuridine pour déterminer l'âge des PNN, une étude a montré que les cellules âgées infiltraient les sites inflammatoires plus tôt et étaient plus phagocytaires que les cellules plus jeunes *in vivo* (Uhl et al., 2016). Cependant, leur capacité à faire des NET reste à déterminer. Le vieillissement des PNN est corrélé à une faible expression de CD62L, et les PNN CD16<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> sont associés à un meilleur pronostic chez les patients atteints de carcinomes épidermoïdes (Millrud Camilla Rydberg et al., 2017). Une autre sous-population de PNN humains exprime l'olfactoméline-4 (OLFM4), une protéine dans les granules spécifiques (Clemmensen Stine N. et al., 2011). Ainsi, en fonction de son expression, les PNN forment des NET positifs ou négatifs pour l'OLFM4 (Welin et al., 2013). L'expression de l'OLFM4 par les PNN favorise l'auto-immunité via la reconnaissance par des auto-Ac anti-OLFM4 et corrèle avec un mauvais pronostic lors du choc septique (Alder et al., 2017; Amirbeagi Firoozeh et al., 2014), bien que le rôle des NET dans ces conditions ne soit pas encore connu.

En résumé, les PNN sont plus hétérogènes que prévu. On ne sait pas si cette hétérogénéité reflète des états d'activation différents ou de vraies sous-populations. La capacité des sous-ensembles de PNN à exécuter des comportements typiques des PNN, par exemple, la phagocytose, la dégranulation ou la formation de NET, devra être analysée. Comme les NET peuvent être à la fois bénéfiques et pathogènes, il serait important d'examiner si certaines sous-populations peuvent être ciblées pour inhiber les effets néfastes des NET tout en laissant intactes leurs propriétés bénéfiques.



**Figure 24 : Sous populations de PNN dans le sang périphérique (Scapini and Cassatella, 2014)**

**G-MDSC** : "Granulocytic myeloid-derived suppressor cells", **LDG** : " Low density granulocytes", **PBMC** : Cellules mononucléées du sang périphérique.

Les neutrophiles matures provenant de donneurs sains, après centrifugation du sang sur des gradients de densité, se déposent typiquement sur les globules rouges (désignés arbitrairement par NDN dans A). En revanche, les neutrophiles immatures, ainsi que les neutrophiles matures activés *in vivo* dans des conditions inflammatoires, présentent des propriétés de flottabilité cellulaire altérées et donc se retrouvent dans la fraction de cellules mononucléaires (arbitrairement indiqué comme LDN dans A).

Selon la littérature, LDN peuvent inclure (1) les neutrophiles immatures trouvés chez les patients atteints de sepsis; (2) des sous-ensembles de neutrophiles immunosuppresseurs, également connus sous le nom de G-MDSC, trouvés chez des patients cancéreux et infectés par le VIH ou chez des donneurs traités au G-CSF et présentant des phénotypes immatures ou activés; et (3) des sous-ensembles de neutrophiles pro-inflammatoires trouvés chez des patients atteints de maladies auto-immunes, appelés LDG ("Low density granulocytes") et consistant en une population mixte de cellules immatures et matures.

Des sous-ensembles de neutrophiles circulants, présentant des propriétés immunosuppresseurs, ont été identifiés parmi les leucocytes totaux (obtenus après lyse des globules rouges) chez des donneurs sains à qui on a administré des endotoxines ou chez des patients avec une blessure grave, un cancer ou une infection par le VIH (indiqué arbitrairement comme UN dans B).

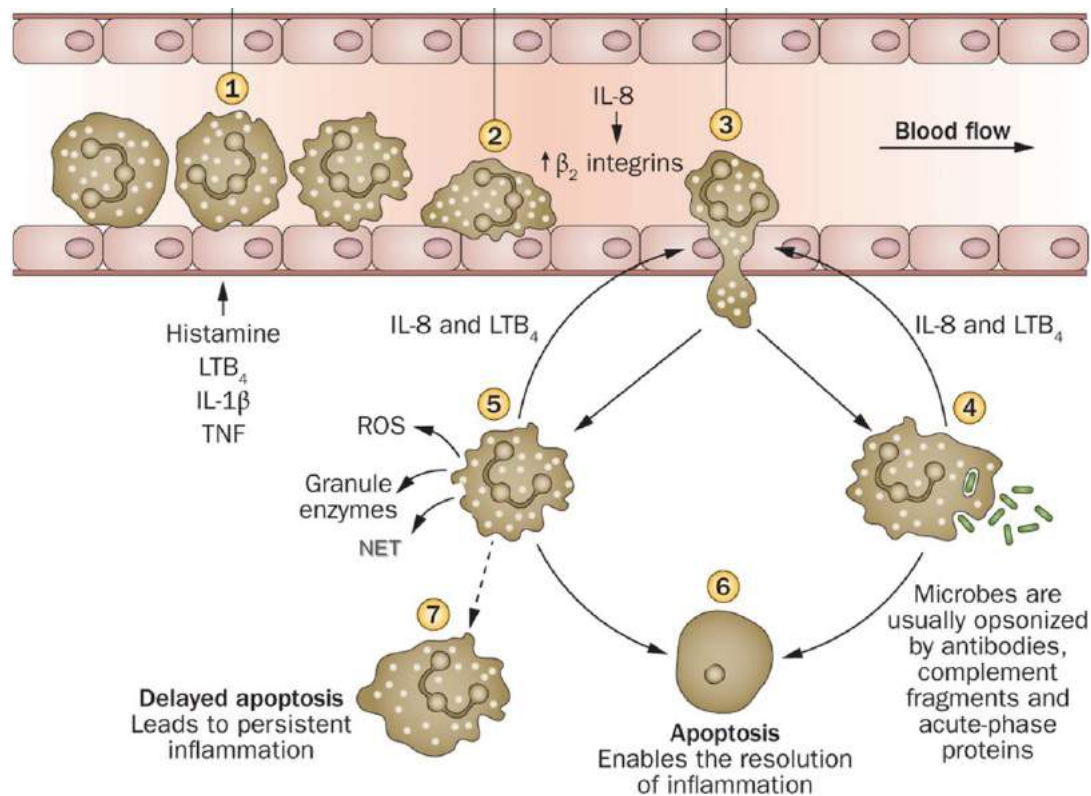
### ***(g) Modes d'action des PNN***

Les PNN représentent environ 60% de tous les leucocytes dans la circulation, et sont les premières cellules recrutées sur les sites d'infection ou d'inflammation (Wright et al., 2014). L'activation des PNN est généralement un processus à plusieurs étapes. Cela commence par l'activation partielle des cellules lors de leur passage à travers l'endothélium vasculaire au cours du processus de recrutement. Après l'entrée dans le tissu inflammatoire, en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, les PNN deviennent complètement activés. Cet état d'activation est caractérisé par la libération de protéines granulaires, l'acquisition de capacités phagocytaires et la production de NET (Mayadas et al., 2014), comme illustré en ***Figure 25***.

Les PNN sont relativement insensibles à un seul stimulus, mais l'exposition à un seul stimulus tel que le LPS ou le TNF améliore la capacité de ces cellules à réagir à un second stimulus (Doerfler et al., 1989; Nathan, 1989). Cet effet, appelé "priming" des PNN, permet une activation rapide et maximale de la cellule, y compris une phagocytose accrue et une génération de ROS (Nathan, 1989; Pitrak, 1997).

### **(i) Activation des PNN**

Les PNN reconnaissent les agents pathogènes via des récepteurs membranaires et/ou intracellulaires qui se lient à des molécules spécifiques sur ceux-ci. Ainsi, ce contact PNN-pathogène est facilité par les opsonines dont il existe deux grandes catégories : les Ig et les molécules du système du complément (C3b et C1q) (Vidarsson and Winkel, 1998). Les récepteurs qui reconnaissent les opsonines induisent des signaux intracellulaires qui conduisent à une capacité totale de destruction des agents pathogènes. L'amplitude, la qualité et la durée de la réponse déclenchées sont dictées par le répertoire de récepteurs engagés à un moment donné, qui à son tour définit le statut d'activation du PNN (Mayadas et al., 2014).



**Figure 25 : Mécanismes d'action des PNN au site d'inflammation (adapté de (Wright et al., 2014))**

**IL** : Interleukine, **LTB** : Leucotriène B, **NET** : "Neutrophil Extracellular Traps", **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène, **TNF** : Facteur de nécrose tumorale.

(1) Le roulement des neutrophiles le long de l'endothélium vasculaire implique des interactions transitoires entre les sélectines sur les cellules endothéliales et les neutrophiles. L'expression des sélectines sur les cellules endothéliales est régulée positivement par les médiateurs inflammatoires. (2) Les facteurs chimiotactiques favorisent l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales, médiée par l'expression accrue des intégrines β<sub>2</sub> et l'excrétion de la L-sélectine, qui se produit dans les minutes suivant l'activation des neutrophiles. (3) La migration des neutrophiles est médiée par la liaison aux protéines endothéliales qui ciblent les neutrophiles aux jonctions intercellulaires et facilitent leur passage à travers elles. (4) Les neutrophiles transmigrés phagocytent et tuent les microbes. Les neutrophiles activés génèrent également des agents chimioattractifs (tels que IL-8 et LTB<sub>4</sub>) qui favorisent un recrutement plus important des neutrophiles et amplifient la réponse inflammatoire aiguë. (5) L'activation des neutrophiles par des complexes immuns solubles induit la libération d'enzymes de granules, de ROS mais aussi de NET. Une apoptose du neutrophile est nécessaire pour la résolution de l'inflammation. (6) Les neutrophiles apoptotiques sont non fonctionnels et expriment des molécules de surface pour leur permettre d'être reconnus et éliminés par les macrophages et les autres cellules phagocytaires. (7) L'apoptose retardée entraîne une inflammation persistante et des lésions tissulaires, en raison de la libération continue de ROS, d'enzymes granulaires et de cytokines.

## 1. Récepteurs opsoniques

Les opsonines classiques, les IgG et, le C3b et le C1q, les produits d'activation du complément ; sont essentiels pour la neutralisation des agents pathogènes par les PNN ; la réponse des PNN vis-à-vis de nombreux types de pathogènes est inefficace en leur absence.

Dans le contexte de l'inflammation stérile, comme dans les maladies auto-immunes, l'accumulation tissulaire de ces opsonines est un déclencheur majeur des lésions tissulaires induites par les PNN. La reconnaissance de pathogènes opsonisés par le complément et/ou les IgG conduit à une absorption rapide du microbe et à une forte stimulation des mécanismes de destruction des PNN (Mayadas et al., 2014).

Les PNN au repos expriment deux types de récepteurs du complément, CR3 et CR4, qui reconnaissent les cibles opsonisées par le produit d'activation du complément C3bi (Schymeinsky et al., 2007). Pendant l'activation des PNN, l'expression du CR1 à leur surface augmente (Changelian et al., 1985).

Ces protéines du complément dérivées du C3 proviennent de l'activation du complément, soit par la voie classique médiée par la liaison d'anticorps IgG ou IgM sur la cible, soit par la voie alterne activée en particulier par les surfaces des microorganismes ou par les endotoxines des bactéries Gram négatif, ou encore par la voie des lectines. Cette activation génère ainsi des fractions C3b, C3bi qui ont pour récepteurs CR1, CR3 et CR4.

Les Ig sont des opsonines thermostables et spécifiques. Ils se fixent de façon spécifique sur des Ag à la surface des microorganismes. Les PNN expriment à la fois des récepteurs de faible et de haute affinité pour la partie Fc de l'IgG, appelés FcγR (Bruhns, 2012). Les PNN humains au repos expriment le FcγRIIA (CD32) et le FcγRIIIB (CD16), qui ont une faible affinité pour les IgG monomériques mais une forte affinité pour les CI, tandis que les PNN activés surexpriment le FcγRI (CD64), qui a une haute affinité pour les IgG. La fixation des particules opsonisées par une Ig sur son récepteur, déclenche une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la phosphorylation des régions cytoplasmiques de ce récepteur par des tyrosines kinases puis à l'activation du récepteur ITAM ("Immunoreceptor tyrosine based activation motif") et à la phagocytose (Christoffersson and Phillipson, 2018).

Les récepteurs FcγRIII ne possèdent pas de région transmembranaire, pourtant l'activation de ce récepteur induit la polymérisation de l'actine, événement pré-requis dans les phénomènes de phagocytose. D'autre part, l'activation de ce récepteur aboutit à la génération de dérivés oxygénés et à la libération des granules des PNN (Boros et al., 1991; Nagaji, 1999). Ce mécanisme aurait pour conséquence d'augmenter l'avidité et l'efficacité des récepteurs FcγRII

(Burg and Pillinger, 2001). En plus de ces récepteurs activateurs, les PNN expriment le FcγRIIB qui lui est inhibiteur (Su et al., 2007).

En 1998, Caron et Hall ont montré que, contrairement au fragment C3b, la fixation des Ig sur leur récepteur générerait la production d'anions superoxydes, mettant ainsi en évidence des cascades de signalisation différentes (Caron and Hall, 1998).

D'autres molécules peuvent également établir des liens entre le PNN et la cible microbienne, notamment certains facteurs sériques comme la CRP, le SAP et le fibronectine (Benna et al., 1997). Ces facteurs sériques font partie des pentraxines, une famille de PRR sécrétés, représentant un 3<sup>ème</sup> type majeur d'opsonine qui engage à la fois les FcγR et les CR. La CRP et la protéine sérum amyloïde P (SAP), sont tous deux produits dans le foie lors de l'inflammation, et peuvent opsoniser les pathogènes microbiens grâce à la reconnaissance des PAMP. L'association de CRP ou SAP avec un microbe induit une activation rapide du complément, facilitant la reconnaissance du pathogène par les CR des PNN. De plus, ces deux protéines sont reconnues directement par le FcγR pour induire l'activation des PNN (Lu et al., 2012).

## 2. Autres récepteurs

Les PAMP, par exemple le LPS, l'acide peptidoglycane et lipotéichoïque, l'ARN viral et l'ADN bactérien sont reconnus par les PRR des PNN. Beaucoup de ces récepteurs sont également engagés par des DAMP qui sont libérés par des cellules nécrotiques, comme HMGB1 et l'ADN mitochondrial pendant une inflammation stérile comme dans les brûlures ou l'hypoxie (Kolaczowska and Kubes, 2013).

Sur les PNN, les PRR phagocytaires sont les récepteurs de la lectine de type C (CLR), le plus important étant la dectine-1, qui reconnaît le β-glucane fongique. La dectine-1, avec l'intégrine Mac-1, internalise et élimine les pathogènes fongiques (Kennedy Adam D. et al., 2007; Li et al., 2011a). L'expression de TREM-1 ("Triggering receptor expressed on myeloid cells"), un autre récepteur endocytaire qui se lie à divers agents pathogènes (Ford and McVicar, 2009), est augmentée par des stimuli bactériens et fongiques et est fortement surexprimé sur les PNN péritonéaux des patients atteints de septicémie microbienne.

Il existe des PRR mais non phagocytaire sur les PNN, parmi eux on distingue les TLR, qui reconnaissent les lipides, les peptides, les ADN et les ARN simple et double brin (Trinchieri and Sher, 2007). Au niveau de l'ARN, les PNN expriment TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 et 10 (et, après traitement par GM-CSF, le TLR9) (Hayashi et al., 2003). L'engagement des TLR "prime" les PNN pour améliorer la réponse à d'autres stimuli, augmentant ainsi leur capacité

phagocytaire, stimulant l'augmentation de la libération de cytokines et ralentissant l'apoptose des PNN (Parker et al., 2005). D'autres PRR comprennent les capteurs microbiens cytosoliques NOD1 et NOD2, qui reconnaissent respectivement les molécules apparentées aux peptidoglycanes des bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Kanneganti et al., 2007). Les PNN expriment NOD2 qui, lorsqu'il reconnaît le protéoglycane, peut entraîner la libération d'IL-8 (Ekman and Cardell, 2010).

Les PNN expriment un large répertoire de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui reconnaissent les produits bactériens (par exemple, les peptides formyles, comme illustré en **Tableau 3**) ainsi que les molécules endogènes libérées durant l'inflammation (par exemple, les leucotriènes, les chimiokines comme l'IL-8, C5a et l'adénosine) (Barletta et al., 2012; Rabiet et al., 2007). Ces RCPG sont principalement impliqués dans le guidage de la migration des PNN. Cependant, la signalisation à travers ces récepteurs peut également “primer“ l'activation des PNN en réponse à d'autres agents d'activation ou, à une concentration suffisamment élevée, pour conduire à une activation cellulaire complète.

G-protein-coupled receptors	Fc-receptors	Adhesion receptors	Cytokine receptors	Innate immune receptors
<i>Formyl-peptide receptors</i>	<i>Fcγ-receptors</i>	<i>Selectins and selectin ligands</i>	<i>Type I cytokine receptors</i>	<i>Toll-like receptors</i>
• FPR1 (FPR)	• FcγRI	• L-selectin	• IL-4R	• TLR1
• FPR2 (FPRL1)	• FcγRIIA (human)	• PSGL-1	• IL-6R	• TLR2
• FPR3 (FPRL2)	• FcγRIIB (inhibitory)	<i>Integrins</i>	• IL-12R	• TLR4
<i>Classical chemoattractant receptors</i>	• FcγRIII (mouse)	• LFA-1 (α <sub>L</sub> β <sub>2</sub> )	• IL-15R	• TLR5
• BLT1 (LTB <sub>4</sub> -rec.)	• FcγRIII (mouse)	• Mac-1 (α <sub>M</sub> β <sub>2</sub> )	• G-CSFR	• TLR6
• BLT2 (LTB <sub>4</sub> -rec.)	• FcγRIIIB (human)	• VLA-4 (α <sub>4</sub> β <sub>1</sub> )	• GM-CSFR	• TLR7 (?)
• PAFR	• FcγRIV (mouse)		<i>Type II cytokine receptors</i>	• TLR8
• C5aR	• Fcα-receptors		• IFNAR (IFNα/β-rec.)	• TLR9
<i>Chemokine receptors</i>	• FcαRI (human)		• IFNGR	<i>C-type lectins</i>
• CXCR1 (human)	<i>Fcε-receptors</i>		• IL-10R	• Dectin-1
• CXCR2	• FcεRI		<i>IL-1R family</i>	• Mincle
• CCR1	• FcεRII		• IL-1RI	• MDL-1
• CCR2			• IL1RII (decoy)	• Mcl
			• IL-18R	• CLEC-2
			<i>TNFR family</i>	<i>NOD-like receptors</i>
			• TNFR1 (p55)	• NOD2
			• TNFR2 (p75)	• NLRP3
			• Fas	<i>RIG-like receptors</i>
			• LTβR	• RIG-I
			• RANK	• MDA5
			• TRAIL-R2	
			• TRAIL-R3	

**Tableau 3 : Récepteurs de surface des PNN (Futosi et al., 2013)**

BLT : Récepteur des leucotriènes B<sub>4</sub>, C5aR : Récepteur de l'anaphylatoxine C5a, CLEC : "C-type lectin", CXCR, CCR : Récepteur aux chimiokines, FcR : "Fc-receptor", FPR : "Formyl Peptide Receptor", G-CSF : "Granulocyte colony stimulating-factor", GM-CSF : "Granulocyte-Macrophage colony stimulating-factor", IFNAR : "Interferon-α/β Receptor", IFNGR : Interferon-γ Receptor, IL : Interleukine, LFA : "Lymphocyte Function-Associated receptor", LTβR : "Lymphotoxin β", Mac : "Macrophage antigen", Mcl : "Macrophage C-type lectin", MDA : "Melanoma Differentiation-Associated protein", MDL : "Myeloid DAP12-associating Lectin", NLRP : "NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3", NOD : "Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing protein", PAFR : "Platelet Activating Factor Receptor", PSGL : "P-selectin glycoprotein ligand", RANK : Récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B, RIG : Gène rétiné inducible, TLR : Récepteur de type Toll, TNFR : Récepteur du facteur de nécrose tumorale, TRAIL-R : "Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor", VLA : "Very Late Antigen".



## (ii) Destruction du pathogène

### 1. Phagocytose

En réponse aux infections, les PNN migrent le long des gradients chimiotactiques vers les agents pathogènes dans les tissus, et s'y lient via des récepteurs de reconnaissance de formes, tels que les TLR, ou des récepteurs opsoniques reconnaissant les pathogènes revêtus d'opsonines, comme les fragments du complément ou les Ig (Wright et al., 2014).

La phagocytose est l'un des principaux modes d'action des PNN, où ils enferment le pathogène dans une vésicule phagocytaire qui fusionne avec des granules déchargeant leur contenu dans la vésicule. En parallèle, la NADPH oxydase (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase) liée à la membrane plasmique est activée, produisant des radicaux libres d'oxygène aboutissant à des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS). Pendant ce temps les pompes à ions sont également activées sur les membranes des vésicules phagocytaires, ce qui entraîne l'afflux d'ions tels que des  $H^+$  et  $K^+$ . Les activités combinées de la NADPH oxydase, des pompes ioniques et des enzymes granulaires fournissent un environnement hautement cytotoxique dans la vésicule (Nunes Paula et al., 2013).

L'absorption, ou la phagocytose du microbe opsonisé, entoure le pathogène dans une vacuole appelée phagosome (Allen and Aderem, 1996; Nordenfelt and Tapper, 2011). La phagocytose faite par le PNN est très rapide, l'absorption de particules opsonisées par les IgG survient en moins de 20 secondes (Segal et al., 1980). L'absorption est suivie par la fusion de la vacuole phagocytaire avec des granules préformés dans la cellule pour former le phagosome, dans un processus appelé maturation phagosomale. Ces granules contiennent des enzymes hydrolytiques et des sous-unités de NADPH oxydase qui initient des mécanismes de destruction. La phagocytose dans les PNN diffère de celle des autres phagocytes professionnels tels que les  $M\Phi$ , dans lesquels l'absorption des particules et la maturation des phagosomes sont beaucoup plus lentes (Vieira et al., 2002). De plus, le phagosome des PNN est beaucoup moins acide que celui des  $M\Phi$  (Jankowski et al., 2002). Cette différence peut refléter les effets de l'explosion oxydative, qui est massive dans les PNN par rapport aux  $M\Phi$ , car lors de l'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme le pH devient plus acide chez les PNN. La maturation phagosomale efficace chez les PNN dépend également du  $Ca^{2+}$  cytosolique, alors que chez les  $M\Phi$ , la fusion entre les lysosomes et le phagosome est indépendante de ce sel minéral (Tapper et al., 2002; Zimmerli et al., 1996). La rapidité avec laquelle les PNN peuvent reconnaître, englober et tuer des pathogènes est un avantage évident en termes de défense de l'hôte.

Les travaux de Kaplan ont pu mettre en évidence une différence morphologique dans ce phénomène de phagocytose selon le mode d'opsonisation (Kaplan, 1977). En effet, lors d'une phagocytose médiée par la fixation par des Ig, des pseudopodes cellulaires englobent la particule, puis les extrémités des pseudopodes se rejoignent pour que la fusion membranaire enferme la particule dans une vacuole. Ce modèle suppose que la particule est complètement recouverte par les opsonines. Ce processus d'adhérence circonférentielle est qualifié de "Zipper model" ; schématiquement, il correspond au principe de la fermeture éclair. Par contre, si les particules possèdent des ligands sur une partie de leur surface seulement, ou bien en cas de particules trop volumineuses, la phagocytose complète n'est pas effectuée. Le PNN va déverser ses substances lytiques directement à la surface de la cible, on parle de phagocytose frustrée.

## 2. Explosion oxydative

Lorsqu'ils sont stimulés, les PNN produisent de façon extrêmement rapide des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS, RNS) qui en raison de leur grande réactivité exercent une forte activité bactéricide et fongicide. Ce phénomène est appelé explosion oxydative du PNN (Manda-Handzlik and Demkow, 2015).

Dans le cas de la génération de ROS, il s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène ( $O_2$ ), de glucose et de son catabolisme par la voie des hexoses monophosphates. Cette voie métabolique de l' $O_2$  est insensible au cyanure, et donc indépendante de la chaîne respiratoire. L' $O_2$  consommé par les PNN est converti enzymatiquement en anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par une réduction monovalente en utilisant la NADPH cellulaire provenant de la voie des hexoses monophosphates qui sert de donneur d'électrons. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique appelé NADPH oxydase (Benna et al., 1997; Morel et al., 1991).

L'assemblage d'une NADPH oxydase fonctionnelle nécessite la translocation inductible de ses composants cytosoliques, à savoir p47phox, p67phox et p40phox sur la membrane, où résident les protéines gp91phox (NOX2), gp22phox (formant le cytochrome b558) et la GTPase Rac2 (ou Rac1). Les protéines p47phox, p67phox et p40Phox, sont présents sous forme de complexe cytosolique dans le PNN au repos comme Rac-2. La translocation des composants cytoplasmiques vers la membrane et leur association avec le cytochrome b558 rendent le complexe fonctionnel ; le cytochrome transfère alors des électrons à partir de groupement NADPH, à l' $O_2$  pour créer l' $O_2^-$  (Kuijpers and Lutter, 2012).

$O_2^-$ , est un métabolite oxydant et est le premier produit issu de l'activité de la NADPH oxydase. Il va subir de nouvelles transformations enzymatiques et/ou non enzymatiques aboutissant à la production des ROS radicalaires ou non radicalaires. En plus des ROS, l' $O_2^-$

est aussi directement ou indirectement à l'origine des oxydants chlorés qui comprennent l'acide hypochloreux (HOCl : ingrédient actif de l'eau de Javel) produit par la MPO par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec le chlorure, et le péroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) formé à partir de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et du monoxyde d'azote (NO), radical produit par la NO-synthase du PNN à partir d'arginine, d'oxygène et de NADPH (Lambeth, 2004). L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la superoxyde dismutase.

HOCl est capable d'oxyder diverses molécules dont les protéines, les lipides, les glucides et le matériel génétique. Il est très toxique pour de nombreux micro-organismes, créant un milieu microbicide dans les phagosomes et l'environnement des PNN. HOCl peut également réagir avec les ions superoxydes, cette réaction aboutit à la formation de chlore moléculaire, un gaz aussi bactéricide que l'eau oxygénée, l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou le NO (Hazen et al., 1996).

NO, molécule hautement réactive de courte durée (demi-vie de quelques secondes), est produite par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), présente dans les granules primaires et induite lors du "priming" des PNN (via le TNF, l'IL-1 ou IFN- $\gamma$ ) (Evans et al., 1996) et lors d'infections bactériennes (Wheeler et al., 1997). La production de NO complète la production de ROS par les PNN ; en effet il a été observé que les souris dépourvues de NAPDH oxydase et d'iNOS (gp91phox<sup>-/-</sup> ; Nos2<sup>-/-</sup>) développent des infections spontanées provoquées par la flore commensale, alors que les souris présentant une seule de ces deux déficiences n'en ont pas (Shiloh et al., 1999).

D'autre part, une quantité excessive de radicaux libres peut avoir un effet néfaste sur les tissus de l'hôte et des marqueurs de stress oxydatif et nitrosatif sont détectables dans de nombreuses maladies. Il est nécessaire de maintenir l'équilibre entre la formation et l'élimination des ROS/RNS, car ces dernières peuvent se révéler toxiques.

### 3. Dégranulation

La dégranulation accompagne la stimulation des PNN. Une stimulation d'intensité moyenne induit une dégranulation limitée aux granules spécifiques, alors que la stimulation intense que représente la phagocytose implique également les granules azurophiles, qui contiennent la plupart des hydrolases et des polypeptides cationiques bactéricides (Xu X. and Håkansson L., 2002).

Les PNN stockent des protéinases et des peptides antimicrobiens dans des granules qui fusionnent avec le phagosome pendant l'absorption du pathogène. La fusion des granules avec la membrane plasmique, provoquant une libération extracellulaire du contenu.

La fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane plasmique conduit à la présentation des récepteurs d'adhésion et chimiotactiques qui favorisent le recrutement des PNN. La mobilisation de granules tertiaires et secondaires au cours de la transmigration peut faciliter la dégradation du collagène dans la membrane basale et donc l'élimination d'une barrière physique pour la migration des PNN (Mayadas et al., 2014).

La dégranulation fait intervenir deux grands mécanismes : d'une part le déversement du contenu granulaire, d'autre part, l'augmentation de l'expression de certaines protéines (comme les récepteurs CXCR1 et 2 et les intégrines) au niveau de la membrane cytoplasmique du PNN (Hartl et al., 2008). Les granules des PNN contiennent une multitude de composants. Certains d'entre eux peuvent être bactériostatiques (c'est-à-dire empêchent la croissance microbienne) et d'autres ont des activités antimicrobiennes, principalement des peptides cationiques ( $\alpha$ -défensines) et des cathélicidines (Teng et al., 2017). Les peptides antimicrobiens cationiques fournissent une activité microbicide par interaction avec les composants membranaires chargés négativement des pathogènes, entraînant la formation de pores, l'induction de perméabilisation membranaire non spécifique, la liaison aux cibles intracellulaires pour inhiber la biosynthèse de l'ADN et/ou de l'ARN et la perturbation des bio-films bactériens. Le LL-37 est le mieux étudiée (Mayadas et al., 2014).

Outre leur activité antimicrobienne directe, de nombreux peptides antimicrobiens (en particulier LL-37) ont également des fonctions immunomodulatrices claires telles que la stimulation de la chimiotaxie des PNN, l'induction de l'expression des récepteurs de chimiokines, l'induction de la production de cytokines et la suppression de l'apoptose des PNN. LL-37 peut également potentialiser les fonctions d'autres cellules immunitaires, telles que les DC (Lande et al., 2007).

D'autres composants des granules des PNN ne sont pas directement antimicrobiens, et il se peut que ceux-ci (tels que les hydrolases acides qui dégradent les hydrates de carbone, les protéines et les acides nucléiques) interviennent dans la digestion des organismes tués, plutôt que dans leur destruction. De ce fait, le contenu des granules des PNN peut être considéré comme la pierre angulaire de l'immunité innée.

### (iii) Présentation antigénique

Bien que toujours débattues, plusieurs études ont mis en avant l'expression ou la production par les PNN de molécules de surface impliquées dans la présentation antigénique (Fanger et al., 1997; Sandilands et al., 2006). Ces observations soutiennent un possible rôle des PNN en tant que cellule présentatrice d'antigène.

L'hypothèse selon laquelle les PNN peuvent acquérir cette fonction repose sur les observations selon lesquelles des molécules de CMH-II et de co-stimulation (CD80 ou CD86) peuvent être induites à leur surface cellulaire après exposition à des cytokines spécifiques telles que l'IFN- $\gamma$  ou le GM-CSF (Gosselin et al., 1993). En outre, il a été démontré que ces leucocytes acquièrent la capacité de stimuler les LT d'une manière dépendante du CMH-II (Radsak et al., 2000).

De plus, Matsushima et al. ont montré que les PNN issus de moelle osseuse humaine et murine exposés au GM-CSF peuvent se différencier en des hybrides PNN-DC, présentant un phénotype de DC et une fonction de présentation d'antigène, tout en conservant plusieurs caractéristiques des PNN (Matsushima et al., 2013). Ce résultat a été confirmé par d'autres études montrant que les PNN immatures (précurseurs) et matures chez la souris et l'homme acquièrent ces caractéristiques de DC après exposition aux cytokines (GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-4, et TNF) (Iking-Konert et al., 2001a; Oehler et al., 1998). Par conséquent, la plasticité des PNN et leur capacité à devenir des CPA peuvent ne pas être limitées à un stade particulier de différenciation. En plus, cette plasticité a été observée en dehors des conditions de cultures *in vitro* car des PNN isolés de patients recevant un traitement par GM-CSF ou IFN- $\gamma$  ont montré une expression non négligeable du CMH-II (Mudzinski et al., 1995; Reinisch et al., 1996) et il en est de même pour les PNN issus de patients atteints de maladies chroniques associées à des niveaux élevés de cytokines ; telles que la PR ou la granulomatose de Wegener (Cross et al., 2003; Iking-Konert et al., 2001b).

De plus, plusieurs études ont souligné le fait que les LT seraient responsables de cette différenciation des PNN en CPA, comme montré par les travaux de Radsak et al. Lors de la culture des LT avec des PNN, ces derniers acquièrent l'expression de CD80 et CD86. Par ailleurs, il faut noter qu'à leur tour les PNN permettent la prolifération et la sécrétion de cytokines par les LT (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF) (Müller et al., 2009; Radsak et al., 2000; Vono et al., 2017).

#### (iv) Résolution de l'inflammation

Classiquement comme décrite par Serhan et al. la résolution de l'inflammation nécessite avant tout une réduction du nombre de PNN des sites inflammatoires locaux, tout en augmentant le recrutement des monocytes qui se différencient en M $\Phi$  pour phagocyter les PNN apoptotiques (Serhan et al., 2008).

Ainsi, nous en savons beaucoup sur les fonctions pro-inflammatoires des PNN mais qu'en est-il de leur rôle dans la résolution de l'inflammation ? Ces dernières années plusieurs études ont mis en avant le rôle de ces leucocytes dans la réparation mais aussi la régénération tissulaire.

Cette fonction peut se traduire par exemple par la production de cytokine anti-inflammatoire telle que l'IL-10 qui a été observée lors des études de De Santo et al. après stimulation des PNN par de la protéine sérum amyloïde A (SAA) (Santo et al., 2010), mais aussi dans des modèles murins en réponse à différents stimuli tels que le LPS et l'IFN- $\gamma$  (Romani et al., 1997), le virus de la rougeole (Hoffman et al., 2003) ou encore lors d'une septicémie (Kasten et al., 2010).

Cependant, à ce jour cette sécrétion reste controversée, car plusieurs études dont celle de Davey et al. en 2011 ont montré que suite à une stimulation par LPS ou SAA les PNN ne produisent pas d'IL-10 (Davey et al., 2011), suggérant que la possible sécrétion observée serait due à une contamination par les monocytes.

Cette même équipe confirme ce dernier résultat en démontrant que le gène de l'IL-10 est inactif, que ce soit sur des PNN stimulés ou pas par LPS (Tamassia et al., 2013).

Par ailleurs, la situation chez la souris peut être différente car la même année Ocuin et al. montrent que le transfert de PNN de souris sauvages dans un modèle murin de septicémie réduisait l'expression de TNF et d'IL-6 par les monocytes, contrairement au transfert de PNN de souris IL-10<sup>-/-</sup> (Ocuin et al., 2011) et en 2009, Zhang et al. ont montré que les PNN murins dans un contexte d'infection bactérienne sont sécrètent d'importantes quantités d'IL-10 (Zhang et al., 2009a).

Le concept selon lequel les PNN ne sont pas seulement des effecteurs de l'inflammation de courte durée mais ont des actions homéostatiques à long terme gagne du terrain. Par exemple, les corps apoptotiques des PNN reprogramment les M $\Phi$  M1 en un phénotype M2 anti-inflammatoire via l'efférocytose, et la déplétion des PNN dans les modèles murins de colite ulcéreuse conduit à une exacerbation de la maladie (Campbell et al., 2014). De plus, dans le cas de la PR, Headland et al. montrent que le liquide synovial est riche en microvésicules issues des PNN et que chez les souris avec un défaut de production de ces microvésicules

l'érosion du cartilage est plus importante que celle observée chez les souris sauvages. De plus, une protection du cartilage est observée lors de l'administration de ces microvésicules à des souris dans le modèle d'arthrite K/BxN (Headland et al., 2015).

### *(h) Exemples de pathologies associées aux PNN*

#### **(i) Athérosclérose**

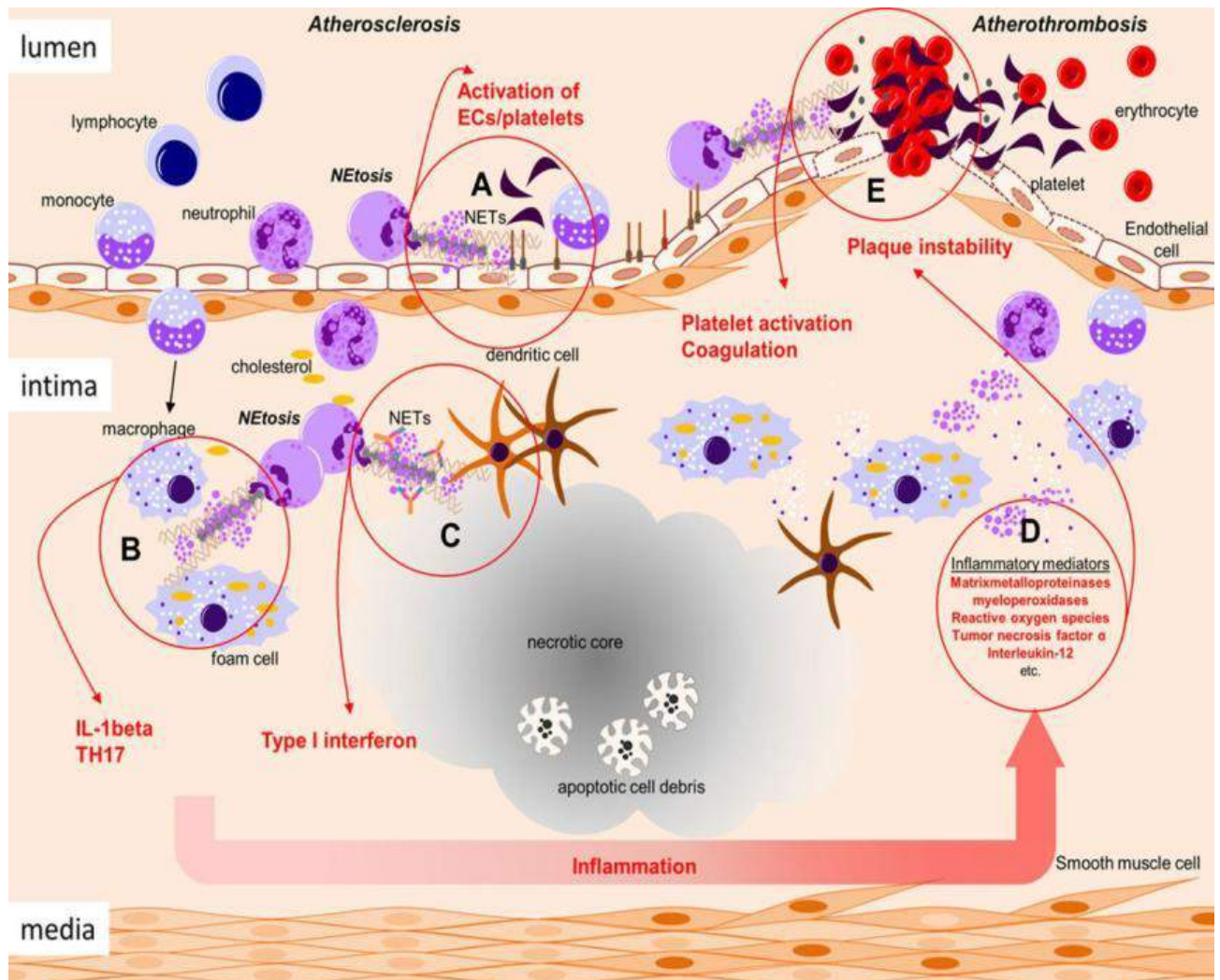
L'athérosclérose est une maladie chronique qui résulte du dépôt de lipides pro-inflammatoires dans le système vasculaire, ce qui entraîne une inflammation mal contrôlée des vaisseaux sanguins (Galkina and Ley, 2009). Jusqu'à récemment, on parlait surtout du rôle des cellules spumeuses et la contribution potentielle des PNN était largement négligée dans cette maladie, car ils n'étaient pas détectés dans les lésions athérosclérotiques. Cependant, des méthodes immunohistochimiques plus sensibles avec des marqueurs restreints aux granulocytes ont permis de détecter les PNN dans les lésions athérosclérotiques précoces et plus développées chez l'homme et dans des modèles murins (Drechsler et al., 2011; Leeuwen et al., 2008). Les ROS générées par les PNN qui favorisent l'apoptose des cellules endothéliales, l'oxydation des lipoprotéines de basse densité et la peroxydation lipidique peuvent favoriser le développement des lésions (Packard et al., 2009). De nombreuses protéines granulaires des PNN, y compris l'azurocidine, le LL-37 et les  $\alpha$ -défensines, se retrouvent également dans les lésions athérosclérotiques humaines, suggérant que les PNN activés peuvent contribuer directement au développement des lésions (Edfeldt et al., 2006; Lee et al., 2002). Les PNN peuvent également favoriser la dégradation de la matrice par la PR3 et les MMP, conduisant à un affaiblissement de la coiffe fibreuse sur les lésions artériosclérotiques vasculaires (Soehnlein, 2012). De plus, la neutropénie induite par un déficit en CXCR2 entraîne une réduction de la taille des lésions (Boisvert et al., 2006), alors qu'une neutrophilie déclenchée par une perturbation de l'axe CXCR4/CXCL12, entraîne une augmentation des dommages athérosclérotiques (Zernecke et al., 2008). En plus du rôle des PNN dans l'initiation et la progression des lésions athérosclérotiques, la présence chronique de PNN dans ces lésions peut contribuer à la thrombose, l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, car la formation de NET et les sérines protéases favorisent la croissance du thrombus. Le dépôt de plaquettes activées dans la paroi des vaisseaux attire les PNN par l'expression de la P-sélectine ou la production de chimiokines telles que CCL5. Les souris génétiquement déficientes en ces molécules, et celles déficientes en plaquettes, développent moins de lésions athérosclérotiques (Collins et al., 2000).

Comme illustré en *Figure 26*, les PNN peuvent participer autrement à la pathogénèse de l'athérosclérose est ceci par l'extériorisation des NET. Ces structures en forme de filet sont détectées dans des lésions athérosclérotiques chez l'homme et la souris. D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que les NET induisent l'activation des cellules endothéliales, des CPA et des plaquettes, ce qui entraîne une réponse immunitaire pro-inflammatoire. Ceci suggère que ces filaments d'ADN ne sont pas seulement présents dans les plaques et le thrombus, mais qu'ils peuvent aussi jouer un rôle causal dans le déclenchement de la formation de la plaque d'athérome et de la thrombose (Döring et al., 2017).

Les résultats de l'étude de Knight et al. soulignent l'importance des NET dans le développement des lésions athérosclérotiques en montrant que l'inhibition de PAD4 par le traitement à la chloramidine prévient la formation de NET, diminuant ainsi la taille des lésions d'athérome et retardant la thrombose de l'artère carotide chez un modèle murin d'athérosclérose. (Knight et al., 2014).

De même, l'équipe de Papayannopoulos trouvent que les cristaux de cholestérol déclenchent la libération de NET par les PNN. Les NET par la suite "priment" les M $\Phi$  pour produire de l'IL-1 $\beta$ , ce qui entraîne l'activation d'une réponse Th17, qui amplifie encore le recrutement des cellules immunitaires dans les lésions d'athérome. De plus, ils rapportent une diminution de la croissance de la plaque d'athérome chez un modèle d'athérosclérose murin où les souris sont traitées à la DNase pour dégrader les NET confirmant ainsi l'implication des NET dans cette pathologie (Warnatsch et al., 2015).





**Figure 26 : Rôle des PNN dans l'athérosclérose (Döring et al., 2017)**

IL : Interleukine, MMP : Métalloprotéinases matricielles, MPO : Myélopéroxydase, NET :

“ Neutrophil Extracellular Traps”, ROS : Espèces réactives de l'oxygène, TNF : Facteur de nécrose tumorale.

(A) Les neutrophiles activent les leucocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales en créant un milieu pro-inflammatoire entraînant vraisemblablement un dysfonctionnement endothélial, déclencheur initial du développement de la lésion. (B/C) Les NETs peuvent initier une réponse interleukine-16 / Th17 (T helper 17) et IFN de type I, ce qui conduit à une activation supplémentaire des leucocytes lésionnels, libérant plus de médiateurs pro-inflammatoires. (D/E) En outre, on peut supposer que les réponses pro-inflammatoires entraînées par le NET provoqueront un environnement inflammatoire qui favorise la déstabilisation et la rupture de la plaque d'athérome. Au cours de l'athérombose, les NET peuvent déclencher l'activation de la cascade de la coagulation et augmenter la stabilité du thrombus, orchestrant ainsi l'occlusion artérielle.

## (ii) Polyarthrite rhumatoïde

La PR est une maladie dans laquelle la synoviale est chroniquement enflammée. Dans le tissu synovial on retrouve des lymphocytes et des MΦ activés, et le liquide synovial contient des PNN en abondance. La présence de PNN et de MΦ dans l'articulation enflammée soulève la possibilité que les ROS soient responsables en partie des dommages subis dans la PR.

La preuve directe que cela est le cas a été obtenue en recherchant les traces de dommages oxydatifs dans les tissus et les fluides des articulations touchées (Babior, 2000).

La présence de groupement carbonyle sur les protéines reflète qu'elles ont subi des dommages oxydatifs et les protéines dans le liquide articulaire des patients atteints de PR ont une teneur accrue en groupes carbonyles, indiquant que l'articulation a subi des dommages par des ROS (Chapman et al., 1989). La nitration des tyrosines est un autre marqueur des dommages oxydatifs, indiquant que le NO et l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> ont été libérés à proximité des protéines nitrées. Ces tyrosines modifiées ont été retrouvées dans le LS de patients PR, mais pas chez des DS ou des patients souffrant d'OA (Kaur and Halliwell, 1994). Enfin pour compléter ces faits, il a été démontré que dans deux modèles murins d'arthrite auto-immune, la superoxyde dismutase améliore la maladie (Kakimoto et al., 1993; Parizada et al., 1991). Alors que le transfert de sérum KBxN à des souris déficiente en PNN soit génétiquement (souris Gfi<sup>-/-</sup>) (Monach et al., 2010), ou par blocage du Ly6G (Anti-LyG6) (Wang et al., 2012) n'induit pas d'arthrite.

Les PNN des fluides synoviaux des patients atteints de PR montrent également une augmentation de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, probablement à cause de leur exposition aux cytokines présentes dans les LS (Dewar and Harth, 1994; Oishi et al., 1990; Robinson et al., 1993). Le fer, catalyseur de la production de radicaux hydroxyles à partir d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est présent en plus grande quantité dans les LS et les tissus des patients atteints de PR (Babior, 2000). Tout cela démontre que les ROS produits par les PNN sont des médiateurs importants dans la pathogenèse de la PR (**Figure 27**).

Pendant de nombreuses années, on pensait que la contribution majeure des PNN à la pathologie des maladies inflammatoires comme la PR était leur libération de produits cytotoxiques. Cependant, les PNN sont maintenant reconnus pour avoir un rôle actif dans l'orchestration de la progression de l'inflammation, en régulant les fonctions des autres cellules immunitaires (Mantovani et al., 2011). Cette régulation est médiée par quatre méthodes principales : la sécrétion d'une large gamme de cytokines et de chimiokines qui peuvent réguler la fonction de presque toutes les autres cellules immunitaires ; la présentation antigénique ; les interactions cellule-cellule qui permettent, par exemple l'activation de

cellules NK ; et la libération de protéases qui peuvent activer ou désactiver les cytokines et les chimiokines. Nous verrons dans le Chapitre C : NETose que les NET jouent aussi un rôle important.

Des différences frappantes dans l'expression des gènes et des protéines existent entre les PNN du sang périphérique des patients atteints de PR et leurs homologues sains, y compris des taux plus élevés de TNF (Wright et al., 2011) et de myéloblastine dans la PR. Les PNN activés sont présents en grand nombre à la fois dans le LS de PR et dans le pannus (Wittkowski et al., 2007). Les PNN du LS de PR sécrètent un répertoire de cytokines et de chimiokines, y compris RANKL (Poubelle et al., 2007), BLYS et IL-17 (Moran et al., 2011), impliqués dans l'activation des ostéoclastes, des LB et des MΦ respectivement. De plus, les PNN du LS de PR peuvent exprimer les molécules du CMH de classe II, comme illustré en **Figure 27**, et présenter l'Ag aux LT, une fonction immunitaire qu'ils partagent avec les MΦ et les DC. Les conditions dans l'articulation synoviale, telles que l'hypoxie (Cross et al., 2006) et la présence de cytokines anti-apoptotiques (comme le TNF, le GM-CSF et l'IL-8) (Lally et al., 2005; Parsonage et al., 2008) augmentent la survie des PNN jusqu'à plusieurs jours (Raza et al., 2006; Weinmann et al., 2007). En particulier, les PNN se trans-différencient en DC dans la PR (Iking-Konert et al., 2005), démontrant une plasticité.

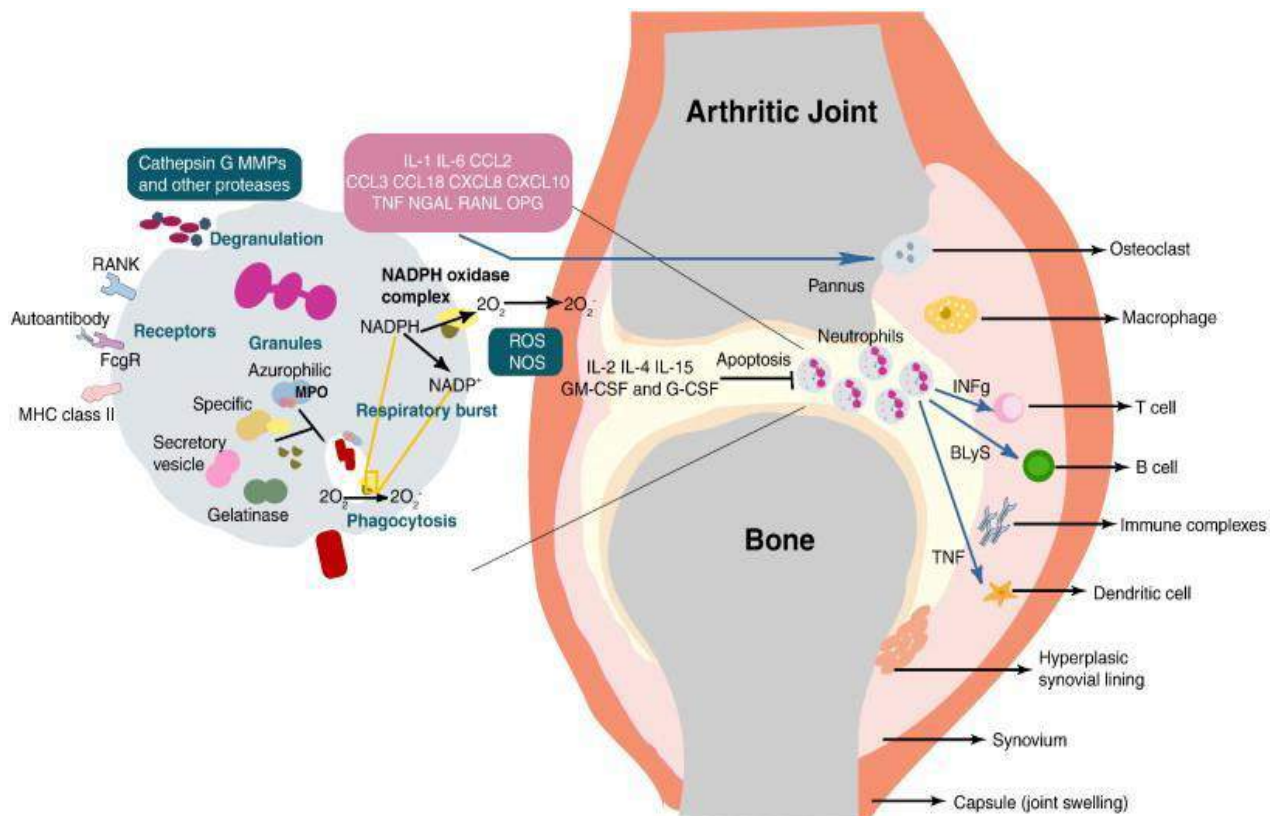
Les PNN sont activés dans l'articulation PR par des CI (contenant le FR) (Rollet-Labelle et al., 2013), à la fois dans le LS et sur la surface du cartilage articulaire. Ces complexes engagent le FcγR et déclenchent ainsi leur activation (Nurcombe et al., 1991; Quayle et al., 1997; Robinson et al., 1994). Une fois activés, les PNN provoquent des dommages au tissu hôte par dégranulation et libération de ROS, soit dans le LS, soit directement à la surface de l'articulation. Le dépôt de CI sur la surface articulaire entraîne une phagocytose frustrée et fournit un microenvironnement dans lequel les PNN libèrent des concentrations élevées d'oxydants et d'agents cytotoxiques directement sur la surface du cartilage articulaire (Hallett and Lloyds, 1995).

Les protéines des granules des PNN sont présentes en concentrations élevées dans le LS de patients PR et peuvent être responsables de lésions du cartilage et des tissus, de l'inhibition de la prolifération et de l'invasion des chondrocytes (Baici et al., 1982; Khandpur et al., 2013; Pham, 2006; Wang et al., 2011a). Les concentrations de calgranuline dans le LS sont corrélées positivement avec le nombre de PNN (Baillet et al., 2010) et des concentrations élevées de ces facteurs induisent la libération de protéases par les différents granules des PNN (granules spécifiques, granules gélatinase, ainsi que des vésicules sécrétoires) (Simard et al., 2010). Ces protéases peuvent, par exemple, dégrader les cytokines ou activer leurs précurseurs. De manière intéressante, de nombreuses cytokines et chimiokines connues pour

être des chimioattractifs ou des activateurs des PNN sont également des cibles pour les protéases dérivées de ces cellules, suggérant l'existence d'une rétroaction régulatrice (Eyles et al., 2006). Les médiateurs immunitaires produits par les PNN dans un scénario inflammatoire peuvent ainsi activer les PNN ou d'autres cellules immunitaires (Hoshino et al., 2008), déclenchant principalement des rétroactions régulatrices positives, pour lesquelles le résultat est une inflammation aiguë et persistante.

Une autre observation intéressante est que les PNN qui sont recrutés au niveau des articulations enflammées et qui sont en contact avec les cellules endothéliales induisent la production de TNF, qui conjointement avec l'IL-10, induit la production de CCL18 (Auer et al., 2007), une chimiokine qui attire les LT.

Une constatation particulière relative au rôle prédominant des PNN dans le déclenchement de la PR provient des modèles murins de la maladie qui ont montré que les protéines citrullinées existent dans les articulations enflammées et que les PNN infiltrés expriment l'enzyme PAD4, responsable de la citrullination d'arginine (Vossenaar et al., 2003). Les auto-Ac contre les peptides citrullinés sont présents dans la phase précoce de la PR, suggérant que les PNN, en tant que source d'enzymes PAD, peuvent contribuer à la génération d'auto-Ag puis d'auto-Ac qui sont essentiels pour l'apparition de la PR (Anzilotti et al., 2010; Eyles et al., 2006) ou via l'extériorisation des NET qui possèdent à leur surface des protéines citrullinées et donc seraient les auto-Ag responsables de cette production (détaillé en Chapitre C). De plus, il a été montré que les NET sont présents dans le sang périphérique, le tissu et le liquide synovial de patients PR. Les niveaux de NET dans le sérum sont plus élevés chez les patients en comparaison aux DS et il existe une corrélation positive entre la capacité des PNN à faire des NET *in vitro* et les taux sériques d'auto-Ac (ACPA) (Khandpur et al., 2013; Wang et al., 2018).



**Figure 27 : Rôle des PNN dans l'articulation enflammée (Cascão et al., 2010)**

**BLyS** : Facteur d'activation des cellules B, **G-CSF** : "Granulocyte colony-stimulating factor", **GM-CSF** : "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor", **IFN** : Interféron, **IL** : Interleukine, **MHC** : Complexe majeur d'histocompatibilité, **MPO** : Myéloperoxydase, **NOS** : Espèces réactives de l'azote, **O<sub>2</sub>** : Oxygène, **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Ion superoxyde, **RANK** : Récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B, **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène, **TNF** : Facteur de nécrose tumorale.

Les neutrophiles sont le premier type cellulaire à arriver sur les sites d'inflammation. Dans ce cas, ils libèrent des granules riches en protéases et de grandes quantités de ROS qui sont corrélées avec la présence de complexes immuns. Les neutrophiles sécrètent des médiateurs immunitaires qui peuvent les activer et activer d'autres cellules immunitaires, déclenchant des rétroactions positives qui entraînent une inflammation aiguë et persistante. Les neutrophiles produisent des quantités faibles de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comparativement aux autres types cellulaires mais leur plus grand nombre sur les sites inflammatoires en fait d'eux une source importante. Ils vivent plus longtemps dans les sites inflammatoires, augmentant la libération d'enzymes destructrices puissantes grâce à la présence de facteurs anti-apoptotiques dans le liquide synovial, comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-15, le GM-CSF et le G-CSF. La présence des PNN à l'interface pannus-os pourrait activer la fusion des monocytes en ostéoclastes pleinement fonctionnels qui provoqueraient alors la résorption osseuse.

## C. NETose

### 1. Introduction

La capacité des PNN à mourir par "autotoxicité" dépendante des ROS en réponse au PMA (Phorbol myristate acétate), un cocarcinogène dérivé de l'huile de l'arbuste Croton (Hecker et al., 1966), a été initialement décrite par Min-Fu Tsan en 1980 (Tsan, 1980). Il a été plus tard rapporté en 1996 par Takei et al. que cette forme de mort du PNN diffèrait de l'apoptose et de la nécrose. Ils décrivaient ce nouveau processus lors de l'étude de la relation entre l'activation et la mort des PNN par PMA où ils remarquaient des distinctions morphologiques telles que la transformation du noyau multilobé des PNN, la décondensation de la chromatine et la rupture de l'enveloppe nucléaire, qui sont suivies par la rupture de la membrane plasmique et la dispersion du contenu cytoplasmique dans l'espace extracellulaire (Takei et al., 1996). Il a fallu attendre huit ans pour reconnaître et donner un nom à cette nouvelle forme de mort cellulaire. Brinkmann et al. détaillaient ce processus et le nommaient NETose en référence à l'apoptose et à d'autres types de mort cellulaire, et NET pour "Neutrophil Extracellular Traps" les structures qui en ressortent. Cette équipe Berlinoise montre que le matériel libéré des PNN mourants contient de la chromatine avec des protéines antimicrobiennes granulaires dépourvus de membrane, formant des fibres extracellulaires avec capacité de liaison bactérienne. Deuxièmement, ils ont noté que ces fibres ont la capacité de dégrader les facteurs de virulence et de tuer les bactéries, ce qui suggère un nouveau mécanisme de défense, qui a pu être reproduit par de l'IL-8 et du LPS. L'existence de NET *in vivo* a été confirmée dans la dysenterie expérimentale et l'appendicite humaine spontanée (Brinkmann et al., 2004). Ces études ont donc démontré que les NET ne sont peut-être pas simplement un artefact de la toxicité du PMA, mais plutôt un processus physiologique potentiel pertinent.

Ainsi, durant la NETose, des pièges extracellulaires sont extériorisés par les PNN activés. Ces NET sont des structures d'ADN de 15 nm à 17 nm de diamètre libérées en raison de la décondensation et de la diffusion de la chromatine (Brinkmann et al., 2004; Wang et al., 2009), occupant ainsi 3 à 5 fois le volume de la chromatine condensée. Plusieurs protéines sont associées aux NET, y compris des histones et plus de 30 composants des granules primaires et secondaires formant des domaines de 25nm de diamètre (Pires et al., 2016), dont des composants à activité bactéricide tels que la neutrophile élastase (NE), la myéloperoxydase (MPO), la cathepsine G (CG), le lactoferrine, la pentraxine 3, la gélatinase, la protéinase 3 (PR3), le LL37, les protéines se liant au peptidoglycane et d'autres ayant la capacité de détruire les facteurs de virulence (Cho et al., 2005; Urban et al., 2009).

Il convient de mentionner que la chromatine et les histones possèdent une activité antimicrobienne intrinsèque. L'ADN agit comme agent chélateur des cations en raison de son squelette phosphodiester, ce qui le rend capable de perturber les membranes externes et internes de *Pseudomonas aeruginosa* (Halverson et al., 2015; Mulcahy et al., 2008). L'effet antimicrobien des histones a été observé dans les années 1950 par James Hirsch et H2A a été proposé comme l'un des agents antimicrobiens les plus efficaces, en particulier contre *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus* et *Staphylococcus aureus*. De plus, l'histone H4 recombinante possède une activité antimicrobienne contre *S. aureus* et *Propionibacterium* (Lee et al., 2009a). L'effet antimicrobien des histones a été observé non seulement contre les bactéries mais aussi contre les parasites, ce qui a été confirmé par Wang et al. montrant que les histones H2A et H2B réduisent la réplication de *Leishmania spp. promastigotes* jusqu'à 50% (Wang et al., 2011b). De plus, comme les NET ne sont pas entourés de membranes, cela permet à leurs composants de s'agréger pour former des fils plus gros avec des diamètres jusqu'à 50 nm (Brinkmann et al., 2004). La structure des NET leur donne le potentiel d'agir comme des barrières physiques et antimicrobiennes qui d'abord confinent puis tuent les agents pathogènes sur le site de l'inflammation (Abi Abdallah et al., 2012; Buchanan et al., 2006). Les NET sont trouvés dans une variété de conditions, telles que les infections bactériennes (Brinkmann et al., 2004; Buchanan et al., 2006), fongiques (Urban et al., 2006), et parasitaires (Abi Abdallah et al., 2012). Cependant, d'autres études montrent que la formation de NET peut également se produire dans des conditions non infectieuses, telles que les maladies auto-immunes (Hakim et al., 2010; Pinegin et al., 2015). Cela a mené à la description de plusieurs mécanismes de NETose.

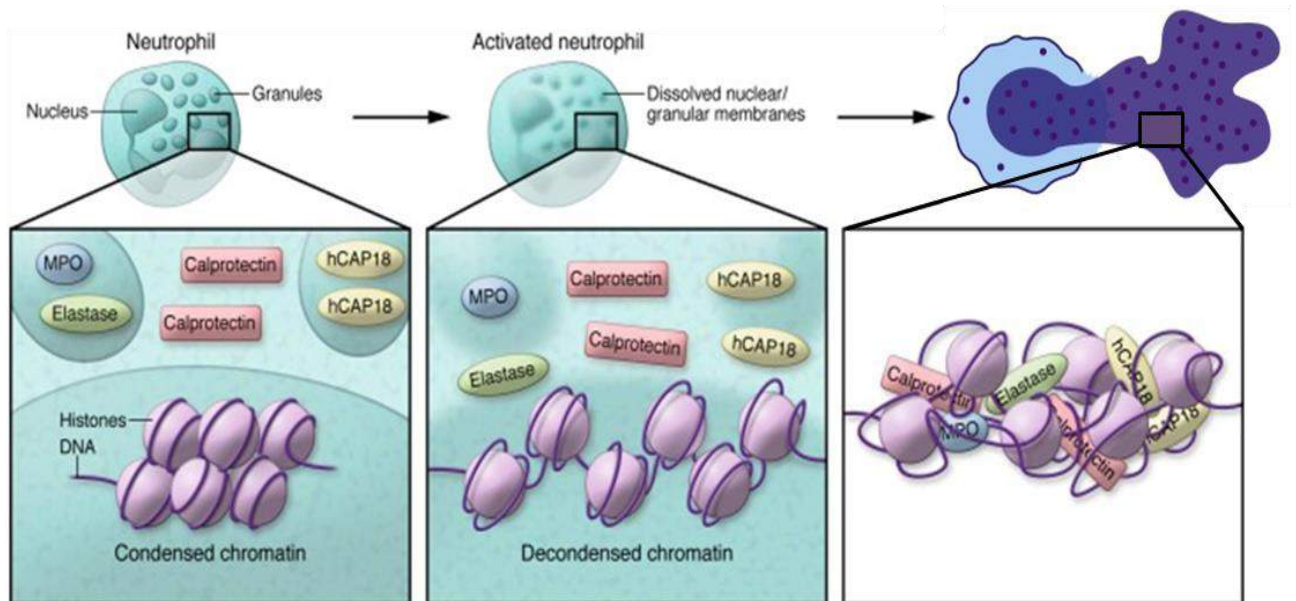
## 2. NETose suicidaire

La NETose suicidaire, d'une durée de 2-4 h, est le modèle le mieux décrit (Pilszczek et al., 2010), même si ses processus moléculaires ne sont pas entièrement compris (Al-Khafaji et al., 2016). Cela commence par l'activation des PNN par la reconnaissance des stimuli, les amenant à conditionner et activer le complexe NADPH oxydase (NOX) par la protéine kinase C (PKC)/Raf/MERK/ERK, ainsi qu'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ; ces cations agissent comme cofacteurs de la PAD4, enzyme nucléaire favorisant la déamination des histones, modifiant ainsi les arginines pour permettre la décondensation de la chromatine en favorisant la perte des charges positives nécessaires à l'interaction des histones à l'ADN (Lewis et al., 2015; Li et al., 2010). Les ROS se comportent comme des seconds messagers dans la NETose suicidaire en favorisant la séparation et la perte graduelle de la membrane nucléaire, qui se désintègre en petites vésicules individuelles, et aussi la migration de NE dans le noyau pour cliver les histones afin de faciliter la décondensation de la chromatine (Papayannopoulos et al., 2010), cette décondensation qui est favorisée par une autre enzyme des granules azurophiles : la MPO. Par la suite, comme illustré en **Figure 28**, la chromatine se disperse dans tout le cytoplasme, où elle se mélange avec les protéines cytoplasmiques et granulaires. Enfin, la chromatine est libérée à l'extérieur de la cellule par les pores de la membrane et la lyse cellulaire. Ainsi, la NETose suicidaire dépend de ROS pour la citrullination des histones par PAD4, qui permet la décondensation de la chromatine (Li et al., 2010; Neeli et al., 2008), libérant finalement l'ADN sous forme de pièges extracellulaires (Brinkmann and Zychlinsky, 2007; Neeli et al., 2009). L'extériorisation de la chromatine pour former des pièges extracellulaires (ET, ou ETose) a d'abord été décrite dans les PNN (Brinkmann et al., 2004) mais peut également être observée dans les mastocytes (Möllerherm et al., 2016), les  $\text{M}\Phi$ , ainsi que dans d'autres cellules myéloïdes comme les éosinophiles et les basophiles (Guimarães-Costa et al., 2012; Schorn et al., 2012). La défense basée sur l'externalisation de l'ADN est apparue il y a plus d'un milliard d'années. Les cellules sentinelles de l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* libèrent de l'ADN mitochondrial et de manière altruiste afin de séquestrer les bactéries envahissant les colonies (Zhang and Soldati, 2016).

L'hypercitrullation leucotoxique et la mitophagie déficiente peuvent déclencher l'expulsion de l'ADN (Konig and Andrade, 2016). Ces processus peuvent être distingués de la formation de NET canonique (Brinkmann et al., 2004), comme détaillé en partie 4 : Autres mécanismes apparentés mais à ne pas confondre avec la NETose. Cependant, comme ils provoquent l'externalisation de l'ADN, ils peuvent être considérés comme des formes non canoniques de



NETose. Bien que la génération de ROS soit impliquée dans plusieurs voies de formation de NET, elle n'est pas strictement requise pour d'autres (Arai et al., 2014).



**Figure 28 : NETose induisant la mort du PNN (adapté de (Sørensen and Borregaard, 2016))**

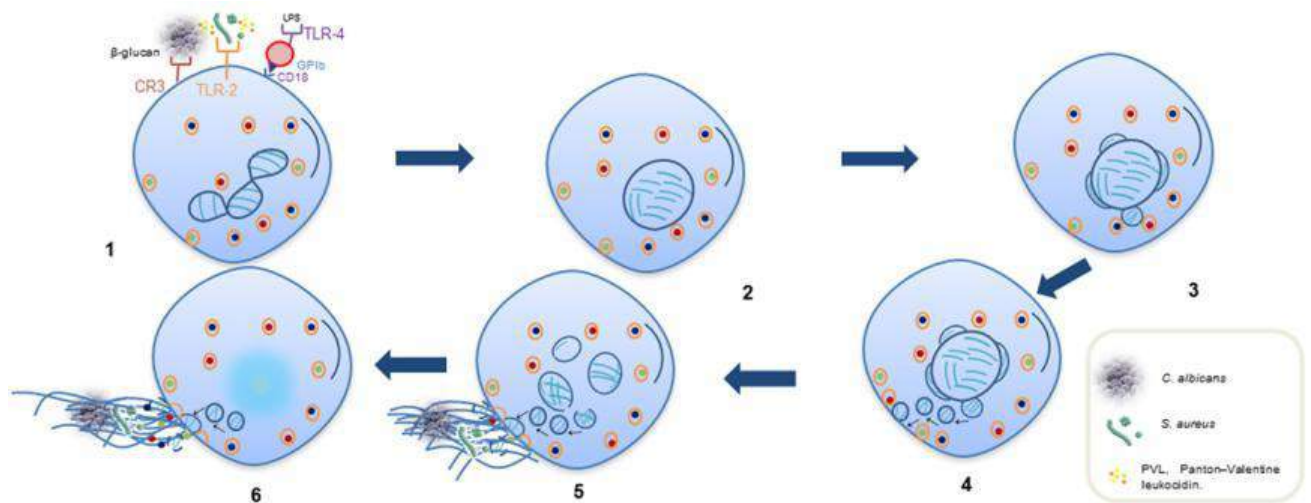
*hCAP* : Cathélicidine, *MPO* : Myéloperoxidase, *NET* : "Neutrophil Extracellular Traps".

Dans les neutrophiles activés, la PAD4 citrulline certaines arginines des histones qui affaiblit la liaison électrostatique étroite entre les histones et l'ADN dans les nucléosomes. Par la suite les deux membranes nucléaires et granulaires se dissolvent, ce qui permet la rencontre entre l'ADN décondensé avec les histones citrullinées et les protéines granulaires qui sont ainsi expulsés des neutrophiles en tant que NET qui peuvent piéger et éventuellement tuer des microbes.

### 3. Libération des NET sans mort du neutrophile

Les premiers rapports sur l'existence des NET ont rapporté que le processus était léthal (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Steinberg and Grinstein, 2007) et finalement un terme NETose a été inventé. Cependant, Yipp et al. ont montré par microscopie intravital de la peau enflammée par *S. aureus* que les PNN anucléés qui ont libéré les NET restent vivants et sont capables de se déplacer et phagocyter (Yipp et al., 2012). Ce résultat confirme les rapports de Pilszczek et al. montrant que lors d'une infection par cette bactérie, les PNN formaient des NET dans les 5 à 60 min sans mourir et indépendamment de la production de ROS. Ces NET ont également été observés *in vivo* par microscopie dans les 10 min suivant l'injection sous-cutanée par *S. aureus* (Pilszczek et al., 2010). Évidemment, au cours de ce processus, la membrane plasmique des PNN est restée intacte et la chromatine a été libérée du noyau par des vésicules intracellulaires qui ont fusionné avec la membrane plasmique pour libérer les NET dans l'espace extracellulaire, comme illustré en **Figure 29**. La libération de NET sans mort du PNN a également été observée dans les 30 minutes suivant la stimulation par des champignons ou du LPS (Byrd et al., 2013; Pilszczek et al., 2010). Cette formation rapide de NET est médiée par le système du complément, le TLR2 ou la fibronectine. Les PNN libérant de tels NET deviennent rapidement mobiles *in vivo*, conservant la possibilité d'effectuer plusieurs tâches au cours de la phase d'infection précoce (Byrd et al., 2013; Yipp et al., 2012).

