



HAL
open science

Etude fonctionnelle du “ Toll-like receptor 9 ” et des neutrophiles au cours de l’inflammation : implication dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde et d’un modèle expérimental

Julie Mussard

► **To cite this version:**

Julie Mussard. Etude fonctionnelle du “ Toll-like receptor 9 ” et des neutrophiles au cours de l’inflammation : implication dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde et d’un modèle expérimental. Biologie moléculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015US-PCD015 . tel-01497415

HAL Id: tel-01497415

<https://theses.hal.science/tel-01497415>

Submitted on 28 Mar 2017

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

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

UNIVERSITE PARIS 13 – SORBONNE PARIS CITE
UFR DE SANTE-MEDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Biologie, Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Etude fonctionnelle du « Toll-like receptor 9 » et des neutrophiles
au cours de l'inflammation : implication dans le développement
de la polyarthrite rhumatoïde et d'un modèle expérimental**

Présentée par

Julie MUSSARD

Soutenue publiquement le 17 avril 2015

Jury

Dr Bénédicte Manoury (Université Paris Descartes)	Rapporteur
Pr Olivier Vittecoq (Université de Rouen)	Rapporteur
Dr Gilles Chiocchia (Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines)	Rapporteur
Dr Nadine Varin-Blank (Université Paris 13)	Examineur
Pr Gérard Perret (Université Paris 13)	Examineur
Dr Patrice Decker (Université Paris 13)	Directeur de thèse

Travail réalisé dans le **laboratoire UMR INSERM 1125**, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Marie-Christophe Boissier pour m'avoir ouvert les portes du Li2P UMR1125, pour ses valeurs et pour ses exigences. Merci pour le « coup de pouce » financier et pour les bons moments lors de congrès notamment.

Je tiens à remercier le Dr Bénédicte Manoury, le Pr Olivier Vittecoq et le Dr Gilles Chiocchia d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, du temps qu'ils m'ont consacré, aux suggestions et conseils qu'ils m'ont m'apporté.

Je souhaite aussi remercier le Dr Nadine Varin-Blank et le Pr Gérard Perret d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Merci à mon directeur de thèse Patrice Decker pour m'avoir appris la rigueur scientifique et pour avoir corrigé ce manuscrit. Merci pour tes petits plats gastronomiques et pour tes « arbres des manip » qui commençaient toujours avec un UN tronc, puis DEUX branches, puis QUATRE rameaux pour finir avec 2^{10} feuilles (= conditions de cultures) et un petit « s'qui s'rait bien » qui parfois me rendaient folle. Tous ces arbres cumulés ont fini par faire une grande forêt de beaux résultats, et je t'en remercie.

Merci à Matthieu, mon binôme « pioux-pioux » et ami, pour avoir été à mes côtés dans les très bons moments (comme dans les mauvais). Ta rigueur, ta franchise et ton humour rythment la vie du labo et celle de ta voisine de bureau. J'ai passé de très longues heures au labo et au cytomètre à regarder défiler les cellules avec toi, ce qui a valu de bons moments de poilade mais aussi d'élargissement de nos cernes. Tu m'as aussi bien appris la cytométrie que l'électricité ou le fonctionnement d'une pompe à chaleur ! Merki pour tout !

Je remercie les « séniors » du laboratoire et en particulier Anne (pour le dépannage de capsules de café et pour les discussions du midi), Natacha (pour avoir été un temps ma co-directrice et pour les rires qu'on entend fuser des bureaux), Eric (pour tes anecdotes), Luca (pour les infomations « cliniques » et la mozzarella), Gaëlle (pour ta « contribution histologique » et pour ton aide précieuse) et Frédéric (pour les conseils dermato et tes petites histoires).

Merci à Delphine et Roxane, les « gardiennes » du laboratoire qui nous facilitent les manip et la vie de manière générale. Merci pour vos sourires, votre bienveillance et pour les conversations qu'on a pu avoir.

Merci aux étudiants passés et présents, en particulier Jérôme et Allan (les « gars ») pour leurs bons conseils, Sandrine pour m'avoir soutenue pendant mon master, ainsi que la relève François et la petite Sarra. Un grand merci à Dennis Lindau que je n'ai pas eu l'occasion de rencontrer mais qui a énormément contribué à ce travail. Petit clin d'œil spécial à Allan, qui a parsemé nos discussions amicales et scientifiques de perles issues d'un français ré-inventé.

Merci aux donneurs anonymes de l'EFS et aux patients qui ont participé à cette étude en donnant de leur personne ainsi que les infirmières préleveuses et Mylène Petit qui a coordonné tout cela. Merci aux souris qui du haut de leurs quelques centimètres apportent beaucoup à la science, et à leurs gardiens passés et présents (Stéphane, Sonia et Samira).

Merci à mes parents sans qui je ne serais pas arrivée jusqu'ici, qui m'ont soutenue tout au long de mes études et qui m'ont inculqué bon nombre de valeurs. Je remercie aussi sincèrement mes sœurs sans qui j'aurais certainement été différente (peut être en mieux !!). Merci à ma famille au sens large et à ma nièce pour sa joie de vivre.

Une pensée pour mon grand-père qui malgré lui a guidé mon parcours...

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE	9
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	15
ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION.....	25
<i>I. La polyarthrite rhumatoïde.....</i>	27
A. Historique.....	27
B. Aspects cliniques et évolution.....	28
C. Etiologie.....	31
1. Facteurs génétiques	31
2. Facteurs hormonaux et sexuels	32
3. Facteurs environnementaux	34
a) Le tabac	34
b) Agents infectieux.....	34
D. Immunopathologie de la PR.....	36
1. Les acteurs cellulaires	36
a) Les cellules de l'immunité adaptative	38
b) Les cellules de l'immunité innée.....	42
c) Dérèglements des cellules immunitaires et ostéo-articulaires dans la PR.....	49
2. Les facteurs solubles	52
a) Les cytokines.....	52
b) Les auto-anticorps	57
c) Le système du complément	58
E. Les traitements de la PR.....	62
1. Les traitements conventionnels	62
2. Les traitements ciblés.....	63
a) Les anti-TNF α	64
b) Les thérapies ciblant l'IL6.....	65
c) Autres thérapies anti-cytokines	65
d) Thérapies ciblant les lymphocytes B.....	66
e) Thérapie ciblant l'interaction cellules dendritiques/lymphocytes T.....	66
F. Les modèles expérimentaux de la PR	67
1. L'arthrite expérimentale au collagène.....	67
2. Modèles d'arthrites spontanées	69
a) L'arthrite de la souris K/BxN.....	69

b) L'arthrite de la souris transgénique pour le TNF α humain	69
c) L'arthrite de la souris déficiente pour l'IL-1Ra.....	70
3. Le modèle CAIA (Collagen antibody-induced arthritis).....	70
II. Les récepteurs de type Toll.....	71
A. Généralités sur les TLRs.....	71
1. Historique.....	71
2. Structure des TLR et transduction du signal	73
3. Les TLR de surface	74
4. Les TLR endosomaux	75
B. Le TLR9	76
1. Généralités	76
2. Du gène à la protéine	76
3. Ligands agonistes et antagonistes du TLR9	81
a) Les ligands synthétiques du TLR9	82
b) Les ligands naturels PAMP et DAMP	82
4. Activation et immuno-modulation cellulaires induites par le TLR9	85
5. Implication du TLR9 dans la polyarthrite rhumatoïde et le LES	87
a) Implication du TLR9 dans la polyarthrite rhumatoïde.	87
b) Rôle du TLR9 dans le LES.....	91
OBJECTIFS.....	93
RESULTATS	97
<i>I. ARTICLE n°1.....</i>	<i>99</i>
<i>II. ARTICLE n°2.....</i>	<i>117</i>
<i>III. ARTICLE n°3.....</i>	<i>129</i>
<i>IV. ARTICLE n°4 :.....</i>	<i>135</i>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	149
<i>I. Les neutrophiles expriment un TLR9 de surface fonctionnel.....</i>	<i>151</i>
A. Les neutrophiles et le TLR9	151
B. Expression du TLR9 à la surface des neutrophiles	152
C. Fonctionnalité du TLR9 à la surface des neutrophiles	153
D. Conséquences de l'expression du TLR9 à la surface des neutrophiles.....	155

<i>II. Implication du TLR9 dans le développement de l'arthrite chez la souris et à un stade avéré de l'inflammation dans la polyarthrite rhumatoïde.....</i>	157
A. Conséquences de l'absence du TLR9 dans l'AEC	157
1. Le modèle animal.....	157
2. L'absence de TLR9 n'influence pas le développement de l'AEC	158
B. Expression du TLR9 chez les patients PR.....	160
<i>III. C1q : une protéine du complément impliquée dans le développement de l'arthrite et dont l'expression des récepteurs est corrélée à l'inflammation</i>	162
A. C1q est absolument nécessaire au développement de l'AEC	162
B. La capacité des PNN et des monocytes à lier C1q est corrélée à l'activité de la maladie.	164
<i>IV. Les neutrophiles sont une source d'IFN-α</i>	166
CONCLUSION.....	169
BIBLIOGRAPHIE	175
ANNEXES.....	199
<i>I. Annexe 1 : figures et informations supplémentaires relatives à l'article 1 : Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9.....</i>	199
<i>II. Annexe 2 : figures et informations supplémentaires relatives à l'article n°4 : TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen.....</i>	211

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<i>Figure 1 : Vue schématique (a,b) et radiographie des métacarpes (c,d) d'une articulation normale (a,c) et d'une articulation de patient atteint de PR.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 2: Les médiateurs cellulaires impliqués dans l'inflammation et la destruction articulaire.....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 3: Différentiation des cellules T CD4 selon l'environnement cytokinique.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 4: Neutrophil Extracellular Traps (NET).....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 5: Tolérance immunologique induite par les cellules dendritiques et IDO</i>	<i>48</i>
<i>Figure 6: Interactions cellulaires et cytokiniques impliquées dans la physiopathologie de la PR.....</i>	<i>53</i>
<i>Figure 7 : voies d'activation du système du complément</i>	<i>59</i>
<i>Figure 8: Les principales biothérapies utilisées dans la PR et leurs cibles immunologiques.</i>	<i>64</i>
<i>Figure 9: Les TLR et leurs voies de signalisation.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 10 : Structure de la protéine TLR9 localisée dans le réticulum endoplasmique ou dans l'endosome</i>	<i>79</i>
<i>Figure 11 : Protéines chaperonnes et trafic intracellulaire des TLR7 et 9</i>	<i>80</i>
<i>Figure 12: Implications possibles du TLR9 dans la PR et ses modèles animaux</i>	<i>91</i>
<i>Figure 13: Le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'AEC.....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 14: L'inflammation et la destruction articulaire sont similaires chez les souris TLR9-KO et sauvages.....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 15: La production d'anticorps anti-collagène est similaire chez les souris n'exprimant pas le TLR9 comparées aux souris sauvages.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 16: Les cellules de souris TLR9-KO et sauvages ont les mêmes capacités d'ostéoclastogénèse.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 17: Cytokines produites in vivo pendant l'AEC.....</i>	<i>123</i>
<i>Figure 18: Les souris TLR9-KO expriment le TLR7 à des taux similaires comparées aux souris sauvages dans l'AEC.....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 19: Les souris TLR9-KO répondent plus fortement à un ligand TLR7</i>	<i>125</i>
<i>Figure 20: Le TLR9 n'est pas surexprimé dans les cellules de patients PR.....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 21: Le TLR9 est surexprimé après stimulation par son ligand activateur.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 22: C1q est indispensable au développement de l'arthrite</i>	<i>132</i>
<i>Figure 23 : C3a est produit chez les souris C1q-KO lors de l'AEC.....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 24: Les souris C1q-KO produisent moins d'IL-6 in vivo au cours de l'AEC.</i>	<i>133</i>
<i>Figure 25: Corrélation entre la fixation de C1q sur les PNN et le DAS28</i>	<i>134</i>
<i>Figure 26 : Schéma résumé des travaux menés, les possibles interactions et les questions soulevées.....</i>	<i>172</i>

<i>Tableau 1 : Liste non exhaustive des principaux médiateurs chimiques sécrétés par les neutrophiles.....</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 2: Les TLR chez l'homme, leurs principaux ligands et les cytokines induites.....</i>	<i>72</i>

ABREVIATIONS

aa:	Acide aminé
Ac:	Anticorps
AC:	“Ammonium chloride”, chlorure d’amonium
ACPA:	“Anti-Citrullinated Protein Antibody”, anticorps anti-protéines citrullinées
ACR :	American College of Rheumatology
AEC:	Arthrite Expérimentale au Collagène
Ag:	Antigène
AINS:	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMM:	Autorisation de mise sur le marché
ANCA:	Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody
APRIL:	A Proliferation Inducing Ligand
BAFF:	B-Cell-activating factor
BCR:	“B Cell Receptor”, récepteur des cellules B
CAIA:	“Collagen Antibody-Induced arthritis”, arthrite induite par des anticorps anti-collagène
CFA:	“Complete Freund Adjuvant”, adjuvant complet de Freund
CI:	Complexe Immun
CII:	Collagène de type II
CMH:	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
convDC:	Cellule dendritique conventionnelle
CPA :	Cellule Présentatrice d’Antigène
CQ :	Chloroquine
CRP :	“C Reactive Protein”, protéine C réactive
CTLA-4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
DAMP :	Damage-Associated Molecular Patterns
DAS28 :	Disease Activity Score 28
DMARD :	Disease-Modifying Antirheumatic Drug
db :	Double brin
DC:	“Dendritic Cells”, cellules dendritiques
EULAR :	European League Against Rheumatism
FR:	Facteurs Rhumatoïdes
GM-CSF:	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor
GWAS:	“Genome-Wide Association Study”, étude d’association pan-génomique

HLA:	Human Leukocyte Antigen
HMGB1:	High-mobility Group Protein B1
IA:	Intra-articulaire
IDO:	Indoléamine 2,3 dioxygénase
IFA:	“Incomplete Freund Adjuvant”, adjuvant incomplet de Freund
IFN:	Interféron
Ig:	Immunoglobuline
IL:	Interleukine
IL-1Ra :	IL-1 Receptor Antagonist
IP :	Intra-péritonéale
IRF :	IFN-Regulatory Factor
IV :	Intra-veineux
J :	Jour
KO :	Knock-Out
LB :	Lymphocyte B
LBP :	LPS-Binding Protein
LES :	Lupus Erythémateux Systémique
LT :	Lymphocyte T
LPS :	Lipopolysaccharide
LRR :	Leucine Rich Repeats
MBP:	Mannose-Binding Protein
M-CSF :	Macrophage Colony-Stimulating Factor
mDC :	Cellules dendritiques myéloïdes
MMP :	Métalloprotéase
MPO :	Myéloperoxydase
mt :	Mitochondrie
MTX :	Méthotrexate
MyD88 :	Myeloid Differentiation Primary Response gene 88
NADPH oxidase :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène-oxidase
NET :	Neutrophil Extracellular Traps
NFκB :	Nuclear Factor-Kappa B
NK :	Natural Killer
NKT :	Lymphocyte T NK
N-ter :	N terminal

ODN :	Oligodeoxynucléotide
PADI :	Peptidylarginine Deiminase
PAMP :	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMC :	“Peripheral Blood Mononuclear Cells”, cellules mononuclées du sang périphérique
pDC:	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PNN :	Polynucléaires neutrophiles
PRR :	Pattern Recognition Receptors
RANKL :	Receptor Activator of NFκB Ligand
RE:	Réticulum Endoplasmique
ROS:	“Reactive Oxygen-Species”, espèces réactives de l’oxygène
sb :	Simple brin
SB:	Synoviocytes de type B
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism
STING :	Stimulator of Interferon Genes
TCR :	“T Cell Receptor”, récepteur des cellules T
Th:	Lymphocyte T auxiliaire ou helper
TLR:	“Toll-Like Receptor”, récepteur de type Toll
TNFα:	Tumor Necrosis Factor α
tolDC:	Cellules dendritiques tolérogènes
TRAP :	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
Treg:	Lymphocyte T régulateur
Trp:	Tryptophane
VS:	Vitesse de sédimentation

INTRODUCTION

I. La polyarthrite rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques touchant entre 0,3 et 1% de la population (1). Cette maladie auto-immune peut survenir à tout âge mais concerne majoritairement les personnes âgées de 35 à 55 ans et touche trois fois plus les femmes que les hommes.

L'inflammation chronique de la membrane synoviale articulaire et la destruction progressive de l'os et du cartilage des patients PR diminuent la fonctionnalité de l'articulation et donc créent un handicap chez la personne atteinte. De plus, de nombreuses co-morbidités liées à cette inflammation chronique systémique, notamment cardio-vasculaires, mettent en jeu le pronostic vital et diminuent d'environ 10 ans l'espérance de vie(2). Cette maladie constitue donc un véritable problème de santé publique (arrêt prématuré de l'activité professionnelle, coût de traitement de l'ordre de 15 000€/an/patient).

L'étiologie précise de la PR n'est pas connue mais des facteurs environnementaux et génétiques semblent être impliqués. Néanmoins, les mécanismes de son entretien sont bien mieux décrits (gonflement de la membrane synoviale, infiltration de cellules inflammatoires, angiogénèse au sein de l'articulation). Cette pathologie serait liée à un dérèglement des réponses immunitaires adaptatives, notamment par la présence de lymphocytes T et B (LB et LT) auto-réactifs. Ces derniers sont à l'origine de la production d'auto-anticorps, comme par exemple les facteurs rhumatoïdes (FR) dirigés contre la partie constante d'immunoglobuline d'isotype G (IgG) ou encore des auto-anticorps dirigés contre des protéines citrullinées (ACPA pour *anti-citrullinated protein antibody*) retrouvés chez 60% des patients (3,4). Bien que les acteurs de l'immunité adaptative jouent un rôle clair dans cette pathologie, nous pouvons nous interroger sur l'implication de l'immunité innée dans les phases d'initiation, d'amplification ou de maintien de la PR.

A. Historique

Contrairement à d'autres maladies rhumatismales décrites depuis l'antiquité, la première description précise de la PR n'a été faite qu'en 1800 par Auguste Jacob Landré-Beauvais dans sa thèse intitulée « *Doit-on admettre une nouvelle espèce de GOUTTE sous la dénomination de GOUTTE asthénique primitive ?* »(5). Dans ce document, Landré-Beauvais décrit des symptômes différents de ceux attribués à la « goutte » (ancienne dénomination de toute atteinte articulaire), qu'il associe à une nouvelle maladie : la goutte asthénique primitive. Il

souligne la prédominance féminine de cette maladie, le caractère chronique, l'atteinte de plusieurs articulations ainsi que l'altération de l'état de santé général du sujet. Néanmoins, la thèse de Landré-Beauvais est restée relativement méconnue pendant la première moitié du XIXe siècle. En 1853, Jean-Martin Charcot publie sa thèse de doctorat portant sur « la goutte asthénique »(6) dans laquelle il réalisa une étude statistique sur une quarantaine de cas cliniques. Ces travaux sont des précurseurs des études modernes de la PR car ils examinent notamment l'âge d'apparition de la maladie, le nombre d'articulations touchées, la fréquence des douleurs nocturnes ainsi que le caractère chronique de la maladie. Par ailleurs, l'auteur de ces travaux mit en évidence l'existence d'un phénomène d'hérédité chez 11 de ses patients. Le terme « rheumatoid arthritis » ou polyarthrite rhumatoïde a été introduit par Sir Alfred Baring Garrod en 1859 suggérant ainsi la reconnaissance d'une maladie distincte de la goutte et du rhumatisme(7).

B. Aspects cliniques et évolution

La PR est une maladie rhumatismale auto-immune et progressive, qui évolue par poussées inflammatoires de durée et d'intensité variables et qui gagne progressivement de nouvelles articulations. Elle provoque des gonflements et des douleurs, notamment au niveau des mains, des poignets et des genoux. Ces gonflements sont dus à une inflammation de la membrane synoviale provoquée par le recrutement de cellules circulantes diverses (neutrophiles, monocytes, lymphocytes) ainsi que la prolifération des synoviocytes entraînant l'épaississement de la membrane synoviale pour former le pannus synovial. Les cellules infiltrées sécrètent des cytokines qui vont maintenir l'inflammation. Lorsque cette inflammation persiste, ce pannus aboutit à une dégradation du cartilage et à une érosion osseuse plus ou moins sévères, responsables de l'atteinte fonctionnelle. La génération d'ostéoclastes ou l'action des fibroblast-like synoviocytes pourraient par ailleurs participer à l'érosion osseuse(8) (Figure 1).

La PR est une maladie systémique où les nodules rhumatoïdes sont la manifestation extra-articulaire la plus fréquente de la maladie (20% des patients). Ils sont retrouvés au niveau des zones de pression du tissu sous-cutané entourant l'os, mais peuvent aussi être observés au niveau des tendons, du myocarde ou des poumons. D'autres atteintes extra-articulaires ont été décrites, notamment des atteintes musculaires, oculaires, cardiaques, pulmonaires ou

vasculaires. En effet, la PR est associée à une augmentation de problèmes cardiovasculaires et notamment à la survenue d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux(9).

Le diagnostic de la PR doit être effectué le plus précocement possible et notamment avant la présence de lésions irréversibles. En 1987, l'American College of Rheumatology (ACR) a mis en place des critères basés sur l'analyse de paramètres cliniques, radiologiques et biologiques permettant de classer un rhumatisme comme étant une PR avec une spécificité de 90%. Depuis 2010, de nouveaux critères de diagnostic ont été définis par l'ACR et l'EULAR (*European League Against Rheumatism*) afin d'identifier une PR à un stade plus précoce. Ces nouveaux critères sont plus sensibles mais néanmoins moins spécifiques que ceux de 1987(10). Il est conseillé d'utiliser les deux types de critères pour avoir un diagnostic plus fiable(11). Le diagnostic précoce de la PR est difficile et repose avant tout sur des données cliniques. Les symptômes observés peuvent en effet correspondre à d'autres maladies comme la goutte, l'arthrose, le rhumatisme articulaire aigu, le LES (lupus érythémateux systémique), la sclérodermie ou la spondylarthrite, dont le traitement et le pronostic sont différents.

L'examen biologique peut quant à lui mettre en évidence un syndrome inflammatoire systémique non spécifique, traduit par une vitesse de sédimentation (VS) augmentée et un taux élevé de protéine C réactive (CRP). Il peut également mettre en évidence la présence de FR et d'ACPA. Ces derniers sont des marqueurs de diagnostic, mais également des marqueurs de pronostic de l'évolution de la maladie. Les FR sont retrouvés chez 70% à 75% des PR, mais également dans d'autres affections et chez certains sujets sains ($\geq 15\%$ chez les personnes de plus de 70 ans). Les ACPA sont également retrouvés de manière très spécifique (spécificité de 95%) au cours de la PR. Il est à noter que certaines protéines présentes dans l'articulation, comme le fibrinogène, la vimentine, le collagène de type II (CII) ou l' α -énolase ainsi que d'autres protéines plus ubiquitaires (histones) peuvent être citrullinés dans la PR(12,13) et sont des auto-antigènes de cette maladie. Les ACPA peuvent être détectés très précocement, avant même l'apparition des symptômes de la PR et constituent donc un facteur prédictif de la maladie(14). De plus, la présence d'ACPA dans le sang périphérique des patients ayant une arthrite non différenciée prédit une évolution certaine vers une PR sévère, érosive et destructrice. Par ailleurs, le lien direct entre ACPA et destruction osseuse a été suggéré. Les anticorps (Ac) anti-vimentine citrullinée peuvent se lier à la surface des ostéoclastes ce qui induit leur prolifération ainsi qu'une résorption osseuse(15). La présence d'ACPA associée à une VS élevée, une forte concentration de CRP, la présence d'érosion osseuse précoce, ainsi qu'un titre élevé de FR sont également des facteurs utilisés pour

conclure à une maladie sévère. L'association de l'ensemble de ces paramètres prédirait une maladie agressive et érosive, alors que pris individuellement, leur valeur prédictive est faible.

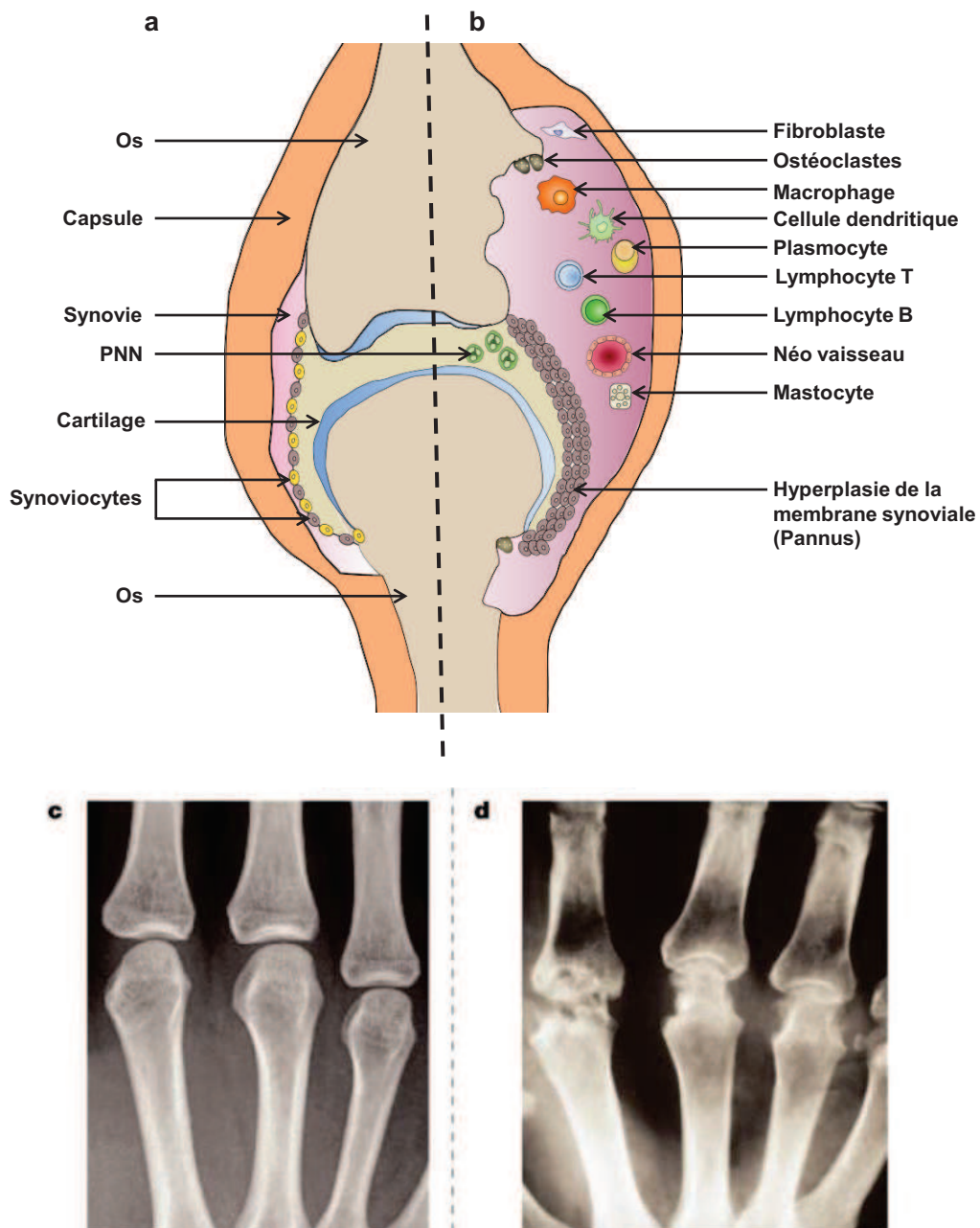


Figure 1 : Vue schématique (a,b) et radiographie des métacarpes (c,d) d'une articulation normale (a,c) et d'une articulation de patient atteint de PR (b,d)d'après(16)

C. Etiologie

La PR est une maladie multifactorielle dont l'origine reste à définir. On sait néanmoins que le terrain génétique, des facteurs hormonaux et environnementaux comme des agents infectieux contribuent à la survenance de cette maladie auto-immune.

1. Facteurs génétiques

La PR n'est pas à proprement dite une maladie héréditaire. Cependant des facteurs de prédispositions génétiques sont aujourd'hui clairement identifiés. Des études familiales sur la survenue de la PR suggèrent que cette maladie est le résultat d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. En effet une étude épidémiologique effectuée en Suède a montré que le rapport de chance (odds ratio) de développer une PR était d'environ 3 chez les sujets apparentés au premier degré avec un patient PR et de 2 chez les sujets apparentés au second degré(17). De plus, le taux de concordance de la PR chez les jumeaux monozygotes est de 9,5 à 15% (comparé à 3,4% chez les jumeaux dizygotes)(18,19). Au final, la contribution génétique par rapport à la contribution environnementale (héritabilité) de la PR est estimée à 60%(20). Ces données confirment l'implication de facteurs génétiques dans la PR même si les taux d'association génétique restent faibles comparés à d'autres maladies auto-immunes.