De plus, les NET induits rapidement par *S. aureus* sont composés d'histones, confirmant que les NET proviennent des noyaux, sans impliquer l'ADN mitochondrial (Pilszczek et al., 2010). En revanche, certains stimuli de type LPS et le facteur C5a du complément induisent la libération de NET à partir d'ADN mitochondrial après "priming" par GM-CSF d'une manière dépendante de ROS (Yousefi et al., 2009). Il est intéressant de noter que *S. aureus* induit rapidement la libération des NET avant même que les ROS ne soient générées, tandis que les NET produits par *Aspergillus* sont indépendants des ROS (Byrd et al., 2013; Pilszczek et al., 2010). De nombreuses preuves démontrent que la formation de NET avec la mort cellulaire implique la génération d'oxydants, alors que la formation rapide de NET sans mort cellulaire peut ou non impliquer la génération d'oxydants. Par exemple, la stimulation par PMA induit une formation de NET dépendante de ROS et avec mort cellulaire, tandis que la stimulation par l'ionomycine induit une libération de chromatine (comparable aux NET) rapide indépendante des ROS et sans mort cellulaire (Parker Heather et al., 2012).



**Figure 29 : Etapes clés de la NETose vitale (Delgado-Rizo et al., 2017)**

*CD* : Cluster de différenciation, *CR* : "Complement receptor", *GPIb* : "Platelet surface glycoprotein Ib", *LPS* : Lipopolysaccharide, *TLR* : Récepteur de type Toll.

La NETose peut ne pas induire la mort du PNN. (1) Cela commence par la reconnaissance des stimuli par les récepteurs adéquats par exemple, le LPS par TLR-4. (2) La perte de la forme lobulaire et multinucléée du noyau. (3, 4) La séparation des membranes nucléaires externes et internes et le bourgeonnement des vésicules. (5) Les vésicules dans le cytoplasme contenant des filaments d'ADN sous la forme de chaînes de perles s'approchent des granules cytoplasmiques vers la membrane plasmique intacte. (6) La libération de l'ADN sous forme de pièges extracellulaires se fait à travers une petite zone à la surface cellulaire ; certains granules cytoplasmiques fusionnent également à la membrane plasmique et pour être libérés dans l'espace extracellulaire pour s'associer à l'ADN.

## 4. Autres mécanismes apparentés mais à ne pas confondre avec la NETose

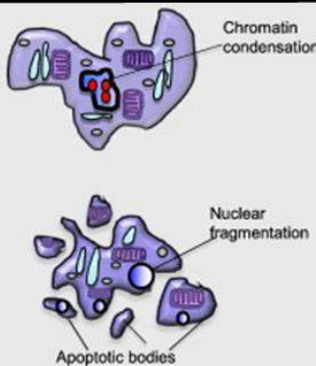
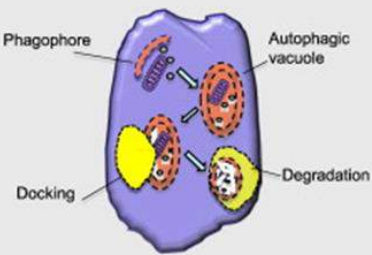
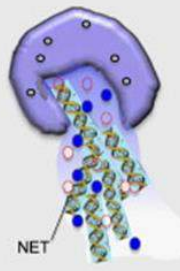
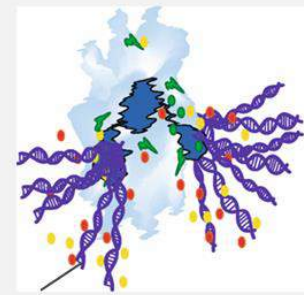
### *a) Mitophagie défectueuse*

Étant donné que la dysfonction mitochondriale peut avoir des effets délétères sur les cellules, les mécanismes de contrôle de la qualité des organites ont évolué pour éliminer les mitochondries endommagées (Ashrafi and Schwarz, 2013). Cependant, alors que la plupart des cellules utilisent un processus autophagique appelé mitophagie pour enlever les mitochondries endommagées, des preuves récentes ont démontré que la mitophagie est défectueuse dans les PNN (Caielli et al., 2016). Pour compenser ce problème, les PNN utilisent deux voies complémentaires pour réaliser la clairance mitochondriale. (1) Le contenu mitochondrial, y compris l'ADN mitochondrial (mt) complexé avec le facteur de transcription A des mitochondries (TFAM), est expulsé du PNN. Cela se produit probablement directement par la fusion des mitochondries avec la membrane plasmique. La libération du complexe ADNmt-protéine dans l'espace extracellulaire est donc un processus normal dans la biologie des PNN. (2) Si l'ADNmt subit une oxydation, il se dissocie de TFAM et est redirigé vers les lysosomes pour la dégradation (Caielli et al., 2016).

Il est intéressant de noter que des premières études ont démontré que l'expulsion de l'ADNmt des PNN peut être induite par le LPS ou le fragment C5a du complément après “priming” avec GM-CSF. Ceci peut indiquer une clairance physiologiquement accrue des mitochondries en réponse à des stimuli inflammatoires. En raison de similitudes morphologiques avec la NETose (ADN extracellulaire), ces structures ont été appelées des NET mitochondriaux (Yousefi et al., 2009). De plus, récemment l'implication de l'autophagie dans la libération de NET a été étudiée dans des souris transgéniques avec une délétion conditionnelle d'*atg5* (son produit est critique pour la formation d'autophagosomes) dans les PNN ou les éosinophiles (Germic et al., 2017). L'étude a exclu un rôle de l'autophagie dans la formation de NET. Ainsi, l'analogie avec les NET est donc inadaptée et crée la confusion sur la biologie de la NETose. De plus, il n'y a aucune raison de postuler que la citrullination peut avoir un rôle dans la libération du complexe ADNmt-protéine des PNN, renforçant le fait que PAD4 n'est pas central à tout processus qui libère de l'ADN.

## *b) Nécroptose*

La nécroptose qui est une forme de mort cellulaire programmée, dite nécrose régulée, est une rupture de la membrane plasmique et un relargage du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire, comme illustré dans le ***Tableau 4***. Cette définition a permis de supposer que la NETose pourrait représenter une nécroptose (Desai et al., 2016a), mais Amini et al. ont rapporté que la formation de NET était indépendante de la voie RIPK3-MLKL, voie nécessaire pour une véritable nécroptose (Amini et al., 2016), et ceci en utilisant une stimulation par E. coli, LPS avec GM-CSF ou facteur C5a du complément. À première vue, ces observations semblent contredire l'implication de la nécroptose dans la libération de NET induite par les cristaux d'urate de monosodium et de PMA (Desai et al., 2016a). Cependant, de toute évidence, la nature de la formation de NET peut différer en termes de synchronisation, de type de stimuli ou de contexte pathologique. Le terme «NETose» est inapproprié non seulement pour décrire un processus vital, mais aussi lorsque la libération de NET est un processus passif secondaire à la rupture de la membrane plasmique de PNN subissant une nécroptose ou même d'autres formes de mort cellulaire régulée.

	<b>Apoptosis</b>	<b>Autophagy</b>	<b>Netosis</b>	<b>Necroptosis</b>
	 <p>Chromatin condensation</p> <p>Nuclear fragmentation</p> <p>Apoptotic bodies</p>	 <p>Phagophore</p> <p>Autophagic vacuole</p> <p>Docking</p> <p>Degradation</p>	 <p>NET</p>	 <p>NET like chromatin</p>
<b>Morphology</b>	Chromatin condensation; nuclear fragmentation; apoptotic bodies	Autophagic vacuoles	Extrusion of NET: DNA, histones, granular proteins (myeloperoxidase, elastase, lactoferrin etc), cytoplasmic proteins (calprotectin, catalase)	Plasma membrane rupture and NET-like chromatin release together with granular enzymes
<b>Triggers</b>	Extrinsic pathway → death receptors (fasL) Intrinsic pathway → viral infection, DNA damage, mitochondrial release of cytochrome c	Amino acid starvation; growth factor withdrawal; energy withdrawal; environmental stress (intracellular reactive oxygen species etc).	PMA, LPS, IL 8, TNFα, LL-37, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , LPS-activated platelets, ANCAs, Immune complexes, Anti-neutrophil antibodies, Activated endothelium, <i>Streptococcus</i> species, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> species, <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , HIV	Monosodium urate crystals (MCU), PMA
<b>Mediators</b>	Extrinsic pathway → caspase 8, 10 Intrinsic pathway → caspase 9	autophagy proteins 1, 5, 6, 8, 12, 17, 13	MPO, elastase, NOX2, NADPH, PAD4, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	RIPK3, MLKL, ROS
<b>Inhibitors</b>	Caspase inhibitors	Bcl-2 ?; anabolic metabolism (class I PI3K)	Catalase, Dnase, DPI	RIPK and MLKL inhibitors
<b>Citrullination</b>	Citrullination is needed to prepare intracellular proteins for degradation during apoptosis with a complete loss of both polymerization competence of the intermediate filament protein and filament forming ability	The presentation of the citrullinated peptides by the APC is associated with autophagy. Citrullination can be considered as a biochemical marker of autophagy	Citrullination of histones is responsible for chromatin decondensation that leads to the release of histones in the NET and prevents histone methylation and further transcription	

**Tableau 4 : Différence entre la NETose, l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose (adapté de (Desai et al., 2016b; Valesini et al., 2015))**

ANCA : Anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques, APC : Cellules présentatrices d'antigène, Bcl-2 : "B-cell lymphoma 2", DNA : Acide désoxyribonucléique, DPI : Diphenyleneiodonium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène, LPS : Lipopolysaccharide, MLKL : "Mixed lineage kinase domain-like", NET : "Neutrophil Extracellular Traps", PI3K : "Phosphoinositide 3-kinase", PMA : Phorbol méristate acétate, RIPK : "Receptor interacting protein kinase", TNF : Facteur de nécrose tumorale, LL-37 : Cathélicidine, VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

### *c) Hypercitrullination leucotoxique*

L'hypercitrullination leucotoxique (LTH) est déclenchée par des stimuli qui génèrent des influx importants de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, telles que les ionophores. L'hyperactivation de la PAD et l'hypercitrullination des protéines sont caractéristiques de ce processus, mais pas la production de ROS par la NADPH oxydase.

Konig et Andrade stipulent que les PNN peuvent souffrir de deux formes de mort cellulaire biochimiquement distinctes qui peuvent facilement être confondues morphologiquement. L'une est dirigée par des signaux qui induisent la production de ROS par la NADPH oxydase (NETose), l'autre représente une stratégie développée par les pathogènes qui par leurs toxines bactériennes génèrent des pores transmembranaires, un afflux anormal de calcium qui active les voies dépendantes du calcium (comme les PAD) aboutissant à l'hypercitrullination des PNN et la libération extracellulaire de chromatine lors de la désintégration de la cellule cible (LTH) (Konig and Andrade, 2016).

## **5. Inducteurs de la NETose**

Le PMA (un agoniste de la PKC) et les ionophores de  $\text{Ca}^{2+}$  ont eu un rôle historique dans la compréhension fonctionnelle du système immunitaire. Depuis le début des années 1970, ces molécules ont été utilisées en tant que stimulus de substitution qui imitent les signaux induits par les microbes et les produits immunitaires, simplifiant l'étude des mécanismes et des voies d'activation immunitaire (Luckasen et al., 1974; Zucker et al., 1974). Sur les PNN, le PMA active la production de ROS via la NADPH oxydase et induit la dégranulation (Bentwood and Henson, 1980; Repine et al., 1974), mais n'a aucun effet sur le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire pendant leur activation (Gennaro et al., 1984; Mahomed and Anderson, 2000).

En revanche, les ionophores de calcium induisent également la dégranulation des PNN (Wright et al., 1977), mais leur effet sur l'activité de la NADPH oxydase est extrêmement faible par rapport au PMA (McPhail et al., 1981). En raison de leur fonctionnalité divergente, PMA et ionophore sont généralement utilisés en combinaison pour atteindre une réponse cellulaire maximale qui nécessite un taux élevé de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et une activation de PKC (Clevers et al., 1985; Josimovits et al., 1985).

Bien qu'un grand nombre de stimuli avec un potentiel biologique pertinent ont été proposées pour induire la NETose, les mécanismes sous-jacents pour la majorité de ces stimuli n'ont pas été élucidés. Au lieu de cela, les études se sont concentrées sur la compréhension des voies utilisées par PMA et ionophore de calcium pour induire des NET, en supposant que ces

mécanismes sont analogues à la NETose *in vivo*. Les voies biochimiques activées par des stimuli immunitaires et microbiens, ne sont cependant, pas complètement reproduites par le PMA ou l'ionophore de calcium. Les stimuli tels que IL-8 et LPS, initialement utilisé pour démontrer que les NET ne sont pas simplement un artefact du traitement au PMA, ne sont ni efficaces dans la production de ROS (comme vu avec PMA) ni dans l'augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (analogue aux ionophores de calcium) (Brandolini et al., 1996; Guichard et al., 2005). Le mécanisme précis de l'induction de NET avec à la fois IL-8 et LPS est inconnu, et leur capacité à reproduire de manière fiable la NETose est discutable. D'autres facteurs solubles, tels que le TNF- $\alpha$  (Li et al., 2010; Neeli et al., 2009), ont des limitations similaires dans l'explication de l'induction des NET (Yuo et al., 1989).

L'importance potentielle des NET en biologie humaine est soutenue par l'induction directe de la NETose par des agents pathogènes. Les champignons *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* semblent être des agents pathogènes modèles et idéaux pour activer systématiquement la NETose via la NADPH oxydase, la MPO, et la NE, utilisant ainsi un mécanisme similaire au PMA (Metzler et al., 2011; Röhm et al., 2014; Urban et al., 2006).

*S. aureus* a été utilisé comme organisme modèle pour démontrer la formation bactérienne de NET par les deux voies NADPH oxydase dépendantes (PMA-like) et indépendantes (Fuchs et al., 2007; Pilsczek et al., 2010), mais aussi pour induire la NETose "vital", une description morphologique choisie pour mettre en évidence que les PNN restent "vivants" après avoir libéré des structures semblables aux NET (Yipp and Kubes, 2013; Yipp et al., 2012).

D'autres espèces bactériennes ont été utilisées. Par exemple, l'induction de NET par *Klebsiella pneumoniae* exige la présence de MPO et NE chez la souris (type PMA) (Papayannopoulos et al., 2010). Cependant, l'induction de NET par *K. pneumoniae in vitro* n'a pas pu être reproduite (Branzk et al., 2014). Par contre, dans le cas de *Shigella flexneri* et du streptocoque pyogènes du groupe A, c'est PAD4 qui est indispensable pour la NETose (Li et al., 2010), mais le mécanisme par lequel PAD4 est activé n'est pas clair. En effet, il a été proposé que seuls les grands pathogènes tels que les hyphes de *C. albicans* et les agrégats bactériens ont la capacité d'induire la NETose (Branzk et al., 2014). La mauvaise reproductibilité de la formation de NET par certains stimuli biologiquement pertinents et la compréhension limitée de ces divergences peuvent expliquer pourquoi le PMA et les ionophores de calcium restent les principaux outils dans l'étude des NET.

Plusieurs études ont rapporté l'implication de la PAD4 dans la formation de NET (Leshner et al., 2012; Li et al., 2010). PAD4 appartient au groupe d'enzymes dépendantes de  $Ca^{2+}$  et est située dans le noyau et les granules de PNN (Kearney et al., 2005; Nakashima et al., 2002).



L'enzyme est impliquée dans la citrullination des histones H2/H3/H4, qui est une modification post-traductionnelle convertissant le résidu arginine en citrulline pour former un groupe carbonyle (Arita et al., 2006; György et al., 2006). La conversion de l'arginine chargée positivement en chaînes latérales neutres de citrulline affecte la stabilisation des protéines (histones) sur l'ADN et conduit à la décondensation de la chromatine et à la libération de NET (Neeli et al., 2008; Wang et al., 2009). En conséquence, l'inhibition chimique de PAD4 en utilisant la Cl-amidine altère la NETose dans des modèles animaux de maladie anti-GBM (anti-membrane basale glomérulaire) ou de néphrite lupique (Knight et al., 2013; Kumar et al., 2015). D'ailleurs, les souris déficientes en PAD4, qui sont incapables de générer des NET (Wang et al., 2009), sont plus sensibles aux infections bactériennes.

Cependant, l'implication de PAD4 dans la formation de NET est une question discutée en raison des effets non spécifiques de Cl-amidine pour PAD4 (Causey et al., 2011; Knuckley et al., 2010).

Par exemple, les souris PAD4<sup>-/-</sup> présentaient une formation de NET altérée au cours de la fasciite nécrosante (Li et al., 2010) mais ont succombé à une pneumonie grippale (Hemmers et al., 2011), qui impliquait des NET induits par le virus de la grippe (Narasaraju et al., 2011). Alors qu'une autre étude utilisant des souris avec la même déficience n'a pas révélé de différences de morbidité ou de mortalité par rapport à des souris sauvages dans un modèle de péritonite (ponction ligation caecale) (Martinod et al., 2015).

Ces disparités suggèrent que l'implication de PAD4 dans la formation de NET dépend du stimulus. En effet, il est montré que certains stimuli, par exemple les ionophores de calcium, activent PKC- $\zeta$ , qui aboutit à l'activation de PAD4 ; alors que le PMA active la PKC- $\alpha$  et, par conséquent, inhibe PAD4 (Radic and Neeli, 2013) ; tandis que les deux stimuli induisent la libération de chromatine. Néanmoins, il existe également des études qui rapportent la présence de dépôts d'histones citrullinées dans des NET après stimulation par PMA (van der Linden et al., 2017; Martinod et al., 2016).

Il est possible que la NETose diffère entre l'homme et la souris, c'est pour cela qu'on suppose actuellement que PAD4 est en partie activé mais pas nécessaire lors de la NETose chez l'homme.

Une autre enzyme requise pour former des NET est une sérine protéase : la NE. Le mécanisme proposé pour son action est la dégradation spécifique des histones qui déstabilise la chromatine (Papayannopoulos et al., 2010). En outre, le blocage de la formation de NET a également été démontrée *in vivo* sur des souris NE-KO infectées par des bactéries Gram négatives (Farley et al., 2012) ou positives (Kolaczowska et al., 2015). En outre, l'utilisation

de l'inhibiteur de NE a conduit à l'inhibition de la formation de NET induite par *C. albicans* (Papayannopoulos et al., 2010) et lors de thrombose stérile chez des souris KO-NET, seuls 20% des PNN produisent des NET (Martinod et al., 2016).

Cela indique que le PAD4 et la NE sont impliqués dans la formation de NET, mais pourrait être plus ou moins redondant en fonction de l'état de la maladie et/ou des stimuli. Par exemple, pendant la septicémie par *S. aureus*, les PNN NE<sup>-/-</sup> n'ont pas produit de NET alors que quelques PNN PAD4<sup>-/-</sup> (environ 20%) le font (Kolaczowska et al., 2015), alors que pendant la thrombose veineuse profonde, 80% des PNN NE<sup>-/-</sup> produisent des NET (Martinod et al., 2016) mais aucune structure de ce type n'a été libérée par les cellules PAD4<sup>-/-</sup> (Martinod et al., 2013). Ces résultats reflètent bien la diversité des types de NET, qui varient non seulement dans leur apparence, dans les molécules et voies impliquées mais aussi dans les conséquences pour les cellules productrices.

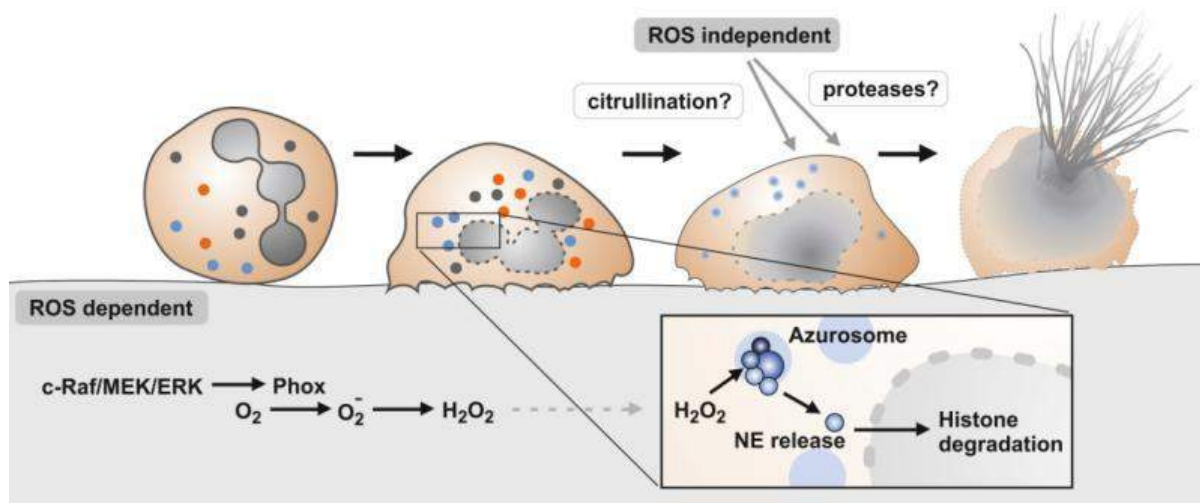
## 6. Voies de signalisation des NET

Les voies conduisant à la génération de NET diffèrent en termes de stimulus d'induction, de dépendance vis-à-vis des espèces oxygénées, de la cinétique du processus et du sort des PNN impliqués (mourir ou survivre après génération de NET) (Papayannopoulos, 2018; Pilsczek et al., 2010). Spécifiquement, des MAPK telles qu'ERK et p38 régulent la génération de NET dépendante de NADPH oxydase (Douda et al., 2015; Hakkim et al., 2011). Une voie rapide, vitale et indépendante des ROS est apparemment la première à être activée chez les PNN en présence de plaquettes activées et de cellules apoptotiques (Manfredi et al., 2018). En fonction des conditions environnementales, d'autres résultats peuvent être envisagés.

### a) NETose dépendante de la NADPH Oxydase

Dans les 1<sup>ères</sup> études, il a été rapporté que la libération des NET dépendait des ROS générées par la voie de la NADPH (Fuchs et al., 2007). Les études ont ensuite été fortement soutenues par l'observation que les patients atteints de maladie granulomateuse chronique (CGD), une maladie qui présente une altération de l'activité de la NADPH oxydase, ne libéraient pas de NET (Bianchi et al., 2009). Par la suite, il a été montré que les Ac (Behnen et al., 2014; Garcia-Romo et al., 2011), les microbes, le cholestérol (Warnatsch et al., 2015) et les stimuli mitogéniques, notamment le PMA et la concanavaleine A, induisaient une NETose dépendante de la NADPH oxydase (Amulic et al., 2017). Ces stimuli déclenchent l'activation de c-Raf, de MEK, d'Akt, d'ERK et de PKC qui, à leur tour, activent la NADPH oxydase (Hakkim et al., 2011), comme illustré en ***Figure 30***.

La NETose dépendante de la NADPH oxydase nécessite l'activation de kinases dépendante des cyclines (CDK) qui tentent de faire sortir les PNN de la phase G0 et de les réintégrer dans le cycle cellulaire (Amulic et al., 2017). En tant que cellules différenciées en phase terminale, l'exigence d'une protéine du cycle cellulaire est surprenante. Les PNN qui subissent une NETose expriment le marqueur de prolifération Ki-67 et CDK6. Les souris déficientes en CDK6 sont plus sensibles à l'infection. Pendant la formation de NET, CDK6 phosphoryle son substrat du cycle cellulaire, une protéine du rétinoblastome. Cependant, les événements de phase S, y compris la synthèse d'ADN et la transcription des gènes des histones, ne se produisent pas pendant la NETose. Par contre, des événements de phase M, tels que la phosphorylation de la lamine et la séparation des centrosomes, font partie de la formation des NET. Ces résultats suggèrent que les PNN utilisent une partie de la machinerie du cycle cellulaire pour désassembler la membrane nucléaire (Sollberger et al., 2018).



**Figure 30 : Formation des NET avec / sans ROS (Sollberger et al., 2018)**

$H_2O_2$  : Peroxyde d'hydrogène,  $NE$  : Neutrophile elastase,  $O_2$  : Oxygène,  $O_2^-$  : Ion superoxyde,  $ROS$  : Espèces réactives de l'oxygène.

Lors de l'activation, les récepteurs sur la surface des neutrophiles initient une cascade entraînant l'assemblage de la NADPH oxydase (Phox) et la production de superoxyde. Le superoxyde se dismute en peroxyde d'hydrogène, qui est détecté par l'azurosome. Ce complexe est composé de plusieurs protéines dont le myéloperoxydase (MPO) qui convertit le peroxyde d'hydrogène en acide halique. Cette conversion libère la neutrophile élastase (NE) et d'autres sérine protéases de l'azurosome dans le cytoplasme. Ces protéases se déplacent vers le noyau et clivent les histones. En parallèle, le noyau délobule et la membrane nucléaire se vésicule, permettant le contact de la chromatine avec les protéines cytoplasmiques et granulaires. Finalement, la membrane cytoplasmique se rompt pour libérer les NET. Une formation de NET indépendante de ROS est possible. Elle se produit en l'absence d'activité de Phox et de MPO et ne nécessite pas de NE. Il peut y avoir d'autres protéases et/ou citrullinations d'histones qui facilitent la décondensation de la chromatine. La dernière étape, similaire à la formation de NET dépendante de ROS, est la rupture de la membrane plasmique et la libération de NET dans l'espace extracellulaire.

## ***b) NETose indépendante de la NADPH oxydase***

Cette indépendance aux ROS à pu être prouvé par des études *in vitro* (Byrd et al., 2013; Gabriel et al., 2010; Mejía et al., 2015) et *in vivo* (Barth et al., 2016; Chen et al., 2012; Kolaczowska et al., 2015) en utilisant des inhibiteurs de la NADPH oxydase et des souris déficientes en cette enzyme. Cette divergence dans les données sur l'implication de ROS est difficile à expliquer à ce stade. Elle pourrait résulter du milieu expérimental ou de la nature des facteurs inducteurs des NET (Farley et al., 2012). Cette dernière étude rapporte une divergence intéressante : PMA mais pas le facteur d'activation plaquettaire (PAF), génère des ROS mais l'inhibiteur de la NADPH oxydase (DPI : Diphenyleneiodonium) réduit la libération de NET par les deux inducteurs (PMA et PAF). Cela peut être expliqué par le fait que le DPI inhibe également une gamme de flavoenzymes, y compris l'oxydase mitochondriale et l'oxyde nitrique synthase (Li and Trush, 1998; Stuehr et al., 1991), qui pourrait remplacer les ROS phagosomales. Ainsi, dans certaines circonstances, la formation de NET pourrait dépendre des ROS phagosomales (dépendante de NADPH, (Fuchs et al., 2007)) mais aussi des ROS mitochondriales (van der Linden et al., 2017; Lood et al., 2016) ou du NO (Patel et al., 2010).

## **7. Composants des NET**

La chromatine nucléaire décondensée constituée d'acides nucléiques (ADN) et de protéines (histones principalement, chargées positivement) constitue l'épine dorsale d'un NET. Les histones (représentant environ 70% de la teneur en protéines des NET) facilitent l'adhésion aux pathogènes microbiens et viraux (chargés négativement) et les histones (Brinkmann and Zychlinsky, 2012) et les acides nucléiques (Halverson et al., 2015) peuvent en soi exercer une activité bactéricide. D'autres peptides antimicrobiens associés aux NET comprennent des protéines granulaires, cytoplasmiques et cytosquelettiques (Jaillon et al., 2007; Kolaczowska and Kubes, 2013). En outre, il est concevable que les NET contiennent des molécules effectrices (NE) ou des constituants libérés par les cellules voisines, comme le montre une étude sur le piégeage et la dégradation des médiateurs pro-inflammatoires par des NET agrégées *in vitro* et *in vivo*, dans le cas de la goutte (Schauer et al., 2014). Ainsi, non seulement les stimuli induisant la formation de NET sont multiples mais aussi le protéome des NET peut différer selon la localisation (tissu contre circulation), la maladie et son stade (aiguë contre chronique) (Sørensen and Borregaard; Urban et al., 2009; Yang et al., 2016). Néanmoins, une vingtaine de protéines (principalement dérivées des PNN) ont été proposées

pour la composition protéique de base des NET incluant les histones, la MPO, la NE, la PR3, la CG et les  $\alpha$ -défensines (Brinkmann et al., 2004; Rahman and Gadjeva, 2014).

## 8. Techniques de détection et de quantification des NET

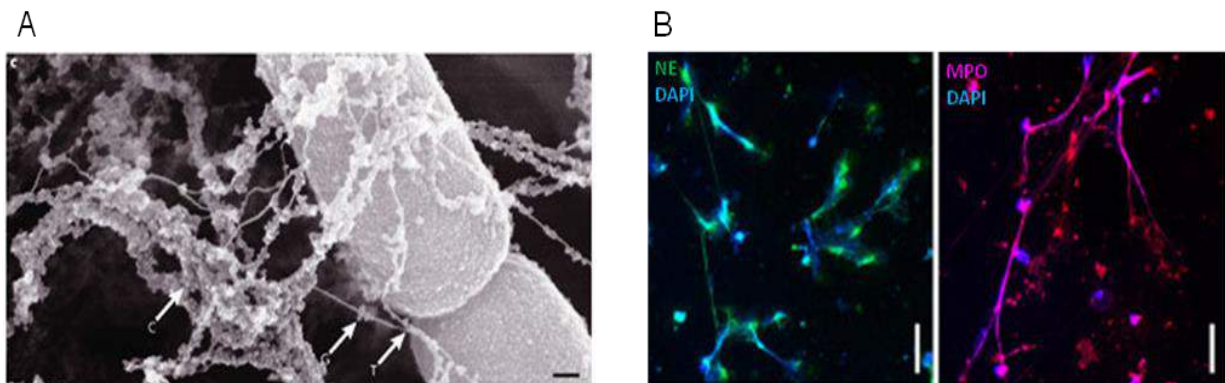
Au cours de la dernière décennie, les chercheurs ont étudié de manière approfondie la «NETose» en utilisant principalement des techniques qui ne distinguent pas les deux phénomènes : libération de NET et mort cellulaire du PNN. Par exemple, les tests les plus largement utilisés pour vérifier la libération de NET sont le marquage par le Picogreen et le Sytox. Deux méthodes qui permettent la détection de l'ADN soit pour visualiser par microscopie, soit pour profiler dans le milieu extracellulaire. Cependant, comme ces méthodes détectent également la libération passive de la chromatine liée à la nécrose, il est difficile de distinguer ce processus d'une expulsion proactive de la chromatine (Arai et al., 2013). D'autres chercheurs utilisent à la place le test de la lactose déshydrogénase (LDH) pour mesurer la formation de NET *in vitro* (Mori et al., 2012). Cependant, ce test mesure la survie cellulaire ou la toxicité ; les cellules et les tissus libèrent de la LDH suite à des dommages toxiques ou liés aux blessures (François et al., 2000), ce qui rend ce test très peu spécifique pour distinguer la formation de NET et la mort cellulaire. La détection de la citrullination des histones par immunoblot ou immunohistologie semble être un bon indicateur de la formation de NET (Li et al., 2010), la citrullination induisant la décondensation de la chromatine qui est une étape essentielle de la libération des NET (Wang et al., 2009).

Ainsi, il apparaît important d'utiliser une combinaison de techniques alliant visualisation et caractérisation biochimique, en suivant plusieurs marqueurs complémentaires.

Comme illustré en **Figure 31**, une technique largement utilisée pour tester la formation de NET est la microscopie, en utilisant plus précisément de l'immunofluorescence, de la microscopie confocale ou électronique pour caractériser la présence de NET en détectant la co-localisation de protéines spécifiques aux NET et de l'ADN, et la morphologie des NET (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007). Cependant, le principal inconvénient de l'utilisation de la microscopie est le besoin de fixation cellulaire avant les examens microscopiques. Par conséquent, cette technique ne peut pas vraiment distinguer le processus de formation de NET et de mort cellulaire. C'est pour cela que plusieurs équipes ont opté pour l'ELISA ("Enzyme-linked immunosorbent assay"), une technique pour détecter les complexes protéines-ADN spécifiques aux NET, par exemple les complexes ADN-MPO ou ADN-NE (Kessenbrock et al., 2009; Sayah et al., 2014), comme indicateur de la formation de NET.

Cependant, bien que ces essais confirment la présence de NET, ils ne parviennent pas à distinguer la formation de NET et la mort cellulaire.

En revanche, la visualisation par vidéo imagerie séquentielle (microscopie) a permis d'observer la formation des NET. Les PNN sont imagés en utilisant une combinaison de marqueurs nucléaires (Sytox, Hoechet), cytoplasmique (colorants calciques) et des colorants de mort cellulaire (iodure de propidium, annexine V), permettant d'identifier différents composants de la formation de NET et de la mort cellulaire, d'une manière dépendante de chaque stimulus et du temps (Fuchs et al., 2007). De plus, Zhao W et al. ont rapporté que la combinaison de deux techniques microscopie et cytométrie en flux, permettrait la détection simultanée et la quantification des NET formés, tout en permettant la distinction entre NETose suicidaire ou vitale (Zhao et al., 2015).



**Figure 31 : Observation des NET par microscopie électronique et immunohistochimie (Brinkmann and Zychlinsky, 2007; Sur Chowdhury et al., 2014)**

*DAPI* : Diamidino phénylindol, *MPO* : Myéloperoxydase, *NE* : Neutrophile élastase.

(A) Observation de la capture de la bactérie *Shigella flexneri* par les NET en microscopie électronique à balayage. Les flèches blanches montrent les NET. (B) Immunohistochimie pour visualisation des composants des NET après stimulation des PNN de donneurs sains avec du liquide synovial de patients PR. L'ADN est marqué en bleu par le DAPI alors que la NE et la MPO sont marquées en vert et en rose, respectivement.

## 9. Fonctions physiologiques des NET

Les PNN sont essentiels à la mission homéostatique consistant à protéger les tissus de l'hôte, à répondre rapidement et diversement aux atteintes des barrières à l'infection de l'hôte et à ramener les tissus à l'état stérile. Comme la plupart des phagocytes professionnels, les PNN réagissent lorsqu'ils sont provoqués par des proies volumineuses. Les PNN tuent les microbes par la phagocytose, la génération d'espèces oxydantes et l'activation de la machinerie protéolytique cellulaire. La libération de NET remplace la phagocytose frustrée ou inefficace, et améliore l'efficacité de la réponse innée face aux microbes envahisseurs. De plus, les NET contrebalancent les stratégies microbiennes pour échapper à la réponse immunitaire. En raison des propriétés adhésives des acides nucléiques et de l'action dans l'environnement extracellulaire des histones et des enzymes, les NET contribuent à la défense de l'hôte contre diverses espèces microbiennes (Sørensen and Borregaard). La chromatine extracellulaire issue des NET peut avoir évolué pour défendre les organismes eucaryotes contre l'infection, et sa libération a au moins trois fonctions : le piégeage et la destruction des microbes, l'amplification des réponses immunitaires et l'induction de la coagulation. Cependant, certaines bactéries produisent des nucléases pour échapper à cette défense (Derré-Bobillot et al., 2013).

Le facteur von Willebrand adsorbé sur les NET, les histones citrullinées et les charges négatives d'acide nucléique concourent au recrutement et à l'activation des plaquettes, ce qui a un impact sur l'hémostase et favorise finalement la thrombose (Fuchs et al., 2010). La thrombose initiée par l'immunité innée, également appelée «immunothrombose», joue un rôle de plus en plus reconnu dans la protection des vaisseaux, limitant la croissance intravasculaire et la propagation hématogène des agents infectieux (Engelmann and Massberg, 2013; Massberg et al., 2010). Inversement, les mécanismes endogènes impliquant la DNase1 et la DNase1-like 3 contrôlent le potentiel thrombogène des NET *in vivo*, dans des conditions où les stimuli microbiens et stériles sont responsables de l'activation des PNN (Jiménez-Alcázar et al., 2017).

De plus, il a été montré que les NET avaient la capacité d'améliorer les réponses immunitaires adaptatives et cela en "primant" les LT directement afin de réduire leur seuil d'activation et en permettant la maturation des pDC (sur-expression de HLA-II, CD80, 83, 86) (Tillack et al., 2012, 2012), et leur clairance par les MΦ (endocytose) qui est facilitée par l'opsonine C1q et la digestion par la DNase était un phénomène immunologiquement silencieux (sans induction de cytokines pro-inflammatoires), servant ainsi à préserver l'homéostasie tissulaire (Farrera and Fadeel, 2013).

Les animaux, les plantes et même les eucaryotes unicellulaires (Zhang et al., 2016) utilisent la chromatine dans l'immunité. Il est intéressant de noter que les travaux réalisés par Hawes et al. montrent que les champignons pathogènes provoquent la libération de la chromatine par les racines des plantes et que ces structures extracellulaires sont essentielles à la défense (Hawes et al., 2016).



## 10. Rôles pathologiques des NET : exemples de maladies inflammatoires

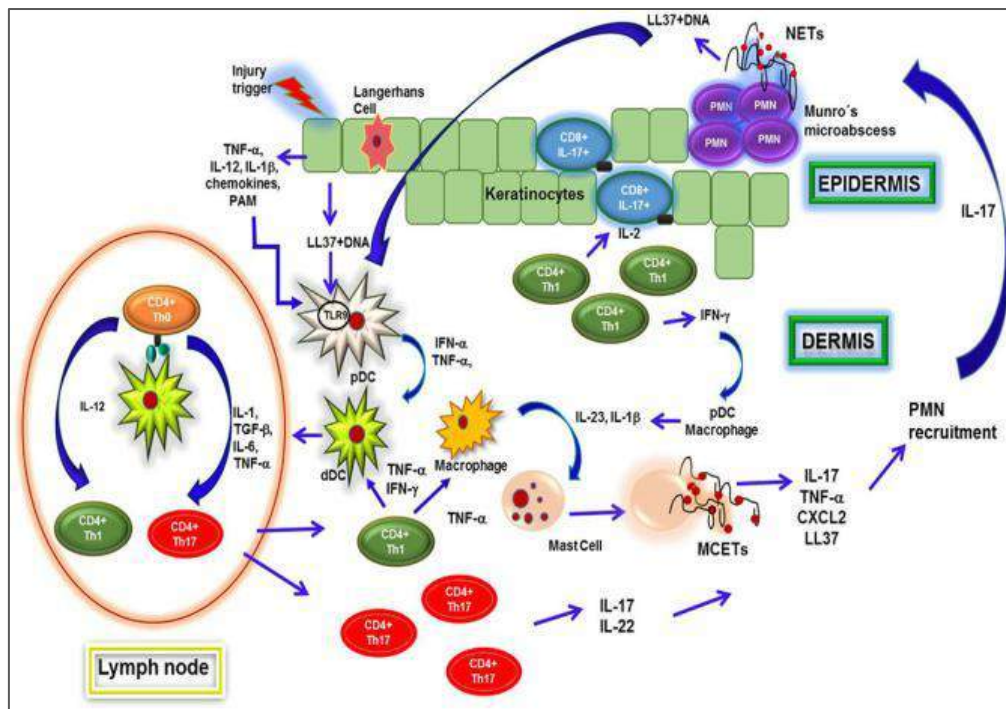
Dans cette partie j'ai choisit de mettre le point sur le rôle des NET sur quelques maladies autoimmunes à composante rhumatismale, tels que le psoriasis, le lupus et la polyarthrite rhumatoïde.

### *a) NET dans le psoriasis*

Les NET sont impliqués dans la phase précoce et tardive du psoriasis. Ganguly et al., ont suggéré que le LL-37, peut se lier à l'ADN ou l'ARN pour former des complexes qui sont présents sur la peau de patient psoriasique. Le complexe comprenant le LL-37 et l'ADN est détecté par les pDC, ensuite transporté au TLR9 endosomal de ces cellules, pour finalement augmenter la production d'IFN- $\alpha$  et cet ADN pourrait être celui des NET (Delgado-Rizo et al., 2017), comme montré en **Figure 32**. En revanche, le complexe LL-37-ARN peut déclencher l'activation des mDC et lier leur TLR7 dans l'endosome pour induire la production de cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. La production de ces cytokines conduit finalement à une réponse auto-inflammatoire et induit l'apparition du psoriasis (Ganguly et al., 2009).

L'inhibiteur de la protéase leucocytaire sécrétoire (SLPI) est une protéine cationique qui se lie à l'ADN des NET et participe à la régulation des pDC. Grâce à la co-localisation de SLPI, des NET et des pDC dans la peau psoriasique, les pDC activées induisent une importante production d'IFN de type 1 qui est dépendante du TLR9 intracellulaire (Skrzeczynska-Moncznik et al., 2012). D'autres recherches visant à élucider le rôle de SLPI dans le psoriasis ont montré que la génération de NET était beaucoup plus efficace chez les souris déficientes pour SLPI ( $^{-/-}$ ) par rapport aux sauvages. Ce résultat met en avant le rôle de contrôle des SLPI dans la génération de NET (Zabieglo et al., 2015).

De plus, Hu et al. ont observé plus de cellules en NETose dans le sang périphérique des patients atteints de psoriasis par rapport aux DS. Ce nombre de cellules semblent par ailleurs être corrélé à la gravité de la maladie. De plus, les PNN subissant une NETose sont plus fréquemment présents dans les plaques psoriasiques et les NET libérés sont de puissants inducteurs du peptide antimicrobien  $\beta$ -défensine-2 humaine (HBD-2) produit par les kératinocytes épidermiques (Hu et al., 2016). Ceci pourrait expliquer en partie la faible sensibilité des patients aux infections microbiennes.



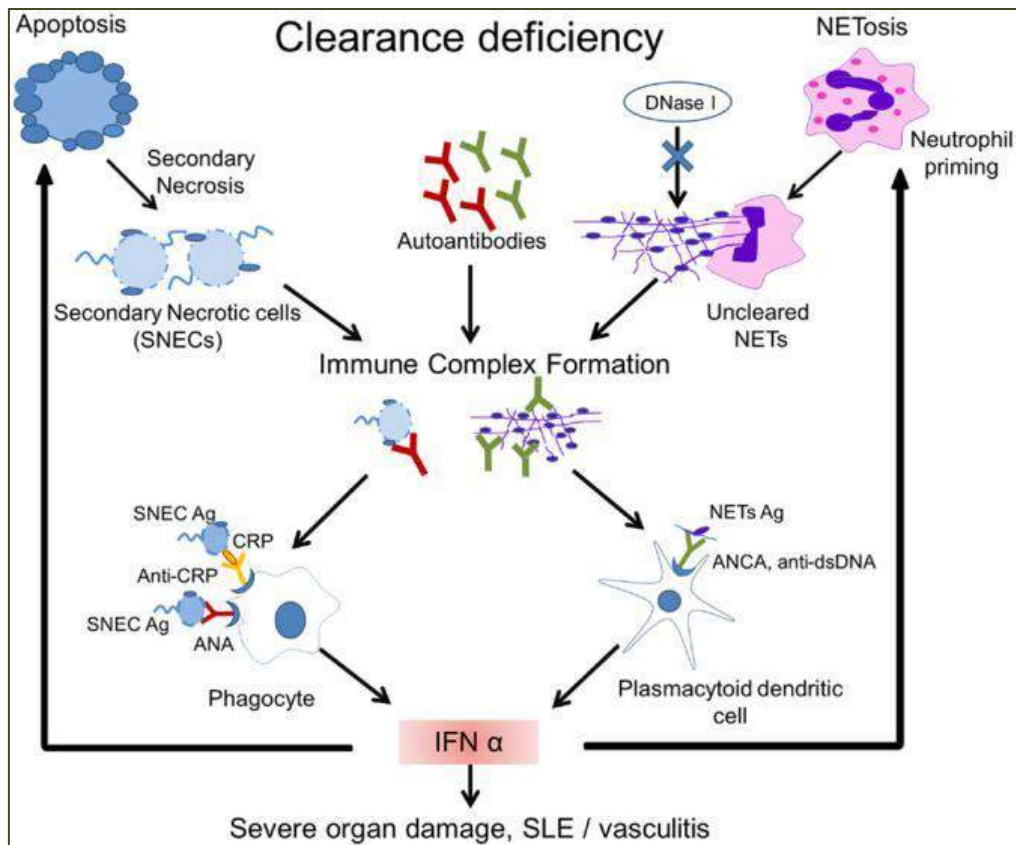
**Figure 32 : Formation des NET dans les plaques psoriasiques (Delgado-Rizo et al., 2017)**

**CD** : Cluster de différenciation, **CXCL** : Chimiokine, **DNA** : Acide désoxyribonucléique, **IFN** : Interféron, **IL** : Interleukine, **LL-37** : Cathélicidine, **MCET** : Piège extracellulaire libéré par les mastocytes, **NET** : "Neutrophil Extracellular Traps", **pDC** : Cellules dendritiques plasmacytoïdes, **PMN** : Neutrophiles, **TGF** : Facteur de croissance transformant, **Th** : Lymphocytes T auxiliaires, **TLR** : Récepteur de type Toll, **TNF** : Facteur de nécrose tumorale.

Les lésions psoriasiques chez les patients sont causées par des lésions cutanées qui induisent la libération de cytokines pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens par les kératinocytes. Ces molécules, comme le cathélicidine LL37, forment des complexes en se liant à l'ADN qui activent les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) par interaction avec le TLR9, ce qui les amène à sécréter de l'IFN-α et du TNF-α. Ces cytokines régulent l'activation des cellules dendritiques dermiques (dDC), qui migrent vers les ganglions lymphoïdes régionaux pour présenter des autoantigènes aux cellules T CD4 (Th0) naïves. Par la suite, les lymphocytes T se différencient en Th1 ou Th17 et migrent vers le derme, où ils sécrètent l'IL-2, l'IFN-γ, le TNF-α, l'IL-22 et l'IL-17 qui contribuent au recrutement et à l'activation des macrophages, des dDC et des mastocytes. Ces cellules synthétisent l'IL-23 et l'IL-1β et induisent ainsi la libération des pièges extracellulaires des mastocytes (MCET). En conséquence, le contenu intracellulaire des mastocytes est libéré avec l'IL-17 et d'autres cytokines, qui induisent l'infiltration des neutrophiles dans l'épiderme et la formation des microabcès de Munro. Les neutrophiles se retrouvent ainsi dans un microenvironnement avec des concentrations élevées d'IL-23 et d'IL-1β, entraînant ainsi la libération de NET. Grâce à la formation des NET, ils sécrètent également des contenus cellulaires, y compris l'IL-17, amplifiant ainsi le processus inflammatoire et augmentant le recrutement des cellules et l'activation des kératinocytes. Enfin, les NET sont des sources importantes de complexes LL37-ADN et d'IL-17, qui activent les pDC et les kératinocytes qui, à leur tour, produisent de l'IFN-α et du LL37, respectivement. Les cellules Th1 induisent l'activation des cellules T CD8 productrices d'IL-17 dans l'épiderme et les pDC dans le derme, perpétuant l'environnement inflammatoire dans les lésions psoriasiques.

## *b) NET dans le lupus*

Les NET ont été largement étudiés dans le lupus car l'ADNdb en est un marqueur. Chez les patients atteints de LES, le matériel nucléaire dérivé des cellules mortes s'accumule en raison de l'échec de son élimination. Ces auto-Ag sont présentés aux cellules B autoréactives dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires par des DC folliculaires, générant ainsi des auto-Ac dirigés contre les composants cellulaires dérivés de la NETose et de l'apoptose (Mahajan et al., 2016). La production et le dépôt dans les tissus de complexes immuns activent le système du complément et induit une inflammation, une lésion vasculaire et cutanée, une thrombose et des lésions cérébrales et rénales (Lande et al., 2011; Smith and Kaplan, 2015). Les CI sont internalisés par les pDC à travers l'endocytose médiée par le récepteur Fc $\gamma$  de type II ; ensuite, ils s'associent au TLR7 et 9 sur les endosomes, ce qui conduit à l'activation des pDC sécrétant de l'IFN- $\alpha$  (cytokine clé du lupus) et à la formation supplémentaire de NET par les PNN (Banchereau and Pascual, 2006a; Mahajan et al., 2016), comme illustré en ***Figure 33***.



**Figure 33 : Pathogénèse du lupus (Mahajan et al., 2016)**

**Ag** : Antigène, **ANA** : Anticorps anti neutrophiles, **ANCA** : Anticorps cytoplasmiques anti neutrophiles, **CRP** : Protéine C réactive, **dsDNA** : Acide désoxyribonucléique double brin, **IFN** : Interféron, **NET** : "Neutrophil Extracellular Traps", **SLE** : Lupus érythémateux systémique.

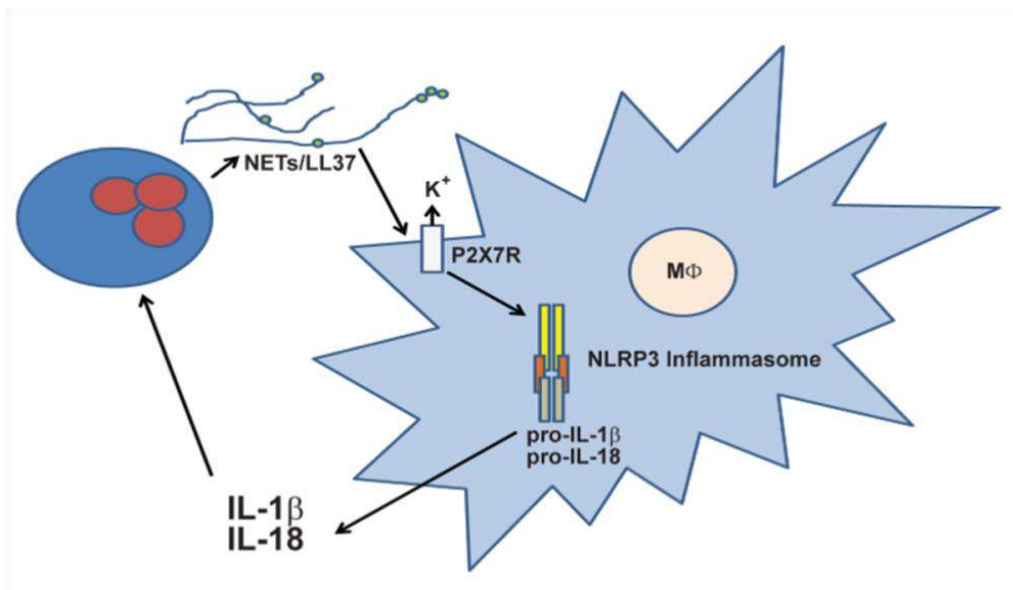
La clairance des cellules apoptotiques et des NET est le principal facteur contribuant à l'étiopathogénèse du LES. Une clairance inefficace des cellules apoptotiques conduit à l'accumulation de cellules nécrotiques secondaires (SNECs), ainsi qu'à la libération de cytokines pro-inflammatoires par des phagocytes pathologiquement activés. Les SNEC circulantes sont sensibilisées par des auto-anticorps. Cela entraîne le dépôt de complexes immuns (CI). Les CI sont ensuite éliminés par les phagocytes sanguins, tels que les M $\Phi$  et les DC, qui libèrent par conséquent de l'IFN- $\alpha$  et d'autres cytokines inflammatoires. La production d'IFN- $\alpha$  précipite la mort cellulaire et les dommages aux organes et induit la NETose. Les NET servent de source d'autoantigène, reconnus par les anticorps cytoplasmiques antineutrophiles et anti-ADN. L'internalisation des complexes immuns d'ANCA par les pDC provoque une libération accrue d'IFN- $\alpha$ . Des taux accrus d'IFN- $\alpha$  amènent les neutrophiles à subir une NETose. La présence d'inhibiteurs de la DNase, d'autoanticorps anti-ADNdb et de faibles niveaux d'opsonines chez les patients atteints de LES aggrave la clairance des NET. Un cercle vicieux est initié entraînant la formation et le dépôt de CI, l'inflammation, la mort cellulaire et les dommages aux organes.

Les patients lupiques possèdent une sous-population distincte de PNN dans le sang connus sous le nom de granulocytes à faible densité (LDG). Ce sont des PNN immatures qui subissent rapidement l'apoptose et libèrent des ROS *in vitro*, agissant ainsi comme des producteurs puissants de NET chez ces patients (Smith and Kaplan, 2015). Grâce à la formation de NET, le contenu intracellulaire des LDG est libéré dans le microenvironnement

comprennant plusieurs molécules telles que le LL37, l' $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines et HMGB1 ; ces molécules s'associent aux acides nucléiques et induisent l'activation de pDC par la stimulation de TLR9, qui induit ensuite la synthèse d'IFN- $\alpha$ . Il a été observé que, chez les patients LES, l'IFN- $\alpha$  est un puissant inducteur de NETose (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011) et, avec l'IL-6 dérivée de pDC activées, favorise la différenciation des cellules B autoréactives sécrétant des auto-Ac (Dubois et al., 1998). A son tour, l'IFN- $\alpha$  favorise la différenciation des monocytes en pDC (Blanco et al., 2001).

Notons qu'il existe une sous-population de patients lupiques présentant une faible capacité à dégrader les NET et cela est associée à une néphrite lupique (Hakim et al., 2010).

Kahlenberg et al. ont décrit un mécanisme par lequel les NET et le LL-37 pourraient activer l'inflammasome NLRP3 des M $\Phi$  issus de patients LES. Comme illustré en **Figure 34**, ce mécanisme permet une perpétuation de la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 qui a son tour favorise l'inflammation et la NETose. Ceci confirme qu'une NETose abérante durant le LES est pathogène en favorisant la perpétuation des réponses inflammatoires (Kahlenberg et al., 2013).



**Figure 34 : Activation possible de l'inflammasome NLRP3 par les NET durant le LES (Kahlenberg et al., 2013)**

*IL* : Interleukine, *LL-37* : Cathélicidine, *M $\Phi$*  : Macrophages, *NET* : "Neutrophil Extracellular Traps", *NLRP* : Récepteur de type NOD, *P2X7R* : Récepteur purinergique.

Les NET contenant du LL-37 peuvent activer la caspase-1 via le P2X7R permettant ainsi l'activation de l'inflammasome NLRP3 et donc la libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 qui à leur tour stimulent la NETose, conduisant à une boucle de maintien de la production de NET et d'activation de l'inflammasome.

### *c) NET dans la polyarthrite rhumatoïde*

Même si la pathogénèse de la PR n'est pas entièrement comprise, de nombreuses recherches suggèrent que les ACPA jouent un rôle clé dans la PR. Les ACPA peuvent reconnaître des protéines nucléaires (par exemple des histones), des protéines cytoplasmiques (par exemple la vimentine et l'énolase), les protéines associées à la membrane (par exemple la myéline) et les protéines extracellulaires (par exemple la filaggrine, le CII, le fibrinogène et la calréticuline) (Makrygiannakis et al., 2006; Valesini et al., 2015). Or, la NETose est associée à la citrullination de protéines par la PAD. De plus, on retrouve des PNN dans le liquide articulaire de patients PR (Yu et al., 1997) ainsi que des dépôts de chromatine (Monach et al., 2009). Ces pour ces raison qu'il a été supposé que les NET pourraient être une source d'auto-Ag.

Khandpur et al. ont révélé que les PNN sont une source de NET impliqués dans la pathogénèse de la PR. En comparant des échantillons issus de patients atteints de PR, de DS ou de patients OA, ils trouvent que les PNN produisant des NET sont présents dans le sang périphérique, le liquide synovial, le tissu synovial, les nodules rhumatoïdes et la peau des patients atteints de PR. Le niveau de NETose *in vitro* est en corrélation avec la présence d'ACPA et les niveaux de marqueurs inflammatoires systémiques tels que la CRP (Khandpur et al., 2013).

Spengler et al., ont révélé que les NET expriment des niveaux élevés de PAD et les PAD actives sont externalisées et accumulées dans le LS des patients atteints de PR comparé à ceux des patients atteints d'OA (Spengler et al., 2015). Des mutations de PAD4 sont capables d'induire une hypercitrullination des histones dans le noyaux des PNN, entraînant la formation et l'accumulation de produits citrullinés dans l'espace synovial (Abbas et al., 2014).

Les NET dans la PR favorisent l'activation et la libération de cytokines par les FLS, qui sont impliquée dans les dommages articulaires (Khandpur et al., 2013). La cascade de transduction du signal qui inclut la production de ROS, de MPO, de NE, de PAD4 et d'histone citrullinée 3 (citH3) est considérablement améliorée pour promouvoir la NETose dans la PR. Puisque le contenu et les dérivés des NET (l'ADN, l'élastase, le nucléosome libre, la NE et la MPO) sont augmentés dans les sérums et LS de patients PR, ils pourraient être utilisés comme biomarqueurs potentiels pour le diagnostic de cette pathologie. Par exemple, le taux plasmatique de nucléosome libre peut être utilisé grâce à sa sensibilité (91%) (Pérez-Sánchez et al., 2017; Sur Chowdhury et al., 2014).

Plusieurs études ont eu pour but de moduler la NETose afin de traiter la PR. Les Ac anti-Fc $\alpha$ RI étaient capables de réduire la formation de NET *in vitro* après l'exposition de PNN isolés à des CI IgA, suggérant que le blocage de Fc $\alpha$ RI peut réduire l'activation des PNN et la formation de NET chez les patients atteints de PR (Aleyd et al., 2016). Yu et al. ont rapporté que le celastrol diminue la formation de NET par les PNN de DS et de patients PR, tout en bloquant l'explosion oxydative, et inhibant la phosphorylation de MAPKK/MEK, la régulation du signal d'ERK et de NF $\kappa$ B et la citrullination des histones (Yu et al., 2015). Le tocilizumab (TCZ), une biothérapie utilisée pour le traitement de la PR en bloquant l'IL-6R, a été identifié comme ayant la capacité de bloquer aussi la NETose, car les PNN de patients non traités libèrent plus de fibres d'ADN suite à la stimulation par IL-6 ou PMA par rapport à ceux traités avec TCZ (Ruiz-Limón et al.). Pérez-Sánchez et al. ont rapporté qu'un traitement avec TCZ ou infliximab pendant 6 mois améliore l'activité de la maladie, diminue les médiateurs inflammatoires et diminue l'ADN dans l'espace extracellulaire en réduisant la formation de NET chez ces patients (Pérez-Sánchez et al., 2017).

L'association entre parodontite et PR est connue et il est important de noter que les PNN jouent un rôle central dans cette association (Mikuls et al., 2012; Scher et al., 2012). *Porphyromonas gingivalis* est une bactérie anaérobie responsable de la parodontite (Pérez-Chaparro et al., 2008). Il est intéressant de noter qu'une augmentation de la NETose a été observée chez les PNN incubés avec du liquide gingival de patients atteints de parodontites et que *Porphyromonas gingivalis* peut induire la formation de NET (Vitkov et al., 2010), en sachant que cette bactérie est le seul procaryote connu qui exprime la PAD, enzyme nécessaire à la citrullination durant la NETose (Kinloch et al., 2011).

Comme cela se produit dans d'autres maladies auto-immunes, les NET peuvent agir comme une source d'auto-Ag extracellulaires ; car il a été rapporté que les peptides citrullinés sont largement représentés dans le LS de patients PR et que l'activité de PAD2 et 4 est surexprimée chez les PNN de patients PR (Foulquier et al., 2007; Khandpur et al., 2013). De tels peptides citrullinés sont reconnus par les ACPA, formant ainsi des CI qui induisent la formation de NET, entraînant la libération du contenu granulaire des PNN ainsi que des auto-Ag cytoplasmiques dans les articulations. Ils peuvent également libérer le récepteur activateur du NF- $\kappa$ B et le facteur d'activation des LB, activant respectivement les ostéoclastes et les LB (Assi et al., 2007; Chakravarti et al., 2009), entraînant des réponses immunitaires innées et adaptatives excessives dans les articulations et les lésions tissulaires.

Les ACPA sont détectés dans le sérum des patients atteints de PR des années avant le début de la maladie et même avant l'apparition des symptômes cliniques, et représentent donc un biomarqueur précoce de la PR (Chang et al., 2005).

Les premiers événements menant au développement de la PR restent flous, mais la formation d'ACPA est considérée comme un phénomène pathogène clé. Au cours de la NETose, les PNN externalisent les auto-Ag citrullinés impliqués dans la pathogénèse de la PR, et les ACPA dirigés contre la vimentine citrullinée induisent la formation de NET (Khandpur et al., 2013). En outre, Pratesi et al. identifient l'histone H4 citrullinée comme l'auto-Ag spécifique des ACPA sur les NET (Pratesi et al., 2014). Tout cela permet de supposer qu'il existerait une boucle de perpétuation de l'induction de NET et de production d'ACPA durant la PR. Les NET pourraient non seulement être la cible des ACPA mais aussi l'auto-Ag inducteur.

Wang et al. ont montré récemment que les patients PR présentaient un niveau élevé de complexe ADN-MPO en comparaison aux DS, et ce niveau était associé à une augmentation du nombre de PNN et à la positivité aux FR et aux ACPA, suggérant que l'évaluation de ce genre de complexe dans le sérum de patients pourrait être un outil complémentaire dans le diagnostic (Wang et al., 2018).

Le blocage de PAD4 réduit nettement la fréquence des Th1 dans les ganglions lymphatiques drainants des souris immunisées. L'exposition de DC à des NET de souris AEC induit une maturation de ces cellules, caractérisée par une régulation positive de l'expression de leurs molécules de co-stimulation et une augmentation de la sécrétion d'IL-6. De plus, ces DC favorisent l'induction de cellules Th1 spécifiques de l'Ag *in vitro* (Papadaki et al., 2016).



---

# OBJECTIFS

---

## Objectifs

---

L'objectif de cette thèse qui a duré 3 ans avait pour but principal et unique de mettre en évidence le rôle et l'implication des "Neutrophil Extracellular Traps" dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.

Depuis que Brinkmann et al. en 2004 ont reconnu et donné un nom à cette nouvelle forme de « mort » cellulaire (Brinkmann et al., 2004) qui a initialement été découverte en 1980 par Tsan (Tsan, 1980), le monde de l'immunologie a connu une révolution menant de nombreux chercheurs à étudier le rôle de la NETose dans de nombreuses maladies telles que les maladies autoimmunes.

Dans notre cas, puisqu'on savait que les neutrophiles étaient nombreux et représentaient plus de 80 % des cellules infiltrées dans le liquide synovial de PR et qu'ils étaient présents dans les tissus articulaires, nous avons supposé que les PNN agissaient en partie dans la pathologie de la PR via l'extériorisation de leur filament d'ADN par NETose.

De plus, les travaux de Khandpur et al. ont montré une augmentation de la NETose chez les patients atteints de PR ; une corrélation positive entre les taux d'ACPA, l'augmentation de marqueurs de l'inflammation et la NETose a été en faveur de notre postulat (Khandpur et al., 2013). De plus, comme décrit dans ce manuscrit, les NET sont des filaments d'ADN associés à des protéines qui en partie subissent une citrullination, donc cela nous a permis de suggérer que les NET pouvaient être une source d'auto-antigènes citrullinés et de molécules modulatrices puisque les complexes chromatine-protéines des granules, relargués par les PNN durant la NETose, pouvaient être la cible des ACPA, voire entraîner la rupture de tolérance observée dans la PR. Cela nous a permis d'orienter notre travail dont le but était de mettre en évidence un rôle pro-inflammatoire des NET dans la PR, en plus de leur rôle antigénique.

Pour mettre en évidence cet effet pro-inflammatoire possible nous avons évalué le rôle de ces NET dans de nombreux types cellulaires qui jouent un rôle important dans le maintien de l'inflammation au cours de la PR à savoir les PNN, les monocytes et les M $\Phi$ , qui participent activement via leur importante production de médiateurs pro-inflammatoires et les DC qui sont des cellules présentatrices d'antigène qui pourraient présenter l'auto-antigène porté par les NET aux LT naïfs initiant ainsi leur maturation et la différenciation des LT, suggérant ainsi un rôle immunogène au sens large de cette chromatine extériorisée.

Par la suite, nous avons voulu savoir par quel mode d'action les NET agissaient. Pour ce faire, nous avons voulu savoir si les NET étaient reconnus par les ACPA et si leur activité dépendait de la reconnaissance des protéines citrullinées par ces auto-anticorps ou au contraire si l'ADN des NET était l'initiateur de l'activation ou simplement de la reconnaissance par les cellules cibles.

## Objectifs

---

Pour illustrer cette dernière hypothèse, nous avons étudié la reconnaissance des NET par trois molécules faisant partie intégrante de l'immunité innée et ayant la capacité de lier l'ADN, à savoir : 1) le TLR-9, puisqu'on sait qu'une réponse TLR excessive entraîne une libération incontrôlée de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans la PR (Acheke et al., 2016) ; 2) le C1q, comme il a été rapporté par Van Schravendijk et al. que la protéine C1q du complément pouvait lier l'ADN (Van Schravendijk and Dwek, 1982) et que le C1q est impliqué dans la pathogénèse de la PR (Trinder et al., 1997) ; 3) et enfin, le LL-37, ce peptide anti-microbien produit en partie par les PNN, et qui joue surtout le rôle de transporteur d'ADN extracellulaire (Chamilos et al., 2012). De plus, ce peptide antimicrobien est présent en quantité importante dans le liquide et le tissu synoviale de patient atteints de PR (Hoffmann et al., 2013). Cette étude a permis de mettre au point la préparation de NET de souris afin de les utiliser sur des cellules provenant de souris déficiente en TLR9 ou C1q en comparaison à des souris sauvages

Par ailleurs, puisqu'il est connu que le TNF et l'IL-1, généralement libérés en quantités plus élevées par les MΦ M1 pro-inflammatoires, sont abondants dans la PR, tandis que l'activité IL-10, caractéristique des M2 anti-inflammatoires, est relativement diminuée chez les patients atteints de PR (Kennedy et al., 2011), nous avons voulu étudier le rôle des NET sur ces deux populations macrophagiques afin de confirmer l'effet pro-inflammatoire potentiel des NET durant la PR.



---

# RESULTATS

---

# A. Article : Article soumis: les NET exercent une activité pro- et anti-inflammatoires dans la PR qui est modulée par C1q et LL-37

**Neutrophil extracellular traps exert both pro- and anti-inflammatory actions in rheumatoid arthritis that are modulated by C1q and LL-37**

**Sarra Seninet**<sup>1,2,†</sup>, Matthieu Ribon<sup>1,2,†‡</sup>, Julie Mussard<sup>1,2,#</sup>, Mireille Sebbag<sup>3,4,5</sup>, Cyril Clavel<sup>3,4</sup>, Guy Serre<sup>3,4</sup>, Marie-Christophe Boissier<sup>1,2,6</sup>, Luca Semerano<sup>1,2,6</sup> and Patrice Decker<sup>1,2,\*</sup>

## Affiliations

<sup>1</sup>University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France.

<sup>2</sup>Inserm UMR 1125, Li2P, Bobigny, France.

<sup>3</sup>University of Toulouse, Toulouse, France.

<sup>4</sup>Inserm UMR 1056, Toulouse, France.

<sup>5</sup>Inserm UMR 1220, Toulouse, France.

<sup>6</sup>Avicenne Hospital, Rheumatology Department, AP-HP, Bobigny, France.

\*To whom correspondence should be addressed: [patrice.decker@univ-paris13.fr](mailto:patrice.decker@univ-paris13.fr)

† M.R. and S.S. contributed equally to this work.

‡ Present e-mail address: [matthieu.ribon@icm-institute.org](mailto:matthieu.ribon@icm-institute.org)

# Present e-mail address: [julie.mussard@lyon.unicancer.fr](mailto:julie.mussard@lyon.unicancer.fr)

## Abstract

It has been suggested that neutrophil extracellular traps (NET), produced by activated polymorphonuclear neutrophils (PMN), may play a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), a chronic inflammatory disease characterized by production of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA). Indeed, RA PMN show enhanced NETosis, NET are a source of citrullinated autoantigens and RA autoantibodies recognize NET. Nevertheless, the mechanisms by which NET trigger or perpetuate the inflammatory process in RA are not elucidated. Therefore, we have extensively analyzed NET antigenic and inflammatory properties in 157 donors. Here we show that RA PMN produced more NET than healthy donor (HD) PMN. Immunoglobulin G purified from ACPA-positive RA patients specifically recognized NET. NET from both HD and RA patients activated both resting macrophages and PMN (from HD and RA patients), leading to cytokine secretion and HLA, CD86, CD11b up-regulation, but RA NET were more potent. Cell activation occurred independently of ACPA or endosomal acidification. Complement C1q increased the NET stimulatory activity on macrophages, which was further supported by the LL-37 antimicrobial peptide. On the contrary, NET specifically inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin (IL)-6 secretion by macrophages (and not by PMN), especially with C1q and LL-37. Thus, NET may trigger autoimmunity in RA as ACPA recognize NET antigens but not non-activated PMN. Independently of ACPA, NET may modulate RA chronic inflammation via their dual activity, since they possess both pro- and anti-inflammatory properties depending on target cell type, their activation level and cofactors like C1q and LL-37. Excess of NETosis together with enhanced NET activity seem to participate to RA pathogenesis at different levels.

## Résumé

Il a été suggéré que les “Neutrophil Extracellular Traps” (NET), produits par les polynucléaires neutrophiles activés (PNN), pouvaient jouer un rôle dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde (PR), une maladie inflammatoire chronique caractérisée par la production d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA). En effet, les PNN de patients PR subissent une NETose plus importante, les NET pourraient être une source d'autoantigènes citrullinés et certains auto-anticorps de patients PR reconnaissent les NET. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les NET déclenchent ou perpétuent le processus inflammatoire dans la PR ne sont pas élucidés.