Les premières preuves suggérant l'implication de certains allèles d'histocompatibilité (HLA) de classe II dans la PR ont été rapportées en 1969(21) marquant le début des études génétiques sur le polymorphisme de la région HLA dans la PR. Il a été montré que la fréquence sérotypique de HLA-DR4 chez les patients PR était supérieure à celle retrouvée chez les sujets sains(22). Dans une moindre mesure, d'autres sérotypes, comme HLA-DR1 sont aussi associés avec le risque de développer une PR(23). L'analyse par séquençage du polymorphisme de la chaîne β 1 de HLA-DR4 et DR1 a mis en évidence l'existence de différents allèles de susceptibilité de la PR. Leur particularité est de coder pour une séquence homologue d'acides aminés appelée « épitope partagé ». A ce propos, il a été montré dans plusieurs études qu'il existait une forte association entre l'épitope partagé et la présence de FR et d'ACPA dans la PR(24,25), et qu'une liaison entre des résidus de peptides citrullinés et HLA-DRB1*04:01/04 (codée par l'allèle partagé de la PR) était possible(26). Cela suggère

que les molécules codées par les épitopes de l'allèle partagé pourraient être impliquées dans la présentation de peptides citrullinés aux LT(20).

Les gènes codant le HLA sont les plus fortement liés à la PR, cependant leur contribution dans le risque de développer la maladie est évaluée à environ 30%. Grâce à de nouvelles méthodes de travail comme les études d'association pangénomique (ou GWAS pour *genome-wide association study*) ou l'étude des polymorphismes nucléotidiques (ou SNP pour *single-nucleotide polymorphisms*), 101 loci de susceptibilité à la PR ont pu être identifiés(27). Reste à savoir lesquels sont biologiquement pertinents. Parmi eux on retrouve PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*), PADI4 (*peptidylarginine deiminase 4*), TRAF-C5 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 1, complement component 5*), STAT4 (*signal transducer and activator of transcription 4*) et FCGR (*Fcγ receptors*) qui sont les loci les plus associés à la PR. Il est à noter que PADI4 code pour l'enzyme du même nom responsable de la conversion de l'arginine en citrulline. Il a été montré in vitro que les transcrits de l'haplotype de PADI4 associé au risque de développer une PR étaient plus stables que ceux des autres haplotypes(28), ce qui pourrait favoriser la présence de peptides citrullinés dans la PR et donc probablement favoriser la production d'ACPA.

Comme mentionné précédemment, les femmes sont trois fois plus touchées que les hommes par la PR. Il semblerait que cette différence ne soit pas due à une modification du nombre de chromosome X. En effet, très peu d'anomalies liées à l'X ont été recensées, que ce soit des syndromes de Klinefelter (homme possédant 2 chromosomes X plus un chromosome Y) ou des syndromes de Turner (femme avec un seul chromosome X) associés à une PR(29,30). Il faut donc chercher ailleurs pour expliquer le biais lié au sexe dans la PR.

2. Facteurs hormonaux et sexuels

La survenue de la PR n'étant probablement pas liée au chromosome X, les recherches se sont tournées vers une association entre la PR et les hormones sexuelles pour expliquer la prédominance féminine.

Concernant les hormones sexuelles masculines, il a été montré que chez les patient(e)s PR, le taux de testostérone était plus faible que chez des donneurs sains(31). Par ailleurs, les androgènes pourraient avoir une activité anti-inflammatoire, notamment au niveau des tissus synoviaux de patients PR(32). Une étude effectuée sur 7 hommes atteints de PR a montré qu'un traitement oral par testostérone induisait une diminution des FR et du nombre

d'articulations touchées(33). Néanmoins, ce groupe de patients était assez restreint et il n'y avait pas de groupe contrôle. Une étude en double aveugle avec un groupe placebo a montré qu'une administration de testostérone une fois toutes les 2 semaines à des femmes PR post-ménopausées améliorait la maladie chez environ ¼ des patientes (contre 4% pour le groupe placebo)(34). Ces études laissent supposer que la testostérone pourrait jouer un rôle protecteur dans cette pathologie.

A l'inverse, le taux d'hormones sexuelles féminines ne varie pas de manière significative entre les patientes PR et les patientes non-PR. Selon plusieurs études, l'effet d'un traitement hormonal post-ménopause sur la survenue, la sévérité ou la progression d'une PR serait modeste(35,36). L'impact de la pilule contraceptive sur la survenue de la PR reste controversé. En effet, elle est tantôt déclarée comme protectrice(37) ou tantôt considérée comme n'ayant aucun impact sur la susceptibilité à la PR(38). Par ailleurs, les études sur une utilisation des hormones féminines comme thérapie de la PR ne donnent pas de réponse claire. En effet, les protocoles d'études sont différents (utilisation d'œstrogène, de progestérone ou une combinaison des 2 ; mode d'administration différent ; durée de l'étude différente) et ainsi ne permettent pas de donner une conclusion générale sur l'utilisation des hormones féminines comme traitement(39). Néanmoins, le lien entre les hormones sexuelles féminines et la PR est conforté par des études reliant la grossesse et l'évolution de la maladie. En effet, une amélioration ou une rémission de la maladie est observée chez la majorité des patientes souffrant de PR dès la fin du troisième trimestre de grossesse(40). Ce phénomène est expliqué par le fait que l'augmentation de la concentration en œstrogène et en progestérone au cours de la grossesse induit un décalage de la réponse immunitaire de type lymphocyte T helper 1 (Th1) vers le type Th2(41) ainsi qu'une augmentation de la fréquence des lymphocyte T régulateurs (Treg)(42).

Ainsi, le rôle des hormones féminines dans la PR n'est pas encore clairement défini mais les hormones masculines semblent avoir un effet protecteur. Il reste maintenant à définir si la perturbation hormonale chez les patients PR, notamment pour la testostérone, est une cause ou une conséquence de la maladie.

3. Facteurs environnementaux

Comme mentionné précédemment, l'héritabilité de la PR est estimée à environ 60%. Cela suggère que le risque de développer une PR serait en partie dû à un ou plusieurs facteurs environnementaux.

a) *Le tabac*

Parmi l'ensemble des facteurs environnementaux, le tabac est celui dont l'association au risque de développer une PR est la plus forte. Fumer augmente la susceptibilité à la PR et affecte de manière défavorable l'évolution de la maladie. Dans cette maladie, la production de FR et d'ACPA est associée au tabac(43). Chez les individus possédant l'épitope partagé d'HLA-DRB1, le risque de développer la maladie conférée par le tabac est accru. Ce risque est augmenté de 20 fois lorsque le fumeur porte deux copies de l'allèle de susceptibilité à la PR(44). Cette étude de 2006 montre que ce risque était valable uniquement pour les patients PR ayant des ACPA. Par ailleurs, le tabac induirait une suractivation des enzymes PADI au niveau des poumons, entraînant une forte citrullination des protéines de cet organe. L'hypothèse actuelle serait que ces protéines citrullinées induiraient une réponse immune préférentiellement chez les individus HLA-DRB1 et ceci plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques de la PR.

Le tabac a aussi des effets délétères dans la prise en charge de PR, notamment par l'effet sur les traitements. Par exemple les patients fumeurs ont des besoins augmentés de DMARDs (*disease-modifying antirheumatic drugs*, traitement classique) ou répondent moins bien aux antagonistes du TNF α (*Tumor necrosis factor α*) (biothérapie développée plus récemment)(45).

b) *Agents infectieux*

De nombreuses recherches se sont développées afin d'identifier les agents infectieux susceptibles de causer une PR. Par exemple, depuis quelques années un intérêt certain s'est développé autour du lien entre PR et la survenue de parodontites. Cette inflammation du parodonte (tissu de soutien de l'organe dentaire composé de la gencive, le ciment, le ligament alvéolo-dentaire et l'os alvéolaire) partage avec la PR des mécanismes pathogénétiques communs ainsi que des facteurs de risques similaires, comme le tabac(46). Le lien entre PR et parodontite pourrait être due à la citrullination, même si cela reste controversé. En effet, les

parodontites sont causées par *Porphyromonas gingivalis*, la seule bactérie connue à ce jour capable d'exprimer l'enzyme PADI. Cette protéine produite par *P. gingivalis* peut citrulliner le fibrinogène humain, protéine retrouvée modifiée dans la PR(47). Ainsi, *P. gingivalis* pourrait participer à la rupture de la tolérance dans la PR. En outre, une étude a été réalisée sur des membres de familles de patients PR non affectés par cette pathologie afin de mieux comprendre le lien entre ACPA et *P. gingivalis*. Dans 20% des cas, les individus non PR de cette cohorte étaient ACPA positifs ou FR positifs. L'étude a montré que les taux sériques d'anticorps IgG spécifiques du LPS (*lipopolisaccharide*) de *P. gingivalis* étaient supérieurs chez les sujets non PR ACPA positifs comparé aux sujets ACPA négatifs(48). Ces résultats sur une cohorte non PR sont intéressants car ils suggèrent une association entre les réponses humorales contre *P. gingivalis* et les ACPA, et ceci indépendamment de la PR. Des résultats similaires ont été observés chez les personnes malades. De plus, une corrélation entre anticorps dirigés contre *P. gingivalis* et ACPA chez des patients PR et chez des individus souffrant de parodontie a été retrouvée(49). De l'ADN de *P. gingivalis* a été retrouvé dans le sérum et le liquide synovial de patients PR(50,51). Je souligne cet élément car une des hypothèses à l'origine de ma thèse est que la reconnaissance de l'ADN du soi ou du non soi, notamment par le TLR9 (*Toll-like receptor 9*) pourrait maintenir, moduler ou participer à l'émergence de la PR. L'utilisation de modèles animaux d'arthrite a aussi montré le lien entre *P. gingivalis* et la PR, où une inflammation induite par la bactérie pourrait diminuer le seuil nécessaire pour initier une stimulation immunitaire induisant une arthrite inflammatoire(52) ou accentuer la sévérité des arthrites(53).

Certaines autres bactéries ou composants bactériens pourraient induire, augmenter la sévérité, ou être concomitant à la PR, comme *E. Coli*, *P. mirabilis* (impliqué dans des infections urinaires) ou certains mycoplasmes(54,55).

Concernant le lien entre virus et PR, certains éléments sont décrits. L'EBV est un virus à ADN double brin responsable de la mononucléose infectieuse. Il est aussi lié au développement de différents types de tumeurs malignes. L'implication de ce virus dans la PR a été suggérée par le fait que des anticorps circulant anti-EBV sont retrouvés en plus forte concentration comparés aux donneurs sains (56) et la fréquence des cellules B infectées par EBV est 10 fois supérieure chez les patients PR comparée à des donneurs sains(57). Le génome d'EBV est également fréquemment retrouvé dans des prélèvements de synovite rhumatoïde. Par ailleurs, il existe une homologie de séquence d'acides aminés entre une glycoprotéine d'EBV et certains sous-types de HLA-DR4. Le développement d'une réponse immune inadaptée à l'infection par EBV, plus particulièrement chez les sujets HLA-

DRB1*0404 (allèle de prédisposition à la PR), pourrait promouvoir l'apparition d'une PR(58). Toutefois, même si les liens entre la PR et EBV sont nombreux, aucune causalité directe n'a pu être démontrée à ce jour.

La distinction entre réponses inflammatoires systémiques dues à la PR ou celles dues aux infections est difficile. Depuis 40 ans, d'énormes efforts ont été faits pour trouver l'élément infectieux responsable de la PR, mais jusqu'à présent aucun pathogène unique n'a été identifié. C'est sans doute une combinaison d'un grand nombre de facteurs génétiques et environnementaux qui va être responsable de la survenue de cette pathologie.

D. Immunopathologie de la PR

Bien que l'origine de la PR reste à être déterminée, nous savons que dans cette maladie une dérégulation du système immunitaire a pour conséquence une inflammation de la membrane synoviale. On distingue deux formes de réponses immunitaires : le système immunitaire inné et adaptatif. L'immunité innée, première ligne de défense contre les pathogènes est commune à tous les animaux. Elle est composée d'effecteurs cellulaires et humoraux qui permettent une réponse rapide (car n'implique pas d'étapes de prolifération/différenciation cellulaire) et sans nécessiter de rencontre préalable avec le pathogène. Elle peut initier les réponses immunes adaptatives qui vont permettre une réponse ciblée. L'immunité adaptative va générer et faire appel à la mémoire immunitaire et à la maturation d'affinité pour un antigène donné. Dans la PR, les événements impliquant les acteurs de l'immunité adaptative sont bien connus (rôle des lymphocytes, production d'ACPA et de FR...) mais relativement peu d'informations concerne le rôle de l'immunité innée.

1. Les acteurs cellulaires

De nombreux médiateurs cellulaires sont impliqués dans la physiopathologie de la PR faisant intervenir à la fois des cellules de la réponse immune adaptative, de la réponse innée ainsi que des médiateurs ostéo-articulaires. L'interaction entre les LB, LT et cellules dendritiques (DC) pourrait être à l'origine de la réponse auto-immune spécifique dirigée contre la citrulline. Cette réponse, probablement initiée dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans la moelle osseuse, va initier ou entretenir un processus inflammatoire localisé dans les articulations. S'en suit le recrutement des leucocytes dans la membrane synoviale qui aboutit

à la formation d'un tissu inflammatoire: le pannus. Ce pannus, par contact cellulaire ou par sécrétion d'enzymes et de cytokines, entraîne l'activation des chondrocytes ainsi que des ostéoclastes responsables de la dégradation du cartilage et de l'érosion osseuse. Les cellules immunitaires et les médiateurs chimiques produits vont entretenir l'inflammation et favoriser les troubles systémiques. Dans ce chapitre, nous décrivons rapidement les acteurs cellulaires principaux impliqués dans la PR, puis nous décrivons leur place dans la physiopathologie de cette maladie. La Figure 2 donne une bonne image de l'interaction entre toutes ces cellules, ce qui conduit à une inflammation et une destruction articulaire.

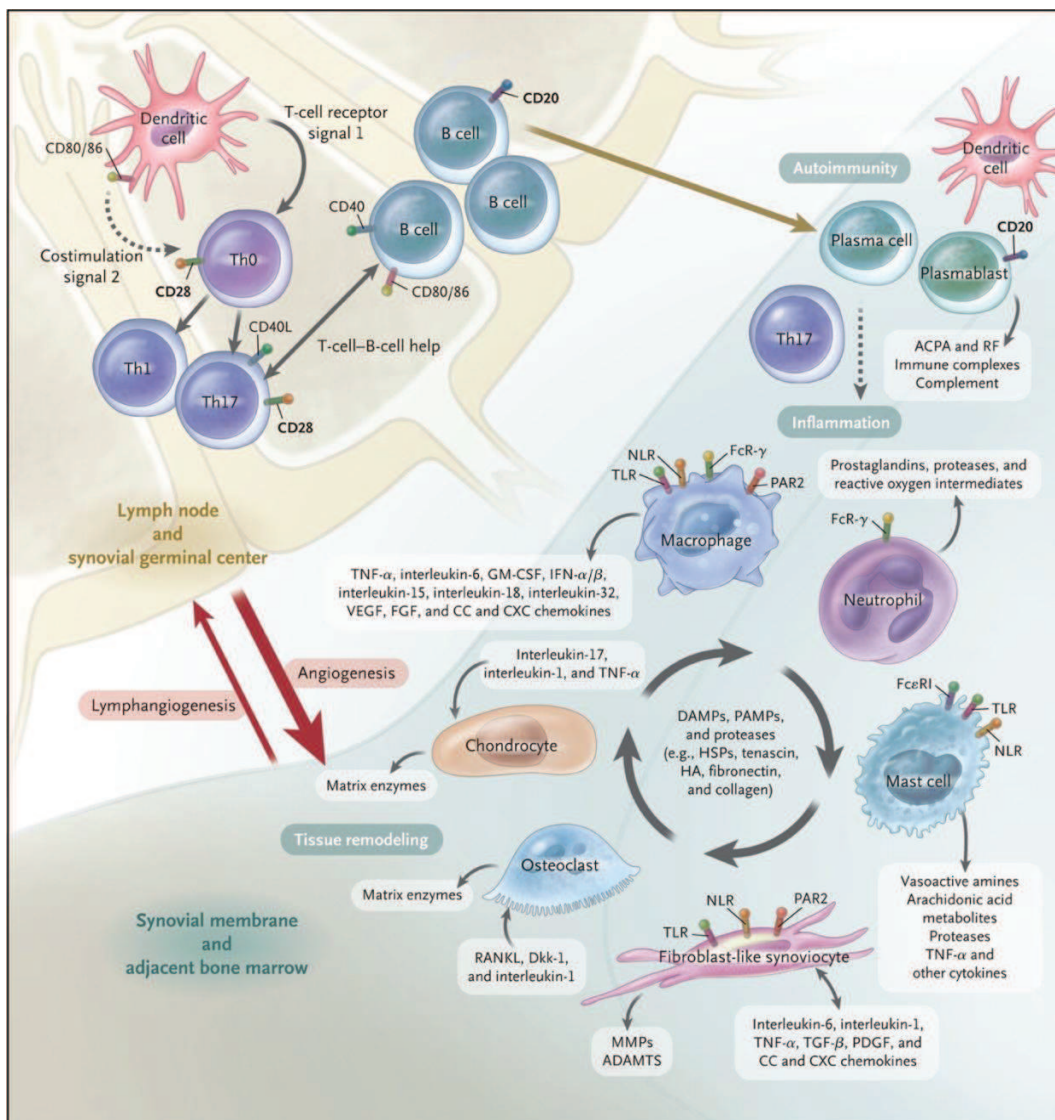


Figure 2: Les médiateurs cellulaires impliqués dans l'inflammation et la destruction articulaire, d'après(59)

PAR2 : protease-activated receptor 2 ; FcR : Fc receptor ; FGF : fibroblast growth factor ; Dkk-1 : dickkopf-1 ; HA : hyaluronan ; HSP : heat-shock protein ; NLR : nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor ; PDGF : platelet-derived growth factor ; RANKL : receptor activator of nuclear factor κ B ligand ; VEGF : vascular endothelial growth factor

a) Les cellules de l'immunité adaptative

α. Les lymphocytes B

Les LB assurent l'immunité humorale c'est-à-dire celle à l'origine de la production d'anticorps. Après stimulation par un antigène spécifique, les LB sont les précurseurs des plasmocytes, cellules productrices d'anticorps et d'auto-anticorps. Dans la PR, les LB sont la source des ACPA et des FR. La fonction des LB ne se réduit pas seulement à cela. Ils sont capables d'influencer la polarisation de la réponse des LT grâce à leur aptitude à présenter des antigènes (Ag) internalisés. Les LT (surtout auxiliaires), en retour, vont être activés et produiront des cytokines. Dans la PR, ces cytokines impliquées sont surtout pro-inflammatoires et aboutissent par exemple à une augmentation de l'activation des macrophages, ce qui amplifie le processus inflammatoire(60). Les LB peuvent en outre sécréter directement de nombreuses cytokines et chimiokines ou encore devenir des LB mémoire.

Les LB auto-réactifs peuvent être activés par des complexes immuns (CI) contenant de l'ADN, reconnus par le TLR9(61). Dans cette étude de 2002, du nucléosome (complexe d'ADN et d'histones formant l'unité de base de la chromatine des organismes eucaryotes) et des anticorps anti-nucléosome ont été utilisés pour former des CI. L'interaction TLR9/CI et l'engagement du BCR (*B cell receptor*) vont entraîner la différenciation des LB en plasmocytes qui vont produire des FR. Cet exemple illustre le fait que les LB peuvent jouer un rôle dans le lien entre immunité innée et adaptative : leur expression de récepteurs de l'immunité innée (ex : TLR) peut induire une réponse adaptative humorale. D'autres ligands TLR (comme le LPS) peuvent induire une population de LB qui a des propriétés immunorégulatrices par leur sécrétion d'IL-10, une cytokine plutôt anti-inflammatoire(62). Cette population, appelée LB régulateurs a été retrouvée dans le sang de patients PR(63). Ces cellules semblent être fonctionnelles chez les patients PR et pourraient être retrouvées en plus grande quantité chez certains patients.

Comme toutes les cellules présentatrices d'antigène (CPA), les LB vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires après contact avec l'Ag, et vont initier la maturation d'autres lymphocytes. Dans la PR, des structures similaires aux organes lymphoïdes secondaires, les structures lymphoïdes ectopiques, peuvent être retrouvées sur le site de l'inflammation(64) ou directement en contact avec la membrane synoviale inflammée. Des facteurs chimiques produits par les cellules présentes dans la synoviale vont modifier la survie, l'organisation et le trafic des LB. Cela pourrait contribuer au recrutement et au maintien des LB dans l'articulation arthritique.

Aujourd'hui, le rôle central de ces cellules dans la PR est souligné par l'efficacité thérapeutique du rituximab, un agent ciblant le CD20 et entraînant la déplétion des LB (cf chapitre «les thérapies ciblant les lymphocytes B »).

β. Les lymphocytes T

Les LT constituent une population très hétérogène du point de vue fonctionnel. De manière schématique, on distingue des cellules effectrices et des cellules régulatrices (même si nous allons voir que la frontière entre les deux est très mince). Parmi les cellules effectrices, on peut citer les LT CD8⁺ (ou cytotoxiques) et les LT CD4⁺ (nommés T auxiliaires ou Th). Une fois recrutés sur le site de l'inflammation et selon les stimuli, les Th naïfs vont se différencier en populations distinguables fonctionnellement par leur profil cytokinique (Figure 3). Cette différenciation est initiée par l'interaction Th/CPA lors de laquelle la CPA va présenter des peptides via son CMH (*complexe majeur d'histocompatibilité*) au récepteur de la cellule T (TCR). Les principales sous-populations de LT impliquées dans physiopathologie de la PR sont les Th1 et les Th17. Les Th2 et les Treg ont plutôt un rôle protecteur dans cette maladie.

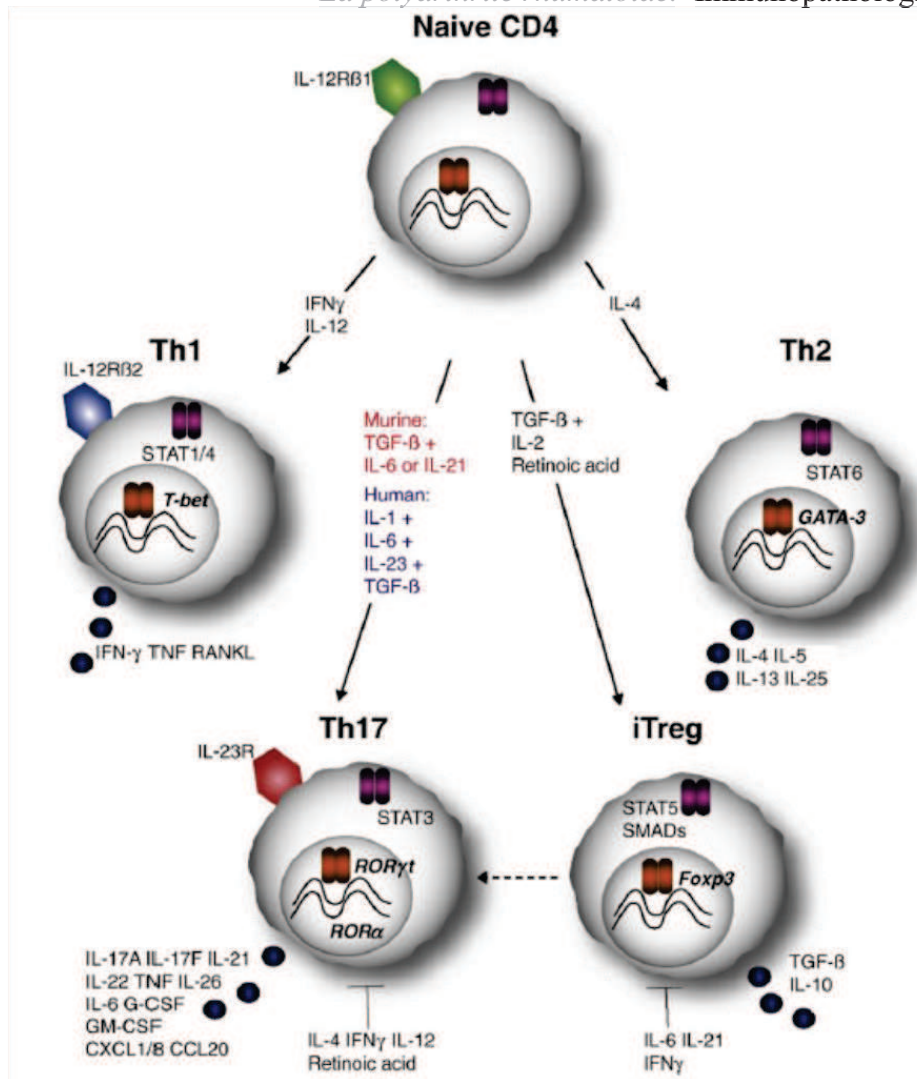


Figure 3: Différentiation des cellules T CD4 selon l'environnement cytokinique, d'après(65)

La différenciation en sous-types de Th se réalise à partir de LT CD4⁺ naïfs et est sous contrôle de l'environnement cytokinique. Les facteurs de transcription spécifiques, les marqueurs spécifiques et les cytokines produites par chaque sous-type de Th sont mentionnés.

Les Th1 sont impliqués dans l'activation des macrophages, les réactions d'hypersensibilité retardée et dans l'élimination des Ag intracellulaires. Ils jouent un grand rôle dans l'inflammation grâce à leur production préférentielle de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-2, l'interféron (IFN) γ et le TNF α . Ils se différencient sous l'action de l'IL-12 et de l'IFN γ .

Les Th2 quand à eux jouent un rôle clé dans l'immunité humorale ainsi que dans la réponse aux pathogènes extracellulaires. Ils contrôlent la différenciation et la prolifération des LB. Ils sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10 et se différencient sous l'action de l'IL-4.

Les Th17 participent à la protection contre les bactéries et les champignons. Ces cellules sont productrices d'IL-17 et d'IL-6, deux cytokines pro-inflammatoires. Chez la souris, la différenciation en Th17 nécessite du TGF- β , de l'IL-21 et de l'IL-6. Chez l'Homme, l'IL-23 pourrait être nécessaire en plus de l'IL-6 et du TGF- β .

Les Treg sont les gardiens de l'homéostasie immunitaire, ils maintiennent la tolérance vis-à-vis des Ag du soi. La différenciation en Treg résulte de l'expression du facteur de transcription Foxp3. Ces cellules sont produites naturellement dans le thymus (Treg naturel) ou peuvent être différenciées en périphérie à partir des T naïfs (Treg induits : iTreg). Après une infection et une fois le pathogène éliminé, les Treg régulent négativement les réponses des autres T effecteurs, des DC et des macrophages, protégeant ainsi les tissus environnants d'une destruction créée par ces cellules. Cette aptitude d'induction de la tolérance peut être à double tranchant. Dans un contexte tumoral, les Treg favorisent la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur(66). A l'inverse, par leur rôle clé dans les mécanismes de tolérance, les Treg ont des effets bénéfiques dans les maladies auto-immunes (67). Ils peuvent aussi induire la tolérance du fœtus par la mère lors d'une grossesse. Les mécanismes utilisés par les Treg pour moduler les réponses immunes sont très vastes. Ils peuvent :

- agir par sécrétion de molécules immuno-modulatrices (comme l'IL-10),
- perturber les métabolismes cellulaires (en convertissant l'ATP en adénosine, molécule inhibant la prolifération cellulaire),
- interagir directement avec les DC via une interaction CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)/CD80/CD86. Cela a notamment pour conséquence l'induction de l'expression d'IDO (indoléamine 2,3 dioxygénase) par les DC(68). IDO est une métallo-enzyme intra-cytoplasmique capable de dégrader le tryptophane (Trp) en divers métabolites appartenant à la famille des kynurénines. L'appauvrissement en Trp dans le milieu inhibe la prolifération et la différenciation des T effecteurs. De plus, les kynurénines peuvent favoriser l'apoptose des LT effecteurs(69).

D'autres mécanismes impliquant CTLA-4 ont été mis en évidence. Il a été montré que cette molécule portée par les Treg peut capturer le CD80/CD86 porté par les DC, induisant ainsi la dégradation de ce dernier(70). Le CD80/CD86 est un ligand du CTLA-4 mais est aussi celui du CD28 porté par les T effecteurs. La liaison de CD80/CD86 à CD28 participe à l'activation des T effecteurs. Ainsi, via les DC, les Treg vont inhiber l'activation des T effecteurs par déplétion des ligands du CD28.

De plus en plus d'études montrent que les LT CD4⁺ ne sont pas confinés dans un phénotype unique. En effet, on parle de plasticité des lymphocytes pour désigner le fait que la destinée

des LT CD4⁺ n'est pas « gravée dans le marbre » en fonction de leur environnement cytokinique. Par exemple, en présence de TGFβ et d'IL-6, les Th17 peuvent produire de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire(71). D'autre part, sous l'influence de plusieurs autres cytokines et après stimulation du TCR, des Treg Foxp3⁺ peuvent exprimer le facteur de transcription spécifique des Th17 (RORγt) et produire de l'IL-17. Ces cellules ont les propriétés régulatrices des Treg mais peuvent aussi avoir une forte activité pro-inflammatoire par la sécrétion d'IL-17(72).

b) Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée ont longtemps été considérées comme des phagocytes professionnels ayant pour seul rôle la défense de l'hôte contre les agents infectieux. Or il est clair aujourd'hui que leur rôle dépasse les limites de la phagocytose et de l'élimination du pathogène qui leur avait été assignées au départ. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les DC sont des cellules essentielles de l'immunité innée qui vont jouer aussi un rôle dans les phases d'initiation et de maintien de l'inflammation.

a. Les neutrophiles : anciennes cellules, nouveaux rôles

Les granulocytes représentent 50 à 70% des leucocytes circulants chez l'homme. Parmi eux, on retrouve les PNN qui représentent à eux seuls près de 98% des granulocytes (les 2% restant étant les éosinophiles et basophiles), ce qui en fait la population de leucocytes la plus représentée dans le sang. Ces cellules phagocytaires jouent un rôle crucial de sentinelle et sont les premières cellules à être recrutées sur les sites inflammatoires. Les PNN sont difficiles à étudier *in vitro* et les lignées de cellules « neutrophile-like » (comme la lignée HL60) ne reflètent que rarement la réalité biologique. Ceci est dû aux caractéristiques inhérentes à ces cellules : sans stimulation, leur durée de vie est d'environ 6 à 8h et sont non mitotiques (elles arrivent dans le sang à un stade différencié)(73). Les PNN ont un véritable attirail d'outils de lutte contre les pathogènes. Ils reconnaissent des motifs moléculaires très conservés par les pathogènes (les PAMP pour *Pathogen-associated molecular pattern*) grâce à leur expression de récepteurs de l'immunité innée, les PRR (*Pattern Recognition Receptors*) incluant les TLR. D'ailleurs, ils expriment tous les TLR (sauf le TLR3)(74) et expriment/produisent une grande variété de cytokines et chimiokines (Tableau 1). Par exemple, nous avons montré récemment que les PNN humains produisent de l'IFNα(75), une cytokine connue pour être sécrétée principalement par les DC plasmacytoïdes (pDC).

Les PNN possèdent un organite spécifique qui permet le stockage des substances toxiques pour les micro-organismes (et aussi pour l'hôte) : les granules. Plusieurs types de granules existent (primaires, secondaires, tertiaires) distinguables par leur contenu et par leur capacité d'exocytose ou de fusion avec les vésicules de phagocytose. Ces organites contiennent, entre autre, des peptides antimicrobiens (défensines) et des enzymes comme la myéloperoxydase (MPO) (enzyme importante dans le choc oxydatif), des élastases, des collagénases, des protéases, des hyaluronidases et des métalloprotéases(76). Toutes ces molécules permettent d'éliminer les pathogènes. L'activation des neutrophiles aboutit à la libération des protéases contenues dans les granules ainsi qu'à la génération de formes réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen-species*) qui peuvent être délétères pour les tissus environnant si elle est incontrôlée. Un outil essentiel des neutrophiles dans la lutte antimicrobienne est la phagocytose. Après interaction directe (via les récepteurs de l'immunité innée) ou indirecte (via les FcγR ou les récepteurs du complément) avec le micro-organisme, les PNN vont « ingérer » les particules inertes ou vivantes dans le phagosome qui va devenir mature après fusion avec les granules ou les lysosomes. Simultanément, la NADPH oxydase (*Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxidase*) va s'assembler sur la membrane du phagosome permettant la production de ROS et créant ainsi un environnement toxique pour les pathogènes.

Chimiokines	CXCL1 à CXCL11 (sauf CXCL7), CCL2,3,4,17,18,19,20,22
Cytokines pro-inflammatoires	IL-1α/β, IL-6, IL-17, IL-18, MIF
Cytokines anti-inflammatoires	IL1-RA, IL-4*, IL-10*, TGFβ
Cytokines immuno-régulatrices	IFNα, IFNγ*, IL-12, IL-23
Colony-stimulating factors (CSF)	G-CSF, M-CSF*, GM-CSF
Membres de la superfamille du TNF	APRIL, BAFF, RANKL, TNF

Tableau 1 : Liste non exhaustive des principaux médiateurs chimiques sécrétés par les neutrophiles d'après (77) *Données controversées

Mobilisation et activation des PNN :

Dans les tissus touchés, une grande variété de signaux inflammatoires (dérivés de pathogènes comme le LPS ou produits par l'hôte comme des cytokines et chimiokines) vont stimuler les cellules endothéliales proches du site qui vont à leur tour exprimer des molécules d'adhérence (P et E-selectines). Les neutrophiles circulants, sensibles aux facteurs chimio-attractants (comme l'IL-8 (CXCL8)) par leur expression de récepteurs aux chimiokines (comme CXCR2) vont s'orienter vers les sites inflammatoires et être arrêtés grâce à leur expression de molécules d'adhérence (PSGL-1, L-selectine, CD44, CD11b). A ce propos, il a été montré que certains ligands des TLR (2 et 4) ou le C5a (molécule du complément activé) pourraient moduler le recrutement des neutrophiles dans les tissus inflammatoires en modifiant l'expression de récepteurs aux chimiokines(78,79). Un phénomène de « rolling » puis de diapédèse va suivre permettant aux PNN d'atteindre le site inflammatoire. A ce stade, les PNN vont suivre le gradient de chimiokines les menant jusqu'au pathogène. Durant cette étape, les neutrophiles vont achever leur activation: engagement des TLR, stimulation des réponses oxydatives et dégranulation(80). Au contact du pathogène, les PNN vont relarguer leur arsenal antimicrobien et jouer leur rôle de cellules phagocytaires. De nombreuses études ont montré que les neutrophiles avaient une durée de vie augmentée (jusqu'à 22 heures) lorsqu'ils sont stimulés par un pathogène. En effet, ces cellules destinées à mourir rapidement expriment constitutivement des facteurs pro-apoptotiques et n'expriment qu'à de faibles taux des facteurs anti-apoptotiques(81). Mais de nombreuses cytokines (IL-1 β , IL-2, TNF α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF) et des ligands TLR (4 et 9) prolongent la vie de ces cellules de manière significative(81–83). Après l'élimination du pathogène, les PNN vont mourir par apoptose. Elles peuvent aussi aller vers un autre mécanisme de mort cellulaire : la Nétose.

La Nétose :

Les neutrophiles activés sont capables de former des filaments extracellulaires dépourvus de membranes composés d'ADN génomique ou mitochondrial (Figure 4) associé à des protéines comme les histones (pouvant être citrullinées), et/ou issues des granules (élastases, cathepsine G)(84). Ces structures fibreuses appelées NET (*Neutrophil Extracellular Traps*) créent un « piège » pour les bactéries conduisant à la destruction de celles-ci (85). La formation de NET est observée depuis 1996(86) mais c'est seulement en 2004 que le groupe de Zychlinsky l'a baptisée et l'a décrite(85). La Nétose, phénomène menant à la formation de NET, est une forme active de mort cellulaire qui se distingue morphologiquement de l'apoptose et de la nécrose. Elle est caractérisée par la décondensation de la chromatine et la désintégration de la

membrane nucléaire avant que l'intégrité de la membrane plasmique ne soit compromise(87). Ce phénomène, parfois qualifié de suicide cellulaire, est dépendant des formes actives de l'oxygène(88) et de la NADPH oxydase, et conduit à la lyse du PNN. Certaines équipes ont montré qu'il existe une forme de Nétose non suicidaire (qualifiée de « vitale ») où les neutrophiles conserveraient certaines de leurs capacités fonctionnelles comme la phagocytose, le chimiotactisme ou la dégranulation. Cette forme de Nétose serait induite par des stimuli différents de la « suicidaire » (PMA pour la « suicidaire », bactérie/levure pour la « vitale »), serait rapide et le type d'ADN relargué serait différent (ici ADN mitochondrial)(89,90). Mais cette théorie n'est pas approuvée par l'ensemble de la communauté scientifique. La formation de NET est bénéfique pour l'hôte dans le cas d'infection mais pourrait être délétère dans d'autres circonstances. En effet, l'exposition d'ADN du soi ou de protéines normalement exprimées dans les compartiments intracellulaires (histones citrullinées notamment) pourrait favoriser le développement de réponses auto-immunes. Par exemple, il a été montré que les NET pourraient être impliqués dans le lupus, maladie auto-immune où l'on retrouve des auto-anticorps dirigés contre l'ADN, contre les histones ou contre des composants nucléaires des neutrophiles (ANCA pour *antineutrophil cytoplasmic antibodies*)(91,92). Une mauvaise élimination des NET dans cette pathologie est corrélée avec le développement de néphrites, l'une des plus sévères manifestations du lupus(93).

a)



b)

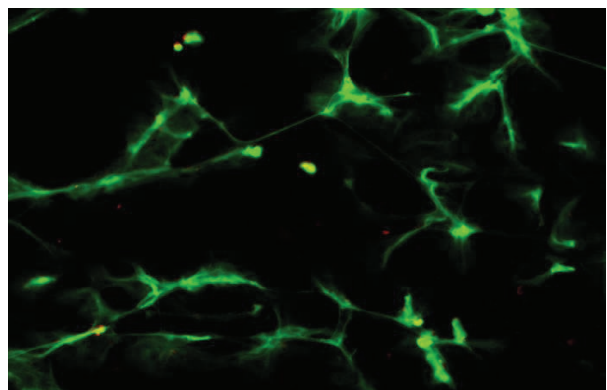


Figure 4: Neutrophil Extracellular Traps (NET)

a) Image par microscopie électronique de bactéries (Salmonella) capturées par des NET(94). (Barre=1µm)

b) Image par microscopie à fluorescence de NET. La Nétose a été induite par du PMA sur des neutrophiles humains purifiés et un marquage de l'ADN (SytoxGreen) a été effectué. Travail réalisé au sein de notre laboratoire (UMR1125 INSERM, Matthieu Ribon et Patrice Decker).

Les PNN ou le lien immunité innée/adaptative:

L'activation par un pathogène augmente considérablement la durée de vie des PNN, permettant à ces cellules de rester sur le site inflammatoire plus longtemps. Les neutrophiles activés sur les sites inflammatoires ont des capacités de sécrétion de cytokines pro- et/ou anti-inflammatoires qui peuvent activer des cellules de l'immunité adaptative(77). On peut noter que les neutrophiles peuvent sécréter du TNF α , de l'IL-12, de l'IL-6, de l'IL-17 (pro-inflammatoires) ou de l'IL-10 (anti-inflammatoire) même si la sécrétion d'IL-10 reste à confirmer. De plus, par leur sécrétion de BAFF (*B-cell-activating factor*) et APRIL (*a proliferation inducing ligand*), les PNN peuvent stimuler spécifiquement la prolifération et la maturation des LB(95). Ils peuvent aussi favoriser la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK (*Natural Killer*)(96). Les PNN peuvent sécréter des chimiokines qui vont permettre le recrutement des Th1 et Th17(97). Plus étonnamment, une étude a montré que les PNN de souris pouvaient être des CPA : ils sont capables d'exprimer le CMH de classe II et peuvent présenter *in vitro* des Ag aux Th1 et Th17, rendant ces derniers spécifiques de cet Ag(98).

Les PNN peuvent aussi induire des réponses immunitaires adaptatives via leur interaction avec les DC. Ils favorisent la maturation de ces cellules qui vont à leur tour induire la prolifération des LT effecteurs, les poussant dans certains cas vers une polarisation Th1(99,100). Ce mécanisme est dépendant de médiateurs chimiques mais peut aussi se dérouler grâce aux contacts cellulaires. Tout comme les DC, les PNN peuvent exprimer IDO, enzyme immunorégulatrice(101). Par ailleurs, une étude récente a montré que des neutrophiles murins dérivés de moelle osseuse pouvaient présenter un phénotype hybride entre le neutrophile et la DC après stimulation par GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor*). Ces cellules expriment les marqueurs phénotypiques des deux types cellulaires, peuvent faire des NET et ont la morphologie et la fonction présentatrice d'Ag(102).

β . Les cellules dendritiques

Bien que les DC ne représentent qu'un très faible pourcentage des leucocytes circulants (moins de 1% des cellules mononuclées du sang), elles sont pourtant considérées comme un des acteurs importants des réponses immunitaires. Ce sont par exemple les principales cellules impliquées dans le priming des LT. De plus, ces cellules créent un pont entre immunité innée et adaptative sans directement s'engager dans la destruction du pathogène. Tout comme les PNN, les DC expriment des PRR et reconnaissent donc les PAMP. Ce sont des CPA dites

« professionnelles » car elles expriment de manière constitutive tous les récepteurs membranaires permettant d'activer les LT naïfs. Elles ont aussi la double capacité de présenter l'Ag et de délivrer des signaux de costimulation. Une des fonctions majeures des DC est de transporter les Ag depuis les sites d'entrée du pathogène vers les sites d'initiation des réponses immunes adaptatives (organes lymphoïdes secondaires). Elles ont aussi un rôle de sentinelle du système immunitaire. Les DC se composent de deux sous populations principales: les DC conventionnelles (convDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC).

On regroupe sous la dénomination convDC les cellules dendritiques des tissus non lymphoïdes qui migrent vers les organes lymphoïdes ou qui vont résider dans ces derniers. Ces cellules sont issues de la lignée myéloïde et sont subdivisées en trois groupes: les DC myéloïdes (mDC), les cellules de Langerhans, et les DC interstitielles. Ces sous-populations ont été caractérisées en fonction de leur localisation, leur phénotype et leur état de maturation. Les pDC quant à elles constituent une population rare de DC nommées ainsi à cause de leur morphologie proche des plasmocytes et de leur forme arrondie. Contrairement aux mDC, elles sont générées à partir de précurseurs lymphoïdes et sont caractérisées par leur capacité à sécréter de l'IFN de type I (IFN- α et β) après stimulation des TLR. Elles peuvent en outre sécréter d'autres molécules pro-inflammatoires. Elles sont généralement décrites comme étant activatrices des réponses immunes mais peuvent avoir des fonctions tolérogènes, notamment par l'expression d'IDO.

L'état de maturation des DC est important pour la fonction de ces cellules. En effet, les facultés de capture antigénique ou de présentation antigénique sont séparées dans le temps. Les DC immatures sont spécialisées dans la capture et l'apprêtement de l'Ag alors que les DC matures sont spécialisées dans la présentation de complexes CMH/peptide antigéniques aux LT. Ces caractéristiques fonctionnelles sont liées à l'expression de marqueurs cellulaires : les cellules immatures ont une très forte expression du CMH de type II en intracellulaire et une faible expression de molécules de costimulation et d'adhérence alors que les DC matures expriment fortement le CMH II membranaire ainsi que des molécules de costimulation et d'adhérence.

Les DC matures possèdent des capacités immunogènes antivirales, anti-tumorales et antibactériennes, leur permettant d'activer les cellules immunitaires effectrices (Th1, Th2, Th17). Selon leur état de maturation, et en particulier pendant la phase semi-mature (CD80/86/83^{low}), les DC ont des fonctions particulières. En effet, grâce à une faible capacité de costimulation et une production de cytokines inadéquate, ces DC vont induire une anergie ou une apoptose des LT effecteurs, ou encore induire des Treg bien que la phase de

présentation antigénique ait eu lieu. Ces cellules sont qualifiées de DC tolérogènes (tolDC) et vont participer à la régulation de l'immunité en périphérie (Figure 5). Cette capacité de promotion de tolérance n'est pas réservée qu'aux DC semi-matures. Par exemple, certaines sous-populations de DC matures peuvent exprimer IDO(103). De plus, selon la stimulation reçue durant la maturation, les DC matures peuvent être tolérogènes. Une stimulation par du TGF- β , par certaines substances immunosuppressives ou certains PAMP(104) induisent ce phénotype. Nous avons d'ailleurs montré que la stimulation de DC issues de moelle osseuse par un neuropeptide aux propriétés immunorégulatrices (l'adrénomédulline) induisait un phénotype semi-mature aux DC ainsi que des propriétés tolérogènes par l'expression d'IDO(105). Des essais cliniques de phase I utilisant des tolDC ont été menés récemment dans le diabète de type I(106) et dans la PR(104). Peu d'informations sont disponibles pour l'instant mais il semblerait que les tolDC injectées par voie intradermique sont bien tolérées dans l'essai sur le diabète.

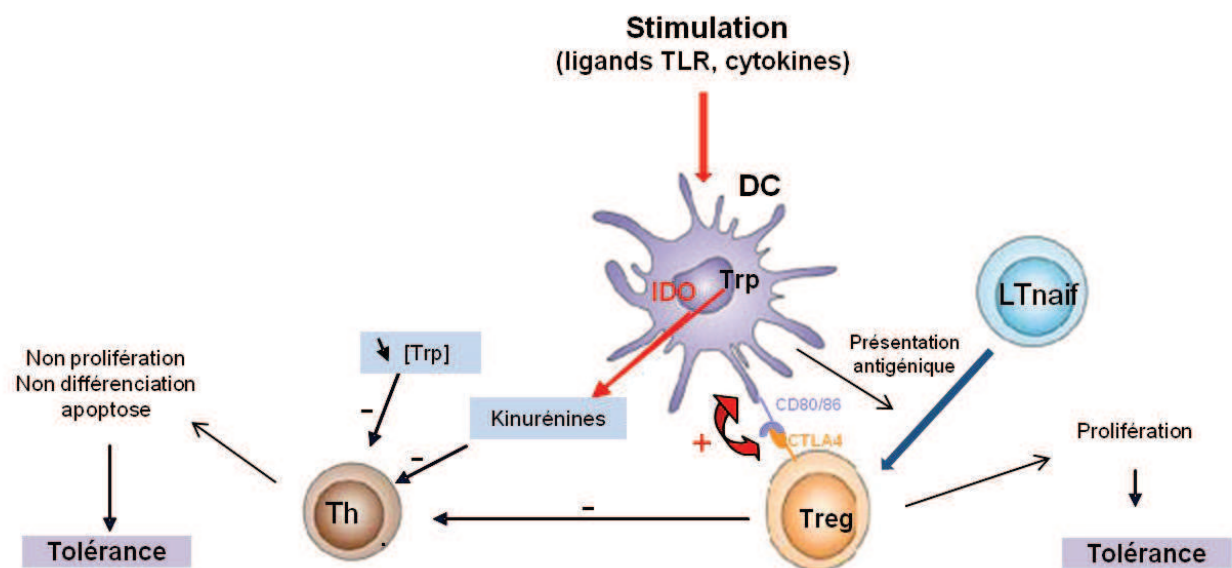


Figure 5: Tolérance immunologique induite par les cellules dendritiques et IDO

Les DC peuvent favoriser la prolifération des Treg. IDO permet l'appauvrissement du milieu en tryptophane et la synthèse de kynurénines, ce qui inhibe la prolifération et la différenciation des Th. L'effet combiné de ces événements induit une tolérance immunologique.

c) Dérèglements des cellules immunitaires et ostéo-articulaires dans la PR

a. Dérèglement des cellules immunitaires

Les cellules T représentent environ 30% de l'infiltrat cellulaire de la synoviale des patients PR. Ceci suggère une forte migration des LT du sang périphérique vers l'articulation. La synovite est caractérisée par un déséquilibre de la balance inflammatoire en faveur des molécules pro-inflammatoires, favorisant l'activation délétère des cellules T, qui dans cet environnement, sont majoritairement de type Th1 ou Th17(107). Les LT activés vont favoriser la mise en place de la réponse auto-immune et activer les cellules B en coopération avec les macrophages, les DC, les synoviocytes et les fibroblastes. Au cours de la PR, on observe une forte production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α , l'IL-6, l'IL-17 ainsi qu'une faible production de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-4 et l'IL-10. Classiquement, on parle d'un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur des Th1. Les études concernant cette balance Th1/Th2 ont établi que le phénotype Th1 ne pouvait pas expliquer l'ensemble des mécanismes impliqués dans la PR. Cependant, la découverte des cellules Th17 et des Treg a modifié ce paradigme vers un nouveau, parlant d'un déséquilibre Th17/Treg, en faveur des Th17.

Les LT auxiliaires interagissent avec les LB et leur délivrent les signaux nécessaires à leur activation et leur différenciation en plasmocytes. Ces derniers synthétisent alors des auto-anticorps, favorisant ainsi la formation de CI. Les Th1 et les Th17 activés jouent également un rôle direct dans la différenciation des précurseurs ostéoclastiques, l'activation des ostéoclastes par l'expression de RANKL et la production d'IL-17 et de TNF α . Le récepteur de l'IL-17A est présent à la surface des synoviocytes, des chondrocytes, des ostéoclastes et des ostéoblastes(108). Les cellules T ont également une action indirecte sur l'ostéoclastogénèse, en stimulant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, telles que l'IL-1 β .

Des neutrophiles activés sont retrouvés en grand nombre dans le liquide synovial et au sein des pannus de patients PR(109). Ces cellules infiltrées peuvent potentiellement induire des dommages au sein de l'articulation, notamment par leur sécrétion de cytokines et chimiokines activatrices des cellules LB (comme BAFF). Les PNN (notamment dans les liquides synoviaux de patients PR), grâce à leur expression de RANKL(110) peuvent induire l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse(111). Les PNN infiltrés dans l'articulation des patients et dans un modèle murin d'arthrite expriment par ailleurs de l'IL-17(112,113). De plus, la présence de cytokines anti-apoptotiques dans l'articulation de patients (TNF α ou GM-CSF) peuvent

favoriser la survie des PNN et augmenter leur durée de vie de plusieurs jours(114). Des CI, parfois composés de FR, sont retrouvés en fortes concentrations dans les liquides synoviaux ou sous forme de dépôts dans l'articulation de patients. Ces structures peuvent être activatrices des neutrophiles(115).

Il a été montré récemment qu'un fort phénomène de Nétose était présent dans la circulation et dans les liquides synoviaux de patients PR(116) et que des séra de patients sont inducteurs de Nétose, en particulier ceux comportant des ACPA. De plus, les NET pourraient être source d'auto-antigènes citrullinés reconnus par les ACPA, notamment l'histone H4(117). Une preuve supplémentaire de l'implication des neutrophiles dans la PR a été rapportée chez la souris où une déplétion de ces cellules dans un modèle d'arthrite (transfert de sérum de souris K/B×N) protège les souris de la maladie(118). Ce même résultat a été observé en utilisant des souris ayant un défaut de développement des neutrophiles (souris déficientes pour Gfi1, un facteur de transcription régulateur du développement des granulocytes)(119).

β. Dérèglement des cellules ostéo-articulaires dans la PR

La principale caractéristique de la PR est l'inflammation et l'épaississement de la membrane synoviale. Cette inflammation aboutit secondairement à la destruction du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral. Ce pannus, par contact cellulaire direct ou par la sécrétion d'enzymes, entraîne l'activation des chondrocytes et des ostéoclastes, responsables de la dégradation du cartilage et de l'érosion osseuse. Trois acteurs cellulaires majeurs sont impliqués dans cette destruction ostéo-cartilagineuse : les synoviocytes de type B (SB), les chondrocytes et les ostéoclastes.

Les SB (aussi appelés *fibroblast-like synoviocytes* ou *FLS*) ont pour fonction d'apporter des substances essentielles nutritives et lubrifiantes dans l'articulation, notamment l'acide hyaluronique donnant sa viscosité au liquide synovial. Au cours de la PR, les SB subissent une modification phénotypique sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires. Ils expriment alors à leur surface des molécules d'adhérence leur permettant de s'attacher au cartilage, de sécréter des métalloprotéases (MMP) de la matrice et de sécréter de la cathepsine(120). Ceci va entraîner la dégradation du cartilage et l'inhibition de synthèse du collagène. Comme cela a été suggéré dans des modèles expérimentaux de PR, ces phénomènes apparaissent avant l'implication des acteurs de l'immunité adaptative et la présence de cellules inflammatoires dans la synoviale. Une des raisons avancées est que les SB favoriseraient l'angiogénèse après activation de leur TLR2 par des peptidoglycanes

bactériens, entraînant la production de VEGF et d'IL-8(121). Cela conduit à la production de nombreuses chimiokines, contribuant au recrutement des cellules inflammatoires (LB, LT, neutrophiles) dans la synoviale. Ces cellules fibroblastiques participent également à l'érosion osseuse en produisant de fortes quantités de RANKL (*Receptor Activator of NFκB ligand*), le principal activateur des ostéoclastes(120), mais aussi en inhibant la réparation tissulaire en bloquant les ostéoblastes.

Les chondrocytes sont le seul type cellulaire composant le cartilage. En conditions non pathologiques, la prolifération de ces cellules est limitée. Ils participent à la synthèse et au maintien du tissu cartilagineux qui est composé essentiellement de CII et de protéoglycanes agrécanes. Dans la PR, la membrane synoviale inflammée est la source majeure de protéases, les MMP matricielles par exemple, qui vont dégrader le cartilage. Les chondrocytes peuvent être aussi à l'origine de ces MMP sous l'action de cytokines inflammatoires(122).

Les ostéoclastes sont les seules cellules de l'organisme capables de résorber le tissu osseux. Leur rôle ne se limite pas seulement à la digestion de l'os. Les ostéoclastes participent au remodelage osseux via leur dialogue constant avec les ostéoblastes et les ostéocytes, ou encore peuvent participer à la réponse immune. En effet, ces cellules issues d'une lignée monocytaire peuvent sécréter des cytokines(123) ou présenter des Ag aux LT(124). Dans des conditions physiologiques, les ostéoclastes peu activés dérivant de précurseurs monocytaires pourraient inhiber la réponse immune en induisant des lymphocytes au phénotype régulateur(125). À l'opposé, dans un contexte inflammatoire, certains ostéoclastes pourraient amplifier la réponse immune, voire auto-immune, surtout si ces ostéoclastes présentaient eux-mêmes des peptides aux LT, et en particulier des peptides citrullinés. Lors de la PR, les précurseurs des ostéoclastes s'accumulent au site de l'inflammation. Ces cellules vont ensuite se différencier en ostéoclastes sous l'action de différents facteurs tels que le M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) et RANKL. Le M-CSF prévient l'apoptose des précurseurs des ostéoblastes et induit l'expression de RANK, le récepteur de RANKL, à la surface de ces mêmes cellules. L'ostéoclastogénèse induite par RANKL peut être inhibée par l'ostéoprotégérine, un récepteur leurre exprimé par les ostéoblastes, les SB, les LB et les LT(126).

2. Les facteurs solubles

L'immunité repose sur l'action conjointe de certains types cellulaires et de molécules effectrices : les facteurs solubles. Ce terme regroupe de nombreuses molécules circulantes aux actions très variées, comme par exemple les cytokines, les chimiokines ou les facteurs du complément. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux principaux facteurs solubles impliqués dans la PR (Figure 6).

a) Les cytokines

Les cytokines sont organisées en un réseau complexe qui peut être redondant et pléiotrope et qui dépend de multiples interactions. Il est clairement établi que les cytokines jouent un rôle fondamental dans le processus responsable de l'inflammation, la destruction articulaire et les co-morbidités associées à la PR. Certaines peuvent contribuer soit à la résolution, soit à l'exacerbation de ces phénomènes. Les cytokines impliquées dans la physiopathologie de la PR sont très variées, et dans cette maladie, on considère que les cytokines de types pro-inflammatoires, responsables de l'exacerbation de la maladie, dominent leurs homologues anti-inflammatoires. On parle de dérégulation de la balance cytokinique en faveur des cytokines pro-inflammatoires dans la PR. Par exemple, depuis les années 1990, on sait qu'il y a une abondance de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α , GM-CSF) dans la synoviale de patients PR(127). D'ailleurs, les traitements ciblés de la PR ont été développés à l'origine pour viser les cytokines pro-inflammatoires en excès dans cette maladie.

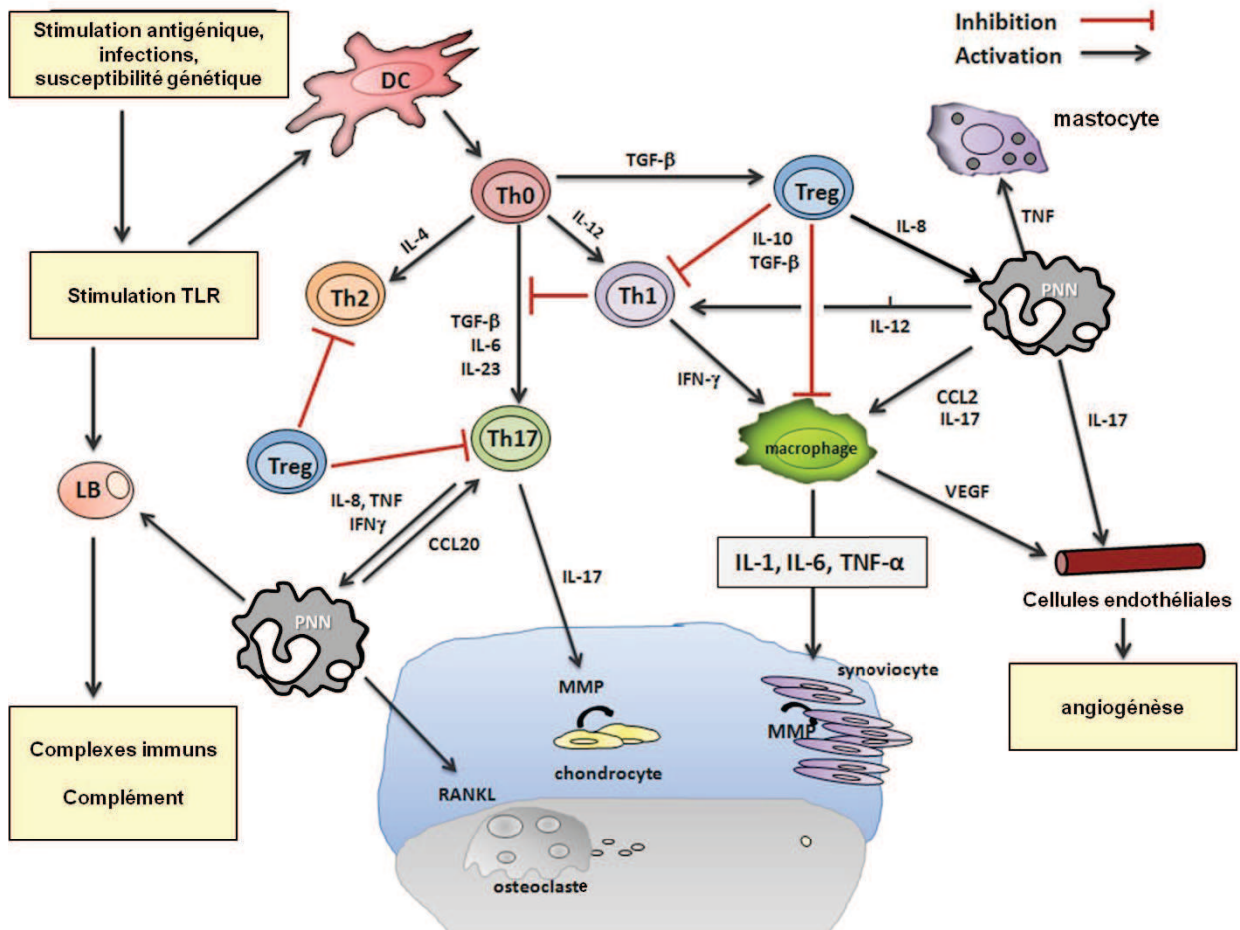


Figure 6: Interactions cellulaires et cytokiniques impliquées dans la physiopathologie de la PR

Le TNF α

A l'origine, ce facteur présent dans le sérum a été identifié comme capable d'induire la nécrose des tumeurs. Par la suite, d'autres propriétés lui ont été attribuées notamment sa capacité à induire des chocs septiques et à participer à l'inflammation.