Nous suggérons en outre, qu'indépendamment des ACPA les NET peuvent directement activer certaines cellules en exposant des molécules immuno-modulatrices. Par conséquent, nous avons analysé de manière approfondie les propriétés antigéniques et inflammatoires des NET chez 157 donneurs. Nous avons montré ici que les PNN de patients PR produisent plus de NET que les PNN de donneurs sains (DS). Les immunoglobulines G des patients PR ACPA-positifs reconnaissent spécifiquement les NET. Les NET de patients PR et de DS activent à la fois les macrophages et les PNN au repos (provenant de patients PR et de DS), conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la surexpression de molécules de surface, mais cet effet est plus important avec des NET PR. L'activation cellulaire par les NET se produit indépendamment des ACPA ou de l'acidification endosomale. La protéine du complément C1q augmente l'activité stimulatrice des NET sur les macrophages, qui est renforcée par le peptide antimicrobien LL-37. Par contre, les NET inhibent spécifiquement la sécrétion d'interleukine (IL)-6 induite par le lipopolysaccharide (LPS) par les macrophages (et non par les PNN), en particulier avec C1q et LL-37. Ainsi, les NET pourraient favoriser une réponse auto-immune dans la PR, car les ACPA reconnaissent les antigènes des NET mais pas les PNN non-activés. Indépendamment des ACPA, les NET peuvent moduler l'inflammation chronique dans la PR via leur double activité, car ils possèdent des propriétés pro- et anti-inflammatoires en fonction du type de cellule cible, de leur niveau d'activation et des cofacteurs tels que C1q et LL-37. L'excès de NETose associé à une activité accrue des NET semblent participer à la pathogenèse de la PR à différents niveaux.



## Main text

### Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) belong to the first line of defense against pathogens. They are the first cells recruited to most inflammatory sites and sustain inflammation notably by chemoattracting the pro-inflammatory Th17 lymphocytes (1). Moreover, PMN can be activated by endogenous factors such as danger-associated molecular patterns. However, excessive PMN activation or impaired resolution of inflammation may be deleterious. Therefore, PMN activity requires a tight regulation. Among the different mechanisms triggered, neutrophil extracellular traps (NET) are chromatin fragments composed of DNA and associated proteins expelled by activated PMN. This process, NETosis, was initially described as an innate immunity mechanism involved in the defense against bacteria (2).

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory and autoimmune disease leading to joint destruction whose etiology is still unknown. RA affects 0.3-1 % of adults and is characterized by the production of the disease-specific anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) which are useful for both diagnosis and prognosis. For example, a subset of those autoantibodies recognizes citrullinated vimentin and may be pathogenic by inducing osteoclastogenesis (3). Moreover, immune complexes made of ACPA and citrullinated fibrinogen, which are present in the synovial tissue of RA patients, induce macrophage activation (4), especially in the presence of immunoglobulin (Ig) M rheumatoid factor (5), another autoantibody produced in RA. However, the stimuli and the mechanisms triggering ACPA production are still unknown. Particularly, the reason why citrullination, a post-translational modification of proteins mediated by peptidylarginine deiminase (PAD) enzymes, leads to ACPA production (and/or is the target of ACPA) in RA is unknown. As NETosis is a process associated with protein citrullination (6) and ACPA recognize citrullinated proteins, NET might play a crucial role in RA pathogenesis. Indeed, NET might be a source of citrullinated autoantigens and neoepitopes (7) and might be either targets for ACPA or at the origin of ACPA induction by favoring the breach of immune tolerance. Both situations might be deleterious, leading directly or indirectly to downstream pathogenic events. In addition, NETosis is associated with the release of active PAD and the latter is present in RA synovial fluid (8) and might citrullinate local autoantigens. Recently, spontaneous and lipopolysaccharide (LPS)-induced NETosis have been shown to be stronger *in vitro* with PMN from RA patients in comparison to osteoarthritis patients (9). Similar results were obtained for spontaneous NETosis with PMN from arthritic versus naïve mice (10). Moreover, RA immunoglobulin (Ig) G stimulate

NETosis of RA and healthy donor (HD) PMN (9). Particularly, RA antibodies recognize citrullinated histone H4 contained in NET (11). Citrullination in NET is however less intense than during hypercitrullination observed in defective mitophagy or leukotoxic hypercitrullination (12). Independently of citrullination, NET might also contain stimulatory proteins.

PMN are activated in RA and depletion of PMN in RA mouse models impairs disease development (13). PMN have particular functions in RA, like differentiation in dendritic cell (DC)-like cells (14), secretion of the pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-17A (15) or expression of RANKL (16), suggesting a role in osteoclast activation and joint destruction. Likewise, we have shown that activated RA PMN secrete interferon (IFN)- $\alpha$  (17). Interestingly, both numerous PMN and soluble chromatin are present in the synovial fluid of RA patients (18). Moreover, chromatin-containing immune complexes are deposited in affected joints of RA patients (19). It is tempting to speculate that part of the chromatin might come from NET derived from locally present and activated PMN and that those NET, free or in immune complexes, might be involved in the inflammatory process. Indeed, we have previously demonstrated that free extracellular chromatin directly activates DC (20) as well as PMN (21) in a Toll-like receptor (TLR) 9-independent manner (22).

Although a major function of NET is to neutralize bacteria, NETosis or an excess of NET may be pathogenic in some cases. In systemic lupus erythematosus (SLE), impaired clearance of NET is associated with the production of anti-NET antibodies and nephritis development (23). Moreover, free NET and especially NET in immune complexes trigger the production of IFN- $\alpha$ , a key cytokine in SLE, by plasmacytoid DC (24, 25). However, it was recently shown that the clearance of NET from healthy subjects by HD macrophages does not lead to the secretion of pro-inflammatory cytokines (26) and even that such NET impair the LPS-mediated activation of HD DC (27). On the other hand, NET are immunogenic and capable to prime T lymphocytes (28). Therefore, in addition to the pathogenic activity of NET-containing immune complexes, we hypothesized that free NET might directly activate leukocytes in some pathological situations and particularly in RA. We have thus tested and compared the differential antigenic and inflammatory properties of NET from HD and RA patients on target cells from HD and RA patients using primary cells from 157 donors. Moreover, we describe complement C1q/LL-37-dependent but ACPA-independent and endosomal acidification-independent mechanisms triggering either pro- or anti-inflammatory responses, thus demonstrating a dual activity of NET. Our results suggest that abnormal clearance of NET strongly influences innate immune responses. Particularly, RA PMN produce more NET and more active NET.

## Results

### **NET from both RA patients and healthy donors are antigenic and strongly as well as specifically recognized by IgG autoantibodies ACPA- RA patients**

To determine whether NET are preferentially recognized by ACPA from RA patients, and whether RA NET are more antigenic, NETosis was induced in vitro by phorbol myristate acetate (PMA). We first verified that we induced typical NET structures. We indeed observed chromatin fibers with activated PMN, as evidenced by the merged signal upon co-staining of DNA and histones (Fig. 1A, arrows). NET were then stained with IgG purified from either ACPA-positive RA patients or ACPA-negative patients suffering from other rheumatic diseases and analyzed by fluorescence microscopy. In contrast to ACPA-negative IgG (Fig. 1C), ACPA-positive IgG strongly recognize NET structures (Fig. 1B, arrows), i.e. the chromatin filaments, as demonstrated by the merged signal upon DNA staining. As a control, we observed no binding of IgG purified from HD on NET (Fig. 1D). NET staining was reproduced with 22 donors (11 RA patients and 11 HD) in 20 independent experiments. The staining with ACPA-positive IgG from RA patients was stronger than with ACPA-negative IgG in 15 out of 22 cases (68 %;  $p < 0.0001$ ; 95 % confidence interval = 0.45-0.86), suggesting that NET expose antigenic and citrullinated structures at the surface recognized by RA autoantibodies. By comparing NET induced using PMN isolated from RA patients and HD, we observed that ACPA-positive IgG from RA patients recognize both RA NET (in 9 out of 11 patients) and HD NET (in 9 out of 11 HD). This indicates that, once NETosis is triggered, HD NET are as antigenic as RA NET thereby suggesting that the key antigenic event is the induction of NETosis. These observations are based on the percentage of positive stainings and not on the staining intensity, as we consider that the former is more reliable. On the contrary, ACPA-positive IgG do not bind to non-activated PMN as demonstrated by flow cytometry (Fig. 1E), indicating that they specifically recognize NET. Gated monocytes (expressing the high affinity IgG receptor CD64) pre-incubated with human immunoglobulins were used as a positive control for the secondary antibody (Fig. 1F). Those results represent the most detailed comparison of RA autoantibody recognition of HD versus RA NET.

## **RA patients have an increased capacity to produce NET compared with healthy donors**

To test whether NET are immunostimulatory, we first established a protocol allowing the isolation of enriched and concentrated NET. Indeed, several protocols and approaches have been described but some of them might not be optimal to analyze the effects of NET on target cells in co-culture. For example, some studies use the cell culture supernatants of PMA-activated PMN which actually contain some PMN-derived DNA but also cytokines induced by PMA as well as PMA itself. Others use a protocol similar to ours but did not verify the cytokine content in NET preparations. Some groups directly co-culture target cells with activated PMN to induce NETosis and use NETosis inhibitors to prove the observed effects are NET-dependent; however, we observed that some of those inhibitors not only inhibit NETosis but also cytokine release during PMN activation (Supplementary Fig. 1A). In addition, we observed that co-cultures obtained by adding target cells on surface-adherent NET are also not optimal because part of the PMA or the cytokines secreted by activated PMN bind to plastic/glass (Supplementary Fig. 1B). Recently, it was also reported that NETosis may be confounded with hypercitrullination, e.g. after stimulation by calcium ionophores (12). In NETosis, citrullination occurs but is relatively low and restricted to some proteins in contrast to leucotoxic hypercitrullination, and the DNA released is associated with histones (as shown in Fig. 1A) in contrast to defective mitophagy. Moreover, NETosis is NADPH oxidase-dependent. We therefore optimized the protocol and included controls to obtain better defined NET, which we call soluble NET, as opposed to NET attached to glass for microscopy analysis. We used the best characterized NETosis inducer (apart bacteria), namely PMA. Figure 2 summarizes the protocol (Fig. 2A) and depicts a typical biochemical analysis of soluble NET. This protocol was highly reproducible, giving soluble NET composed of DNA from ~ 100 base pairs (bp) to ~ 400 bp (Fig. 2C) with individual bands (and not a smear) and a characteristic protein content (Fig. 2D). No DNA was detected in supernatants, but only after mild deoxyribonuclease 1 (DNase 1) digestion of glass-adherent NET, and NET induction was blocked by the NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI, Fig. 2B and Supplementary Fig. 1C), in agreement with a role of reactive oxygen species in NETosis (29). Soluble NET were further characterized by Western blot (Fig. 2E). Both HD and RA NET contain histones as expected (top), including low levels of citrullinated histone H3 (bottom). As already reported, histones are partially cleaved during NETosis and are therefore smaller in comparison to the positive controls (total histones and nucleohistones). Altogether, similar NET characteristics were observed with HD and RA PMN. However and importantly, RA PMN produce significantly more soluble NET upon

activation than PMN from HD (Fig. 2F,  $n = 58$ ,  $p < 0.05$ ). Interestingly, as shown by the correlation matrix (Supplementary Fig. 2), the concentration of soluble NET prepared in vitro from RA PMN is positively correlated with the concentration of circulating PMN in patients, although NET were always prepared from the same number of PMN. Moreover, the “neutrophil” cluster (represented by the NET concentration and PMN count) appears also positively correlated with the “inflammation” cluster (represented by ESR, CRP and DAS28) in RA patients.

### **NET from both RA patients and healthy donors activate healthy donor and RA steady-state PMN as well as macrophages, but RA NET are more stimulatory**

We then tested the stimulatory activity of soluble NET on human inflammatory cells, focusing on two cell types involved in RA pathogenesis. NET activated both macrophages (Fig. 3A, B and S3) and PMN (Fig. 3C, D and G), as evidenced by the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 (macrophages and PMN, Fig. 3A-D) and up-regulation of CD11b (PMN, Fig. 3G) or HLA class I/class II and CD86 (macrophages, Supplementary Fig. 3), indicating that NET are pro-inflammatory. Tumor necrosis factor (TNF) (macrophages and PMN) and IL-6 (macrophages) were also induced by NET, to a lesser but still significant extent, whereas minimal secretion of the immunomodulatory cytokine IL-10 (especially in comparison to IL-8) was observed (Supplementary Fig. 4). Interestingly, soluble NET prepared with PMN from both HD and RA patients induce cell activation indicating that both HD and RA NET have stimulatory properties. In addition, we show that target cells (PMN and macrophages) from both HD (Fig. 3A, C, G) and RA patients (Fig. 3B, D, G) respond to the stimulation by HD or RA NET. When RA PMN are used as target cells, activation may appear lower because those cells are pre-activated (as shown by the spontaneous IL-8 release) and therefore probably partly exhausted and less responsive to stimulation. These results suggest that a key pathogenic event in RA patients is the triggering of NETosis and the quantity of NET released rather than the ability to respond to NET. As controls, we first verified that the buffers used to enrich soluble NET do not alter the response of target cells (which is the true negative control for estimating NET-induced cell activation) and second that the cytokine detected after PMN and macrophage activation is not simply due to the passive transfer of the cytokine present in NET preparations but is really secreted by target cells (see also Figure 7). For example, IL-8 concentrations measured in the NET purification buffer or in HD NET and RA NET cultured without target cells are 0, 0.26, and 0.43 ng/ml respectively in the cultures with HD macrophages (Fig. 3A) or PMN (Fig. 3C). By using the NET buffer control, we thus also verified that PMA is not transferred in soluble NET after

washes. Next, we have demonstrated that when glass-adherent NET are not detached by DNase 1 treatment after PMA is washed out, no soluble NET are transferred onto target cells and no activation is induced (Supplementary Fig. 5). Likewise, when soluble NET are degraded due to overdigestion by DNase 1 (after PMA is washed out), they lose most of their activating potential (Supplementary Fig. 6). All these controls show that the identified stimulatory activity originates solely from NET.

The global analysis of all results from experiments testing the activity of NET (all RA and HD NET) demonstrates that NET significantly activate macrophages (Fig. 3E,  $p < 0.05$  vs. the NET purification buffer, data pooled from 23 independent experiments) and PMN (Fig. 3F,  $p < 0.001$  vs. the NET purification buffer, data pooled from 21 other independent experiments), leading to IL-8 secretion. Then, in the 14 independent experiments (among Fig. 3E and F) in which we compared HD and RA NET on the same target cells from the same donor (HD macrophages or PMN, cell activation estimated by IL-8 secretion, HD and RA NET tested at the same concentration), we have demonstrated that RA NET are more stimulatory than HD NET. We indeed showed that RA NET induce a stronger IL-8 secretion (Fig. 3H), indicating that RA NET have a significantly higher activity than HD NET ( $p < 0.05$ ) and suggesting that RA NET are potentially more pathogenic.

### **Polyclonal ACPA are not required for strong NET-induced cell activation**

Because NET are antigenic (Fig. 1) and because PMN as well as macrophages express Fc receptors, we next investigated whether immune complex formation with ACPA modulates NET activity. Soluble NET (or the NET buffer) were thus pre-incubated with ACPA-positive IgG (or the IgG buffer) for 1 hour at 37° C and then macrophages or PMN were added to the cell culture plate. As described above, both PMN (Fig. 4A) and macrophages (Fig. 4B) were activated by NET, as shown by IL-8 detection, but in both cases cell activation was not significantly enhanced in the presence of ACPA. Similar results were obtained with both HD and RA NET. Therefore, soluble NET directly activate macrophages or PMN and recognition by ACPA is not required for a strong stimulatory activity of NET.

### **The C1q complement protein enhances the NET-induced IL-8 secretion by macrophages**

C1q has been shown to bind DNA (30, 31) and to deposit onto NET (32). Moreover, we observed that C1q also interacts with purified chromatin (manuscript in preparation) and C1q genetic variants are associated with RA (33). As C1q is produced in RA synovium (34) and because PMN and macrophages express cell surface C1q receptors, we thus tested whether

C1q favors NET-induced cell activation. Interestingly, whereas C1q did not significantly influence PMN activation by NET (Fig. 5A), macrophage activation by NET was significantly much stronger in the presence of C1q (Fig. 5B,  $p < 0.05$ ). Importantly, C1q alone did not activate macrophages. Anew, similar results were obtained with both HD and RA NET.

To explain the different modulatory activity of C1q on NET-mediated activation of PMN and macrophages, we measured the C1q-binding capacity, which reflects the global expression of all cell surface C1q receptors. Interestingly, C1q binding was observed with both PMN and monocytes which were used as precursors to prepare macrophages, but the percentage of monocytes expressing C1q receptors was higher than that of PMN (Fig. 5C, 45.1 % vs. 23.3 %,  $n = 59$  donors,  $p < 0.0001$ ). Similar results were obtained when comparing monocytes and PMN from HD or RA patients. In addition, we have clearly shown that macrophages express higher amount of C1q receptors than both monocytes and PMN (Supplementary Fig. 7A,  $p < 0.005$ ) and that macrophages acquire high expression of C1q receptors during differentiation from monocytes (Supplementary Fig. 7B,  $p < 0.05$ ).

To support our hypothesis on the involvement of C1q receptors, we have shown that blocking or saturating C1q receptors (by pre-incubating target cells with an excess of C1q) specifically reduces macrophage activation by NET but not by LPS (Fig. 5D). Thus, our results suggest that C1q facilitates NET-induced activation of cells expressing high levels of C1q receptors, presumably by bridging NET to the target cells.

### **LL-37 supports the C1q-enhanced IL-8 secretion by macrophages in response to NET**

We next tested whether another co-factor might work in combination with C1q to enhance the NET-induced IL-8 secretion by macrophages. We focused on the antimicrobial peptide LL-37 because it also binds DNA, it has both pro- and anti-inflammatory properties and, in particular, it is produced by PMN and macrophages, which also express LL-37 receptors. In addition, LL-37 expression is induced in RA synovial membranes (35), especially in PMN and macrophages (36). Although LL-37 has little effect on NET-induced IL-8 secretion by macrophages (Fig. 6A), the combination of C1q with LL-37 (Fig. 6B) significantly increases IL-8 production by NET-stimulated macrophages as compared to C1q alone. This LL-37 effect is specific to NET, as LPS activation was not significantly influenced by LL-37, and was not observed with PMN (Supplementary Fig. 8). As LL-37 by itself does not enhance NET-induced macrophage and PMN activation, we verified that LL-37 is active. Indeed, it directly induces a moderate but significant IL-6 secretion by PMN and, in addition, it inhibits

PMN response to LPS (Fig. 6C). Again, to support a role of LL-37 receptors in the recognition of NET by target cells in combination with C1q, we have shown that blocking or saturating LL-37 receptors (by pre-incubating target cells with an excess of LL-37) specifically reduces macrophage activation by NET (Fig. 6D).

### **NET-induced cell activation occurs independently of endosomal acidification**

Because the response to NET may require endocytosis and degradation of NET, we analyzed the influence of endolysosomal acidification. Moreover, NET are composed of DNA and may therefore trigger cell activation through endosomal TLR9, which requires endosomal acidification. We therefore tested whether endosomal acidification is necessary for NET-induced cell activation. For example, PMN are typical phagocytic cells which express most TLR (except TLR3 (37)) and strongly respond to TLR agonists, whereas macrophages express TLR4, TLR7, TLR8 and TLR9, among others. Cell activation by NET was observed both in the presence and absence of ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl), an inhibitor of endosomal acidification (Fig. 7). As a control, activation through endosomal TLR7/8 by the R848 agonist was completely inhibited by ammonium chloride, whereas triggering of cell surface TLR4 by LPS was not influenced. Similar results were obtained with HD and RA PMN or macrophages. Thus, NET-induced cell activation occurs independently of endosomal acidification. This result suggests that endosomal TLR7/8/9 are not involved in triggering PMN (Fig. 7A) or macrophage (Fig. 7B) activation in response to NET. The incubation of NET without PMN or macrophages confirms that IL-8 is not transferred with NET but is really produced by activated cells.

### **NET are also anti-inflammatory**

Finally, we tested whether NET may on the opposite modulate the LPS-induced cell activation and the secretion of other cytokines. Interestingly, NET inhibit IL-6 secretion of LPS-activated macrophages (Fig. 8A) and are therefore also anti-inflammatory. This was observed with both HD and RA NET (both being significant vs. the purification buffer, Fig. 8B) and on both HD and RA macrophages ( $p < 0.0001$  for pooled data). Only IL-6 was down-regulated, whereas IL-8 and TNF were normally secreted (Supplementary Fig. 9). Although this effect was not significantly influenced by C1q alone (Supplementary Fig. 10), the NET-mediated inhibition of IL-6 secretion was strongly enhanced in the presence of both C1q and LL-37 (Fig. 8C,  $p < 0.01$  for LPS with NET vs LPS with NET, C1q and LL-37). On the contrary, LPS-mediated activation of PMN was not inhibited by NET, as IL-8 and TNF were normally secreted and IL-6 was not inhibited (Supplementary Fig. 11). Importantly, the NET-



mediated inhibition of IL-6 secretion was accompanied by the simultaneous increased secretion of the immunomodulatory cytokine IL-10 by LPS-activated macrophages (Fig. 8D,  $p < 0.05$  for NET vs. the purification buffer), reinforcing the anti-inflammatory potential of NET, although this was not affected by C1q and LL-37.

## Discussion

In the present study, we demonstrate for the first time that NET are pro-inflammatory and activate steady-state PMN and macrophages. Particularly, we show that, compared to HD, PMN from RA patients produce more NET, and that those NET more potently activate PMN and macrophages. We also show that NET are specifically recognized by ACPA-positive IgG from RA patients and are therefore potentially antigenic in RA. Importantly, we report a dual activity of NET since we show that NET are also potentially endowed with anti-inflammatory functions, as they inhibit IL-6 secretion and at the same time increase IL-10 secretion by activated macrophages. Moreover, we dissected how NET mechanistically affect inflammatory cells and showed that NET activation of macrophages and PMN is independent of immune complex and of endosomal acidification. Conversely, C1q complement protein reinforces the pro- or anti-inflammatory response of macrophages to NET, especially when helped by LL-37. This is, globally, the largest analysis comparing RA and HD NET on RA and HD target cells reported so far.

Accumulating evidence supports the functions of NETosis in the defense against bacteria. However, the consequences of uncontrolled NETosis or the potential pathogenic effects of NET in autoimmune diseases are less understood. It has been shown that NET may be involved in fibrosis (38), gout (39), as well as in SLE (40) and in RA (9), mostly promoting inflammation. Nevertheless, at very high concentration as in gout only, NET may participate in the resolution of inflammation (41). Therefore, immunoregulatory properties of NET need to be further investigated.

In RA, NET might be a source of citrullinated autoantigens and thus involved in the triggering of ACPA production. If recognized by ACPA, NET might also be involved in downstream pathogenic events, like complement activation by NET-ACPA immune complexes. Importantly, PMN from RA patients exhibit an enhanced capacity to spontaneous NETosis (42). In our work, the ACPA staining was particularly observed on NET fibers (and not on non-activated PMN) and was significantly much lower with ACPA-negative IgG from patients with other rheumatic conditions, whereas IgG from healthy individuals gave no signal. The low signal observed with ACPA-negative IgG is probably due to other antibody specificities present in the serum pool, such as anti-chromatin autoantibodies in lupus patients. Interestingly, we clearly show that NET from both HD and RA patients are recognized by ACPA-positive IgG, indicating that once NETosis is triggered, HD NET are as antigenic as RA NET.

We next demonstrated that NET are not only recognized by autoantibodies but are also directly stimulatory and clearly pro-inflammatory. They indeed activate steady-state PMN and macrophages, leading to the secretion of pro-inflammatory cytokines and up-regulation of activation markers. Particularly, macrophages acquire a phenotype of activated antigen-presenting cells, which may contribute to the breach of tolerance. Anew, both HD and RA NET have inflammatory properties, but RA NET are more stimulatory than HD NET. Cells from both HD and RA patients respond similarly to NET, excluding an intrinsic difference in RA cell response to NET. These results suggest that the NETosis process is not fundamentally altered in RA but, rather, that increased levels of NETosis, together with a higher stimulatory activity, probably due to a slightly different composition of NET, may be pathogenic in RA patients.

We also report that NET-ACPA immune complex formation is not required to trigger a strong activation of PMN or macrophages, although we have shown that ACPA do bind NET. NET might therefore also be pathogenic in the absence of ACPA, which may happen either in ACPA-negative RA patients or in the early phases of disease, before ACPA are produced. However, ACPA may support cell activation by NET in particular conditions. Moreover, it is possible that the density of immune complexes reached *in vitro* is not optimal to enhance cell activation, although the concentrations used both for ACPA and NET were elevated. Likewise, cell activation may be stronger with monoclonal ACPA and vary depending on their antigenic specificities. In addition, we have excluded that endosomal acidification is important for NET-mediated cell activation, suggesting that activation does not occur through recognition of the DNA moiety of NET by endosomal TLR9 or recognition of other NET components by other endosomal TLR. On the contrary, we have demonstrated that the C1q complement protein enhances the NET-induced activation of macrophages with high expression of C1q receptors, which is further potentiated by LL-37, suggesting that C1q/LL-37 connect both partners. Thus, C1q and LL-37 may behave as NET transporters for macrophages.

Nevertheless, we also show that in some cases NET are anti-inflammatory, as recently suggested (41). This property was only observed with strongly-activated macrophages (after LPS stimulation). IL-6, but not IL-8 nor TNF, was partly inhibited and inhibition was stronger with both C1q and LL-37. On the contrary, IL-10 was induced. According to Schauer *et al.* (41), we can exclude cytokine degradation by NET-derived proteases as TNF secretion by LPS-activated macrophages was not affected by NET (Supplementary Fig. 9). Likewise, NET from HD have been reported to inhibit the LPS-induced activation of DC (27). We can also exclude LPS neutralization by NET as IL-8 secretion by LPS-activated macrophages was not

affected by NET, showing that macrophages are truly activated (Supplementary Fig. 9). Thus, a fine control is probably required in vivo to determine whether NET should trigger pro- or anti-inflammatory responses. This control might rely on a balance between the stimuli, the cell types, the activation level of the target cells and the presence of co-factors like C1q and LL-37 that might bind NET, as summarized in Supplementary Figure 12.

In contrast to some recent studies (26, 27), we show that immune cells are activated by NET. There are several explanations for this only apparent discrepancy. First of all, and as explained above, we have tried to optimize the preparation of NET, meaning that we used a slightly different protocol (DNase I digestion or no digestion versus other nucleases, PMA versus other stimuli as calcium ionophore), and we have included several controls to prove the immunoregulatory activity of NET (preparations without PMN or with non-activated PMN). Moreover, we have analyzed different cytokines (IL-8 production by macrophages), other pathways (endosomal TLR and ACPA) and especially different target cells (PMN). In addition to these studies, we emphasize a mechanism depending on C1q and LL-37 as well as a dual activity of NET according to their environment. But a particular added value of the present report is the study on a large scale of the antigenicity of NET, the comparison of HD and RA NET as well as HD and RA target cells for the immunoregulatory NET activity. Particularly, all experiments were performed with primary cells (NETosis and cell activation) and we analyzed and compared two types of pro-inflammatory target cells (PMN and macrophages). Similarly, RA NET were very recently shown to up-regulate HLA class II on DC (10) and fibroblasts (43).

There are a few limitations in our study. Ideally, staining of NET and cell activation assays with NET should be performed with purified ACPA instead of IgG purified from ACPA-positive RA patients in order to determine whether NET form pathogenic immune complexes. In addition, ACPA with different antigen specificities should be compared.

Direct clinical implications arise from these findings because pathogenicity of anti-citrullinated protein immunization has been confirmed in RA (44). However, not all the involved mechanisms are elucidated, yet. Further studies will be required to determine whether NETosis is pathogenic through its pro-inflammatory activity or by triggering ACPA production or simply as a target of ACPA, or the combination of both. The precise comprehension of NET pathogenic role may help define whether NET may constitute a potential therapeutic target for future treatments. Influence of currently used biologic therapies on NET activity also deserves further studies.

In conclusion, NET are antigenic, immunogenic (according to other studies), pro-inflammatory and therefore potentially pathogenic, even if they may control activation of strongly-stimulated cells. Further experiments will be required to determine whether NET induce ACPA production and what are the downstream consequences of ACPA binding to NET in the pathophysiology of RA, such as complement activation.

## Methods

### Human samples.

A total number of 157 donors (62 RA patients and 95 HD) have been tested in the present study to delineate the regulatory properties of NETosis (as detailed below, other donors were used to purify IgG). EDTA-blood from random, healthy individuals (blood bank of Bobigny) and RA patients (Rheumatology Department, Avicenne Hospital, Bobigny) was used. RA patients fulfilled the American College of Rheumatology-European League Against Rheumatism 2010 criteria. Characteristics of the 42 RA patients specifically used to prepare soluble NET are presented in supplementary Table 1 (additional patients were used to prepare cells tested in culture with these NET). We endeavored to focus on RA patients that were not treated with biologic therapy. Thirty-four HD were used to prepare control NET.

IgG were purified from a pool of sera from additional ACPA-positive RA patients and from ACPA-negative patients with rheumatic diseases by affinity chromatography on protein G columns as previously described after screening for ACPA reactivity both by immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (4). Commercial IgG (Sigma-Aldrich) purified from HD were used as controls.

### Cell isolation and culture.

PMN and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were freshly isolated by dextran sedimentation (Axis Shield) from peripheral blood of HD and RA patients (17). Contaminating red blood cells were lysed using ACK hemolysis buffer ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$ , and EDTA). Monocytes were purified from PBMC by positive selection using CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec). Cell purities were estimated by flow cytometry. Monocytes (defined as  $\text{CD14}^+$  cells, purity > 95 % of living cells) were differentiated into macrophages by culturing in X-vivo 15 medium (Lonza) in the presence of 100 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (Immunotools) for 7 days in perfluoroalkoxy polymer culture inserts (Savillex). PMN (defined as  $\text{CD3}^-$ ,  $\text{CD19}^-$ ,  $\text{CD56}^-$ ,  $\text{CD11b}^+$ ,  $\text{CD66b}^+$  cells, purity > 95 % of living cells,  $10^6$  cells/ml) and macrophages ( $0.75 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (PAN) or X-vivo 15 medium (Lonza), respectively, with soluble NET (50 % v/v, i.e. 9-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  final) or the NET purification buffer (see below) in the presence/absence of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  purified human IgG (ACPA-positive IgG, ACPA-negative IgG or normal IgG), LPS from *S. typhimurium* (5 or 250 ng/ml for PMN or macrophages, respectively), 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  R848, 50

µg/ml purified human C1q (all from Sigma-Aldrich) or 10 µg/ml LL-37 (InvivoGen). To allow interaction, soluble NET and IgG were pre-incubated for 1 hour at 37° C before addition of cells. In some cases, cells were pre-incubated for 30 minutes at 37° C with ammonium chloride (2-8 mM) to inhibit endosomal acidification. For blocking experiments, cells were pre-incubated for 2 hours with an excess of C1q or LL-37 to saturate C1q or LL-37 receptors and then stimulated. Cell activation was estimated after 4-14 hours (PMN) or 48 hours (macrophages) by flow cytometry and by measuring cytokine secretion by ELISA (after 14 or 24 hours for PMN or macrophages, respectively).

### **NETosis induction, immunostaining and analysis by fluorescence microscopy.**

Freshly isolated PMN were seeded on poly-L-lysine-coated (0.001 %, Sigma-Aldrich) borosilicate chamber slides (NUNC), settled for 30 minutes and activated by 50 nM PMA in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % heat-inactivated FCS. After 2 hours, supernatants were discarded, NET were fixed with 4 % paraformaldehyde and washed. The chamber slides were blocked with 2 % bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), 2 % heat-inactivated goat serum (Eurobio), 0.2 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and NET were stained with 100 µg/ml purified IgG (from either ACPA-positive RA patients or ACPA-negative rheumatic patients or HD) followed by an AlexaFluor568-conjugated anti-human IgG antibody (Life Technologies, catalog number A21090). Alternatively, NET were stained with an anti-histones monoclonal antibody (mAb) (clone H11-4, pan histones, Millipore) followed by an AlexaFluor568-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Life Technologies, catalog number A11004). After washing, NET were also stained with the Sytox green DNA dye (Life Technologies) and analyzed on a Zeiss Axioskop fluorescence microscope. Stainings were evaluated in a blind and independent manner by two persons.

### **Soluble NET preparation.**

NETosis was induced in vitro by PMA on poly-L-lysine-adherent PMN as described above except that PMN were cultured without FCS. In some cases, NETosis was induced in the presence of 100 µM DPI (Sigma-Aldrich) to block NETosis. To produce soluble NET, supernatants were discarded after 4 hours, chambers were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and NET were detached from glass by mild DNase 1 digestion (Sigma-Aldrich, 5 U/ml, 15 min) in PBS. The reaction was stopped by 3 mM EDTA and supernatants

containing soluble NET were harvested and centrifuged at 300 g for 10 min. The upper phase was collected and NET were enriched by a second centrifugation step (16,000 g, 10 min) and again the upper phase was harvested and frozen. As a control, the same procedure was followed but without PMN in order to prepare the corresponding NET buffer. NET were quantified by fluorescence in a microplate reader (using PicoGreen, a dye for the quantification of soluble double-stranded DNA, Life Technologies) and by spectrophotometry (NanoDrop technology) and characterized by 16% SDS-PAGE and 1.5% agarose gel. Preparations ranging from 18 to 40  $\mu\text{g/ml}$  (of DNA, as determined by spectrophotometry by measuring optical density at 260 nm) were used in cell cultures.

### **Flow cytometry, Western-blot and ELISA.**

See supplementary methods.

### **Statistical analysis.**

The proportions of positive NET stainings with ACPA-positive IgG from RA patients versus ACPA-negative IgG were compared by two-sided Fisher's exact test and analyzed by calculating the confidence interval using a 95 % confidence level. The percentages of C1q-binding PMN and monocytes were compared using a two-tailed Mann-Whitney test. C1q receptor expression levels (mean fluorescence intensity) by cell subsets were compared using a two-tailed Mann-Whitney test or a two-tailed Wilcoxon signed rank test. Concentrations of soluble NET produced by HD and RA PMN were compared using a two-tailed Mann-Whitney test. IL-8, IL-6 and TNF concentrations measured for macrophages or PMN cultured in NET buffer versus NET were compared using a two-tailed Mann-Whitney test. To compare the activity of NET prepared from HD or RA patients, we only used the experiments in which HD NET and RA NET were tested by pairs in the same experiment, at the same concentration and on the same cells (macrophages or PMN). The levels of IL-8 induction by pairs of HD vs. RA NET were analyzed by a two-tailed Wilcoxon signed rank test. To determine the effect of C1q/LL-37 on NET activity in cultures of macrophages or PMN, the level of IL-8 induced by NET vs. the purification buffer or IL-6 induced by LPS (data pooled from experiments with HD and RA NET) in the presence of C1q/LL-37 was compared to that without C1q/LL-37 and data were analyzed using a two-tailed Mann-Whitney test or a two-tailed unpaired *t*-test with or without Welch's correction after having checked that both groups follow a Gaussian distribution. The impact of NET on LPS-induced IL-6 and IL-10 secretion by macrophages



was estimated by comparing IL-6/IL-10 concentrations in cultures with LPS in the presence of NET or the purification buffer (with/without LL-37/C1q) using a two-tailed unpaired *t*-test with/without Welch's correction. Correlations between quantitative parameters were assessed by using two-tailed Spearman tests. Data were analyzed using GraphPad Prism software version 5 and p values below 0.05 were considered significant. Correlation matrix was represented with Genesis software (Institute of Genomics and Bioinformatics, Gratz, Austria).

### **Study approval.**

Experiments with human cells were approved by the local ethics committee CPP Paris Ile de France (NI-2016-11-01) and informed consents of the donors were collected.

## References

1. M. Pelletier, L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani, M. A. Cassatella. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* **115**. 335-343 (2010).
2. V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**. 1532-1535 (2004).
3. U. Harre, D. Georgess, H. Bang, A. Bozec, R. Axmann, E. Ossipova, P. J. Jakobsson, W. Baum, F. Nimmerjahn, E. Szarka, G. Sarmay, G. Krumbholz, E. Neumann, R. Toes, H. U. Scherer, A. I. Catrina, L. Klareskog, P. Jurdic, G. Schett. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest* **122**. 1791-1802 (2012).
4. C. Clavel, L. Nogueira, L. Laurent, C. Iobagiu, C. Vincent, M. Sebbag, G. Serre. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* **58**. 678-688 (2008).
5. L. Laurent, F. Anquetil, C. Clavel, N. Ndong-Thiam, G. Offer, P. Miossec, J. L. Pasquali, M. Sebbag, G. Serre. IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **74**. 1425-1431 (2015).
6. P. Li, M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, Y. Wang. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **207**. 1853-1862 (2010).
7. N. Thieblemont, H. L. Wright, S. W. Edwards, V. Witko-Sarsat. Human neutrophils in auto-immunity. *Semin. Immunol.* **28**. 159-173 (2016).
8. J. Spengler, B. Lugonja, A. J. Ytterberg, R. A. Zubarev, A. J. Creese, M. J. Pearson, M. M. Grant, M. Milward, K. Lundberg, C. D. Buckley, A. Filer, K. Raza, P. R. Cooper, I. L. Chapple, D. Scheel-Toellner. Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. *Arthritis Rheumatol.* **67**. 3135-3145 (2015).

9. R. Khandpur, C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri, A. Gizinski, S. Yalavarthi, J. S. Knight, S. Friday, S. Li, R. M. Patel, V. Subramanian, P. Thompson, P. Chen, D. A. Fox, S. Pennathur, M. J. Kaplan. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5**. 178ra40-(2013).
10. G. Papadaki, K. Kambas, C. Choulaki, K. Vlachou, E. Drakos, G. Bertsiias, K. Ritis, D. T. Boumpas, P. R. Thompson, P. Verginis, P. Sidiropoulos. Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. *Eur. J. Immunol.* **46**. 2542-2554 (2016).
11. F. Pratesi, I. Dioni, C. Tommasi, M. C. Alcaro, I. Paolini, F. Barbetti, F. Boscaro, F. Panza, I. Puxeddu, P. Rovero, P. Migliorini. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann. Rheum. Dis.* **73**. 1414-1422 (2014).
12. M. F. König and F. Andrade. A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination. *Front Immunol.* **7**. 461-(2016).
13. J. X. Wang, A. M. Bair, S. L. King, R. Shnayder, Y. F. Huang, C. C. Shieh, R. J. Soberman, R. C. Fuhlbrigge, P. A. Nigrovic. Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism. *Blood* **120**. 1489-1498 (2012).
14. C. Iking-Konert, B. Ostendorf, O. Sander, M. Jost, C. Wagner, L. Joosten, M. Schneider, G. M. Hansch. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann. Rheum. Dis.* **64**. 1436-1442 (2005).
15. E. M. Moran, R. Heydrich, C. T. Ng, T. P. Saber, J. McCormick, J. Sieper, H. Appel, U. Fearon, D. J. Veale. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS. One.* **6**. e24048-(2011).
16. P. E. Poubelle, A. Chakravarti, M. J. Fernandes, K. Doiron, A. A. Marceau. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res. Ther.* **9**. R25-(2007).
17. D. Lindau, J. Mussard, A. Rabsteyn, M. Ribon, I. Kotter, A. Igney, G. J. Adema, M. C. Boissier, H. G. Rammensee, P. Decker. TLR9 independent interferon alpha production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann. Rheum. Dis.* **73**. 2199-2207 (2014).

18. D. Yu, P. M. Rumore, Q. Liu, C. R. Steinman. Soluble oligonucleosomal complexes in synovial fluid from inflamed joints. *Arthritis Rheum.* **40**. 648-654 (1997).
19. P. A. Monach, W. Hueber, B. Kessler, B. H. Tomooka, M. BenBarak, B. P. Simmons, J. Wright, T. S. Thornhill, M. Monestier, H. Ploegh, W. H. Robinson, D. Mathis, C. Benoist. A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**. 15867-15872 (2009).
20. P. Decker, H. Singh-Jasuja, S. Haager, I. Kötter, H. G. Rammensee. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J. Immunol.* **174**. 3326-3334 (2005).
21. V. M. Rönnefarth, A. I. M. Erbacher, T. Lamkemeyer, J. Madlung, A. Nordheim, H. G. Rammensee, P. Decker. TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **177**. 7740-7749 (2006).
22. D. Lindau, V. Rönnefarth, A. Erbacher, H. G. Rammensee, P. Decker. Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* **41**. 669-681 (2011).
23. A. Hakkim, B. G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U. A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R. E. Voll, A. Zychlinsky. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**. 9813-9818 (2010).
24. G. S. Garcia-Romo, S. Caielli, B. Vega, J. Connolly, F. Allantaz, Z. Xu, M. Punaro, J. Baisch, C. Guiducci, R. L. Coffman, F. J. Barrat, J. Banchereau, V. Pascual. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**. 73ra20-(2011).
25. R. Lande, D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Riccieri, R. Bassett, H. Amuro, S. Fukuhara, T. Ito, Y. J. Liu, M. Gilliet. Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**. 73ra19-(2011).
26. C. Farrera and B. Fadeel. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol.* **191**. 2647-2656 (2013).

27. L. Barrientos, A. Bignon, C. Gueguen, L. de Chaisemartin, R. Gorges, C. Sandre, L. Mascarell, K. Balabanian, S. Kerdine-Romer, M. Pallardy, V. Marin-Esteban, S. Chollet-Martin. Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **193**. 5689-5698 (2014).
28. K. Tillack, P. Breiden, R. Martin, M. Sospedra. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* **188**. 3150-3159 (2012).
29. T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**. 231-241 (2007).
30. M. R. Van Schravendijk and R. A. Dwek. Interaction of C1q with DNA. *Mol. Immunol.* **19**. 1179-1187 (1982).
31. H. Jiang, B. Cooper, F. A. Robey, H. Gewurz. DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J. Biol. Chem.* **267**. 25597-25601 (1992).
32. J. Leffler, M. Martin, B. Gullstrand, H. Tyden, C. Lood, L. Truedsson, A. A. Bengtsson, A. M. Blom. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J. Immunol.* **188**. 3522-3531 (2012).
33. L. A. Trouw, N. Daha, F. A. Kurreeman, S. Bohringer, G. N. Goulielmos, H. J. Westra, A. Zhernakova, L. Franke, E. A. Stahl, E. W. Levarht, G. Stoeken-Rijsbergen, W. Verduijn, A. Roos, Y. Li, J. J. Houwing-Duistermaat, T. W. Huizinga, R. E. Toes. Genetic variants in the region of the C1q genes are associated with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **173**. 76-83 (2013).
34. S. Breitner, S. Storkel, W. Reichel, M. Loos. Complement components C1q, C1r/C1s, and C1INH in rheumatoid arthritis. Correlation of in situ hybridization and northern blot results with function and protein concentration in synovium and primary cell cultures. *Arthritis Rheum.* **38**. 492-498 (1995).
35. F. Paulsen, T. Pufe, L. Conradi, D. Varoga, M. Tsokos, J. Papendieck, W. Petersen. Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. *J. Pathol.* **198**. 369-377 (2002).
36. M. H. Hoffmann, H. Bruns, L. Backdahl, P. Neregard, B. Niederreiter, M. Herrmann, A. I. Catrina, B. Agerberth, R. Holmdahl. The cathelicidins LL-37 and rCRAMP are associated

with pathogenic events of arthritis in humans and rats. *Ann. Rheum. Dis.* **72**. 1239-1248 (2013).

37. F. Hayashi, T. K. Means, A. D. Luster. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**. 2660-2669 (2003).

38. A. Chrysanthopoulou, I. Mitroulis, E. Apostolidou, S. Arelaki, D. Mikroulis, T. Konstantinidis, E. Sivridis, M. Koffa, A. Giatromanolaki, D. T. Boumpas, K. Ritis, K. Kambas. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J. Pathol.* **233**. 294-307 (2014).

39. I. Mitroulis, K. Kambas, A. Chrysanthopoulou, P. Skendros, E. Apostolidou, I. Kourtzelis, G. I. Drosos, D. T. Boumpas, K. Ritis. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout. *PLoS. One.* **6**. e29318-(2011).

40. E. Villanueva, S. Yalavarthi, C. C. Berthier, J. B. Hodgins, R. Khandpur, A. M. Lin, C. J. Rubin, W. Zhao, S. H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M. F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot, M. Kretzler, A. T. Bruce, M. J. Kaplan. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **187**. 538-552 (2011).

41. C. Schauer, C. Janko, L. E. Munoz, Y. Zhao, D. Kienhofer, B. Frey, M. Lell, B. Manger, J. Rech, E. Naschberger, R. Holmdahl, V. Krenn, T. Harrer, I. Jeremic, R. Bilyy, G. Schett, M. Hoffmann, M. Herrmann. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* **20**. 511-517 (2014).

42. Sur Chowdhury C., S. Giaglis, U. A. Walker, A. Buser, S. Hahn, P. Hasler. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res. Ther.* **16**. R122-(2014).

43. C. Carmona-Rivera, P. M. Carlucci, E. Moore, N. Lingampalli, H. Uchtenhagen, E. James, Y. Liu, K. Bicker, H. Wahamaa, V. Hoffmann, A. I. Catrina, P. R. Thompson, J. H. Buckner, W. H. Robinson, D. A. Fox, M. J. Kaplan. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Immunol.* **2**. eaag3358-(2017).

44. H. Benham, H. J. Nel, S. C. Law, A. M. Mehdi, S. Street, N. Ramnoruth, H. Pahau, B. T. Lee, J. Ng, G. B. ME, C. Hyde, L. A. Trouw, N. L. Dudek, A. W. Purcell, B. J. O'Sullivan, J. E. Connolly, S. K. Paul, K. A. Le Cao, R. Thomas. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci. Transl. Med.* **7**. 290ra87-(2015).

## Supplementary Information

### Supplementary Methods.

Supplementary Fig. 1. NADPH oxidase inhibitors block both cytokine release and NETosis by activated PMN, whereas adsorbed PMA artificially stimulates target cells directly co-cultured on adherent NET.

Supplementary Fig. 2. Spearman-correlation matrix of clinical parameters and soluble NET prepared in vitro for the 42 RA patients described in Supplementary Table 1.

Supplementary Fig. 3. NET-activated macrophages up-regulate HLA class I and II as well as CD86.

Supplementary Fig. 4. TNF, IL-6 and IL-10 secretion by NET-stimulated macrophages and PMN.

Supplementary Fig. 5. Obtainment of soluble NET and stimulatory activity require DNase 1 treatment.

Supplementary Fig. 6. Soluble NET overdigested by DNase 1 lose their stimulatory activity.

Supplementary Fig. 7. Macrophages express higher levels of cell surface C1q receptors than monocytes or PMN.

Supplementary Fig. 8. LL-37 does not support IL-8 secretion by PMN in response to NET and C1q.

Supplementary Fig. 9. NET do not alter IL-8 and TNF secretion by LPS-activated macrophages.

Supplementary Fig. 10. C1q alone does not enhance the NET-mediated inhibition of IL-6 secretion by LPS-activated macrophages.

Supplementary Fig. 11. LPS-mediated activation of PMN is not inhibited by NET.

Supplementary Fig. 12. Dual activity of NET.

Supplementary Table 1. Characteristics of RA patients used to prepare soluble NET for cell activation studies.

## **Acknowledgments:**

This work was supported by Inserm and the University of Paris 13 and by a grant from the Fritz Thyssen Foundation (Az. 10.10.2.128) to Prof. Patrice Decker. M.R. was partly supported by a fellowship from Arthritis Courtin Foundation.

We thank Natacha Bessis and Jérôme Biton (University of Paris 13, Inserm UMR 1125, Bobigny, France) for critical reading of the manuscript and statistical support, Mylène Petit and Nathalie Saidenberg (Avicenne Hospital, Rheumatology Department, Bobigny, France) for patient recruitment and organizing collection of clinical data, Magali Breckler and Katarzyna Matyja (University of Paris 13, Inserm UMR 1125, Bobigny, France) as well as Dennis Lindau (Radboud University, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Nijmegen, The Netherlands) for technical support.

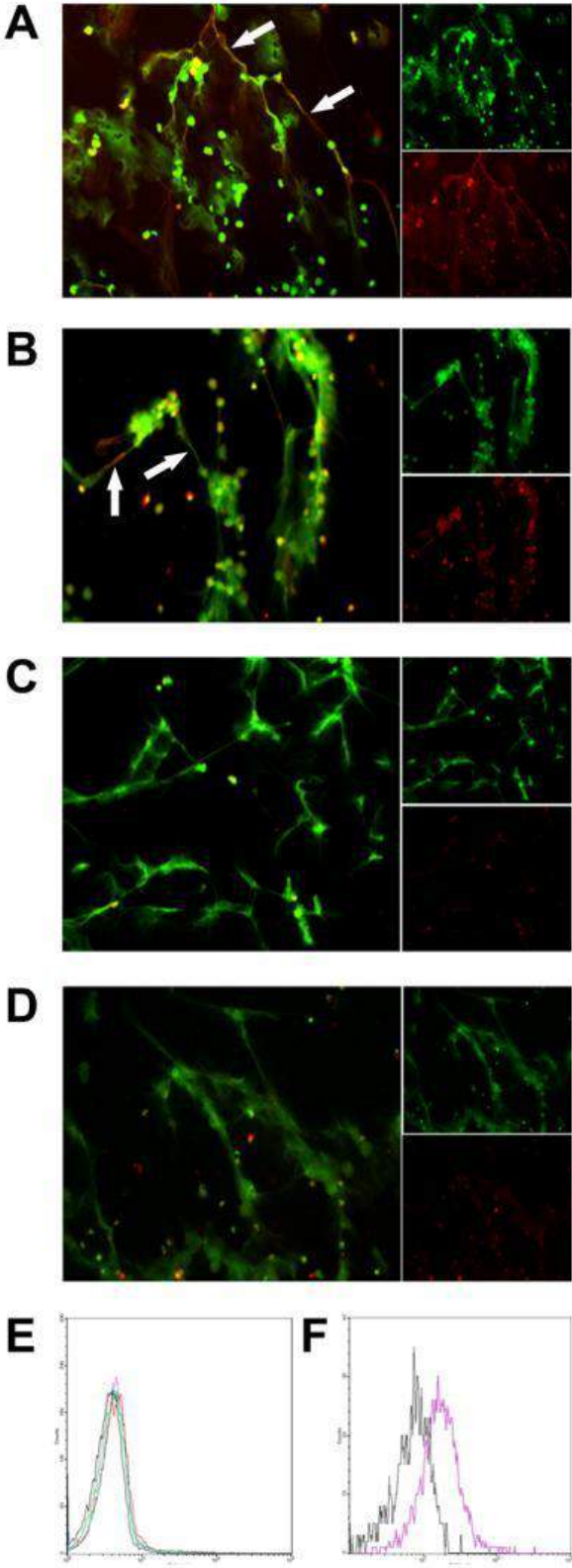
## **Author contributions:**

All authors were involved in drafting the manuscript. P.D. designed the research, performed part of the experiments, analyzed and interpreted data and wrote the manuscript. M.R. and S.S. performed the experiments, analyzed and interpreted data. J.M. performed part of the experiments and analyzed data. M.S., C.C. and G.S. contributed reagents, analyzed and interpreted data. L.S. and M.C.B. analyzed and interpreted data.

All authors declare that they have no competing interests.

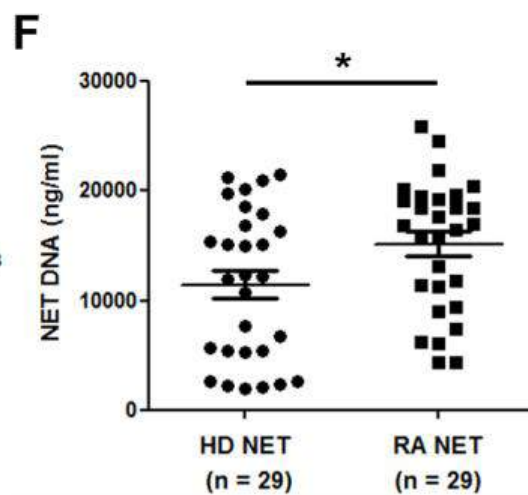
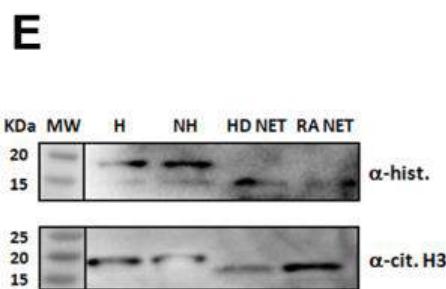
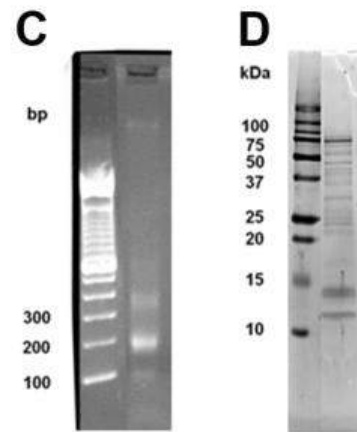
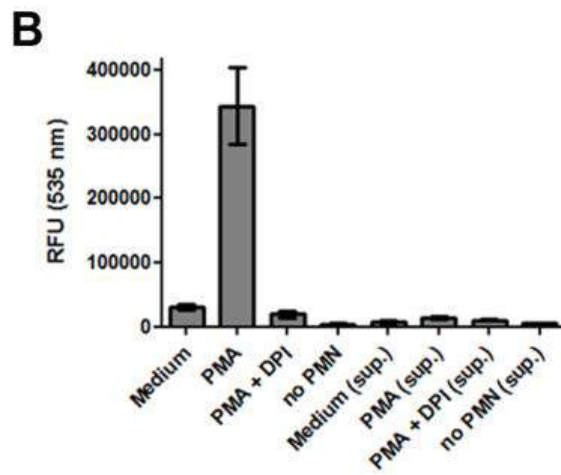
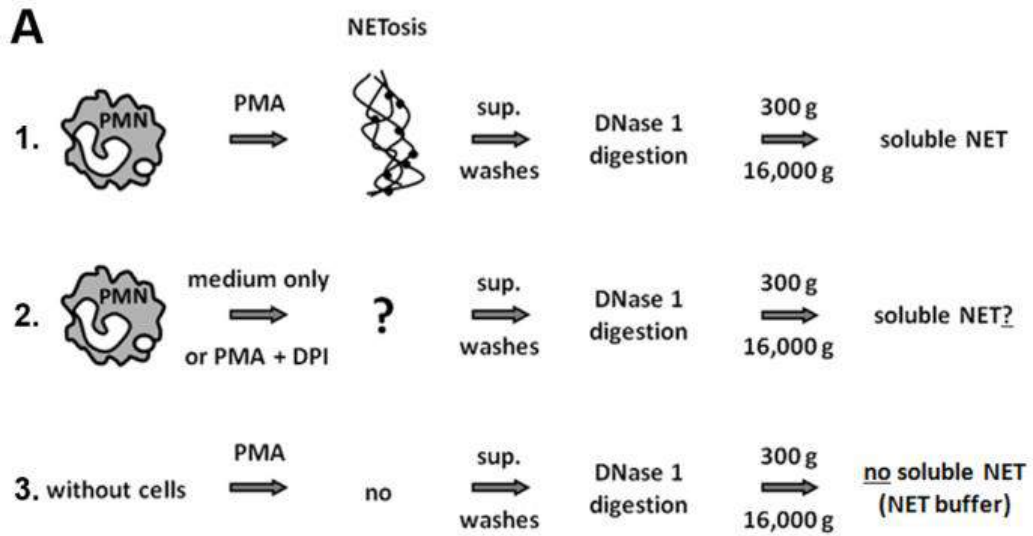


Figures:



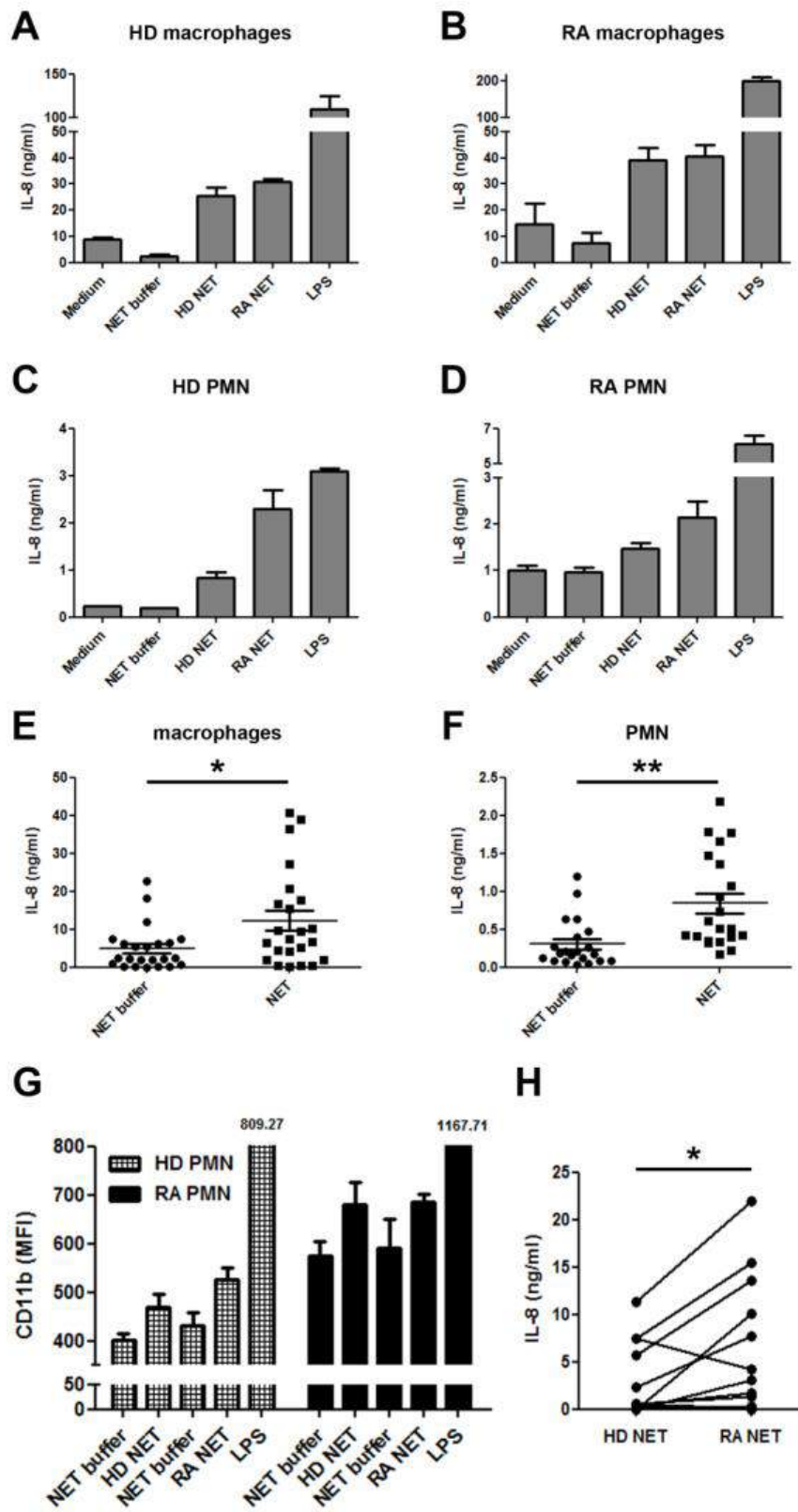
**Figure 1. IgG from ACPA-positive RA patients strongly and specifically recognize NET.**

(A) Typical chromatin fibers observed upon NETosis. PMN were freshly isolated from a HD, seeded on poly-L-lysine-coated chamber slides and activated by PMA to induce NETosis. After 2 hours, NET (arrows) were stained with a DNA dye (green) and an anti-histones monoclonal antibody followed by an AlexaFluor568-conjugated anti-mouse secondary antibody (red) and analyzed by fluorescence microscopy. The individual fluorescence channels (right) and the merged signals (left) are depicted. (B-D) PMN were freshly isolated from a HD and NETosis was induced as in (A). After 2 hours, NET were stained with a DNA dye (green) and with IgG purified from ACPA-positive RA patients (B, arrows) or from ACPA-negative patients with rheumatic diseases (C) or from HD (D) followed by an AlexaFluor568-conjugated anti-human IgG antibody (red) and analyzed by fluorescence microscopy. NET are the green chromatin filaments. The individual fluorescence channels (right) and the merged signals (left) are depicted. Shown is one representative result from 22 independent donors (11 HD and 11 RA patients) for whom NET have been induced and stained in 20 independent experiments. (E, F) Freshly isolated PMN (E) and PBMC (F) were untreated and stained ex vivo. PMN (E) were stained with a PE-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG alone (purple) or together with ACPA-positive IgG (green), ACPA-negative IgG (blue) or normal IgG (red) and analyzed by flow cytometry. The black histogram represents unstained cells. In (F), cells were pre-incubated with human Ig and directly stained with the PE-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG alone (purple). Monocytes were CD14-gated. The black histogram represents unstained cells.



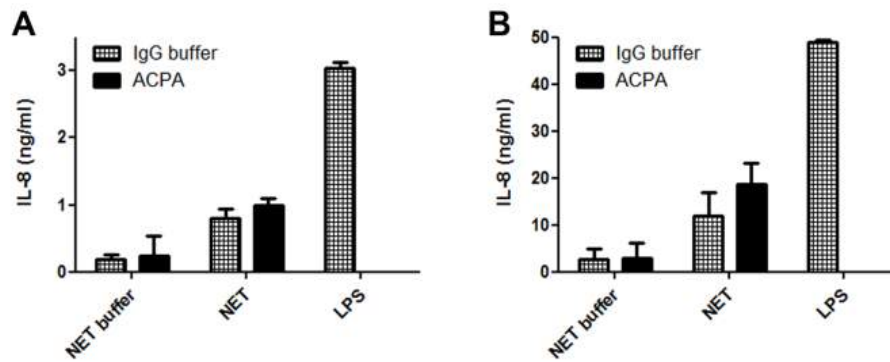
**Figure 2. Characterization of soluble NET and higher yield of production by PMN from RA patients versus healthy donors.**

(A) HD or RA PMN were seeded on poly-L-lysine-coated chamber slides and activated by PMA for 4 hours to induce NETosis (A.1), or left untreated or activated in the presence of diphenylene iodonium (DPI, 100  $\mu$ M), a NADPH oxidase inhibitor (A.2). As a negative control, soluble NET production was performed without PMN (A.3). Culture supernatants (sup.) were collected and chambers were washed. PMN were then treated with deoxyribonuclease 1 (DNase 1), the reaction was stopped by 3 mM EDTA and detached soluble NET were collected and centrifuged at 300 g and 16,000 g. NET were quantified on a fluorometer (B and F) using PicoGreen (RFU, relative fluorescence units) and by spectrophotometry and were analyzed on 1.5 % agarose gel (C) and 16 % SDS-PAGE (D). In (C) and (D): left lane, molecular weight markers; right lane, soluble NET; bp, base pair. Shown is one representative experiment of 74 independent experiments (except (B), 15 independent experiments testing sup. and DPI) using cells from independent donors (controls or RA patients). Mean and SD are shown. (E) Western blot demonstrating the presence of histones (citrullinated or not) in HD and RA soluble NET. Purified histones (H), nucleohistones (NH) as well as soluble NET from a healthy donor (HD NET) or RA patient (RA NET) were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and probed for total histones (hist., top) or citrullinated histone H3 (cit. H3, bottom). MW, molecular weight markers;  $\alpha$ -, anti. Shown is one representative experiment of 4 independent experiments using 4 pairs of HD and RA NET. (F) RA PMN produce more NET than HD PMN. Soluble NET were prepared from 58 independent donors (29 HD and 29 RA patients, from the 74 tested as in (C) and (D)) using freshly isolated PMN ( $3 \times 10^6$  cells in all cases) stimulated with PMA. Concentrations of NET DNA were determined by fluorescence using PicoGreen and according to a standard curve of purified DNA. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed Mann-Whitney test). Mean and SEM are shown. HD, healthy donor; RA, rheumatoid arthritis patient.



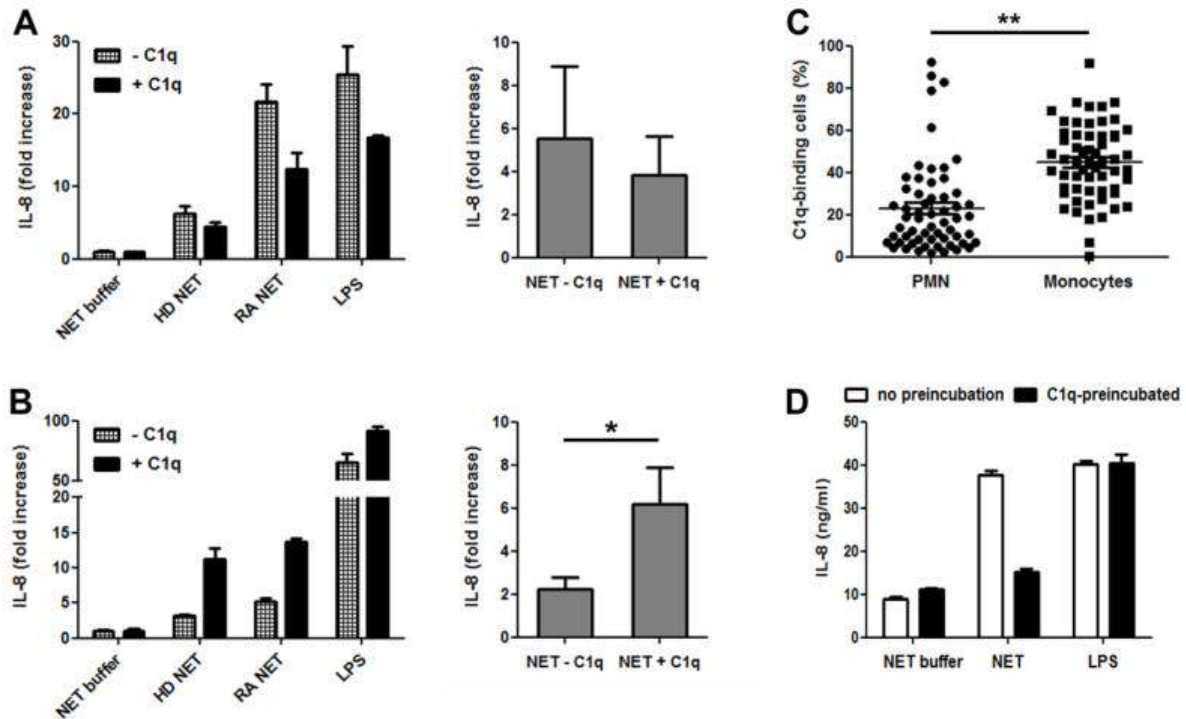
**Figure 3. Soluble NET activate PMN and macrophages and RA NET are more stimulatory than NET from healthy donors.**

(**A-D, G**) Monocyte-derived macrophages (**A, B**) and primary PMN (**C, D, G**) were prepared from HD (**A, C, G**) or RA patients (**B, D, G**) and cultured with soluble NET from HD or RA patients, the NET purification buffer, or LPS. Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA (**A-D**) and CD11b up-regulation (on PMN) by flow cytometry (**G**). Shown is one representative experiment of at least 3 independent experiments for each panel. Mean and SD of triplicates are shown. MFI, mean fluorescence intensity. (**E, F**) Pooled data (RA and HD NET) showing the NET-mediated IL-8 induction in macrophages (**E**,  $p < 0.05$  (\*, two-tailed Mann-Whitney test),  $n = 23$  pairs of NET buffer/NET preparations tested on 23 independent HD/RA macrophage donors) and PMN (**F**,  $p < 0.001$  (\*\*, two-tailed Mann-Whitney test),  $n = 21$  pairs of NET buffer/NET preparations tested on 21 independent HD/RA PMN donors). Each symbol represents one donor tested with one NET preparation or its purification buffer. Mean and SEM are shown. (**H**) HD NET and RA NET were tested by pairs (at the same concentration) on HD macrophages or PMN in 14 independent experiments. IL-8 secretion was determined for each pair of NET and compared by a two-tailed Wilcoxon signed rank test (\*,  $p < 0.05$ ). Each line represents a pair of RA NET/HD NET and data are pooled from 10 experiments with macrophages and 4 experiments with PMN. HD, healthy donor; RA, rheumatoid arthritis patient.



**Figure 4. Immune complex formation with polyclonal ACPA does not increase NET-induced cell activation.**

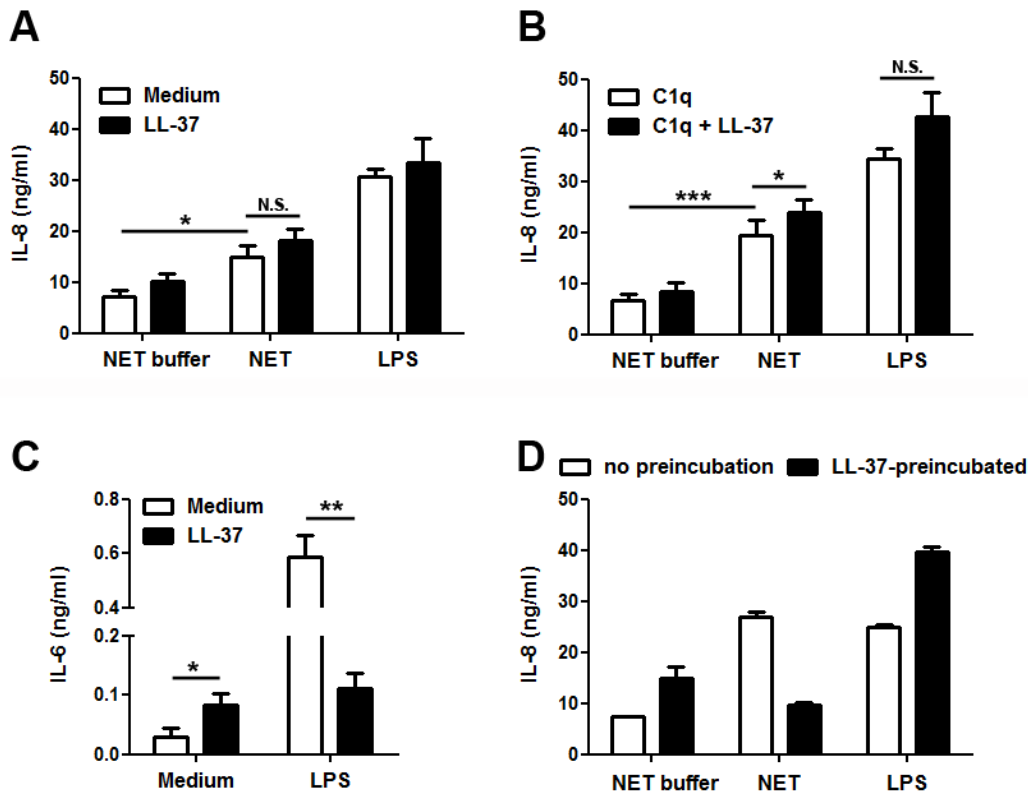
Primary PMN (A) and monocyte-derived macrophages (B) were prepared from HD and cultured with soluble NET, the NET purification buffer, or LPS with ACPA-positive IgG (black bars) or with the IgG buffer (hatched bars). To favor immune complex formation, soluble NET and ACPA were pre-incubated before addition of cells. Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Shown is one representative experiment of at least 3 independent experiments for each panel and using 5 donors tested with 5 NET preparations. Mean and SD are shown. ACPA, purified IgG containing anti-citrullinated protein antibodies.