Le TNF α est tout d'abord synthétisé sous forme membranaire (mTNF α) et peut ensuite être sécrété sous forme soluble (sTNF α) suite à son clivage par l'enzyme TACE(128). Les deux formes du TNF α , membranaire et soluble, sont biologiquement actives. Cette cytokine agit via ses deux récepteurs : TNFR1 et TNFR2. TNFR1 est exprimé ubiquitairement par un large éventail de types cellulaires et possède un domaine de mort dans sa partie intracellulaire. En revanche, TNFR2 ne possède pas de domaine de mort cellulaire et son expression est restreinte à certains types cellulaires, notamment les lymphocytes. Ces deux récepteurs deviennent des inhibiteurs naturels du TNF α en cas de libération dans la circulation sanguine après un clivage enzymatique.

Le TNF α est produit par les macrophages activés, les PNN et les LT. Il exerce des effets pro-inflammatoires après fixation à ses récepteurs et est impliqué dans de nombreuses maladies auto-immunes (PR, maladie de Crohn, psoriasis). Son blocage inhibe la production de GM-CSF, d'IL-6 et d'IL-8(129). Paradoxalement, cette cytokine peut avoir des effets anti-inflammatoires, spécialement après fixation via le TNFR2 portés par les Treg. L'interaction avec ces cellules régulatrices induit leur activation et leur prolifération conduisant à des phénomènes anti-inflammatoires(130).

L'implication du TNF α dans la PR émerge de travaux effectués, *in vitro*, établissant sa forte participation dans la destruction du cartilage et de l'os(131). Cette cytokine peut induire la production d'autres molécules délétères dans la PR (autres cytokines inflammatoires, MMP...). L'implication du TNF α a clairement été démontrée dans des modèles animaux d'arthrite où la neutralisation de cette cytokine par un Ac diminue fortement les arthrites(132). De plus, les souris surexprimant le TNF α humain développent une arthrite spontanée(133). Une autre preuve de l'implication de cette cytokine a été démontrée chez l'homme par l'efficacité des biothérapies ciblées utilisées pour traiter cette pathologie et par l'utilisation d'Ac bloquant le TNF α .

La superfamille de l'IL-1

Les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-18 and IL-33) sont importantes dans la réponse anti-infectieuse et parfois aussi dans le cas d'une inflammation stérile. Elles peuvent induire l'activation des leucocytes, des cellules endothéliales, des ostéoclastes ou encore des chondrocytes. L'IL1-RI et l'IL-1RII sont les deux récepteurs membranaires de cette cytokine pro-inflammatoire. IL-1RII, à l'opposé d'IL-1RI, ne transmet pas de signal activateur et joue par ce fait le rôle de récepteur leurre de l'IL-1(134). De plus, l'IL-1Ra (pour *IL-1 Receptor antagonist*) est un antagoniste naturel qui, par sa fixation sur ces deux récepteurs, va inhiber l'activation induite par l'IL-1. L'expression d'IL-1Ra est induite par le TGF- β , l'IL-4, l'IFN- β et l'IL-13. Ces mêmes cytokines vont en parallèle diminuer l'expression de l'IL-1(135). L'IL-1 est principalement produite par les monocytes mais aussi par les LB, les synoviocytes et les chondrocytes. La balance IL-1/IL-1Ra est complexe et, dans certaines situations, l'un des deux peut être modifié sans que l'autre ne le soit, ce qui entraîne une dérégulation de cette balance.

Cibler l'IL-1 ou ses récepteurs s'est avéré efficace dans différents modèles murins d'arthrites, car le blocage de cette cytokine permet de réduire l'inflammation et surtout les atteintes articulaires(136). Les souris n'exprimant pas l'IL-1Ra développent une arthrite spontanée, qui

est expliquée en partie par une amplification d'une inflammation dépendante des Th17(137). Les membres de la famille de l'IL-1 (L'IL-1 α , l'IL-1 β , IL-1Ra) sont très exprimés chez les patients PR et notamment dans la membrane synoviale(138). Certains patients développent même des anticorps anti-IL-1(139). Paradoxalement, l'utilisation des traitements ciblant spécifiquement l'IL-1 reste marginale car moins efficaces que ceux ciblant le TNF α .

L'IL-33 est une cytokine de la superfamille de l'IL-1 par ses similitudes fonctionnelles et structurales. Après fixation à son récepteur (ST2L), cette cytokine favorise la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les Th2 et pourrait donc avoir un rôle anti-inflammatoire dans la PR. Néanmoins, l'administration d'IL-33 exacerbe l'arthrite expérimentale au collagène (AEC), et les souris déficientes en ST2L, son récepteur membranaire, développent une arthrite atténuée(140). De manière générale, les études dans l'arthrite attribuent à l'IL-33 un effet pro-inflammatoire qui reste cependant controversé à cause de sa capacité d'induction de cytokines anti-inflammatoires(141). Chez les patients PR, l'IL-33 est détectée dans la membrane synoviale et de manière prédominante dans les SB(140).

L'IL-17

Les cytokines de la famille de l'IL-17 regroupent 6 membres : IL-17A (souvent appelée IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) et IL-17F. A l'origine décrite comme produite exclusivement par les Th17, l'IL-17 peut aussi être exprimée par des cellules de l'immunité innée (macrophages, DC, NK)(142). L'IL-17 induit de nombreux phénomènes pro-inflammatoires notamment par induction de l'expression de certains gènes des MMP, de facteurs de croissance, d'autres cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines attirant les neutrophiles(143). L'IL-17 est impliquée dans la défense antibactérienne et antifongique. C'est une cytokine clairement pro-inflammatoire qui stimule l'activation des monocytes, des DC (en collaboration avec le TNF α) et des fibroblastes et qui accroît la production de cytokines (principalement inflammatoires) par ces cellules(144). Elle permet indirectement la différenciation, la maturation et l'activation des PNN, car ces cellules n'expriment pas le récepteur à l'IL-17.

L'IL-17 est impliquée dans la pathogénèse de la PR, par ces effets sur l'ostéoclastogénèse aboutissant à la résorption osseuse. Cette cytokine a d'ailleurs été retrouvée dans le tissu synovial de patients PR(144). L'importance de l'IL-17 dans la physiopathologie de la PR est soulignée par les résultats obtenus dans les modèles de cette pathologie. Par exemple, la

sévérité de l'arthrite à antigène est diminuée par la neutralisation de l'IL-17(145) et le développement de l'AEC est diminué chez les souris déficientes en IL-17 (146).

L'IL-6

L'IL-6 est une cytokine connue pour posséder une action pléiotrope. En effet, elle agit sur la maturation et l'activation des LB, des LT, des macrophages, des ostéoclastes, des chondrocytes, des cellules endothéliales et possède des effets variés sur l'hématopoïèse dans la moelle osseuse(147). Cette cytokine est sécrétée par de nombreuses cellules, notamment par celles appartenant au système immunitaire inné (neutrophiles, monocytes, macrophages). L'IL-6 agit via son récepteur hétérodimérique, composé de la gp130 et de l'IL-6R.

De nombreuses études font état d'une surproduction d'IL-6 dans diverses maladies auto-immunes et maladies chroniques inflammatoires (maladie de Crohn, arthrite juvénile, myélome multiple ou PR)(148). Les souris n'exprimant pas l'IL-6 sont protégées de l'AEC et la neutralisation des effets de l'IL-6, par un anticorps anti-IL-6 ou un anti-IL-6 récepteur (IL-6R), inhibe le développement de l'arthrite(149). L'IL-6 est retrouvée abondamment dans le liquide synovial et dans le sérum de patients atteints de PR. En Europe, un anticorps ciblant l'IL-6R (tocilizumab) est autorisé depuis 2009 pour traiter la PR, ainsi que d'autres maladies inflammatoires et auto-immunes comme la maladie de Crohn, les myélomes multiples ou le LES. Cette stratégie permet de diminuer l'activité de la maladie chez les patients réfractaires aux traitements classiques de la PR.

L'IFN- α

Les IFN de type I sont des protéines aux activités antivirales, antiprolifératives et immuno-modulatrices, sécrétées par de nombreuses cellules en réponse à une grande variété de stimuli. L'IFN- α et l'IFN- β appartiennent à la famille des IFN de type I. Ces molécules sont reconnues par leur récepteur nommé IFNAR (*interferon- α/β receptor*). Contrairement à l'IFN- β qui est produite par de nombreuses cellules, l'IFN- α est décrite comme produite principalement par les pDC. L'activation via les TLR induit une forte production d'IFN- α par les pDC, ce qui peut participer à la physiopathologie de maladie auto-immune comme le lupus(150). Dans cette pathologie, des CI contenant de l'ADN ou de l'ARN induisent la production d'IFN- α par les pDC. Cependant, d'autres cellules semblent pouvoir sécréter cette cytokine comme les monocytes(151), les fibroblastes, les LT ou les macrophages(152). Récemment, nous avons montré que les neutrophiles sont aussi capables de produire cette molécule(75), et notamment les PNN provenant de patients PR. Cette cytokine participe par

ailleurs au lien immunité innée/adaptative. De manière générale, les IFN de type I sont connus pour être délétères dans les maladies auto-immunes par leur capacité à promouvoir la présentation des Ag, induire les réponses T et par l'induction de l'expression de chimiokines(153). Peu de données sont disponibles concernant l'implication de l'IFN- α dans la PR. On sait néanmoins que les patients PR ayant une faible réponse à la thérapie anti-CD20 (rituximab) ont une signature IFN- α (154). L'IFN- α est présent localement dans le liquide synovial de PR(155). Au contraire, dans un modèle animal d'arthrite induite par la méthyl-BSA, l'administration d'IFN- α protège du développement de la maladie(156) et l'administration d'IFN- β protège des arthrites dans deux autres modèles(157). De même, les souris déficientes pour l'IFNAR développent des arthrites plus sévères(156). Ainsi, le rôle exact des IFN de type I doit être éclairci et surtout il reste à savoir à quelle phase du développement de l'arthrite ils pourraient être impliqués.

b) Les auto-anticorps

La PR est classiquement caractérisée par la présence de FR, des auto-anticorps d'isotype IgM dirigés contre le fragment Fc des IgG. Connus depuis 1940, ils sont présents chez 80% des patients PR et ce dès la première année. Néanmoins, les FR sont retrouvés chez 15% des individus sains et ne sont donc pas spécifiques de la PR. La découverte des ACPA a été une avancée très importante qui permet d'augmenter la spécificité des tests diagnostiques à 90-98%. Les FR et les ACPA sont corrélées avec la progression radiologique de la PR ainsi qu'avec le DAS28 (*disease activity score 28*)(158), score utilisé pour mesurer l'activité de la maladie.

Les ACPA reconnaissent des protéines ou peptides citrullinés. *In vivo*, la conversion des arginines en citrullines est réalisée par l'enzyme PADI. Le phénomène de citrullination est favorisé par un environnement inflammatoire. Les cibles citrullinées reconnues par les ACPA qui semblent être les plus spécifiques de la PR sont le fibrinogène, la vimentine, la filaggrine et la kératine. Par ailleurs, il a été montré que les anticorps monoclonaux anti-citrulline pouvaient reconnaître plus d'un antigène, du moment qu'il est citrulliné(159,160). Ceci laisse supposer que la reconnaissance par les ACPA est plus citrulline-dépendante qu'antigène-dépendante. En plus d'être un marqueur diagnostique, les ACPA sont pathogènes. Ils peuvent former des complexes immuns, activer le système du complément(161), activer les cellules possédant des récepteurs Fc(162) ou les ostéoclastes. La fixation d'ACPA à la surface des

ostéoclastes induit d'ailleurs un phénomène d'ostéoclastogénèse conduisant à la destruction osseuse(15). De nombreuses protéines citrullinées ont été détectées dans des échantillons de liquides synoviaux de patients(163), faisant de ces protéines des cibles potentielles des ACPA.

Il a par ailleurs été montré récemment que les ACPA reconnaissent des NET(116,117) qui exposent des Ag citrullinés, principalement des histones.

c) Le système du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines sériques et de récepteurs membranaires de l'immunité innée. Il assure un mécanisme de défense contre les infections, participe à l'élimination des pathogènes mais peut aussi contrôler les réponses inflammatoires et moduler la réponse immune spécifique. Les membres du complément circulants sont généralement synthétisés dans le foie. La voie classique, alterne et celle des lectines, sont les trois voies pouvant être activées par des ligands qui leur sont spécifiques (Figure 7). Leur mise en œuvre entraîne des cascades d'activation par protéolyse successive de protéines plasmatiques, qui convergent toutes vers la protéine centrale du système du complément, appelée C3. A la suite de cette cascade, C3 est clivée en deux fragments bioactifs (C3a et C3b). C3a est une anaphylatoxine aux propriétés chimioattractantes pour les PNN, les LB, les LT, les monocytes et les macrophages. C3b est un composant des complexes C3 et C5 convertases qui induisent la libération de C5a, une autre anaphylatoxine et C5b. Grâce à leurs récepteurs respectifs (C3aR et C5aR), C3a et C5a peuvent activer les cellules endothéliales et les plaquettes mais aussi induire la sécrétion de cytokines et de chimiokines aux activités pro-inflammatoires. De plus, C3b, par l'intermédiaire des récepteurs CR1, CR3 et CR4 peut activer les leucocytes. C5b est impliqué, avec C6, C7, C8 et C9 dans la formation du complexe d'attaque membranaire qui va littéralement créer un pore transmembranaire qui permettra la lyse osmotique du micro-organisme ou de la cellule infectée ciblés.

L'ensemble de ces phénomènes est essentiel dans la lutte contre les pathogènes mais peut aussi jouer un rôle dans la destruction tissulaire. Ceci a été démontré dans de nombreuses situations pathologiques telles que les maladies auto-immunes, les chocs septiques, l'allergie ou dans un contexte de rejet de greffe.

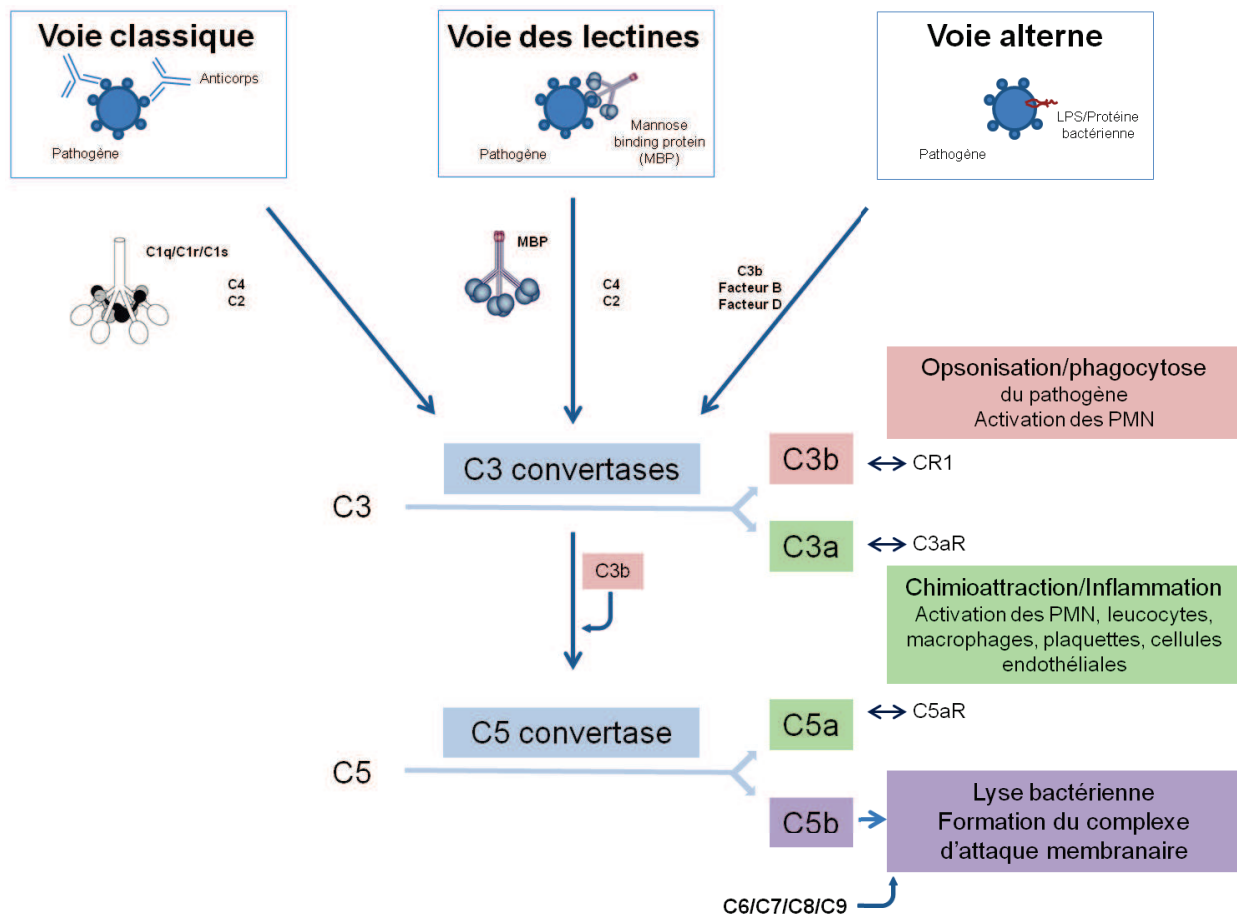


Figure 7 : voies d'activation du système du complément

La voie classique du complément est activée après la fixation de C1q aux CI. La voie des lectines est activée par les résidus mannose présents sur les membranes du pathogène via la fixation de MBP (*Mannose-Binding Protein*). La voie alterne est activée par des substances d'origine bactérienne telles que le LPS. Les 3 voies convergent vers la formation des complexes C3 et C5 convertases, eux-mêmes à l'origine de la formation de C3a, C3b, C5a, C5b. Ceci conduit à l'élimination directe du pathogène (opsonisation, phagocytose, formation du complexe d'attaque membranaire) ou à l'activation des cellules de l'immunité.

Activation de la voie classique du complément

Par définition, la voie classique du complément est activée par la fixation de C1q aux CI, mais il existe d'autres ligands au C1q endogènes ou exogènes (cellules apoptotique, CRP, LPS, fixation directe aux bactéries) dont certains activent la voie classique. La structure de C1q est complexe : elle comprend six têtes globulaires connectées à une région centrale de structure proche du collagène. Chaque tête globulaire possède un site de fixation aux immunoglobulines (IgM et IgG) et l'engagement d'au moins deux têtes suffit à un changement de conformation du C1q. La fixation de C1q aux CI puis son changement de conformation provoque la mobilisation de C1r et C1s. Une activation de la cascade du

complément est alors mise en jeu, impliquant C4 et C2, ce qui a pour conséquence la formation du complexe C3 convertase classique (C4b2a). Ce complexe a la capacité de cliver C3 en C3a et C3b. Comme décrit précédemment, l'activation de la voie classique du complément, comme d'ailleurs l'activation des autres voies, a pour conséquence une élimination du pathogène (directe ou indirecte) et l'induction de phénomènes inflammatoires. De plus, la protéine C1q, par son rôle d'opsonine, se fixe et recouvre les cellules apoptotiques/nécrotiques, ce qui permet leur élimination par les macrophages. Ce phénomène limite les réponses inflammatoires causées par la libération de molécules cytoplasmiques/nucléaires dans le milieu extracellulaire, telles que la protéine HMGB1 (*High-mobility group protein B1*) qui est une protéine qui stabilise la formation du nucléosome ou les nucléosomes eux-mêmes. De même, il existe des récepteurs à C1q qui vont permettre principalement la phagocytose des éléments fixés par cette protéine.

Activation de la voie des lectines

La voie des lectines est activée par les micro-organismes qui portent des résidus mannose ou N-acétylglucosamides. La protéine de reconnaissance de ces micro-organismes est la MBP (aussi appelée MBL pour *Mannose-Binding-Lectin*) qui possède une similitude structurelle avec C1q. MBP est associée à des sérines estérases (appelées MASP pour *Mannan-Associated Serine Protease*) qui présentent une forte homologie avec C1r et C1s. Une fois activées, les MASP permettent le clivage de C2 et C4, participant à la formation d'une C3 convertase identique à celle formée à l'issue de l'activation de la voie classique. Il existe donc une similitude entre voie des lectines et voie classique.

Activation de la voie alterne

La première étape de l'activation de la voie alterne débute par une fixation covalente de C3b à des éléments d'origine bactérienne (comme le LPS), ou parfois à quelques cellules infectées par un virus, quelques levures ou parasites. Grâce à la mise en jeu des facteurs D et B et de C3b, la formation continue d'une C3 convertase caractéristique de la voie alterne (C3bBb) est mise en place. En l'absence d'activateur, cette C3 convertase a une durée de vie assez courte et est très rapidement dissociée. Mais au contact d'une surface activatrice, le C3b dissocié va pouvoir se lier à une molécule de facteur B et permettre la formation d'une nouvelle C3 convertase alterne stabilisée par la Properdine. Cette C3 convertase clive C3 de façon identique à la C3 convertase classique (C4b2a). La voie alterne est capable d'auto-amplification car plusieurs molécules de C3b peuvent se lier à une même surface activatrice,

permettant la formation de plusieurs C3 convertases. Ce phénomène est important pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en absence d'anticorps spécifiques. La voie alterne peut aussi amplifier une activation du complément initiée par les deux autres voies.

Implication du système du complément dans la PR

Le système du complément, lorsqu'il fait défaut, participe à la pathogénèse ou aux manifestations cliniques de certaines maladies auto-immunes. Par exemple, les déficiences homozygotes héréditaires de C1q, C1r, C1s ou C4 sont très fortement associées au lupus(164). De manière générale, plusieurs hypothèses expliquant le rôle du système du complément dans la survenue de maladies auto-immunes ont été émises. La première est que les taux anormalement bas de certains membres du complément entraînent un défaut d'élimination des CI, qui vont se déposer dans les tissus. S'en suit des réactions inflammatoires ainsi que la libération d'auto-antigènes qui favorisent l'initiation d'une réponse auto-immune(165), ce qui est le cas dans le lupus. De plus, un défaut d'élimination des cellules apoptotiques pourrait s'ajouter à ces phénomènes, amplifiant la libération d'auto-antigènes(166). Une autre hypothèse suggère que le système du complément est impliqué dans le développement de la tolérance au soi ; il est par exemple nécessaire à l'élimination des lymphocytes auto-réactifs lors de la maturation du système immunitaire (167).

De manière générale, la PR n'est pas considérée comme une pathologie associée à un défaut du complément, mais plutôt une maladie où ce système est activé. Néanmoins, quelques études suggèrent qu'un défaut de C1q et de C2 pourrait favoriser la survenue de la PR et qu'un défaut de MBP est associé à la sévérité de la maladie(167). Il a été montré que les membres du complément activé et leurs récepteurs ainsi que leurs ARNm étaient présents localement dans les articulations inflammées de PR(168,169). De manière plus systémique, les taux de C3 et C4 dans les séras de patients PR sont élevés, reflétant les phénomènes inflammatoires(170). Une hypothèse serait que les facteurs du complément sont produits localement dans l'articulation et que les forts taux systémiques seraient en partie dus à leur relargage dans la circulation(167).

Des études sur le lien entre complément et PR ont été menées sur des modèles murins. Par exemple, les souris déficientes en C3 ou en facteur B sont protégées des arthrites cliniquement et histologiquement dans le modèle d'AEC(171). Dans le même modèle, une administration systémique d'Ac monoclonaux anti-C5 retarde l'apparition de la maladie et diminue les arthrites lorsqu'elles sont déjà établies(172). Dans le modèle d'arthrite par

transfert de sérum de souris K/BxN (modèle qui ne nécessite pas d'immunisation active), il a été montré que les souris n'exprimant pas C3, C5, C5aR ou le facteur B ne développaient pas ou peu d'arthrites(173). Dans cette même étude, une injection de ce sérum arthritogénique à des souris n'exprimant pas C1q, C6 ou MBP n'induit ni protection ni aggravation des arthrites comparé aux souris contrôles. Une autre étude réalisée dans le modèle CAIA (*Collagen Antibody-Induced arthritis*) où les arthrites sont induites par l'injection d'un cocktail d'anticorps anti-collagène commercial, montre que l'inhibition de la voie classique ou de la voie des lectines n'affecte pas le développement des arthrites(174). La voie classique seule ou la voie des lectines seule ne sont pas suffisantes pour induire des arthrites dans ce modèle(175). Tous ces éléments appuient le fait que le système du complément est impliqué dans la physiopathologie de la PR.

E. Les traitements de la PR

1. Les traitements conventionnels

Les traitements classiques de la PR comportent d'une part des thérapeutiques à visée symptomatique et d'autre part des traitements dits « de fond » qui sont susceptibles de freiner ou d'arrêter l'évolution de la maladie. Les traitements symptomatiques comprennent les analgésiques et les corticostéroïdes (anti-inflammatoires stéroïdiens). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine sont relativement peu efficaces. Ces traitements agissent surtout sur l'inflammation et sont associés à un traitement de fond (DMARD) qui lui va plutôt avoir une action sur l'atteinte articulaire. Le traitement de fond de référence est le méthotrexate (MTX) ; il possède un effet cytostatique thérapeutique non spécifique et est bien toléré. Le MTX est aussi utilisé dans d'autres pathologies comme le cancer grâce à son action anti-prolifératif. D'autres molécules comme la salazopyrine ou le leflunomide sont à la disposition du praticien en seconde attention. Les patients peuvent également bénéficier d'actes thérapeutiques locaux, tels que des infiltrations de corticoïdes, ou d'actes chirurgicaux plus lourds, allant jusqu'à l'arthroplastie.

2. Les traitements ciblés

Considérées comme une révolution dans la prise en charge thérapeutique, les biothérapies sont l'emploi de molécules issues d'organismes vivants à des fins thérapeutiques. Elles peuvent se présenter sous la forme d'une molécule, d'un virus, d'un gène codant pour une molécule thérapeutique introduit dans un vecteur, d'une cellule ou d'un tissu. Ce sont des traitements qui agissent directement sur les mécanismes intervenant dans la mise en place ou l'entretien d'une pathologie. Dans le cas de la PR, les traitements ciblés ont fait leur apparition dans les années 1990. Ce sont essentiellement des "biothérapies" (terme impropre consacré par l'usage en français) qui ciblent spécifiquement les molécules responsables de l'inflammation et de l'érosion articulaire. La majorité des biothérapies autorisées et utilisées dans la PR ciblent des cytokines pro-inflammatoires, mais également l'action des LB et l'activation des LT (Figure 8). Différentes stratégies sont utilisées pour bloquer ou neutraliser ces acteurs. L'action des cytokines pro-inflammatoires est ciblée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de celles-ci (ou de leurs récepteurs) ou en utilisant leurs récepteurs solubles inhibiteurs. Des anticorps monoclonaux sont également utilisés pour inhiber l'action des LB et l'activation des LT. Il est à noter qu'il existe également des inhibiteurs de molécules impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire.

Du fait de leurs coûts élevés et des effets secondaires potentiels, les biothérapies ne sont utilisées dans cette maladie qu'après échec thérapeutique des immunomodulateurs conventionnels.

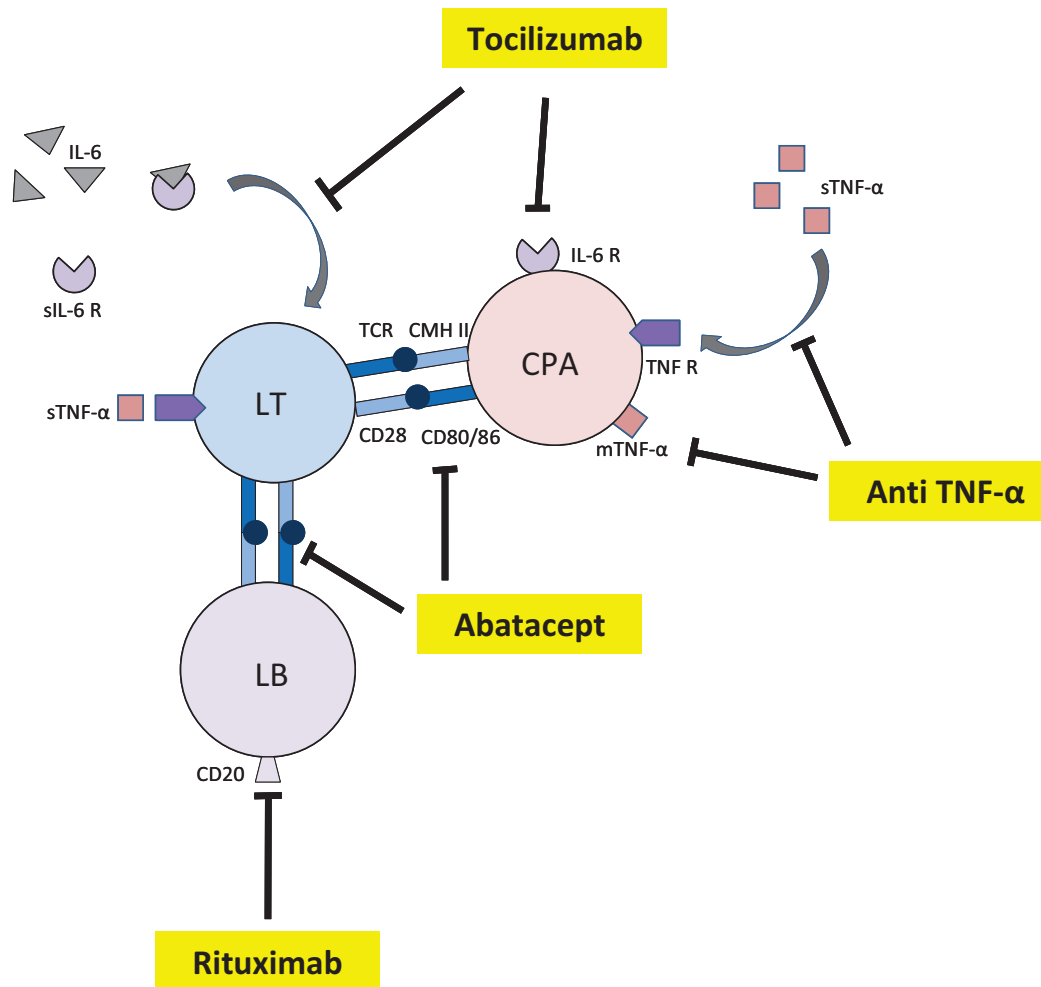


Figure 8: Les principales biothérapies utilisées dans la PR et leurs cibles immunologiques.

a) Les anti-TNF α

Il est clairement établi que le TNF α est impliqué dans la physiopathologie de la PR par ses effets pro-inflammatoires. L'observation des souris surexprimant le TNF α humain développant une arthrite destructrice(133) et le fait que les arthrites des souris traitées par un Ac anti-TNF α soient diminuées(132), a poussé la recherche à tester les anti-TNF α dans la PR. Ainsi l'équipe de Marc Feldman a utilisé un anticorps chimérique monoclonal anti-TNF α dans un essai clinique(176). Cet essai fut un réel succès, puisque 10 patients atteints de PR anciennes et réfractaires, répondirent favorablement au traitement. Cet anticorps reçu ensuite une autorisation de mise sur le marché dans la maladie de Crohn en 1998, puis dans la PR et ensuite dans différentes pathologies liées au TNF α . Il fut rebaptisé infliximab. L'infliximab permet dans les modèles expérimentaux, comme chez les patients, de réduire de manière significative l'inflammation et la destruction articulaire.

En plus de l'infliximab, d'autres Ac monoclonaux sont disponibles (adalimumab, certolizumab, golimumab) ou des protéines de fusion Ig-récepteur soluble (etanercept), tous ayant pour cible le TNF α . Ces biothérapies peuvent cibler le TNF α soluble (etanercept) ou le TNF α soluble et membranaire (infliximab, adalimumab, certolizumab, golimumab). La thérapie ciblant le TNF α fut une révolution quant à la prise en charge des personnes atteintes de PR réfractaires aux traitements conventionnels. Malgré cela, ils sont susceptibles d'entraîner des effets secondaires. La complication majeure liée à l'utilisation des inhibiteurs du TNF α est l'augmentation de l'incidence des états infectieux, notamment la tuberculose. De plus, les anticorps anti-TNF α peuvent induire l'apparition d'anticorps anti-médicament, ce qui entraîne une diminution de leur effet thérapeutique.

b) Les thérapies ciblant l'IL6

Jusqu'à présent, le seul inhibiteur de l'IL-6 utilisé en routine pour traiter la PR est le tocilizumab. Le tocilizumab est un anticorps monoclonal anti-récepteur de l'IL-6. En Europe, il est autorisé depuis 2009 pour traiter en première ligne la PR. Ce traitement est utilisé en monothérapie ou en combinaison avec le MTX. Il diminue les symptômes, augmente les fonctions physiques et la qualité de vie et surtout retarde les atteintes structurelles de la PR. Les effets du tocilizumab sur les taux d'IL-6 dans les séras de patients souffrant de PR sont controversés. L'équipe de Nishimoto a démontré que le traitement par tocilizumab induisait une augmentation du taux d'IL-6 sérique alors que l'équipe de Marti a observé une diminution de celui-ci(177,178). La question reste donc ouverte quant aux mécanismes cellulaires impliqués dans la sécrétion d'IL-6 chez les patients sous tocilizumab (implication des lymphocytes, induction de la sécrétion par les DC). Le succès du tocilizumab a ouvert la voie au développement d'autres thérapies ciblant l'IL-6 ou son récepteur.

c) Autres thérapies anti-cytokines

L'anakinra est une forme recombinante non glycosylée de l'IL-1Ra qui est autorisée pour traiter les patients PR ne répondant pas aux DMARDs seuls. Son efficacité et sa tolérabilité ont été prouvés dans plusieurs essais cliniques. Les effets indésirables les plus courants sont les infections au site de l'injection. Bien qu'aucune étude ne le démontre formellement, l'anakinra semble moins efficace que les anti-TNF α dans le traitement des PR actives(179). De ce fait, il est que très rarement utilisé en clinique.

Si l'on tient compte du succès des anti-TNF α , il n'est pas étonnant que de nouvelles biothérapies ciblant les cytokines voient le jour. Ceci est le cas pour les traitements ciblant l'IL-17. Deux anticorps monoclonaux sont en cours de développement : le secukinumab et l'ixekizumab (aussi utilisé dans le psoriasis) chez des patients après échec du méthotrexate seul ou d'un anti-TNF α . Le secukinumab est aussi développé pour traiter le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante. Deux autres molécules ciblant cette fois-ci les voies de signalisations sont en développement dont le tofacitinib (inhibiteur des janus kinases 1 et 3).

d) *Thérapies ciblant les lymphocytes B*

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique qui cible le CD20, antigène exprimé à la surface des LB mais qui n'est pas exprimé par les plasmocytes ni par les précurseurs avant le stade pré-B. Il provoque la destruction sélective des LB par apoptose, cytotoxicité dépendante du complément ou cytotoxicité dépendante des Ac. En déplaçant les LB, le rituximab agit sur la réponse immunitaire et sur l'activation des LT. A l'origine, cette biothérapie a été utilisée dans le traitement des lymphomes B où son efficacité et sa bonne tolérance ont constitué un atout majeur dans la prise en charge de ces maladies(180). Ces dernières années, son utilisation a été élargie aux maladies auto-immunes et en particulier à la PR. En effet, les LB sont les précurseurs des plasmocytes, cellules productrices de facteurs rhumatoïdes et des différents auto-Ac impliqués dans la pathologie. En outre, les LB sont susceptibles de présenter des auto-Ag et peuvent activer des LT auto-réactifs. Ils sécrètent différentes cytokines, pro-inflammatoires notamment (IL-1, TNF α), délétères dans la PR. Les effets secondaires du rituximab sont les infections des voies respiratoires et urinaires. Des molécules ciblant la survie et la maturation des LB sont en cours de développement, comme le belimumab qui cible les formes solubles de BAFF. L'atacept, une protéine de fusion qui va bloquer la fixation de BAFF et APRIL sur les LB a démontré quant à lui de faibles effets thérapeutiques dans le traitement de la PR(181).

e) *Thérapie ciblant l'interaction cellules dendritiques/lymphocytes T*

L'activation des lymphocytes T passe, entre autre, par une phase impliquant des molécules de costimulation. C'est pourquoi des biothérapies ciblant ces molécules ont été élaborées, le but étant de modérer une trop grande activation des réponses immunitaires.

L'abatacept est la première immunothérapie visant à inhiber la costimulation des LT. Cette protéine de fusion autorisée depuis 2005 aux Etats-Unis est composée du domaine

extracellulaire du CTLA-4 humain et de la partie Fc d'une IgG humaine. Le CTLA-4 est une molécule appartenant à la famille de CD28 qui est notamment exprimée par les LT CD4. Il lie les mêmes molécules que CD28 à savoir CD80/CD86 portés par les CPA. Contrairement au CD28 qui augmente les fonctions des lymphocytes T quand il est lié au CD80/86, l'interaction CTLA-4-CD80/86 induit un signal d'inhibition intra-cytoplasmique au LT l'exprimant, bloquant ainsi son cycle cellulaire. De plus, des phénomènes de tolérance peuvent être induits par l'engagement de CTLA-4. Par exemple, l'expression de cette molécule de co-activation par les Treg est nécessaire à l'activité suppressive de ces cellules(182).

F. Les modèles expérimentaux de la PR

Les modèles animaux sont développés dans le but d'obtenir une représentation simplifiée de systèmes biologiques impossibles à étudier directement chez l'homme. La PR étant une maladie multifactorielle impliquant une part génétique et une part environnementale, il est difficile de parler de modèle animal reflétant exactement toutes les caractéristiques de cette maladie (cliniques, histologiques, immunologiques et génétiques). Cependant, l'étude des modèles animaux d'arthrite expérimentale tient une place prépondérante dans la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la PR. Idéalement, il serait donc nécessaire de confirmer dans plusieurs modèles et dans plusieurs espèces animales les résultats d'une même étude. Dans ce manuscrit, nous détaillerons uniquement le modèle utilisé lors de ce travail de thèse (AEC) et décrirons plus succinctement les autres modèles les plus utilisés dans l'étude de la PR.

1. L'arthrite expérimentale au collagène

L'arthrite expérimentale au collagène (AEC) a d'abord été décrite chez le rat(183) et est toujours très utilisée dans cette espèce pour identifier des molécules thérapeutiques dans la PR. Il a été ensuite établi que certaines souches de souris étaient sensibles à l'AEC, ainsi que les primates(184). L'immunisation est réalisée par du collagène de type II (CII) hétérologue ou parfois homologue(185) émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA, contenant des bactéries de *M. tuberculosis* inactivées). Un rappel est réalisé 21 jours plus tard dans du CFA ou de l'IFA (adjuvant incomplet de Freund, sans bactéries) selon le fond génétique des souris. Dans certains cas, une injection de LPS est effectuée afin de « booster » le

développement des arthrites. Suite à cette immunisation, les animaux développent une polyarthrite auto-immune caractérisée par une érosion sévère du cartilage et de l'os. Ces souris immunisées partagent différents traits cliniques, immunologiques et histopathologiques avec la maladie humaine : érythème et œdème ; production de FR et d'anticorps anti-CII ; synovite, formation de pannus, infiltration cellulaire articulaire et érosion du cartilage et de l'os(186). L'induction de la maladie par le CII initie une réponse immune humorale et cellulaire, ciblée au niveau du tissu articulaire, où l'antigène est localisé de manière prépondérante. L'induction de la pathologie est fortement dépendante du CMH et les souris d'haplotypes H-2^q, comme les souris de la lignée DBA/1, sont les plus sensibles. Néanmoins, les souris C57BL/6, plus réfractaires au développement des arthrites (car d'haplotype H-2^b), sont désormais de plus en plus utilisées dans l'AEC car de nombreux « knock-out » (KO) et transgéniques ont été créés à partir de cette lignée. L'étude d'un gène unique dans une maladie multifactorielle est essentielle, même si l'utilisation de souris KO dans un modèle induit pose certaines questions (nécessité du gène pour le développement fœtal, modification génétique pouvant modifier d'autres fonctions...).

Les LT et les LB ont une place importante dans le développement de l'AEC. Les LB ont comme principal rôle la production d'anticorps arthritogéniques anti-CII. La place centrale de ces anticorps dans l'AEC est soulignée par le fait qu'ils sont capables d'induire une arthrite par immunisation passive lorsqu'ils sont injectés à des souris naïves (modèle CAIA)(187). De plus, l'intensité des signes articulaires de la maladie est corrélée aux taux d'anticorps dirigés contre certains épitopes du CII(188). Rappelons aussi que la neutralisation des LB s'est révélée être un traitement efficace dans la PR. Les LT jouent un rôle plus complexe dans l'AEC : s'ils agissent en synergie avec les LB, ils induisent également l'activation d'autres types cellulaires (PNN, macrophages, synoviocytes, chondrocytes). Leur transfert ne permet pas d'induire de manière franche une arthrite, par contre leur blocage inhibe le développement de la maladie(189). Comme chez l'homme, les cytokines pro-inflammatoires ont été décrites comme jouant un rôle prépondérant dans ce modèle (TNF α , IL-1, IL-6, IL-17). Par exemple, de récents travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que le blocage du récepteur à l'IL-6 dans l'AEC diminuait les arthrites(190). Ce phénomène est accompagné de l'augmentation d'une sous-population de Treg aux activités très suppressives.

L'utilisation d'adjuvant dans ce modèle et l'injection (parfois nécessaire) de LPS mettent en lumière le rôle probable de l'immunité innée, notamment les TLR, dans le processus d'immunisation.

2. Modèles d'arthrites spontanées

a) *L'arthrite de la souris K/BxN*

Le modèle K/BxN a été généré en croisant des souris de fond génétique C57BL/6 (KRN) possédant un TCR transgénique qui reconnaît la ribonucléase bovine, avec des souris NOD (*Non-obese diabetic*). Ces souris, initialement créées dans le but d'étudier la fonction du transgène dans un fond génétique CMH-H2^k, développent des arthrites spontanées chroniques, sévères et destructrices(191). La maladie est due à l'activation des LB qui vont produire de larges quantités d'auto-Ac anti-G6PI (*glucose-6-phosphate isomerase*), une protéine ubiquitaire, et déclencher ainsi une arthrite sévère(192). La pathologie articulaire dans ce modèle est chronique et symétrique, et se rapproche plus des caractéristiques de la PR que le modèle d'AEC. Chez les souris arthritiques, on retrouve des dépôts de G6PI associés à des IgG anti-G6PI et des fragments du complément dans les articulations. Cette accumulation de l'auto-Ag dans l'articulation explique le fait qu'une protéine ubiquitaire induise une maladie auto-immune localisée dans un tissu. Notons que dans ce modèle, le système du complément est très impliqué dans la pathogénèse(173) ainsi que les neutrophiles(119).

De manière très intéressante, le transfert du sérum ou des IgG purifiées contenant des Ac anti-G6PI d'une souris K/BxN arthritique à une souris naïve induit une rapide et profonde synovite érosive, similaire à celle observé chez l'homme. Cette synovite est dépendante des neutrophiles, des macrophages, du système du complément et des médiateurs inflammatoires(186). On parle ici de sérum arthritogénique.

b) *L'arthrite de la souris transgénique pour le TNF α humain*

Les souris exprimant le transgène du TNF α humain développent spontanément dès la 3^{ème} semaine de vie des arthrites progressives et chroniques qui touchent toutes les articulations. Ces souris présentent une hyperplasie de la membrane synoviale, un pannus, une dégradation du cartilage ainsi qu'une infiltration de neutrophiles et de lymphocytes dans l'articulation(133), ressemblant fortement à la pathologie humaine. L'inhibition du TNF α dans ce modèle restaure l'activité des Treg(193). Ce modèle est intéressant pour l'étude de nouveaux traitements dans la pathologie humaine où le rôle du TNF α n'est plus à démontrer.

c) *L'arthrite de la souris déficiente pour l'IL-1Ra*

L'IL-1Ra est un antagoniste naturel qui, par sa fixation sur les récepteurs de l'IL-1, va inhiber l'activation induite par cette cytokine. Les souris BALB/c (mais pas les C57BL/6) déficientes pour l'IL-1Ra développent des arthrites spontanées dès l'âge de 5 semaines caractérisées par une inflammation péri-articulaire(194). Ces souris produisent des Ac anti-CII mais pas de facteurs rhumatoïdes IgM(195). Les arthrites spontanées des souris IL-1Ra^{-/-} sont en partie expliquées par une amplification d'une inflammation dépendante des Th17(137).

3. Le modèle CAIA (Collagen antibody-induced arthritis)

Ce modèle d'arthrite est induit par deux injections d'un cocktail ou d'un unique anticorps monoclonal(196) anti-CII à des souris naïves, suivies d'une injection de LPS. Ces anticorps reconnaissent un éventail d'épitopes du CII et permettent la formation de CI au niveau du cartilage. Ce modèle ne nécessite pas d'immunisation active. De ce fait, la phase d'initiation et la phase de production d'anticorps ne sont pas présentes, ce qui permet l'apparition des signes cliniques d'arthrite seulement 48 heures après l'injection de LPS. Ce modèle mime la phase aiguë de la maladie et les signes cliniques ne persistent que pendant 10 jours environ. Le développement de l'arthrite dans ce modèle n'est pas dépendant du CMH(197) mais est clairement dépendant des cytokines(198), du système du complément et des PNN(197).

II. Les récepteurs de type Toll

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les pathogènes et est commune à tous les animaux. Elle repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires présents sur de nombreux pathogènes, les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Ces motifs, très conservés au cours de l'évolution, sont reconnus par des récepteurs cellulaires nommés PRR (*pattern-recognition receptors*). Un tel système permet qu'un nombre restreint de PRR puisse reconnaître l'énorme diversité des micro-organismes. Certains lipides, lipoprotéines, carbohydrates ou peptidoglycanes issus de bactéries, champignons, ou protozoaires constituent des exemples de PAMP. Par ailleurs, certaines molécules endogènes relarguées lors d'atteintes tissulaires, les DAMP (*damage-associated molecular patterns*), peuvent activer les PRR. Les PRR peuvent être séparés en plusieurs catégories : les PRR sécrétés ou les PRR cytosoliques et membranaires. La plupart des membres du système du complément sont par exemple des PRR sécrétés. La reconnaissance des PAMP par les PRR déclenche l'activation des cellules de l'immunité innée qui les portent, qui sécrètent alors des médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines, histamines...) responsables de l'activation des cellules endothéliales et de l'initiation de la phase vasculaire de la réponse inflammatoire puis de la phase effectrice. Ces cellules sont aussi les initiateurs de l'activation de l'immunité adaptative.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à une famille de PRR, celle des récepteurs de type Toll (TLR), et plus particulièrement au TLR9.

A. Généralités sur les TLRs

1. Historique

Les TLR ont d'abord été décrits chez *Drosophila melanogaster* pour leur rôle dans l'orientation dorso-ventrale des organes pendant l'embryogénèse(199). En effet, les insectes dépourvus du gène toll codant pour cette protéine présentaient des anomalies de positionnement des organes. Environ 10 ans plus tard, en 1996, le rôle immunitaire des TLR a été mis en évidence par l'équipe de Jules Hoffmann après l'observation que certaines mutations du gène toll chez *Drosophila* induisaient un défaut de résistance face à des infections fongiques(200). A l'époque, on rapprochait le rôle des TLR à celui du récepteur 1 de l'IL-1 (IL1-R1). En effet, il a été montré que les TLR et l'IL-1R1 partageaient des

homologies de séquence dans leur domaine cytosolique (le domaine TIR pour *Toll-Interleukin 1 Receptor*), suggérant l'implication de la voie du NFκB (*nuclear factor-kappa B*) et l'induction de phénomènes immunologiques(201). Ces études sont le point de départ d'une série de recherches actives pour identifier des molécules similaires chez les mammifères. En 1997, l'équipe de Janeway montre des homologies de séquence entre la protéine Toll de drosophile et une protéine chez l'homme. Ils ont cloné pour la première fois cette « protéine Toll humaine » ou hToll (ancien nom du TLR4) dans des monocytes humains et ont montré que ces cellules étaient capables d'exprimer des molécules de co-stimulation et de produire des cytokines pro-inflammatoires et ce de manière NFκB-dépendante(202). Ces caractéristiques sont nécessaires pour l'activation des T naïfs. Depuis les années 90, 13 récepteurs TLR ont été découverts chez les mammifères dont 10 qui sont exprimés et fonctionnels chez l'Homme (Tableau 2) mais il est fort probable que le nombre va augmenter dans les années à venir. De plus, certains TLR n'ont pas encore de ligands naturels connus (TLR10, 12, 13).

Nom	Compartiment cellulaire	PAMP	DAMP et ligands endogènes	ligand synthétique	Production cytokinique
TLR1 + TLR2	membrane plasmique	Triacyl lipopeptides bactériens et certaines protéines parasitaires	?	Pam3CSK4	cytokines pro-inflammatoires
TLR2 + TLR6	membrane plasmique	Diacyl lipopeptides bactériens, acide lipoteicoïque (Gram+), Zymosan (paroi des levures)	HSP60/70, HMGB1 (complexée ou non au nucléosome), anticorps anti-phospholipides, serum amyloïde A	FSL-1	cytokines pro-inflammatoires
TLR3	endosome	ARN double brin	ARN messenger, ARN de transfert	Poly(I:C)	cytokines pro-inflammatoires et IFNβ
TLR4	membrane plasmique	LPS	HMGB1, Fibrinogen, élastase de neutrophiles, anticorps anti phospholipides, fragments d'héparane sulfate		cytokines pro-inflammatoires et IFN de type I
TLR5	membrane plasmique	Flagelline	?		cytokines pro-inflammatoires
TLR7	endosome	ARN simple brin	ARN simple brin endogène	ARN synthétique, resiquimod (R848), imiquimod	cytokines pro-inflammatoires et IFN de type I
TLR8	endosome	ARN simple brin	ARN simple brin endogène	ARN synthétique, resiquimod (R848)	cytokines pro-inflammatoires et IFN de type I
TLR9	endosome et membrane plasmique	ADN riche en motifs CpG hypométhylés (bactérie, virus)	CI contenant de la chromatine, ADN à la surface de cellules apoptotiques, ADN mitochondrial génomique	oligonucléotides riches en motifs CpG (CpG-ODN)	cytokines pro-inflammatoires et IFN de type I
TLR10 + TLR2	endosome et membrane plasmique		Inconnu	Pam3CSK4	inhibe l'action du TLR2, inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires, production d'IL1-Ra

Tableau 2: Les TLR chez l'homme, leurs principaux ligands et les cytokines induites

2. Structure des TLR et transduction du signal

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I (partie N-terminale du côté extracellulaire) traversant soit la membrane plasmique (TLR1, 2, 4, 5, 6) soit celle de l'endosome (TLR3, 7, 8, 9). Leur domaine extracellulaire ou intra-endosomal est le domaine de liaison au ligand ; il comporte des répétitions de motifs riches en leucines (LRR pour *leucine rich repeats*). Le domaine intracytoplasmique des TLR comporte le motif TIR essentiel à la transduction du signal.

Sans stimulation, les TLR se trouvent sous forme monomérique (TLR de surface), homodimérique ou hétérodimérique préformés (endolysosomaux). La dimérisation des TLR est essentielle à leur activation. La liaison du ligand à l'ectodomaine du TLR induit une modification de sa conformation, ce qui permet l'interaction entre les domaines TIR des dimères TLR. La dimérisation de ces domaines TIR est le signal de départ de la formation d'un complexe très ordonné, appelé le « Myddosome » impliquant la protéine adaptatrice MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*). La formation du Myddosome entraîne l'activation de NFκB et la production de cytokines pro-inflammatoires. Le signal peut, par ailleurs, être transduit par l'engagement du domaine TIR de la protéine TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) qui permettra la formation du « Trifosome ». Ceci conduit à l'activation des facteurs de transcription IRF (*IFN-regulatory factor*) qui permettront la production d'IFN-α et β(203).

La formation du Myddosome est induite par tous les TLR sauf le TLR3 (qui active uniquement la voie passant par TRIF). Le TLR4, quant à lui, active les voies de signalisation impliquant MyD88 et TRIF. Cela nécessite l'engagement de deux autres molécules adaptatrices, MAL (*MyD88 adaptator-like protein*) et TRAM (*TRIF-related adaptator molecule*), qui vont créer un « pont » entre le TLR et MyD88 ou TRIF respectivement.

En outre, la voie passant par MyD88 peut rejoindre la voie passant par TRIF, ce qui explique le fait que le TLR3 peut activer NFκB et que le TLR9 (par exemple) peut activer la synthèse d'IFN de type I.

La Figure 9 représente les TLR ainsi que les différentes voies d'activation induites par la reconnaissance de leurs ligands.

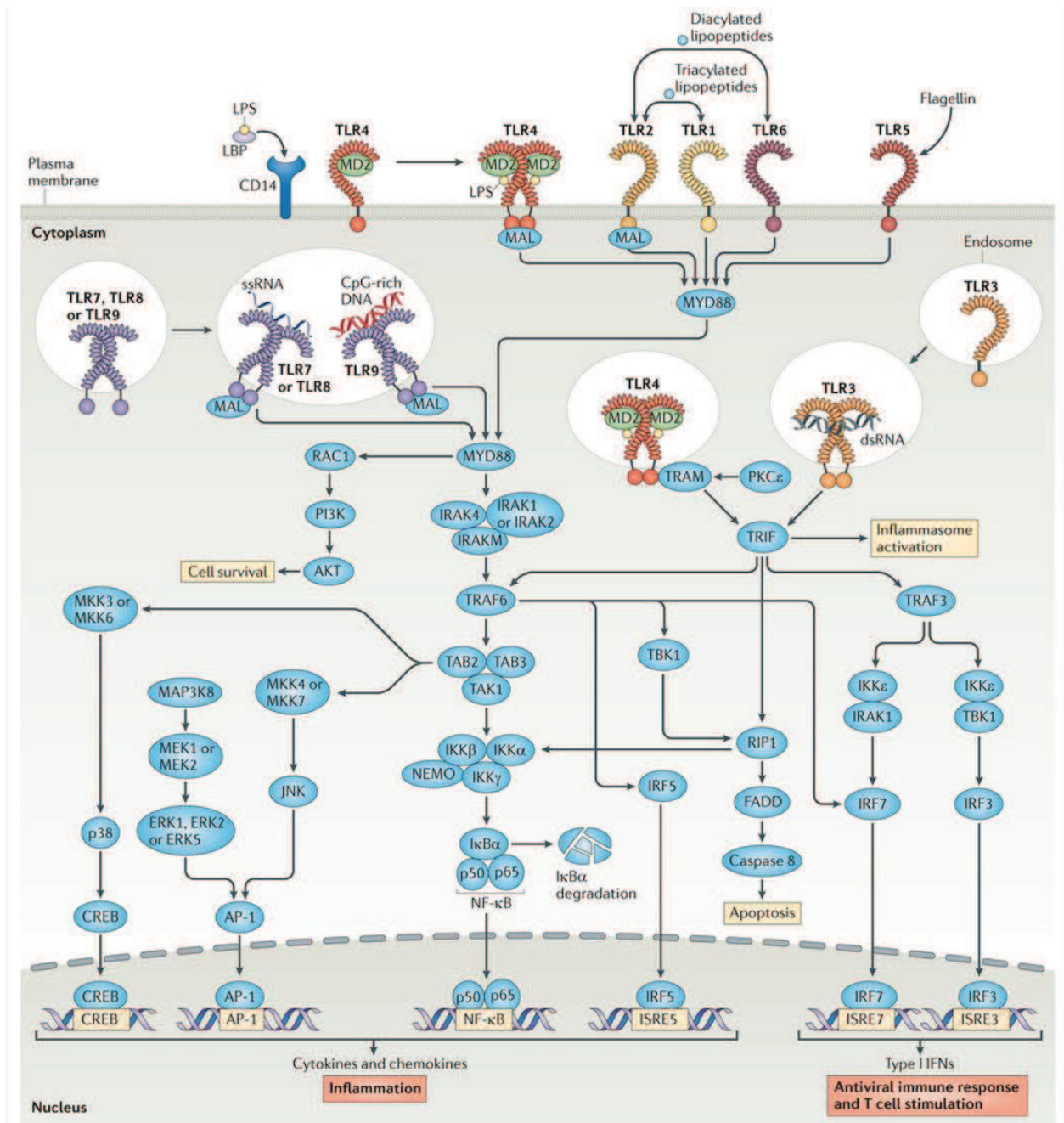


Figure 9: Les TLR et leurs voies de signalisation. Image issue de(203)

3. Les TLR de surface

Les TLR de surface (TLR1, 2, 4, 5, 6) sont impliqués dans la reconnaissance de molécules issues de bactéries et de champignons et peuvent être recrutés dans les phagosomes (voir Tableau 2 pour la liste de leurs ligands). Le TLR2 s'associe soit au TLR1 soit au TLR6 pour former des hétérodimères qui vont reconnaître des peptidoglycanes. Chez l'homme, le TLR10, contrairement aux autres TLR, possède des actions inhibitrices lorsqu'il forme un

hétérodimère membranaire avec le TLR2(204). Le rôle du TLR10 reste toujours mal connu et ne possède pas de ligand naturel identifié à ce jour. Le TLR5 reconnaît la flagelline qui est une protéine structurale du filament flagellaire des bactéries. Ces différents TLR de surface activent le Myddosome après interaction avec leur ligand.