**Figure 5. C1q enhances the NET-induced activation of cells expressing high levels of cell surface C1q receptors.**

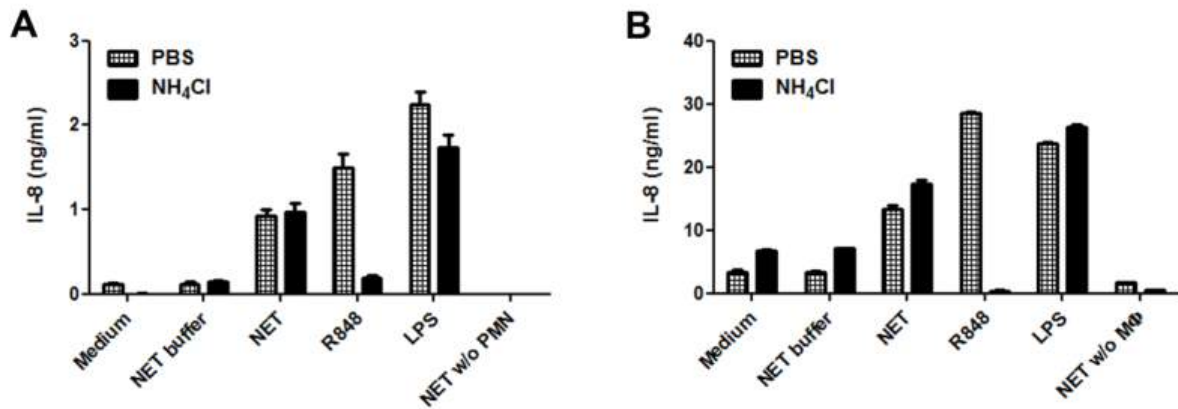
Primary PMN (A) and monocyte-derived macrophages (B) were prepared from HD and cultured with soluble NET, the NET purification buffer, or LPS in the presence (black bars) or absence (hatched bars) of C1q. Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Shown is one representative experiment (left) and pooled NET data (right) of at least 6 independent experiments for each panel and using 4 macrophage donors tested with 5 NET preparations and 3 PMN donors tested with 5 NET preparations. Results are presented as fold increases relative to NET buffer. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed Mann-Whitney test). Mean and SD (SEM for pooled data) are shown. (C) The C1q-binding capacity of PMN and monocytes was determined in 59 human blood donors (controls and RA patients). For each donor, PMN and monocytes were compared (\*\*,  $p < 0.0001$ , all monocytes vs. all PMN, two-tailed Mann-Whitney test). Mean and SEM are shown. (D) Monocyte-derived macrophages were preincubated (black bars) or not (white bars) with an excess of C1q for 2 hours and then activated or not with NET or LPS. IL-8 was quantified by ELISA. Shown is one representative experiment out of two (depicting mean and SD). HD, healthy donor; RA, rheumatoid arthritis patient.





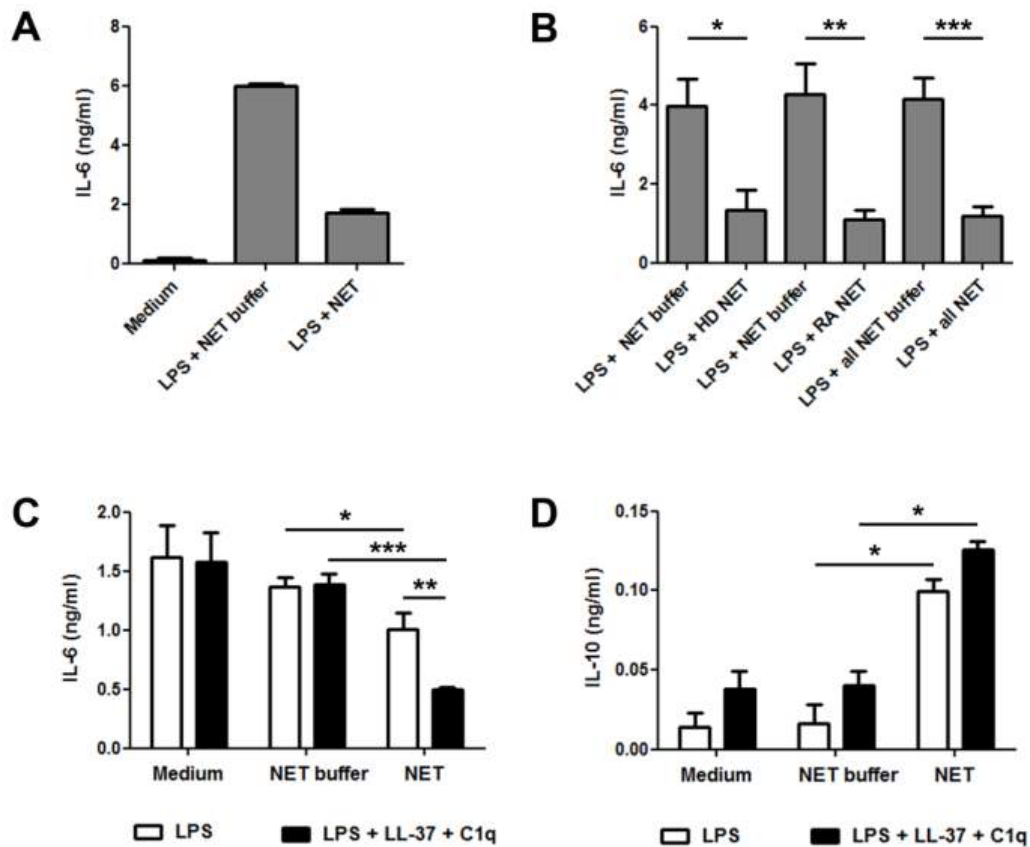
**Figure 6. C1q in combination with LL-37 further enhance macrophage response to NET.**

Monocyte-derived macrophages (**A**, **B**) and primary PMN (**C**) were prepared from HD and RA patients. Macrophages were cultured with soluble NET, the NET purification buffer, or LPS in the absence (**A**, white bars) or presence of LL-37 (**A**, black bars), C1q (**B**, white bars) or C1q together with LL-37 (**B**, black bars). PMN were cultured in medium alone or LPS, with LL-37 (**C**, black bars) or not (**C**, white bars). Cell activation was estimated by measuring IL-8 or IL-6 secretion by ELISA. Shown are pooled data from 5 independent experiments (5 macrophage donors tested with 5 NET preparations) and from 3 independent experiments (3 PMN donors). Similar results were obtained with HD and RA cells. Mean and SEM are shown. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$  (two-tailed Mann-Whitney test or two-tailed unpaired *t*-test, with or without Welch's correction); N.S., not significant. (**D**) Monocyte-derived macrophages were pre-incubated (black bars) or not (white bars) with an excess of LL-37 for 2 hours and then activated or not with NET or LPS. IL-8 was quantified by ELISA. Shown is one representative experiment out of two (depicting mean and SD).



**Figure 7. NET activate PMN and macrophages independently of endosomal acidification.**

Primary PMN (A) and monocyte-derived macrophages (B) were prepared from HD and cultured with soluble NET, the NET purification buffer, TLR7/8 (R848) or TLR4 (LPS) agonists, in the presence (black bars) or absence (hatched bars) of ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl, inhibitor of endosomal acidification). Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. As a control, NET were incubated without (w/o) PMN or macrophages (MΦ). Shown is one representative experiment of 5 independent experiments using 5 PMN donors tested with 2 NET preparations and of 3 independent experiments using 3 macrophage donors tested with 2 additional NET preparations. Mean and SD are shown.



**Figure 8. NET possess an anti-inflammatory activity which is amplified by C1q and LL-37.**

Monocyte-derived macrophages were prepared from HD or RA patients and cultured in medium only or with soluble NET or the NET purification buffer, in the presence of LPS (A, B) or in the presence of LPS with or without C1q and LL-37 (C, D). Cell activation was estimated by measuring IL-6 and IL-10 secretion by ELISA. Shown is one representative experiment (A) and the 19 data pooled from 11 independent experiments using 13 macrophage donors tested with 12 (HD and RA) NET preparations (B). Asterisks indicate  $p < 0.05$  for LPS with NET vs. LPS with the purification buffer (\*,  $p < 0.05$  for HD NET, two-tailed Mann-Whitney test; \*\*,  $p < 0.005$  for RA NET; \*\*\*,  $p < 0.0001$  for all NET; two-tailed unpaired *t*-tests with Welch's correction). Panel (C) shows the increase of the NET anti-inflammatory activity by C1q and LL-37, whereas panel (D) highlights the simultaneous induction of IL-10. Shown are pooled data from 3 independent experiments (3 macrophage donors tested with 3 NET preparations). \*,  $p < 0.05$  (two-tailed unpaired *t*-test); \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$  (two-tailed unpaired *t*-tests with Welch's correction). Mean and SD (A) or SEM (B, C, D) are shown. HD, healthy donor; RA, rheumatoid arthritis patient.

## Supplementary Information

### Supplementary Methods

#### Flow cytometry.

Phenotype and purity of PMN and monocytes was determined by staining with mAb specific for CD66b (FITC-conjugated, clone G10F5) or CD14 (PE-conjugated, clone M5E2), respectively, or the corresponding isotype control, at 4° C in staining buffer (PBS containing 5 % heat-inactivated FCS, 100 µg/ml human  $\alpha$ -globulin (Calbiochem), 0.02 % sodium azide) and according to classical protocols. Cell viability was estimated by propidium iodide staining. PMN activation was analyzed by staining with mAb specific for CD66b (FITC-conjugated) and CD11b (PE-conjugated, clone ICRF44). CD11b expression was estimated on CD66b-positive cells. Macrophage activation was analyzed by staining with mAb specific for CD86 (AlexaFluor647-conjugated, clone IT2.2), HLA class I (anti-HLA-ABC, PE-Cy5-conjugated, clone G46-2.6) and HLA class II (anti-HLA-DR, APC-Cy7-conjugated, clone L243). All antibodies were purchased from BD Biosciences (except anti-HLA-ABC, BioLegend). To estimate IgG/ACPA binding on untreated PMN and PBMC, cells were saturated in staining buffer for 20 minutes at 4° C, washed, stained ex vivo with the different purified IgG (0 or 300 µg/ml in staining buffer at 4° C), washed and incubated with a PE-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG (Beckman Coulter, catalog number 732595). In PBMC, monocytes were gated.

The total expression of C1q receptors was quantified on primary monocytes and PMN by measuring the capacity to bind C1q. EDTA whole blood was used to minimize manipulations and was stained ex vivo directly after lysis of erythrocytes. Whole blood cells were saturated in staining buffer (containing bovine serum albumin instead of FCS/ $\alpha$ -globulin) for 20 minutes at 4° C, washed and incubated in staining buffer containing 0 or 25 µg/ml purified C1q for 30 minutes at 4° C to avoid uptake. After washing, cells were stained with a FITC-conjugated anti-human C1q antibody (AHP033F, AbD Serotec) and analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence on gated PMN or monocytes. Cell identity was confirmed by CD66b or CD14 staining, respectively. Dead cells were excluded by propidium iodide staining. In some experiments, purified PMN, purified monocytes and monocyte-derived macrophages were analyzed as above to evaluate C1q receptor expression. The capacity to bind C1q is defined as: (% of FITC-positive cells incubated with C1q) - (% of FITC-positive cells incubated without C1q). Expression levels of C1q receptors are determined by the FITC mean fluorescence intensity.

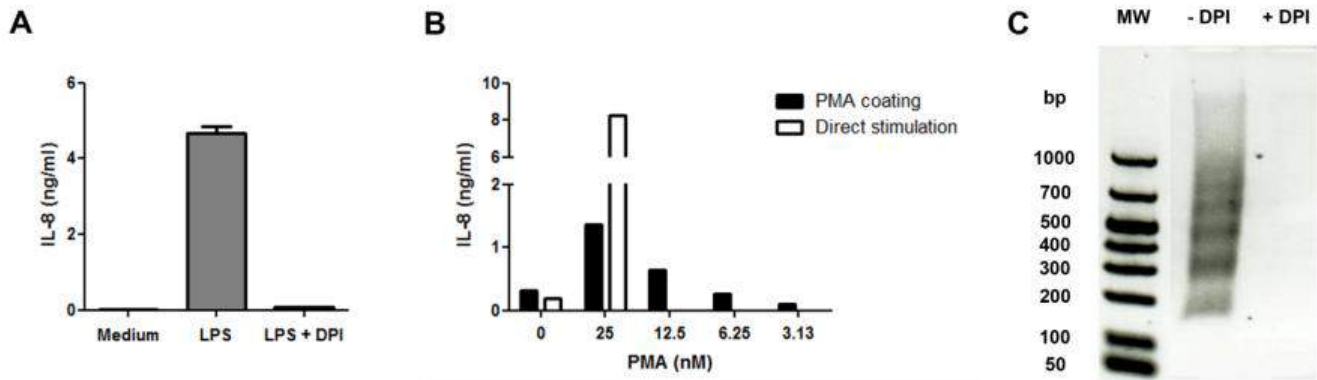
Cells were analyzed on a *four-color FACSCalibur* or a *eight-color FACSCanto II apparatus* (Becton Dickinson). Data were evaluated with CellQuest Pro software (Becton Dickinson) or Weasel.

### **Western-blot.**

Soluble NET (0.8 µg) prepared from freshly isolated normal and RA PMN, purified total histones (Roche, 0.3 µg) and nucleohistone (Sigma-Aldrich, 0.3 µg) were separated on a 4-15 % SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane using Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer System (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. After saturation with Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween 20 (TBS-T) and 5 % non-fat milk, membranes were incubated (overnight, 4°C) with primary antibodies (either anti-histone mAb, clone H11-4, pan histones, Merck Millipore, 2 µg/ml, or anti-citrullinated histone H3, ab5103, polyclonal, Abcam, 3 µg/ml). After washing with TBS-T, bound antibodies were detected using secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:5,000) or goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz, 1:2,500)) and revealed with the ECL select detection system (Amersham) using an imaging system (ChemiDoc MP, Bio-Rad) and analyzed with Image Lab software (Bio-Rad).

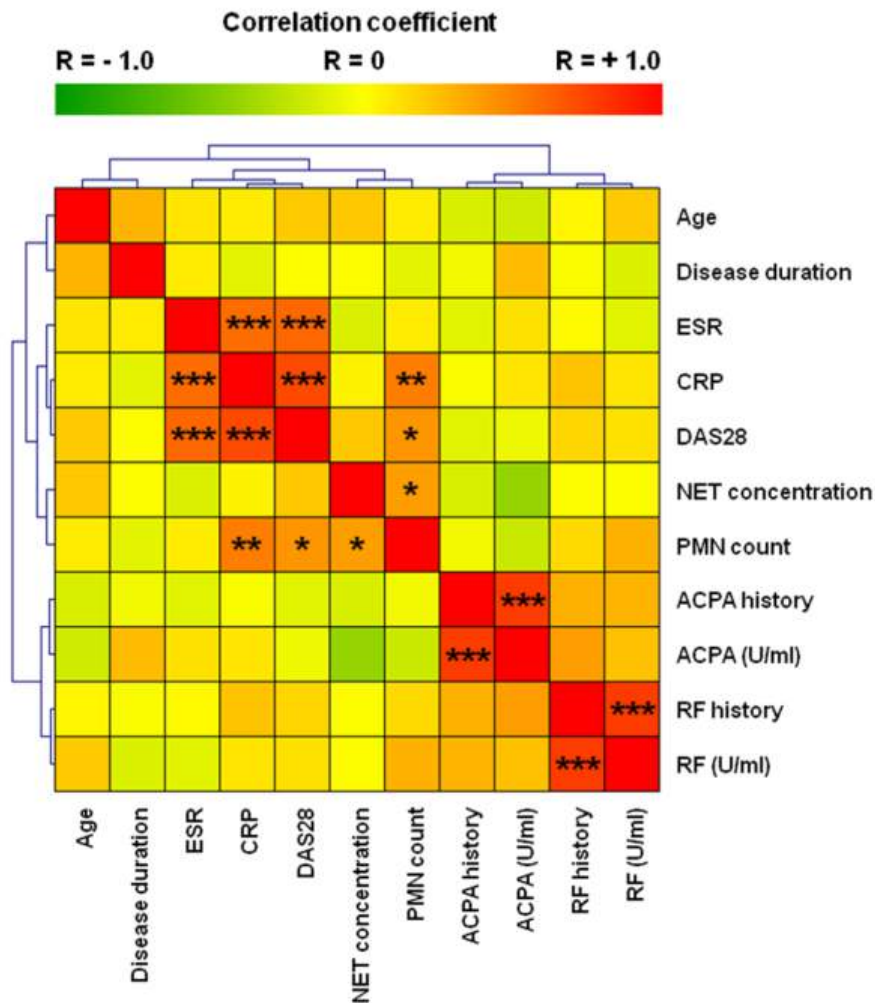
### **ELISA.**

Detection of IL-8, IL-6, IL-10 and TNF secretion by human PMN and macrophages was analyzed by sandwich ELISA using OptEIA set or mAb pairs and streptavidin-peroxidase conjugate from BD Biosciences or eBioscience and according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations in cell culture supernatants are depicted as mean ± standard deviation or standard error of the mean of triplicates.



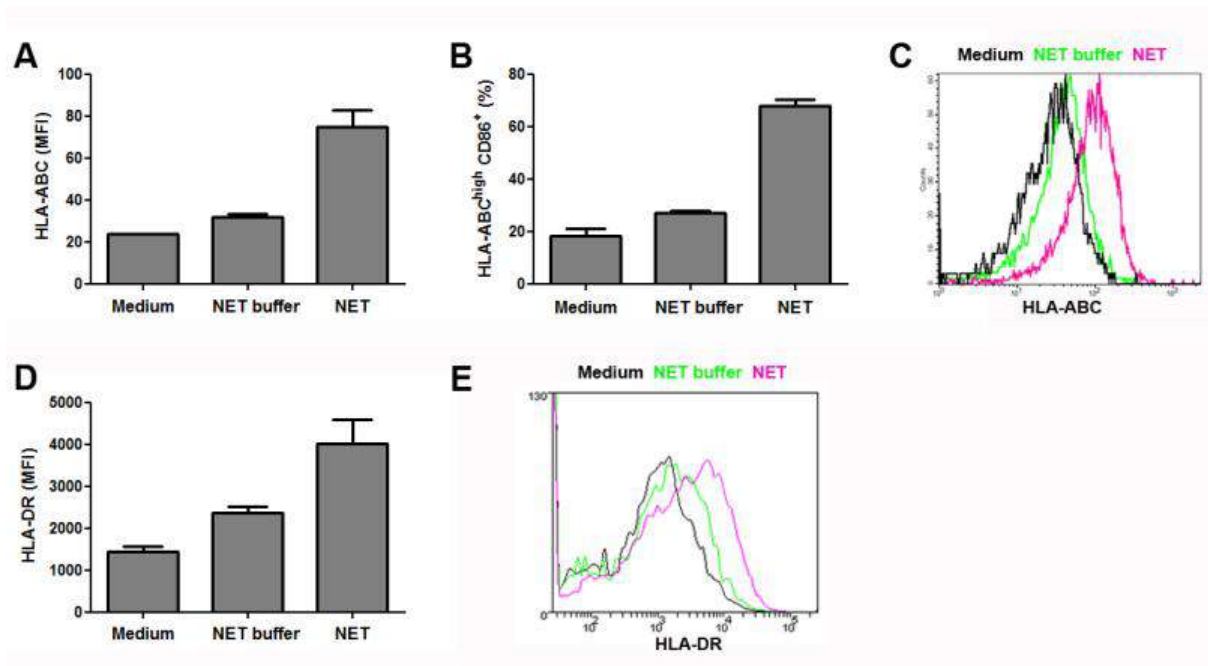
**Supplementary Figure 1. NADPH oxidase inhibitors block both cytokine release and NETosis by activated PMN, whereas adsorbed PMA artificially stimulates target cells directly co-cultured on adherent NET.**

(A) IL-8 secretion is inhibited by a NADPH oxidase inhibitor. PMN were cultured in medium alone, LPS, or LPS with diphenylene iodonium (DPI, 100  $\mu$ M). After 14 hours, cell culture supernatants were collected and IL-8 was quantified by ELISA. Shown is one representative experiment of 3 independent experiments. Mean and SD of triplicates are shown. (B) Potential unwanted activation of target cells by residual plastic-bound PMA. Poly-L-lysine-coated chamber slides were incubated with medium (without PMN) supplemented with different PMA concentrations (black bars) for 4 hours (like in the NETosis induction protocol). Medium was collected, chambers were washed and then PMN (target cells) were added and cultured in medium alone for 14 hours. Cell culture supernatants were collected and IL-8 was quantified by ELISA. As a control, PMN were directly cultured in chamber slides and stimulated with PMA (white bars). Although chambers were washed, part of the PMA is absorbed and is clearly capable of activating PMN, even if direct stimulation of PMN by PMA is more efficient. Shown is one representative experiment of 3 independent experiments. (C) NETosis is not triggered in the presence of a NADPH oxidase inhibitor. PMN were seeded on poly-L-lysine-coated chamber slides. Adherent PMN were activated by PMA for 4 hours to induce NETosis in the presence/absence of DPI (100  $\mu$ M). Culture supernatants were collected and chambers were washed. PMN were then treated with deoxyribonuclease 1, the reaction was stopped by 3 mM EDTA and detached soluble NET were collected and centrifuged at 300 g and 16,000 g. NET were analyzed on a 1.5 % agarose gel. Left lane, molecular weight (MW) markers; middle and right lanes, PMN activated by PMA in the absence/presence of DPI, respectively. Shown is one representative experiment of 6 independent experiments using cells from independent donors (healthy donors or RA patients). bp, base pair.



**Supplementary Figure 2. Spearman-correlation matrix of clinical parameters and soluble NET prepared in vitro for the 42 RA patients described in Table S1.**

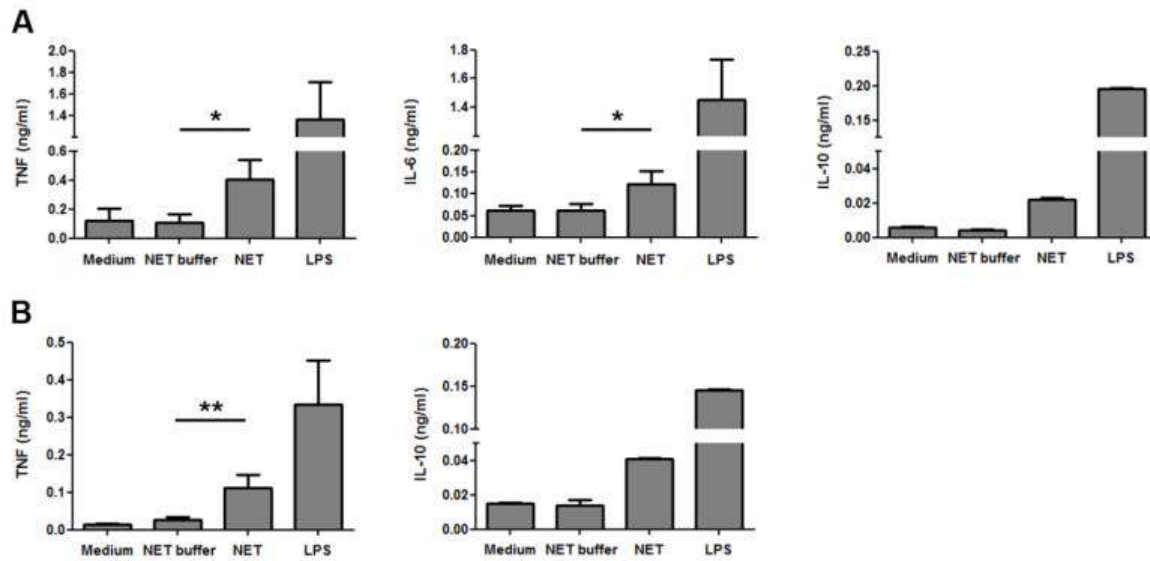
Each colored square illustrates the correlation between two parameters. Red color illustrates a strong positive correlation, and green color illustrates a strong negative correlation. A two-tailed Spearman test was applied. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  ( $< 0.0001$  for DAS28 vs. CRP). ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; DAS28, disease activity score of 28 joints; NET concentration,  $\mu\text{g/ml}$  of soluble NET prepared in vitro; PMN count, concentration of circulating PMN; ACPA, anti-citrullinated protein antibodies (U, units); RF, rheumatoid factor (U, units). All values refer to the date of blood collection, except ACPA/RF history (history of positivity).



**Supplementary Figure 3. NET-activated macrophages up-regulate HLA class I and II as well as CD86.**

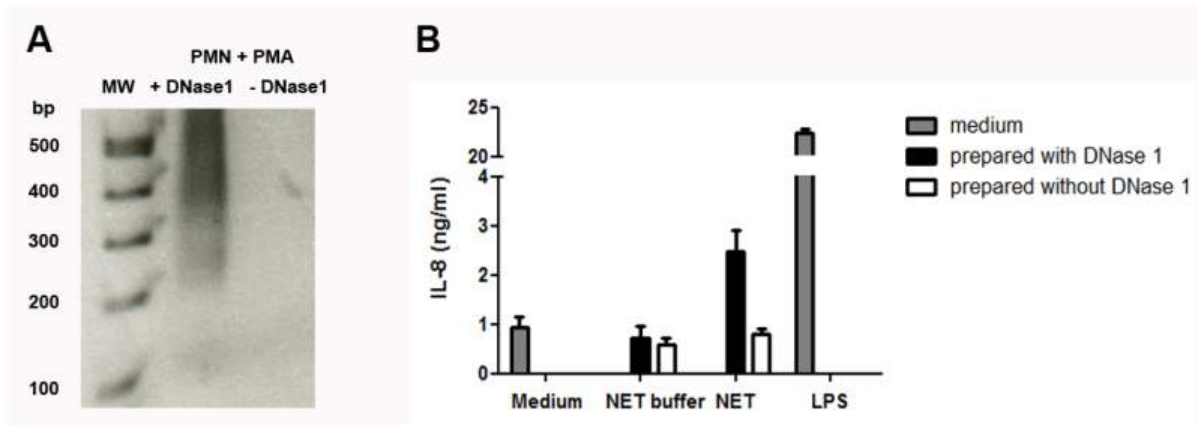
Monocyte-derived macrophages were cultured in medium alone, the NET purification buffer or soluble NET and then analyzed by flow cytometry. (A) HLA-ABC expression after 72 hours. (B) Percentages of macrophages with high HLA-ABC expression and positive for CD86 after 48 hours. (C) Representative flow cytometry histogram showing HLA-ABC up-regulation after culture with NET (pink) as compared with medium only (black) or NET purification buffer (green). (D) HLA-DR expression after 48 hours. (E) Representative flow cytometry histogram showing HLA-DR up-regulation after culture with NET (pink) as compared with medium only (black) or NET purification buffer (green). Shown is one representative experiment out of three. Similar results were obtained with normal vs. RA NET and normal vs. RA macrophages. Mean and SD are presented. MFI, mean fluorescence intensity.





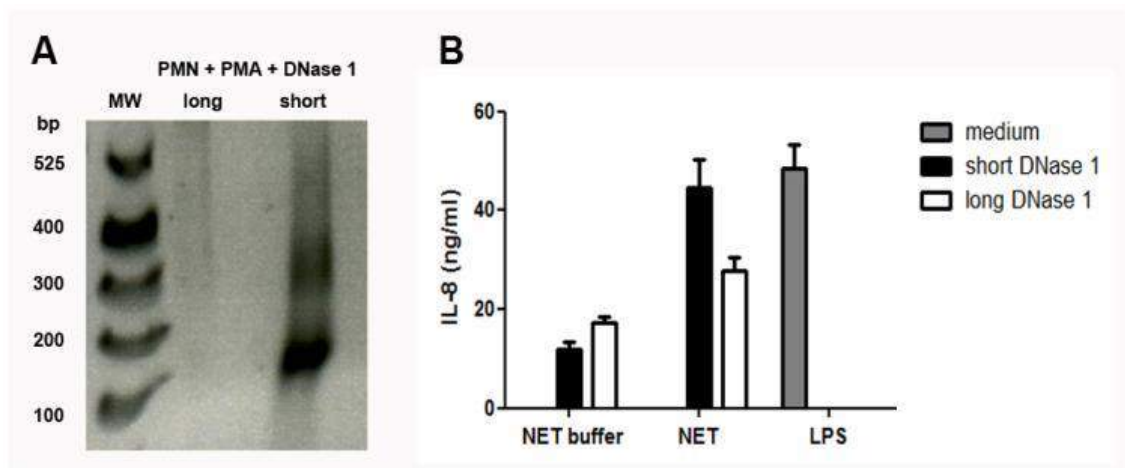
**Supplementary Figure 4. TNF, IL-6 and IL-10 secretion by NET-stimulated macrophages and PMN.**

Monocyte-derived macrophages (A) and primary PMN (B) were cultured in medium alone, soluble NET, the NET purification buffer, or LPS. Cytokine secretion was estimated by ELISA. For TNF and IL-6, data are pooled from 17 (A) and 10 (B) independent experiments using independent donors (mean and SEM are shown). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$  (two-tailed Mann-Whitney test). For IL-10, shown is one representative experiment out of three depicting mean and SD.



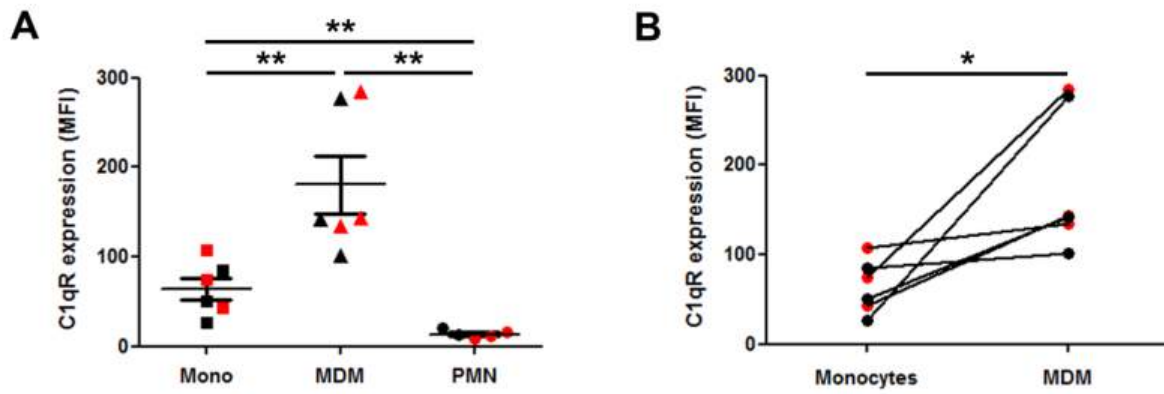
**Supplementary Figure 5. Obtainment of soluble NET and stimulatory activity require DNase 1 treatment.**

Freshly isolated PMN were activated with PMA for 4 hours to induce NETosis. After collection of supernatants and washes, adherent NET were treated or not with DNase 1 to detach or not NET and produce soluble NET or not. Both preparations were then treated with EDTA and centrifuged as in Figure 2. (A) Preparations obtained with/without DNase 1 treatment were analyzed on a 1.5 % agarose gel. Without DNase 1 treatment, no soluble NET were obtained. This was confirmed by measuring DNA concentrations by spectrophotometry: 23.5  $\mu\text{g/ml}$  (with DNase 1) vs. 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (without DNase 1). MW, molecular weight markers; bp, base pair. (B) Only soluble NET obtained thanks to DNase 1 treatment (black bars) activate targets cells. Freshly isolated PMN were cultured with preparations described in (A) and cell activation was determined by measuring IL-8 secretion by ELISA. LPS was used as a positive control. Shown is one representative experiment of 4 independent experiments using two pairs of NET prepared with or without DNase 1. Mean and SD are shown.



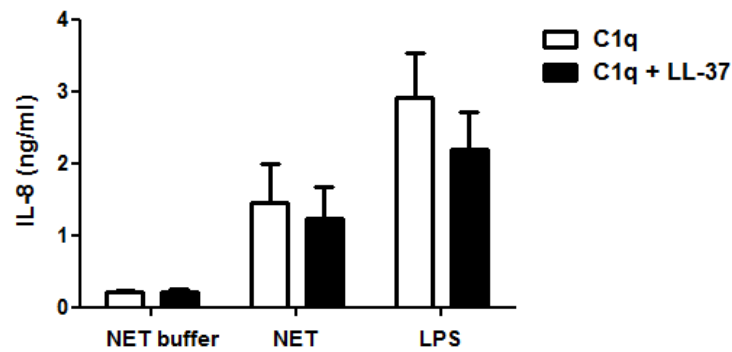
### Supplementary Figure 6. Soluble NET overdigested by DNase 1 lose their stimulatory activity.

Freshly isolated PMN were activated with PMA for 4 hours to induce NETosis. After collection of supernatants and washes, adherent NET were treated with DNase 1 for 15 minutes to detach NET and produce soluble NET (short DNase 1 treatment) or incubated for 30 minutes with DNase 1 to degrade soluble NET (long DNase 1 treatment). Both preparations were then treated with EDTA and centrifuged as in Figure 2. (A) Preparations obtained by short or long DNase 1 treatment were analyzed on a 1.5 % agarose gel. After the long DNase 1 treatment, NET DNA was nearly completely digested. This was confirmed by measuring DNA concentrations by spectrophotometry: 20.0  $\mu\text{g/ml}$  (15 min DNase 1) vs. 7.1  $\mu\text{g/ml}$  (30 min DNase 1). MW, molecular weight markers; bp, base pair. (B) Only soluble NET obtained after 15 minutes of DNase 1 treatment (black bars) efficiently activate target cells, whereas those overdigested after 30 minutes (white bars) are nearly devoid of stimulatory activity (68.2 % reduction of IL-8 induction). Monocyte-derived macrophages were cultured with preparations described in (A) and cell activation was determined by measuring IL-8 secretion by ELISA. LPS was used as a positive control. Shown is one representative experiment of 2 independent experiments. Mean and SEM are shown.



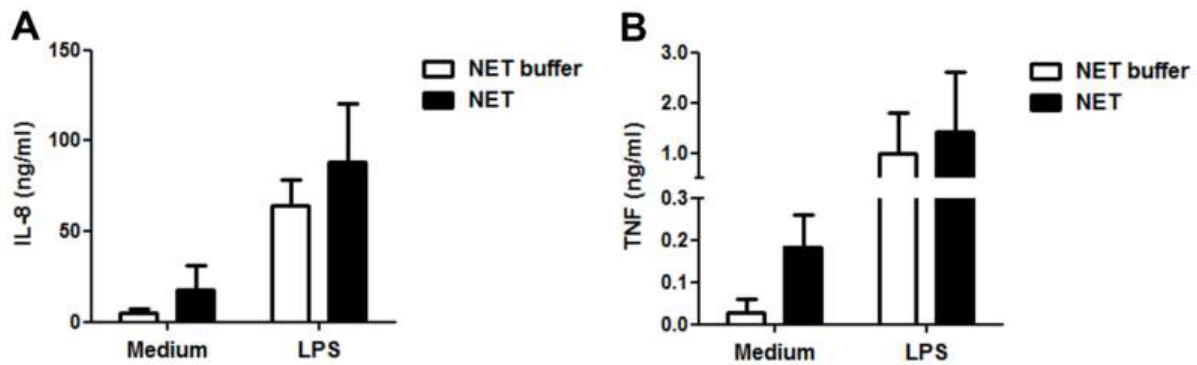
**Supplementary Figure 7. Macrophages express higher levels of cell surface C1q receptors than monocytes or PMN.**

(A) Purified primary monocytes (Mono), monocyte-derived macrophages (MDM) and isolated primary PMN were prepared from 6 independent donors (3 healthy donors (black symbols) and 3 RA patients (red symbols)) and expression levels of C1q receptors (C1qR) were analyzed. For each donor, cell subsets were compared (\*\*,  $p < 0.005$  for MDM vs. Mono, for Mono vs. PMN and for MDM vs. PMN, two-tailed Mann-Whitney test). Mean and SEM are shown. (B) For each donor, C1q receptor expression levels were compared in primary monocytes ex vivo and in MDM after differentiation from those monocytes in culture (\*,  $p < 0.05$ , two-tailed Wilcoxon signed rank test). Each line represents one donor. Data are from 6 independent experiments. MFI, mean fluorescence intensity.



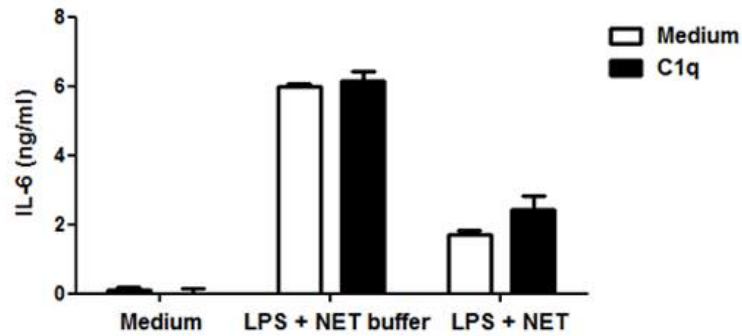
**Supplementary Figure 8. LL-37 does not support IL-8 secretion by PMN in response to NET and C1q.**

Primary PMN were prepared from HD and RA patients and were cultured with soluble NET, the NET purification buffer, or LPS in the presence of C1q (white bars) or C1q together with LL-37 (black bars). Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Shown are pooled data from 3 independent experiments (3 PMN donors tested with 3 NET preparations). Similar results were obtained with HD and RA cells. Mean and SEM are shown.



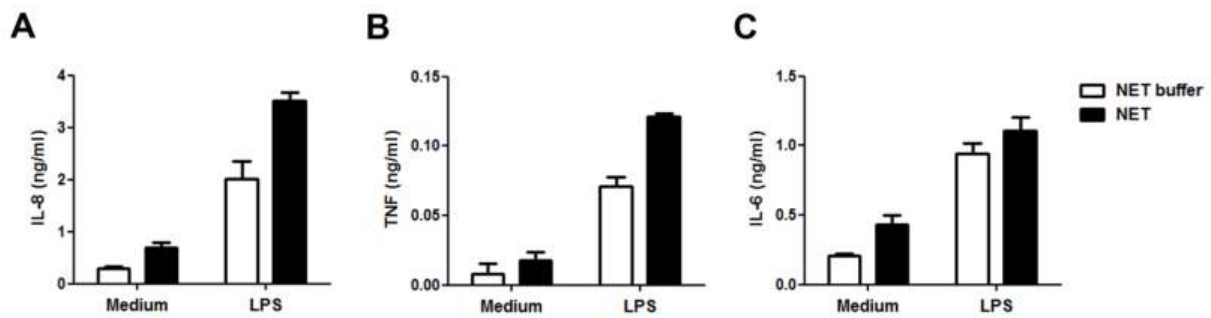
**Supplementary Figure 9. NET do not alter IL-8 and TNF secretion by LPS-activated macrophages.**

Monocyte-derived macrophages were prepared from HD and RA patients and were cultured in medium alone or with LPS, in the presence of soluble NET (black bars) or the NET purification buffer (white bars). Cell activation was estimated by measuring IL-8 (A) or TNF (B) secretion by ELISA. Shown are pooled data from 3 independent experiments (3 macrophage donors tested with 3 NET preparations). Similar results were obtained with HD and RA cells as well as with HD and RA NET. Mean and SD are shown.



**Supplementary Figure 10. C1q alone does not enhance the NET-mediated inhibition of IL-6 secretion by LPS-activated macrophages.**

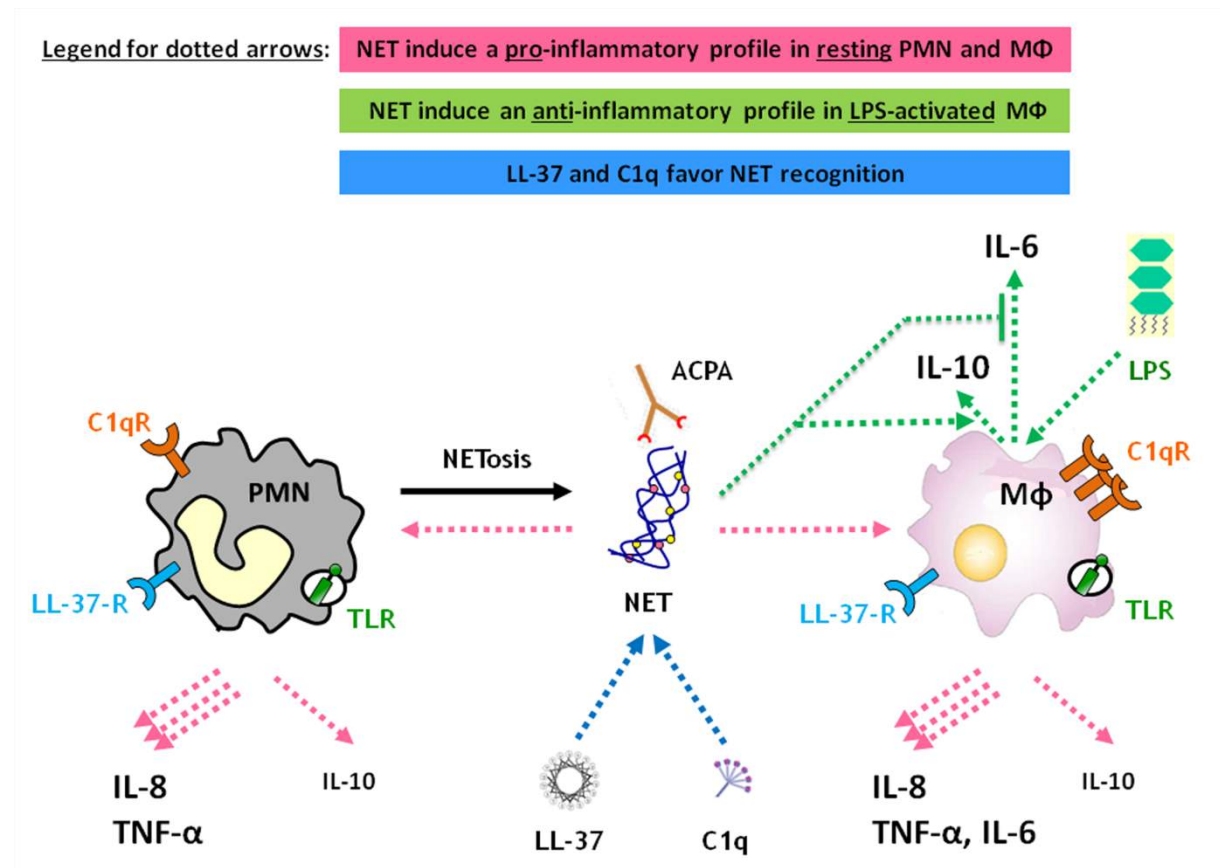
Monocyte-derived macrophages were prepared from HD and were cultured in medium alone, with LPS and the NET purification buffer, or with LPS and soluble NET, in the presence (black bars) or not (white bars) of C1q. Cell activation was estimated by measuring IL-6 secretion by ELISA. Shown is one representative experiment of 4 independent experiments (2 macrophage donors tested with 4 NET preparations). Similar results were obtained with HD and RA NET. Mean and SD of triplicates are shown.



**Supplementary Figure 11. LPS-mediated activation of PMN is not inhibited by NET.**

Primary PMN were prepared from HD and were cultured in medium alone or LPS in the presence of soluble NET (black bars) or the NET purification buffer (white bars). Cell activation was estimated by measuring IL-8 (A), TNF (B) and IL-6 (C) secretion by ELISA. Shown is one representative experiment of 3 independent experiments (3 PMN donors tested with 3 NET preparations). Mean and SD of triplicates are shown.





**Supplementary Figure 12. Dual activity of NET.**

Activated PMN enter NETosis in response to some stimuli. In RA, PMN are significantly more sensitive to NETosis triggering. These NET directly activate (pink arrows) steady state PMN (left) and macrophages (MΦ, right), leading to strong IL-8, TNF and IL-6 secretion (three important cytokines in RA) but low IL-10 induction, i.e. a pro-inflammatory profile. In addition, RA NET are significantly more stimulatory than normal NET. Although NET are recognized by ACPA, the resulting immune complexes do not clearly enhance PMN and MΦ response to NET. Likewise, endosomal TLR are probably not involved in NET sensing. Regarding MΦ, NET-induced activation is specifically increased in the presence of DNA-binding molecules like C1q and LL-37 (blue arrows). C1q in combination with LL-37 carry NET to PMN and MΦ which express surface C1q and LL-37 receptors (C1qR, LL-37-R). Because MΦ express much more C1qR than PMN, MΦ (and not PMN) activation by NET is enhanced by C1q or C1q/LL-37. On the contrary, NET induce an anti-inflammatory profile in strongly-activated MΦ but not PMN (green arrows). Indeed, NET specifically (partly) inhibit secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 by MΦ in response to LPS, especially in the presence of both C1q and LL-37, and inversely enhance IL-10 secretion by those MΦ.

**Supplementary Table 1. Characteristics of RA patients used to prepare soluble NET for cell activation studies.**

Paient ID. (n = 42)	Age (years)	Gender (female)	Disease duration (years)	RF positive	ACPA positive	CRP (mg/L)	ESR (mm/hour)	Steroids	DMARD	Biologics	DAS28
RA77	61	0	21	1	1	2	18	0	1	0	3.77
RA87	43	1	1	1	1	3	10	1	0	0	3.35
RA88	64	1	22	0	1	2	14	1	1	0	3.11
RA90	55	1	13	1	1	29	47	0	1	0	4.21
RA91	67	1	20	1	1			1	0	0	
RA92	57	1	19	1	1	7	24	1	1	0	3.81
RA93	65	1	4	1	1	7	18	1	1	0	4.38
RA94	68	1	12	1	1	5	25	0	1	0	4.17
RA95	51	1	20	1	1	9	30	1	1	0	4.33
RA98	47	1	12	1	1	3	2	1	1	1	1.33
RA106	53	1	2	0	0	3	20	0	1	0	3.36
RA108	83	1	48	0	0	56	45	1	1	0	4.32
RA114	56	1	14	1	1	25	36	0	1	0	5.71
RA115	62	0	6	1	1	1	7	1	1	0	2.32
RA117	56	1	31	1	1	14	15	1	1	0	4.98
RA121	54	1	13	1	0	14	17	1	1	0	3.98
RA124	51	1	8	1	1	4	10	0	1	0	2.59
RA128	44	1	2	1	1	20		1	1	0	
RA141	67	1	11	1	0	12	40	0	0	0	5.87
RA157	57	1	2		1			0	0	0	
RA158	68	1	12	1	0	15		1	0	0	
RA159	59	1	3		1	1.6	3.3	0	0	0	2.08
RA163	43	1	16	1	1	2	20	0	1	1	2.42
RA170	64	1	8	1	1	5	32	0	1	0	3.92
RA181	45	1	13	0	1	4	10	1	0	0	4.12
RA182	64	1	9	0	1	1	22	1	1	0	2.44
RA188	59	1	6	0	1	3	14	0	1	0	2.13
RA189	42	1	8	1	1	6	15	0	1	0	3.16
RA191	80	1	30		0	<1	21	0	1	0	4.17
RA194	62	1	31		1	2.4	17	1	1	0	4.63
RA197	82	1	13	1	1	25	73	1	0	0	6.61
RA202	61	1	5	1	1	59.2	75	1	1	0	5.73
RA212	54	1	1	1	1	11	47	1	1	0	
RA213	50	0	2		1	58.2	37	1	1	0	6.84
RA214	53	0	9	1	1	4	20	1	1	0	4.95
RA218	87	1	15	1	1	7	3	1	1	0	1.88
RA225	58	1	6	1	0	<1	7	1	1	0	2.68
RA226	49	1	6	0	0	8	20	0	1	0	5.71
RA227	75	1	5	1	1	23	14	1	1	0	6.57
RA228	57	1	15	1	1	10	27	1	1	0	3.43
RA236	65	1	32	1	1	2	8	1	1	0	3.95
RA237	75	1	5	1	1	28	11	1	1	0	6.06
Mean (± SD)	59.8 (11.2)	90.5 %	12.6 (10.2)	81.1 %	81.0 %	12.3 (15.4)	23.0 (17.1)	64.3 %	81.0 %	4.8 %	4.0 (1.4)

RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; DMARD, disease-modifying anti-rheumatic drug; DAS28, disease activity score of 28 joints. All values refer to the date of blood collection, except RF and ACPA (history of positivity). “1”/”0” means yes/no.

## B. Article en préparation :

# Les NET activent de manière différentielle les sous-populations de cellules myéloïdes

Sarra Seninet

## 1. INTRODUCTION

La PR est une maladie inflammatoire chronique qui se développe à cause d'une rupture de tolérance vis-à-vis des auto-antigènes, menant à la production d'auto-anticorps ciblant des protéines ayant des modifications post-traductionnelles telles que la citrullination et la carbamylation (Alivernini et al., 2018).

L'étiologie de la PR est inconnue mais il a été rapporté que celle-ci représente une maladie multifactorielle faisant intervenir dans sa pathogénèse des prédispositions génétiques (par exemple l'antigène leucocytaire humain DR-4 (HLA-DR4) en particulier DRB1\*0401 (Okada et al., 2014), mais aussi des facteurs environnementaux et comportementaux tels que le tabagisme et les infections par *Porphyromonas gingivalis*, via peut être l'augmentation du phénomène de citrullination formant ainsi de nouveaux épitopes qui se lient préférentiellement aux molécules HLA-DR (par exemple DRB1\*0401) par rapport à la forme native (Klareskog et al., 2006; Wegner et al., 2010).

Les anticorps dirigés contre les protéines citrullinées sont hautement spécifiques de la PR et reconnaissent ces épitopes portant la citrulline (Makrygiannakis et al., 2006). Les protéines citrullinées et les complexes immuns contenant divers antigènes citrullinés ont une immunogénicité et une arthritogénicité accrues, et leur présence dans les articulations arthritiques est en corrélation avec la sévérité de la maladie. Ces antigènes comprennent la vimentine, l'antithrombine, l' $\alpha$ -énolase, le fibrinogène (Kinloch et al., 2005; Sokolove et al., 2011) et nous supposons aussi les NET.

Les enzymes peptidylarginine déiminase (PAD) 2 et 4 génèrent ces protéines citrullinées. Elles sont exprimées dans les cellules myéloïdes (Jones et al., 2009) et sont détectés dans la synoviale rhumatoïde (Foulquier et al., 2007). Les NET sont libérés via une forme de « mort » cellulaire appelée NETose. Ces NET représentent un réseau de chromatine décondensée décorée de peptides antimicrobiens présents dans les granules des neutrophiles (Brinkmann et al., 2004). Les PAD sont en partie activées puis relarguées lors de la NETose.

Nous avons montré que les PNN de patients PR produisent plus de NET que ceux de donneurs sains et que ces NET sont antigéniques, car reconnus par les ACPA, mais aussi pro-inflammatoires permettant l'activation des PNN et des MΦ via l'induction de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8, l'IL6 et le TNF- $\alpha$ .

De plus, il a été montré que les NET sont capables d'induire la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires, à savoir l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, via l'activation d'inflammasome mais sur des MΦ "primés" par du LPS (Kahlenberg et al., 2013) et sur des lignées macrophagiques (Hu et al., 2017). C'est pour cela que nous avons entrepris d'évaluer la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par des cellules primaires (MΦ et PNN).

Au cours du développement de la PR, un afflux important de monocytes sanguins entraîne une augmentation dans le nombre de MΦ, particulièrement dans la synoviale, qui adoptent préférentiellement un phénotype pro-inflammatoire (MΦ M1) grâce aux signaux locaux (Herenius et al., 2011). Ces MΦ produisent des métalloprotéinases et des cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6, responsables de la destruction du cartilage (Kinne et al., 2007). Des MΦ anti-inflammatoires M2 sont présents au cours de la PR, mais l'activité IL-10, caractéristique des MΦ M2, est relativement diminuée chez les patients atteints de PR par rapport aux individus sains (Kennedy et al., 2011). Par ailleurs, les souris déficientes en IL-10 développent une arthrite expérimentale exacerbée, et le phénotype des MΦ synoviaux chez ces souris est déplacé vers le phénotype M1 pro-inflammatoire (Ye et al., 2014). De ce fait, nous avons voulu caractériser précisément l'effet des NET mais cette fois-ci sur les sous-populations macrophagiques afin de vérifier s'ils favorisent l'activité pro-inflammatoires des M1 ou au contraire agissent via leur propriétés anti-inflammatoires, comme nous l'avons montré sur les MΦ activés par LPS (inhibition de la sécrétion d'IL-6 et augmentation de la production d'IL-10).

Cet effet anti-inflammatoire des NET a été observé aussi par l'équipe du Pr Sylvie Cholet-Martin (Barrientos et al., 2014), mais sur des monocytes dérivés en DC. Ces cellules une fois activées par du LPS, les NET viennent inhiber leur production en cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-23) et diminuer l'expression d'HLA-DR, CD80,

CD83 et CD86. Alors que dans un modèle murin d'arthrite (AEC) l'exposition de DC à des NET permet une maturation de ces cellules (augmentation de l'expression d'IL-6) et cela a pu être confirmé dans la même étude sur des DC humaines (Papadaki et al., 2016). Puisque les NET peuvent avoir un rôle pro- mais aussi anti-inflammatoire en fonction de l'état d'activation et du type cellulaire, dans cette présente étude nous avons voulu étudier le rôle de ces filaments d'ADN sur la lignée myéloïde à savoir les monocytes, les MΦ et les DC.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### *a) Isolement des monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques*

Les cellules sont issues du sang périphérique de donneurs sains ou de patients atteints de PR, qui sont obtenus respectivement de l'établissement français de sang (EFS) et du service de Rhumatologie de l'Hôpital Avicenne de Bobigny. Les cellules mononuclées et les PNN du sang périphériques (PBMC) sont isolés par centrifugation sur dextran (Axi shield) à 500g pendant 40 minutes.

Les monocytes sont ensuite purifiées par tri positif CD14. L'anneau de PBMC est lavé avec du tampon phosphate salin (PBS, Eurobio). Les cellules sont ressuspendues dans du PBS pour procéder au tri positif CD14 (Miltenyi) contenant des billes magnétiques dans du tampon MACS (PBS, BSA 0.5% et EDTA 2mM, pH 7.2). La pureté est vérifiée par cytométrie en flux.

Les monocytes sont par la suite soit différenciés en macrophages ( $M\Phi$ ) indifférenciés en présence de milieu X-VIVO 15 (LONZA) pendant 7 jours en présence de M-CSF (Macrophage colony stimulating-factor) à 100ng/ml, en  $M\Phi$  polarisés (M1, M2a et M2c) avec du milieu IMDM (Thermofisher) contenant 10% de sérum de vœu fœtal (SVF) et du M-CSF pendant 4 jours puis le facteur de croissance est remplacé par des cytokines pendant 3 jours, l'IFN- $\gamma$ , IL-4 ou l'IL-10 pour obtenir les 3 sous populations macrophagiques, respectivement. Le phénotype des sous populations est vérifié par cytométrie (voir page 203). Par contre, l'obtention des  $M\Phi$  et des cellules dendritiques pro-inflammatoires se fait en utilisant des antagonistes ou agonistes du récepteur aryl d'hycarbone (AHR), respectivement (préparés par Dr Elodie SEGURA, U932, Institut Curie, Paris).

Les PNN et les NET sont produits selon les protocoles décrits dans l'article 1.

## ***b) Culture des monocytes, macrophages et cellules dendritiques.***

Les monocytes obtenus après tri et les MΦ indifférenciés sont ensuite re-suspendus dans du milieu X-VIVO les MΦ polarisés dans du milieu IMDM avec 10% SVF et enfin les MΦ et les DC pro-inflammatoires sont re-suspendus dans du milieu RPMI 1640 (Thermofisher) contenant 10% SVF.

Chacun de ces types cellulaires (50µl) est cultivé en milieu seul (50µl) comme contrôle négatif ou milieu avec du LPS de *Salmonella Typhimurium* (5ng/ml, Invivogen) comme contrôle positif, 50µl de NET ou de tampon de préparation de NET correspondant, ou de R848 (0,5µg/ml, Alexis) qui est un agoniste du TLR7/8. La culture a été réalisée en présence/absence d'ATP (1mM, Sigma). Une fois tous les échantillons déposés, la plaque est mise à l'étuve pendant toute la nuit (24 heures, h) pour pouvoir récupérer le lendemain matin les surnageants de culture pour des analyses ELISA. Les cellules sont utilisées pour des analyses par cytométrie en flux.

## ***c) Evaluation de l'état d'activation des cellules.***

### ***(1) Par enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, dosage de la production d'IL-8, IL-6, TNF-α, IL-β et IL-10).***

Comme illustré dans le **Tableau 5**, le coating des plaques ELISA à 96 puits se fait avec les anticorps de capture anti-IL-8 et anti-IL-6 (kit BD OptEIA) dilué au 1/250<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup>, respectivement dans du tampon carbonate/bicarbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15mM, NaHCO<sub>3</sub> 35mM, NaN<sub>3</sub> 0.02%, pH 9,6) (50µl/puits), anti-TNF-α et anti-IL10 (kit eBioscience Affymetrix, Thermofisher) au 1/250<sup>ème</sup> dans du "Coating buffer" et anti-IL-1β (kit R&D DuoSet) au 1/120<sup>ème</sup> dans du PBS 1X puis les plaques sont placées à 4°C pendant toute une nuit. Après 3 lavages avec une solution de PBS-Tween 0,05%, les plaques sont remplies avec du tampon de saturation, pendant 2h à température ambiante (150µl/puits). Ensuite, ces plaques sont lavées trois autres fois au PBS-Tween 0,05%, pour après, ajouter les surnageants de culture des cellules selon les dilutions requises et sont ainsi incubées pendant 2h à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS-Tween 0,05%, les puits sont incubés pendant 1h à température ambiante avec un anticorps biotinylé et ensuite avec de la streptavidine couplée à la peroxydase (HRP). Finalement, après 3 derniers lavages au PBS-Tween 0,05%, 50µl par puits

de substrat TMB (3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine) sont ajoutés et laissés jusqu'à apparition de la coloration bleue. La réaction est stoppée avec 25µl par puits d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N, l'absorbance est mesurée à 450nm via le logiciel Microplate Manager (BioRad) et les résultats sont extraits puis traités sur le logiciel EXCEL. Les concentrations en cytokine sont déterminées par rapport à une gamme de concentrations connues de cytokine recombinante.

	ELISA IL-8	ELISA IL-6	ELISA TNF-α	ELISA IL-1β	ELISA IL-10
Coating (Ac I <sup>aire</sup> )	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup> dans TP Carbo/Bicarbo	Dilution au 1/100 <sup>ème</sup> dans TP Carbo/Bicarbo	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup> dans Coating buffer 1X	Dilution au 1/120 <sup>ème</sup> dans du PBS 1X	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup> dans Coating buffer 1X
Saturation	PBS Tween0.05% BSA0.5%	PBS Tween0.05% BSA0.5%	Diluent assay 1X	PBS Tween0.05% BSA01%	Diluent assay 1X
Echantillons	Dilution au 1/50 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/2 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/2 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/4 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/2 <sup>ème</sup>
Ac II <sup>aire</sup>	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/60 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup>
HRP	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/800 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/40 <sup>ème</sup>	Dilution au 1/250 <sup>ème</sup>

**Tableau 5 : Représentation des différentes étapes des ELISA et dilutions de chaque anticorps et enzymes**

Ac : Anticorps, BSA : Albumine de sérum bovin, Carbo/Bicarbo : Carbonate bicarbonate, HRP : Horseradish peroxidase, IL : Interleukine, PBS : Tampon phosphate salin, TNF : Facteur de nécrose tumorale, TP : Tampon.

## (2) Par cytométrie en flux

Après culture, le contenu cellulaire de chaque puits est divisé en deux et incubé dans du tampon Fluo (PBS, SVF 5%, NaN<sub>3</sub> (azide de sodium) 0.02%, γ globuline 100µg/ml final) dans une plaque 96 puits à fond conique. Un puits permettra de faire le marquage avec les anticorps monoclonaux spécifiques (anti-CD86 phycoerythrine (PE) et anti-HLA-ABC phycoerythrine cyanine 5 (PE-Cy5), BD Biosciences) et le 2<sup>ème</sup> puits sera le puits contrôle, avec les contrôles isotypiques correspondants (IgG2bκ-PE et IgG1κ-PE-Cy5 de souris, BD Biosciences). En sachant que le CD86 et HLA-ABC sont respectivement une molécule de costimulation et une molécule de CMH de classe I, qui sont surexprimées lors de l'activation des MΦ et DC. Après centrifugation des plaques à 1700g pendant 3min pour éliminer le milieu, on rajoute 150µl de tampon Fluo par puits et on laisse incubé pendant 15 min à 4°C pour saturer. On centrifuge une fois les plaques à 1700g pendant 3min et on rajoute par puits, 150µl de tampon Fluo additionné de 2ul pour 100 000 cellules d'anticorps anti-CD86-PE et



2 $\mu$ l d'anticorps anti-HLA-ABC-PE-Cy5 ou 2 $\mu$ l de d'isotypes contrôls correspondants. Les plaques sont incubées pendant 25min à 4°C pour enfin être centrifugées à 1700g pendant 3min et lavées. Après le dernier lavage, on rajoute à chaque puits 150 $\mu$ l de tampon Fluo, puis on transfère le contenu de chaque puits dans des tubes FACS pour les analyser par cytométrie en flux sur FACSCalibur via le logiciel CellQuestPro (BD).

Après l'isolement des monocytes et avant culture, les cellules sont marquées par l'anticorps anti-CD14-PE (ou le contrôle isotypique IgG2b $\kappa$ -PE) en utilisant le même protocole, afin de vérifier la qualité de la purification des monocytes, et pour vérifier celle des M $\Phi$  polarisés on effectue un marquage à l'anti-CD64 fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD80-PE-Cy5, anti-CD14-PE, anti-CD200R-Alexa-fluor 647 (Alexa 647), anti-CD163-PE et anti-CD16-PE-Cy5 afin de vérifier la pureté de chaque sous population macrophagique. Les M $\Phi$  M1 surexpriment le CD64 et CD80, les M2a surexpriment le CD200R mais régulent négativement l'expression de CD14 et le CD163 ainsi que le CD16 sont hautement exprimés par les M2c.

#### *d) Préparation des M $\Phi$ et PNN de souris et induction de NET murins*

Les cellules sont issues de la moelle osseuse (fémur et tibia) de souris C57BL/6. Une fois lavées et tamisées (70 $\mu$ m), une lyse des globules rouges est nécessaire avant de procéder à un tri négatif afin d'obtenir les PNN (Miltenyi). La fraction éluée représentera nos PNN qui seront déposés sur des labteck afin de les stimuler pendant 16 heures avec du PMA à 100nM pour obtenir des sNET (NET solubles, digestion par de la DNase I) ou des aNET (NET attachés), comme illustré en **Figure 40**, et dans l'article 1.

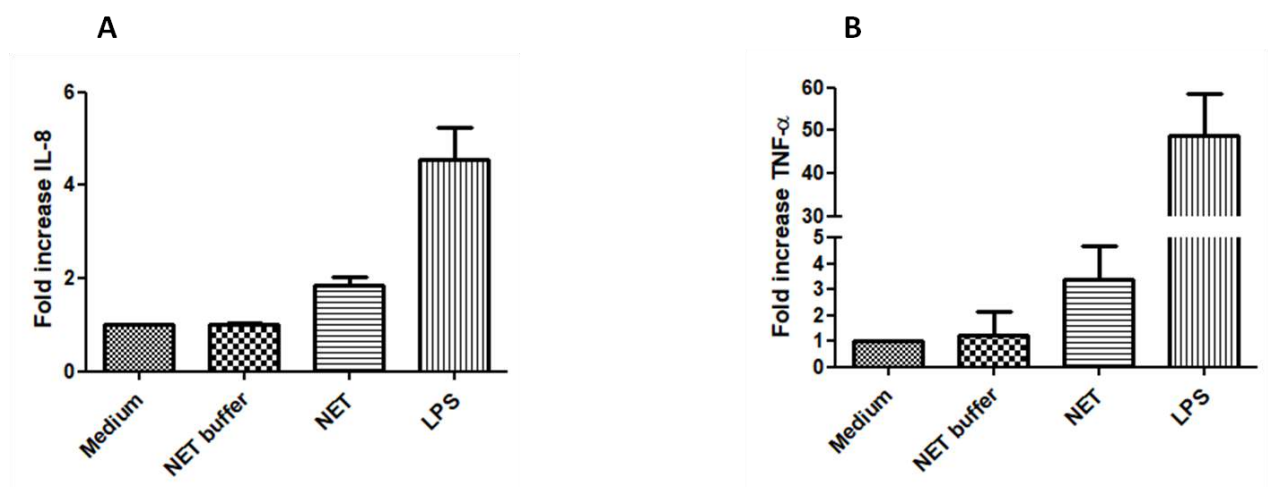
La fraction retenue dans la colonne sera utilisée pour faire une différenciation macrophagique. Pour ce faire, ces cellules seront re-suspendues dans du milieu IMDM supplémenté avec 10% de SVF et contenant du M-CSF (30ng/ml) et cultivées sept jours. Le phénotype des M $\Phi$  (F4/80) et des PNN (Ly6G) est vérifié par cytométrie en flux.

### 3. RESULTATS

Le but de cette étude était de mettre en évidence le rôle potentiel pro- ou anti-inflammatoire des “Neutrophil Extracellular traps” sur d’autres types cellulaires et surtout les sous-populations impliqués dans la PR à savoir les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages polarisés (pro- et anti-inflammatoires).

Pour ce faire, nous avons cultivé des monocytes obtenus après un tri positif CD14 avec des NET solubles (comme défini dans l’article 1) ou autres conditions (milieu seul (“Medium”), contrôle positif (LPS), ou tampon de préparation des NET (“NET buffer”). L’évaluation de la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et TNF- $\alpha$ ) par ELISA démontre l’effet pro-inflammatoire des NET sur les monocytes en comparaison du tampon de purification, comme illustré en **Figure 35**. L’IL-10 n’a pas été détectée (donnée non montrée).

**Figure 35 : Les NET activent et ont un effet pro-inflammatoire sur les monocytes CD14+**



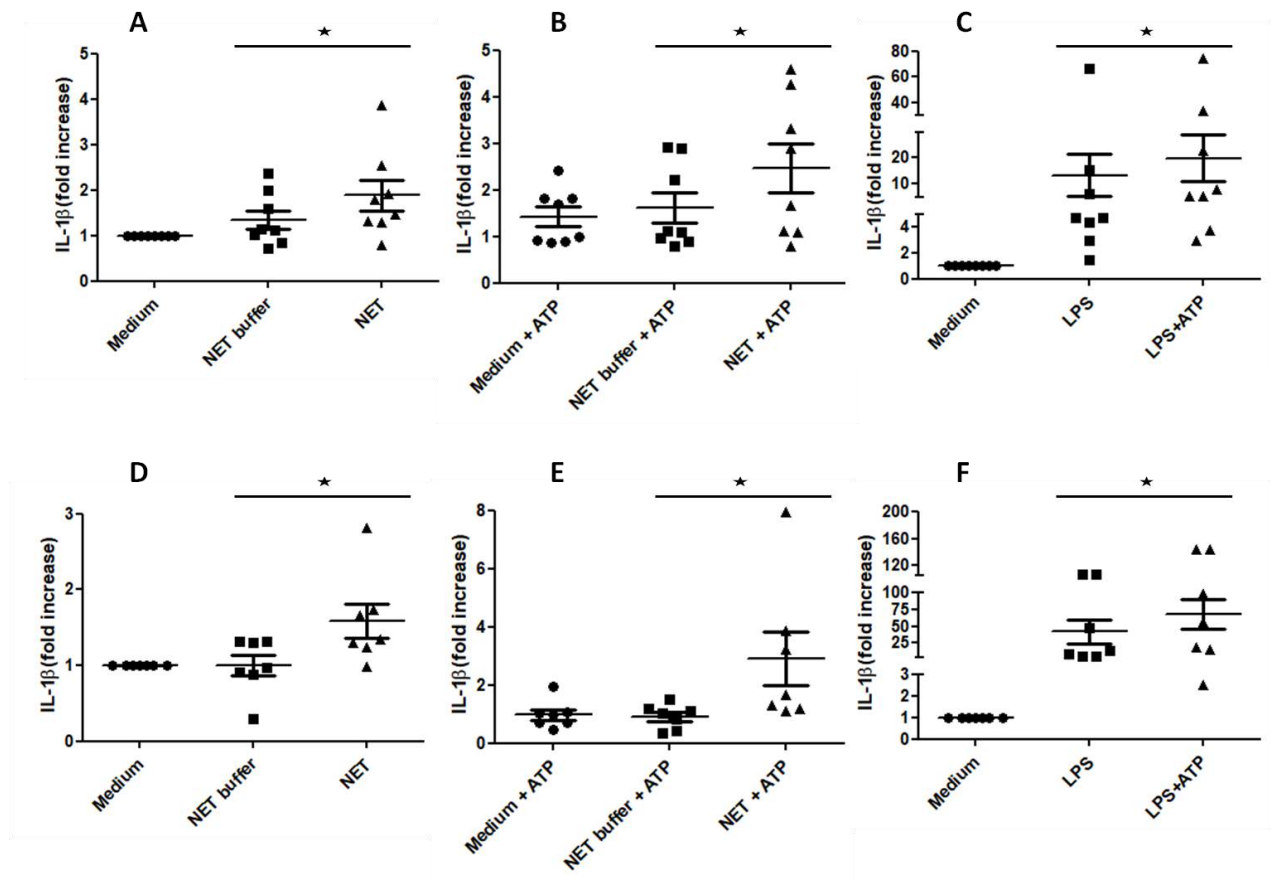
(A, B) les monocytes CD14<sup>+</sup> obtenus à partir de l’anneau de PBMC de donneurs sains ou de patients PR sont cultivés avec des NET de donneurs sains ou de patients PR, du tampon de préparation des NET (“NET buffer”), du milieu seul (“Medium”) et du LPS. L’estimation de l’activation cellulaire a été faite par mesure de la sécrétion d’IL-8 et de TNF- $\alpha$  par ELISA. Ces résultats sont le pool de 3 expériences indépendantes avec 3 donneurs de M $\Phi$  et 3 donneurs de NET. Les résultats sont sous forme de ratios (“Fold increase”) par rapport à la condition milieu. Les moyennes et les écarts à la moyenne (SEM) sont représentés.