Le TLR4, quant à lui, a été l'un des premiers TLR à avoir été mis en évidence chez les mammifères. C'est un récepteur toll particulier car il nécessite la contribution d'autres molécules comme la protéine circulante LBP (*LPS-Binding protein*) qui va se complexer au LPS circulant. C'est sous cette forme complexée que la protéine membranaire CD14 reconnaît le LPS, qui va alors interagir avec le TLR4, lui-même associé à la protéine MD2 (*myeloid differentiation factor 2*). MD2 est une protéine soluble qui est associée de manière non covalente au TLR4. La fixation du ligand au TLR4 active le Myddosome ou le Trifosome et induit ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires et les IFN de type I.

4. Les TLR endosomaux

Les TLR endolysosomaux (TLR3, 7, 8, 9) reconnaissent les acides nucléiques bactériens et viraux. Ils se distinguent aussi de leurs homologues de surface car ils sont synthétisés sous la forme de dimères stables(205,206) (sauf le TLR3 qui est synthétisé sous forme de monomère). Bien que les raisons restent mal connues, le pH légèrement acide de l'endosome est nécessaire à l'activité de ces TLR(203). Par ailleurs, des endoprotéases activées par des milieux acides (cathepsine, asparagine endopeptidase) clivent les ectodomains des TLR endosomaux(207). Ce clivage serait nécessaire à la pré-activation des TLR, notamment le TLR9(208,209). De plus, une hypothèse a été émise quant à la localisation endosomale de ces quatre TLR: ils sont séquestrés dans les compartiments endosomaux afin d'éviter une reconnaissance des acides nucléiques du soi, et ainsi d'empêcher la survenue de maladies auto-immunes.

Le TLR3 reconnaît les ARN double brin (db) de plus de 35 nucléotides, caractéristiques de certains virus. La liaison d'un ARNdb entraîne la dimérisation de deux chaînes de TLR3 dont les domaines TIR vont activer la voie passant par TRIF. Les TLR7 et 8 reconnaissent quant à eux les ARN simple brins (sb). Chez la souris, le TLR8 semble avoir une action inhibitrice sur le TLR7(210). Le TLR9 (dont nous développerons les caractéristiques dans la suite de ce manuscrit) reconnaît les motifs CpG hypométhylés présents en plus grande quantité sur les ADN bactériens et viraux. Les TLR7/8/9 activent la voie dépendante de MyD88.

B. Le TLR9

1. Généralités

Le TLR9 et son implication dans la reconnaissance de l'ADN ont été décrits depuis l'an 2000 par l'équipe d'Akira(211). Ces chercheurs ont identifié une séquence génétique présentant des similitudes avec les séquences TLR déjà identifiées, qu'ils ont nommé « TLR9 » ou CD289. Ils ont ensuite généré des souris n'exprimant pas de TLR9 (inactivation du gène du TLR9 par insertion du gène de résistance à la néomycine). Une stimulation des cellules de ces souris par un oligodéoxynucléotide (ODN) synthétique riche en motif CpG non méthylés (CpG-ODN) mimant l'ADN bactérien, n'induit ni leur activation ni la production de cytokines. Depuis, de nombreuses études sont venues compléter ces observations. La méthylation est décrite comme importante pour la reconnaissance des ligands bactériens et viraux par le TLR9. En effet, l'ADN génomique des organismes eucaryotes se distingue des autres ADN car il est beaucoup plus méthylé, ce qui permet au TLR9 de distinguer le soi du non soi. Mais nous savons maintenant que le TLR9 peut reconnaître d'autres molécules ou que l'ADN bactérien ou viral peut aussi être reconnu par d'autres récepteurs. Par ailleurs, dans un modèle artificiel où le TLR9 est exprimé à la surface de cellules (chimère TLR4/TLR9), ce récepteur est capable de reconnaître de l'ADN du soi(212), appuyant l'hypothèse que la localisation endosomale du TLR9 serait nécessaire au maintien de la tolérance vis-à-vis d'ADN du soi.

Une étude étonnante utilisant des souris vaccinées à différents moments de la journée (vaccin adjuvanté par des ligands TLR9), a montré que l'activité du TLR9 est dépendante du rythme circadien(213). Selon le moment de la journée où la vaccination s'est déroulée, les souris présentent, ou pas, un défaut de réponse adaptative, démontrant un rôle important du rythme régulant l'ensemble de phénomènes biologiques oscillant sur une période de 24h.

2. Du gène à la protéine

Le gène du TLR9 est porté par le chromosome 3 chez l'homme et 9 chez la souris. Il mesure 5,08 kb et possède deux exons. Un polymorphisme du TLR9 existe et certains SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) sont associés à des risques accrus d'asthme(214), à la maladie de Crohn(215), à la survenue d'événements indésirables lors de la grossesse de femmes infectées par *Plasmodium falciparum*(216), à l'augmentation de la transmission du virus HIV-1 à l'enfant pendant la grossesse(217) ou encore au risque de développer un cancer de

l'utérus(218). Certaines études ont montré une association entre un polymorphisme du TLR9 et le risque de développer un LES(219) mais cela reste contradictoire(220). Malheureusement, les conséquences structurelles et fonctionnelles des variants associés aux SNP du TLR9 n'ont pas été étudiées systématiquement.

Chez l'homme, cinq isoformes issues d'un épissage alternatif des transcrits du gène TLR9 existent : TLR9-A, TLR9-B, TLR9-C, TLR9-D et TLR9-E(221,222). Chez les rongeurs, aucune étude jusqu'ici ne fait état d'isoformes du TLR9. Les variants du TLR9 donnent lieu à des protéines dont la taille diffère légèrement : les isoformes TLR9-C et TLR9-D possèdent respectivement 23 et 15 acides aminés (aa) de plus que le TLR9-A (qui compte 1032 aa) du côté N-terminal (N-ter) ; à l'inverse, le TLR9-B et le TLR9-E sont deux variants tronqués avec respectivement 42 et 15 aa de moins que la forme A. On peut néanmoins noter qu'une région de 975 aa est commune à tous les variants(223). Les isoformes du TLR9 semblent être exprimées de manière différente selon le type cellulaire, leur état de maturation, leur localisation tissulaire ou encore le degré d'inflammation systémique(223). Néanmoins, toutes les isoformes du TLR9 semblent avoir la même capacité à lier leur ligand. Dans la suite de ce manuscrit et pour plus de compréhension, le terme TLR9 désignera l'isoforme A qui est la plus décrite.

Conformation de la protéine TLR9

Le TLR9 est une protéine de 1032 aa composée d'un domaine TIR, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine de liaison avec le ligand riche en LRR (comptant en moyenne 24 résidus) (Figure 10). Les domaines LRR se regroupent sous forme de fer à cheval et, entre les domaines LRR 14 et 15 (approximativement au milieu de l'ectodomaine) se trouve une longue insertion, la boucle Z(224). Cette forme décrite du TLR9 est sa forme « full-length » inactive. Elle est capable de lier les ligands mais n'initie pas le recrutement de MyD88(225). Un homodimère inactif peut être formé à partir de deux protéines « full-length ».

En absence de stimulation, le TLR9 réside dans le réticulum endoplasmique (RE). Sa migration vers les endosomes va se produire en réponse à une stimulation. C'est dans cet organite que va se dérouler le clivage protéolytique de la fraction N-ter du TLR9, au niveau de la boucle Z (en position 471) par de enzymes endosomales comme l'asparagine endopeptidase et les cathepsines. Ce clivage aboutit à la formation d'un TLR9 processé fonctionnel qui va permettre le recrutement de MyD88. Il est à noter que cette réaction est dépendante du pH acide retrouvé dans l'endosome(226). Récemment, des études ont

démontré que la fraction N-ter (acides aminés 1 à 471) reste associée à la fraction C-ter processée au niveau de la boucle Z dans les endolysosomes et que cette fraction est nécessaire à la signalisation induite par un ligand(227). Paradoxalement, une autre étude a montré que la fraction N-ter clivée pouvait réguler négativement le TLR9 en induisant la dégradation de celui-ci par des protéases aspartiques(228). Le rôle exact de la fraction N-ter reste encore à définir. Cette fraction peut aussi s'associer à une protéine TLR9 « full-length »(229).

Le clivage du TLR9 à la position 723 donne lieu à la génération d'une forme soluble du TLR9 (sTLR9) qui pourrait réguler partiellement le TLR9 endosomal(230). Ce sTLR9 n'est pas sécrété, ne contient pas le domaine de liaison à MyD88 mais contient la fraction N-ter du TLR9 « full-length ». L'enzyme responsable de la formation du sTLR9 reste inconnue mais l'on sait que ce clivage ne nécessite pas un environnement acide.

La liaison d'un ligand à un dimère de TLR9 induit des changements allostériques au niveau des domaines TIR, un rapprochement des domaines transmembranaires et des changements de conformation des ectodomains(205) permettant le recrutement du Myddosome aux domaines TIR. Il est à noter qu'à ce jour, seule la structure cristalline du domaine C-ter du TLR9 de souris a été établie(224).

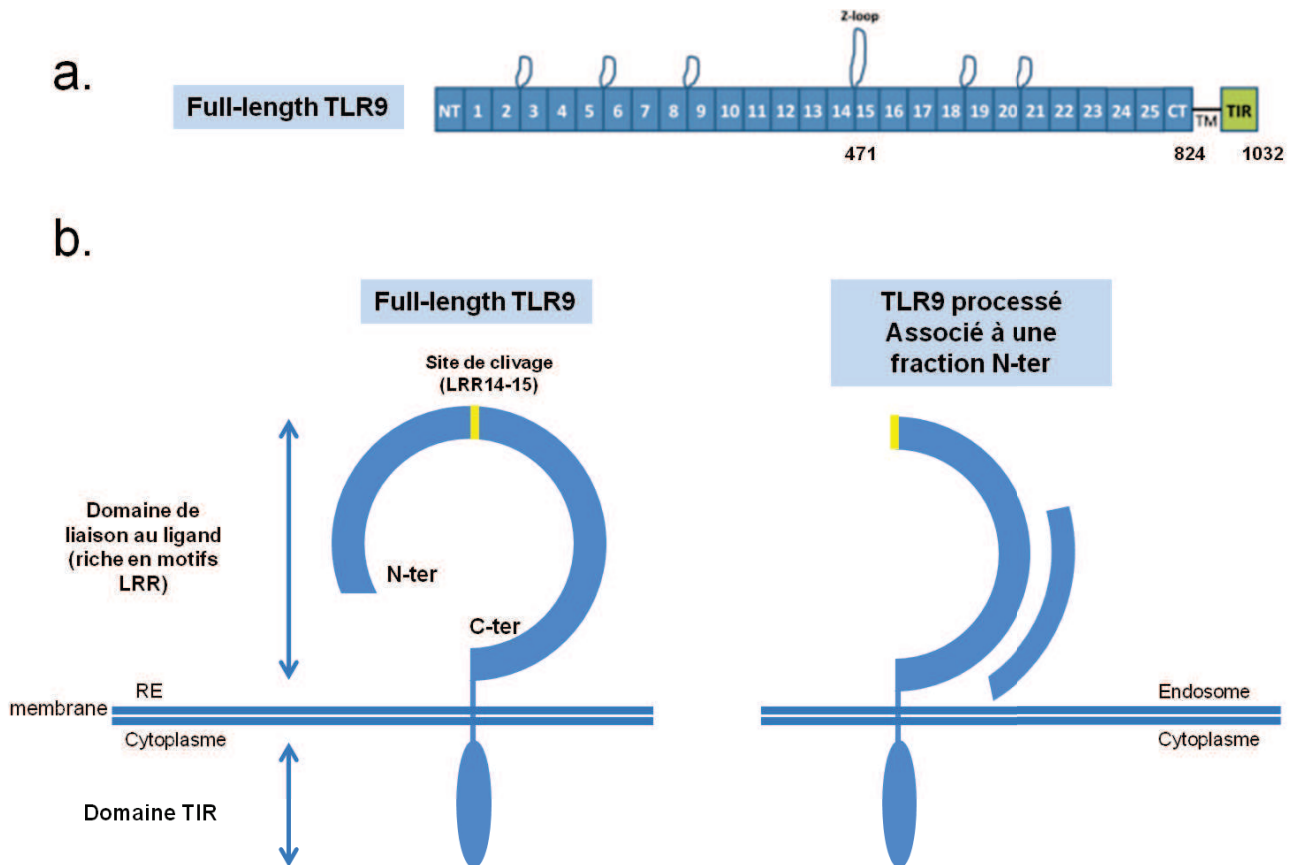


Figure 10 : Structure de la protéine TLR9 localisée dans le réticulum endoplasmique ou dans l'endosome

a. Représentation schématique du TLR9 « full-length » d'après(224). Les numéros représentent les LRR. Z-loop : boucle Z ; TM : domaine transmembranaire.
 b. Représentation des différentes formes du TLR9 (full-length et processée), associées ou non à la fraction N-ter clivée. RE : réticulum endoplasmique

Adressage du TLR9

La localisation des récepteurs aux acides nucléiques dans les compartiments endolysosomiaux est déterminante pour la discrimination entre le soi et le non soi. Néanmoins, les mécanismes permettant cette localisation ne sont pas tous élucidés. Les TLR endosomaux sont reconnus par une protéine chaperonne : UNC93B1. Cette protéine est retrouvée dans le réticulum endoplasmique (RE) et est essentielle pour l'adressage des TLR endolysosomiaux depuis le RE vers l'appareil de Golgi(225) (Figure 11). UNC93B1 se lie aux TLR destinés à une localisation endosomale, dirige ces protéines vers l'appareil de Golgi via l'emballage dans des vésicules coâtées de COPII (*coat protein complex II*) (transport antérograde classique des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi). La fonction de UNC93B1 ne s'arrête pas là : cette protéine facilite aussi le transport des TLR7 et 9 depuis l'appareil de Golgi vers les endosomes via la mise en jeu respectivement des protéines adaptatrices AP4 ou 1 (*adaptator*

protein complex)(231,232). Contrairement au TLR7 qui rejoint directement les endosomes grâce à AP4, le TLR9 couplé à UNC93B1 rejoint la membrane plasmique de manière transitoire grâce à son interaction avec AP1(203). Le couple TLR9-UNC93B1 est ensuite pris en charge à la membrane par AP2 qui va permettre leur localisation endosomale. Ainsi, le TLR9 se trouve de manière transitoire à la surface de la cellule mais la conformation dans laquelle il se trouve reste inconnue. Le passage du TLR9 à la membrane durant son adressage est une découverte très récente et peu publiée, il faut donc rester prudent concernant cette affirmation.

Pendant longtemps, on supposait que le TLR9 n'était pas dirigé vers l'appareil de Golgi car cette protéine est sensible à la digestion induite par l'endoglycosydase H (la résistance s'acquière après le passage par cette organelle)(233). Depuis 2009, il a été montré que cette caractéristique ne suffisait pas et que lorsque le transport des protéines du Golgi est inhibé, la signalisation induite par le TLR9 est elle aussi inhibée(231).

Le signal induisant la translocation du TLR9 du RE vers les endolysosomes est déclenché lors de la rencontre de la cellule avec un ligand TLR9, pendant l'acheminement de ce ligand dans ce compartiment cellulaire(233).

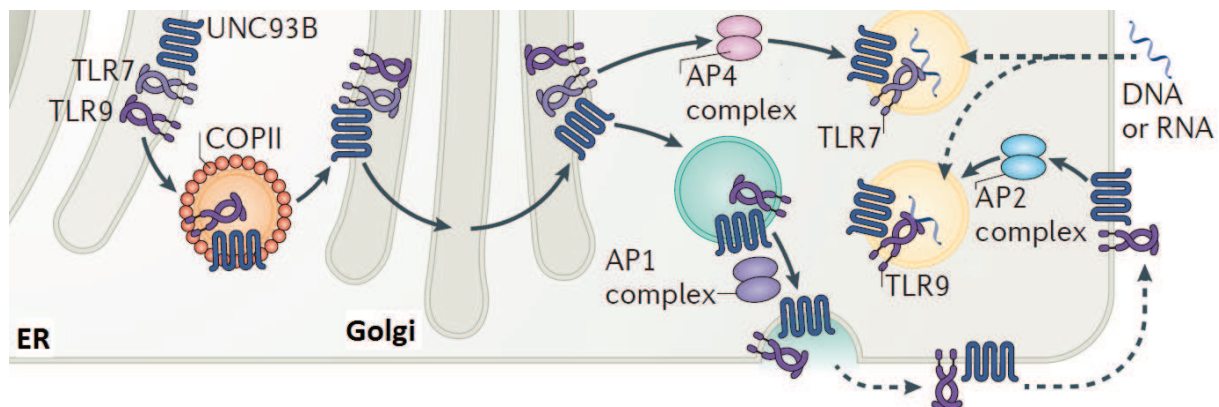


Figure 11 : Protéines chaperonnes et trafic intracellulaire des TLR7 et 9 d'après(203)

La protéine UNC93B1 achemine les TLR7 et 9 depuis le réticulum endoplasmique (ER) jusqu'à l'appareil de Golgi en facilitant leur incorporation dans les vésicules de COPII. Associé à cette protéine, le TLR9 rejoint la membrane plasmique grâce à la protéine AP1, puis l'endosome (en jaune) grâce à la protéine AP2. Le TLR7 rejoint directement l'endosome via la mise en jeu d'AP4.

Expression du TLR9

Le TLR9 est exprimé par de nombreuses cellules immunitaires (monocytes, macrophages, neutrophiles, lymphocytes, DC, NK, lymphocytes T NK (NKT)) mais aussi par des cellules non immunes (cellules épithéliales pulmonaires, intestinales, de glande mammaire). Depuis sa découverte, le TLR9 est connu pour être exprimé et séquestré dans les endosomes afin d'éviter la reconnaissance d'Ag du soi et la survenue de maladie auto-immunes. Par exemple, une étude a montré que quand le TLR9 était artificiellement exprimé à la surface des cellules, il pouvait reconnaître des ligands endogènes(212) et que les souris exprimant un tel récepteur mourraient d'une inflammation systémique(234). Depuis peu, de plus en plus d'études font état d'une expression du TLR9 à la surface de certaines cellules. Par exemple, il a été montré que les cellules issues d'amygdales et notamment celles exprimant le CMH de classe II et le CD19 exprimaient le TLR9 à leur surface(235). Cette équipe a aussi montré que parmi les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), les DC sont les cellules qui expriment le plus de TLR9 à leur surface. Des DC exprimant le TLR9 à leur surface ont aussi été retrouvées dans la rate de souris(227). Les LB sont aussi capables d'une telle expression(229,236). Il semblerait que le TLR9 de surface sur les LB soit incapable de lier son ligand artificiel et qu'il est associé au BCR(229). De plus, ce TLR9 de surface serait un régulateur négatif du TLR9 endosomal. Toutes ces publications montrent néanmoins que l'expression de surface du TLR9 est beaucoup moins importante que la fraction endosomale.

A la surface des cellules épithéliales polarisées de l'intestin, selon où il est exprimé (surface apicale ou basolatérale), l'activation via le TLR9 est respectivement plutôt inhibitrice ou activatrice de la voie NFκB(237). Ce mécanisme serait une manière de maintenir l'homéostasie de l'intestin, où la surface apicale des cellules épithéliales est mise en présence constante avec des bactéries commensales, susceptibles d'être reconnues comme pathogènes.

3. Ligands agonistes et antagonistes du TLR9

Les propriétés de stimulation du système immunitaire par de l'ADN bactérien ont été découvertes dans les années 1890 par le Dr. William Colley qui utilisait des lysats de bactéries vivantes ou inactivées pour traiter des tumeurs(238). C'est seulement dans les années 1980 qu'une équipe a identifié l'ADN bactérien comme le principal composant actif de ces lysats(239) et en 2000 que le TLR9 a été identifié comme son récepteur.

a) Les ligands synthétiques du TLR9

Les effets de l'ADN peuvent être mimés par des oligonucléotides synthétiques simple brin riches en motif CpG : les CpG-ODN. Il est à noter que les même ODN portant des motifs GpC ne sont pas activateurs. L'activation cellulaire par les CpG-ODN induit la surexpression du CMH de type II et de molécules de costimulation, la présentation de l'antigène par les CPA, la production de cytokines type Th1, de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-8, IL-6) et d'IFN de type I par les pDC(240). Différentes classes d'ODN ayant des séquences et des activités biologiques distinctes ont été créées :

- les CpG-ODN de classe A (aussi appelés classe K) sont composés d'une séquence palindromique phosphodiester (liaison P=O) centrale ainsi qu'une queue 3' poly-G phosphorothioate (liaison P=S) leur permettant de former des structures secondaires et leur conférant une résistance aux nucléases. Ces structures permettent une forte stabilité et augmente la prise en charge de ces ODN vers l'endosome. Les CpG-ODN de classe A ont la capacité d'induire la maturation des pDC et leur production d'IFN de type I mais sont de mauvais activateurs de la voie NF κ B.

- Les CpG-ODN de classe B (aussi appelés classe D) sont des ODN monomériques à squelette phosphorothioate contenant un ou plusieurs dinucléotides CpG. Ils peuvent activer différentes cellules, induire la production de cytokines pro-inflammatoires, induire la prolifération et la maturation des LB, mais n'induisent pas ou peu la production d'IFN de type I.

- Les CpG-ODN de classe C combinent la structure et les effets des deux classes précédentes. Ils peuvent former des structures secondaires ou tertiaires (type dimère) grâce à leur squelette phosphorothioate et possèdent un motif palindromique contenant des CpG. Cette classe d'ODN permet la production d'IFN de type I ainsi que l'activation des LB et DC.

Il existe par ailleurs des ODN synthétiques antagonistes. Par exemple, ceux contenant des motifs formés de plusieurs G (G-ODN) inhibent l'activation induite par le TLR9.

b) Les ligands naturels PAMP et DAMP

De manière générale, le TLR9 est décrit comme un récepteur à l'ADN viral ou bactérien riche en motifs CpG hypométhylés. La méthylation de l'ADN, notamment sur les cytosines est importante pour la discrimination entre l'ADN endogène et exogène. Les motifs CpG (succession de desoxycytosines et desoxyguanines séparées par un phosphate) présents dans

l'ADN de vertébrés tendent à disparaître avec l'évolution(241) (on parle de phénomène de suppression des CG). Ainsi l'ADN de vertébrés comporterait moins de motifs CpG mais plus méthylés que l'ADN de pathogène, permettant à l'organisme de les différencier.

Les ADN naturels ne peuvent pas être classifiés comme les ODN synthétiques. Les nucléotides naturels sont reliés par des ponts phosphodiester. Il a été montré que ce squelette phosphodiester déterminait la reconnaissance de l'ADN par le TLR9(242). De plus, le TLR9 peut lier et être activé constitutivement par les ADN dépourvus de motifs CpG lorsqu'ils sont présents en grand nombre dans l'endosome(243). Ces résultats montrent que la reconnaissance de l'ADN par le TLR9 est plus dépendante de la nature du squelette que de sa composition en CpG. Ceci pourrait expliquer pourquoi le TLR9 peut reconnaître de l'ADN du soi dans certaines circonstances. Par ailleurs, quelques études ont montré que le TLR9 pouvait reconnaître des ADNs même dans le cas où ils sont pauvres en CpG et que ce phénomène est dépendant du pH endosomal(226). De plus, le TLR9 peut reconnaître des hybrides ARN/ADN retrouvés lors de la réplication des ADN viraux(244). Enfin, la reconnaissance de l'ADN peut dépendre de son association à des protéines.

La reconnaissance de l'ADN est essentielle pour lutter contre les pathogènes mais peut aussi induire des réponses auto-immunes. Parmi les ligands naturels du TLR9, en plus des ADN dérivés de pathogènes, on retrouve des ligands endogènes, de l'ADN du soi ou encore des DAMP. Par exemple, le TLR9 peut reconnaître de l'ADN nucléaire du soi lorsqu'il est sous forme de CI(61,245) ou complexé avec des peptides anti-microbiens(91,246). A l'inverse, le TLR9 ne reconnaît pas l'ADN présent dans les nucléosomes extracellulaires, un auto-Ag lupique, où l'ADN est protégé par les histones(247).

Les DAMP sont des molécules relarguées après une atteinte tissulaire. Ils peuvent être de nature protéique (issus du noyau, des membranes, du cytoplasme, du RE) ou peuvent être des acides nucléiques (ADN, ARN, nucléotides). Les mitochondries proviennent de l'endosymbiose d'une bactérie avec une cellule eucaryote. L'origine bactérienne de cette organelle explique pourquoi l'ADN mitochondrial (ADNmt) contient de nombreux motifs CpG hypométhylés. L'ADNmt, quand il est relargué par les cellules en apoptose, nécrose, autophagie ou lors de blessures du tissu est considéré comme un DAMP. Il peut être reconnu par le TLR9 dans sa forme entière(248). D'autres études ont montré que l'ADNmt fragmenté peut induire la production d'IFN- α par les pDC, notamment s'il est associé à des peptides anti-microbiens comme le LL-37(249). Néanmoins, les auteurs de cet article ont montré une co-localisation de l'ADNmt fragmenté avec le TLR9 dans les endosomes, mais ils n'ont pas

décrit de preuve directe de leur interaction.

Un autre type de DAMP reconnu par le TLR9 sont les histones. En effet, une étude de 2011 utilisant un modèle d'ischémie/reperfusion hépatique a révélé que les histones extracellulaires, notamment l'histone H4 interagissaient directement avec le TLR9, ayant pour conséquence une activation des cellules immunitaires(250). Dans ce modèle ainsi que dans un modèle de septicémie(251), des histones extracellulaires sont retrouvées en forte concentration dans la circulation et sont considérées comme des DAMP.

D'autre part, certains DAMP protéiques associés à l'ADN peuvent potentiellement moduler les réponses induites par le TLR9. C'est le cas pour HMGB1 qui est une protéine nucléaire associée à l'ADN et relarguée par les cellules nécrotiques. Elle est considérée comme une alarmine. Une étude a montré qu'HMGB1 pouvait se lier à des CpG-ODN ou à de la chromatine sous forme de CI et que ces complexes augmentaient considérablement l'activation des DC via le TLR9(252). Néanmoins, une autre étude a montré que HMGB1 pouvait restreindre l'activation et les réponses cytokiniques des pDC à des ligands TLR9 libres (synthétiques ou viraux)(253). Ainsi, le rôle de HMGB1 dans les mécanismes d'activation cellulaire via le TLR9 doit encore être éclairci. Cette protéine est tout de même décrite comme inductrice des réponses immunes inflammatoires notamment par son interaction avec les TLR2/4 ou RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*).

L'ADN de placenta et de fœtus sont deux types d'ADN naturels potentiellement reconnus par le TLR9. Par exemple, les ADN du placenta possèdent des CpG hypométhylés. Cet ADN est retrouvé dans la circulation des femmes ayant eu des accouchements avant terme ou souffrant de pré-éclampsie (pathologie répandue durant la grossesse caractérisée par une élévation de la pression artérielle). Une étude a montré que l'ADN fœtal peut entraîner des réactions inflammatoires comme la production d'IL-6 par les PBMC(254). De manière plus intéressante, les auteurs de cette étude ont montré que l'injection d'ADN foetal à des souris gestantes induit des naissances avant terme. Ce résultat est aussi retrouvé après injection de CpG-ODN et est abrogé chez des souris déficientes pour le gène du TLR9. Ainsi, la reconnaissance de l'ADN fœtal par le TLR9 maternel pourrait être à l'origine de certains problèmes ayant lieu durant la grossesse.

Les organismes possèdent d'autres moyens de reconnaître l'ADNdb que la voie du TLR9. Par exemple, de l'ADNdb bactérien transfecté dans des monocytes et des macrophages, ou encore de l'ADN de vertébrés transfecté dans des DC(255) sont reconnus mais indépendamment du

TLR9. Par ailleurs, la reconnaissance de la chromatine, fort auto-Ag du lupus, est indépendante du TLR9(247) et, lorsqu'elle est sous forme de CI, la chromatine peut activer les DC dépendamment ou indépendamment du TLR9 (via le Fc γ RIII)(245). Une autre étude a montré que si de l'ADN génomique était associé à LL-37, il induisait la production d'IFN de type I par les monocytes via l'engagement de STING (*Stimulator of IFN genes*) et indépendamment du TLR9(256). DAI (*DNA dependent activator of IFN*), AIM2 (*absent in melanoma 2*) et LRRFIP1 (*Leucine Rich Repeat (In FLII) Interacting*) sont des exemples de senseurs intracellulaires de l'ADNdb différents du TLR9. A la surface cellulaire, DEC-205(CD205) est exprimé par les DC et est capable de reconnaître des CpG-ODN de type B(257).

En conclusion, le TLR9 n'est pas seulement un récepteur à l'ADN dérivé de pathogènes ; il peut reconnaître d'autres ligands (du soi par exemple). De plus, les ADN peuvent être reconnus par des récepteurs autres que le TLR9, ce qui complexifie la compréhension des mécanismes de reconnaissance des DAMP et PAMP.