Précédemment (article 1) nous avons montré que les NET induisaient une importante production de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) par les PNN et les M $\Phi$  en comparaison à la faible sécrétion d'IL-10 (une cytokine anti-inflammatoire). C'est pour cette raison que nous avons investigué le rôle des NET dans l'activation de l'inflammasome pour induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$ .

Pour cela nous avons cultivé des PNN ou des M $\Phi$  indifférenciés avec des NET en présence ou en absence d'ATP car dans le cas d'une sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par l'inflammasome NLRP3, l'activation de ce dernier nécessite deux signaux : un pour l'activation de la voie du NF-kB qui peut se faire par des ligands de TLR tels que LPS, et un second pour l'oligomérisation du NLRP3 grâce à l'ATP ou l'amiante.

Comme illustré en **Figure 36**, sur les deux types cellulaires, les NET induisent faiblement mais significativement la production d'IL-1 $\beta$  indépendamment de l'ATP, suggérant l'implication des NET dans le maintien de l'inflammation via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires prépondérantes dans le liquide synovial. De plus, cette induction est plus forte en présence d'ATP (**Figure 36, B, E**). Comme attendu, la combinaison LPS-ATP est encore plus efficace.

**Figure 36 : Les NET solubles seuls ou en combinaison avec l'ATP activent la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans PNN et les M $\Phi$**



(A, B, C) les PNN primaires et (D, E, F) les M $\Phi$  dérivés des monocytes obtenus de donneurs sains ou de patients PR sont cultivés avec des NET de donneurs sains ou de patients PR, du tampon de préparation des NET (“NET buffer“), du milieu seul (“Medium“) ou du LPS, en présence ou en absence d’ATP. L’estimation de l’activation a été faite par mesure de la sécrétion d’IL-1 $\beta$  par ELISA. (A, B, C) n = 8 avec un pool de 8 expériences indépendantes sur 7 donneurs de PNN et 7 donneurs de NET. (D, E, F) n = 7 avec un pool de 7 expériences indépendantes sur 6 donneurs de M $\Phi$  et 7 donneurs de NET. Les résultats sont sous forme de ratios (“Fold increase“) par rapport à la condition milieu. \*, p < 0.05 (Two-tailed Wilcoxon test). Les moyennes et les SEM sont représentés.

Les MΦ sont des cellules clés dans la PR, et durant cette pathologie nous pouvons retrouver un déséquilibre en ce qui concerne le phénotype de ces cellules, avec plus de MΦ pro-inflammatoires M1 que d'anti-inflammatoires M2. C'est pour cela nous avons voulu savoir sur quelle sous-population les NET agissaient.

Pour se faire nous avons différencié des monocytes en MΦ M1 avec de l'IFN- $\gamma$ . Comme illustré en **Figure 37, E**, les M1 obtenus expriment en effet le CD80 et le CD64, alors que les M2c obtenus grâce à une différenciation par l'IL-10 expriment eux le CD163 et le CD16 et ceux différenciés avec de l'IL-4, les M2a expriment le CD200R tout en ayant une sous-expression de CD14.

Les cellules une fois obtenus et caractérisés ont été mis en culture en présence de milieu, de tampon de purification des NET, des NET ou du LPS pour évaluer par ELISA la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et IL-1 $\beta$ ) et anti-inflammatoires (IL-10).

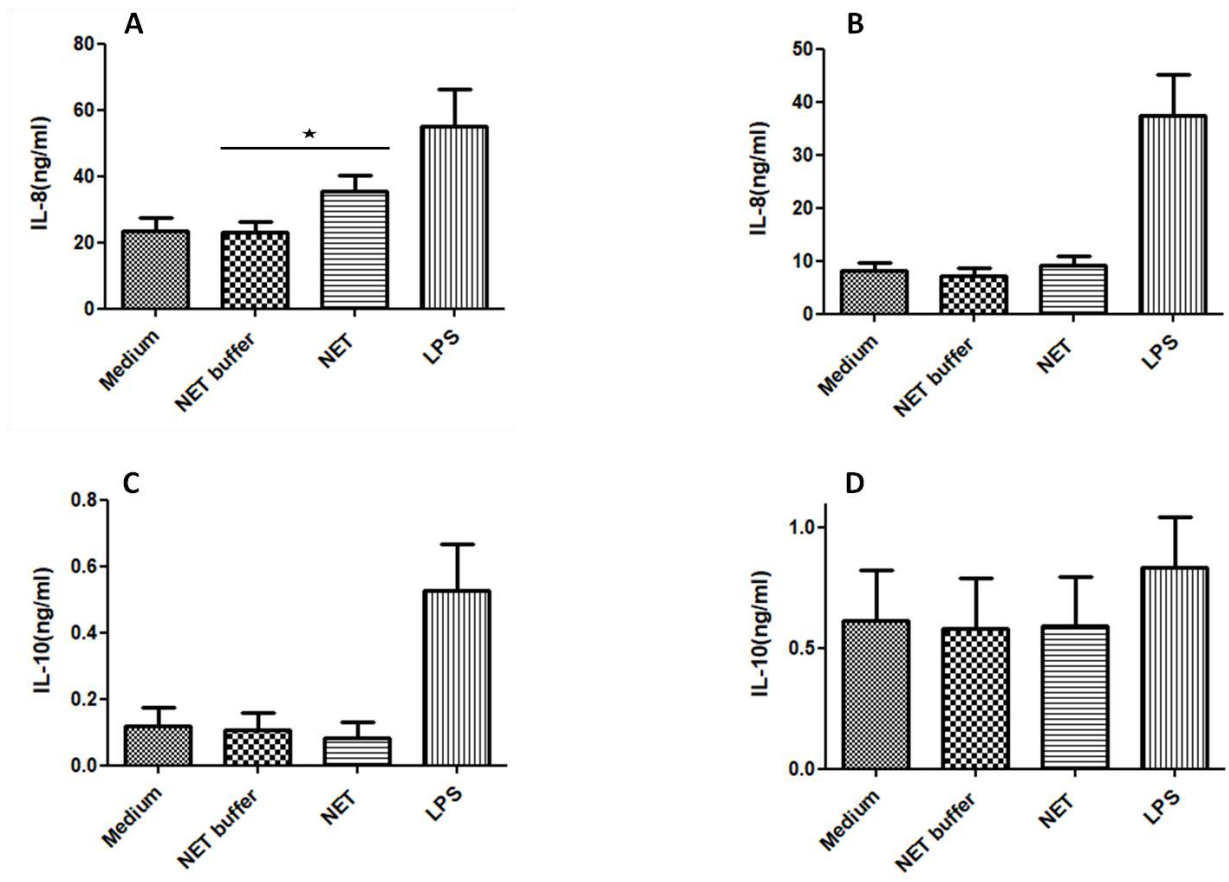
Comme illustré en **Figure 37, A**, les NET induisent la sécrétion d'IL-8 par les MΦ M1 et non les M2, sans pour autant favoriser la sécrétion d'IL-10 par les MΦ M2, ni les M1 (**Figure 37, B**). Cependant, les MΦ M1 conservent la capacité à produire de l'IL-10 en réponse au LPS, alors que les MΦ M2 produisent de l'IL-8 en réponse au LPS.

Cet effet pro-inflammatoire des NET est étouffé par le résultat obtenu en **Figure 38**, où les NET induisent la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les MΦ M1 en présence et même en absence d'ATP.

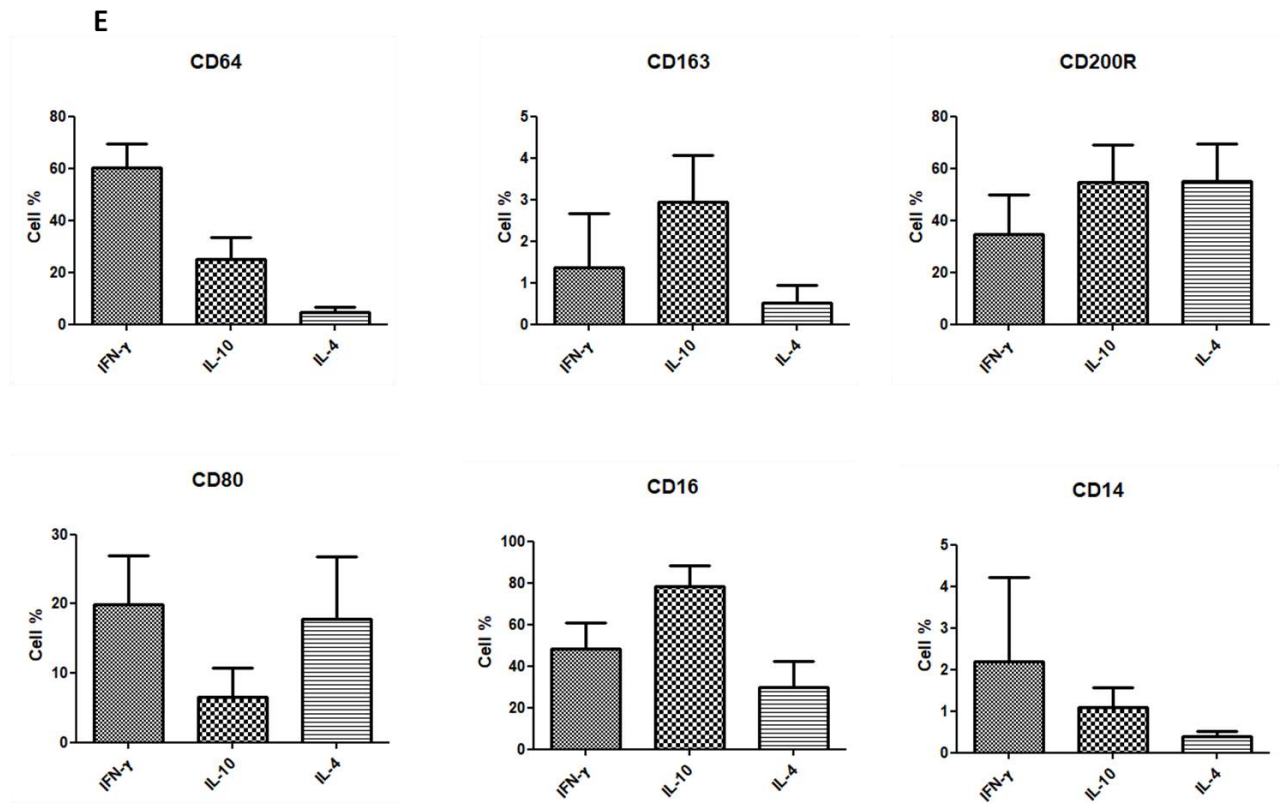
Ainsi, malgré le possible effet immunomodulateur des NET sur des cellules activées (MΦ et DC activés par LPS), ces filaments agissent préférentiellement sur les MΦ M1 pro-inflammatoires pour induire une réponse pro-inflammatoire.

Dans nos expériences, les MΦ M2a ne répondaient qu'au LPS (données non montrées)

*Figure 37 : Les NET favorisent l'effet pro-inflammatoire de la sous population de MΦ M1 inflammatoire*

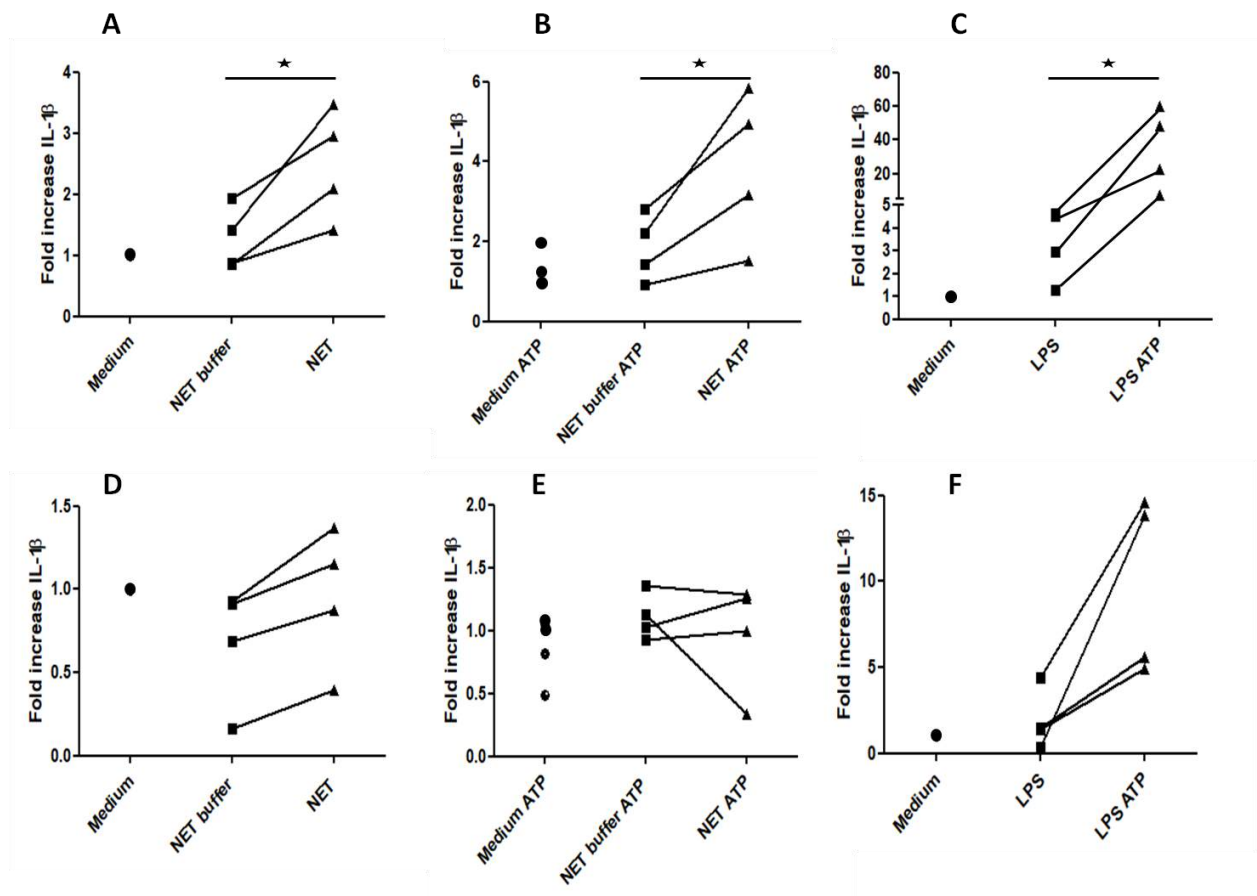


(A, C) les MΦ pro-inflammatoires M1 (différenciés avec de l'IFN- $\gamma$ ) et (B, D) les MΦ anti-inflammatoires M2 (différenciés avec de l'IL-10) obtenus de donneurs sains ou de patients PR sont activés avec des NET de donneurs sains ou de patients PR, du tampon de purification des NET ("NET buffer"), du milieu seul ("Medium") ou du LPS. L'estimation de l'activation cellulaire de chaque population est faite par mesure de la sécrétion d'IL-8 et d'IL-10 par ELISA. (A, B, C, D) n = 12 avec un pool de 12 expériences indépendantes sur 12 donneurs de MΦ et 8 donneurs de NET. \*, p < 0.05 (Two-tailed Wilcoxon test). Les moyennes et les SEM sont représentés.



(E) Le phénotype des trois sous-populations macrophagiques M1 (IFN- $\gamma$ ), M2a (IL-4) et M2c (IL-10) est vérifié par cytométrie en flux grâce à un marquage par des anticorps anti-CD64-FITC, anti-CD80-PE-CY5, anti-CD163-PE, anti-CD16-PE-CY5, anti-CD200R-Alexa-F647 et anti-CD14-PE en évaluant le pourcentage de cellules exprimant ces récepteurs.  $n = 6$  avec un pool de 6 expériences indépendantes sur 6 donneurs de M $\Phi$  de donneurs sains et de patients PR. Les moyennes et les SEM sont représentés.

*Figure 38 : Les NET activent la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les M $\Phi$  M1*



(A, B, C) les M $\Phi$  pro-inflammatoires M1 (différenciés avec de l'IFN- $\gamma$ ) et (D, E, F) les macrophages M $\Phi$  anti-inflammatoires M2 (différenciés avec de l'IL-10) obtenus de donneurs sains ou de patients PR sont cultivés avec des NET de donneurs sains ou de patients PR, du tampon de purification des NET ("NET buffer"), du milieu seul ("Medium") ou du LPS, en présence ou en absence d'ATP. L'estimation de l'activation par chacune de ces 2 populations est faite par mesure de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par ELISA. n = 4 avec un pool de 4 expériences indépendantes sur 4 donneurs de M $\Phi$  et 3 donneurs de NET. Les résultats sont sous forme de ratios ("Fold increase") par rapport à la condition milieu. \*, p < 0.05 (Two-tailed Wilcoxon test). Les moyennes et les SEM sont représentés.



Nous avons ensuite affiné la caractérisation de cette réponse, non seulement sur les MΦ, mais aussi les DC, également impliquées dans la PR. Nous avons étudié des sous-populations ayant un phénotype pro-inflammatoire, récemment identifiées (Goudot et al., 2017).

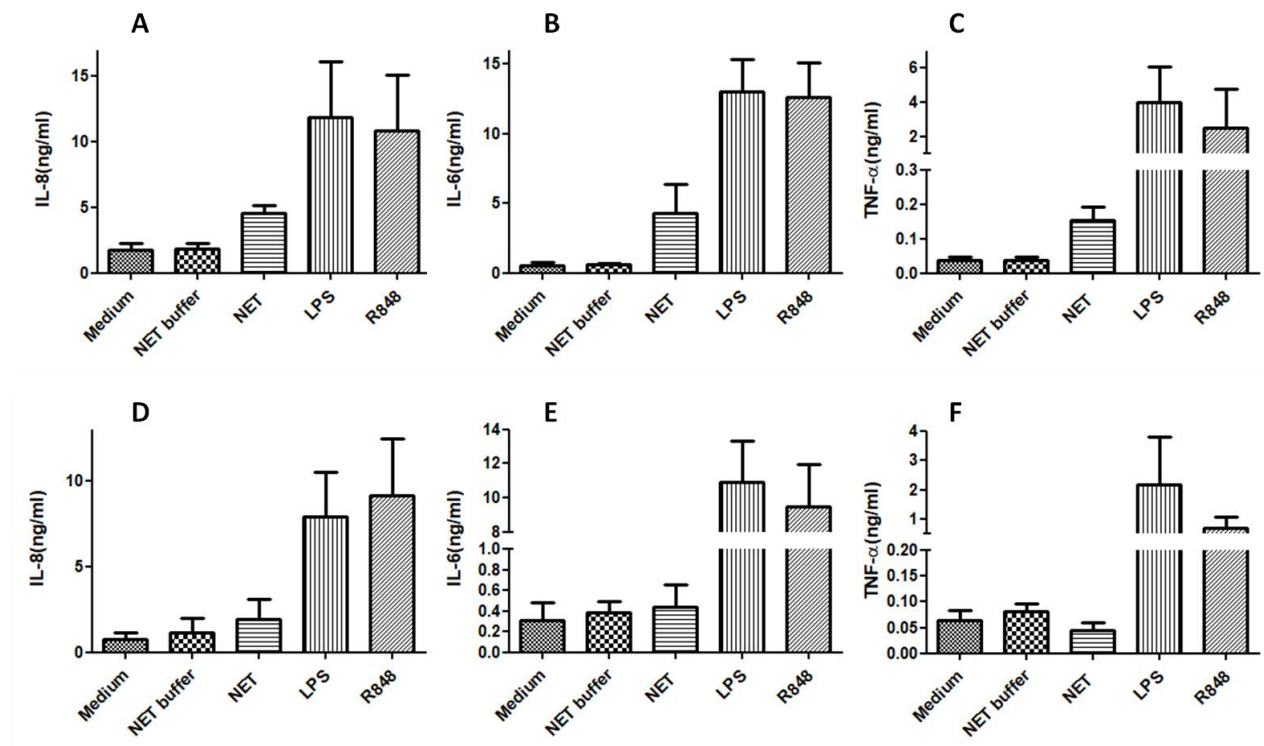
Nous avons voulu savoir si les NET avaient un effet pro-inflammatoire sur les DC au repos comme montré sur les MΦ en repos.

Cela a pu être réalisé grâce à une collaboration avec le Dr Elodie SEGURA, qui nous a préparé des DC et des MΦ à profil pro-inflammatoires, selon le protocole décrit par Goudot et al. (Goudot et al., 2017), comme illustré en **Figure 39, G.**

Comme montré en **Figure 39**, la culture des DC et des MΦ pro-inflammatoires avec des NET induit la sécrétion par ces cellules des cytokines pro-inflammatoires (IL-8 pour les DC et IL-8, IL-6 et TNF-α par les MΦ). Nous n'avons pas pu observer d'induction de l'IL-10

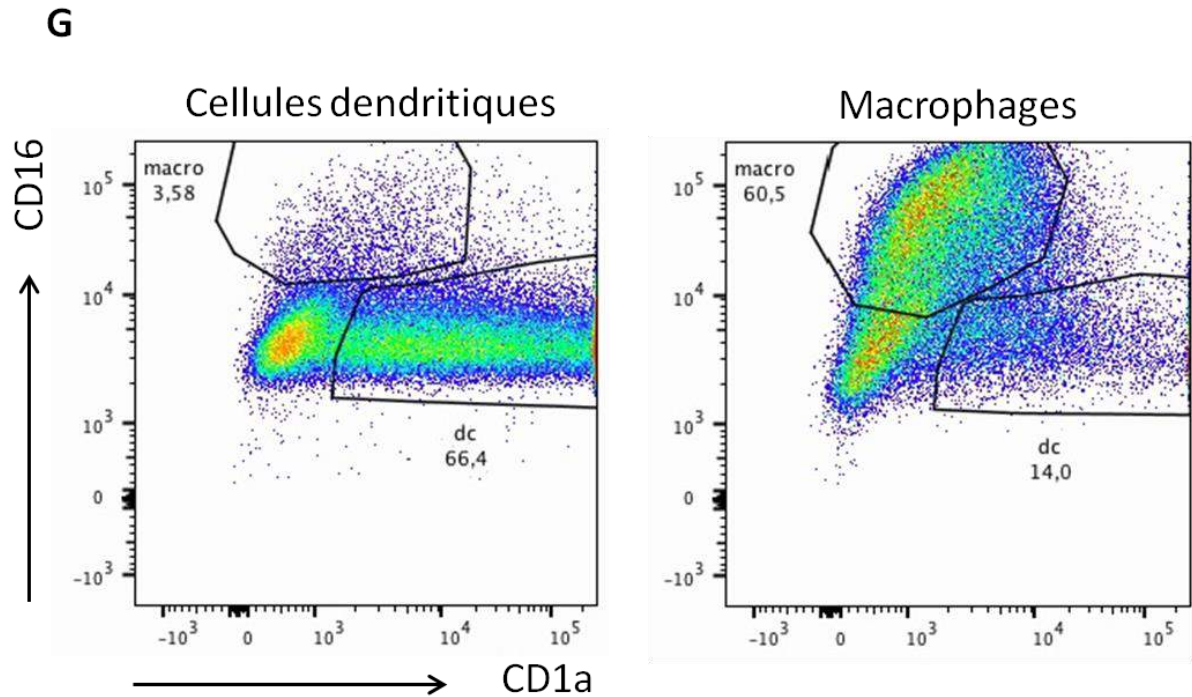
Les NET sur les MΦ et DC au repos induisent un profil pro-inflammatoire. Par contre, les MΦ répondent plus fortement que les DC.

*Figure 39 : Les NET induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les MΦ et les DC pro-inflammatoires*



(A, B, C) Les MΦ pro-inflammatoires dérivés de monocytes pro-inflammatoires et (D, E, F) les DC pro-inflammatoires dérivées des monocytes, obtenus de donneurs sains, sont cultivés avec des NET de donneurs sains ou de patients PR, du tampon de purification des NET (“NET buffer“), du milieu seul (“Medium“), du LPS ou du R848. L’estimation de l’activation des MΦ et des DC a été faite par mesure de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6 et TNF-α) par ELISA.

Pour (A, B, C), n = 3 avec un pool de 3 expériences indépendantes sur 3 donneurs de MΦ et 3 donneurs de NET alors que pour (D, E, F) n = 4 avec un pool de 4 expériences indépendantes sur 4 donneurs de DC et 4 donneurs de NET. Les moyennes et les SEM sont représentés.

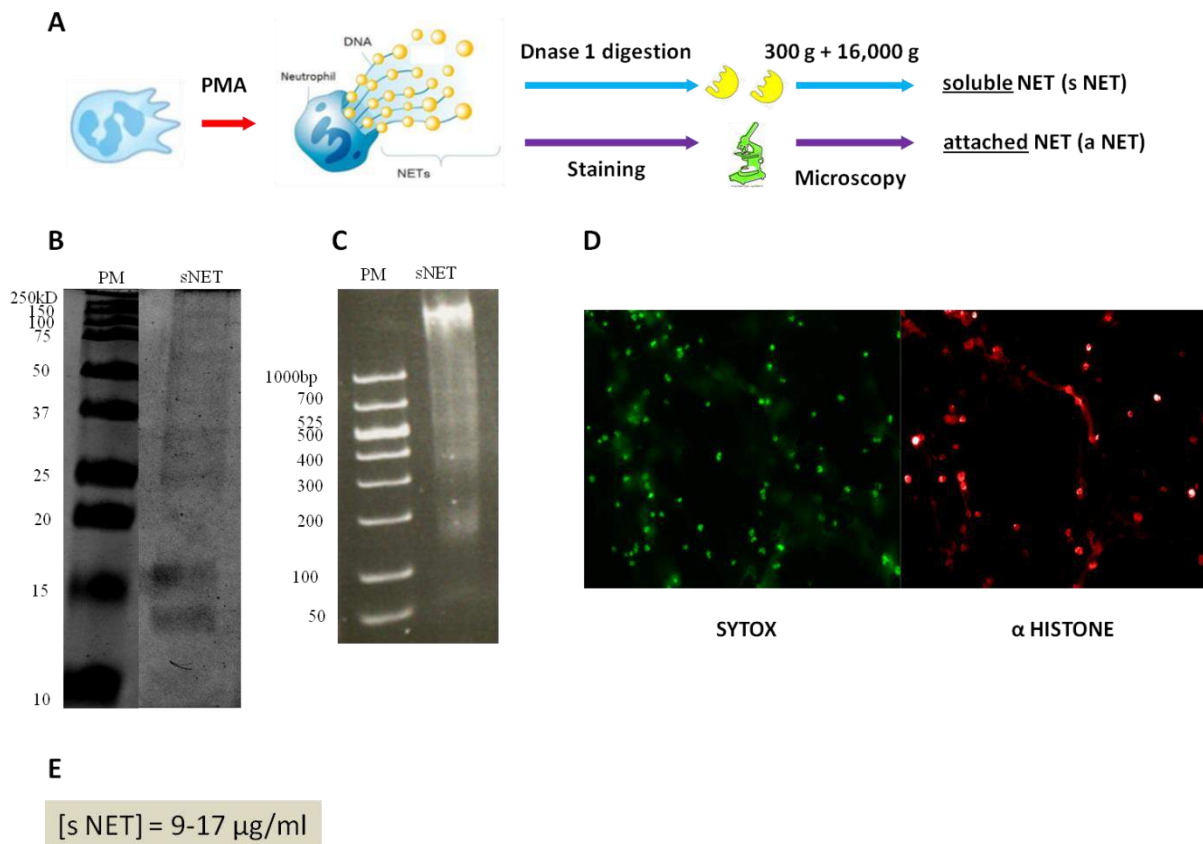


(G) Le phénotype des M $\Phi$  et DC pro-inflammatoires obtenus après différenciation des monocytes par un antagoniste ou un agoniste du ARH, respectivement, est vérifié par cytométrie en flux grâce à un marquage par des anticorps anti-CD16-FITC et anti-CD1a-APC (allophycocyanine) en évaluant le pourcentage de cellules exprimant ces molécules (voir insert). Ce résultat est une expérience représentative de 4 expériences indépendantes.

Enfin, nous avons voulu déterminer le rôle du TLR9 dans la reconnaissance des NET. En effet, le TLR9 peut reconnaître de l'ADN du soi (de mammifères) (Lamphier et al., 2006) et les histones (Huang et al., 2011, 2013). Pour cela, nous avons mis au point d'une part les cultures de M $\Phi$  de souris, mais surtout la préparation de NET solubles de souris (***Figure 40***).

A l'aide de ces NET de souris sauvages, nous avons cultivé des M $\Phi$  de souris sauvages et TLR9-déficientes. Nous avons montré que les deux populations de M $\Phi$  sont activées par les NET, comme illustré en ***Figure 41***, alors que seuls les M $\Phi$  de souris sauvages sont activés par l'agoniste CpG du TLR9, démontrant que le TLR9 ne reconnaît pas les NET.

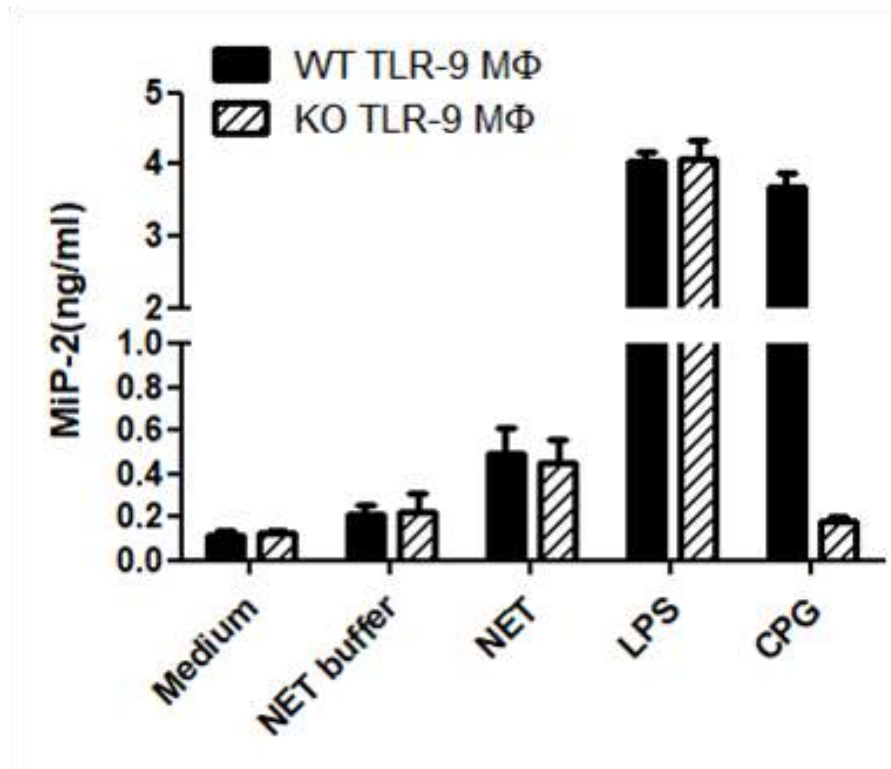
*Figure 40 : Caractérisation des NET murins*



(A) L'induction de NET de souris se fait de la même manière qu'avec des cellules humaines. Après isolement et tri des cellules de la moelle osseuse (tibia et fémur), les PNN sont déposés sur des labteck et activés avec du PMA (100nM) pendant 16h. Pour récupérer des NET solubles (sNET), les NET subissent une digestion partielle par de la DNase I. Par ailleurs, dans le cas de leur visualisation par microscopie, les NET doivent rester fixés et c'est pour cela qu'on parle de NET attachés (aNET). (B) Profil protéique des sNET par SDS PAGE (16%), (C) leur profil nucléaire par Gel agarose (1,5%), et en (E) quantification de leur concentration en ADN par spectrométrie (NanoDrop). (D) Marquage de l'ADN et des histones des aNET par du Sytox et un anticorps anti-histone, respectivement.

PMA : Phorbol myristate acétate, DNA : Acide désoxyribonucléique, NET : "Neutrophil Extracellular Traps", PM : Poids moléculaire, kD : Kilo dalton, bp : Paires de base.

*Figure 41 : Le TLR9 n'est pas impliqué dans la reconnaissance des NET*



Les MΦ de souris sauvages et TLR9-KO, obtenus après différenciation des cellules de la moelle osseuse avec du M-CSF sont cultivés avec des NET de souris sauvage, du tampon de purification des NET (“NET buffer“), du milieu seul (“Medium“), du LPS ou du CpG (agoniste du TLR9). L’estimation de l’activation des MΦ a été faite par mesure de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire MIP-2 (orthologue de l’IL-8 humaine) par ELISA. n = 2 avec un pool de 2 expériences indépendantes sur 4 donneurs de MΦ et 2 donneurs de NET. Les moyennes et les SEM sont représentés.

---

**DISCUSSION  
&  
PERSPECTIVES**

---

## A. Les NET sont antigéniques et reconnus par les ACPA

La polyarthrite rhumatoïde est une énigme en ce qui concerne son déclenchement malgré les nombreuses avancées concernant la compréhension des mécanismes et sa définition en tant que maladie multifactorielle.

C'est une maladie auto-immune caractérisée par la production d'auto-anticorps, comme les facteurs rhumatoïdes qui sont des IgG et plus souvent des IgM ciblant les IgG. Ces anticorps sont présents dans de nombreuses maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (Fedrigo et al., 2018), la sclérodermie (Sato et al., 1994) ou le syndrome de Sjogren (Peen et al., 2009). Cependant d'autres anticorps peuvent être retrouvés dans le sang périphérique et le liquide synovial des patients et qui sont plus spécifiques à la PR : les anticorps anti protéines citrullinées.

Ces ACPA reconnaissent des antigènes du soi qui ont subi une citrullination, une modification post-traductionnelle permettant la transformation d'une arginine en citrulline causant ainsi une perte de la charge positive d'une protéine.

Cette modification est générée par des enzymes, les peptidyl arginine déiminases, et il a été montré que ces enzymes sont largement exprimées par les cellules myéloïdes, telles que les neutrophiles qui extériorisent des "Neutrophil Extracellular Traps" via une forme de « mort » cellulaire (NETose). Cette dernière a été définie par Brinkmann en 2004 comme étant un autre processus d'action des neutrophiles permettant de piéger et d'éliminer les bactéries (Brinkmann et al., 2004), en sachant que ce phénomène a été observé et décrit pour la première fois par Min-Fu Tsan en 1980 après activation des PNN par du phorbol myristate acétate (Tsan, 1980).

De plus, la citrullination est souvent associée à la PR, car de nombreuses études rapportent la présence des ACPA mais aussi l'augmentation de la citrullination des protéines et de l'activité des PAD dans le liquide synovial de patients PR. La réaction de citrullination liée à la PR est médiée par deux isoformes, PAD 2 et 4, toutes deux présentes dans les PNN et qui sont les PAD dominantes dans le liquide synovial des patients atteints de PR (Foulquier et al., 2007; Wang et al., 2016). Les thérapies qui réduisent l'activité de la PAD (y compris le Cl-amidine, les glucocorticoïdes et le paclitaxel) sont associées à une amélioration de la maladie dans les modèles animaux d'arthrite (Brahn et al., 1994; Makrygiannakis et al., 2012; Willis et al., 2011).



C'est pour toutes ces raisons que nous avons supposé que les NET, cette chromatine décondensée contenant des peptides antimicrobiens et des histones citrullinées pouvaient être l'auto-antigène responsable de la production d'ACPA par les lymphocytes B ou au moins être une une de leur cible.

Pour ce faire, nous avons collaboré avec l'équipe du Pr Guy Serre (Université de Toulouse, UMR 1056 INSERM) pour tester des IgG contenant des ACPA purifiées de patients PR pour leur capacité à reconnaître les NET. Nous avons pu observer par microscopie après marquage de ces anticorps et de l'ADN, qu'il y'avait une colocalisation des signaux alors que dans le cas des IgG sans ACPA issues d'autres maladies rhumatismales, nous n'observons aucune colocalisation entre les anticorps et les NET. Ce résultat prouve que les NET sont un antigène reconnu par les ACPA.

Pour étoffer ce résultat, il faudrait mettre en évidence la ou les protéines reconnues par les ACPA, et comparer la composition en protéines entre les NET de donneurs sains et de patients PR. Pour ce faire le mieux est de faire un SDS-PAGE des sNET, probablement sur un gel 2D, après identification en parallèle des bandes d'intérêt par immunoblot avec ACPA. Il faudra par la suite découper les bandes d'intérêt du gel et les digérer par de la trypsine afin d'obtenir une solution analysable au spectromètre de masse (Maldi MS/MS).

## B. Les NET sont immunogènes et induisent la sécrétion d'IL-8, -6 et TNF- $\alpha$

Après avoir montré que les NET étaient antigéniques, nous nous sommes attardés sur l'immunogénicité de ces NET, en premier temps sur les PNN, qui sont les cellules prédominantes dans le liquide synovial de PR. On a donc supposé qu'une fois extériorisés, les NET activent à leur tour les PNN formant une boucle d'auto-activation des PNN, aggravant ainsi l'inflammation.

En second temps, nous avons analysé l'effet sur les M $\Phi$  car leur nombre est important dans la membrane synoviale enflammée et au niveau de la jonction cartilage-pannus ils sont activés (Bresnihan, 1999; Burmester et al., 1997) et ils répondent aux traitements antirhumatismaux. Nous avons supposé que les M $\Phi$  pouvaient participer à la pathogénèse de la PR via leur rôle de présentateur d'antigène à savoir présentateur de NET aux LT et donc à l'induction de la production d'ACPA, et via la sécrétion de cytokines.

Pour ce faire, nous avons cultivé des PNN et des M $\Phi$  dérivés de monocytes primaires issus de sang périphérique de donneurs sains (Etablissement français du sang, Bobigny) ou de patients atteints de PR (Service de rhumatologie, Hôpital Avicenne, Bobigny). Ces M $\Phi$  ont été différenciés soit avec du M-CSF, ou avec un antagoniste du récepteur aryl hydrocarbène. Dans ce dernier cas, les M $\Phi$  sont obtenus grâce à une collaboration avec le Dr Elodie SEGURA (Institut Curie, INSERM U932, Paris) et ont un phénotype pro-inflammatoire, donc probablement proche de celui chez les patients.

Nous avons pu démontrer par ELISA que les NET, que ce soient ceux faits par des PNN de donneurs sains ou de patients PR, induisaient la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par ces deux types cellulaires (IL-8, TNF- $\alpha$  pour les PNN et les M $\Phi$  ; et l'IL-6 pour ces derniers). Par cytométrie en flux nous avons pu confirmer cet état d'activation cellulaire, avec une augmentation de l'expression de CD11b par les PNN et celle d'HLA-ABC, HLA-DR et la molécule de costimulation CD86 par les M $\Phi$ . En absence de forte induction d'IL-10, ce profil confirme que les NET sont pro-inflammatoires sur des cellules non activées.

En 2013, Consol Farrera and Bengt Fadeel ont montré que les M $\Phi$  internalisent les NET, pour au final permettre la dégradation des NET qui est facilitée par de la DNase I, et cette internalisation des NET par ces cellules n'induit pas de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Farrera and Fadeel, 2013).

## Discussion et perspectives

---

Pendant mon travail, nous n'avons pas pu montrer que les NET activaient les MΦ après un phénomène d'endocytose donc ne nous pouvons pas contredire cela mais le fait que ces NET n'induisent pas de cytokines pro-inflammatoires dans le cas de cette étude peut être expliqué par le fait qu'ils utilisent des concentrations en PMA différentes de la notre (25nM au lieu de 50nM) pour induire des NET et n'utilisent pas de nucléase. Leur NET sont peut être moins imposants et donc d'autant plus faciles à phagocyter. De plus, ils n'ont pas dosé l'IL-8.

Il est important de noter que depuis la définition des NET par Brinkmann en 2004, plusieurs phénomènes cellulaires ont été nommés et associés à la NETose. C'est pour cela qu'on distingue dans plusieurs publications l'appellation NETose mortelle (suicidaire) ou NETose vitale, NETose par de l'ADN nucléaire ou mitochondrial, NETose dépendante ou indépendante de la NADPH oxydase. Durant mon travail, nous avons défini les NET comme étant le résultat d'une forme de mort cellulaire (le PMA induit une perméabilisation membranaire que nous observons par microscopie lors de la visualisation des NET attachés) dépendante de la NADPH oxydase (pas de NET formés en présence de diphénylèneiodonium) et qui sont composés de protéines des granules et cytoplasmiques associées à de l'ADN nucléaires, ce dernier porte les histones qu'on a pu montré par microscopie et western blot alors que l'ADN mitochondrial ne possède pas d'histones).

La perspective de cette partie du travail serait d'induire des NET par des stimuli physiologiques susceptibles d'être présents dans le liquide synoviale et/ou le sang périphérique des patients PR, à savoir des combinaisons de cytokines, de facteurs de croissance ou de contact cellulaire par exemple, afin de pouvoir mimer au mieux le naturel

## C. Les NET sont activateurs de l'inflammasome et induisent la sécrétion d'IL-1 $\beta$

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de l'IL-1 dans la pathogenèse de la PR. Par exemple, la surexpression d'IL-1 $\beta$  dans les articulations du genou de lapin provoque une arthrite avec des atteintes cliniques et histologiques caractéristiques de la PR, alors qu'une déficience en IL-1 est associée à une réduction des lésions articulaires. Dans des modèles expérimentaux, les inhibiteurs de l'IL-1, y compris le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra), réduisent significativement les signes cliniques et histologiques de la maladie. Chez les patients atteints de PR, les concentrations plasmatiques et synoviales d'IL-1 sont élevées, et sont en corrélation avec l'activité de la maladie (Kay and Calabrese, 2004).

Ces pour toutes ces raisons que nous avons voulu savoir si les NET étaient impliqués dans cette production excessive d'IL-1 $\beta$  observée lors de la PR.

Pour ce faire, nous avons cultivé des PNN ou des M $\Phi$  avec des NET en présence ou en absence d'ATP. En effet, il a été décrit que l'activation de l'inflammasome NLRP3 se fait en 2 temps : (1) une induction de la transcription, dépendante de la voie NF- $\kappa$ B, qui requiert la fixation de ligands de TLR ou de NLR, (2) un activateur qui permet l'oligomérisation des récepteurs NLRP3 (Bauernfeind et al., 2009).

Nous avons pu voir par ELISA que les NET induisent une sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les M $\Phi$  indifférenciés qui est inchangée en présence d'ATP.

A ma connaissance, aucun article n'a été publié concernant la possible activation directe de l'inflammasome des PNN primaires par les NET. Par contre, dans le cas des M $\Phi$  les publications sont nombreuses mais dans la plupart des cas un "priming" est nécessaire.

Par exemple, Hu et al. ont montré que les NET induisent la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , mais cela a été fait sur une lignée cellulaire de macrophages murins et en présence de LPS uniquement, alors que les NET seuls n'induisaient rien. De plus, il faut noter que cette sécrétion dépend de la partie ADN et sérine protéase des NET, car lors de la culture de ces M $\Phi$  avec la combinaison NET/LPS en présence de DNase I ou d'inhibiteurs des sérines protéases, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  était inhibée (Hu et al., 2017).

Par contre, Kahlenberg et al. réussissent à montrer que les NET des "Normal"- et "Low-Density Neutrophils" induisent la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 par des M $\Phi$  primaires, mais

ces cellules ont été primées au préalable par du LPS. Ils ont montré aussi que le LL-37 permettait la sécrétion de ces cytokines et que l'IL-18 induisait la NETose. De ce fait, ils ont proposé que les NET contenant le peptide anti-microbien LL-37 peuvent activer la caspase-1 via le P2X7R et la libération subséquente d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 stimulerait la NETose, conduisant à un cycle d'auto-perpétuation de la production de NET et de l'activation de l'inflammasome (Kahlenberg et al., 2013).

Tout cela permet de mettre en avant notre résultat car nos cellules sont humaines, primaires et non primées. La finalité serait de savoir si les NET induisent la sécrétion de la forme active ou inactive (avant clivage protéolytique) de l'IL-1 $\beta$  par Western-blot et surtout d'identifier par quel inflammasome les NET agissent, à savoir activation du NLRP3 via le P2X7R où se fixerait le LL-37 des NET, ou au contraire AIM2 où la partie ADN des NET déclencherait son oligomérisation. Nous pourrions utiliser pour cela des inhibiteurs de ces inflammasomes en culture avec les cellules avant le dépôt des NET et mesurer la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans les surnageants de culture. Il faudrait également prouver que l'inflammasome est activé et étudier son oligomérisation.

## D. L'activation par les NET est indépendante du TLR9 et des ACPA mais est favorisée par la combinaison C1q/LL-37 sur les MΦ seulement

Après avoir montré que les NET pouvaient activer les PNN et les MΦ, deux cellules clés de la PR, nous nous sommes posé la question suivante : par quel mécanisme les NET agissent ? Nous avons supposé que cela se faisait via la formation de complexes immuns NET-ACPA.

Nous avons cultivé des PNN et des MΦ avec des NET en présence ou en absence d'IgG contenant des ACPA. Nous avons observé par ELISA que la sécrétion d'IL-8 par ces deux types cellulaires restait inchangée en présence d'ACPA.

Carmona-Rivera et al. ont montré que les ACPA reconnaissent les autoantigènes citrullinés portés par les NET, et activent les PNN pour induire la NETose. Les auteurs décrivent un cercle vicieux de production excessive de protéines citrullinées portées par les NET et d'ACPA dans le liquide synovial des patients PR (Carmona-Rivera et al., 2017).

Bien que nos IgG contenant des ACPA reconnaissent les NET par Western-blot, ils ne favorisent pas l'activation des PNN et des MΦ par les NET.

Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait refaire des cultures de PNN et de MΦ avec des NET mais cette fois-ci en présence/absence d'ACPA purifiés et non un mélange d'IgG contenant des ACPA, mais aussi en utilisant des ACPA monoclonaux et non polyclonaux.

Après cela nous avons supposé que les NET agissaient cette fois-ci via la reconnaissance de leur partie ADN. C'est pour cela que nous avons entrepris d'étudier l'implication de protéines ayant la capacité de reconnaître l'ADN dans l'activation des PNN et des MΦ.

La première protéine était la protéine du complément C1q, cette protéine qui est abondamment présente dans le liquide synovial de patients PR mais qui a aussi la capacité de lier l'ADN via sa partie collagène-like et sa tête globulaire (Jiang et al., 1992).

De plus, Leffler et al. avaient constaté que le sérum d'un sous-groupe de patients atteints de LES actifs avait une capacité réduite à dégrader les NET générés *in vitro*, et ceci grâce à leur C1q qui en agissant directement sur la DNase I inhibait cette dégradation (Leffler et al., 2012).

Nous avons ainsi cultivé des PNN ou des MΦ avec des NET en présence ou en absence de C1q, et nous avons montré de ce fait que l'activation des PNN était inchangée alors que celle des MΦ augmentait significativement. Ce résultat était en accord avec notre hypothèse mais on ne comprenait pas pourquoi une différence d'effet était constatée en fonction du type cellulaire, en sachant que les PNN et les MΦ exprimaient les récepteurs du C1q.

Nous avons montré par cytométrie en flux après incubation de nos cellules avec du C1q et marquage avec un anticorps anti-C1q que certes les PNN, les MΦ dérivés des monocytes et les monocytes expriment bel et bien le C1q, mais le pourcentage de C1qR sur les MΦ est largement plus important que celui des PNN, permettant ainsi de justifier cette différence de réponse entre ces deux types cellulaires.

Les NET viendraient lier le C1q formant un complexe reconnu par le C1qR à la surface des cellules cibles pour induire leur activation à condition que les cellules expriment fortement le C1qR. Pour confirmer cela il faudrait tester si le C1q en présence des NET augmente la sécrétion d'IL-8 par les monocytes, vu que ces cellules ont une expression de C1qR proche de celle des MΦ.

Nous avons montré que la pré-incubation des MΦ avec du C1q pour bloquer le récepteur empêche la sécrétion d'IL-8 induite par les NET (**Figure 5, Article 1**). Pour argumenter son rôle, le mieux serait de cultiver des NET murins (caractérisés en **Figure 40**) issus de souris exprimant ou pas le C1q sur des MΦ de souris sauvages pour voir si le C1q est nécessaire à la production des NET ou surtout à leur reconnaissance par les cellules.

La 2<sup>ème</sup> protéine à laquelle nous avons pensé était le LL-37, un peptide antimicrobien présent dans les granules des PNN, qui a la particularité de protéger l'ADN de la dégradation par les nucléases et de transporter l'ADN extracellulaire dans les DC en formant un complexe qui sera reconnu par le TLR9, induisant la production d'IFN-α que ce soit dans le cas du psoriasis ou du LES. De plus, le LL-37 est exprimé dans le tissu synovial de patients PR.

Lande et al. ont démontré que les NET pouvaient être une source de complexe ADN-LL-37 nécessaire à la production d'IFN-α par les DC et ceci en ajoutant à une culture de DC le surnageant des PNN activés par PMA (contenant ainsi des NET). Ce qui est intéressant dans ce résultat est que lorsqu'ils rajoutaient de la DNase I, la sécrétion n'était pas affectée car cette enzyme dégrade l'ADN filamentueux lisse et non l'ADN globulaire contenant des peptides anti-microbiens, alors que l'utilisation de NAC (N acétyl L cystéine, un inhibiteur de la génération de ROS nécessaire à la formation de NET) ou de CMK (ChloroMethyl Ketone, un inhibiteur du clivage protéolytique du précurseur immature hCAP18 en protéine mature

LL-37) inhibe l'activation des DC (Lande et al., 2011). Des résultats similaires ont été rapportés par une autre équipe la même année (Garcia-Romo et al., 2011).

Cela nous a permis de supposer que les NET se lieraient au LL-37 et activeraient ainsi les PNN et les MΦ, qui expriment des récepteurs pour LL-37. Pourtant, nos cultures avec des NET en présence de LL-37 n'ont pas influencé l'effet des NET alors qu'une pré-incubation des PNN et des MΦ avec ce peptide avant l'ajout des NET diminuait fortement leur sécrétion en IL-8 (**Figure 6, Article 1**). C'est pour cela qu'on a supposé que l'effet du LL-37 n'était pas suffisant mais qu'il devait peut-être s'associer à une autre protéine, et cela s'est avéré vrai car la combinaison C1q/LL-37 augmentait l'activation des MΦ par les NET, mais ne changeait en rien celle des PNN car ils expriment moins de récepteur pour C1q.

La perspective de ce résultat serait de vérifier l'implication du LL-37 en utilisant des souris déficiente en ce peptide anti-microbien (mCRAMP chez la souris) comme dans le cas du C1q, afin de voir s'il est nécessaire à la reconnaissance.

Nous avons souvent associé le LES à un défaut de clairance des NET, mais si nous parlons de clairance nous parlons en partie d'internalisation de ces filaments d'ADN. Parmi les récepteurs qui lient l'ADN, nous distinguons le TLR9 qui est un récepteur endosomal mais qui peut être exprimé à la surface des PNN comme démontré en 2013 par Lindau et al. (Lindau et al., 2013).

Les TLR endosomaux tels que les TLR7, 8 et 9 ont besoin pour leur activité d'un milieu à pH acide c'est pour cela qu'on parle d'acidification endosomale dans ce cas.

L'hypothèse que nous avons émise était que les NET étaient phagocytés par les cellules cibles (PNN et MΦ) et une fois dans les endosomes la partie ADN des NET viendrait se lier au TLR9.

Pour y répondre, nous avons cultivé les PNN et les MΦ que ce soit de donneurs sains ou de patients PR avec des NET en présence ou en absence de NH<sub>4</sub>Cl (chlorure d'ammonium, un inhibiteur de l'acidification endosomale). Le résultat obtenu nous a permis de conclure que l'activation par les NET est indépendante de l'acidification endosomale dans le cas des PNN et des MΦ car la sécrétion d'IL-8 par les cellules cibles est augmentée grâce aux NET mais est inchangée en présence de NH<sub>4</sub>Cl. Ceci suggère un mécanisme indépendant des TLR endosomaux.

Par ailleurs, pour confirmer notre résultat nous avons utilisé des cellules provenant de souris déficiente en TLR9 en comparaison à des souris qui expriment ce récepteur. Ces cellules, à savoir les MΦ, ont été cultivés avec des NET. Les NET de souris activent bel et bien les MΦ



mais cet effet est le même que ça soit en présence ou en absence de TLR9 alors qu'au contraire l'activation par du CpG (courte séquence nucléotidique contenant un motif CpG, un agoniste du TLR9) était inhibée sur les MΦ issus de souris TLR9-KO.

Une internalisation des NET dépendante du TLR-9 a été suggérée en 2017, mais celle-ci concernait le cas de l'activation des fibroblastes du liquide synovial de patients PR et OA. En effet, ils montrent que les NET sont internalisés et induisent une sécrétion d'IL-8 et d'IL-6 par les fibroblastes du liquide synovial de PR, et cette internalisation et cette sécrétion sont inhibées lors de l'utilisation d'un antagoniste du TLR9 et d'un inhibiteur du récepteur membranaire RAGE. Ils supposent ainsi que RAGE/TLR9 reconnaîtraient les NET à la surface des fibroblastes pour passer dans le milieu intracellulaire puis dans l'endosome (Carmona-Rivera et al., 2017).

## E. Les NET sont anti-inflammatoires sur les MΦ activés par LPS, inhibant la sécrétion d'IL-6 et augmentant celle d'IL-10

Depuis le début, les résultats discutés concernent des cellules en repos, mais les données rapportent que dans le cas de la PR, les cellules immunitaires plus particulièrement les PNN et les MΦ présentent un phénotype activé avec une forte production de médiateurs inflammatoires tels que des cytokines et des ROS.

C'est pour cela qu'en deuxième partie nous nous sommes concentrés sur l'effet des NET sur des cellules activées (par LPS). Pour ce faire, les PNN et les MΦ ont été mis en culture avec du LPS et des NET en même temps et dans le cas des MΦ en présence ou en absence de la combinaison C1q/LL-37.

Sur les PNN activés par LPS, les NET viennent sur-activer ces cellules et cela se traduit par une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) confirmant ainsi le rôle pro-inflammatoire des NET. Par contre sur les MΦ, l'effet est inversé, la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 est diminuée et cette diminution est d'autant plus importante en présence de C1q/LL-37, confirmant l'implication de cette combinaison dans l'effet des NET sur les MΦ. En plus de l'inhibition de la sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire, nous avons observé aussi une augmentation dans la production d'IL-10 (une cytokine anti-inflammatoire). Ce résultat souligne la complexité et l'originalité du rôle des NET, passant d'une activité pro- à anti-inflammatoire en fonction du type cellulaire et de l'état d'activation de celles-ci. Cela n'exclut pas l'activation des MΦ au repos par les NET dans la PR. D'ailleurs, les MΦ de patients PR, sûrement pré-activés *in vivo*, sont activés par les NET *in vitro*. Le LPS est sûrement un stimulus qui induit une activation plus forte que celle observée *in vivo*.

Nous ne sommes pas les seuls à avoir montré que les NET sont anti-inflammatoires. En 2014 l'équipe du Pr Sylvie Chollet-Martin a publié un article soulignant l'inhibition de l'activité des DC activées par du LPS. Les DC dérivées de monocytes pré-incubées avec des NET avant l'ajout du LPS sécrètent moins d'IL-8, -6, -12, -23 et TNF- $\alpha$  que des DC en présence de LPS seulement et leur expression en molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et CMH (HLA-DR) diminue significativement. Cet effet n'est pas spécifique du LPS, car en utilisant d'autres stimuli comme R848 (agoniste du TLR7/8) et PMA (activateur de la protéine kinase C) la

production de TNF- $\alpha$  est significativement diminuée en présence de NET (Barrientos et al., 2014). Par contre, l'activation des cellules au repos par les NET n'est pas observée.

Nous avons montré que les NET, sur les PNN que ce soit en repos ou activés par LPS favorisent leur activation, alors que sur les M $\Phi$  nous passons de l'activation à l'inhibition lors de l'utilisation de cellules au repos et stimulées par LPS, respectivement. Mais qu'en est-il vraiment pour les DC au repos en sachant qu'en 2016 Papadaki et al. avaient montré dans un modèle d'AEC que la culture de DC dérivées de moelle osseuse avec des NET issus de souris arthritiques induisait une sur-expression des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et une importante sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et de TNF- $\alpha$ ) par ces DC. Dans cette même étude, ils avaient montré que les NET de patients PR induisaient la maturation des DC dérivées de monocytes de donneurs sains via la sur-expression de CD86 et HLA-DR et la sécrétion d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Papadaki et al., 2016).

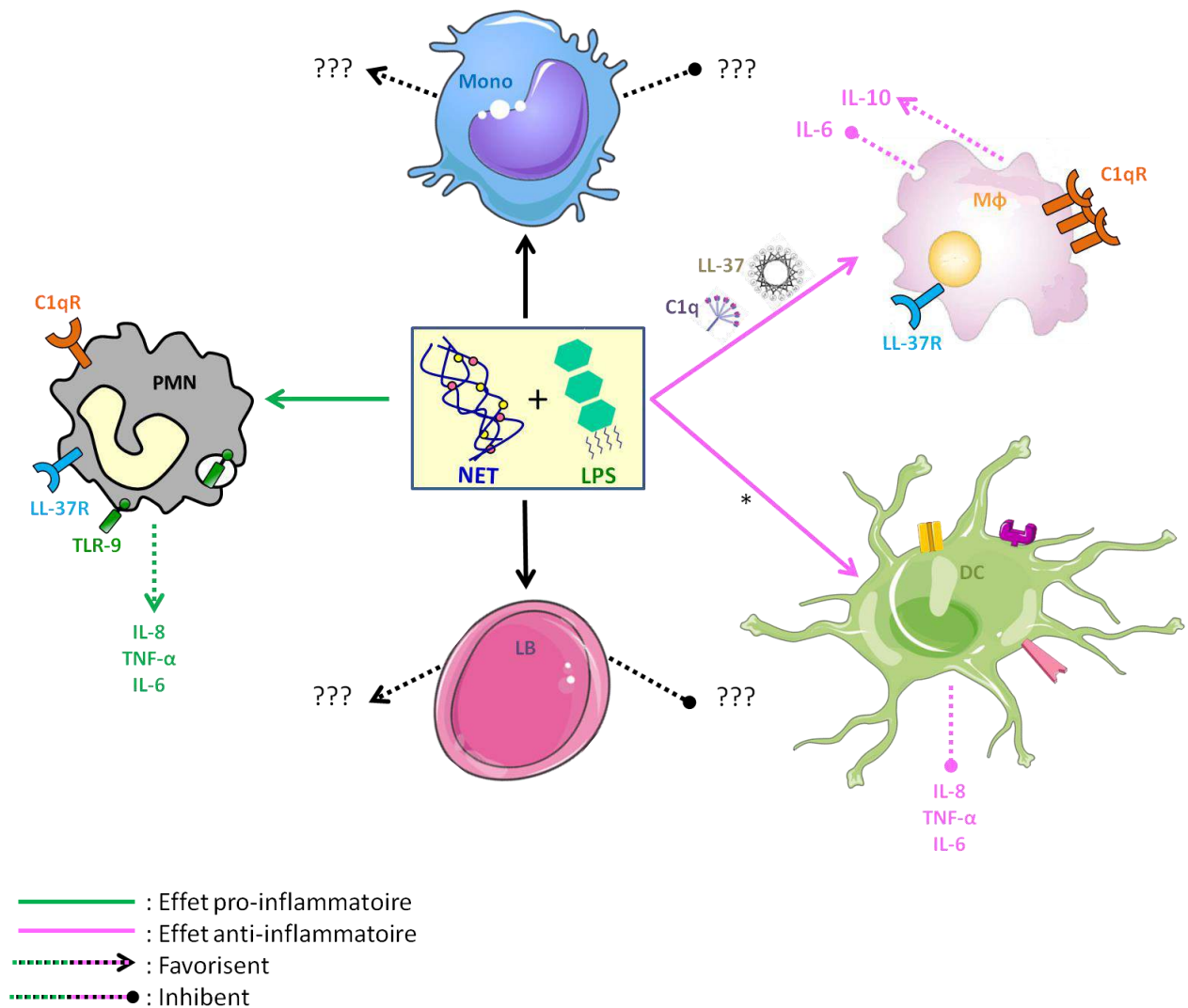
Grâce à notre collaboration avec le Dr Elodie SEGURA (Institut Curie, INSERM U932), nous avons pu obtenir des DC dérivées de monocytes présentant un phénotype pro-inflammatoire et nous avons pu confirmer l'effet direct des NET sur ces cellules présentatrices d'antigènes, car une fois en culture avec des NET, les DC sécrètent de l'IL-8.

Ainsi, en rapport avec les résultats que nous avons obtenu et les différentes études publiées, nous pouvons supposer que dans le cas de CPA au repos, les NET sont pro-inflammatoires mais deviennent anti-inflammatoires lors de l'activation de ces cellules, comme illustré en **Figure 42**.

Notons que nous avons montré que l'effet anti-inflammatoire n'est pas dû à une inhibition directe du LPS, ni à la dégradation des cytokines comme suggéré par Schauer et al. dans un mécanisme anti-inflammatoire de la goutte (Schauer et al., 2014).

Pour voir si les NET présentent un effet anti-inflammatoire spécifiquement sur les CPA activées, il faudrait vérifier cela sur des monocytes et des LB activés par LPS et mesurer la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires en présence et en absence de NET.

De plus, vu que la seule différence que nous avons pu noter entre PNN et M $\Phi$  était l'expression de C1qR, et que celle-ci est importante sur les M $\Phi$  mais aussi les monocytes, il serait intéressant de voir si cette sur-expression est spécifique à toutes les CPA et donc mesurer cela sur les DC et les LB. Cela pourrait peut être expliquer cet effet préférentiel pour les CPA.



**Figure 42 : Effet des NET sur cellules activées**

**C1q** : Protéine du complément C1q, **C1qR** : Récepteur du C1q, **DC** : Cellules dendritiques, **IL** : Interleukine, **LB** : Lymphocytes B, **LL-37** : Peptide anti-microbien cathélicidine, **LL-37R** : Récepteur du LL-37, **LPS** : Lipopolysaccharide, **Mono** : Monocytes, **MΦ** : Macrophages, **NET** : "Neutrophil Extracellular Traps", **PMN** : Neutrophiles, **TLR-9** : Récepteur de type Toll 9, **TNF** : Facteur de nécrose tumorale, \* : Lorena Barrientos et al. 2014, *The Journal of Immunology*.

Sur des cellules activées, les NET peuvent passer d'un effet pro- à anti-inflammatoires. C'est ce que nous pouvons observer lors de l'activation des PNN avec LPS, où les NET favorisent et augmentent la sécrétion en cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, TNF-α). Alors que nous avons montré que sur les MΦ, les NET inhibent la sécrétion d'IL-6 et augmentent celle d'IL-10. Les NET sont anti-inflammatoires sur un autre type de CPA, les DC, en inhibant la sécrétion d'IL-8,6 et TNF-α. Il se pourrait que les NET aient le même comportement sur les monocytes et les LB mais cela reste à prouver.

## F. Les NET favorisent l'activation des MΦ pro-inflammatoires M1 et n'agissent pas sur les anti-inflammatoires M2

Certes les NET peuvent avoir un effet pro- et anti-inflammatoire sur des MΦ indifférenciés, mais qu'en est-il sur des cellules déjà polarisées comme dans le cas des MΦ M1 et M2 ?

Il a été rapporté qu'une prédominance de MΦ M1 pro-inflammatoires était associée à la PR alors que les MΦ M2 sont en moindre quantité. Dans ce cas, sur qu'elles sous populations agiraient les NET ?

Anderson B. Guimarães-Costa et al. ont montré que les NET pouvaient influencer la différenciation des monocytes en MΦ anti-inflammatoires au lieu de DC. Ils démontrent que lors de la différenciation des monocytes par de l'IL-4/GM-CSF ils obtiennent des DC avec une baisse de l'expression de CD14 et une sur-expression de CD1a, alors qu'au contraire lors de l'ajout des NET avant la combinaison IL-4/GM-CSF, l'expression de CD14 est maintenue et celle du CD1a est diminuée. Ils avaient souligné que ces cellules différenciées en présence de NET exprimaient d'autres marqueurs de surface qui sont spécifiques aux MΦ M2 à savoir CD68, CD32, et CD163, et sécrétaient de l'IL-10 et du TGF-β, deux cytokines anti-inflammatoires ; leur capacité à tuer des parasites (*Leishmania*) était moindre par rapport aux cellules différenciées par la combinaison IL-4/GM-CSF seule (Guimarães-Costa et al., 2017).

Avant d'étudier le rôle des NET sur des MΦ polarisés, nous avons commencé par analyser leur effet sur les monocytes qui sont utilisés pour cette polarisation. Les monocytes cultivés en présence de NET sécrètent de l'IL-8 et du TNF-α mais pas d'IL-10, donc les NET ont un effet pro-inflammatoire sur les monocytes.

Pour la polarisation macrophagique, nous nous sommes référés à l'article d'Ambarus et al. de 2012 où il définissent les MΦ M1 comme étant ceux différenciés avec de l'IFN-γ et qui sur-expriment le CD80 et CD64, les MΦ M2a ceux différenciés avec de l'IL-4 et qui expriment fortement le CD200R et faiblement le CD14 et enfin les MΦ M2c, les MΦ différenciés grâce à l'IL-10 et qui sur-expriment le CD163 et le CD16 (Ambarus et al., 2012b).

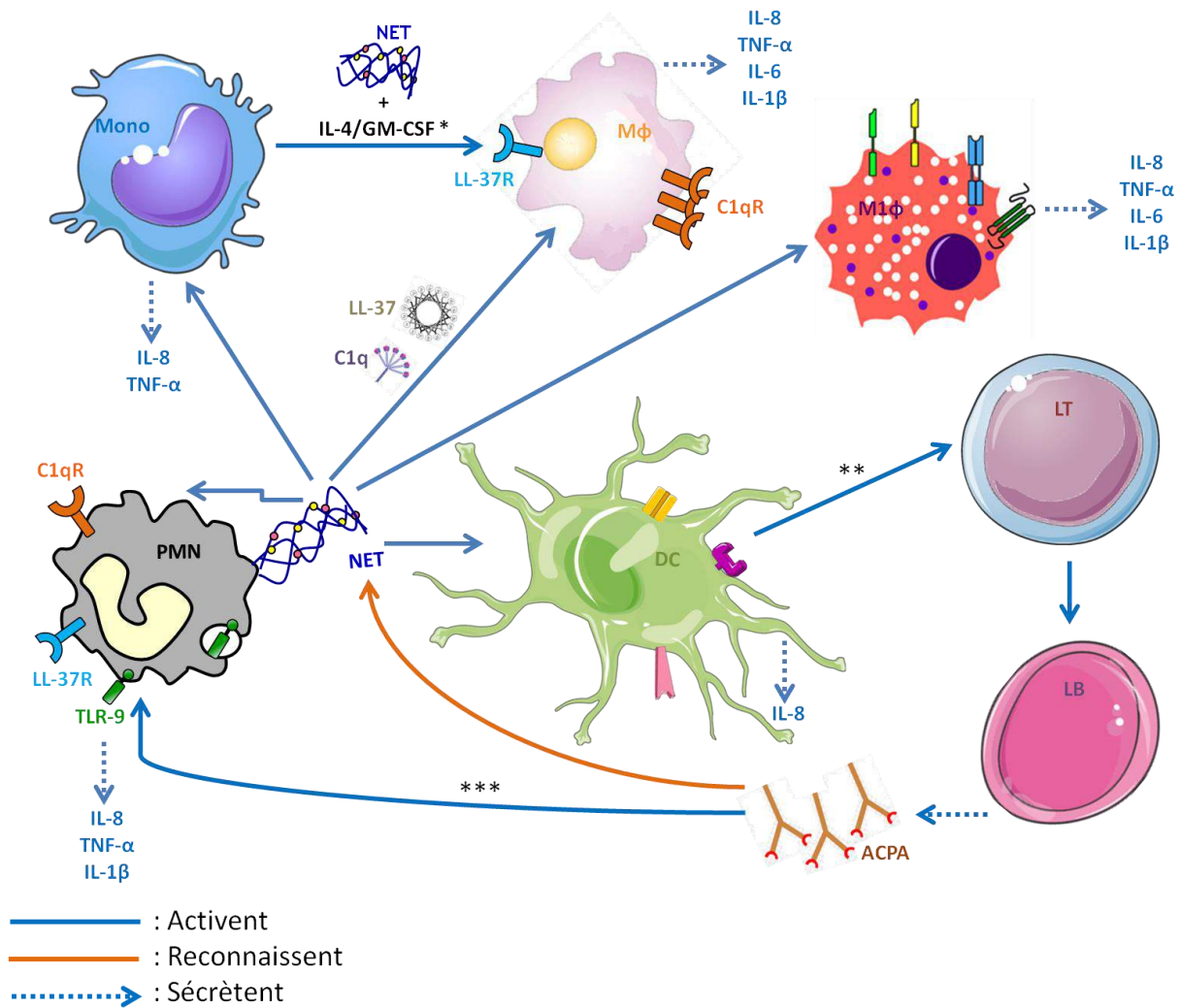
Nous avons montré que sur la sous-population anti-inflammatoire M2c, les NET n'avaient aucun effet comme illustré dans la **Figure 37**. Les NET n'affecte en rien la sécrétion d'IL-10 induit par les MΦ M2c. Alors qu'au contraire, sur les MΦ M1 les NET induisent et

## **Discussion et perspectives**

---

augmentent leur sécrétion en IL-8 et IL-1 $\beta$  mais pas en IL-10. De plus, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par les NET semble plus élevée avec les M $\Phi$  M1 qu'avec les M $\Phi$  indifférenciés.

Cela prouve que les NET sont avant tout pro-inflammatoires, aggravant et maintenant l'inflammation, comme illustré en ***Figure 43***.



**Figure 43 : Effet des NET sur cellules au repos**

ACPA : Anticorps anti protéines citrulinées, C1qR : Récepteur du C1q, DC : Cellules dendritiques, GM-CSF : “Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor”, IL : Interleukine, LB : Lymphocytes B, LL-37 : Peptide anti-microbien cathélicidine, C1q : Protéine du complément C1q, LL-37R : Récepteur du LL-37, LT : Lymphocytes T, Mono : Monocytes, MΦ : Macrophages, NET : “Neutrophil Extracellular Traps”, PMN : Neutrophiles, TLR-9 : Récepteur de type Toll, TNF : Facteur de nécrose tumorale, \* : Anderson B. Guimaraes-Costa et al. 2017, *Frontiers in Immunology*, \*\* : Garyfalia Papadaki et al. 2016, *European Journal of Immunology*, \*\*\* : Carmelo Carmona-Rivera et al. 2017, *Science Immunology*.