4. Activation et immuno-modulation cellulaires induites par le TLR9

Comme décrit précédemment, selon le type cellulaire et le type de ligand reconnu, les réponses induites par le TLR9 vont être différentes. L'activation du TLR9 par des ligands naturels ou artificiels conduit toujours à l'activation de la voie NF κ B ou IRF3/7 et induit la production de cytokines pro-inflammatoires ou de la famille des IFN de type I.

De manière générale, les ligands du TLR9 vont activer les DC, augmenter l'expression de molécules de costimulation et induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires(211). L'effet de ces ligands sur les pDC se traduit par une production d'IFN-I caractéristique, ce qui va mener à la différenciation des monocytes vers un phénotype de DC inflammatoires. Ces CPA vont favoriser la réponse Th1 et T CD8 cytotoxique. Néanmoins, il a été montré que l'activation des pDC par des ligands TLR9 peut induire des phénomènes de tolérance, via la génération de Treg FoxP3⁺ producteurs d'IL-10(258). De plus, les DC stimulées par des ligands TLR9 ont une expression accrue d'IDO, enzyme aux propriétés immunorégulatrices(103).

Des CI composés d'ADN peuvent induire fortement l'activation des LB (prolifération et production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF α)(239). Des ligands

synthétiques du TLR9 induisent la maturation et la prolifération des LB naïfs, augmentent les capacités à présenter les Ag et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines (IL-8 notamment)(259). Ces ligands sont aussi capables d'induire la différenciation des LB en LB mémoire et en plasmocytes(259). Par ailleurs, plusieurs études montrent qu'en plus de la production de cytokines pro-inflammatoires, les LB (naïfs, matures et mémoires) peuvent sécréter de l'IL-10, en réponse à des ligands TLR9 synthétiques ou dérivés de cellules apoptotiques(259,260), suggérant un rôle immunorégulateur du TLR9.

Peu de données sont connues concernant la régulation du TLR9 dans les neutrophiles. On sait néanmoins que le GM-CSF induit une surexpression du TLR9 dans ces cellules et augmente leur capacité de phagocytose(255), permettant ainsi une meilleure prise en charge des ligands. Il a été montré que le CpG-ODN pouvaient induire une sortie des neutrophiles depuis la moelle osseuse lorsqu'il était injecté en intra-veineuse (IV) chez la souris(82). Des ADN viraux et bactériens ainsi que des ligands synthétiques (riches en motifs CpG ou non) sont capables de recruter les neutrophiles sur un site inflammatoire(261). Ceci est rendu possible par la perte d'expression des L-selectines (impliquées dans les liaisons faibles à l'endothélium) et du récepteur à l'IL-8, de leur surexpression de CD11b ainsi que l'augmentation de leur capacité d'adhérence aux cellules endothéliales(255,262) et ce de manière TLR9-dépendant. La présence de ligands TLR9 induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les PNN, principalement de l'IL-8 (ou MIP-2 chez la souris) mais aussi du TNF α et de l'IL-6. Ils augmentent aussi l'activité phagocytaire des PNN et amorcent la production de superoxydes par ces cellules. De manière intéressante, l'activation des PNN par des ligands TLR9 inhibe l'apoptose de ces cellules(263) et prolonge ainsi leur durée de vie.

Le TLR9 peut collaborer avec d'autres TLR pour amplifier ou au contraire inhiber l'activation cellulaire. Par exemple, l'activation conjointe des TLR3 et 9 par des ligands synthétiques conduit à une production synergique de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α , IL-6) par les macrophages(264). Une étude utilisant des souris double-déficientes pour le TLR9 et le TLR2 montre que ces deux récepteurs collaborent pour lutter contre certaines bactéries(265). De manière plus intéressante, une collaboration étroite entre les TLR endosomaux est décrite. Cette interaction semble être plus inhibitrice qu'activatrice. Par exemple, il a été montré que la production d'IFN de type I induite par l'activation du TLR9 dans les PBMC est inhibée par des agonistes du TLR7 et 8(266). De plus, le TLR9 contrôle l'activation induite par le TLR7

sur les LB chez la souris(210). Cette dernière étude montre aussi que le TLR8 restreint l'activation des DC induite par le TLR7, suggérant que le TLR8 est fonctionnel chez la souris. Ainsi, selon le type cellulaire, le TLR7 est contrôlé par le TLR9 ou par le TLR8.

5. Implication du TLR9 dans la polyarthrite rhumatoïde et le LES

L'idée que les pathologies induites par des pathogènes puissent être dépendantes des TLR est facilement concevable. Dans d'autres pathologies, où l'origine bactérienne et/ou virale est partielle ou non décrite (certaines maladies auto-immunes par exemple), l'implication des TLR peut exister via la reconnaissance d'Ag du soi ou de pathogènes associés à ces maladies.

a) Implication du TLR9 dans la polyarthrite rhumatoïde.

α. Rôle des TLR et du TLR9 chez les patients PR.

Comme décrit précédemment, certains pathogènes (viraux ou bactériens) peuvent moduler, exacerber ou être concomitants à la survenue de la PR. Ces pathogènes peuvent être de manière évidente la cible des TLR. Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence une association entre un polymorphisme nucléotidique des TLR et les caractéristiques cliniques de la PR mais le succès reste mitigé à ce jour(267). Cependant, il est clair que certains TLR sont fortement exprimés dans la PR notamment par les PBMC, les tissus synoviaux et les cellules infiltrées dans l'articulation(268). Il a été montré que l'activation de certains TLR (2/3/4) exprimé par les fibroblastes synoviaux induisait une forte production de cytokines pro-inflammatoires ou de MMP, et que ces cellules pouvaient exacerber les réponses Th1/Th17(269). De plus, de nombreux ligands endogènes potentiellement reconnus par les TLR sont retrouvés chez les patients, tout particulièrement dans l'articulation (fibrinogène, HMGB1, ADN extracellulaire). Ces ligands endogènes présents dans l'articulation ou relargués pendant les processus inflammatoires pourraient contribuer à la maintenance de l'inflammation chronique caractéristique de la PR.

Concernant l'implication du TLR9 dans la PR, un polymorphisme de ce récepteur associé à un risque accru de développer cette pathologie a été retrouvé dans une population de patients PR turcs(270). Cependant, aucune autre étude de plus grande ampleur et sur d'autres populations n'a pu mettre en évidence une telle association. Depuis les années 1950, des anti-paludéens sont utilisés dans la PR pour leurs propriétés anti-inflammatoires, en association

avec d'autres traitements de fond. L'effet de ces médicaments passe par l'inhibition des TLR endosomaux, comme la chloroquine qui inhibe l'acidification des endosomes et interagit avec les acides nucléiques rendant impossible leur liaison avec les TLR endosomaux(271,272). Toutefois, l'emploi des anti-paludéens est aujourd'hui limité, essentiellement dans le traitement des formes débutantes et peu actives de la PR. Nous savons que le TLR9 est fortement exprimé dans les cellules de patients PR, notamment dans la synoviale (fibroblastes, DC, macrophages, LB)(223,271). De l'ADN extracellulaire présent dans les articulations de patients(273) et de l'ADN riche en motifs CpG retrouvé dans le sang(274) pourraient être des ligands du TLR9. D'autres molécules comme la LL-37 sont retrouvées en grandes quantités dans les articulations et pourraient amplifier ou induire l'activation cellulaire via le TLR9(271). De manière intéressante, certaines cellules impliquées dans la physiopathologie de la PR sont sensibles aux ligands TLR9. Par exemple, les précurseurs des ostéoclastes et les ostéoblastes expriment le TLR9 et sont sensibles à son activation. Plusieurs études *in vitro* sur des cellules de souris ont montré que les CpG-ODN, grâce à l'induction de TNF- α , favorisent l'ostéoclastogénèse de cellules déjà engagées dans ce processus alors qu'ils inhibent la différenciation ostéoclastique lors des phases précoces (par inhibition de l'expression des récepteurs du M-CSF)(275,276). La différenciation en ostéoclaste peut par ailleurs être accentuée grâce à une synergie entre les TLR, par exemple lorsque les pathogènes sont peu présents dans l'environnement(277).

Pour résumer, aucune étude n'a clairement démontré l'implication du TLR9 dans la physiopathologie de la PR, bien qu'il y ait de nombreux soupçons. Le rôle de ce récepteur dans cette pathologie reste à définir.

β . Rôle des TLR et du TLR9 dans les modèles animaux d'arthrite.

Dans la plupart des modèles animaux de PR, l'arthrite est induite ou amplifiée via l'activation des réponses inflammatoires grâce à des bactéries inactivées ou des dérivés bactériens. Ceci suggère fortement l'implication des PRR dans le développement des arthrites. Il est clairement établi que le CFA utilisé dans le modèle d'AEC contient des PAMP capables d'activer les TLR (ceci a été montré pour le TLR2(278)). L'inhibition du TLR4 dans ce même modèle protège les souris du développement des arthrites cliniques et de la destruction articulaire mais ne modifie pas la réponse anti-collagène par l'immunité adaptative(268). D'autre part, certaines équipes injectent du LPS après l'immunisation (28 jours après la première immunisation en général) dans le protocole d'AEC afin d'amplifier fortement le

développement des arthrites. Dans le modèle de transfert de sérum arthritogénique de souris K/BxN, il a été montré que l'injection de ligands TLR4 en intra-péritonéal aggravait les arthrites de la souris receveuse(279). Par ailleurs, les souris n'exprimant pas l'IL-1Ra développent des arthrites spontanées sauf si elles sont débarrassées de leur flore intestinale (souris « germ-free »), suggérant l'implication cette flore dans le développement de la maladie. De manière intéressante, les souris n'exprimant ni le TLR2 ni l'IL-1Ra développent des arthrites plus sévères que les simples IL-1Ra déficientes et les souris TLR4-/-IL-1Ra-/- développent des arthrites moins sévères(268). Ainsi, les différents TLR peuvent avoir des effets protecteurs ou aggravateurs dans l'arthrite.

L'implication des TLR endosomaux reste relativement peu étudiée dans les modèles d'arthrite. On sait néanmoins que les souris n'exprimant pas le TLR7 présentent des arthrites moins sévères dans un modèle d'AEC(280). Néanmoins, cette étude présente un biais puisque les souris sauvages utilisées ici ne dérivent pas de la même descendance que les souris TLR7-/- . De plus, l'induction d'une tolérance du TLR7 diminue la sévérité des arthrites dans le modèle de transfert de sérum K/BxN(281). On peut ainsi dire que le TLR7 a un rôle aggravant dans le développement de cette maladie.

Concernant le TLR9, plusieurs études ont suggéré que ce récepteur pourrait être impliqué dans le développement de la maladie. Par exemple, la seule injection intra-articulaire (IA) d'ADN bactériens riches en motifs CpG chez la souris C57BL/6 induit des arthrites(282). Dans un modèle chez le rat Lewis, l'ajout de ligands TLR9 dans l'émulsion ou l'injection intradermique de CpG-ODN aggravent la maladie(283,284). Cette aggravation est aussi retrouvée dans un modèle d'AEC chez la souris DBA/1(285). L'équipe de Gunter Steiner a utilisé des splénocytes de rats arthritiques stimulés *ex vivo* par des séquences d'acides nucléiques (ADN ou ARN) spécifiques. Le transfert adoptif de ces cellules à des rats naïfs induit des arthrites. D'autre part, lorsque les splénocytes sont stimulés avec des CpG-ODN ou avec de l'imiquimod (ligand TLR7), on observe aussi un développement des arthrites après le transfert adoptif de ces cellules à des rats naïfs(286). Ces résultats suggèrent que les TLR7 et 9 sont impliqués dans ce phénomène.

L'équipe de Klinman a elle aussi beaucoup étudié l'effet de l'administration de CpG-ODN dans le développement des arthrites. Dans une étude de 2002, cette équipe a injecté dans l'articulation de souris BALB/c naïves des CpG-ODN ou des antagonistes du TLR9(287). Ils ont observé que l'injection d'antagonistes n'a aucun effet alors qu'une injection de CpG-ODN induit à elle-seule le développement d'arthrites inflammatoires localisées dans l'articulation

injectée. La dose arthritogénique dans cette étude est de 25µg de CpG-ODN par articulation. Lorsque cette injection est suivie d'une injection d'antagonistes du TLR9, les arthrites sont fortement diminuées. Ce phénomène est accompagné d'une réduction locale de l'ARNm codant pour le TNFα. En 2003, cette même équipe a voulu savoir si l'injection systémique de CpG-ODN ou d'antagonistes pouvait influencer le développement de la maladie. Pour cela, ils ont injecté des CpG-ODN ou des antagonistes du TLR9 en intra-péritonéale (IP) à des souris BALB/c naïves suivi d'une deuxième injection en IA de CpG-ODN (288). Ils ont observé que la co-injection de CpG-ODN augmentait la sévérité des arthrites. De plus, le transfert adoptif des splénocytes de ces souris à des souris injectées avec une dose sub-arthritogène de CpG-ODN en IA induit le développement d'arthrites. Parallèlement, lorsque l'injection de CpG-ODN en IA était précédée d'une injection d'antagonistes en IP, les souris étaient protégées des arthrites. Ainsi, l'administration systémique d'antagonistes du TLR9 inhibe la maladie. En 2004, L'équipe de Klinman a étudié ces mêmes phénomènes dans un modèle d'arthrite classique, à savoir l'AEC chez la souris DBA/1(289). L'injection IP d'antagonistes du TLR9 pendant la phase d'immunisation par le collagène diminue la sévérité des arthrites. De plus, ces antagonistes inhibent la production d'Ac anti-collagène ainsi que le taux d'IFN-γ dans les sera. Néanmoins, l'injection de CpG-ODN classiques dans le même protocole n'induit pas d'aggravation des arthrites.

L'ensemble de ces études suggère que le TLR9, lorsqu'il est stimulé par des ligands naturels (ADN bactériens) ou synthétiques, aggrave ou promeut les arthrites dans des modèles animaux. Néanmoins, cette démonstration reste indirecte car elle est basée sur la stimulation du TLR9 par des ligands et ne reflète pas l'action directe de ce récepteur. En effet, le rôle du TLR9 dans l'AEC n'a jamais été étudié dans des souris TLR9-KO. De plus, comme décrit plus haut, certains ligands pourraient activer d'autres récepteurs que le TLR9.

Quelques études suggèrent cependant que des ligands TLR9 ont des effets protecteurs dans l'arthrite. Par exemple, l'équipe de Diane Mathis et Christophe Benoist a démontré que l'injection de CpG-ODN de classe B en IP avant un protocole de transfert de sérum de souris K/BxN diminuait la sévérité des arthrites(279). Cette observation n'a pas été faite avec tous les CpG-ODN de classe B utilisés mais est dépendante du TLR9 (démonstré par l'utilisation de souris déficientes pour le TLR9 où l'effet protecteur n'est plus observé). Une autre étude évoque l'effet protecteur des ligands TLR9 : l'injection en IV de thymocytes apoptotiques diminue les arthrites dans un modèle d'AEC chez la souris(260). Cette protection est dépendante des récepteurs à l'ADN car les souris ne sont plus protégées de l'arthrite si les

cellules apoptotiques sont traitées avec de la DNase. L'équipe instigatrice de cette publication suggère que ce phénomène est dû à la capacité des cellules apoptotiques d'induire des phénomènes de tolérance (production d'IL-10 par les LB) via la stimulation du TLR9. Néanmoins, nous savons que le TLR9 n'est pas le seul récepteur à reconnaître l'ADN et que les cellules apoptotiques présentent de nombreuses molécules susceptibles d'être reconnues.

Pour conclure, le rôle du TLR9 dans le développement des arthrites dans des modèles animaux n'est pas encore clair et peut parfois être contradictoire selon le ligand utilisé, le modèle, et le protocole. La Figure 12 résume les connaissances actuelles sur l'implication possible du TLR9 dans la PR et ses modèles animaux.

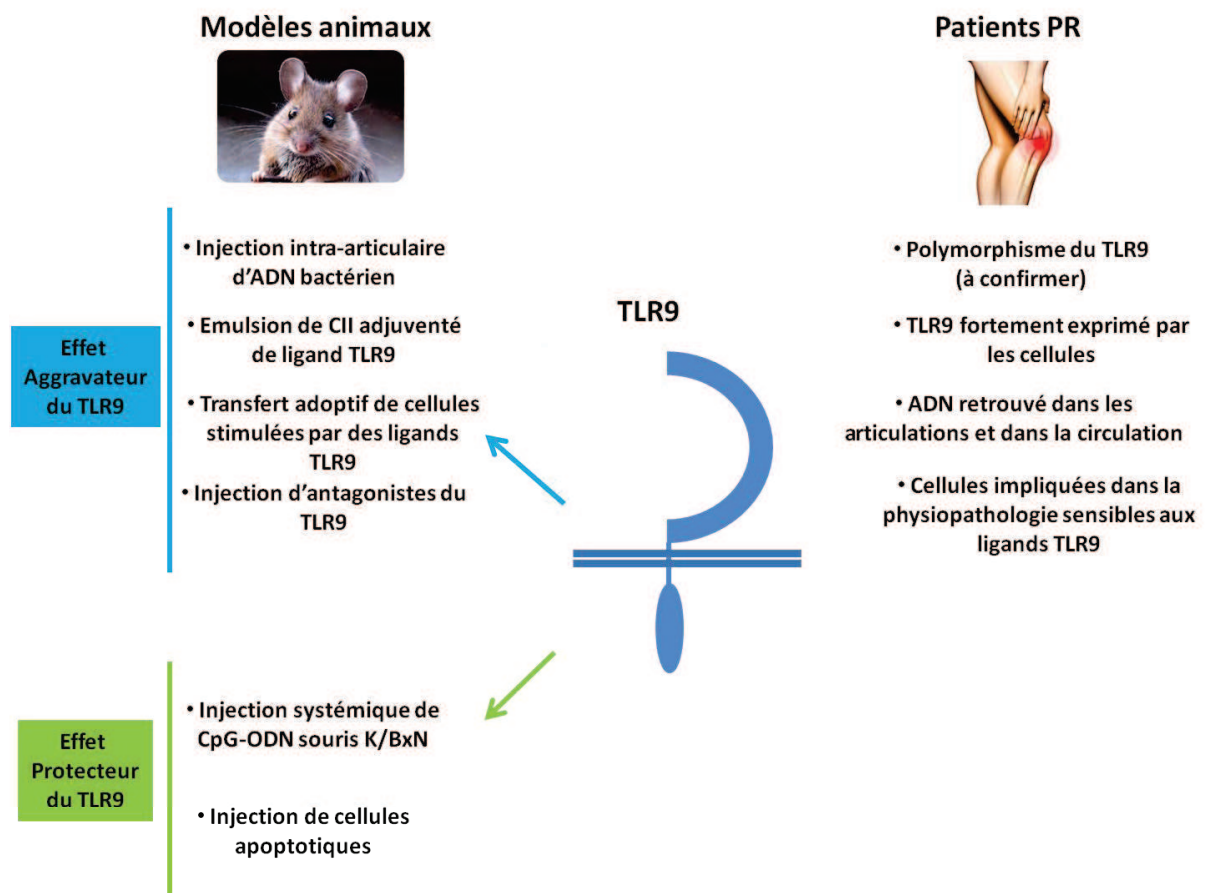


Figure 12: Implications possibles du TLR9 dans la PR et ses modèles animaux

b) Rôle du TLR9 dans le LES

La PR et le LES sont des maladies auto-immunes inflammatoires d'origine multifactorielle, dont le processus pathogène résulte d'une combinaison de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux. D'un point de vue physiopathologique, la réponse humorale joue un rôle

majeur dans ces deux maladies, plus particulièrement au cours du LES dont la plupart des manifestations est la conséquence du dépôt tissulaire des CI. Ce phénomène serait dû à une exposition prolongée du système immunitaire à des protéines devenues immunogènes à la suite d'un défaut d'élimination des cellules apoptotiques et de modifications post-traductionnelles. La dérégulation de l'élimination des cellules apoptotiques serait provoquée en partie par un manque de C1q. De forts taux d'IFN- α induisent la maturation des DC et l'activation des LT helper qui vont stimuler les LB auto-réactifs. Les auto-Ac retrouvés dans le LES sont dirigés contre des composants du noyau (nucléosomes, histones, ADN, ARN). Il a été suggéré que les forts taux d'IFN- α caractéristiques du LES auraient pour origine une activation des TLR3, 7 et 9 dans les pDC. Il est clairement établi que le TLR7 est impliqué dans cette pathologie car les souris déficientes pour le TLR7 ne produisent plus d'auto-Ac anti ARN et sont protégées du développement de la maladie(290). Le rôle du TLR9 dans le lupus s'avère être plus compliqué. Il a été montré que les souris déficientes pour le TLR9 développent un lupus plus sévère que les souris sauvages(290). Ce phénomène serait dû au fait que le TLR9 restreint l'activité du TLR7, qui lui est pathologique dans le lupus(210,291). Le TLR8 est lui aussi impliqué dans la répression du TLR7 dans ce modèle. De plus, l'équipe de Schlomchik a montré que la reconnaissance de l'ADN par le TLR9 était essentielle à la génération d'auto-Ac anti ADN dans ce modèle(292) et que le TLR9 régule la production d'auto-Ac induite par le TLR7(293). Par ailleurs, il semblerait que l'ADN reconnu par les auto-Ac soit riche en motifs CpG et les CI formés de cet ADN sont activateurs des réponses immunes(239,245).

Les études faites chez l'homme comme chez la souris montrent un rôle important des TLR endosomaux pour l'activation cellulaire dans le lupus ainsi que la reconnaissance de l'ADN et de l'ARN sous forme de complexes immuns. Bien que de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires soient communs à la PR et au LES, ce sont deux pathologies distinctes ayant des caractéristiques cliniques et des origines différentes. On peut toutefois envisager que différents TLR et ligands soient impliqués dans ces deux pathologies.

OBJECTIFS

L'immunité adaptative joue un rôle important dans le développement de la PR mais de plus en plus d'études dévoilent la contribution de l'immunité innée dans cette pathologie. Néanmoins, tous les mécanismes mettant en jeu l'immunité innée ne sont pas encore élucidés, ni à quel(s) stade(s) de la maladie ils sont impliqués, comme par exemple la contribution des TLR ou de certains facteurs du complément dans la PR. On sait que les facteurs environnementaux et en particulier certains agents infectieux favorisent le développement de cette maladie. Tous les ligands naturels du TLR9 dérivés de ces agents pathogènes ne sont pas connus et ce récepteur peut reconnaître de ligands endogènes comme de l'ADN du soi ou d'autres DAMP. Les données concernant l'implication du TLR9 dans la PR restent contradictoires et sont indirectes à cause de l'utilisation de ligands TLR9 en particulier dans les modèles animaux. Par exemple, les souris TLR9-KO n'ont jamais été étudiées dans l'AEC. Pour ces raisons, le TLR9 est un bon candidat d'étude mais reste peu examiné dans la PR. De plus, l'idée que l'expression du TLR9 est uniquement endosomale est remise en cause. Les PNN (fortement activés et présents dans l'articulation des patients) expriment le TLR9 et sont activés par certains des ligands de ce récepteur. Ces cellules pourraient par ailleurs posséder d'autres fonctions que celles communément admises, comme par exemple la production de cytokines décrites comme exclusives à un autre type cellulaire. Un autre acteur majeur de l'immunité innée est le système du complément. Le complément est activé dans la PR mais les mécanismes et stimuli impliqués sont mal connus. C1q est activé par des CI, formés dans certains cas d'ACPA, mais peut être mis en jeu indépendamment de ces complexes. Il a été suggéré que C1q ne jouait pas de rôle dans deux modèles d'arthrites chez la souris, modèles qui ne nécessitent pas d'immunisation active (transfert de sérum de souris K/BxN et CAIA) mais qui sont dépendants des Ac. Ainsi, l'implication de cette protéine dans les phases précoces de la maladie n'a jamais été évaluée, par exemple avant la production d'auto-Ac ou dans un modèle d'arthrite qui nécessite une immunisation active.

Nos objectifs sont multiples mais tous centrés sur la compréhension de nouveaux mécanismes de l'immunité innée qui pourraient être impliqués dans la PR.

Nous avons tout d'abord cherché à mieux caractériser l'activité du TLR9 en nous focalisant sur les PNN et à définir la réponse de ces cellules inflammatoires. Nous rapportons ici des fonctions non classiques des PNN, comme l'expression d'un TLR9 fonctionnel à leur surface cellulaire ou la production d'IFN- α . Ces fonctions pourraient participer aux phénomènes

inflammatoires retrouvés dans la PR ou le LES. L'**article I** et l'**article IV** décrivent ces nouvelles caractéristiques.

En parallèle, nous avons évalué la contribution directe du TLR9 ou de la protéine C1q dans la PR (**articles II** et **III**). Nous avons évalué le rôle de ces molécules dans le développement de l'AEC, qui est un modèle permettant l'étude des phases de la maladie précédant l'immunisation et où une immunisation active est nécessaire. En parallèle, nous avons évalué la contribution de ces deux molécules en analysant l'expression du TLR9 chez les patients PR et en mesurant la capacité des leucocytes du sang de patients à lier C1q, ce qui permet d'estimer l'expression de tous les récepteurs à C1q et qui pourrait être le reflet de l'inflammation systémique.

RESULTATS

I. ARTICLE n°1

Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9

Dennis Lindau*, Julie Mussard*, Britta J.Wagner, Matthieu Ribon, Viktoria M. Rönnefarth, Maude Quettier, Ivan Jelcic, Marie-Christophe Boissier, Hans-Georg Rammensee, Patrice Decker.

Eur. J. Immunol, 2013. 43 :2101-2113

*contribution égale

Les neutrophiles humains primaires expriment un TLR9 de surface fonctionnel.

Avant la publication de ce travail, quelques données existaient quant à l'expression d'un TLR9 à la surface des cellules (LB, DC, cellules d'amygdale, monocytes) mais aucun de ces travaux n'avait étudié l'activité de ce récepteur à la membrane plasmique et aucune donnée concernant les neutrophiles n'existaient. L'idée générale était que le TLR9 est séquestré dans les compartiments endolysosomiaux afin d'éviter la reconnaissance d'Ag du soi. La preuve étant que l'expression artificielle du TLR9 à la surface des cellules induit une reconnaissance d'ADN de mammifère et une inflammation létale. De plus, la translocation forcée d'ADN de mammifère dans les endosomes induit une activation cellulaire en partie dépendante du TLR9(294).

L'objectif de cette étude était de déterminer si les neutrophiles primaires humains (donneurs sains) ou de souris exprimaient *ex vivo* un TLR9 à leur surface. Nous nous sommes aussi intéressés à la fonctionnalité de ce TLR9 de surface, via plusieurs approches:

- Le TLR9 de surface exprimé par les neutrophiles est-il capable de lier son ligand ?
- Ce TLR9 est-il capable d'activer les neutrophiles, comme c'est le cas pour le TLR9 endosomal ?

Pour la première fois, nous avons montré par cytométrie en flux et par microscopie confocale que les PNN primaires humains et de souris expriment un TLR9 de surface, en plus de la fraction endosomale. Ce signal n'est pas observé à la surface des cellules issues de souris TLR9-KO. Ce TLR9 de surface est capable de lier son ligand (CpG-ODN) lorsque celui-ci est libre ou immobilisé sur une surface plastique. La fixation du ligand n'est pas observé à la surface des cellules de souris TLR9-KO. La fonctionnalité du TLR9 de surface a été montrée par l'étude de l'activation des neutrophiles : le TLR9 de surface est capable d'activer les neutrophiles l'exprimant car lorsque la fraction endosomale est inhibée ou si le ligand est immobilisé, les neutrophiles sécrètent de l'IL-8 en réponse au CpG-ODN.

Ainsi, cette étude montre qu'en plus des LB, des monocytes ou des DC, les neutrophiles expriment à leur surface le TLR9 qui pourrait potentiellement reconnaître des ligands atypiques ou des DAMP. Il s'agit de la première étude prouvant que ce TLR9 de surface est fonctionnel.

Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9

Dennis Lindau^{*1}, Julie Mussard^{*2}, Britta J. Wagner¹, Matthieu Ribon², Viktoria M. Rönnefarth¹, Maude Quettier³, Ivan Jelcic¹, Marie-Christophe Boissier^{2,4}, Hans-Georg Rammensee¹ and Patrice Decker^{1,2}

¹ Department of Immunology, Institute for Cell Biology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

² University of Paris 13, Sorbonne Paris City, Bobigny, France

³ University of Paris 13, Sorbonne Paris City, INSERM U978, Bobigny, France

⁴ Rheumatology Department, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France

Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) represent one of the first lines of defense against pathogens. TLR9 is normally expressed in endosomes/lysosomes where it is activated by pathogen-derived DNA. Here we show that freshly isolated human and mouse primary PMNs express TLR9 at the cell surface *ex vivo*. Moreover, surface TLR9 expression is upregulated upon activation of PMNs with different stimuli and not only TLR9 agonists. Importantly, surface TLR9 is processed, active, and functional. TLR9 ligands, oligonucleotides containing unmethylated CpG motifs, indeed bind to surface TLR9 and binding was strongly observed at the cell surface of human cells expressing surface TLR9 and at the surface of WT but not TLR9-deficient mouse PMNs. Finally, CpG oligonucleotides cross-linked onto a solid phase and having no access to intracellular TLR9 are able to trigger cell surface TLR9 and induce neutrophil activation, even when endosomal acidification is inhibited. This is the first demonstration of a functional TLR9 expressed at the cell surface of human primary cells. This pathway may be triggered when pathogen-derived TLR9 ligands cannot reach the endosome, offering a rescue mechanism for neutrophil activation.