Les PNN ont la capacité d’extérioriser des filaments d’ADN appelés NET. Ces NET sont immunogènes permettant l’activation de nombreuses cellules impliquées dans la pathogénèse de la PR. Les NET une fois libérés sont capables à leur tour d’activer les PNN formant une boucle d’amplification. Les NET activent aussi les monocytes via l’induction de la sécrétion d’IL-8 et de TNF-α et lors de la différenciation de ces cellules en présence d’IL-4/GM-CSF, les NET orienteraient la différenciation en MΦ (mais anti-inflammatoires). Les NET activent les MΦ et cette activation est favorisée par la combinaison C1q/LL-37. De plus, cette activation, cible les MΦ pro-inflammatoires M1 en augmentant la sécrétion d’IL-8, -6, -1β et TNF-α. Enfin, les NET activent les DC qui par la suite vont présenter l’auto-antigène aux LT. Ces derniers pourraient activer les LB pour produire les ACPA qui reconnaissent les NET et qui ont la capacité d’induire la NETose.





---

# **BIBLIOGRAPHIE**

---

## Bibliographie

---

- Abbas, A.K., Le, K., Pimmett, V.L., Bell, D.A., Cairns, E., and DeKoter, R.P. (2014). Negative regulation of the peptidylarginine deiminase type IV promoter by NF- $\kappa$ B in human myeloid cells. *Gene* 533, 123–131.
- Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L.A.B., Koenders, M.I., Devesa, I., Roelofs, M.F., Radstake, T.R.D.J., Heuvelmans-Jacobs, M., Akira, S., Nicklin, M.J.H., Ribeiro-Dias, F., et al. (2008). Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J. Clin. Invest.* 118, 205–216.
- Abi Abdallah, D.S., Lin, C., Ball, C.J., King, M.R., Duhamel, G.E., and Denkers, E.Y. (2012). *Toxoplasma gondii* Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps. *Infect. Immun.* 80, 768–777.
- Achek, A., Yesudhas, D., and Choi, S. (2016). Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Arch. Pharm. Res.* 39, 1032–1049.
- Adam, R., Sturrock, R.D., and Gracie, J.A. (2006). TLR4 mutations (Asp299Gly and Thr399Ile) are not associated with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 1099–1101.
- Addobbati, C., Cruz, H.L.A. da, Adelino, J.E., Ramos, A.L.M.T., Fragoso, T.S., Domingues, A., Duarte, Â.L.B.P., Oliveira, R.D.R., Louzada-Júnior, P., Donadi, E.A., et al. (2018). Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. *Inflamm. Res.* 67, 255–264.
- Aggarwal, A., Bhardwaj, A., Alam, S., and Misra, R. (2000). Evidence for activation of the alternate complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 39, 189–192.
- Agier, J., Efenberger, M., and Brzezińska-Błaszczyk, E. (2015). Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent.-Eur. J. Immunol.* 40, 225–235.
- Agrawal, A., and Volanakis, J.E. (1994). Probing the C1q-binding site on human C-reactive protein by site-directed mutagenesis. *J. Immunol.* 152, 5404–5410.
- Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. (2008). TLR accessory molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 420–425.
- Alalwani, S.M., Sierigk, J., Herr, C., Pinkenburg, O., Gallo, R., Vogelmeier, C., and Bals, R. (2010). The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 40, 1118–1126.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science).
- Alder, M.N., Opoka, A.M., Lahni, P., Hildeman, D.A., and Wong, H.R. (2017). Olfactomedin-4 Is a Candidate Marker for a Pathogenic Neutrophil Subset in Septic Shock. *Crit. Care Med.* 45.
- Aleixo, P., Vaz-Patto, J., Moreira, H., and Abrantes, J. (2018). Dynamic joint stiffness of the ankle in healthy and rheumatoid arthritis post-menopausal women. *Gait Posture* 60, 225–234.

## Bibliographie

---

- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* *62*, 2569–2581.
- Aletaha, D., Alasti, F., and Smolen, J.S. (2016). Optimisation of a treat-to-target approach in rheumatoid arthritis: strategies for the 3-month time point. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 1479–1485.
- Aleyd, E., Al, M., Tuk, C.W., Laken, C.J. van der, and Egmond, M. van (2016). IgA Complexes in Plasma and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis Induce Neutrophil Extracellular Traps via Fc $\alpha$ RI. *J. Immunol.* *197*, 4552–4559.
- Alivernini, S., Tolusso, B., Ferraccioli, G., Gremese, E., Kurowska-Stolarska, M., and McInnes, I.B. (2018). Driving chronicity in rheumatoid arthritis: perpetuating role of myeloid cells. *Clin. Exp. Immunol.*
- Al-Khafaji, A.B., Tohme, S., Yazdani, H.O., Miller, D., Huang, H., and Tsung, A. (2016). Superoxide Induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR-4 and NOX-Dependent Mechanism. *Mol. Med.* *22*, 621–631.
- Allegretti, M., Moriconi, A., Beccari, A.R., Di Bitondo, R., Bizzarri, C., Bertini, R., and Colotta, F. (2005). Targeting C5a: recent advances in drug discovery. *Curr. Med. Chem.* *12*, 217–236.
- Allen, L.A., and Aderem, A. (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* *184*, 627–637.
- Allen, C., Thornton, P., Denes, A., McColl, B.W., Pierozynski, A., Monestier, M., Pinteaux, E., Rothwell, N.J., and Allan, S.M. (2012). Neutrophil Cerebrovascular Transmigration Triggers Rapid Neurotoxicity through Release of Proteases Associated with Decondensed DNA. *J. Immunol.* *189*, 381–392.
- Alten, R., Gram, H., Joosten, L.A., Berg, W.B. van den, Sieper, J., Wassenberg, S., Burmester, G., van Riel, P., Diaz-Lorente, M., Bruin, G.J., et al. (2008). The human anti-IL-1 $\beta$  monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *10*, R67.
- Alzabin, S., Kong, P., Medghalchi, M., Palfreeman, A., Williams, R., and Sacre, S. (2012). Investigation of the role of endosomal Toll-like receptors in murine collagen-induced arthritis reveals a potential role for TLR7 in disease maintenance. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R142.
- Ambarus, C.A., Noordenbos, T., de Hair, M.J., Tak, P.P., and Baeten, D.L. (2012a). Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R74.
- Ambarus, C.A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T.R.D.J., Reedquist, K.A., Tak, P.P., and Baeten, D.L.P. (2012b). Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods* *375*, 196–206.

- Amini, P., Stojkov, D., Wang, X., Wicki, S., Kaufmann, T., Wong, W.W., Simon, H., and Yousefi, S. (2016). NET formation can occur independently of RIPK3 and MLKL signaling. *Eur. J. Immunol.* *46*, 178–184.
- Amirbeagi Firoozeh, Thulin Pontus, Pullerits Rille, Pedersen Bo, Andersson Bengt A., Dahlgren Claes, Welin Amanda, and Bylund Johan (2014). Olfactomedin-4 autoantibodies give unusual c-ANCA staining patterns with reactivity to a subpopulation of neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* *97*, 181–189.
- Amulic, B., Knackstedt, S.L., Abu Abed, U., Deigendesch, N., Harbort, C.J., Caffrey, B.E., Brinkmann, V., Heppner, F.L., Hinds, P.W., and Zychlinsky, A. (2017). Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps. *Dev. Cell* *43*, 449-462.e5.
- Anderson, K.V., Jürgens, G., and Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* *42*, 779–789.
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.-C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., et al. (2000). High Mobility Group 1 Protein (Hmg-1) Stimulates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes. *J. Exp. Med.* *192*, 565–570.
- Andzinski, L., Kasnitz, N., Stahnke, S., Wu, C.-F., Gereke, M., von Köckritz-Blickwede, M., Schilling, B., Brandau, S., Weiss, S., and Jablonska, J. (2016). Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int. J. Cancer* *138*, 1982–1993.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2009). Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* *5*, 325–331.
- Anwar, M.A., Basith, S., and Choi, S. (2013). Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp. Mol. Med.* *45*, e11.
- Anzilotti, C., Pratesi, F., Tommasi, C., and Migliorini, P. (2010). Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun. Rev.* *9*, 158–160.
- Aquino, S.G. de, Abdollahi-Roodsaz, S., Koenders, M.I., Loo, F.A.J. van de, Pruijn, G.J.M., Marijnissen, R.J., Walgreen, B., Helsen, M.M., Bersselaar, L.A. van den, Molon, R.S. de, et al. (2014). Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune Experimental Arthritis by Inducing a TLR2- and IL-1-Driven Th17 Response. *J. Immunol.* *192*, 4103–4111.
- Arai, Y., Yamashita, K., Mizugishi, K., Watanabe, T., Sakamoto, S., Kitano, T., Kondo, T., Kawabata, H., Kadowaki, N., and Takaori-Kondo, A. (2013). Serum Neutrophil Extracellular Trap Levels Predict Thrombotic Microangiopathy after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *19*, 1683–1689.
- Arai, Y., Nishinaka, Y., Arai, T., Morita, M., Mizugishi, K., Adachi, S., Takaori-Kondo, A., Watanabe, T., and Yamashita, K. (2014). Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *443*, 556–561.

- Arend, W.P. (2001). The innate immune system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *44*, 2224–2234.
- Arita, K., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Yamada, M., and Sato, M. (2006). Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5291–5296.
- Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Budayova-Spano, M., Rossi, V., and Fontecilla-Camps, J.C. (2002). Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity. *Mol. Immunol.* *39*, 383–394.
- Ashrafi, G., and Schwarz, T.L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* *20*, 31–42.
- Asquith, D.L., Miller, A.M., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2009). Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2040–2044.
- Assi, L.K., Wong, S.H., Ludwig, A., Raza, K., Gordon, C., Salmon, M., Lord, J.M., and Scheel-Toellner, D. (2007). Tumor necrosis factor alpha activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* *56*, 1776–1786.
- Auer, J., Bläss, M., Schulze-Koops, H., Russwurm, S., Nagel, T., Kalden, J.R., Röllinghoff, M., and Beuscher, H.U. (2007). Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *9*, R94.
- Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* *109*, 33–44.
- Bagnall, R.D., Roberts, R.G., Mirza, M.M., Torigoe, T., Prescott, N.J., and Mathew, C.G. (2008). Novel isoforms of the *CARD8* (*TUCAN*) gene evade a nonsense mutation. *Eur. J. Hum. Genet.* *16*, 619–625.
- Baici, A., Salgam, P., Cohen, G., Fehr, K., and Böni, A. (1982). Action of collagenase and elastase from human polymorphonuclear leukocytes on human articular cartilage. *Rheumatol. Int.* *2*, 11–16.
- Baillet, A., Trocmé, C., Berthier, S., Arlotto, M., Grange, L., Chenau, J., Quétant, S., Sève, M., Berger, F., Juvin, R., et al. (2010). Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *49*, 671–682.
- Balistreri, C.R., Candore, G., Mirabile, M., Lio, D., Caimi, G., Incalcaterra, E., Caruso, M., Hoffmann, E., and Caruso, C. (2008). TLR2 and Age-Related Diseases: Potential Effects of Arg753Gln and Arg677Trp Polymorphisms in Acute Myocardial Infarction. *Rejuvenation Res.* *11*, 293–296.
- Ballanti, E., Perricone, C., di Muzio, G., Kroegler, B., Chimenti, M.S., Graceffa, D., and Perricone, R. (2011). Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors. *Autoimmun. Rev.* *10*, 617–623.
- Banda, N.K., Thurman, J.M., Kraus, D., Wood, A., Carroll, M.C., Arend, W.P., and Holers, V.M. (2006). Alternative Complement Pathway Activation Is Essential for Inflammation and

- Joint Destruction in the Passive Transfer Model of Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* *177*, 1904–1912.
- Barletta, K.E., Ley, K., and Mehrad, B. (2012). Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 856–864.
- Barlow, P.G., Li, Y., Wilkinson, T.S., Bowdish, D.M.E., Lau, Y.E., Cosseau, C., Haslett, C., Simpson, A.J., Hancock, R.E.W., and Davidson, D.J. (2006). The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 509–520.
- Barrientos, L., Bignon, A., Gueguen, C., Chaisemartin, L. de, Gorges, R., Sandré, C., Mascarell, L., Balabanian, K., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., et al. (2014). Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* *193*, 5689–5698.
- Barth, C.R., Funchal, G.A., Luft, C., de Oliveira, J.R., Porto, B.N., and Donadio, M.V.F. (2016). Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. *Eur. J. Immunol.* *46*, 964–970.
- Barton, A., Bowes, J., Eyre, S., Spreckley, K., Hinks, A., John, S., and Worthington, J. (2004). A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum.* *50*, 1117–1121.
- Batsford, S., Dunn, J., and Mihatsch, M. (2011). Induction of Experimental Arthritis by Borrelial Lipoprotein and CpG Motifs: Are Toll-Like Receptors 2, 4, 9 or CD-14 Involved? *Open Rheumatol. J.* *5*, 18–23.
- Bauernfeind, F., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *183*, 787–791.
- Baum, R., Sharma, S., Carpenter, S., Li, Q.-Z., Busto, P., Fitzgerald, K.A., Marshak-Rothstein, A., and Gravalles, E.M. (2015). AIM2 and endosomal TLRs differentially regulate arthritis and autoantibody production in DNaseII deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *194*, 873–877.
- Beauvillain, C., Cunin, P., Doni, A., Scotet, M., Jaillon, S., Loiry, M.-L., Magistrelli, G., Masternak, K., Chevaller, A., Delneste, Y., et al. (2011). CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* *117*, 1196–1204.
- Begovich, A.B., Carlton, V.E.H., Honigberg, L.A., Schrodi, S.J., Chokkalingam, A.P., Alexander, H.C., Ardlie, K.G., Huang, Q., Smith, A.M., Spoerke, J.M., et al. (2004). A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* *75*, 330–337.
- Behnen, M., Leschczyk, C., Möller, S., Batel, T., Klinger, M., Solbach, W., and Laskay, T. (2014). Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via Fc $\gamma$ RIIIB and Mac-1. *J. Immunol.* *193*, 1954–1965.

## Bibliographie

---

- Behrens, F., Himsel, A., Rehart, S., Stanczyk, J., Beutel, B., Zimmermann, S.Y., Koehl, U., Möller, B., Gay, S., Kaltwasser, J.P., et al. (2007). Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 1151–1156.
- Behrens, M., Smart, M., Luckey, D., Luthra, H., and Taneja, V. (2011). To B or not to B: Role of B cells in pathogenesis of arthritis in HLA transgenic mice. *J. Autoimmun.* *37*, 95–103.
- Ben Hamad, M., Cornelis, F., Marzouk, S., Chabchoub, G., Bahloul, Z., Rebai, A., Fakhfakh, F., Ayadi, H., Petit-Teixeira, E., and Maalej, A. (2012). Association study of CARD8 (p.C10X) and NLRP3 (p.Q705K) variants with rheumatoid arthritis in French and Tunisian populations. *Int. J. Immunogenet.* *39*, 131–136.
- Bendele, A. (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* *1*, 377–385.
- Benna, J.E., Dang, P.M.-C., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., and Gougerot-Pocidalò, M.-A. (1997). Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p67 phox during Human Neutrophil Activation REGULATION BY PROTEIN KINASE C-DEPENDENT AND INDEPENDENT PATHWAYS. *J. Biol. Chem.* *272*, 17204–17208.
- Benson, R.A., McInnes, I.B., Garside, P., and Brewer, J.M. (2017). Model answers: Rational application of murine models in arthritis research. *Eur. J. Immunol.*
- Benson, R.A., McInnes, I.B., Garside, P., and Brewer, J.M. (2018). Model answers: Rational application of murine models in arthritis research. *Eur. J. Immunol.* *48*, 32–38.
- Bentwood, B.J., and Henson, P.M. (1980). The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J. Immunol.* *124*, 855–862.
- Berg, T.K. van den, Die, I. van, Lavalette, C.R. de, Döpp, E.A., Smit, L.D., Meide, P.H. van der, Tilders, F.J., Crocker, P.R., and Dijkstra, C.D. (1996). Regulation of sialoadhesin expression on rat macrophages. Induction by glucocorticoids and enhancement by IFN-beta, IFN-gamma, IL-4, and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* *157*, 3130–3138.
- Bessis, N., Decker, P., Assier, E., Semerano, L., and Boissier, M.-C. (2017). Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin. Immunopathol.* *39*, 469–486.
- Bhatia, S.S., Majka, D.S., Kittelson, J.M., Parrish, L.A., Ferucci, E.D., Deane, K.D., Arend, W.P., Rewers, M., Holers, V.M., and Norris, J.M. (2007). Rheumatoid factor seropositivity is inversely associated with oral contraceptive use in women without rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 267–269.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 1–5.
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R.A., Zychlinsky, A., and Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* *114*, 2619–2622.
- Bielinski, S.J., Hall, J.L., Pankow, J.S., Boerwinkle, E., Matijevic-Aleksic, N., He, M., Chambless, L., and Folsom, A.R. (2011). Genetic variants in TLR2 and TLR4 are associated

with markers of monocyte activation: the Atherosclerosis Risk in Communities MRI Study. *Hum. Genet.* 129, 655–662.

Blache, C., Lequerré, T., Roucheux, A., Beutheu, S., Dedreux, I., Jacquot, S., Le Loët, X., Boyer, O., and Vittecoq, O. (2011). Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4+CD25hi regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. *Rheumatology* 50, 1814–1822.

Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540–1543.

Blomgran, R., Patcha Brodin, V., Verma, D., Bergström, I., Söderkvist, P., Sjöwall, C., Eriksson, P., Lerm, M., Stendahl, O., and Särndahl, E. (2012). Common Genetic Variations in the NALP3 Inflammasome Are Associated with Delayed Apoptosis of Human Neutrophils. *PLoS ONE* 7.

Boissier, M.C., Feng, X.Z., Carlioz, A., Roudier, R., and Fournier, C. (1987). Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 46, 691–700.

Boissier, M.-C., Semerano, L., Challal, S., Saidenberg-Kermanac'h, N., and Falgarone, G. (2012). Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J. Autoimmun.* 39, 222–228.

Boisvert, W.A., Rose, D.M., Johnson, K.A., Fuentes, M.E., Lira, S.A., Curtiss, L.K., and Terkeltaub, R.A. (2006). Up-Regulated Expression of the CXCR2 Ligand KC/GRO- $\alpha$  in Atherosclerotic Lesions Plays a Central Role in Macrophage Accumulation and Lesion Progression. *Am. J. Pathol.* 168, 1385–1395.

Bokarewa, M., Tarkowski, A., Lind, M., Dahlberg, L., and Magnusson, M. (2008). Arthritogenic dsRNA is present in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients with an erosive disease course. *Eur. J. Immunol.* 38, 3237–3244.

Bonelli, M., Ferner, E., Göschl, L., Blüml, S., Hladik, A., Karonitsch, T., Kiener, H.P., Byrne, R., Niederreiter, B., Steiner, C.W., et al. (2013). Abatacept (CTLA-4IG) treatment reduces the migratory capacity of monocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Amp Rheumatol.* 65, 599–607.

Boros, P., Odin, J.A., Muryoi, T., Masur, S.K., Bona, C., and Unkeless, J.C. (1991). IgM anti-Fc gamma R autoantibodies trigger neutrophil degranulation. *J. Exp. Med.* 173, 1473–1482.

Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., MacMurray, J., Meloni, G.F., Lucarelli, P., Pellicchia, M., et al. (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat. Genet.* 36, 337.

Botto, M., and Walport, M.J. (2002). C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology* 205, 395–406.

Bouchier-Hayes, L., Conroy, H., Egan, H., Adrain, C., Creagh, E.M., MacFarlane, M., and Martin, S.J. (2001). CARDINAL, a Novel Caspase Recruitment Domain Protein, Is an Inhibitor of Multiple NF- $\kappa$ B Activation Pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 44069–44077.



## Bibliographie

---

- Bowdish, D.M.E., Davidson, D.J., Speert, D.P., and Hancock, R.E.W. (2004). The Human Cationic Peptide LL-37 Induces Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Kinase Pathways in Primary Human Monocytes. *J. Immunol.* *172*, 3758–3765.
- Brackertz, D., Mitchell, G.F., Vadas, M.A., Mackay, I.R., and Miller, J.F.A.P. (1977). Studies on Antigen-Induced Arthritis in Mice: II. Immunologic Correlates of Arthritis Susceptibility in Mice. *J. Immunol.* *118*, 1639–1644.
- Brahn, E., Tang, C., and Banquerigo, M.L. (1994). Regression of collagen-induced arthritis with taxol, a microtubule stabilizer. *Arthritis Rheum.* *37*, 839–845.
- Brand, D.D. (2005). Rodent Models of Rheumatoid Arthritis. *Comp. Med.* *55*, 114–122.
- Brand, D.D., Latham, K.A., and Rosloniec, E.F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.* *2*, 1269–1275.
- Brandolini, L., Bertini, R., Bizzarri, C., Sergi, R., Caselli, G., Zhou, D., Locati, M., and Sozzani, S. (1996). IL-1 beta primes IL-8-activated human neutrophils for elastase release, phospholipase D activity, and calcium flux. *J. Leukoc. Biol.* *59*, 427–434.
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., and Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* *15*, 1017–1025.
- Breedveld, F.C., Weisman, M.H., Kavanaugh, A.F., Cohen, S.B., Pavelka, K., Vollenhoven, R. van, Sharp, J., Perez, J.L., and Spencer-Green, G.T. (2006). The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.* *54*, 26–37.
- Brennan, F.M., and McInnes, I.B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* *118*, 3537–3545.
- Brentano, F., Schorr, O., Gay, R.E., Gay, S., and Kyburz, D. (2005). RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via toll-like receptor 3. *Arthritis Rheum.* *52*, 2656–2665.
- Bresnihan, B. (1999). Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* *26*, 717–719.
- Bresnihan, B., Alvaro-Gracia, J.M., Cobby, M., Doherty, M., Domljan, Z., Emery, P., Nuki, G., Pavelka, K., Rau, R., Rozman, B., et al. (1998). Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* *41*, 2196–2204.
- Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 577–582.
- Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* *198*, 773–783.

## Bibliographie

---

- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* *303*, 1532–1535.
- Brodeur, J.P., Ruddy, S., Schwartz, L.B., and Moxley, G. (1991). Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *34*, 1531–1537.
- Brown, K.L., Poon, G.F.T., Birkenhead, D., Pena, O.M., Falsafi, R., Dahlgren, C., Karlsson, A., Bylund, J., Hancock, R.E.W., and Johnson, P. (2011). Host Defense Peptide LL-37 Selectively Reduces Proinflammatory Macrophage Responses. *J. Immunol.* *186*, 5497–5505.
- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* *119*, 5640–5649.
- Buanec, H.L., Delavallée, L., Bessis, N., Paturance, S., Bizzini, B., Gallo, R., Zagury, D., and Boissier, M.-C. (2006). TNF $\alpha$  kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNF $\alpha$  protect mice from autologous TNF $\alpha$ -driven chronic and acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 19442–19447.
- Buchanan, J.T., Simpson, A.J., Aziz, R.K., Liu, G.Y., Kristian, S.A., Kotb, M., Feramisco, J., and Nizet, V. (2006). DNase Expression Allows the Pathogen Group A Streptococcus to Escape Killing in Neutrophil Extracellular Traps. *Curr. Biol.* *16*, 396–400.
- Buckley, C.D., Ross, E.A., McGettrick, H.M., Osborne, C.E., Haworth, O., Schmutz, C., Stone, P.C.W., Salmon, M., Matharu, N.M., Vohra, R.K., et al. (2006). Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 303–311.
- Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Serhan, C.N., Stockinger, B., and Tak, P.P. (2013). The resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 59–66.
- Bugl, S., Wirths, S., Radsak, M.P., Schild, H., Stein, P., André, M.C., Müller, M.R., Malenke, E., Wiesner, T., Märklin, M., et al. (2013). Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling. *Blood* *121*, 723–733.
- Bürckstümmer, T., Baumann, C., Blüml, S., Dixit, E., Dürnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., et al. (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat. Immunol.* *10*, 266–272.
- Burg, N.D., and Pillinger, M.H. (2001). The Neutrophil: Function and Regulation in Innate and Humoral Immunity. *Clin. Immunol.* *99*, 7–17.
- Burkhardt, H., Koller, T., Engström, Å., Nandakumar, K.S., Turnay, J., Kraetsch, H.G., Kalden, J.R., and Holmdahl, R. (2002). Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis Rheum.* *46*, 2339–2348.
- Burmester, G.R., Stuhlmüller, B., Keyszer, G., and Kinne, R.W. (1997). Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum.* *40*, 5–18.

- Burmester, G.R., Mariette, X., Montecucco, C., Monteagudo-Sáez, I., Malaise, M., Tzioufas, A.G., Bijlsma, J.W.J., Unnebrink, K., Kary, S., and Kupper, H. (2007). Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 732–739.
- Burmester, G.R., Rigby, W.F., Vollenhoven, R.F. van, Kay, J., Rubbert-Roth, A., Kelman, A., Dimonaco, S., and Mitchell, N. (2015). Tocilizumab in early progressive rheumatoid arthritis: FUNCTION, a randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* *annrheumdis-2015-207628*.
- Byrd, A.S., O'Brien, X.M., Johnson, C.M., Lavigne, L.M., and Reichner, J.S. (2013). An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *C. albicans*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 4136–4148.
- Caielli, S., Athale, S., Domic, B., Murat, E., Chandra, M., Banchereau, R., Baisch, J., Phelps, K., Clayton, S., Gong, M., et al. (2016). Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J. Exp. Med.* *213*, 697–713.
- Callahan, L.F., and Pincus, T. (1997). Education, self-care, and outcomes of rheumatic diseases: Further challenges to the “biomedical model” paradigm. *Arthritis Rheum.* *10*, 283–288.
- Campbell, E.L., Bruyninckx, W.J., Kelly, C.J., Glover, L.E., McNamee, E.N., Bowers, B.E., Bayless, A.J., Scully, M., Saeedi, B.J., Golden-Mason, L., et al. (2014). Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity* *40*, 66–77.
- Caponi, L., Petit-Teixeira, E., Sebbag, M., Bongiorno, F., Moscato, S., Pratesi, F., Pierlot, C., Osorio, J., Chapuy-Regaud, S., Guerrin, M., et al. (2005). A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 587–593.
- Carmona-Rivera, C., Carlucci, P.M., Moore, E., Lingampalli, N., Uchtenhagen, H., James, E., Liu, Y., Bicker, K.L., Wahamaa, H., Hoffmann, V., et al. (2017). Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Immunol.* *2*.
- Caron, E., and Hall, A. (1998). Identification of Two Distinct Mechanisms of Phagocytosis Controlled by Different Rho GTPases. *Science* *282*, 1717–1721.
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., et al. (2013). Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance. *Cell* *153*, 1025–1035.
- Cascão, R., Rosário, H.S., Souto-Carneiro, M.M., and Fonseca, J.E. (2010). Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun. Rev.* *9*, 531–535.
- Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* *179*, 1317–1330.

## Bibliographie

---

- Cassel, S.L., Eisenbarth, S.C., Iyer, S.S., Sadler, J.J., Colegio, O.R., Tephly, L.A., Carter, A.B., Rothman, P.B., Flavell, R.A., and Sutterwala, F.S. (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9035–9040.
- Catrina, A.I., Ytterberg, A.J., Reynisdottir, G., Malmström, V., and Klareskog, L. (2014). Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 645.
- Causey, C.P., Jones, J.E., Slack, J.L., Kamei, D., Jones, L.E., Subramanian, V., Knuckley, B., Ebrahimi, P., Chumanevich, A.A., Luo, Y., et al. (2011). The Development of N- $\alpha$ -(2-Carboxyl)benzoyl-N5-(2-fluoro-1-iminoethyl)-l-ornithine Amide (o-F-amidine) and N- $\alpha$ -(2-Carboxyl)benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-l-ornithine Amide (o-Cl-amidine) As Second Generation Protein Arginine Deiminase (PAD) Inhibitors. *J. Med. Chem.* *54*, 6919–6935.
- Cavassani, K.A., Ishii, M., Wen, H., Schaller, M.A., Lincoln, P.M., Lukacs, N.W., Hogaboam, C.M., and Kunkel, S.L. (2008). TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J. Exp. Med.* *205*, 2609–2621.
- Cederlund, A., Gudmundsson, G.H., and Agerberth, B. (2011). Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* *278*, 3942–3951.
- Celada, A., Gray, P.W., Rinderknecht, E., and Schreiber, R.D. (1984). Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J. Exp. Med.* *160*, 55–74.
- Celhar, T., and Fairhurst, A.-M. (2014). Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus: potential for personalized treatment. *Front. Pharmacol.* *5*.
- Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J.-L., and Miossec, P. (1998a). Enhancing Effect of IL-17 on IL-1-Induced IL-6 and Leukemia Inhibitory Factor Production by Rheumatoid Arthritis Synoviocytes and Its Regulation by Th2 Cytokines. *J. Immunol.* *161*, 409–414.
- Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J.-L., and Miossec, P. (1998b). Enhancing Effect of IL-17 on IL-1-Induced IL-6 and Leukemia Inhibitory Factor Production by Rheumatoid Arthritis Synoviocytes and Its Regulation by Th2 Cytokines. *J. Immunol.* *161*, 409–414.
- Chae, J.J., Cho, Y.-H., Lee, G.-S., Cheng, J., Liu, P.P., Feigenbaum, L., Katz, S.I., and Kastner, D.L. (2011). Gain-of-function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 $\beta$  Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity* *34*, 755–768.
- Chakravarti, A., Raquil, M.-A., Tessier, P., and Poubelle, P.E. (2009). Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* *114*, 1633–1644.
- Chamilos, G., Gregorio, J., Meller, S., Lande, R., Kontoyiannis, D.P., Modlin, R.L., and Gilliet, M. (2012). Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. *Blood* *120*, 3699–3707.
- Chan, R.K., Ibrahim, S.I., Takahashi, K., Kwon, E., McCormack, M., Ezekowitz, A., Carroll, M.C., Moore, F.D., and Austen, W.G. (2006). The Differing Roles of the Classical and Mannose-Binding Lectin Complement Pathways in the Events following Skeletal Muscle Ischemia-Reperfusion. *J. Immunol.* *177*, 8080–8085.

## Bibliographie

---

- Chang, X., Yamada, R., Suzuki, A., Sawada, T., Yoshino, S., Tokuhiko, S., and Yamamoto, K. (2005). Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* *44*, 40–50.
- Changelian, P.S., Jack, R.M., Collins, L.A., and Fearon, D.T. (1985). PMA induces the ligand-independent internalization of CR1 on human neutrophils. *J. Immunol.* *134*, 1851–1858.
- Chapman, M.L., Rubin, B.R., and Gracy, R.W. (1989). Increased carbonyl content of proteins in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* *16*, 15–18.
- Chen, G.Y., and Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 826–837.
- Chen, F., Wu, W., Millman, A., Craft, J.F., Chen, E., Patel, N., Boucher, J.L., Urban Jr, J.F., Kim, C.C., and Gause, W.C. (2014). Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat. Immunol.* *15*, 938–946.
- Chen, J.-Q., Szodoray, P., and Zeher, M. (2016). Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *50*, 1–17.
- Chen, K., Nishi, H., Travers, R., Tsuboi, N., Martinod, K., Wagner, D.D., Stan, R., Croce, K., and Mayadas, T.N. (2012). Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* *120*, 4421–4431.
- Chen, M., Daha, M.R., and Kallenberg, C.G.M. (2010). The complement system in systemic autoimmune disease. *J. Autoimmun.* *34*, J276–J286.
- Cheng, N., He, R., Tian, J., Ye, P.P., and Ye, R.D. (2008). Cutting Edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 22–26.
- Chibnik, L.B., Keenan, B.T., Cui, J., Liao, K.P., Costenbader, K.H., Plenge, R.M., and Karlson, E.W. (2011). Genetic Risk Score Predicting Risk of Rheumatoid Arthritis Phenotypes and Age of Symptom Onset. *PLoS ONE* *6*.
- Cho, J.H., Fraser, I.P., Fukase, K., Kusumoto, S., Fujimoto, Y., Stahl, G.L., and Ezekowitz, R.A.B. (2005). Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood* *106*, 2551–2558.
- Cho, M.-L., Ju, J.-H., Kim, H.-R., Oh, H.-J., Kang, C.-M., Jhun, J.-Y., Lee, S.-Y., Park, M.-K., Min, J.-K., Park, S.-H., et al. (2007). Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol. Lett.* *108*, 121–128.
- Chotjumlong, P., Bolscher, J.G., Nazmi, K., Reutrakul, V., Supanchart, C., Buranaphatthana, W., and Krisanaprakornkit, S. (2013). Involvement of the P2X7 purinergic receptor and c-Jun N-terminal and extracellular signal-regulated kinases in cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 induction by LL-37. *J. Innate Immun.* *5*, 72–83.
- Choubey, D. (2012). Interferon-inducible Ifi200-family genes as modifiers of lupus susceptibility. *Immunol. Lett.* *147*, 10–17.

- Choulaki, C., Papadaki, G., Repa, A., Kampouraki, E., Kambas, K., Ritis, K., Bertias, G., Boumpas, D.T., and Sidiropoulos, P. (2015). Enhanced activity of NLRP3 inflammasome in peripheral blood cells of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *17*.
- Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus. *Immunity* *25*, 417–428.
- Christoffersson, G., and Phillipson, M. (2018). The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? *Cell Tissue Res.* *371*, 415–423.
- Chromek, M., Slamová, Z., Bergman, P., Kovács, L., Podracká, L., Ehrén, I., Hökfelt, T., Gudmundsson, G.H., Gallo, R.L., Agerberth, B., et al. (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat. Med.* *12*, 636–641.
- Clancy, R.M., Markham, A.J., and Buyon, J.P. (2016). Endosomal Toll-like Receptors in Clinically Overt and Silent Autoimmunity. *Immunol. Rev.* *269*, 76–84.
- Clavel, C., Nogueira, L., Laurent, L., Iobagiu, C., Vincent, C., Sebbag, M., and Serre, G. (2008). Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fc gamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* *58*, 678–688.
- Clemmensen Stine N., Bohr Christina T., Rørvig Sara, Glenthøj Andreas, Mora-Jensen Helena, Cramer Elisabeth P., Jacobsen Lars C., Larsen Maria T., Cowland Jack B., Tanassi Julia T., et al. (2011). Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* *91*, 495–500.
- Clevers, H.C., Versteegen, J.M., Logtenberg, T., Gmelig-Meyling, F.H., and Ballieux, R.E. (1985). Synergistic action of A23187 and phorbol ester on human B cell activation. *J. Immunol.* *135*, 3827–3830.
- Coenen, M.J.H., Enevold, C., Barrera, P., Schijvenaars, M.M.V.A.P., Toonen, E.J.M., Scheffer, H., Padyukov, L., Kastbom, A., Klareskog, L., Barton, A., et al. (2010). Genetic Variants in Toll-Like Receptors Are Not Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility or Anti-Tumour Necrosis Factor Treatment Outcome. *PLOS ONE* *5*, e14326.
- Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2014). Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol. Rev.* *262*, 153–166.
- Collins, R.G., Velji, R., Guevara, N.V., Hicks, M.J., Chan, L., and Beaudet, A.L. (2000). P-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (Icam)-1 Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J. Exp. Med.* *191*, 189–194.
- Consortium, T.W.T.C.C. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* *447*, 661.
- Cosgrove, D., Gray, D., Dierich, A., Kaufman, J., Lemeur, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1991). Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* *66*, 1051–1066.

## Bibliographie

---

- Costenbader, K.H., and Karlson, E.W. (2006). Epstein–Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis Res. Ther.* 8, 204.
- Costenbader, K.H., Feskanich, D., Mandl, L.A., and Karlson, E.W. (2006). Smoking Intensity, Duration, and Cessation, and the Risk of Rheumatoid Arthritis in Women. *Am. J. Med.* 119, 503.e1-503.e9.
- Crofford, L.J. (2013). Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 15, S2.
- Cross, A., Bucknall, R.C., Cassatella, M.A., Edwards, S.W., and Moots, R.J. (2003). Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2796–2806.
- Cross, A., Barnes, T., Bucknall, R.C., Edwards, S.W., and Moots, R.J. (2006). Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *J. Leukoc. Biol.* 80, 521–528.
- Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L.M., Persechini, P.M., and Ojcius, D.M. (2007). ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 282, 2871–2879.
- Curry, J.L., Qin, J.-Z., Bonish, B., Carrick, R., Bacon, P., Panella, J., Robinson, J., and Nickoloff, B.J. (2003). Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127, 178–186.
- Cutolo, M. (2007). Sex and rheumatoid arthritis: mouse model versus human disease. *Arthritis Rheum.* 56, 1–3.
- Cutolo, M., Sulli, A., Pizzorni, C., Serio, B., and Straub, R.H. (2001). Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 729–735.
- Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A., and Stewart, T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259, 1739–1742.
- Davey, M.S., Tamassia, N., Rossato, M., Bazzoni, F., Calzetti, F., Bruderek, K., Sironi, M., Zimmer, L., Bottazzi, B., Mantovani, A., et al. (2011). Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils. *Nat. Immunol.* 12, 1017–1018.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995.
- De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 74, 181–189.
- De Rycke, L., Peene, I., Hoffman, I., Kruithof, E., Union, A., Meheus, L., Lebeer, K., Wyns, B., Vincent, C., Mielants, H., et al. (2004). Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1587–1593.

- De Rycke, L., Baeten, D., Foell, D., Kruithof, E., Veys, E.M., Roth, J., and De Keyser, F. (2005). Differential expression and response to anti-TNF $\alpha$  treatment of infiltrating versus resident tissue macrophage subsets in autoimmune arthritis. *J. Pathol.* *206*, 17–27.
- De Yang, Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J., Oppenheim, J.J., and Chertov, O. (2000). LI-37, the Neutrophil Granule–And Epithelial Cell–Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor–Like 1 (Fpr1) as a Receptor to Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells. *J. Exp. Med.* *192*, 1069–1074.
- Deal, C. (2012). Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. *Curr. Rheumatol. Rep.* *14*, 231–237.
- Deighton, C.M., Walker, D.J., Griffiths, I.D., and Roberts, D.F. (1989). The contribution of H LA to rheumatoid arthritis. *Clin. Genet.* *36*, 178–182.
- Delgado-Rizo, V., Martínez-Guzmán, M.A., Iñiguez-Gutierrez, L., García-Orozco, A., Alvarado-Navarro, A., and Fafutis-Morris, M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front. Immunol.* *8*.
- Demmer, R.T., Molitor, J.A., Jacobs, D.R., and Michalowicz, B.S. (2011). Periodontal Disease, Tooth Loss and Incident Rheumatoid Arthritis: Results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its Epidemiologic Follow-up Study. *J. Clin. Periodontol.* *38*, 998–1006.
- Deng, G.M., Nilsson, I.M., Verdrengh, M., Collins, L.V., and Tarkowski, A. (1999). Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat. Med.* *5*, 702–705.
- Deniset, J.F., Surewaard, B.G., Lee, W.-Y., and Kubes, P. (2017). Splenic Ly6G<sup>high</sup> mature and Ly6G<sup>int</sup> immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae*. *J. Exp. Med.* *214*, 1333–1350.
- Derré-Bobillot, A., Cortes-Perez, N.G., Yamamoto, Y., Kharrat, P., Couvé, E., Da Cunha, V., Decker, P., Boissier, M.-C., Escartin, F., Cesselin, B., et al. (2013). Nuclease A (Gbs0661), an extracellular nuclease of *Streptococcus agalactiae*, attacks the neutrophil extracellular traps and is needed for full virulence. *Mol. Microbiol.* *89*, 518–531.
- Desai, J., Kumar, S.V., Mulay, S.R., Konrad, L., Romoli, S., Schauer, C., Herrmann, M., Bilyy, R., Müller, S., Popper, B., et al. (2016a). PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *Eur. J. Immunol.* *46*, 223–229.
- Desai, J., Mulay, S.R., Nakazawa, D., and Anders, H.-J. (2016b). Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is “NETosis” = necroptosis? *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 2211–2219.
- Desnues, B., Macedo, A.B., Roussel-Queval, A., Bonnardel, J., Henri, S., Demaria, O., and Alexopoulou, L. (2014). TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1497–1502.



## Bibliographie

---

- Devi, S., Wang, Y., Chew, W.K., Lima, R., A-González, N., Mattar, C.N.Z., Chong, S.Z., Schlitzer, A., Bakocevic, N., Chew, S., et al. (2013). Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J. Exp. Med.* 210, 2321–2336.
- Dewar, C.L., and Harth, M. (1994). Superoxide production from cytokine-treated adherent rheumatoid neutrophils. *Clin. Investig. Med. Med. Clin. Exp.* 17, 52–60.
- Dieudé, P. (2009). Rheumatic diseases: Environment and genetics. *Joint Bone Spine* 76, 602–607.
- Dihlmann, S., Erhart, P., Mehrabi, A., Nickkholgh, A., Lasitschka, F., Böckler, D., and Hakimi, M. (2014). Increased Expression and Activation of Absent in Melanoma 2 Inflammasome Components in Lymphocytic Infiltrates of Abdominal Aortic Aneurysms. *Mol. Med.* 20, 230–237.
- Dinarello, C.A. (1998). Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-18, and the Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856, 1–11.
- Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550.
- Ding, B., Soblosky, L., Nguyen, K., Geng, J., Yu, X., Ramamoorthy, A., and Chen, Z. (2013). Physiologically-Relevant Modes of Membrane Interactions by the Human Antimicrobial Peptide, LL-37, Revealed by SFG Experiments. *Sci. Rep.* 3.
- Ding, L., Gu, H., Gao, X., Xiong, S., and Zheng, B. (2015). Aurora kinase a regulates m1 macrophage polarization and plays a role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Inflammation* 38, 800–811.
- Ditzel, H.J. (2004). The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol. Med.* 10, 40–45.
- Divanovic, S., Trompette, A., Atabani, S.F., Madan, R., Golenbock, D.T., Visintin, A., Finberg, R.W., Tarakhovskiy, A., Vogel, S.N., Belkaid, Y., et al. (2005). Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat. Immunol.* 6, 571–578.
- Doerfler, M.E., Danner, R.L., Shelhamer, J.H., and Parrillo, J.E. (1989). Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B<sub>4</sub>. *J. Clin. Invest.* 83, 970–977.
- Does, A.M. van der, Beekhuizen, H., Ravensbergen, B., Vos, T., Ottenhoff, T.H.M., Dissel, J.T. van, Drijfhout, J.W., Hiemstra, P.S., and Nibbering, P.H. (2010). LL-37 Directs Macrophage Differentiation toward Macrophages with a Proinflammatory Signature. *J. Immunol.* 185, 1442–1449.
- Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Kammerbauer, C., Göß, C., Anz, D., Simanski, M., Gläser, R., Harder, J., Hornung, V., et al. (2011). Cytosolic DNA Triggers Inflammasome Activation in Keratinocytes in Psoriatic Lesions. *Sci. Transl. Med.* 3, 82ra38.

## Bibliographie

---

- Döring, Y., Soehnlein, O., and Weber, C. (2017). Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ. Res.* *120*, 736–743.
- Douda, D.N., Khan, M.A., Grasemann, H., and Palaniyar, N. (2015). SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 2817–2822.
- Dougados, M., Combe, B., Cantagrel, A., Goupille, P., Olive, P., Schattenkirchner, M., Meusser, S., Paimela, L., Rau, R., Zeidler, H., et al. (1999). Combination therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised, controlled, double blind 52 week clinical trial of sulphasalazine and methotrexate compared with the single components. *Ann. Rheum. Dis.* *58*, 220–225.
- Doyle, A.G., Herbein, G., Montaner, L.J., Minty, A.J., Caput, D., Ferrara, P., and Gordon, S. (1994). Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* *24*, 1441–1445.
- Draborg, A.H., Duus, K., and Houen, G. (2013). Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*, 535738.
- Drechsler, M., Döring, Y., Megens, R.T.A., and Soehnlein, O. (2011). Neutrophilic granulocytes - promiscuous accelerators of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* *106*, 839–848.
- Dubois, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Fayette, J., Brière, F., Banchereau, J., and Caux, C. (1998). Critical Role of IL-12 in Dendritic Cell-Induced Differentiation of Naive B Lymphocytes. *J. Immunol.* *161*, 2223–2231.
- Dumas, A., Amiable, N., de Rivero Vaccari, J.P., Chae, J.J., Keane, R.W., Lacroix, S., and Vallières, L. (2014). The Inflammasome Pyrin Contributes to Pertussis Toxin-Induced IL-1 $\beta$  Synthesis, Neutrophil Intravascular Crawling and Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS Pathog.* *10*.
- Duus, K., Hansen, E.W., Tacnet, P., Frachet, P., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., and Houen, G. (2010). Direct interaction between CD91 and C1q. *FEBS J.* *277*, 3526–3537.
- Eash, K.J., Greenbaum, A.M., Gopalan, P.K., and Link, D.C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* *120*, 2423–2431.
- Edelson, B.T., Stricker, T.P., Li, Z., Dickeson, S.K., Shepherd, V.L., Santoro, S.A., and Zutter, M.M. (2006). Novel collectin/C1q receptor mediates mast cell activation and innate immunity. *Blood* *107*, 143–150.
- van Eden, W., Wagenaar-Hilbers, J.P.A., and Wauben, M.H.M. (2001). Adjuvant Arthritis in the Rat. In *Current Protocols in Immunology*, (John Wiley & Sons, Inc.), p.
- Edfeldt, K., Agerberth, B., Rottenberg, M.E., Gudmundsson, G.H., Wang, X.-B., Mandal, K., Xu, Q., and Yan, Z. (2006). Involvement of the Antimicrobial Peptide LL-37 in Human Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 1551–1557.
- Eggleton, P., Reid, K., Kishore, U., and Sontheimer, R.D. (1997). Review : Clinical relevance of calreticulin in systemic lupus erythematosus. *Lupus* *6*, 564–571.

## Bibliographie

---

- Ekman, A.-K., and Cardell, L.O. (2010). The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* 130, 55–63.
- El-Ghobarey, A., and Whaley, K. (1980). Alternative pathway complement activation in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 7, 453–460.
- Elton, C.M., Smethurst, P.A., Eggleton, P., and Farndale, R.W. (2002). Physical and functional interaction between cell-surface calreticulin and the collagen receptors integrin  $\alpha 2\beta 1$  and glycoprotein VI in human platelets. *Thromb. Haemost.* 88, 648–654.
- Eming, R., Visconti, K., Hall, F., Sekine, C., Kobayashi, K., Chen, Q., Cope, A., Kanazawa, S., Peterlin, M., Rijnders, A., et al. (2002). Humanized mice as a model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 4, S133.
- Enevold, C., Radstake, T.R.D., Coenen, M.J.H., Fransen, J., Toonen, E.J.M., Bendtzen, K., and Riel, P.L.C.M. van (2010). Multiplex Screening of 22 Single-Nucleotide Polymorphisms in 7 Toll-like Receptors: An Association Study in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 37, 905–910.
- Engelmann, B., and Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 34–45.
- Ericson, J.A., Duffau, P., Yasuda, K., Ortiz-Lopez, A., Rothamel, K., Rifkin, I.R., and Monach, P.A. (2014). Gene Expression during the Generation and Activation of Mouse Neutrophils: Implication of Novel Functional and Regulatory Pathways. *PLoS ONE* 9.
- Eskan, M.A., Jotwani, R., Abe, T., Chmelar, J., Lim, J.-H., Liang, S., Ciero, P.A., Krauss, J.L., Li, F., Rauner, M., et al. (2012). The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat. Immunol.* 13, 465–473.
- Etem, E.O., Elyas, H., Ozgocmen, S., Yildirim, A., and Godekmerdan, A. (2011). The investigation of toll-like receptor 3, 9 and 10 gene polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol. Int.* 31, 1369–1374.
- Evans, T.J., Buttery, L.D., Carpenter, A., Springall, D.R., Polak, J.M., and Cohen, J. (1996). Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9553–9558.
- Eyles, J.L., Roberts, A.W., Metcalf, D., and Wicks, I.P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils—forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2, 500–510.
- Falgarone, G., Jaen, O., and Boissier, M.-C. (2005). Rôle de l'immunité innée dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum.* 72, 17–26.
- Fanger, N.A., Liu, C., Guyre, P.M., Wardwell, K., O'Neil, J., Guo, T.L., Christian, T.P., Mudzinski, S.P., and Gosselin, E.J. (1997). Activation of Human T Cells by Major Histocompatibility Complex Class II Expressing Neutrophils: Proliferation in the Presence of Superantigen, But Not Tetanus Toxoid. *Blood* 89, 4128–4135.

## Bibliographie

---

- Farkas, A., Tonel, G., and Nestle, F.O. (2008). Interferon- $\alpha$  and viral triggers promote functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Br. J. Dermatol.* *158*, 921–929.
- Farley, K., Stolley, J.M., Zhao, P., Cooley, J., and Remold-O'Donnell, E. (2012). A SerpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting NETosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 4574–4581.
- Farrera, C., and Fadeel, B. (2013). Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 2647–2656.
- Fedrigo, A., dos Santos, T.A.F.G., Nisihara, R., and Skare, T. (2018). The lupus patient with positive rheumatoid factor. *Lupus* 0961203318759607.
- Feldmann, M., Brennan, F.M., and Maini, R.N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 397–440.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* *458*, 509–513.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat. Immunol.* *11*, 385–393.
- Ferrante, C.J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G., Cronstein, B.N., Hasko, G., Outram, S., and Leibovich, S.J. (2013). The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of Interleukin-4 receptor alpha (IL4R $\alpha$ ) signaling. *Inflammation* *36*, 921–931.
- Ferreira, R.C., Freitag, D.F., Cutler, A.J., Howson, J.M.M., Rainbow, D.B., Smyth, D.J., Kaptoge, S., Clarke, P., Boreham, C., Coulson, R.M., et al. (2013). Functional IL6R 358A Allele Impairs Classical IL-6 Receptor Signaling and Influences Risk of Diverse Inflammatory Diseases. *PLoS Genet.* *9*.
- Firestein, G.S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis.
- Firestein, G.S. (2014). The disease formerly known as rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *16*, 114.
- Firestein, G.S., and McInnes, I.B. (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* *46*, 183–196.
- Firestein, G.S., and Zvaifler, N.J. (2002). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum.* *46*, 298–308.
- Fits, L. van der, Mourits, S., Voerman, J.S.A., Kant, M., Boon, L., Laman, J.D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Florencia, E., Prens, E.P., et al. (2009). Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.* *182*, 5836–5845.

## Bibliographie

---

- Flint, J., Panchal, S., Hurrell, A., van de Venne, M., Gayed, M., Schreiber, K., Arthanari, S., Cunningham, J., Flanders, L., Moore, L., et al. (2016). BSR and BHPR guideline on prescribing drugs in pregnancy and breastfeeding—Part I: standard and biologic disease modifying anti-rheumatic drugs and corticosteroids. *Rheumatology* 55, 1693–1697.
- Flutter, B., and Nestle, F.O. (2013). TLRs to cytokines: Mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. *Eur. J. Immunol.* 43, 3138–3146.
- Fontalba, A., Martinez-Taboada, V., Gutierrez, O., Pipaon, C., Benito, N., Balsa, A., Blanco, R., and Fernandez-Luna, J.L. (2007). Deficiency of the NF- $\kappa$ B Inhibitor Caspase Activating and Recruitment Domain 8 in Patients with Rheumatoid Arthritis Is Associated with Disease Severity. *J. Immunol.* 179, 4867–4873.
- Ford, J.W., and McVicar, D.W. (2009). TREM and TREM-like Receptors in Inflammation and Disease. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 38–46.
- Forestier, J. (1932). THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS WITH GOLD SALTS INJECTIONS. *The Lancet* 219, 441–444.
- Fosbrink, M., Niculescu, F., and Rus, H. (2005). The role of C5b-9 terminal complement complex in activation of the cell cycle and transcription. *Immunol. Res.* 31, 37–46.
- Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al Badine, R., Méchin, M.-C., Vincent, C., Nachat, R., Yamada, M., Takahara, H., et al. (2007). Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum.* 56, 3541–3553.
- Frchet, P., Tacnet-Delorme, P., and Thielens, C.G. and N.M. (2015). Role of C1q in Efferocytosis and Self-Tolerance — Links With Autoimmunity. *Autoimmun. - Pathog. Clin. Asp. Ther. Specif. Autoimmune Dis.*
- Franchi, L., Eigenbrod, T., and Núñez, G. (2009). TNF- $\alpha$  Mediate Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 792–796.
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., and Núñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes.
- François, M., Cabec, V.L., Dupont, M.-A., Sansonetti, P.J., and Maridonneau-Parini, I. (2000). Induction of Necrosis in Human Neutrophils by *Shigella flexneri* Requires Type III Secretion, IpaB and IpaC Invasins, and Actin Polymerization. *Infect. Immun.* 68, 1289–1296.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Bayuh, R., Worthen, G.S., et al. (2012). Transcriptomic Analysis Comparing Tumor-Associated Neutrophils with Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells and Normal Neutrophils. *PLoS ONE* 7.

## Bibliographie

---

- Friggeri, A., Banerjee, S., Biswas, S., de Freitas, A., Liu, G., Bierhaus, A., and Abraham, E. (2011). Participation of the Receptor for Advanced Glycation End-products in Efferocytosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 6191–6198.
- Frisell, T., Holmqvist, M., Källberg, H., Klareskog, L., Alfredsson, L., and Askling, J. (2013). Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum.* *65*, 2773–2782.
- Fritz, G. (2011). RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 625–632.
- Fu, J., Lin, G., Zeng, B., Wu, Z., Wu, Y., Chu, H., Qin, G., Liang, G., Li, J., Gan, X., et al. (2006). Anti-ischemia/reperfusion of C1 inhibitor in myocardial cell injury via regulation of local myocardial C3 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *350*, 162–168.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* *176*, 231–241.
- Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Wroblewski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H., and Wagner, D.D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 15880–15885.
- Fugger, L., Michie, S.A., Rulifson, I., Lock, C.B., and McDevitt, G.S. (1994). Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region beta-chain T-cell repertoire and mediates an HLA-DR-restricted immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 6151–6155.
- Futosi, K., Fodor, S., and Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* *17*, 638–650.
- van Gaalen, F.A., Toes, R.E.M., Ditzel, H.J., Schaller, M., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., and Huizinga, T.W.J. (2004). Association of autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase with extraarticular complications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *50*, 395–399.
- Gabriel, S.E. (2001). THE EPIDEMIOLOGY OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *Rheum. Dis. Clin.* *27*, 269–281.
- Gabriel, C., McMaster, W.R., Girard, D., and Descoteaux, A. (2010). Leishmania donovani Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. *J. Immunol.* *185*, 4319–4327.
- Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A.V., and Cua, D.J. (2014). The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 585–600.
- Gaipl, U.S., Beyer, T.D., Heyder, P., Kuenkele, S., Böttcher, A., Voll, R.E., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2004). Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum.* *50*, 640–649.

## Bibliographie

---

- Gál, P., Dobó, J., Závodszy, P., and Sim, R.B.M. (2009). Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. *Mol. Immunol.* *46*, 2745–2752.
- Galkina, E., and Ley, K. (2009). Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 165–197.
- Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F.J., Zal, T., and Gilliet, M. (2009). Self-RNA–antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* *206*, 1983–1994.
- Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., et al. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* *3*, 73ra20.
- Garcia-Vallejo, J.J., and Kooyk, Y. van (2013). The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol.* *34*, 482–486.
- Garrod, A.E. (Archibald E. (1890). A treatise on rheumatism and rheumatoid arthritis (London, Griffin).
- Gasmi, L., McLENNAN, A.G., and Edwards, S.W. (1996). Regulation of neutrophil apoptosis by diadenosine pentaphosphate and GM-CSF. *Biochem. Soc. Trans.* *24*, 491S–491S.
- Gaspari, A.A. (2006). Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* *54*, S67–S80.
- Gaujoux-Viala, C., Nam, J., Ramiro, S., Landewé, R., Buch, M.H., Smolen, J.S., and Gossec, L. (2014). Efficacy of conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs, glucocorticoids and tofacitinib: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 510–515.
- Ge, J., Gong, Y.-N., Xu, Y., and Shao, F. (2012). Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a Legionella effector functioning in membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 6193–6198.
- Gennaro, R., Pozzan, T., and Romeo, D. (1984). Monitoring of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in C5a-stimulated neutrophils: loss of receptor-modulated Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> uptake in granule-free cytoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 1416–1420.
- Gentek, R., Molawi, K., and Sieweke, M.H. (2014). Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol. Rev.* *262*, 56–73.
- Germic, N., Stojkov, D., Oberson, K., Yousefi, S., and Simon, H.-U. (2017). Neither eosinophils nor neutrophils require ATG5-dependent autophagy for extracellular DNA trap formation. *Immunology* *152*, 517–525.
- Ghebrehiwet, B., and Peerschke, E.I.B. (1998). Structure and Function of gC1q-R: a Multiligand Binding Cellular Protein. *Immunobiology* *199*, 225–238.

## Bibliographie

---

- Ghebrehiwet, B., Silvestri, L., and McDevitt, C. (1984). Identification of the Raji cell membrane-derived C1q inhibitor as a receptor for human C1q. Purification and immunochemical characterization. *J. Exp. Med.* *160*, 1375–1389.
- Ghebrehiwet, B., Lim, B.L., Peerschke, E.I., Willis, A.C., and Reid, K.B. (1994). Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular “heads” of C1q. *J. Exp. Med.* *179*, 1809–1821.
- Ghebrehiwet, B., Lim, B.-L., Kumar, R., Feng, X., and Peerschke, E.I.B. (2001). gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol. Rev.* *180*, 65–77.
- Ghiran, I., Tyagi, S.-R., Klickstein, L.B., and Nicholson-Weller, A. (2002). Expression and function of C1q receptors and C1q binding proteins at the cell surface. *Immunobiology* *205*, 407–420.
- Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thürlimann, W., Burg, G., Nestle, F.O., and Dummer, R. (2004). Psoriasis Triggered by Toll-like Receptor 7 Agonist Imiquimod in the Presence of Dermal Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Arch. Dermatol.* *140*, 1490–1495.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 392–404.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* *330*, 841–845.
- Goekoop-Ruiterman, Y.P.M., De Vries-Bouwstra, J.K., Allaart, C.F., Van Zeben, D., Kerstens, P.J.S.M., Hazes, J.M.W., Zwinderman, A.H., Roodman, H.K., Han, K.H., Westedt, M.L., et al. (2005). Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): A randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* *52*, 3381–3390.
- Goh, F.G., and Midwood, K.S. (2012). Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *51*, 7–23.
- Gondokaryono, S.P., Ushio, H., Niyonsaba, F., Hara, M., Takenaka, H., Jayawardana, S.T.M., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2007). The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J. Leukoc. Biol.* *82*, 657–665.
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* *32*, 593–604.
- Gordy, C., Pua, H., Sempowski, G.D., and He, Y.-W. (2011). Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. *Blood* *117*, 618–629.
- Gosselin, E.J., Wardwell, K., Rigby, W.F., and Guyre, P.M. (1993). Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J. Immunol.* *151*, 1482–1490.



- Götestam Skorpen, C., Hoeltzenbein, M., Tincani, A., Fischer-Betz, R., Elefant, E., Chambers, C., da Silva, J., Nelson-Piercy, C., Cetin, I., Costedoat-Chalumeau, N., et al. (2016). The EULAR points to consider for use of antirheumatic drugs before pregnancy, and during pregnancy and lactation. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 795–810.
- Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.-L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* 47, 582-596.e6.
- Graudal, N.A., Homann, C., Madsen, H.O., Svejgaard, A., Jurik, A.G., Graudal, H.K., and Garred, P. (1998). Mannan binding lectin in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *J. Rheumatol.* 25, 629–635.
- Greenlee-Wacker, M.C. (2016). Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol. Rev.* 273, 357–370.
- Gregersen, P.K., and Behrens, T.W. (2006). Genetics of autoimmune diseases — disorders of immune homeostasis. *Nat. Rev. Genet.* 7, 917–928.
- Gregersen, P.K., and Olsson, L.M. (2009). Recent Advances in the Genetics of Autoimmune Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 363–391.
- Gregersen, P.K., Silver, J., and Winchester, R.J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30, 1205–1213.
- Gregory, A.D., and Houghton, A.M. (2011). Tumor-Associated Neutrophils: New Targets for Cancer Therapy. *Cancer Res.* 71, 2411–2416.
- Griffiths, R.J. (1992). Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions* 35, 88–95.
- Grinberg, S., Hasko, G., Wu, D., and Leibovich, S.J. (2009). Suppression of PLC $\beta$ 2 by Endotoxin Plays a Role in the Adenosine A2A Receptor-Mediated Switch of Macrophages from an Inflammatory to an Angiogenic Phenotype. *Am. J. Pathol.* 175, 2439–2453.
- Guan, Y., Ranao, D.R.E., Jiang, S., Mutha, S.K., Li, X., Baudry, J., and Tapping, R.I. (2010). Human TLRs 10 and 1 Share Common Mechanisms of Innate Immune Sensing but Not Signaling. *J. Immunol.* 184, 5094–5103.
- Guarda, G., Zenger, M., Yazdi, A.S., Schroder, K., Ferrero, I., Menu, P., Tardivel, A., Mattmann, C., and Tschopp, J. (2011). Differential Expression of NLRP3 among Hematopoietic Cells. *J. Immunol.* 186, 2529–2534.
- Guichard, C., Pedruzzi, E., Dewas, C., Fay, M., Pouzet, C., Bens, M., Vandewalle, A., Ogier-Denis, E., Gougerot-Pocidallo, M.-A., and Elbim, C. (2005). Interleukin-8-induced Priming of Neutrophil Oxidative Burst Requires Sequential Recruitment of NADPH Oxidase Components into Lipid Rafts. *J. Biol. Chem.* 280, 37021–37032.
- Guiducci, C., Gong, M., Xu, Z., Gill, M., Chaussabel, D., Meeker, T., Chan, J.H., Wright, T., Punaro, M., Bolland, S., et al. (2010). TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* 465, 937–941.

## Bibliographie

---

- Guimarães-Costa, A.B., Nascimento, M.T.C., Wardini, A.B., Pinto-da-Silva, L.H., and Saraiva, E.M. (2012). ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J. Parasitol. Res.* 2012.
- Guimarães-Costa, A.B., Rochael, N.C., Oliveira, F., Echevarria-Lima, J., and Saraiva, E.M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps Reprogram IL-4/GM-CSF-Induced Monocyte Differentiation to Anti-inflammatory Macrophages. *Front. Immunol.* 8.
- Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P.-Y. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 21, 677–687.
- György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A., and Buzás, E.I. (2006). Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1662–1677.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Müller, T., Latz, E., and Wagner, H. (2008). The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 28, 315–323.
- Hacbarth, E., and Kajdacsy-Balla, A. (1986). Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* 29, 1334–1342.
- Häger, M., Cowland, J.B., and Borregaard, N. (2010). Neutrophil granules in health and disease. *J. Intern. Med.* 268, 25–34.
- Hahn, G., Stuhlmüller, B., Hain, N., Kalden, J.R., Pfizenmaier, K., and Burmester, G.R. (1993). Modulation of monocyte activation in patients with rheumatoid arthritis by leukapheresis therapy. *J. Clin. Invest.* 91, 862–870.
- Hakkim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., and Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9813–9818.
- Hakkim, A., Fuchs, T.A., Martinez, N.E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., and Waldmann, H. (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 7, 75–77.
- Hallett, M.B., and Lloyds, D. (1995). Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green.' *Immunol. Today* 16, 264–268.
- Halverson, T.W.R., Wilton, M., Poon, K.K.H., Petri, B., and Lewenza, S. (2015). DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathog.* 11.
- Hamza, B., Wong, E., Patel, S., Cho, H., Martel, J., and Irimia, D. (2014). Retrotaxis of Human Neutrophils during Mechanical Confinement inside Microfluidic Channels. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* 6, 175–183.
- Hari, A., Flach, T.L., Shi, Y., and Mydlarski, P.R. (2010). Toll-Like Receptors: Role in Dermatological Disease. *Mediators Inflamm.* 2010.

- Harpel, P.C., and Cooper, N.R. (1975). Studies on human plasma C1 inactivator-enzyme interactions. I. Mechanisms of interaction with C1s, plasmin, and trypsin. *J. Clin. Invest.* *55*, 593–604.
- Harre, U., Georgess, D., Bang, H., Bozec, A., Axmann, R., Ossipova, E., Jakobsson, P.-J., Baum, W., Nimmerjahn, F., Szarka, E., et al. (2012). Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* *122*, 1791–1802.
- Hartl, D., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Hordijk, P.L., Kuijpers, T.W., Hoffmann, F., Hector, A., Eber, E., Marcos, V., Bittmann, I., et al. (2008). Infiltrated Neutrophils Acquire Novel Chemokine Receptor Expression and Chemokine Responsiveness in Chronic Inflammatory Lung Diseases. *J. Immunol.* *181*, 8053–8067.
- Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Brière, F., Vlach, J., Lebecque, S., et al. (2005). Human TLR10 Is a Functional Receptor, Expressed by B Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells, Which Activates Gene Transcription through MyD88. *J. Immunol.* *174*, 2942–2950.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269–279.
- Haslett, C., Savill, J.S., Whyte, M.K., Stern, M., Dransfield, I., and Meagher, L.C. (1994). Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *345*, 327–333.
- Hawes, M., Allen, C., Turgeon, B.G., Curlango-Rivera, G., Minh Tran, T., Huskey, D.A., and Xiong, Z. (2016). Root Border Cells and Their Role in Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* *54*, 143–161.
- Hay, F.C., Nineham, L.J., Perumal, R., and Roitt, I.M. (1979). Intra-articular and circulating immune complexes and antiglobulins (IgG and IgM) in rheumatoid arthritis; correlation with clinical features. *Ann. Rheum. Dis.* *38*, 1–7.
- Hayashi, F., Means, T.K., and Luster, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* *102*, 2660–2669.
- Hazen, S.L., Hsu, F.F., Mueller, D.M., Crowley, J.R., and Heinecke, J.W. (1996). Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J. Clin. Invest.* *98*, 1283–1289.
- He, M., Kubo, H., Morimoto, K., Fujino, N., Suzuki, T., Takahashi, T., Yamada, M., Yamaya, M., Maekawa, T., Yamamoto, Y., et al. (2011). Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep.* *12*, 358–364.
- Headland, S.E., Jones, H.R., Norling, L.V., Kim, A., Souza, P.R., Corsiero, E., Gil, C.D., Nerviani, A., Dell’Accio, F., Pitzalis, C., et al. (2015). Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci. Transl. Med.* *7*, 315ra190.

## Bibliographie

---

- Hecker, E., Kubinyi, H., Bresch, H., and von Szczepanski, C. (1966). The chemical structure of a cocarcinogen and of phorbol isolated from croton oil. *J. Med. Chem.* 9, 246–247.
- Hegen, M., Keith, J.C., Collins, M., and Nickerson-Nutter, C.L. (2008). Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 1505–1515.
- Heijde, D.V.D., Riel, P.V., Gribnau, F., Nuver-Zwart, I., and Putte, L.V.D. (1989). EFFECTS OF HYDROXYCHLOROQUINE AND SULPHASALAZINE ON PROGRESSION OF JOINT DAMAGE IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *The Lancet* 333, 1036–1038.
- van der Helm-van Mil, A.H., Verpoort, K.N., Breedveld, F.C., Toes, R.E., and Huizinga, T.W. (2005). Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7, R949.
- Hemmers, S., Teijaro, J.R., Arandjelovic, S., and Mowen, K.A. (2011). PAD4-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Not Required for Immunity against Influenza Infection. *PLOS ONE* 6, e22043.
- Herenius, M.M.J., Thurlings, R.M., Wijbrandts, C.A., Bennink, R.J., Dohmen, S.E., Voermans, C., Wouters, D., Izmailova, E.S., Gerlag, D.M., van Eck-Smit, B.L.F., et al. (2011). Monocyte migration to the synovium in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1160–1162.
- Herman, S., Fischer, A., Pfatschbacher, J., Hoffmann, M., and Steiner, G. (2011). A TLR 9 antagonist diminishes arthritis severity in a rat model of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, A39–A39.
- Herz, J., and Strickland, D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* 108, 779–784.
- Hietala, M.A., Jonsson, I.-M., Tarkowski, A., Kleinau, S., and Pekna, M. (2002). Complement Deficiency Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Mice. *J. Immunol.* 169, 454–459.
- Hietala, M.A., Nandakumar, K.S., Persson, L., Fahlén, S., Holmdahl, R., and Pekna, M. (2004). Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. *Eur. J. Immunol.* 34, 1208–1216.
- Hill, J.A., Bell, D.A., Brintnell, W., Yue, D., Wehrli, B., Jevnikar, A.M., Lee, D.M., Hueber, W., Robinson, W.H., and Cairns, E. (2008). Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J. Exp. Med.* 205, 967–979.
- Hillmen, P., Young, N.S., Schubert, J., Brodsky, R.A., Socié, G., Muus, P., Röth, A., Szer, J., Elebute, M.O., Nakamura, R., et al. (2006). The Complement Inhibitor Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 355, 1233–1243.
- Hitomi, Y., Ebisawa, M., Tomikawa, M., Imai, T., Komata, T., Hirota, T., Harada, M., Sakashita, M., Suzuki, Y., Shimojo, N., et al. (2009). Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 779–785.e6.

- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* *209*, 1167–1181.
- Hoffman, S.J., Polack, F.P., Hauer, D.A., and Griffin, D.E. (2003). Measles Virus Infection of Rhesus Macaques Affects Neutrophil Expression of IL-12 and IL-10. *Viral Immunol.* *16*, 369–379.
- Hoffmann, M.H., Bruns, H., Bäckdahl, L., Neregård, P., Niederreiter, B., Herrmann, M., Catrina, A.I., Agerberth, B., and Holmdahl, R. (2013). The cathelicidins LL-37 and rCRAMP are associated with pathogenic events of arthritis in humans and rats. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 1239–1248.
- Høgåsen, K., Mollnes, T.E., Harboe, M., Götze, O., Hammer, H.B., and Oppermann, M. (1995). Terminal complement pathway activation and low lysis inhibitors in rheumatoid arthritis synovial fluid. *J. Rheumatol.* *22*, 24–28.
- Hogg, N., Palmer, D.G., and Revell, P.A. (1985). Mononuclear phagocytes of normal and rheumatoid synovial membrane identified by monoclonal antibodies. *Immunology* *56*, 673–681.
- Holers, V.M. (2013). Autoimmunity to Citrullinated Proteins and the Initiation of Rheumatoid Arthritis. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 728–735.
- Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, E., Rubin, K., and Klareskog, L. (1986). Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* *29*, 106–113.
- Holmdahl, R., Jonsson, R., Larsson, P., and Klareskog, L. (1988). Early appearance of activated CD4+ T lymphocytes and class II antigen-expressing cells in joints of DBA/1 mice immunized with type II collagen. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *58*, 53–60.
- Holmdahl, R., Andersson, E.C., Andersen, C.B., Svejgaard, A., and Fugger, L. (1999). Transgenic mouse models of rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* *169*, 161–173.
- Honda, K., and Littman, D.R. (2012). The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 759–795.
- Hoovestol, R.A., and Mikuls, T.R. (2011). Environmental exposures and rheumatoid arthritis risk. *Curr. Rheumatol. Rep.* *13*, 431–439.
- Hoshino, A., Nagao, T., Nagi-Miura, N., Ohno, N., Yasuhara, M., Yamamoto, K., Nakayama, T., and Suzuki, K. (2008). MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via its Fc region- and complement-dependent manner. *J. Autoimmun.* *31*, 79–89.
- Hosszu, K.K., Valentino, A., Vinayagasundaram, U., Vinayagasundaram, R., Joyce, M.G., Ji, Y., Peerschke, E.I.B., and Ghebrehiwet, B. (2012). DC-SIGN, C1q, and gC1qR form a trimolecular receptor complex on the surface of monocyte-derived immature dendritic cells. *Blood* *120*, 1228–1236.

## Bibliographie

---

- Hot, A., and Miossec, P. (2011). Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 727–732.
- Hu, F., Mu, R., Zhu, J., Shi, L., Li, Y., Liu, X., Shao, W., Li, G., Li, M., Su, Y., et al. (2014a). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  provoke toll-like receptor signalling-induced inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 928–936.
- Hu, S.C.-S., Yu, H.-S., Yen, F.-L., Lin, C.-L., Chen, G.-S., and Lan, C.-C.E. (2016). Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human  $\beta$ -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Sci. Rep.* 6, 31119.
- Hu, X., Chakravarty, S.D., and Ivashkiv, L.B. (2008). Regulation of IFN and TLR Signaling During Macrophage Activation by Opposing Feedforward and Feedback Inhibition Mechanisms. *Immunol. Rev.* 226, 41–56.
- Hu, Z., Murakami, T., Suzuki, K., Tamura, H., Kuwahara-Arai, K., Iba, T., and Nagaoka, I. (2014b). Antimicrobial Cathelicidin Peptide LL-37 Inhibits the LPS/ATP-Induced Pyroptosis of Macrophages by Dual Mechanism. *PLoS ONE* 9.
- Hu, Z., Murakami, T., Tamura, H., Reich, J., Kuwahara-Arai, K., Iba, T., Tabe, Y., and Nagaoka, I. (2017). Neutrophil extracellular traps induce IL-1 $\beta$  production by macrophages in combination with lipopolysaccharide. *Int. J. Mol. Med.* 39, 549–558.
- Hua, S., Dias, T.H., Pepperall, D.-G., and Yang, Y. (2017). Topical Loperamide-Encapsulated Liposomal Gel Increases the Severity of Inflammation and Accelerates Disease Progression in the Adjuvant-Induced Model of Experimental Rheumatoid Arthritis. *Front. Pharmacol.* 8.
- Huang, Q.-Q., and Pope, R.M. (2009). The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 11, 357–364.
- Huang, H., Evankovich, J., Yan, W., Nace, G., Zhang, L., Ross, M., Liao, X., Billiar, T., Xu, J., Esmon, C.T., et al. (2011). Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology* 54, 999–1008.
- Huang, H., Chen, H.-W., Evankovich, J., Yan, W., Rosborough, B.R., Nace, G.W., Ding, Q., Loughran, P., Beer-Stolz, D., Billiar, T.R., et al. (2013). Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J. Immunol.* 191, 2665–2679.
- Huang, Q., Ma, Y., Adebayo, A., and Pope, R.M. (2007). Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 2192–2201.
- Hughes, J., Johnson, R.J., Mooney, A., Hugo, C., Gordon, K., and Savill, J. (1997). Neutrophil fate in experimental glomerular capillary injury in the rat. Emigration exceeds in situ clearance by apoptosis. *Am. J. Pathol.* 150, 223–234.
- Ikari, K., Kuwahara, M., Nakamura, T., Momohara, S., Hara, M., Yamanaka, H., Tomatsu, T., and Kamatani, N. (2005). Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: A replication study. *Arthritis Rheum.* 52, 3054–3057.

- Iking-Konert, C., Csekö, C., Wagner, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., and Hänsch, G.M. (2001a). Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *79*, 464–474.
- Iking-Konert, C., Vogt, S., Radsak, M., Wagner, C., Hänsch, G.M., and Andrassy, K. (2001b). Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Int.* *60*, 2247–2262.
- Iking-Konert, C., Ostendorf, B., Sander, O., Jost, M., Wagner, C., Joosten, L., Schneider, M., and Hänsch, G.M. (2005). Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1436–1442.
- Ip, W.K., Lau, Y.L., Chan, S.Y., Mok, C.C., Chan, D., Tong, K.K., and Lau, C.S. (2000). Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in Southern Chinese. *Arthritis Rheum.* *43*, 1679–1687.
- Iwahashi, M., Yamamura, M., Aita, T., Okamoto, A., Ueno, A., Ogawa, N., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P.J., and Makino, H. (2004). Expression of toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *50*, 1457–1467.
- Iyer, S.S., Pulskens, W.P., Sadler, J.J., Butter, L.M., Teske, G.J., Ulland, T.K., Eisenbarth, S.C., Florquin, S., Flavell, R.A., Leemans, J.C., et al. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20388–20393.
- Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., Lienenklaus, S., and Weiss, S. (2010). Neutrophils responsive to endogenous IFN- $\beta$  regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J. Clin. Invest.* *120*, 1151–1164.
- Jacquet, M., Lacroix, M., Ancelet, S., Gout, E., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., and Rossi, V. (2013). Deciphering Complement Receptor Type 1 Interactions with Recognition Proteins of the Lectin Complement Pathway. *J. Immunol.* *190*, 3721–3731.
- Jaillon, S., Peri, G., Delneste, Y., Frémaux, I., Doni, A., Moalli, F., Garlanda, C., Romani, L., Gascan, H., Bellocchio, S., et al. (2007). The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J. Exp. Med.* *204*, 793–804.
- Jakobs, C., Perner, S., and Hornung, V. (2015). AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *PLoS ONE* *10*.
- Janeway, null, and Medzhitov, null (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol.* *10*, 349–350.
- Janeway, C.A., Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2009). *Immunobiologie* (De Boeck Supérieur).
- Jankowski, A., Scott, C.C., and Grinstein, S. (2002). Determinants of the Phagosomal pH in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* *277*, 6059–6066.

## Bibliographie

---

- Jarvis, J.N., Iobidze, M., Taylor, H., Dejonge, J., and Chang, S. (1993). A Comparison of Immunoglobulin G-Containing High-Molecular-Weight Complexes Isolated from Children with Juvenile Rheumatoid Arthritis and Congenital Human Immunodeficiency Virus Infection. *Pediatr. Res.* 34, 781–784.
- Jawaheer, D., Seldin, M.F., Amos, C.I., Chen, W.V., Shigeta, R., Monteiro, J., Kern, M., Criswell, L.A., Albani, S., Nelson, J.L., et al. (2001). A Genomewide Screen in Multiplex Rheumatoid Arthritis Families Suggests Genetic Overlap with Other Autoimmune Diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 927–936.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., and Allen, J.E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. *Science* 332, 1284–1288.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Thomas, G.D., Hewitson, J.P., Duncan, S., Brombacher, F., Maizels, R.M., Hume, D.A., and Allen, J.E. (2013). IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J. Exp. Med.* 210, 2477–2491.
- Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D.M., Hofhuis, F.M.A., Boackle, S.A., Takahashi, K., Holers, V.M., Walport, M., Gerard, C., et al. (2002). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16, 157–168.
- Jiang, H., Cooper, B., Robey, F.A., and Gewurz, H. (1992). DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J. Biol. Chem.* 267, 25597–25601.
- Jiao, J., Dragomir, A.-C., Kocabayoglu, P., Rahman, A.H., Chow, A., Hashimoto, D., Leboeuf, M., Kraus, T., Moran, T., Carrasco-Avino, G., et al. (2014). Central Role of Conventional Dendritic Cells in Regulation of Bone Marrow Release and Survival of Neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 3374–3382.
- Jiménez-Alcázar, M., Rangaswamy, C., Panda, R., Bitterling, J., Simsek, Y.J., Long, A.T., Bilyy, R., Krenn, V., Renné, C., Renné, T., et al. (2017). Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* 358, 1202–1206.
- Jin, T., Perry, A., Jiang, J., Smith, P., Curry, J.A., Unterholzner, L., Jiang, Z., Horvath, G., Rathinam, V., Johnstone, R.W., et al. (2012). Structures of The HIN Domain:DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of The AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor. *Immunity* 36, 561–571.
- Jin, T., Perry, A., Smith, P., Jiang, J., and Xiao, T.S. (2013). Structure of the Absent in Melanoma 2 (AIM2) Pyrin Domain Provides Insights into the Mechanisms of AIM2 Autoinhibition and Inflammasome Assembly. *J. Biol. Chem.* 288, 13225–13235.
- Johansson, J., Gudmundsson, G.H., Rottenberg, M.E., Berndt, K.D., and Agerberth, B. (1998). Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* 273, 3718–3724.
- Jones, J., Causey, C., Knuckley, B., Slack-Noyes, J.L., and Thompson, P.R. (2009). Protein arginine deiminase 4 (PAD4): current understanding and future therapeutic potential. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 616–627.



- Jongbloed, S.L., Lebre, M.C., Fraser, A.R., Gracie, J.A., Sturrock, R.D., Tak, P.P., and McInnes, I.B. (2006). Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8, R15.
- Joosten, L.A., Helsen, M.M., Saxne, T., van De Loo, F.A., Heinegard, D., and van Den Berg, W.B. (1999). IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J. Immunol.* 163, 5049–5055.
- Joosten, L.A.B., Koenders, M.I., Smeets, R.L., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M.M.A., Takeda, K., Akira, S., Lubberts, E., van de Loo, F.A.J., and van den Berg, W.B. (2003). Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 6145–6153.
- Jose, P.J., Moss, I.K., Maini, R.N., and Williams, T.J. (1990). Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase. *Ann. Rheum. Dis.* 49, 747–752.
- Josimovits, O., Osawa, H., and Dlamantstein, T. (1985). The Mode of Action of the Calcium Ionophore A23187 on T Cell Proliferation.: I. The Ionophore does not Replace Lymphokines but Acts via Induction of IL-2 Production on IL-2 Responsive Cells. *Immunobiology* 170, 164–174.
- Jung, Y.O., Cho, M.-L., Kang, C.-M., Jhun, J.-Y., Park, J.-S., Oh, H.-J., Min, J.-K., Park, S.-H., and Kim, H.-Y. (2007). Toll-like receptor 2 and 4 combination engagement upregulate IL-15 synergistically in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol. Lett.* 109, 21–27.
- Kahlenberg, J.M., and Dubyak, G.R. (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 286, C1100–C1108.
- Kahlenberg, J.M., and Kaplan, M.J. (2013). Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191.
- Kahlenberg, J.M., Carmona-Rivera, C., Smith, C.K., and Kaplan, M.J. (2013). Neutrophil Extracellular Trap-Associated Protein Activation of the NLRP3 Inflammasome Is Enhanced in Lupus Macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 1217–1226.
- Kaisho, T., and Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 979–987.
- Kakimoto, K., Kojima, Y., Ishii, K., Onoue, K., and Maeda, H. (1993). The suppressive effect of gelatin-conjugated superoxide dismutase on disease development and severity of collagen-induced arthritis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 94, 241–246.
- Källberg, H., Ding, B., Padyukov, L., Bengtsson, C., Rönnelid, J., Klareskog, L., and Alfredsson, L. (2011). Smoking is a major preventable risk factor for Rheumatoid arthritis Estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 508–511.
- Kanik, K.S., Yarboro, C.H., Naparstek, Y., Plotz, P.H., and Wilder, R.L. (1996). Failure of low-dose intravenous immunoglobulin therapy to suppress disease activity in patients with treatment-refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39, 1027–1029.

- Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. *Immunity* 27, 549–559.
- Kaplan, G. (1977). Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand. J. Immunol.* 6, 797–807.
- Karlson, E.W., Mandl, L.A., Hankinson, S.E., and Grodstein, F. (2004). Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum.* 50, 3458–3467.
- Kastbom, A., Verma, D., Eriksson, P., Skogh, T., Wingren, G., and Söderkvist, P. (2008). Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (The Swedish TIRA project). *Rheumatology* 47, 415–417.
- Kastbom, A., Ärlestig, L., and Rantapää-Dahlqvist, S. (2015). Genetic Variants of the NLRP3 Inflammasome Are Associated with Stroke in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 42, 1740–1745.
- Kasten, K.R., Muenzer, J.T., and Caldwell, C.C. (2010). Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 28–31.
- Kaur, H., and Halliwell, B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* 350, 9–12.
- Kay, J., and Calabrese, L. (2004). The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 43, iii2–iii9.
- Kearney, P.L., Bhatia, M., Jones, N.G., Yuan, L., Glascock, M.C., Catchings, K.L., Yamada, M., and Thompson, P.R. (2005). Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 10570–10582.
- Keenan, B.T., Chibnik, L.B., Cui, J., Ding, B., Padyukov, L., Kallberg, H., Bengtsson, C., Klareskog, L., Alfredsson, L., and Karlson, E.W. (2010). Effect of Glutathione S-Transferase T1, M1, P1 and Heme Oxygenase-1 Polymorphisms Interactions with Heavy Smoking on the Risk of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 3196–3210.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., and Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10, 4025–4031.
- Kemp, P.A., Spragg, J.H., Brown, J.C., Morgan, B.P., Gunn, C.A., and Taylor, P.W. (1992). Immunohistochemical determination of complement activation in joint tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis using neoantigen-specific monoclonal antibodies. *J. Clin. Lab. Immunol.* 37, 147–162.
- Kennedy, A., Fearon, U., Veale, D.J., and Godson, C. (2011). Macrophages in Synovial Inflammation. *Front. Immunol.* 2.

- Kennedy Adam D., Willment Janet A., Dorward David W., Williams David L., Brown Gordon D., and DeLeo Frank R. (2007). Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* *37*, 467–478.
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemärck, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Gröne, H.-J., Brinkmann, V., and Jenne, D.E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* *15*, 623–625.
- Keyßer, G., and Schäfer, C. (2018). Die Rheumatoide Arthritis. *MMW - Fortschritte Med.* *160*, 50–58.
- Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., et al. (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* *5*, 178ra40.
- Khraishi, M.M., and Singh, G. (1996). The role of anti-malarials in rheumatoid arthritis--the American experience. *Lupus 5 Suppl 1*, S41-44.
- Kilding, R., Akil, M., Till, S., Amos, R., Winfield, J., Iles, M.M., and Wilson, A.G. (2003). A biologically important single nucleotide polymorphism within the toll-like receptor-4 gene is not associated with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *21*, 340–342.
- Kilgore, K.S., Flory, C.M., Miller, B.F., Evans, V.M., and Warren, J.S. (1996). The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Pathol.* *149*, 953–961.
- Killeen, N., Sawada, S., and Littman, D.R. (1993). Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4. *EMBO J.* *12*, 1547–1553.
- Kilpatrick, D.C. (2002). Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1572*, 401–413.
- Kilsgård, O., Andersson, P., Malmsten, M., Nordin, S.L., Linge, H.M., Eliasson, M., Sörenson, E., Erjefält, J.S., Bylund, J., Olin, A.I., et al. (2012). Peptidylarginine deiminases present in the airways during tobacco smoking and inflammation can citrullinate the host defense peptide LL-37, resulting in altered activities. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *46*, 240–248.
- Kim, D.D., and Song, W.-C. (2006). Membrane complement regulatory proteins. *Clin. Immunol.* *118*, 127–136.
- Kim, H.K., Sierra, M.D.L.L., Williams, C.K., Gulino, A.V., and Tosato, G. (2006). G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* *108*, 812–820.
- Kim, K.-W., Cho, M.-L., Lee, S.-H., Oh, H.-J., Kang, C.-M., Ju, J.H., Min, S.-Y., Cho, Y.-G., Park, S.-H., and Kim, H.-Y. (2007). Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation. *Immunol. Lett.* *110*, 54–64.

## Bibliographie

---

- Kim, K.-W., Cho, M.-L., Oh, H.-J., Kim, H.-R., Kang, C.-M., Heo, Y.-M., Lee, S.-H., and Kim, H.-Y. (2009). TLR-3 enhances osteoclastogenesis through upregulation of RANKL expression from fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* *124*, 9–17.
- Kim, M.-G., Kim, S.C., Ko, Y.S., Lee, H.Y., Jo, S.-K., and Cho, W. (2015). The Role of M2 Macrophages in the Progression of Chronic Kidney Disease following Acute Kidney Injury. *PLoS ONE* *10*.
- Kim, S., Bauernfeind, F., Ablasser, A., Hartmann, G., Fitzgerald, K.A., Latz, E., and Hornung, V. (2010). *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 Inflammasome. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1545–1551.
- Kinloch, A., Tatzer, V., Wait, R., Peston, D., Lundberg, K., Donatien, P., Moyes, D., Taylor, P.C., and Venables, P.J. (2005). Identification of citrullinated  $\alpha$ -enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *7*, R1421–R1429.
- Kinloch, A.J., Alzabin, S., Brintnell, W., Wilson, E., Barra, L., Wegner, N., Bell, D.A., Cairns, E., and Venables, P.J. (2011). Immunization with *Porphyromonas gingivalis* enolase induces autoimmunity to mammalian  $\alpha$ -enolase and arthritis in DR4-IE-transgenic mice. *Arthritis Rheum.* *63*, 3818–3823.
- Kinne, R.W., Schmidt-Weber, C.B., Hoppe, R., Buchner, E., Palombo-Kinne, E., Nürnberg, E., and Emmrich, F. (1995). Long-term amelioration of rat adjuvant arthritis following systemic elimination of macrophages by clodronate-containing liposomes. *Arthritis Rheum.* *38*, 1777–1790.
- Kinne, R.W., Bräuer, R., Stuhlmüller, B., Palombo-Kinne, E., and Burmester, G.-R. (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* *2*, 189–202.
- Kinne, R.W., Stuhlmüller, B., and Burmester, G.-R. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Macrophages. Arthritis Res. Ther.* *9*, 224.
- Kirschfink, M. (2002). C1-Inhibitor and Transplantation. *Immunobiology* *205*, 534–541.
- Kirwan, J.R., Arthritis, the, and Group, R.C.L.-D.G.S. (1995). The Effect of Glucocorticoids on Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* *333*, 142–147.
- Klareskog, L., Heijde, D. van der, Jager, J.P. de, Gough, A., Kalden, J., Malaise, M., Mola, E.M., Pavelka, K., Sany, J., Settas, L., et al. (2004). Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *The Lancet* *363*, 675–681.
- Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Harris, H.E., Ulfgren, A.-K., Rantapää-Dahlqvist, S., et al. (2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* *54*, 38–46.
- Klareskog, L., Catrina, A.I., and Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. *Lancet* *373*, 659–672.
- Klein, K., Ospelt, C., and Gay, S. (2012). Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *14*, 227.

- Kleyer, A., Finzel, S., Rech, J., Manger, B., Krieter, M., Faustini, F., Araujo, E., Hueber, A.J., Harre, U., Engelke, K., et al. (2014). Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 854–860.
- Klickstein, L.B., Barbashov, S.F., Liu, T., Jack, R.M., and Nicholson-Weller, A. (1997). Complement Receptor Type 1 (CR1, CD35) Is a Receptor for C1q. *Immunity* *7*, 345–355.
- Klopfleisch, R. (2016). Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model – Phenotypes, functions and markers. *Acta Biomater.* *43*, 3–13.
- Knight, J.S., Zhao, W., Luo, W., Subramanian, V., O’Dell, A.A., Yalavarthi, S., Hodgins, J.B., Eitzman, D.T., Thompson, P.R., and Kaplan, M.J. (2013). Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J. Clin. Invest.* *123*, 2981–2993.
- Knight, J.S., Luo, W., O’Dell, A.A., Yalavarthi, S., Zhao, W., Subramanian, V., Guo, C., Grenn, R.C., Thompson, P.R., Eitzman, D.T., et al. (2014). Peptidylarginine Deiminase Inhibition Reduces Vascular Damage and Modulates Innate Immune Responses in Murine Models of Atherosclerosis. *Circ. Res.* *114*, 947–956.
- Knuckley, B., Causey, C.P., Jones, J.E., Bhatia, M., Dreyton, C.J., Osborne, T.C., Takahara, H., and Thompson, P.R. (2010). Substrate Specificity and Kinetic Studies of PADs 1, 3, and 4 Identify Potent and Selective Inhibitors of Protein Arginine Deiminase 3. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 4852–4863.
- Köhl, J. (2006). Drug evaluation: the C5a receptor antagonist PMX-53. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *8*, 529–538.
- Köhler, A., Filippo, K.D., Hasenberg, M., Brandt, C. van den, Nye, E., Hosking, M.P., Lane, T.E., Männ, L., Ransohoff, R.M., Hauser, A.E., et al. (2011). G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* *117*, 4349–4357.
- Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 159–175.
- Kolaczowska, E., Jenne, C.N., Surewaard, B.G.J., Thanabalasuriar, A., Lee, W.-Y., Sanz, M.-J., Mowen, K., Opdenakker, G., and Kubes, P. (2015). Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat. Commun.* *6*.
- Konig, M.F., and Andrade, F. (2016). A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination. *Front. Immunol.* *7*.
- Konig, M.F., Abusleme, L., Reinholdt, J., Palmer, R.J., Teles, R.P., Sampson, K., Rosen, A., Nigrovic, P.A., Sokolove, J., Giles, J.T., et al. (2016). Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* *8*, 369ra176.

- Konttinen, Y.T., Ceponis, A., Meri, S., Vuorikoski, A., Kortekangas, P., Sorsa, T., Sukura, A., and Santavirta, S. (1996). Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. *Ann. Rheum. Dis.* *55*, 888–894.
- Korganow, A.-S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.-L., et al. (1999). From Systemic T Cell Self-Reactivity to Organ-Specific Autoimmune Disease via Immunoglobulins. *Immunity* *10*, 451–461.
- Kourilovitch, M., Galarza-Maldonado, C., and Ortiz-Prado, E. (2014). Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* *48–49*, 26–30.
- Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* *87*, 811–822.
- Krause, M.L., Amin, S., and Makol, A. (2014). Use of DMARDs and biologics during pregnancy and lactation in rheumatoid arthritis: what the rheumatologist needs to know. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* *6*, 169–184.
- Kremer, J.M., Westhovens, R., Leon, M., Di Giorgio, E., Alten, R., Steinfeld, S., Russell, A., Dougados, M., Emery, P., Nuamah, I.F., et al. (2003). Treatment of Rheumatoid Arthritis by Selective Inhibition of T-Cell Activation with Fusion Protein CTLA4Ig. *N. Engl. J. Med.* *349*, 1907–1915.
- Kuijpers, T., and Lutter, R. (2012). Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 7–15.
- Kumar, S.V.R., Kulkarni, O.P., Mulay, S.R., Darisipudi, M.N., Romoli, S., Thomasova, D., Scherbaum, C.R., Hohenstein, B., Hugo, C., Müller, S., et al. (2015). Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* *26*, 2399–2413.
- Kurosaka, K., Chen, Q., Yarovinsky, F., Oppenheim, J.J., and Yang, D. (2005). Mouse Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Chemoattracts Leukocytes Using Formyl Peptide Receptor-Like 1/Mouse Formyl Peptide Receptor-Like 2 as the Receptor and Acts as an Immune Adjuvant. *J. Immunol.* *174*, 6257–6265.
- Kuznik, A., Bencina, M., Svajger, U., Jeras, M., Rozman, B., and Jerala, R. (2011). Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 4794–4804.
- Kyburz, D., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Gay, R.E., Carson, D.A., and Gay, S. (2003). Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling. *Arthritis Rheum.* *48*, 642–650.
- Labasi, J.M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M.M., Brissette, W., Wicks, J.R., Audoly, L., and Gabel, C.A. (2002). Absence of the P2X7 Receptor Alters Leukocyte Function and Attenuates an Inflammatory Response. *J. Immunol.* *168*, 6436–6445.
- Lahti, M., Heino, J., and Käpylä, J. (2013). Leukocyte integrins  $\alpha$ L $\beta$ 2,  $\alpha$ M $\beta$ 2 and  $\alpha$ X $\beta$ 2 as collagen receptors—Receptor activation and recognition of GFOGER motif. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1204–1211.

## Bibliographie

---

- Lai, Y., Adhikarakunnathu, S., Bhardwaj, K., Ranjith-Kumar, C.T., Wen, Y., Jordan, J.L., Wu, L.H., Dragnea, B., Mateo, L.S., and Kao, C.C. (2011). LL37 and Cationic Peptides Enhance TLR3 Signaling by Viral Double-stranded RNAs. *PLoS ONE* 6.
- Lally, F., Smith, E., Filer, A., Stone, M.A., Shaw, J.S., Nash, G.B., Buckley, C.D., and Rainger, G.E. (2005). A Novel Mechanism of Neutrophil Recruitment in a Coculture Model of the Rheumatoid Synovium. *Arthritis Rheum.* 52, 3460–3469.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189.
- Lämmermann, T., Afonso, P.V., Angermann, B.R., Wang, J.M., Kastenmüller, W., Parent, C.A., and Germain, R.N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death *in vivo*. *Nature* 498, 371–375.
- Lamphier, M., Zheng, W., Latz, E., Spyvee, M., Hansen, H., Rose, J., Genest, M., Yang, H., Shaffer, C., Zhao, Y., et al. (2014). Novel small molecule inhibitors of TLR7 and TLR9: mechanism of action and efficacy *in vivo*. *Mol. Pharmacol.* 85, 429–440.
- Lamphier, M.S., Sirois, C.M., Verma, A., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2006). TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1082, 31–43.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564–569.
- Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., et al. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra19.
- Larrick, J.W., Hirata, M., Balint, R.F., Lee, J., Zhong, J., and Wright, S.C. (1995). Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 63, 1291–1297.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 750–761.
- Lay, W.H., and Nussenzweig, V. (1968). RECEPTORS FOR COMPLEMENT ON LEUKOCYTES. *J. Exp. Med.* 128, 991–1009.
- Lebbink, R.J., Ruiter, T. de, Adelmeijer, J., Brenkman, A.B., Helvoort, J.M. van, Koch, M., Farndale, R.W., Lisman, T., Sonnenberg, A., Lenting, P.J., et al. (2006). Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J. Exp. Med.* 203, 1419–1425.
- Lebre, M.C., Jongbloed, S.L., Tas, S.W., Smeets, T.J.M., McInnes, I.B., and Tak, P.P. (2008). Rheumatoid Arthritis Synovium Contains Two Subsets of CD83–DC-LAMP– Dendritic Cells with Distinct Cytokine Profiles. *Am. J. Pathol.* 172, 940–950.
- Lee, A., and Haslett, C. (1994). Human monocyte-conditioned medium inhibits neutrophil apoptosis *in vitro*. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 254S.

- Lee, C.-C., Sun, Y., Qian, S., and Huang, H.W. (2011). Transmembrane Pores Formed by Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biophys. J.* *100*, 1688–1696.
- Lee, D.-Y., Huang, C.-M., Nakatsuji, T., Thiboutot, D., Kang, S.-A., Monestier, M., and Gallo, R.L. (2009a). Histone H4 Is a Major Component of the Antimicrobial Action of Human Sebocytes. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 2489–2496.
- Lee, E.B., Fleischmann, R., Hall, S., Wilkinson, B., Bradley, J.D., Gruben, D., Koncz, T., Krishnaswami, S., Wallenstein, G.V., Zang, C., et al. (2014). Tofacitinib versus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* *370*, 2377–2386.
- Lee, H.Y., Kim, S.D., Shim, J.W., Lee, S.Y., Yun, J., and Bae, Y.-S. (2009b). LL-37 inhibits serum amyloid A-induced IL-8 production in human neutrophils. *Exp. Mol. Med.* *41*, 325–333.
- Lee, P.Y., Kumagai, Y., Li, Y., Takeuchi, O., Yoshida, H., Weinstein, J., Kellner, E.S., Nacionales, D., Barker, T., Kelly-Scumpia, K., et al. (2008). TLR7-dependent and Fc $\gamma$ R-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *J. Exp. Med.* *205*, 2995–3006.
- Lee, T.D., Gonzalez, M.L., Kumar, P., Chary-Reddy, S., Grammas, P., and Pereira, H.A. (2002). CAP37, a Novel Inflammatory Mediator. *Am. J. Pathol.* *160*, 841–848.
- Lee, Y.H., Rho, Y.H., Choi, S.J., Ji, J.D., and Song, G.G. (2007). PADI4 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol. Int.* *27*, 827–833.
- Lee, Y.H., Choi, S.J., Ji, J.D., and Song, G.G. (2016). Association between toll-like receptor polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update. *Lupus* *25*, 593–601.
- Leech, M.T., and Bartold, P.M. (2015). The association between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *29*, 189–201.
- Leeuwen, M. van, Gijbels, M.J.J., Duijvestijn, A., Smook, M., Gaar, M.J. van de, Heeringa, P., Winther, M.P.J. de, and Tervaert, J.W.C. (2008). Accumulation of Myeloperoxidase-Positive Neutrophils in Atherosclerotic Lesions in LDLR $^{-/-}$  Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 84–89.
- Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tydén, H., Lood, C., Truedsson, L., Bengtsson, A.A., and Blom, A.M. (2012). Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 3522–3531.
- Leshner, M., Wang, S., Lewis, C., Zheng, H., Chen, X.A., Santy, L., and Wang, Y. (2012). PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol.* *3*.
- Lewis, H.D., Liddle, J., Coote, J.E., Atkinson, S.J., Barker, M.D., Bax, B., D., Bicker, K.L., Bingham, R.P., Campbell, M., Chen, Y.H., et al. (2015). Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 189–191.



- Li, P., and Schwarz, E.M. (2003). The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* 25, 19–33.
- Li, Y., and Trush, M.A. (1998). Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H Oxidase Inhibitor, also Potently Inhibits Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 295–299.
- Li, D., Beisswenger, C., Herr, C., Schmid, R.M., Gallo, R.L., Han, G., Zakharkina, T., and Bals, R. (2014). Expression of the antimicrobial peptide cathelicidin in myeloid cells is required for lung tumor growth. *Oncogene* 33, 2709–2716.
- Li, F., Yang, Y., Zhu, X., Huang, L., and Xu, J. (2015). Macrophage Polarization Modulates Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 37, 1279–1288.
- Li, H., Wang, J., Wang, J., Cao, L.-S., Wang, Z.-X., and Wu, J.-W. (2013). Structural mechanism of DNA recognition by the p202 HINa domain: insights into the inhibition of Aim2-mediated inflammatory signalling. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 70, 21–29.
- Li, H.-N., Barlow, P.G., Bylund, J., Mackellar, A., Björstad, Å., Conlon, J., Hiemstra, P.S., Haslett, C., Gray, M., Simpson, A.J., et al. (2009). Secondary necrosis of apoptotic neutrophils induced by the human cathelicidin LL-37 is not proinflammatory to phagocytosing macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 86, 891–902.
- Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 207, 1853–1862.
- Li, X., Utomo, A., Cullere, X., Choi, M.M., Milner, D.A., Venkatesh, D., Yun, S.-H., and Mayadas, T.N. (2011a). The  $\beta$ -Glucan Receptor Dectin-1 Activates the Integrin Mac-1 in Neutrophils via Vav Protein Signaling to Promote *Candida albicans* Clearance. *Cell Host Microbe* 10, 603–615.
- Li, Y., Cai, L., Wang, H., Wu, P., Gu, W., Chen, Y., Hao, H., Tang, K., Yi, P., Liu, M., et al. (2011b). Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene* 30, 3887–3899.
- Liang, J., Huang, H.-I., Benzatti, F.P., Karlsson, A.B., Zhang, J.J., Youssef, N., Ma, A., Hale, L.P., and Hammer, G.E. (2016). Inflammatory Th1 and Th17 in the Intestine Are Each Driven by Functionally Specialized Dendritic Cells with Distinct Requirements for MyD88. *Cell Rep.* 17, 1330–1343.
- Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F., and Dunn, A.R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84, 1737–1746.
- van Lieshout, A.W.T., Barrera, P., Smeets, R., Pesman, G., van Riel, P.L.C.M., van den Berg, W.B., and Radstake, T. (2005). Inhibition of TNF $\alpha$  during maturation of dendritic cells results in the development of semi-mature cells: a potential mechanism for the beneficial effects of TNF $\alpha$  blockade in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 408–414.

- Lindau, D., Rönnefarth, V., Erbacher, A., Rammensee, H.-G., and Decker, P. (2011). Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* *41*, 669–681.
- Lindau, D., Mussard, J., Wagner, B.J., Ribon, M., Rönnefarth, V.M., Quettier, M., Jelcic, I., Boissier, M.-C., Rammensee, H.-G., and Decker, P. (2013). Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2101–2113.
- Lindau, D., Mussard, J., Rabsteyn, A., Ribon, M., Kötter, I., Igney, A., Adema, G.J., Boissier, M.-C., Rammensee, H.-G., and Decker, P. (2014). TLR9 independent interferon  $\alpha$  production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 2199–2207.
- van der Linden, M., Westerlaken, G.H.A., van der Vlist, M., van Montfrans, J., and Meyaard, L. (2017). Differential Signalling and Kinetics of Neutrophil Extracellular Trap Release Revealed by Quantitative Live Imaging. *Sci. Rep.* *7*.
- Linn-Rasker, S.P., van der Helm-van Mil, A.H.M., van Gaalen, F.A., Kloppenburg, M., de Vries, R.R.P., le Cessie, S., Breedveld, F.C., Toes, R.E.M., and Huizinga, T.W.J. (2006). Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 366–371.
- Listing, J., Strangfeld, A., Kary, S., Rau, R., von Hinueber, U., Stoyanova-Scholz, M., Gromnica-Ihle, E., Antoni, C., Herzer, P., Kekow, J., et al. (2005). Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum.* *52*, 3403–3412.
- Liu, D., and Niu, Z.-X. (2009). The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* *31*, 524–535.
- Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., and Link, D.C. (1996). Impaired Production and Increased Apoptosis of Neutrophils in Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor-Deficient Mice. *Immunity* *5*, 491–501.
- Liu, F., Poursine-Laurent, J., Wu, H.Y., and Link, D.C. (1997). Interleukin-6 and the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor Are Major Independent Regulators of Granulopoiesis In Vivo But Are Not Required for Lineage Commitment or Terminal Differentiation. *Blood* *90*, 2583–2590.
- Liu, P.T., Stenger, S., Tang, D.H., and Modlin, R.L. (2007). Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against *Mycobacterium tuberculosis* Is Dependent on the Induction of Cathelicidin. *J. Immunol.* *179*, 2060–2063.
- Liu, X., Zeng, B., Zhang, J., Li, W., Mou, F., Wang, H., Zou, Q., Zhong, B., Wu, L., Wei, H., et al. (2016). Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice. *Sci. Rep.* *6*.
- London, T.P.J.A. 2016By J.L.J.L.A.L. is a freelance science writer based in, and UK Blocking the immune system in rheumatoid arthritis.
- Lood, C., Gullstrand, B., Truedsson, L., Olin, A.I., Alm, G.V., Rönnblom, L., Sturfelt, G., Eloranta, M.-L., and Bengtsson, A.A. (2009). C1q inhibits immune complex-induced

## Bibliographie

---

interferon- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells: A novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Amp Rheumatol.* 60, 3081–3090.

Lood, C., Blanco, L.P., Purmalek, M.M., Carmona-Rivera, C., Ravin, S.S.D., Smith, C.K., Malech, H.L., Ledbetter, J.A., Elkon, K.B., and Kaplan, M.J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* 22, 146–153.

Loos, M., Martin, H., and Petry, F. (1989). The biosynthesis of C1q, the collagen-like and Fc-recognizing molecule of the complement system. *Behring Inst. Mitt.* 32–41.

Lu, J., Marjon, K.D., Mold, C., Clos, T.W.D., and Sun, P.D. (2012). Pentraxins and Fc receptors. *Immunol. Rev.* 250, 230–238.

Lu, J., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Yu, X., Wang, Y., Lee, V.W.S., Zheng, G., Tan, T.K., et al. (2013). Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int.* 84, 745–755.

Lubberts, E., and Berg, W.B. van den (2013). *Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Collagen-Induced Arthritis* (Landes Bioscience).

Luckasen, J.R., White, J.G., and Kersey, J.H. (1974). Mitogenic Properties of a Calcium Ionophore, A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 5088–5090.

Ludwig, I.S., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2006). Two way communication between neutrophils and dendritic cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 408–413.

Lundsröm, E., Källberg, H., Alfredsson, L., Klareskog, L., and Padyukov, L. (2009). Gene-environment interaction between DRB1 shared epitope and smoking regarding risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis - all alleles are important. *Arthritis Rheum.* 60, 1597–1603.

Ma, W., Rai, V., Hudson, B.I., Song, F., Schmidt, A.M., and Barile, G.R. (2012). RAGE binds C1q and enhances C1q-mediated phagocytosis. *Cell. Immunol.* 274, 72–82.

Mackness, G.B. (1962). Cellular Resistance to Infection. *J. Exp. Med.* 116, 381–406.

MacKay, K., Eyre, S., Myerscough, A., Milicic, A., Barton, A., Laval, S., Barrett, J., Lee, D., White, S., John, S., et al. (2002). Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom. *Arthritis Rheum.* 46, 632–639.

Maeda, Y., Kurakawa, T., Umemoto, E., Motooka, D., Ito, Y., Gotoh, K., Hirota, K., Matsushita, M., Furuta, Y., Narazaki, M., et al. (2016). Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 68, 2646–2661.

Mahajan, A., Herrmann, M., and Muñoz, L.E. (2016). Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front. Immunol.* 7.

mahatef (2014). *Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical Presentation.*

- Mahdi, H., Fisher, B.A., Källberg, H., Plant, D., Malmström, V., Rönnelid, J., Charles, P., Ding, B., Alfredsson, L., Padyukov, L., et al. (2009). Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated  $\alpha$ -enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* *41*, 1319.
- Mahomed, A.G., and Anderson, R. (2000). Activation of human neutrophils with chemotactic peptide, opsonized zymosan and the calcium ionophore A23187, but not with a phorbol ester, is accompanied by efflux and store-operated influx of calcium. *Inflammation* *24*, 559–569.
- Majithia, V., and Geraci, S.A. (2007). Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. *Am. J. Med.* *120*, 936–939.
- Makarov, S.S. (2001). NF-kappaB in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res.* *3*, 200–206.
- Makrygiannakis, D., Klint, E. af, Lundberg, I.E., Löfberg, R., Ulfgren, A., Klareskog, L., and Catrina, A.I. (2006). Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 1219–1222.
- Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A.-K., Nicholas, A.P., Zendman, A.J.W., Eklund, A., Grunewald, J., Skold, C.M., Klareskog, L., and Catrina, A.I. (2008). Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 1488–1492.
- Makrygiannakis, D., Revu, S., Engström, M., af Klint, E., Nicholas, A.P., Pruijn, G.J., and Catrina, A.I. (2012). Local administration of glucocorticoids decreases synovial citrullination in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R20.
- Maksymowych, W., and Russell, A.S. (1987). Antimalarials in rheumatology: efficacy and safety. *Semin. Arthritis Rheum.* *16*, 206–221.
- Maksymowych, W.P., Aviña-Zubieta, A., Luong, M., and Russell, A.S. (1996). High dose intravenous immunoglobulin (IVIg) in severe refractory rheumatoid arthritis: no evidence for efficacy. *Clin. Exp. Rheumatol.* *14*, 657–660.
- Malhotra, R., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Fischer, P.B., Dwek, R.A., and Sim, R.B. (1995). Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat. Med.* *1*, 237–243.
- Man, S.M., and Kanneganti, T.-D. (2015). Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* *265*, 6–21.
- Manda-Handzlik, A., and Demkow, U. (2015). Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease. In *Pulmonary Infection*, (Springer, Cham), pp. 51–60.
- Manderson, A.P., Botto, M., and Walport, M.J. (2004). The Role of Complement in the Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 431–456.
- Manfredi, A.A., Ramirez, G.A., Rovere-Querini, P., and Maugeri, N. (2018). The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front. Immunol.* *9*.

- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.
- Mantovani, A., Garlanda, C., and Locati, M. (2009). Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis: A Question of Balance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 1419–1423.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 519–531.
- Margadant, C., Monsuur, H.N., Norman, J.C., and Sonnenberg, A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 607–614.
- Marini, O., Costa, S., Bevilacqua, D., Calzetti, F., Tamassia, N., Spina, C., Sabata, D.D., Tinazzi, E., Lunardi, C., Scupoli, M.T., et al. (2017). Mature CD10+ and immature CD10– neutrophils present in G-CSF–treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* *129*, 1343–1356.
- Martin, C.A., Carsons, S.E., Kowalewski, R., Bernstein, D., Valentino, M., and Santiago-Schwarz, F. (2003). Aberrant Extracellular and Dendritic Cell (DC) Surface Expression of Heat Shock Protein (hsp)70 in the Rheumatoid Joint: Possible Mechanisms of hsp/DC-Mediated Cross-Priming. *J. Immunol.* *171*, 5736–5742.
- Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T.A., Wong, S.L., Brill, A., Gallant, M., Hu, J., Wang, Y., and Wagner, D.D. (2013). Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 8674–8679.
- Martinod, K., Fuchs, T.A., Zitomersky, N.L., Wong, S.L., Demers, M., Gallant, M., Wang, Y., and Wagner, D.D. (2015). PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. *Blood* *125*, 1948–1956.
- Martinod, K., Witsch, T., Erpenbeck, L., Savchenko, A., Hayashi, H., Cherpokova, D., Gallant, M., Mauler, M., Cifuni, S.M., and Wagner, D.D. (2016). Peptidylarginine deiminase 4 promotes age-related organ fibrosis. *J. Exp. Med.* *jem.20160530*.
- Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M.-L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A.B., et al. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* *16*, 887–896.
- Mathews, R.J., Robinson, J.I., Battellino, M., Wong, C., Taylor, J.C., Syndicate (BRAGGSS), B. in R.A.G. and G.S., Eyre, S., Churchman, S.M., Wilson, A.G., Isaacs, J.D., et al. (2014). Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1202–1210.
- Mathias Jonathan R., Perrin Benjamin J., Liu Ting-Xi, Kanki John, Look A. Thomas, and Huttenlocher Anna (2006). Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 1281–1288.
- Matsumoto, I., Lee, D.M., Goldbach-Mansky, R., Sumida, T., Hitchon, C.A., Schur, P.H., Anderson, R.J., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Brenner, M., et al. (2003). Low prevalence of

## Bibliographie

---

antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum.* 48, 944–954.

Matsumoto, T., Kaneko, T., Seto, M., Wada, H., Kobayashi, T., Nakatani, K., Tonomura, H., Tono, Y., Ohyabu, M., Nobori, T., et al. (2008). The membrane proteinase 3 expression on neutrophils was downregulated after treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* 14, 186–192.

Matsushima, H., Geng, S., Lu, R., Okamoto, T., Yao, Y., Mayuzumi, N., Kotol, P.F., Chojnacki, B.J., Miyazaki, T., Gallo, R.L., et al. (2013). Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* 121, 1677–1689.

Mayadas, T.N., Cullere, X., and Lowell, C.A. (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 181–218.

McDaniel, D.O., Alarcón, G.S., Pratt, P.W., and Reveille, J.D. (1995). Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatoid antigenic determinant (epitope). *Ann. Intern. Med.* 123, 181–187.

McInnes, I.B., and O'Dell, J.R. (2010). State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1898–1906.

McInnes, I.B., and Schett, G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 429–442.

McInturff, J.E., Modlin, R.L., and Kim, J. (2005). The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J. Invest. Dermatol.* 125, 1–8.

McPhail, L.C., Henson, P.M., and Johnston, R.B. (1981). Respiratory burst enzyme in human neutrophils. Evidence for multiple mechanisms of activation. *J. Clin. Invest.* 67, 710–716.

van der Meché, F.G.A., Schmitz, P.I.M., and Group\*, the D.G.-B.S. (1992). A Randomized Trial Comparing Intravenous Immune Globulin and Plasma Exchange in Guillain-Barré Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 326, 1123–1129.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.

Mejía, S.P., Cano, L.E., López, J.A., Hernandez, O., and González, Á. (2015). Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology* 161, 1008–1017.

Mélet J., Mulleman D., Goupille P., Ribourtout B., Watier H., and Thibault G. (2013). Rituximab-Induced T Cell Depletion in Patients With Rheumatoid Arthritis: Association With Clinical Response. *Arthritis Rheum.* 65, 2783–2790.

Meng, L., Zhu, W., Jiang, C., He, X., Hou, W., Zheng, F., Holmdahl, R., and Lu, S. (2010). Toll-like receptor 3 upregulation in macrophages participates in the initiation and maintenance of pristane-induced arthritis in rats. *Arthritis Res. Ther.* 12, R103.

- Merle, N.S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015). Complement System Part II: Role in Immunity. *Front. Immunol.* 6.
- Mertens, M., and Singh, J.A. (2009). Anakinra for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005121.
- Messier, V., Rabasa-Lhoret, R., Barbat-Artigas, S., Elisha, B., Karelis, A.D., and Aubertin-Leheudre, M. (2011). Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. *Maturitas* 68, 331–336.
- Metzler, K.D., Fuchs, T.A., Nauseef, W.M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117, 953–959.
- Meunier, E., Wallet, P., Dreier, R.F., Costanzo, S., Anton, L., Rühl, S., Dussurgey, S., Dick, M.S., Kistner, A., Rigard, M., et al. (2015). Guanylate-binding proteins promote AIM2 inflammasome activation during *Francisella novicida* infection by inducing cytosolic bacteriolysis and DNA release. *Nat. Immunol.* 16, 476.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442, 39–44.
- Michou, L., Lasbleiz, S., Rat, A.-C., Migliorini, P., Balsa, A., Westhovens, R., Barrera, P., Alves, H., Pierlot, C., Glikmans, E., et al. (2007). Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1649–1654.
- Mikuls, T.R., Thiele, G.M., Deane, K.D., Payne, J.B., O'Dell, J.R., Yu, F., Sayles, H., Weisman, M.H., Gregersen, P.K., Buckner, J.H., et al. (2012). Porphyromonas gingivalis and Disease-Related Autoantibodies in Individuals at Increased Risk of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 64.
- Millar, K., Lloyd, S.M., McLean, J.S., Batty, G.D., Burns, H., Cavanagh, J., Deans, K.A., Ford, I., McConnachie, A., McGinty, A., et al. (2013). Personality, Socio-Economic Status and Inflammation: Cross-Sectional, Population-Based Study. *PLoS ONE* 8.
- Miller, L.S., Sørensen, O.E., Liu, P.T., Jalian, H.R., Eshtiaghpour, D., Behmanesh, B.E., Chung, W., Starner, T.D., Kim, J., Sieling, P.A., et al. (2005). TGF- $\alpha$  Regulates TLR Expression and Function on Epidermal Keratinocytes. *J. Immunol.* 174, 6137–6143.
- Millrud Camilla Rydberg, Kågedal Åsa, Kumlien Georén Susanna, Winqvist Ola, Uddman Rolf, Razavi Ronia, Munck-Wikland Eva, and Cardell Lars Olaf (2017). NET-producing CD16high CD62Ldim neutrophils migrate to tumor sites and predict improved survival in patients with HNSCC. *Int. J. Cancer* 140, 2557–2567.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* 164, 6166–6173.
- Milutinovic, P.S., Englert, J.M., Crum, L.T., Mason, N.S., Ramsgaard, L., Enghild, J.J., Sparvero, L.J., Lotze, M.T., and Oury, T.D. (2014). Clearance Kinetics and Matrix Binding Partners of the Receptor for Advanced Glycation End Products. *PLOS ONE* 9, e88259.

- Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 763–776.
- Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2009). Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *N. Engl. J. Med.* *361*, 888–898.
- Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* *14*, 454–460.
- Mishalian, I., Granot, Z., and Fridlender, Z.G. (2017). The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology* *222*, 82–88.
- Miura-Shimura, Y., Nakamura, K., Ohtsuji, M., Tomita, H., Jiang, Y., Abe, M., Zhang, D., Hamano, Y., Tsuda, H., Hashimoto, H., et al. (2002). C1q Regulatory Region Polymorphism Down-Regulating Murine C1q Protein Levels with Linkage to Lupus Nephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 1334–1339.
- Miyabe, Y., Miyabe, C., Murooka, T.T., Kim, E.Y., Newton, G.A., Kim, N.D., Haribabu, B., Lusinskas, F.W., Mempel, T.R., and Luster, A.D. (2017). Complement C5a Receptor is the Key Initiator of Neutrophil Adhesion Igniting Immune Complex-induced Arthritis. *Sci. Immunol.* *2*.
- Miyata, M., Kobayashi, H., Sasajima, T., Sato, Y., and Kasukawa, R. (2000). Unmethylated oligo-DNA containing CpG motifs aggravates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* *43*, 2578–2582.
- Mizuno, M. (2006). A review of current knowledge of the complement system and the therapeutic opportunities in inflammatory arthritis. *Curr. Med. Chem.* *13*, 1707–1717.
- Moelants, E.A.V., Mortier, A., Van Damme, J., and Proost, P. (2013). Regulation of TNF- $\alpha$  with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol. Cell Biol.* *91*, 393–401.
- Molenaar, E.T.H., Voskuyl, A.E., Familian, A., van Mierlo, G.J., Dijkmans, B.A.C., and Hack, C.E. (2001). Complement activation in patients with rheumatoid arthritis mediated in part by C-reactive protein. *Arthritis Rheum.* *44*, 997–1002.
- Möllerherm, H., von Köckritz-Blickwede, M., and Branitzki-Heinemann, K. (2016). Antimicrobial Activity of Mast Cells: Role and Relevance of Extracellular DNA Traps. *Front. Immunol.* *7*.
- Moltke, J. von, Ayres, J.S., Kofoed, E.M., Chavarría-Smith, J., and Vance, R.E. (2013). Recognition of Bacteria by Inflammasomes. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 73–106.
- Monach, P.A., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). The Role of Antibodies in Mouse Models of Rheumatoid Arthritis, and Relevance to Human Disease. In *Advances in Immunology*, (Academic Press), pp. 217–248.
- Monach, P.A., Hueber, W., Kessler, B., Tomooka, B.H., BenBarak, M., Simmons, B.P., Wright, J., Thornhill, T.S., Monestier, M., Ploegh, H., et al. (2009). A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15867–15872.



- Monach, P.A., Nigrovic, P.A., Chen, M., Hock, H., Lee, D.M., Benoist, C., and Mathis, D. (2010). Neutrophils in a mouse model of autoantibody-mediated arthritis: critical producers of Fc receptor gamma, the receptor for C5a, and lymphocyte function-associated antigen 1. *Arthritis Rheum.* 62, 753–764.
- Mookherjee, N., Lippert, D.N.D., Hamill, P., Falsafi, R., Nijnik, A., Kindrachuk, J., Pistolic, J., Gardy, J., Miri, P., Naseer, M., et al. (2009). Intracellular Receptor for Human Host Defense Peptide LL-37 in Monocytes. *J. Immunol.* 183, 2688–2696.
- Moon, S.-J., Park, M.-K., Oh, H.-J., Lee, S.-Y., Kwok, S.-K., Cho, M.-L., Ju, J.H., Park, K.-S., Kim, H.-Y., and Park, S.-H. (2010). Engagement of Toll-Like Receptor 3 Induces Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-8 in Human Rheumatoid Synovial Fibroblasts. *Korean J. Intern. Med.* 25, 429–435.
- Moran, E.M., Heydrich, R., Ng, C.T., Saber, T.P., McCormick, J., Sieper, J., Appel, H., Fearon, U., and Veale, D.J. (2011). IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PloS One* 6, e24048.
- Morel, J. (2014). Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Datatraitesap14-63669*.
- Morel, F., Doussiere, J., and Vignais, P.V. (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* 201, 523–546.
- Morgan, K., Clague, R.B., Shaw, M.J., Firth, S.A., Twose, T.M., and Holt, P.J.L. (1981). Native Type II Collagen-Induced Arthritis in the Rat. *Arthritis Rheum.* 24, 1356–1362.
- Mori, M., Yamada, R., Kobayashi, K., Kawaida, R., and Yamamoto, K. (2005). Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J. Hum. Genet.* 50, 264.
- Mori, Y., Yamaguchi, M., Terao, Y., Hamada, S., Ooshima, T., and Kawabata, S. (2012).  $\alpha$ -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* Induces Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J. Biol. Chem.* 287, 10472–10481.
- Morizane, S., Yamasaki, K., Mühleisen, B., Kotol, P.F., Murakami, M., Aoyama, Y., Iwatsuki, K., Hata, T., and Gallo, R.L. (2012). Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J. Invest. Dermatol.* 132, 135–143.
- Mosmann, T.R., and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17, 138–146.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Moxley, G., and Ruddy, S. (1985). Elevated C3 anaphylatoxin levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 28, 1089–1095.
- Mudaliar, H., Pollock, C., Komala, M.G., Chadban, S., Wu, H., and Panchapakesan, U. (2013). The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 305, F143–F154.

- Mudzinski, S.P., Christian, T.P., Guo, T.L., Cirenza, E., Hazlett, K.R., and Gosselin, E.J. (1995). Expression of HLA-DR (major histocompatibility complex class II) on neutrophils from patients treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for mobilization of stem cells [letter]. *Blood* 86, 2452–2453.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., and Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog.* 4.
- Müller, I., Munder, M., Kropf, P., and Hänsch, G.M. (2009). Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol.* 30, 522–530.
- Mulligan, M.S., Warner, R.L., Rittershaus, C.W., Thomas, L.J., Ryan, U.S., Foreman, K.E., Crouch, L.D., Till, G.O., and Ward, P.A. (1999). Endothelial Targeting and Enhanced Antiinflammatory Effects of Complement Inhibitors Possessing Sialyl Lewisx Moieties. *J. Immunol.* 162, 4952–4959.
- Murray, P.J. (2017). Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541–566.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14–20.
- Nadkarni, S., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2007). Anti-TNF- $\alpha$  therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- $\beta$ . *J. Exp. Med.* 204, 33–39.
- Nagaji, J. (1999). The Role of Protein Kinase C and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Superoxide Anion Synthesis and Myeloperoxidase Degranulation of Human Neutrophils. *Kurume Med. J.* 46, 157–162.
- Nagaoka, I., Tamura, H., and Hirata, M. (2006). An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *J. Immunol.* 176, 3044–3052.
- Nagaoka, I., Suzuki, K., Niyonsaba, F., Tamura, H., and Hirata, M. (2012). Modulation of Neutrophil Apoptosis by Antimicrobial Peptides. *ISRN Microbiol.* 2012.
- Nakashima, K., Hagiwara, T., and Yamada, M. (2002). Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 49562–49568.
- Nam, J.L., Ramiro, S., Gaujoux-Viala, C., Takase, K., Leon-Garcia, M., Emery, P., Gossec, L., Landewe, R., Smolen, J.S., and Buch, M.H. (2014). Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 516–528.
- Nandakumar, K.S., Andrén, M., Martinsson, P., Bajtner, E., Hellström, S., Holmdahl, R., and Kleinau, S. (2003). Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory Fc $\gamma$ RIIB. *Eur. J. Immunol.* 33, 2269–2277.

## Bibliographie

---

- Narasaraju, T., Yang, E., Samy, R.P., Ng, H.H., Poh, W.P., Liew, A.-A., Phoon, M.C., van Rooijen, N., and Chow, V.T. (2011). Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. *Am. J. Pathol.* *179*, 199–210.
- Nathan, C.F. (1989). Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood* *73*, 301–306.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* *158*, 670–689.
- Nauseef, W.M., and Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* *15*, 602–611.
- Nauta, A.J., Raaschou-Jensen, N., Roos, A., Daha, M.R., Madsen, H.O., Borrias-Essers, M.C., Ryder, L.P., Koch, C., and Garred, P. (2003). Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2853–2863.
- Nauta, A.J., Castellano, G., Xu, W., Woltman, A.M., Borrias, M.C., Daha, M.R., Kooten, C. van, and Roos, A. (2004). Opsonization with C1q and Mannose-Binding Lectin Targets Apoptotic Cells to Dendritic Cells. *J. Immunol.* *173*, 3044–3050.
- Neeli, I., Khan, S.N., and Radic, M. (2008). Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 1895–1902.
- Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S., and Radic, M. (2009). Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J. Innate Immun.* *1*, 194–201.
- Nell, V., Machold, K., Stamm, T., Eberl, G., Heinzl, H., Uffmann, M., Smolen, J., and Steiner, G. (2005). Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1731–1736.
- Netea, M.G., Joosten, L.A.B., Latz, E., Mills, K.H.G., Natoli, G., Stunnenberg, H.G., O'Neill, L.A.J., and Xavier, R.J. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* *352*, aaf1098.
- Nickerson, K.M., Christensen, S.R., Shupe, J., Kashgarian, M., Kim, D., Elkon, K., and Shlomchik, M.J. (2010). TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J. Immunol.* *184*, 1840–1848.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K., and Gallo, R.L. (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* *414*, 454.
- Nordenfelt, P., and Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* *90*, 271–284.
- Nordkamp, M.J.M.O., Boross, P., Yildiz, C., Jansen, J.H.M., Leusen, J.H.W., Wouters, D., Urbanus, R.T., Hack, C.E., and Meyaard, L. (2014). Inhibition of the Classical and Lectin Pathway of the Complement System by Recombinant LAIR-2. *J. Innate Immun.* *6*, 284–292.

- Nündel, K., Green, N.M., Shaffer, A.L., Moody, K.L., Busto, P., Eilat, D., Miyake, K., Oropallo, M.A., Cancro, M.P., and Marshak-Rothstein, A. (2015). Cell-Intrinsic Expression of TLR9 in Autoreactive B Cells Constrains BCR/TLR7-Dependent Responses. *J. Immunol.* *194*, 2504–2512.
- Nunes Paula, Demaurex Nicolas, and Dinauer Mary C. (2013). Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. *Traffic* *14*, 1118–1131.
- Nurcombe, H.L., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (1991). Neutrophils isolated from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: priming and activation in vivo. *Ann. Rheum. Dis.* *50*, 147–153.
- Ocuin, L.M., Bamboat, Z.M., Balachandran, V.P., Cavnar, M.J., Obaid, H., Plitas, G., and DeMatteo, R.P. (2011). Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *J. Leukoc. Biol.* *89*, 423–432.
- Oehler, L., Majdic, O., Pickl, W.F., Stöckl, J., Riedl, E., Drach, J., Rappersberger, K., Geissler, K., and Knapp, W. (1998). Neutrophil Granulocyte-committed Cells Can Be Driven to Acquire Dendritic Cell Characteristics. *J. Exp. Med.* *187*, 1019–1028.
- Ohata, J., Zvaifler, N.J., Nishio, M., Boyle, D.L., Kalled, S.L., Carson, D.A., and Kipps, T.J. (2005). Fibroblast-Like Synoviocytes of Mesenchymal Origin Express Functional B Cell-Activating Factor of the TNF Family in Response to Proinflammatory Cytokines. *J. Immunol.* *174*, 864–870.
- Oishi, S., Shingu, M., Ezaki, I., Nobunaga, M., and Sakai, K. (1990). Rheumatoid factor modulation of neutrophil superoxide generation enhancing activity of preformed immune complexes. *Rheumatol. Int.* *10*, 9–12.
- Oishi, S., Takano, R., Tamura, S., Tani, S., Iwaizumi, M., Hamaya, Y., Takagaki, K., Nagata, T., Seto, S., Horii, T., et al. (2016). M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. *Immunology* *149*, 320–328.
- Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2016). Tissue biology perspective on macrophages. *Nat. Immunol.* *17*, 9–17.
- Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., et al. (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* *506*, 376–381.
- Okamoto, H., Cujec, T.P., Yamanaka, H., and Kamatani, N. (2008). Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of transcription factors. *FEBS J.* *275*, 4463–4470.
- Okroj, M., Heinegård, D., Holmdahl, R., and Blom, A.M. (2007). Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann. Med.* *39*, 517–530.
- Olde Nordkamp, M.J.M., van Eijk, M., Urbanus, R.T., Bont, L., Haagsman, H.P., and Meyaard, L. (2014). Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is a novel inhibitory receptor for surfactant protein D. *J. Leukoc. Biol.* *96*, 105–111.

- de Oliveira, S., Rosowski, E.E., and Huttenlocher, A. (2016). Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 378–391.
- Oliver, J.E., and Silman, A.J. (2006). Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* *35*, 169–174.
- O’Neill, L.A.J. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* *226*, 10–18.
- O’Neill, L.A.J., Bryant, C.E., and Doyle, S.L. (2009). Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer. *Pharmacol. Rev.* *61*, 177–197.
- van Oosterhout, M., Bajema, I., Levarht, E.W.N., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., and van Laar, J.M. (2008). Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *58*, 53–60.
- Oren, Z., Lerman, J.C., Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., and Shai, Y. (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J.* *341*, 501–513.
- O’Shea, J.J., Schwartz, D.M., Villarino, A.V., Gadina, M., McInnes, I.B., and Laurence, A. (2015). The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annu. Rev. Med.* *66*, 311–328.
- Osorio y Fortéa, J., Bukulmez, H., Petit-Teixeira, E., Michou, L., Pierlot, C., Cailleau-Moindrault, S., Lemaire, I., Lasbleiz, S., Alibert, O., Quillet, P., et al. (2004). Dense genome-wide linkage analysis of rheumatoid arthritis, including covariates. *Arthritis Rheum.* *50*, 2757–2765.
- Ospelt, C., Brentano, F., Rengel, Y., Stanczyk, J., Kolling, C., Tak, P.P., Gay, R.E., Gay, S., and Kyburz, D. (2008). Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: Toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum.* *58*, 3684–3692.
- Østensen, M., and Förger, F. (2009). Management of RA medications in pregnant patients. *Nat. Rev. Rheumatol.* *5*, 382.
- Ostuni, R., Zanoni, I., and Granucci, F. (2010). Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 4109–4134.
- Ozaki, E., Campbell, M., and Doyle, S.L. (2015). Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J. Inflamm. Res.* *8*, 15–27.
- Pace, J.L., Russell, S.W., Schreiber, R.D., Altman, A., and Katz, D.H. (1983). Macrophage activation: priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 3782–3786.
- Packard, R.R.S., Lichtman, A.H., and Libby, P. (2009). Innate and Adaptive Immunity in Atherosclerosis. *Semin. Immunopathol.* *31*, 5.

## Bibliographie

---

- Padyukov, L., Silva, C., Stolt, P., Alfredsson, L., and Klareskog, L. (2004). A gene–environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA–DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *50*, 3085–3092.
- Page, G., and Miossec, P. (2005). RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell–t cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum.* *52*, 2307–2312.
- Page, G., Chevrel, G., and Miossec, P. (2004). Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine–producing cells. *Arthritis Rheum.* *50*, 199–208.
- Palchetti, S., Starace, D., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., and Riccioli, A. (2015). Transfected Poly(I:C) Activates Different dsRNA Receptors, Leading to Apoptosis or Immunoadjuvant Response in Androgen-independent Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *290*, 5470–5483.
- Panayi, G.S. (2006). Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism?
- Papadaki, G., Kambas, K., Choulaki, C., Vlachou, K., Drakos, E., Bertias, G., Ritis, K., Boumpas, D.T., Thompson, P.R., Verginis, P., et al. (2016). Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. *Eur. J. Immunol.* n/a-n/a.
- Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 134–147.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* *191*, 677–691.
- Paramel, G.V., Sirsjö, A., and Fransén, K. (2015). Role of Genetic Alterations in the NLRP3 and CARD8 Genes in Health and Disease.
- Parizada, B., Werber, M.M., and Nimrod, A. (1991). Protective effects of human recombinant MnSOD in adjuvant arthritis and bleomycin-induced lung fibrosis. *Free Radic. Res. Commun.* *15*, 297–301.
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., and Abraham, E. (2004). Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 7370–7377.
- Parker, L.C., Whyte, M.K.B., Dower, S.K., and Sabroe, I. (2005). The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J. Leukoc. Biol.* *77*, 886–892.
- Parker Heather, Dragunow Mike, Hampton Mark B., Kettle Anthony J., and Winterbourn Christine C. (2012). Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* *92*, 841–849.
- Parsonage, G., Filer, A., Bik, M., Hardie, D., Lax, S., Howlett, K., Church, L.D., Raza, K., Wong, S.-H., Trebilcock, E., et al. (2008). Prolonged, granulocyte–macrophage colony-

stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNF $\alpha$ . *Arthritis Res. Ther.* 10, R47.

Patakas, A., Ji, R.-R., Weir, W., Connolly, S.E., Benson, R.A., Nadler, S.G., Brewer, J.M., McInnes, I.B., and Garside, P. (2016). Abatacept Inhibition of T Cell Priming in Mice by Induction of a Unique Transcriptional Profile That Reduces Their Ability to Activate Antigen-Presenting Cells. *Arthritis Rheumatol.* 68, 627–638.

Patel, S., Kumar, S., Jyoti, A., Srinag, B.S., Keshari, R.S., Saluja, R., Verma, A., Mitra, K., Barthwal, M.K., Krishnamurthy, H., et al. (2010). Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 22, 226–234.

Paulsen Friedrich, Pufe Thomas, Conradi Lenard, Varoga Deike, Tsokos Michael, Papendieck Jann, and Petersen Wolf (2002). Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. *J. Pathol.* 198, 369–377.

Peake, P.W., Shen, Y., Walther, A., and Charlesworth, J.A. (2008). Adiponectin binds C1q and activates the classical pathway of complement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 560–565.

Pedersen, M., Jacobsen, S., Klarlund, M., Pedersen, B.V., Wiik, A., Wohlfahrt, J., and Frisch, M. (2006). Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res. Ther.* 8, R133.

Pedersen, M., Jacobsen, S., Garred, P., Madsen, H.O., Klarlund, M., Svejgaard, A., Pedersen, B.V., Wohlfahrt, J., and Frisch, M. (2007). Strong combined gene–environment effects in anti–cyclic citrullinated peptide–positive rheumatoid arthritis: A nationwide case–control study in Denmark. *Arthritis Rheum.* 56, 1446–1453.

Peen, E., Mellbye, O.J., and Haga, H.-J. (2009). IgA rheumatoid factor in primary Sjogren’s syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* 38, 46–49.

Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., et al. (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115, 335–343.

Peng, K., Broz, P., Jones, J., Joubert, L.-M., and Monack, D. (2011). Elevated AIM2-mediated pyroptosis triggered by hypercytotoxic *Francisella* mutant strains is attributed to increased intracellular bacteriolysis. *Cell. Microbiol.* 13, 1586–1600.

Pérez-Chaparro, P.J., Gracieux, P., Lafaurie, G.I., Donnio, P.-Y., and Bonnaure-Mallet, M. (2008). Genotypic characterization of *Porphyromonas gingivalis* isolated from subgingival plaque and blood sample in positive bacteremia subjects with periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 35, 748–753.

Pérez-Sánchez, C., Ruiz-Limón, P., Aguirre, M.A., Jiménez-Gómez, Y., Arias-de la Rosa, I., Ábalos-Aguilera, M.C., Rodríguez-Ariza, A., Castro-Villegas, M.C., Ortega-Castro, R., Seguí, P., et al. (2017). Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J. Autoimmun.* 82, 31–40.

- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* *14*, 1583–1589.
- Pettit, A.R., MacDonald, K.P.A., O’Sullivan, B., and Thomas, R. (2000). Differentiated dendritic cells expressing nuclear RelB are predominantly located in rheumatoid synovial tissue perivascular mononuclear cell aggregates. *Arthritis Rheum.* *43*, 791–800.
- Pham, C.T.N. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 541–550.
- Piccinini, A.M., and Midwood, K.S. (2010). DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* *2010*.
- Pierer, M., Wagner, U., Rossol, M., and Ibrahim, S. (2011). Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice. *PLoS One* *6*, e23539.
- Pietrosimone, K.M., Jin, M., Poston, B., and Liu, P. (2015). Collagen-Induced Arthritis: A model for Murine Autoimmune Arthritis. *Bio-Protoc.* *5*.
- Pikwer, M., Bergström, U., Nilsson, J.-Å., Jacobsson, L., Berglund, G., and Turesson, C. (2009). Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 526–530.
- Pikwer, M., Bergström, U., Nilsson, J.-Å., Jacobsson, L., and Turesson, C. (2012). Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 378–381.
- Pillay, J., Braber, I. den, Vrisekoop, N., Kwast, L.M., Boer, R.J. de, Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* *116*, 625–627.
- Pilszczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H.Y., Surette, M.G., Sugai, M., et al. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 7413–7425.
- Pinegin, B., Vorobjeva, N., and Pinegin, V. (2015). Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* *14*, 633–640.
- Pires, R.H., Felix, S.B., and Delcea, M. (2016). The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale* *8*, 14193–14202.
- Pitrak, D.L. (1997). Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the bactericidal functions of neutrophils. *Curr. Opin. Hematol.* *4*, 183–190.
- Pittman, K., and Kubes, P. (2013). Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J. Innate Immun.* *5*, 315–323.



## Bibliographie

---

- Plenge, R.M. (2009). Recent progress in rheumatoid arthritis genetics: one step towards improved patient care. *Curr. Opin. Rheumatol.* 21, 262.
- Poubelle, P.E., Chakravarti, A., Fernandes, M.J., Doiron, K., and Marceau, A.-A. (2007). Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res. Ther.* 9, R25.
- van der Pouw Kraan, T.C.T.M., Wijbrandts, C.A., van Baarsen, L.G.M., Voskuyl, A.E., Rustenburg, F., Baggen, J.M., Ibrahim, S.M., Fero, M., Dijkmans, B.A.C., Tak, P.P., et al. (2007). Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 1008–1014.
- Pratesi, F., Dioni, I., Tommasi, C., Alcaro, M.C., Paolini, I., Barbetti, F., Boscaro, F., Panza, F., Puxeddu, I., Rovero, P., et al. (2013). Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann. Rheum. Dis.*
- Pratesi, F., Dioni, I., Tommasi, C., Alcaro, M.C., Paolini, I., Barbetti, F., Boscaro, F., Panza, F., Puxeddu, I., Rovero, P., et al. (2014). Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1414–1422.
- Probert, L., Plows, D., Kontogeorgos, G., and Kollias, G. (1995). The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* 25, 1794–1797.
- Puellmann, K., Kaminski, W.E., Vogel, M., Nebe, C.T., Schroeder, J., Wolf, H., and Beham, A.W. (2006). A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14441–14446.
- Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2012). B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* 13, 170–180.
- Puzas, J.E., Landeau, J.-M., Tallents, R., Albright, J., Schwarz, E.M., and Landesberg, R. (2001). Degradative Pathways in Tissues of the Temporomandibular Joint. *Cells Tissues Organs* 169, 248–256.
- Quayle, J.A., Watson, F., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (1997). Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology* 91, 266–273.
- Quinn, M.A., and Emery, P. (2003). Window of opportunity in early rheumatoid arthritis: possibility of altering the disease process with early intervention. *Clin. Exp. Rheumatol.* 21, S154-157.
- Quintero, O.L., Amador-Patarroyo, M.J., Montoya-Ortiz, G., Rojas-Villarraga, A., and Anaya, J.-M. (2012). Autoimmune disease and gender: Plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J. Autoimmun.* 38, J109–J119.

## Bibliographie

---

- Rabeony, H., Pohin, M., Vasseur, P., Petit-Paris, I., Jégou, J.-F., Favot, L., Frouin, E., Boutet, M.-A., Blanchard, F., Togbe, D., et al. (2015). IMQ-induced skin inflammation in mice is dependent on IL-1R1 and MyD88 signaling but independent of the NLRP3 inflammasome. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2847–2857.
- Rabiet, M.-J., Huet, E., and Boulay, F. (2007). The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: An overview. *Biochimie* *89*, 1089–1106.
- Radic, M., and Neeli, I. (2013). Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front. Immunol.* *4*.
- Radsak, M., Iking-Konert, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., and Hänsch, G.M. (2000). Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* *101*, 521–530.
- Radstake, T., van Lent, P.L.E.M., Pesman, G., Blom, A., Sweep, F., Ronnelid, J., Adema, G., Barrera, P., and van den Berg, W.B. (2004a). High production of proinflammatory and Th1 cytokines by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and down regulation upon FcγR triggering. *Ann. Rheum. Dis.* *63*, 696–702.
- Radstake, T.R.D.J., Franke, B., Hanssen, S., Netea, M.G., Welsing, P., Barrera, P., Joosten, L.A.B., van Riel, P.L.C.M., and van den Berg, W.B. (2004b). The toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum.* *50*, 999–1001.
- Radstake, T.R.D.J., Nabbe, K.C. a. M., Wenink, M.H., Roelofs, M.F., Oosterlaar, A., Lieshout, A.W.T. van, Barrera, P., Lent, P.L.E.M. van, and Berg, W.B. van den (2005a). Dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis lack the interleukin 13 mediated increase of FcγRII expression, which has clear functional consequences. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1737–1743.
- Radstake, T.R.D.J., Lieshout, A.W.T. van, Riel, P.L.C.M. van, Berg, W.B. van den, and Adema, G.J. (2005b). Dendritic cells, Fcγ receptors, and Toll-like receptors: potential allies in the battle against rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1532–1538.
- Rahman, S., and Gadjeva, M. (2014). Does NETosis Contribute to the Bacterial Pathoadaptation in Cystic Fibrosis? *Front. Immunol.* *5*.
- Raja, H., Matteson, E.L., Michet, C.J., Smith, J.R., and Pulido, J.S. (2012). Safety of Tumor Necrosis Factor Inhibitors during Pregnancy and Breastfeeding. *Transl. Vis. Sci. Technol.* *1*.
- Ramirez-Ortiz, Z.G., Pendergraft Iii, W.F., Prasad, A., Byrne, M.H., Iram, T., Blanchette, C.J., Luster, A.D., Hacohen, N., Khoury, J.E., and Means, T.K. (2013). The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nat. Immunol.* *14*, 917–926.
- Ramiro, S., Gaujoux-Viala, C., Nam, J.L., Smolen, J.S., Buch, M., Gossec, L., Heijde, D. van der, Winthrop, K., and Landewé, R. (2014). Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 529–535.

- Ranganathan, S., Cao, C., Catania, J., Migliorini, M., Zhang, L., and Strickland, D.K. (2011). Molecular Basis for the Interaction of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) with Integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2. *J. Biol. Chem.* 286, 30535–30541.
- Rathinam, V.A.K., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* 11, 395–402.
- Rawlings, D.J., Dai, X., and Buckner, J.H. (2015). The role of PTPN22 risk variant in the development of autoimmunity: Finding common ground between mouse and man. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 2977–2984.
- Raza, K., Scheel-Toellner, D., Lee, C.-Y., Pilling, D., Curnow, S.J., Falciani, F., Trevino, V., Kumar, K., Assi, L.K., Lord, J.M., et al. (2006). Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8, R120.
- Razmara, M., Srinivasula, S.M., Wang, L., Poyet, J.-L., Geddes, B.J., DiStefano, P.S., Bertin, J., and Alnemri, E.S. (2002). CARD-8 Protein, a New CARD Family Member That Regulates Caspase-1 Activation and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 13952–13958.
- Reinisch, W., Tillinger, W., Lichtenberger, C., Gangl, A., Willheim, M., Scheiner, O., and Steger, G. (1996). In vivo induction of HLA-DR on human neutrophils in patients treated with interferon-gamma [letter]. *Blood* 87, 3068–3068.
- Renn, C.N., Sanchez, D.J., Ochoa, M.T., Legaspi, A.J., Oh, C.-K., Liu, P.T., Krutzik, S.R., Sieling, P.A., Cheng, G., and Modlin, R.L. (2006). TLR Activation of Langerhans Cell-Like Dendritic Cells Triggers an Antiviral Immune Response. *J. Immunol.* 177, 298–305.
- Repine, J.E., White, J.G., Clawson, C.C., and Holmes, B.M. (1974). Effects of Phorbol Myristate Acetate on the Metabolism and Ultrastructure of Neutrophils in Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Invest.* 54, 83–90.
- Reynisdottir, G., Karimi, R., Joshua, V., Olsen, H., Hensvold, A.H., Harju, A., Engström, M., Grunewald, J., Nyren, S., Eklund, A., et al. (2014). Structural Changes and Antibody Enrichment in the Lungs Are Early Features of Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 66, 31–39.
- Reynisdottir, G., Olsen, H., Joshua, V., Engström, M., Forsslund, H., Karimi, R., Sköld, C.M., Nyren, S., Eklund, A., Grunewald, J., et al. (2016). Signs of immune activation and local inflammation are present in the bronchial tissue of patients with untreated early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 1722–1727.
- Rhodes, D.C.J. (2002). Binding of Tamm-Horsfall protein to complement 1q and complement 1, including influence of hydrogen-ion concentration. *Immunol. Cell Biol.* 80, 558–566.
- Richards, A., Kathryn Liszewski, M., Kavanagh, D., Fang, C.J., Moulton, E., Fremeaux-Bacchi, V., Remuzzi, G., Noris, M., Goodship, T.H.J., and Atkinson, J.P. (2007). Implications of the initial mutations in membrane cofactor protein (MCP; CD46) leading to atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol. Immunol.* 44, 111–122.

## Bibliographie

---

- Richards, M.K., Liu, F., Iwasaki, H., Akashi, K., and Link, D.C. (2003). Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood* 102, 3562–3568.
- Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M.R., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2011). IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *J. Immunol.* 187, 4835–4843.
- Robbins, C.S., Hilgendorf, I., Weber, G.F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J.-L., Gorbato, R., Sukhova, G.K., Gerhardt, L.M.S., Smyth, D., et al. (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* 19, 1166–1172.
- Roberts, R.L., Topless, R.K.G., Phipps-Green, A.J., Gearry, R.B., Barclay, M.L., and Merriman, T.R. (2010). Evidence of interaction of *CARD8 rs2043211* with *NALP3 rs35829419* in Crohn's disease. *Genes Immun.* 11, 351–356.
- Roberts-Thomson, P.J., Neoh, S.H., Bradley, J., and Milazzo, S.C. (1980). Circulating and intra-articular immune complexes in rheumatoid arthritis: a comparative study of the C1q binding and monoclonal rheumatoid factor assays. *Ann. Rheum. Dis.* 39, 438–444.
- Robinson, J.J., Watson, F., Phelan, M., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (1993). Activation of neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 347–353.
- Robinson, J.J., Watson, F., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (1994). Role of Fc gamma receptors in the activation of neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates isolated from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 515–520.
- Rodríguez-Fernández, J.L. (2013). Antigen presentation by dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 712–719.
- Roelofs, M.F., Joosten, L. a. B., Abdollahi-Roodsaz, S., Van Lieshout, A.W.T., Sprong, T., van den Hoogen, F.H., Van Den Berg, W.B., and Radstake, T.R.D.J. (2005). The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 52, 2313–2322.
- Roelofs, M.F., Boelens, W.C., Joosten, L.A.B., Abdollahi-Roodsaz, S., Geurts, J., Wunderink, L.U., Schreurs, B.W., Berg, W.B. van den, and Radstake, T.R.D.J. (2006). Identification of Small Heat Shock Protein B8 (HSP22) as a Novel TLR4 Ligand and Potential Involvement in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* 176, 7021–7027.
- Roelofs, M.F., Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L.A.B., van den Berg, W.B., and Radstake, T.R.D.J. (2008). The orchestra of toll-like receptors and their potential role in frequently occurring rheumatic conditions. *Arthritis Rheum.* 58, 338–348.
- Roelofs, M.F., Wenink, M.H., Brentano, F., Abdollahi-Roodsaz, S., Oppers-Walgreen, B., Barrera, P., van Riel, P.L.C.M., Joosten, L.A.B., Kyburz, D., van den Berg, W.B., et al. (2009). Type I interferons might form the link between Toll-like receptor (TLR) 3/7 and TLR4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). *Ann. Rheum. Dis.* 68, 1486–1493.

Röhm, M., Grimm, M.J., D'Auria, A.C., Almyroudis, N.G., Segal, B.H., and Urban, C.F. (2014). NADPH Oxidase Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pulmonary Aspergillosis. *Infect. Immun.* *82*, 1766–1777.

Rollet-Labelle, E., Vaillancourt, M., Marois, L., Newkirk, M.M., Poubelle, P.E., and Naccache, P.H. (2013). Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. *J. Inflamm. Lond. Engl.* *10*, 27.

Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Sero, G.D., Nicoletti, I., Trinchieri, G., Bistoni, F., and Puccetti, P. (1997). Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J. Immunol.* *158*, 5349–5356.

Rosales, C. (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* *9*.

Rosengren, S., Hoffman, H., Bugbee, W., and Boyle, D. (2005). Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 708–714.

Rosloniec, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Whittington, K.B., Gumanovskaya, M., Zaller, D.M., Woods, A., Altmann, D.M., Stuart, J.M., and Kang, A.H. (1997). An HLA-DR1 Transgene Confers Susceptibility to Collagen-induced Arthritis Elicited with Human Type II Collagen. *J. Exp. Med.* *185*, 1113–1122.

Rosloniec1, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Esaki, Y., Whittington, K.B., Zaller, D.M., Woods, A., Stuart, J.M., and Kang, A.H. (1998). Induction of Autoimmune Arthritis in HLA-DR4 (DRB1\*0401) Transgenic Mice by Immunization with Human and Bovine Type II Collagen. *J. Immunol.* *160*, 2573–2578.

Rowley, M.J., Nandakumar, K.S., and Holmdahl, R. (2008). The role of collagen antibodies in mediating arthritis. *Mod. Rheumatol.* *18*, 429–441.

Ruiz-Limón, P., Ortega, R., Arias de la Rosa, I., Abalos-Aguilera, M. del C., Perez- Sanchez, C., Jimenez- Gomez, Y., Peralbo-Santaella, E., Font, P., Ruiz-Vilches, D., Ferrin, G., et al. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl. Res.*

Rus, H., Cudrici, C., and Niculescu, F. (2005a). The role of the complement system in innate immunity. *Immunol. Res.* *33*, 103–112.

Rus, H., Cudrici, C., and Niculescu, F. (2005b). C5b-9 complement complex in autoimmune demyelination and multiple sclerosis: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *Ann. Med.* *37*, 97–104.

S. Reis, E., Falcão, D.A., and Isaac, L. (2006). Clinical Aspects and Molecular Basis of Primary Deficiencies of Complement Component C3 and its Regulatory Proteins Factor I and Factor H. *Scand. J. Immunol.* *63*, 155–168.

Sacre, S.M., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Amjadi, P., Lundberg, A., Giddins, G., Feldmann, M., Brennan, F., and Foxwell, B.M. (2007). The Toll-Like Receptor Adaptor Proteins MyD88

## Bibliographie

---

and Mal/TIRAP Contribute to the Inflammatory and Destructive Processes in a Human Model of Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Pathol.* *170*, 518–525.

Sacre, S.M., Lo, A., Gregory, B., Simmonds, R.E., Williams, L., Feldmann, M., Brennan, F.M., and Foxwell, B.M. (2008). Inhibitors of TLR8 reduce TNF production from human rheumatoid synovial membrane cultures. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 8002–8009.

Sagiv, J.Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R.V., et al. (2015). Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *Cell Rep.* *10*, 562–573.

Sagulenko, V., Thygesen, S.J., Sester, D.P., Idris, A., Cridland, J.A., Vajjhala, P.R., Roberts, T.L., Schroder, K., Vince, J.E., Hill, J.M., et al. (2013). AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ.* *20*, 1149–1160.

Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., et al. (2003). Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* *426*, 454–460.

Säll, J., Carlsson, M., Gidlöf, O., Holm, A., Humlén, J., Ohman, J., Svensson, D., Nilsson, B.-O., and Jönsson, D. (2013). The antimicrobial peptide LL-37 alters human osteoblast Ca<sup>2+</sup> handling and induces Ca<sup>2+</sup>-independent apoptosis. *J. Innate Immun.* *5*, 290–300.

Sandilands, G.P., McCrae, J., Hill, K., Perry, M., and Baxter, D. (2006). Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on in vitro and in vivo activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology* *119*, 562–571.

Sanjuan, M.A., Rao, N., Lai, K.-T.A., Gu, Y., Sun, S., Fuchs, A., Fung-Leung, W.-P., Colonna, M., and Karlsson, L. (2006). CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion. *J. Cell Biol.* *172*, 1057–1068.

Santiago-Schwarz, F., Anand, P., Liu, S., and Carsons, S.E. (2001). Dendritic Cells (DCs) in Rheumatoid Arthritis (RA): Progenitor Cells and Soluble Factors Contained in RA Synovial Fluid Yield a Subset of Myeloid DCs That Preferentially Activate Th1 Inflammatory-Type Responses. *J. Immunol.* *167*, 1758–1768.

Santo, C.D., Arscott, R., Booth, S., Karydis, I., Jones, M., Asher, R., Salio, M., Middleton, M., and Cerundolo, V. (2010). Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat. Immunol.* *11*, 1039–1046.

SANTOS, L.L., MORAND, E.F., HUTCHINSON, P., BOYCE, N.W., and HOLDSWORTH, S.R. (1997). Anti-neutrophil monoclonal antibody therapy inhibits the development of adjuvant arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* *107*, 248–253.

Sato, S., Fujimoto, M., Ihn, H., Kikuchi, K., and Takehara, K. (1994). Antigen specificity of antihistone antibodies in localized scleroderma. *Arch. Dermatol.* *130*, 1273–1277.

Satoh, M., Treadwell, E.L., and Reeves, W.H. (1995). Pristane induces high titers of anti-Su and anti-nRNPSm autoantibodies in BALBc mice Quantitation by antigen capture ELISAs based on monospecific human autoimmune sera. *J. Immunol. Methods* *182*, 51–62.

- Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., and Haslett, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* *83*, 865–875.
- Sawada, T., Kanzaki, T., Hashimoto, S., Suzuki, A., Yamada, R., Odawara, M., and Yamamoto, K. (2009). Citrullinated antigens as C1q-binding and monoclonal rheumatoid factor (mRF)-binding peptides in synovial fluids from rheumatoid arthritis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* *27*, 989–992.
- Sayah, D.M., Mallavia, B., Liu, F., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., DerHovanesian, A., Ross, D.J., Lynch III, J.P., Saggar, R., Ardehali, A., et al. (2014). Neutrophil Extracellular Traps Are Pathogenic in Primary Graft Dysfunction after Lung Transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *191*, 455–463.
- Scapini, P., and Cassatella, M.A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* *124*, 710–719.
- Schauber, J., and Gallo, R.L. (2008). The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response? *Exp. Dermatol.* *17*, 633–639.
- Schauer, C., Janko, C., Munoz, L.E., Zhao, Y., Kienhöfer, D., Frey, B., Lell, M., Manger, B., Rech, J., Naschberger, E., et al. (2014). Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* *20*, 511–517.
- Schaumberg, D.A., Hankinson, S.E., Guo, Q., Rimm, E., and Hunter, D.J. (2007). A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* *125*, 55–62.
- Scher, J.U., Ubeda, C., Equinda, M., Khanin, R., Buischi, Y., Viale, A., Lipuma, L., Attur, M., Pillinger, M.H., Weissmann, G., et al. (2012). Periodontal Disease and the Oral Microbiota in New-Onset Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* *64*, 3083–3094.
- Scher, J.U., Szczesnak, A., Longman, R.S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E.G., Abramson, S.B., et al. (2013). Expansion of intestinal *Prevotella* copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *ELife* *2*.
- Scher, J.U., Ubeda, C., Artacho, A., Attur, M., Isaac, S., Reddy, S.M., Marmon, S., Neimann, A., Brusca, S., Patel, T., et al. (2015). Decreased Bacterial Diversity Characterizes an Altered Gut Microbiota in Psoriatic Arthritis and Resembles Dysbiosis of Inflammatory Bowel Disease. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *67*, 128–139.
- Scher, J.U., Littman, D.R., and Abramson, S.B. (2016). Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *68*, 35–45.
- Schett, G., and McInnes, I.B. (2011). The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2205–2224.
- Schoels, M., Aletaha, D., Smolen, J.S., and Wong, J.B. (2012). Comparative effectiveness and safety of biological treatment options after tumour necrosis factor  $\alpha$  inhibitor failure in rheumatoid arthritis: systematic review and indirect pairwise meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 1303–1308.

- Schorn, C., Janko, C., Latzko, M., Chaurio, R., Schett, G., and Herrmann, M. (2012). Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.* *3*.
- Schumacher Jr., H.R., Arayssi, T., Crane, M., Lee, J., Gerard, H., Hudson, A.P., and Klippel, J. (1999). Chlamydia trachomatis nucleic acids can be found in the synovium of some asymptomatic subjects. *Arthritis Rheum.* *42*, 1281–1284.
- Schymeinsky, J., Mócsai, A., and Walzog, B. (2007). Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb. Haemost.* *98*, 262–273.
- Scott, M.G., Davidson, D.J., Gold, M.R., Bowdish, D., and Hancock, R.E.W. (2002). The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. *J. Immunol.* *169*, 3883–3891.
- Seelen, M.A., and Daha, M.R. (2006). The role of complement in autoimmune renal disease. *Autoimmunity* *39*, 411–415.
- Segal, A.W., Dorling, J., and Coade, S. (1980). Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. *J. Cell Biol.* *85*, 42–59.
- Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* *38*, 336–348.
- Seldin, M.F., Amos, C.I., Ward, R., and Gregersen, P.K. (1999). The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *42*, 1071–1079.
- Semerano, L., Decker, P., Clavel, G., and Boissier, M.-C. (2016). Developments with investigational Janus kinase inhibitors for rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Investig. Drugs* *25*, 1355–1359.
- Seok, J., Warren, H.S., Cuenca, A.G., Mindrinos, M.N., Baker, H.V., Xu, W., Richards, D.R., McDonald-Smith, G.P., Gao, H., Hennessy, L., et al. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 3507–3512.
- Serhan, C.N., Chiang, N., and Dyke, T.E.V. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 349–361.
- Seung, N.R., Park, E.J., Kim, C.W., Kim, K.H., Kim, K.J., Cho, H.J., and Park, H.R. (2007). Comparison of expression of heat-shock protein 60, Toll-like receptors 2 and 4, and T-cell receptor  $\gamma\delta$  in plaque and guttate psoriasis. *J. Cutan. Pathol.* *34*, 903–911.
- Seymour, J.F., Lieschke, G.J., Grail, D., Quilici, C., Hodgson, G., and Dunn, A.R. (1997). Mice Lacking Both Granulocyte Colony-Stimulating Factor (CSF) and Granulocyte-Macrophage CSF Have Impaired Reproductive Capacity, Perturbed Neonatal Granulopoiesis, Lung Disease, Amyloidosis, and Reduced Long-Term Survival. *Blood* *90*, 3037–3049.



## Bibliographie

---

- Shah, S., Bohsali, A., Ahlbrand, S.E., Srinivasan, L., Rathinam, V.A.K., Vogel, S.N., Fitzgerald, K.A., Sutterwala, F.S., and Briken, V. (2013). Mycobacterium tuberculosis but not non-virulent mycobacteria inhibit IFN- $\beta$  and AIM2-inflammasome dependent IL-1 $\beta$  production via their ESX-1 secretion system. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 3514–3518.
- Shahrara, S., Huang, Q., Mandelin, A.M., and Pope, R.M. (2008). TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *10*, R93.
- Shao, B.-Z., Xu, Z.-Q., Han, B.-Z., Su, D.-F., and Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front. Pharmacol.* *6*.
- Sharma, D., and Kanneganti, T.-D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol* *213*, 617–629.
- Sheedy, F.J., Marinou, I., O'Neill, L. a. J., and Wilson, A.G. (2008). The Mal/TIRAP S180L and TLR4 G299D polymorphisms are not associated with susceptibility to, or severity of, rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 1328–1331.
- Shi, J., Knevel, R., Suwannalai, P., van der Linden, M.P., Janssen, G.M.C., van Veelen, P.A., Levarht, N.E.W., van der Helm-van Mil, A.H.M., Cerami, A., Huizinga, T.W.J., et al. (2011a). Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17372–17377.
- Shi, Z., Cai, Z., Sanchez, A., Zhang, T., Wen, S., Wang, J., Yang, J., Fu, S., and Zhang, D. (2011b). A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus. *J. Biol. Chem.* *286*, 4517–4524.
- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., and Nathan, C. (1999). Phenotype of Mice and Macrophages Deficient in Both Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase. *Immunity* *10*, 29–38.
- Simard, J.-C., Girard, D., and Tessier, P.A. (2010). Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* *87*, 905–914.
- Simard, J.-C., Cesaro, A., Chapeton-Montes, J., Tardif, M., Antoine, F., Girard, D., and Tessier, P.A. (2013). S100A8 and S100A9 Induce Cytokine Expression and Regulate the NLRP3 Inflammasome via ROS-Dependent Activation of NF- $\kappa$ B1. *PLoS ONE* *8*.
- Singh, J.A., Saag, K.G., Bridges, S.L., Akl, E.A., Bannuru, R.R., Sullivan, M.C., Vaysbrot, E., McNaughton, C., Osani, M., Shmerling, R.H., et al. (2016). 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* *68*, 1–26.
- Sinha, S., Zhu, Q.S., Romero, G., and Corey, S.J. (2003). Deletional mutation of the external domain of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor in a patient with severe chronic neutropenia refractory to granulocyte colony-stimulating factor. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* *25*, 791–796.
- Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P.E., and Schulze-Koops, H. (2005). The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res. Ther.* *7*, S4–S14.

## Bibliographie

---

- Skidgel, R.A., Kawahara, M.S., and Hugli, T.E. (1986). Functional significance of the subunits of carboxypeptidase N (kininase I). *Adv. Exp. Med. Biol.* *198 Pt A*, 375–380.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., Wlodarczyk, A., Zabieglo, K., Kapinska-Mrowiecka, M., Marewicz, E., Dubin, A., Potempa, J., and Cichy, J. (2012). Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor-Competent DNA Deposits Are Potent Stimulators of Plasmacytoid Dendritic Cells: Implication for Psoriasis. *J. Immunol.* *189*, 1611–1617.
- Smit, M. de, Westra, J., Vissink, A., Doornbos-van der Meer, B., Brouwer, E., and van Winkelhoff, A.J. (2012). Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R222.
- Smith, C.K., and Kaplan, M.J. (2015). The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* *27*, 448–453.
- Smolen, J.S., and Aletaha, D. (2013). Forget personalised medicine and focus on abating disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 3–6.
- Smolen, J.S., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M.H., and Emery, P. (2007). New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet* *370*, 1861–1874.
- Smolen, J.S., Aletaha, D., Bijlsma, J.W.J., Breedveld, F.C., Boumpas, D., Burmester, G., Combe, B., Cutolo, M., de Wit, M., Dougados, M., et al. (2010). Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 631–637.
- Smolen, J.S., Nash, P., Durez, P., Hall, S., Ilivanova, E., Irazoque-Palazuelos, F., Miranda, P., Park, M.-C., Pavelka, K., Pedersen, R., et al. (2013). Maintenance, reduction, or withdrawal of etanercept after treatment with etanercept and methotrexate in patients with moderate rheumatoid arthritis (PRESERVE): a randomised controlled trial. *The Lancet* *381*, 918–929.
- Smolen, J.S., Heijde, D. van der, Machold, K.P., Aletaha, D., and Landewé, R. (2014a). Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 3–5.
- Smolen, J.S., Kay, J., Matteson, E.L., Landewé, R., Hsia, E.C., Xu, S., Zhou, Y., and Doyle, M.K. (2014b). Insights into the efficacy of golimumab plus methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis who discontinued prior anti-tumour necrosis factor therapy: post-hoc analyses from the GO-AFTER study. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1811–1818.
- Smolen, J.S., Emery, P., Ferraccioli, G.F., Samborski, W., Berenbaum, F., Davies, O.R., Koetse, W., Purcaru, O., Bennett, B., and Burkhart, H. (2014c). Certolizumab pegol in rheumatoid arthritis patients with low to moderate activity: the CERTAIN double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* *annrheumdis-2013-204632*.
- Smolen, J.S., Aletaha, D., and McInnes, I.B. (2016a). Rheumatoid arthritis. *The Lancet* *388*, 2023–2038.
- Smolen, J.S., Breedveld, F.C., Burmester, G.R., Bykerk, V., Dougados, M., Emery, P., Kvien, T.K., Navarro-Compán, M.V., Oliver, S., Schoels, M., et al. (2016b). Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 3–15.

## Bibliographie

---

- Smolen, J.S., Landewé, R., Bijlsma, J., Burmester, G., Chatzidionysiou, K., Dougados, M., Nam, J., Ramiro, S., Voshaar, M., van Vollenhoven, R., et al. (2017). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 960–977.
- Soehnlein, O. (2012). Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis. *Circ. Res.* *110*, 875–888.
- Sokolove, J., Zhao, X., Chandra, P.E., and Robinson, W.H. (2011). Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor. *Arthritis Rheum.* *63*, 53–62.
- Sokolove, J., Bromberg, R., Deane, K.D., Lahey, L.J., Derber, L.A., Chandra, P.E., Edison, J.D., Gilliland, W.R., Tibshirani, R.J., Norris, J.M., et al. (2012). Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PloS One* *7*, e35296.
- Sollberger, G., Tilley, D.O., and Zychlinsky, A. (2018). Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev. Cell* *44*, 542–553.
- Son, M., and Diamond, B. (2015). C1q-Mediated Repression of Human Monocytes Is Regulated by Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor 1 (LAIR-1). *Mol. Med.* *20*, 559–568.
- Son, M., Santiago-Schwarz, F., Al-Abed, Y., and Diamond, B. (2012). C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E3160–E3167.
- Sønderstrup, G., Cope, A.P., Patel, S., Congia, M., Hain, N., Hall, F.C., Parry, S.L., Fugger, L.H., Michie, S., and McDevitt, H.O. (1999). HLA class II transgenic mice: models of the human CD4+ T-cell immune response. *Immunol. Rev.* *172*, 335–343.
- Sorci, G., Riuzzi, F., Giambanco, I., and Donato, R. (2013). RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1833*, 101–109.
- Sorensen, P.S. (2003). The role of intravenous immunoglobulin in the treatment of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *206*, 123–130.
- Sørensen, O.E., and Borregaard, N. (2016). Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J. Clin. Invest.* *126*, 1612–1620.
- Sørensen, O.E., and Borregaard, N. Neutrophil extracellular traps — the dark side of neutrophils. *J. Clin. Invest.* *126*, 1612–1620.
- Sørensen, L.K., Havemose-Poulsen, A., Sønder, S.U., Bendtzen, K., and Holmstrup, P. (2008). Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J. Periodontol.* *79*, 477–485.
- Sørensen, O.E., Follin, P., Johnsen, A.H., Calafat, J., Tjabringa, G.S., Hiemstra, P.S., and Borregaard, N. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* *97*, 3951–3959.

## Bibliographie

---

- Sorvillo, J., Gigli, I., and Pearlstein, E. (1985). Fibronectin binding to complement subcomponent C1q. Localization of their respective binding sites. *Biochem. J.* 226, 207–215.
- de Souza, A.W.S., van Timmeren, M., Sanders, J.-S., Stegeman, C., Heeringa, P., Kallenberg, C.G.M., and Westra, J. (2017). M2 macrophage is the predominant phenotype in airways inflammatory lesions in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Res. Ther.* 19.
- Spear, G.T., Jiang, H., Sullivan, B.L., Gewürz, H., Landay, A.L., and Lint, T.F. (1991). Direct Binding of Complement Component C1q to Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Human T Lymphotropic Virus-I (HTLV-I) Coinfected Cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7, 579–585.
- Spengler, J., Lugonja, B., Ytterberg, A.J., Zubarev, R.A., Creese, A.J., Pearson, M.J., Grant, M.M., Milward, M., Lundberg, K., Buckley, C.D., et al. (2015). Release of active peptidyl arginine deiminases by neutrophils can explain production of extracellular citrullinated autoantigens in RA synovial fluid. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ.
- Stahl, H., Hubner, B., Seidl, B., Liebert, U., van der Heijden, I.M., Wilbrink, B., Kraan, M., Emmrich, F., and Tak, P. (2000). Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 342–346.
- Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., and Ley, K. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22, 285–294.
- Starnes, T.W., and Huttenlocher, A. (2012). Neutrophil Reverse Migration Becomes Transparent with Zebrafish. *Adv. Hematol.* 2012.
- Stastny, P. (1976). Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 57, 1148–1157.
- Steenbakkens, P.G.A., Baeten, D., Rovers, E., Veys, E.M., Rijnders, A.W.M., Meijerink, J., Keyser, F.D., and Boots, A.M.H. (2003). Localization of MHC Class II/ Human Cartilage Glycoprotein-39 Complexes in Synovia of Rheumatoid Arthritis Patients Using Complex-Specific Monoclonal Antibodies. *J. Immunol.* 170, 5719–5727.
- Stefano, R.D., Frati, E., Nargi, F., Baldi, C., Menza, L., Hammoud, M., and Galeazzi, M. (2010). Comparison of combination therapies in the treatment of rheumatoid arthritis: leflunomide-anti-TNF-alpha versus methotrexate-anti-TNF-alpha. *Clin. Rheumatol.* 29, 517–524.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287–292.
- Steinbach, K.H., Schick, P., Trepel, F., Raffler, H., Döhrmann, J., Heilgeist, G., Heltzel, W., Li, K., Past, W., van der Woerd-de Lange, J.A., et al. (1979). Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. *Blut* 39, 27–38.

- Steinberg, B.E., and Grinstein, S. (2007). Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2007, pe11.
- Strangfeld, A., Hierse, F., Rau, R., Burmester, G.-R., Krummel-Lorenz, B., Demary, W., Listing, J., and Zink, A. (2010). Risk of incident or recurrent malignancies among patients with rheumatoid arthritis exposed to biologic therapy in the German biologics register RABBIT. *Arthritis Res. Ther.* 12, R5.
- Stringer, R.E., Hart, C.A., and Edwards, S.W. (1996). Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br. J. Haematol.* 92, 169–175.
- Stuart, J.M., and Dixon, F.J. (1983). Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* 158, 378–392.
- Stuehr, D.J., Fasehun, O.A., Kwon, N.S., Gross, S.S., Gonzalez, J.A., Levi, R., and Nathan, C.F. (1991). Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenylethylidenehydrazide and its analogs. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 5, 98–103.
- Su, K., Yang, H., Li, X., Li, X., Gibson, A.W., Cafardi, J.M., Zhou, T., Edberg, J.C., and Kimberly, R.P. (2007). Expression Profile of FcγRIIb on Leukocytes and Its Dysregulation in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 3272–3280.
- Sugiyama, D., Nishimura, K., Tamaki, K., Tsuji, G., Nakazawa, T., Morinobu, A., and Kumagai, S. (2010). Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 70–81.
- Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., and Chilvers, E.R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31, 318–324.
- Sur Chowdhury, C., Giaglis, S., Walker, U.A., Buser, A., Hahn, S., and Hasler, P. (2014). Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res. Ther.* 16, R122.
- Sutterwala, F.S., Haasken, S., and Cassel, S.L. (2014). Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1319, 82–95.
- Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhiro, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., et al. (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 34, 395–402.
- Swingle, K.F., Jaques, L.W., and Kvam, D.C. (1969). Differences in the Severity of Adjuvant Arthritis in Four Strains of Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132, 608–612.
- Symmons, D.P., Bankhead, C.R., Harrison, B.J., Brennan, P., Barrett, E.M., Scott, D.G., and Silman, A.J. (1997). Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.* 40, 1955–1961.

## Bibliographie

---

- Tagliani, E., Shi, C., Nancy, P., Tay, C.-S., Pamer, E.G., and Erlebacher, A. (2011). Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. *J. Exp. Med.* *208*, 1901–1916.
- Tak, P.P., Rigby, W.F., Rubbert-Roth, A., Peterfy, C.G., Vollenhoven, R.F. van, Stohl, W., Hessey, E., Chen, A., Tyrrell, H., Shaw, T.M., et al. (2011). Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: the IMAGE trial. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 39–46.
- Takeda, K., and Akira, S. (2015). Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* *109*, 14.12.1-10.
- Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., and Sendo, F. (1996). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* *59*, 229–240.
- Tamaki, Y., Takakubo, Y., Hirayama, T., Kontinen, Y.T., Goodman, S.B., Yamakawa, M., and Takagi, M. (2011). Expression of Toll-like receptors and their signaling pathways in rheumatoid synovitis. *J. Rheumatol.* *38*, 810–820.
- Tamassia, N., Zimmermann, M., Castellucci, M., Ostuni, R., Bruderek, K., Schilling, B., Brandau, S., Bazzoni, F., Natoli, G., and Cassatella, M.A. (2013). Cutting Edge: An Inactive Chromatin Configuration at the IL-10 Locus in Human Neutrophils. *J. Immunol.* *190*, 1921–1925.
- Taneja, V., and David, C.S. (2010). Role of HLA class II genes in susceptibility/resistance to inflammatory arthritis: studies with humanized mice. *Immunol. Rev.* *233*, 62–78.
- Taniguchi, N., Kawahara, K.-I., Yone, K., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., Goto, M., Inoue, K., Yamada, S., Ijiri, K., Matsunaga, S., et al. (2003). High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.* *48*, 971–981.
- Tanimoto, K., Cooper, N.R., Johnson, J.S., and Vaughan, J.H. (1975). Complement fixation by rheumatoid factor. *J. Clin. Invest.* *55*, 437–445.
- Tapper, H., Furuya, W., and Grinstein, S. (2002). Localized Exocytosis of Primary (Lysosomal) Granules During Phagocytosis: Role of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Tyrosine Phosphorylation and Microtubules. *J. Immunol.* *168*, 5287–5296.
- Taylor, P.C., Keystone, E.C., van der Heijde, D., Weinblatt, M.E., Del Carmen Morales, L., Reyes Gonzaga, J., Yakushin, S., Ishii, T., Emoto, K., Beattie, S., et al. (2017). Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* *376*, 652–662.
- Tecchio, C., Micheletti, A., and Cassatella, M.A. (2014). Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Front. Immunol.* *5*.
- Teller, K., Budhai, L., Zhang, M., Haramati, N., Keiser, H.D., and Davidson, A. (1996). HLA-DRB1 and DQB typing of Hispanic American patients with rheumatoid arthritis: the “shared epitope” hypothesis may not apply. *J. Rheumatol.* *23*, 1363–1368.

## Bibliographie

---

- Teng, T.-S., Ji, A., Ji, X.-Y., and Li, Y.-Z. (2017). Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J. Immunol. Res.* 2017.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., and Simon, J.C. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med.* 195, 99–111.
- Termén, S., Tollin, M., Olsson, B., Svenberg, T., Agerberth, B., and Gudmundsson, G.H. (2003). Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 536–549.
- Thomas, R., and Lipsky, P.E. (1996). Presentation of self peptides by dendritic cells. Possible implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39, 183–190.
- Thomas, R., Davis, L.S., and Lipsky, P.E. (1994). Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting dendritic cells. *J. Immunol.* 152, 2613–2623.
- Thomas, R., MacDonald, K.P.A., Pettit, A.R., Cavanagh, L.L., Padmanabha, J., and Zehntner, S. (1999). Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Leukoc. Biol.* 66, 286–292.
- Thurlings, R.M., Vos, K., Wijbrandts, C.A., Zwinderman, A.H., Gerlag, D.M., and Tak, P.P. (2008). Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 917–925.
- Thwaites, R., Chamberlain, G., and Sacre, S. (2014). Emerging Role of Endosomal Toll-Like Receptors in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* 5, 1.
- Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., and Sospedra, M. (2012). T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J. Immunol.*
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 179–190.
- Trinder, P.K., Maeurer, M.J., Stoerkel, S.S., and Loos, M. (1997). Altered (oxidized) C1q induces a rheumatoid arthritis-like destructive and chronic inflammation in joint structures in arthritis-susceptible rats. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 82, 149–156.
- Trouw, L.A., Haisma, E.M., Levarht, E.W.N., van der Woude, D., Ioan-Facsinay, A., Daha, M.R., Huizinga, T.W.J., and Toes, R.E. (2009). Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum.* 60, 1923–1931.
- Trouw, L.A., Daha, N., Kurreeman, F. a. S., Böhringer, S., Goulielmos, G.N., Westra, H.J., Zhernakova, A., Franke, L., Stahl, E.A., Levarht, E.W.N., et al. (2013). Genetic variants in the region of the C1q genes are associated with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 173, 76–83.
- Tsan, M.F. (1980). Phorbol myristate acetate induced neutrophil autotoxicity. *J. Cell. Physiol.* 105, 327–334.

## Bibliographie

---

- Tsaprouni, L.G., Yang, T.-P., Bell, J., Dick, K.J., Kanoni, S., Nisbet, J., Viñuela, A., Grundberg, E., Nelson, C.P., Meduri, E., et al. (2014). Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics* 9, 1382–1396.
- Tsark, E.C., Wang, W., Teng, Y.-C., Arkfeld, D., Dodge, G.R., and Kovats, S. (2002). Differential MHC Class II-Mediated Presentation of Rheumatoid Arthritis Autoantigens by Human Dendritic Cells and Macrophages. *J. Immunol.* 169, 6625–6633.
- Tsiakalos, A.P., Avgoustidis, N.K., and Moutsopoulos, H.M. (2008). Rituximab therapy in Greek patients with rheumatoid arthritis. *Biol. Targets Ther.* 2, 911–916.
- Tsiftoglou, S.A., Willis, A.C., Li, P., Chen, X., Mitchell, D.A., Rao, Z., and Sim, R.B. (2005). The Catalytically Active Serine Protease Domain of Human Complement Factor I. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 6239–6249.
- Tsuchimoto, Y., Asai, A., Tsuda, Y., Ito, I., Nishiguchi, T., Garcia, M.C., Suzuki, S., Kobayashi, M., Higuchi, K., and Suzuki, F. (2015). M2b Monocytes Provoke Bacterial Pneumonia and Gut Bacteria–Associated Sepsis in Alcoholics. *J. Immunol.* 195, 5169–5177.
- Türkoğlu, O., Emingil, G., Küçükçüler, N., and Atilla, G. (2009). Gingival Crevice Fluid Levels of Cathelicidin LL-37 and Interleukin-18 in Patients With Chronic Periodontitis. *J. Periodontol.* 80, 969–976.
- Turkstra, E., Ng, S.-K., and Scuffham, P.A. (2011). A mixed treatment comparison of the short-term efficacy of biologic disease modifying anti-rheumatic drugs in established rheumatoid arthritis. *Curr. Med. Res. Opin.* 27, 1885–1897.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.-N., Waring, A.J., and Lehrer, R.I. (1998). Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2206–2214.
- Udalova, I.A., Mantovani, A., and Feldmann, M. (2016). Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 472–485.
- Ueda, Y., Cain, D.W., Kuraoka, M., Kondo, M., and Kelsoe, G. (2009). IL-1RI dependent HSC proliferation is necessary for Inflammatory Granulopoiesis and Reactive Neutrophilia. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 6477–6484.
- Uhl, B., Vadlauer, Y., Zuchtriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F., and Reichel, C.A. (2016). Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood* 128, 2327–2337.
- Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8, 668–676.
- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., and Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5, e1000639.



## Bibliographie

---

- Uribe-Querol, E., and Rosales, C. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J. Immunol. Res.* 2015.
- Valesini, G., Gerardi, M.C., Iannuccelli, C., Pacucci, V.A., Pendolino, M., and Shoenfeld, Y. (2015). Citrullination and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 14, 490–497.
- Van Der Heijden, I.M., Wilbrink, B., Tchetverikov, I., Schrijver, I.A., Schouls, L.M., Hazenberg, M.P., Breedveld, F.C., and Tak, P.P. (2000). Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum.* 43, 593–598.
- Van Schravendijk, M.R., and Dwek, R.A. (1982). Interaction of C1q with DNA. *Mol. Immunol.* 19, 1179–1187.
- Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., and Schoofs, L. (2012). A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell. Immunol.* 280, 22–35.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.-D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal Lamina Propria Dendritic Cell Subsets Have Different Origin and Functions. *Immunity* 31, 502–512.
- Vassallo, R., Luckey, D., Behrens, M., Madden, B., Luthra, H., David, C., and Taneja, V. (2014). Cellular and humoral immunity in arthritis are profoundly influenced by the interaction between cigarette smoke effects and host HLA-DR and DQ genes. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 152, 25–35.
- Veiko, N.N., Shubaeva, N.O., Ivanova, S.M., Speranskii, A.I., Lyapunova, N.A., and Spitkovskii, D.M. (2006). Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bull. Exp. Biol. Med.* 142, 313–316.
- Velaga, M.R., Wilson, V., Jennings, C.E., Owen, C.J., Herington, S., Donaldson, P.T., Ball, S.G., James, R.A., Quinton, R., Perros, P., et al. (2004). The Codon 620 Tryptophan Allele of the Lymphoid Tyrosine Phosphatase (LYP) Gene Is a Major Determinant of Graves' Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5862–5865.
- Vergunst, C.E., Gerlag, D.M., Dinant, H., Schulz, L., Vinkenoog, M., Smeets, T.J.M., Sanders, M.E., Reedquist, K.A., and Tak, P.P. (2007). Blocking the receptor for C5a in patients with rheumatoid arthritis does not reduce synovial inflammation. *Rheumatology* 46, 1773–1778.
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., and Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4560–4565.
- Verstappen, S.M.M., King, Y., Watson, K.D., Symmons, D.P.M., and Hyrich, K.L. (2011). Anti-TNF therapies and pregnancy: outcome of 130 pregnancies in the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 823–826.
- Viatte, S., Plant, D., Han, B., Fu, B., Yarwood, A., Thomson, W., Symmons, D.P.M., Worthington, J., Young, A., Hyrich, K.L., et al. (2015). Association of HLA-DRB1

## Bibliographie

---

- Haplotypes With Rheumatoid Arthritis Severity, Mortality, and Treatment Response. *JAMA* 313, 1645–1656.
- Vidarsson, G., and Winkel, J.G. j van de (1998). Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 11, 271–278.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 366, 689–704.
- Vietinghoff, S. von, and Ley, K. (2008). Homeostatic Regulation of Blood Neutrophil Counts. *J. Immunol.* 181, 5183–5188.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C.C., Hodgins, J.B., Khandpur, R., Lin, A.M., Rubin, C.J., Zhao, W., Olsen, S.H., Klinker, M., et al. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 187, 538–552.
- Vincent, C., de Keyser, F., Masson-Bessiere, C., Sebbag, M., Veys, E., and Serre, G. (1999). Anti-perinuclear factor compared with the so called “antikeratin” antibodies and antibodies to human epidermis filaggrin, in the diagnosis of arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* 58, 42–48.
- Vitkov, L., Klappacher, M., Hannig, M., and Krautgartner, W.D. (2010). Neutrophil fate in gingival crevicular fluid. *Ultrastruct. Pathol.* 34, 25–30.
- Volanakis, J.E. (1982). Complement Activation by C-Reactive Protein Complexes\*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 389, 235–250.
- Vono, M., Lin, A., Norrby-Teglund, A., Koup, R.A., Liang, F., and Loré, K. (2017). Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. *Blood* 129, 1991–2001.
- Vossenaar, E.R., Nijenhuis, S., Helsen, M.M.A., van der Heijden, A., Senshu, T., van den Berg, W.B., van Venrooij, W.J., and Joosten, L.A.B. (2003). Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2489–2500.
- Wabe, N., and Wiese, M.D. (2017). Treating rheumatoid arthritis to target: physician and patient adherence issues in contemporary rheumatoid arthritis therapy. *J. Eval. Clin. Pract.* 23, 486–493.
- Walport, M.J. (2001). Complement. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 1140–1144.
- Walter, A., Schäfer, M., Cecconi, V., Matter, C., Urosevic-Maiwald, M., Belloni, B., Schönewolf, N., Dummer, R., Bloch, W., Werner, S., et al. (2013). Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nat. Commun.* 4, 1560.
- Wang, J. (2018). Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.* 371, 531–539.
- Wang, B., Zhao, P., Zhou, Y., Meng, L., Zhu, W., Jiang, C., Wang, L., Cai, Y., Lu, S., and Hou, W. (2017a). Increased expression of Th17 cytokines and interleukin-22 correlates with disease activity in pristane-induced arthritis in rats. *PLOS ONE* 12, e0188199.

- Wang, C.-H., Dai, J.-Y., Wang, L., Jia, J.-F., Zheng, Z.-H., Ding, J., Chen, Z.-N., and Zhu, P. (2011a). Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 850–860.
- Wang, F., Chen, F.-F., Gao, W.-B., Wang, H.-Y., Zhao, N.-W., Xu, M., Gao, D.-Y., Yu, W., Yan, X.-L., Zhao, J.-N., et al. (2016). Identification of citrullinated peptides in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis using LC-MALDI-TOF/TOF. *Clin. Rheumatol.* *35*, 2185–2194.
- Wang, J.-X., Bair, A.M., King, S.L., Shnyder, R., Huang, Y.-F., Shieh, C.-C., Soberman, R.J., Fuhlbrigge, R.C., and Nigrovic, P.A. (2012). Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a  $\beta$ 2-integrin-dependent mechanism. *Blood* *120*, 1489–1498.
- Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014). Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Front. Immunol.* *5*.
- Wang, W., Peng, W., and Ning, X. (2018). Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* *21*, 415–421.
- Wang, Y., Rollins, S.A., Madri, J.A., and Matis, L.A. (1995). Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8955–8959.
- Wang, Y., Kristan, J., Hao, L., Lenkoski, C.S., Shen, Y., and Matis, L.A. (2000). A Role for Complement in Antibody-Mediated Inflammation: C5-Deficient DBA/1 Mice Are Resistant to Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* *164*, 4340–4347.
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., et al. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* *184*, 205–213.
- Wang, Y., Chen, Y., Xin, L., Beverley, S.M., Carlsen, E.D., Popov, V., Chang, K.-P., Wang, M., and Soong, L. (2011b). Differential Microbicidal Effects of Human Histone Proteins H2A and H2B on *Leishmania* Promastigotes and Amastigotes. *Infect. Immun.* *79*, 1124–1133.
- Wang, Y., Han, C., Cui, D., Li, Y., Ma, Y., and Wei, W. (2017b). Is macrophage polarization important in rheumatoid arthritis? *Int. Immunopharmacol.* *50*, 345–352.
- Wantha, S., Alard, J.-E., Megens, R.T.A., Does, A.M. van der, Döring, Y., Drechsler, M., Pham, C.T.N., Wang, M.-W., Wang, J.-M., Gallo, R.L., et al. (2013). Neutrophil-Derived Cathelicidin Promotes Adhesion of Classical Monocytes Novelty and Significance. *Circ. Res.* *112*, 792–801.
- Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2015). Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* *349*, 316–320.
- Wassenberg, S., Rau, R., Steinfeld, P., Zeidler, H., and Low-Dose Prednisolone Therapy Study Group (2005). Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* *52*, 3371–3380.

## Bibliographie

---

- Webb, L.M., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Rot, A. (1993). Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 7158–7162.
- Webster, S., Bonnell, B., and Rogers, J. (1997). Charge-based binding of complement component C1q to the Alzheimer amyloid beta-peptide. *Am. J. Pathol.* *150*, 1531–1536.
- Wegner, N., Wait, R., Sroka, A., Eick, S., Nguyen, K.-A., Lundberg, K., Kinloch, A., Culshaw, S., Potempa, J., and Venables, P.J. (2010). Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *62*, 2662–2672.
- Weinmann, P., Moura, R.A., Caetano-Lopes, J.R., Pereira, P.A., Canhão, H., Queiroz, M.V., and Fonseca, J.E. (2007). Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy. *Clin. Exp. Rheumatol.* *25*, 885–887.
- Welin, A., Amirbeagi, F., Christenson, K., Björkman, L., Björnsdóttir, H., Forsman, H., Dahlgren, C., Karlsson, A., and Bylund, J. (2013). The Human Neutrophil Subsets Defined by the Presence or Absence of OLFM4 Both Transmigrate into Tissue In Vivo and Give Rise to Distinct NETs In Vitro. *PLOS ONE* *8*, e69575.
- Welsing, P.M.J., Landewé, R.B.M., Van Riel, P.L.C.M., Boers, M., Van Gestel, A.M., Van Der Linden, S., Swinkels, H.L., and Van Der Heijde, D.M.F.M. (2004). The relationship between disease activity and radiologic progression in patients with rheumatoid arthritis: A longitudinal analysis. *Arthritis Rheum.* *50*, 2082–2093.
- Wenink, M.H., Han, W., Toes, R.E., and Radstake, T.R. (2009). Dendritic cells and their potential implication in pathology and treatment of rheumatoid arthritis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 81–98.
- Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2003). Ectopic Germinal Center Formation in Rheumatoid Synovitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *987*, 140–149.
- Wheeler, M.A., Smith, S.D., García-Cardena, G., Nathan, C.F., Weiss, R.M., and Sessa, W.C. (1997). Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* *99*, 110–116.
- WILLIAMS, R.O. (1998). Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin. Exp. Immunol.* *114*, 330–332.
- Williams, R.O. (1998). Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin. Exp. Immunol.* *114*, 330–332.
- Willis, V.C., Gizinski, A.M., Banda, N.K., Causey, C.P., Knuckley, B., Cordova, K.N., Luo, Y., Levitt, B., Glogowska, M., Chandra, P., et al. (2011). N- $\alpha$ -Benzoyl-N<sup>5</sup>-(2-Chloro-1-Iminoethyl)-L-Ornithine Amide, a Protein Arginine Deiminase Inhibitor, Reduces the Severity of Murine Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 4396–4404.
- Willis, V.C., Demoruelle, M.K., Derber, L.A., Chartier-Logan, C.J., Parish, M.C., Pedraza, I.F., Weisman, M.H., Norris, J.M., Holers, V.M., and Deane, K.D. (2013). Sputum

Autoantibodies in Patients With Established Rheumatoid Arthritis and Subjects at Risk of Future Clinically Apparent Disease. *Arthritis Rheum.* 65, 2545–2554.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271–275.

Winthrop, K.L., Siegel, J.N., Jereb, J., Taylor, Z., and Iademarco, M.F. (2005). Tuberculosis associated with therapy against tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum.* 52, 2968–2974.

Wipke, B.T., Wang, Z., Kim, J., McCarthy, T.J., and Allen, P.M. (2002). Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography. *Nat. Immunol.* 3, 366–372.

Witko-Sarsat, V., Mocek, J., Bouayad, D., Tamassia, N., Ribeil, J.-A., Candalh, C., Davezac, N., Reuter, N., Mouthon, L., Hermine, O., et al. (2010). Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J. Exp. Med.* 207, 2631–2645.

Wittkowski, H., Foell, D., af Klint, E., De Rycke, L., De Keyser, F., Frosch, M., Ulfgren, A.-K., and Roth, J. (2007). Effects of intra-articular corticosteroids and anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 1020–1025.

Wolbink, G.J., Bossink, A.W., Groeneveld, A.B., de Groot, M.C., Thijs, L.G., and Hack, C.E. (1998). Complement activation in patients with sepsis is in part mediated by C-reactive protein. *J. Infect. Dis.* 177, 81–87.

Wolfe, F. (2000). The effect of smoking on clinical, laboratory, and radiographic status in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 27, 630–637.

Woude, D. van der, Rantapää-Dahlqvist, S., Ioan-Facsinay, A., Onnekink, C., Schwarte, C.M., Verpoort, K.N., Drijfhout, J.W., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., and Pruijn, G.J.M. (2010). Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1554–1561.

Wright, D.G., Bralove, D.A., and Gallin, J.I. (1977). The differential mobilization of human neutrophil granules. Effects of phorbol myristate acetate and ionophore A23187. *Am. J. Pathol.* 87, 237–284.

Wright, H.L., Chikura, B., Bucknall, R.C., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2011). Changes in expression of membrane TNF, NF- $\kappa$ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 537–543.

Wright, H.L., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*

Wu, C.-Y., Chi, P.-L., Hsieh, H.-L., Luo, S.-F., and Yang, C.-M. (2010a). TLR4-dependent induction of vascular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: Roles of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ /cyclooxygenase-2. *J. Cell. Physiol.* 223, 480–491.

## Bibliographie

---

- Wu, H.-J., Sawaya, H., Binstadt, B., Brickelmaier, M., Blasius, A., Gorelik, L., Mahmood, U., Weissleder, R., Carulli, J., Benoist, C., et al. (2007). Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J. Exp. Med.* *204*, 1911–1922.
- Wu, H.-J., Ivanov, I.I., Darce, J., Hattori, K., Shima, T., Umesaki, Y., Littman, D.R., Benoist, C., and Mathis, D. (2010b). Gut-Residing Segmented Filamentous Bacteria Drive Autoimmune Arthritis via T Helper 17 Cells. *Immunity* *32*, 815–827.
- Xu, H., Yang, J., Gao, W., Li, L., Li, P., Zhang, L., Gong, Y.-N., Peng, X., Xi, J.J., Chen, S., et al. (2014). Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* *513*, 237–241.
- Xu X., and Håkansson L. (2002). Degranulation of Primary and Secondary Granules in Adherent Human Neutrophils. *Scand. J. Immunol.* *55*, 178–188.
- Yamakawa, M., Ouhara, K., Kajiya, M., Munenaga, S., Kittaka, M., Yamasaki, S., Takeda, K., Takeshita, K., Mizuno, N., Fujita, T., et al. (2016). Porphyromonas gingivalis infection exacerbates the onset of rheumatoid arthritis in SKG mice. *Clin. Exp. Immunol.* *186*, 177–189.
- Yamamoto, K., Okada, Y., Suzuki, A., and Kochi, Y. (2015). Genetics of rheumatoid arthritis in Asia—present and future. *Nat. Rev. Rheumatol.* *11*, 375.
- Yamasaki, K., Schaubert, J., Coda, A., Lin, H., Dorschner, R.A., Schechter, N.M., Bonnart, C., Descargues, P., Hovnanian, A., and Gallo, R.L. (2006). Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 2068–2080.
- Yang, C.-A., and Chiang, B.-L. (2015). Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* *61*, 1–8.
- Yang, H., Biermann, M.H., Brauner, J.M., Liu, Y., Zhao, Y., and Herrmann, M. (2016). New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Front. Immunol.* *7*.
- Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008). IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human T<sub>H</sub>17 cells. *Nature* *454*, 350–352.
- Yang, M., Feng, X., Ding, J., Chang, F., and Chen, X. (2017). Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis. *J. Controlled Release* *252*, 108–124.
- Yarilina, A., DiCarlo, E., and Ivashkiv, L.B. (2007). Suppression of the Effector Phase of Inflammatory Arthritis by Double-Stranded RNA Is Mediated by Type I IFNs. *J. Immunol.* *178*, 2204–2211.
- Ye, L., Wen, Z., Li, Y., Chen, B., Yu, T., Liu, L., Zhang, J., Ma, Y., Xiao, S., Ding, L., et al. (2014). Interleukin-10 attenuation of collagen-induced arthritis is associated with suppression of interleukin-17 and retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t production in macrophages and repression of classically activated macrophages. *Arthritis Res. Ther.* *16*, R96.

- Yeadon, C., and Karsh, J. (1983). Lymphapheresis in rheumatoid arthritis. The clinical and laboratory effects of a limited course of cell depletion. *Clin. Exp. Rheumatol.* *1*, 119–124.
- Yeo, L., Toellner, K.-M., Salmon, M., Filer, A., Buckley, C.D., Raza, K., and Scheel-Toellner, D. (2011). Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 2022–2028.
- Yipp, B.G., and Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it? *Blood* *122*, 2784–2794.
- Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N.V., Zbytniuk, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*. *Nat. Med.* *18*, 1386–1393.
- Yoshino, S., Schlipkötter, E., Kinne, R., Hünig, T., and Emrich, F. (1990). Suppression and prevention of adjuvant arthritis in rats by a monoclonal antibody to the alpha/beta T cell receptor. *Eur. J. Immunol.* *20*, 2805–2808.
- Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Kobayashi, K., Brown, G.D., Tagami, T., Sakihama, T., Hirota, K., Tanaka, S., Nomura, T., Miki, I., et al. (2005). A role for fungal  $\beta$ -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J. Exp. Med.* *201*, 949–960.
- Youinou, P., Taher, T.E., Pers, J.-O., Mageed, R.A., and Renaudineau, Y. (2009). B lymphocyte cytokines and rheumatic autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* *60*, 1873–1880.
- Yousefi, S., Blaser, K., and Simon, H.U. (1997). Activation of signaling pathways and prevention of apoptosis by cytokines in eosinophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *112*, 9–12.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., and Simon, H.U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* *16*, 1438–1444.
- Yu, D., Rumore, P.M., Liu, Q., and Steinman, C.R. (1997). Soluble oligonucleosomal complexes in synovial fluid from inflamed joints. *Arthritis Rheum.* *40*, 648–654.
- Yu, N., Zhang, S., Zuo, F., Kang, K., Guan, M., and Xiang, L. (2009). Cultured human melanocytes express functional toll-like receptors 2-4, 7 and 9. *J. Dermatol. Sci.* *56*, 113–120.
- Yu, Y., Koehn, C.D., Yue, Y., Li, S., Thiele, G.M., Heath-Holmes, M.P., Mikuls, T.R., O'Dell, J.R., Klassen, L.W., Zhang, Z., et al. (2015). Celastrol Inhibits Inflammatory Stimuli-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Curr. Mol. Med.* *15*, 401–410.
- Yuan, G., Wei, J., Zhou, J., Hu, H., Tang, Z., and Zhang, G. (2003). Expression of C5aR (CD88) of synoviocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Chin. Med. J. (Engl.)* *116*, 1408–1412.
- Yuo, A., Kitagawa, S., Suzuki, I., Urabe, A., Okabe, T., Saito, M., and Takaku, F. (1989). Tumor necrosis factor as an activator of human granulocytes. Potentiation of the metabolisms triggered by the Ca<sup>2+</sup>-mobilizing agonists. *J. Immunol.* *142*, 1678–1684.
- Zabieglo, K., Majewski, P., Majchrzak-Gorecka, M., Wlodarczyk, A., Grygier, B., Zegar, A., Kapinska-Mrowiecka, M., Naskalska, A., Pyrc, K., Dubin, A., et al. (2015). The inhibitory

effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on formation of neutrophil extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.* 98, 99–106.

van Zeben, D., Hazes, J.M., Zwinderman, A.H., Cats, A., van der Voort, E.A., and Breedveld, F.C. (1992). Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann. Rheum. Dis.* 51, 1029–1035.

Zenobia, C., and Hajishengallis, G. (2015). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol.* 2000 69, 142–159.

Zernecke, A., Bot, I., Djalali-Talab, Y., Shagdarsuren, E., Bidzhekov, K., Meiler, S., Krohn, R., Schober, A., Sperandio, M., Soehnlein, O., et al. (2008). Protective Role of CXC Receptor 4/CXC Ligand 12 Unveils the Importance of Neutrophils in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 102, 209–217.

Zhang, X., and Soldati, T. (2016). Of Amoebae and Men: Extracellular DNA Traps as an Ancient Cell-Intrinsic Defense Mechanism. *Front. Immunol.* 7.

Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J.J., Burk, R.D., Kunisaki, Y., Jang, J.-E., Scheiermann, C., et al. (2015a). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 525, 528–532.

Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2009a). Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity* 31, 761–771.

Zhang, X., Zhang, D., Jia, H., Feng, Q., Wang, D., Liang, D., Wu, X., Li, J., Tang, L., Li, Y., et al. (2015b). The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med.* 21, 895–905.

Zhang, X., Zhuchenko, O., Kuspa, A., and Soldati, T. (2016). Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat. Commun.* 7, 10938.

Zhang, Z., Cherryholmes, G., and Shively, J.E. (2008). Neutrophil secondary necrosis is induced by LL-37 derived from cathelicidin. *J. Leukoc. Biol.* 84, 780–788.

Zhang, Z., Cherryholmes, G., Chang, F., Rose, D.M., Schraufstatter, I., and Shively, J.E. (2009b). EVIDENCE THAT CATHELICIDIN PEPTIDE LL-37 MAY ACT AS A FUNCTIONAL LIGAND FOR CXCR2 ON HUMAN NEUTROPHILS. *Eur. J. Immunol.* 39, 3181–3194.

Zhao, W., Fogg, D.K., and Kaplan, M.J. (2015). A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J. Immunol. Methods* 423, 104–110.

Zhao, X., Okeke, N.L., Sharpe, O., Batliwalla, F.M., Lee, A.T., Ho, P.P., Tomooka, B.H., Gregersen, P.K., and Robinson, W.H. (2008). Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10, R94.

Zheng, B., Li, Q., Wei, C., Qin, J., Shou, T., Zhou, R., Shao, J., Yang, Y., and Xiao, C. (2010). Lack of association of TLR4 gene Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population of Yunnan Province. *Rheumatol. Int.* 30, 1249–1252.



## Bibliographie

---

- Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2007). Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils. *Br. J. Dermatol.* *157*, 1124–1131.
- Zhong, Y., Kinio, A., and Saleh, M. (2013). Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front. Immunol.* *4*.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* *469*, 221–225.
- Zimmerli, S., Majeed, M., Gustavsson, M., Stendahl, O., Sanan, D.A., and Ernst, J.D. (1996). Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages. *J. Cell Biol.* *132*, 49–61.
- Zipfel, P.F., Heinen, S., Józsi, M., and Skerka, C. (2006). Complement and diseases: Defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol. Immunol.* *43*, 97–106.
- Zubler, R.H., Nydegger, U., Perrin, L.H., Fehr, k, McCormick, J., Lambert, P.H., and Miescher, P.A. (1976). Circulating and intra-articular immune complexes in patients with rheumatoid arthritis. Correlation of 125I-Clq binding activity with clinical and biological features of the disease. *J. Clin. Invest.* *57*, 1308–1319.
- Zucker, M.B., Troll, W., and Belman, S. (1974). THE TUMOR-PROMOTER PHORBOL ESTER (12-O-TETRADECANOYL-PHORBOL-13-ACETATE), A POTENT AGGREGATING AGENT FOR BLOOD PLATELETS. *J. Cell Biol.* *60*, 325–336.
- Zughaier, S.M., Shafer, W.M., and Stephens, D.S. (2005). Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cell. Microbiol.* *7*, 1251–1262.
- Zutter, M.M., and Edelson, B.T. (2007). The  $\alpha 2\beta 1$  integrin: A novel collectin/C1q receptor. *Immunobiology* *212*, 343–353.
- Zvaifler, N.J. (1973). The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.* *16*, 265–336.
- Zvaifler, N.J., Steinman, R.M., Kaplan, G., Lau, L.L., and Rivelis, M. (1985). Identification of immunostimulatory dendritic cells in the synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* *76*, 789–800.



La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique et auto-immune, caractérisée par la production d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) et l'infiltration dans la synovite rhumatoïde de neutrophiles (PNN), macrophages (MΦ), cellules dendritiques (DC),... Parmi ces cellules infiltrées, nous distinguons les PNN qui participent à la pathogénèse de la PR via la production de cytokines, d'espèces réactives de l'oxygène mais aussi comme suggéré récemment via la libération (NETose) de "Neutrophil Extracellular Traps" (NET), un filet de chromatine associé aux protéines des granules et cytoplasmiques. En effet, il a été rapporté que le liquide synovial de patients PR induisait la NETose des PNN et que les ACPA reconnaissaient les protéines citrullinées portées par les NET. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les NET déclenchent ou perpétuent le processus inflammatoire dans la PR restent peu clairs. Par conséquent, nous avons analysé les propriétés antigéniques et immunogènes des NET sur les cellules myéloïdes impliquées dans la PR. Nous avons montré que les PNN de PR produisent plus de NET et ces derniers sont plus actifs. Les NET sont pro-inflammatoires sur les PNN, les MΦ mais aussi sur les monocytes et les DC au repos en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8. Par ailleurs, les NET sont reconnus par les immunoglobulines de patients PR contenant des ACPA mais l'activation des cellules cibles (PNN et MΦ) par les NET est indépendante de leur reconnaissance par ces ACPA ou le récepteur de type Toll 9. Par contre, le C1q et le LL-37 favorisent la reconnaissance des NET par les MΦ. Par ailleurs, en fonction de l'état d'activation des cellules et du type cellulaire, les NET peuvent présenter un rôle anti-inflammatoire qui est observé sur les cellules activées par LPS. Néanmoins, malgré leur possible effet immunomodulateur, les NET agissent préférentiellement sur les MΦ M1 pro-inflammatoires et les activent, confirmant le rôle des NET dans le maintien de l'inflammation observée lors de la PR.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory and autoimmune disease, characterized by the production of antibodies against citrullinated proteins (ACPA) and infiltration of synovial compartment by neutrophils (PMN), macrophages (MΦ), dendritic cells (DC)... Among these infiltrated cells, we distinguish PMN that participate in the pathogenesis of RA via the production of cytokines, reactive oxygen species, but also via the release (NETosis) of Neutrophil Extracellular Traps (NET), a network of chromatin associated with proteins from cytoplasm and granules. Indeed, it has been reported that synovial fluid of RA patients induce NETosis of PMN and that ACPA recognize citrullinated proteins carried by NET. Nevertheless, the mechanisms by which NET trigger or perpetuate the inflammatory process in RA remain unclear. Therefore, we analyzed the antigenic and immunogenic properties of NET on myeloid cells involved in RA. We have shown that RA PMN produce more NET and these NET are more active. NET are pro-inflammatory on resting PMN, MΦ but also on monocytes and DC by inducing the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-8. Moreover, NET are recognized by ACPA but the activation of the target cells (PMN and MΦ) by NET is independent of their recognition by these ACPA and Toll like receptor 9. On the contrary, the C1q and the LL-37 favor the recognition of NET by MΦ. Moreover, depending on the activation state of the cells and the cell type, NET exhibit also an anti-inflammatory role which is observed on LPS-activated MΦ. Nevertheless, despite their possible immunomodulatory effect, NET preferentially act on pro-inflammatory M1 MΦ to induce activation, confirming the role of NET in maintaining the inflammation observed during RA.

Discipline : Biologie, mention : Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Mots clés : Neutrophil Extracellular Traps, Neutrophiles, Macrophages, Polyarthrite rhumatoïde, Inflammation.

UMR INSERM 1125, Université Paris XIII, USPC, 1 rue de Chablis, 93000, Bobigny.



La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique et auto-immune, caractérisée par la production d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) et l'infiltration dans la synovite rhumatoïde de neutrophiles (PNN), macrophages (MΦ), cellules dendritiques (DC),... Parmi ces cellules infiltrées, nous distinguons les PNN qui participent à la pathogénèse de la PR via la production de cytokines, d'espèces réactives de l'oxygène mais aussi comme suggéré récemment via la libération (NETose) de "Neutrophil Extracellular Traps" (NET), un filet de chromatine associé aux protéines des granules et cytoplasmiques. En effet, il a été rapporté que le liquide synovial de patients PR induisait la NETose des PNN et que les ACPA reconnaissent les protéines citrullinées portées par les NET. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les NET déclenchent ou perpétuent le processus inflammatoire dans la PR restent peu clairs. Par conséquent, nous avons analysé les propriétés antigéniques et immunogènes des NET sur les cellules myéloïdes impliquées dans la PR. Nous avons montré que les PNN de PR produisent plus de NET et ces derniers sont plus actifs. Les NET sont pro-inflammatoires sur les PNN, les MΦ mais aussi sur les monocytes et les DC au repos en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8. Par ailleurs, les NET sont reconnus par les immunoglobulines de patients PR contenant des ACPA mais l'activation des cellules cibles (PNN et MΦ) par les NET est indépendante de leur reconnaissance par ces ACPA ou le récepteur de type Toll 9. Par contre, le C1q et le LL-37 favorisent la reconnaissance des NET par les MΦ. Par ailleurs, en fonction de l'état d'activation des cellules et du type cellulaire, les NET peuvent présenter un rôle anti-inflammatoire qui est observé sur les cellules activées par LPS. Néanmoins, malgré leur possible effet immunomodulateur, les NET agissent préférentiellement sur les MΦ M1 pro-inflammatoires et les activent, confirmant le rôle des NET dans le maintien de l'inflammation observée lors de la PR.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory and autoimmune disease, characterized by the production of antibodies against citrullinated proteins (ACPA) and infiltration of synovial compartment by neutrophils (PMN), macrophages (MΦ), dendritic cells (DC)... Among these infiltrated cells, we distinguish PMN that participate in the pathogenesis of RA via the production of cytokines, reactive oxygen species, but also via the release (NETosis) of Neutrophil Extracellular Traps (NET), a network of chromatin associated with proteins from cytoplasm and granules. Indeed, it has been reported that synovial fluid of RA patients induce NETosis of PMN and that ACPA recognize citrullinated proteins carried by NET. Nevertheless, the mechanisms by which NET trigger or perpetuate the inflammatory process in RA remain unclear. Therefore, we analyzed the antigenic and immunogenic properties of NET on myeloid cells involved in RA. We have shown that RA PMN produce more NET and these NET are more active. NET are pro-inflammatory on resting PMN, MΦ but also on monocytes and DC by inducing the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-8. Moreover, NET are recognized by ACPA but the activation of the target cells (PMN and MΦ) by NET is independent of their recognition by these ACPA and Toll like receptor 9. On the contrary, the C1q and the LL-37 favor the recognition of NET by MΦ. Moreover, depending on the activation state of the cells and the cell type, NET exhibit also an anti-inflammatory role which is observed on LPS-activated MΦ. Nevertheless, despite their possible immunomodulatory effect, NET preferentially act on pro-inflammatory M1 MΦ to induce activation, confirming the role of NET in maintaining the inflammation observed during RA.

Discipline : Biologie, mention : Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Mots clés : Neutrophil Extracellular Traps, Neutrophiles, Macrophages, Polyarthrite rhumatoïde, Inflammation.

UMR INSERM 1125, Université Paris XIII, USPC, 1 rue de Chablis, 93000, Bobigny.