Keywords: Activation · Cell-surface expression · Functionality · Neutrophils · TLR9



See accompanying Commentary by Miyake



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

Polymorphonuclear cells (PMNs) are the first cells recruited at inflammation sites. They play a central role in host defense and their accumulation at sites of acute infection or tissue injury is a critical component of inflammation [1]. PMNs have recently been

reported to induce chemotaxis of the pro-inflammatory Th17 lymphocytes [2] and to stimulate plasmacytoid dendritic cells (DCs) to produce IFN- α [3,4]. Importantly, PMNs have been suggested to link innate and adaptive immunity [5–7] by influencing, e.g. DCs. PMN activation may thus favor adaptive immunity but may also represent a double-edged sword in promoting responses that may lead to tissue injury or autoimmunity.

Correspondence: Dr. Patrice Decker
e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

*These authors contributed equally to this work.

TLR9 is activated in endosomal/lysosomal compartments by unmethylated CpG motifs present in pathogen-derived DNA [8] as well as in synthetic oligonucleotides (ODNs). Nevertheless, vertebrate DNA can also trigger TLR9 under certain circumstances although TLR9-independent pathways are triggered in addition [9]. For instance, mammalian DNA activates innate immunity in a TLR-independent manner [10]. Moreover, natural phosphodiester ODNs lacking CpG motifs activate TLR9 upon enforced endosomal translocation [11]. Actually, the sugar backbone of natural phosphodiester DNA has been shown to determine recognition by TLR9 [12]; the rules governing TLR9 activation are therefore complicated. Furthermore, all the aforementioned results refer to intracellular TLR9. An emerging paradigm in innate immunity is thus the intracellular expression of TLR9 [13] because nucleic acids have to be released from microbial particles, concentrated or modified in acidified endosomal-lysosomal compartments [14, 15], before receptor–ligand interactions can take place with ectodomain-cleaved activated TLR9 [16, 17]. ODNs containing CpG motifs (CpG-ODN) are transported upon receptor-mediated endocytosis [18]. TLR9 signals upon UNC93B1-aided and physical association-mediated translocation from the ER to endolysosomes where it interacts with TLR9 agonists [19, 20]. It has been suggested that TLR9 is sequestered intracellularly to exclude recognition of extracellular host-derived nucleic acids, thus preventing autoimmune responses [21]. The recruitment of CpG-ODNs to endosomal TLR9 is enhanced by the soluble cofactor granulin [22], although granulin is not absolutely required for cell activation by CpG-ODNs. Endosomal compartmentalization of TLR9 may thus reflect an evolutionary strategy to avoid TLR9 activation by self-DNA and localization of the nucleic acid sensing TLRs is critical in discriminating between self and nonself nucleic acids.

PMNs recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) on foreign organisms by expressing TLRs 1–10, except TLR3 [23]. Particularly, PMNs express TLR9 and respond to TLR9 ligands, leading to cytokine secretion and CD11b upregulation, although the subcellular localization of TLR9 in PMNs has not been investigated. A few studies have demonstrated that specialized human primary immune cells such as B lymphocytes [24–27], tonsil cells [28], and monocytes [29], as well as intestinal epithelial cells [30], might express TLR9 at the cell surface, although the functionality of TLR9 expressed on the surface of human cells has not been demonstrated and its significance is unclear. Antigen-presenting cells (APCs) represent therefore major cell populations expressing cell surface TLR9. Nevertheless, human primary PMNs have not been studied so far. Moreover, only studies using engineered cell lines and expressing a chimeric cell surface TLR9 could clearly show that surface TLR9 responds to some of its ligands and even to mammalian DNA [21]. Such a demonstration is not available for primary cells expressing a natural TLR9. We therefore investigated whether human and mouse primary PMNs express a cell surface TLR9 and whether this receptor can trigger an activation signal upon binding and recognition of its agonist in the extracellular milieu. Using an approach combining immunological and microscopic techniques, we investigated the cellular distribution

and the functionality of TLR9 in lymphoid and myeloid cells. We demonstrate that surface TLR9 interacts with CpG ODN, leading to the activation of PMNs, and that surface expression of TLR9 is enhanced upon PMN activation.

Results

Human PMNs spontaneously express TLR9 at the cell surface

To investigate the *ex vivo* expression of TLR9 at the surface of non-stimulated cells, we first analyzed simultaneously all the human leukocyte populations in several independent healthy donors. Cells were prepared by dextran centrifugation and the two layers containing either PBMCs or PMNs were harvested and mixed, yielding a leukocyte population depleted from erythrocytes and platelets. As shown in Figure 1A, the R1 gate contained only PMNs (CD66b-positive cells), whereas the R2 gate contained essentially T lymphocytes, B lymphocytes, NK/NKT cells, and a few monocytes. Freshly isolated cells were then stained for cell surface or intracellular TLR9 using a specific mAb (clone 5G5). Focusing on gate R1, we identified cell-surface expression of TLR9 on PMNs (Fig. 1B), all the cells being double-positive for CD66b and CD11b. Gating on R2, and as already reported, B lymphocytes also express TLR9 at the cell surface (Fig. 1C, middle panel). Similarly, gating on CD3⁺CD19⁺ cells, we confirmed that part of the monocytes also express cell surface TLR9 (Fig. 1C, lower panel). Interestingly, no cell surface TLR9 was detected on T lymphocytes (Fig. 1C, upper panel), NK cells, or NKT cells (Fig. 1D, lower and upper panels, respectively). However, all the cell types analyzed expressed TLR9 intracellularly and intracellular expression was stronger than surface expression. No binding of the isotype control was observed, indicating that the staining was TLR9 specific. The specificity of the TLR9 staining was confirmed by comparing BM cells prepared from WT and TLR9-KO mice. Indeed, the 5G5 anti-TLR9 mAb used in the present study recognizes both human and mouse TLR9 [14]. We gated on Ly-6G^{high} cells (most of them are CD11b⁺ cells and thus granulocytes) that are known to express intracellular TLR9. WT PMNs indeed express intracellular TLR9 whereas no expression was observed in TLR9-KO PMNs, as expected (Fig. 1E). Those results indicate that the signal measured at the surface of human PMNs corresponds to TLR9. More importantly, only the cells expressing TLR9 at the cell surface (namely PMNs, B lymphocytes, and monocytes) strongly bind the TLR9 ligand (FITC-CpG-ODN 2006) at the cell surface (Fig. 1B–D), whereas all the cell types were stained positively with that ligand upon fixation/permeabilization, suggesting that the CpG-ODN also binds to its intracellular receptor. This observation confirms the presence of TLR9 at the cell surface and the specific interaction with its ligand suggests that surface-expressed TLR9 is active. To determine whether PMNs express a mature form of TLR9 at the cell surface, human PMNs were isolated from fresh blood and analyzed by flow cytometry after staining with another TLR9-specific mAb (clone 26C593, Supporting Information Fig. 1),

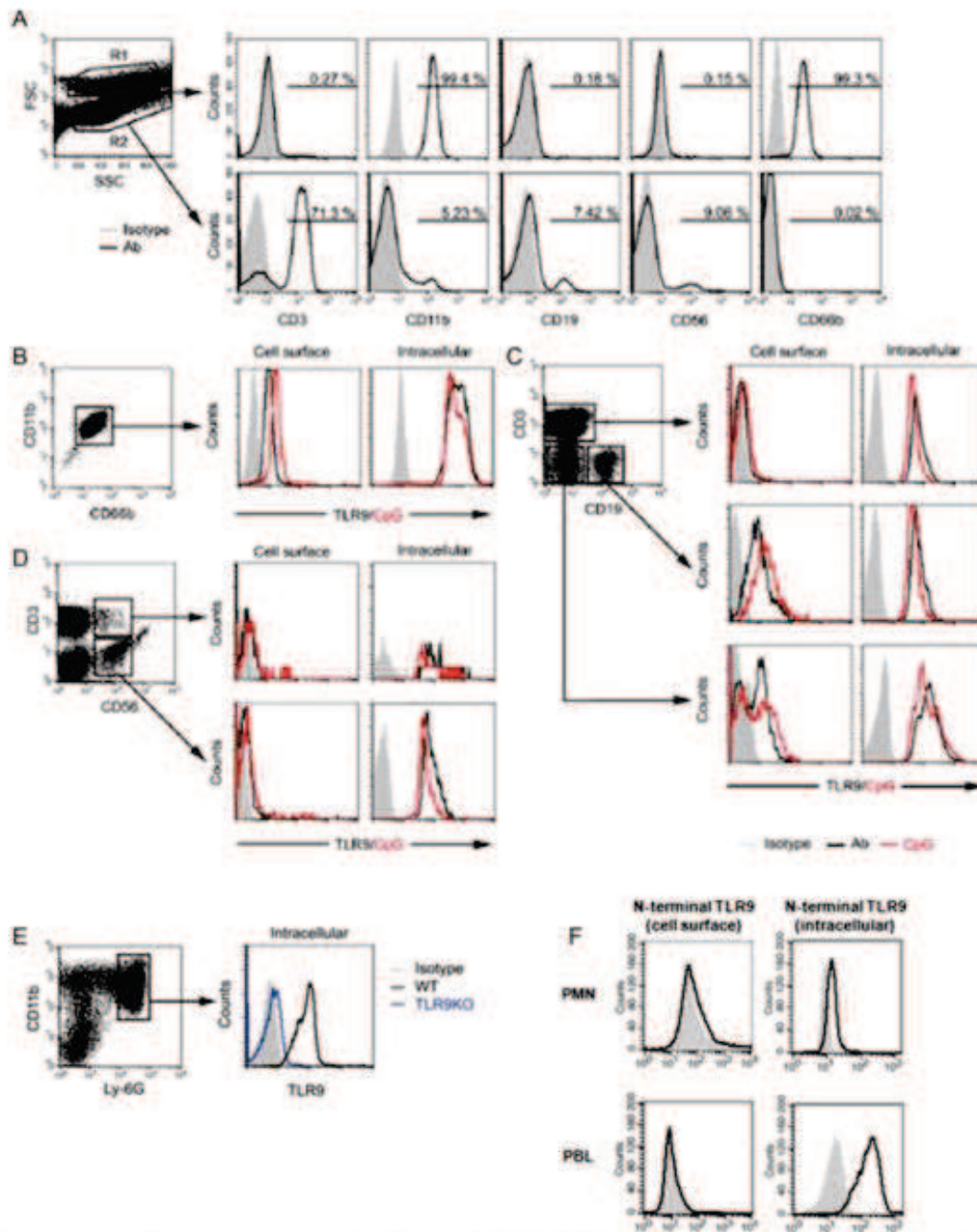


Figure 1. Human primary PMNs express a processed TLR9 at the cell surface. PBMCs and PMNs were freshly isolated from the peripheral blood by dextran centrifugation and mixed (except in (F)). Cells were analyzed by multicolor flow cytometry using different gates. (A) Cells contained in gates R1 and R2 were characterized and the percentages of gated cells positive for the marker of interest are indicated. (B) Cells from gate R1, which are PMNs according to the staining for CD66b and CD11b (left), were stained for cell surface (without permeabilization) and intracellular (after permeabilization) TLR9 using an anti-TLR9-FITC mAb (5G5) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 antibody. Alternatively, cells were stained with a FITC-CpG-ODN (a TLR9 ligand). (C, D) Cells from gate R2 were stained for (C) CD3 and CD19 or (D) CD3 and CD56 and analyzed for surface and intracellular TLR9 expression or stained with the FITC-CpG-ODN as described in (B). (E) BM cells were isolated from WT and TLR9-KO mice and stained for Ly-6G and CD11b or the corresponding isotype control. Ly-6G-positive cells were then analyzed for intracellular TLR9 expression as in (B). (F) PMNs mainly express a cleaved form of TLR9 at the cell surface. Human PMNs and PBMCs were isolated separately and stained for cell surface and the intracellular N-terminal region of TLR9 (black histograms, N-terminal TLR9 staining). In PBMCs, PBLs were gated. Data are representative of ten independent experiments (except E, five experiments) using cells isolated from independent donors. Ab: antibody; CpG: FITC-CpG-ODN 2006. Filled gray histograms depict isotype controls. (B–D) Black histograms represent TLR9 staining; red histograms represent FITC-CpG-ODN staining.

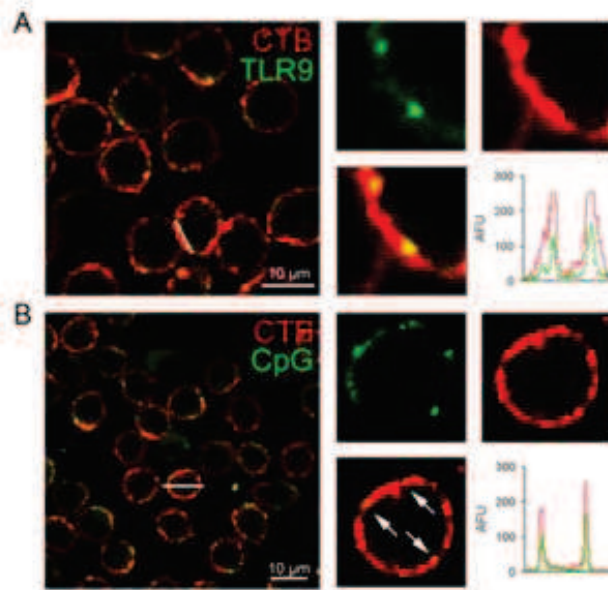


Figure 2. Human primary PMNs express a cell surface TLR9 and bind to TLR9 ligands. PMNs were purified from fresh blood and analyzed by confocal microscopy in the absence of PBMCs. (A) PMNs were stained consecutively with anti-TLR9-FITC (5G5) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 (without permeabilization) at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB. The individual fluorescence channels and the merged signal are shown (right). The intensity of both signals (measured along the white bar) is also depicted. (B) PMNs were then incubated with FITC-CpG-ODN 2006 at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB and analyzed. The individual channels, the merged signal (arrows) and the intensity of both signals across the cells (white bar) are depicted. (A, B) The scale bar represents 10 μm. Data shown are representative of eight independent experiments performed. CpG, FITC-CpG-ODN 2006; AFU: arbitrary fluorescence units.

which recognizes the TLR9 moiety cleaved and removed during TLR9 processing and maturation. This N-terminal fragment should not be transported to the cell surface because it contains no transmembrane domain. Therefore, this mAb should not stain the processed TLR9 at the cell surface. We used from this point on highly purified PMNs, yielding only the cell population corresponding to gate R1 and PMNs were not mixed with PBMCs. In most cases, PMNs and PBLs were only weakly stained at the cell surface with this mAb specific for unprocessed TLR9 (Fig. 1F) and therefore only express low levels of full-length TLR9 at the cell surface. As a control, clone 26C593 recognized intracellular TLR9 in both cell types, especially in PBLs. Since PMNs (and PBLs) were stained with the 5G5 mAb at the cell surface (Fig. 1B), those results suggest that PMNs (and PBLs) mainly express a processed TLR9 at the cell surface.

To confirm the presence of TLR9 at the cell surface, highly purified human PMNs were analyzed by confocal microscopy. Cells were stained for TLR9 expression (green) at 4°C in the presence of cholera toxin subunit B (CTB, red) to stain the cell surface. As shown in Figure 2A, a TLR9-specific signal was observed at the cell surface of PMNs, as demonstrated by the merged signal with CTB staining. The histogram depicting the intensity of both signals (measured along the white bar) shows that both signals

overlay along the cell membrane. PMNs were then incubated with FITC-CpG-ODN 2006 (green) in the presence of CTB and analyzed (Fig. 2B). The TLR9 ligand bound to the cell surface of PMNs (merged signal), in line with the cell-surface expression of TLR9. When analyzing both signals across the cells (white bar), we only detected the FITC-CpG-ODN at the cell surface, as depicted by the overlay in the histogram showing the intensity of both signals. The binding of the CpG-ODN at the cell surface suggests that TLR9 recognizes its ligand.

To support our observations, several control experiments were performed. We first analyzed unpurified PMNs in whole blood instead of isolated PMNs to show that the PMN isolation procedure used above does not influence TLR9 cell-surface expression. RBCs were lysed and fresh whole blood cells were directly stained at 4°C and analyzed by flow cytometry. Moreover, a different combination of antibodies was used to confirm the staining reproducibility and specificity. Gating on PMNs, we detected TLR9 at the cell surface (Supporting Information Fig. 2A). Then, to prove that the detected TLR9 is at the cell surface and not inside cells, freshly isolated PMNs were analyzed by flow cytometry (with the same antibody combination as was used in Fig. 1B) in the presence of Trypan blue (TB) that quenches the extracellular FITC fluorescence, whereas intracellular FITC fluorescence is not altered [31]. The PMNs used were highly pure (Supporting Information Fig. 2B) and uniformly expressed surface TLR9 (Supporting Information Fig. 2C). As a negative control, we analyzed the endocytosis of fluorescent molecules at 37°C using FITC nucleosomes as a marker (nucleosomes slightly bind to the PMN cell surface whereas they are strongly endocytosed by PMNs [32]). FITC nucleosomes were taken up by PMNs and the signal was not inhibited by TB (Supporting Information Fig. 2D). As expected, the staining of surface CD66b was decreased in the presence of TB, confirming its activity. In contrast to FITC-nucleosomes, the staining of surface TLR9 (and CD66b) at 4°C was decreased in the presence of TB (Supporting Information Fig. 2E). Those results indicate that TLR9 is indeed present at the cell surface of PMNs.

Primary mouse PMNs also express TLR9 at the cell surface

To confirm the specificity of the TLR9 staining and to show that the CpG-ODN mainly binds to the cell surface TLR9 and not to an as-yet-unidentified DNA sensor as proposed [33], PMNs were isolated from WT and TLR9-KO mice by magnetic cell sorting. Mouse PMNs were stained in the presence of CTB and analyzed by confocal microscopy. WT PMNs showed a strong cell surface TLR9 signal upon staining with the 5G5 mAb, as demonstrated by the co-localization with the CTB signal, which was not detected upon staining with the corresponding isotype control (Fig. 3A). More importantly, the TLR9 staining was not observed with TLR9-KO PMNs, indicating that the cell-surface signal measured with WT PMNs was TLR9 specific. Likewise, the TLR9 ligand CpG-ODN strongly bound to the cell surface of WT PMNs, whereas no or low binding was detected with TLR9-KO PMNs, confirming that the

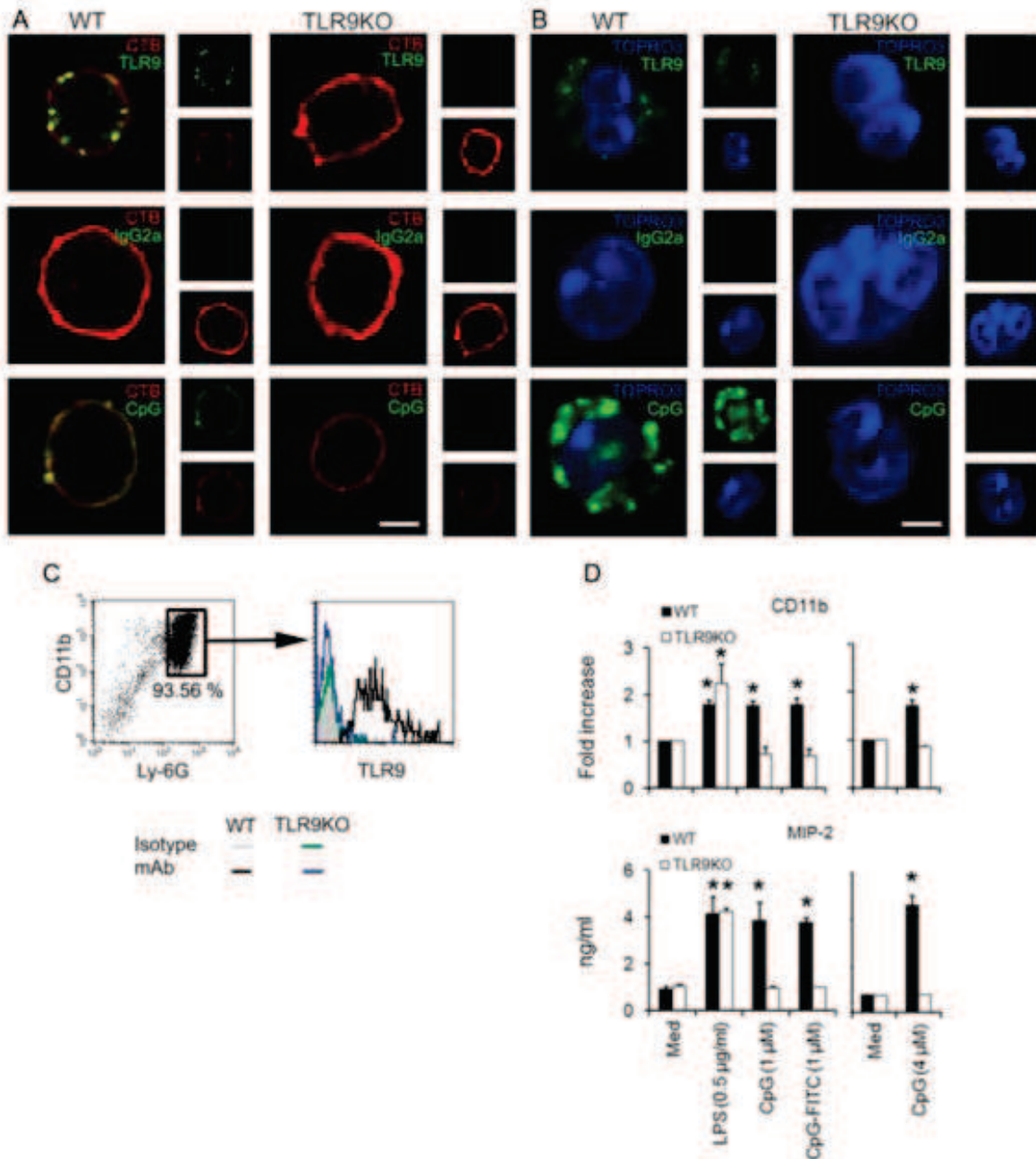


Figure 3. Mouse PMNs express also a cell surface TLR9 and the staining is specific. PMNs were purified from the BM of WT and TLR9-KO mice. (A) Cells were stained consecutively with anti-TLR9-FITC (5G5, upper panel) or the corresponding isotype control (middle panel) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 or were directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 (lower panel) at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB (without permeabilization). PMNs were then analyzed by confocal microscopy as described in Figure 2. CpG, FITC-CpG-ODN 2006. (B) The same staining was performed using permeabilized cells to detect intracellular TLR9 expression and CpG-FITC binding, except that PMNs were stained with TO-PRO-3 instead of CTB. (A, B) The scale bar represents 5 µm. The individual fluorescence channels and the merged signal are shown. (C) Purified PMNs isolated from WT and TLR9-KO mice were analyzed by flow cytometry. The phenotype of the isolated cells was verified by Ly-6G and CD11b staining. Nonpermeabilized Ly-6G-positive cells (all of them are CD11b-positive) were analyzed for cell surface TLR9 expression as described in Figure 1. (D) The mouse PMNs isolated in (C) were cultured with LPS, CpG-ODN 2006, FITC-CpG-ODN 2006, or CpG-ODN 1826 (right histograms) for 16 h. Cell activation was then estimated by measuring CD11b upregulation (flow cytometry, depicted as fold increase versus medium) and MIP-2 secretion (ELISA). Data are shown as mean + SD of five samples pooled from five independent experiments. **p* < 0.05 versus medium, Student's *t*-test.

binding of the CpG-ODN to the cell surface of PMNs is essentially mediated by TLR9. The same experiment was then reproduced with fixed and permeabilized cells (Fig. 3B). Cells were stained with the DNA dye TO-PRO-3 instead of CTB in order to stain the nucleus. Only WT, but not TLR9-KO, PMNs showed a TLR9 signal, whereas no signal was observed upon staining with the isotype control, confirming that the mAb used was TLR9 specific and that the control mice used were TLR9-KO. Similarly, the CpG-ODN only bound to the intracellular TLR9 present in WT PMNs. The surface expression of TLR9 by those purified PMNs was confirmed by flow cytometry. Nonpermeabilized WT PMNs show a strong expression of surface TLR9, which was not observed with TLR9-deficient PMNs (Fig. 3C). To confirm that the FITC-CpG-ODN 2006 used is an active TLR9 agonist for mouse PMNs, cells were cultured with different stimuli and cell activation was estimated. Indeed, CpG-ODNs are often cell type specific and the conjugation to a FITC molecule may interfere with cell activation. WT PMNs were equally activated by CpG-ODN 2006 and FITC-CpG-ODN 2006, as shown by CD11b upregulation and MIP-2 secretion (Fig. 3D), whereas activation was not observed with TLR9-deficient PMNs. Similarly, only WT PMNs were activated by the mouse-optimized CpG-ODN 1826. As a control, WT and TLR9-deficient PMNs were activated by LPS, indicating that all the CpG-ODN used (conjugated to FITC or not) are TLR9 ligands and are not contaminated by endotoxins (which is an important control for the functional assay of surface TLR9 described under *TLR9 expressed at the cell surface of primary neutrophils is functional*). All those results confirmed the specificity of the TLR9 staining and the presence of TLR9 at the cell surface of PMNs. The strong binding of the CpG-ODN at the cell surface of WT but not TLR9-KO PMNs indicates that TLR9 expressed at the cell surface is able to recognize its ligand.

TLR9 expressed at the cell surface of primary neutrophils is functional

The results described above clearly show that the TLR9 ligand binds to the cell surface of primary PMNs and that the binding is specifically mediated by TLR9. It therefore indicates that this receptor is at least partially functional since it recognizes this ligand. We then analyzed whether ligation of FITC-CpG-ODN 2006 to the cell surface TLR9 triggers activation of primary human PMNs. In order to specifically stimulate TLR9 at the cell surface, the FITC-CpG-ODN 2006 was cross-linked by UV irradiation onto a nitrocellulose cell culture plate. The technical approach used is shown in Supporting Information Fig. 3A. The efficacy was verified by measuring the FITC fluorescence at all the different steps using a fluorometer (Supporting Information Fig. 3B, upper part). The results show that the ODN was covalently bound to the wells. Nevertheless, only $25.6 \pm 9.8\%$ of the incubated ODN was efficiently immobilized onto the plate. Freshly isolated PMNs were then cultured in the CpG-ODN-coated plate. As negative and positive controls, PMNs were cultured in medium alone or supplemented with LPS, respectively. As a comparison, PMNs were

cultured with the FITC-CpG-ODN 2006 free in solution at a sub-optimal concentration (adjusted to the amount of the cross-linked ODN). The concentration of the free ODN used was either the same than that of the cross-linked ODN (as estimated by measuring the FITC fluorescence) or slightly higher. Indeed, UV irradiation did not allow the cross-linking of an optimal amount of ODN. After overnight culture, the cross-linked ODN was still detectable in the cell culture whereas only a slight signal was detected for that ODN in the supernatants (Supporting Information Fig. 3B, lower part), suggesting that only a minute amount of the ODN is released and that most of it is still nitrocellulose bound. A stronger signal was detected for the free (not cross-linked) ODN in both the culture and supernatants, indicating that the latter was essentially in solution and not immobilized. Importantly, the cross-linked ODN induced the activation of PMNs, as shown by the IL-8 (CXCL8) secretion (Fig. 4A), indicating that the cell surface TLR9 is functional. The activation was even stronger than the activation measured with the same ODN in solution, whereas the latter was used at a stronger concentration. After cell culture, the FITC fluorescence was also measured in PMNs by flow cytometry. As expected, a strong signal was detected in PMNs incubated with the free FITC-ODN (Fig. 4B and Supporting Information Fig. 3C, left panel). Surprisingly, PMNs incubated with the cross-linked ODN showed an intermediate signal, suggesting that PMNs are able to detach part of the FITC molecules or part of the cross-linked ODN from the nitrocellulose filter. To determine whether the signal corresponds to a cell-surface signal only, the same cells were measured in the presence of ammonium chloride (AC), an inhibitor of endosomal acidification. The FITC fluorescence is indeed inhibited at low pH values and AC protects and restores the endosomal FITC fluorescence [31]. As shown in Figure 4B and Supporting Information Figure 3C (right panel), whereas the FITC fluorescence of the free ODN was significantly increased in the presence of AC ($p < 0.001$), the fluorescence of the cross-linked ODN was slightly but significantly decreased ($p = 0.029$), indicating that the ODN has different properties upon immobilization. Compared to the expected behavior of the free ODN that reaches endosomes, the results confirm that the cross-linked ODN bound only to the PMN surface (i.e. is cell bound but remains external) and did not reach the endosomal TLR9. The activation observed with the cross-linked ODN is therefore triggered by the cell surface TLR9. Primary PMNs were then isolated from six independent healthy donors and cell activation by the cross-linked ODN was determined in six independent experiments. The coated ODN induced a significant IL-8 secretion ($p = 0.014$), showing clearly that the TLR9 expressed at the cell surface of PMNs recognized its ligand and is functional (Fig. 4C). To support this hypothesis, PMN activation was estimated in the presence/absence of the lysosomotropic agent AC or the LPS inhibitor polymyxin B (PB). Free CpG-ODN activated PMNs independently of endosomal acidification whereas activation with Resiquimod (R848), a TLR7/8 ligand in humans, was abolished in the presence of AC (Fig. 4D), indicating that TLR9 can signal from the cell surface. As a control, activation with the TLR4 ligand LPS but not with free CpG-ODN was inhibited by PB, excluding that the noninhibition of free CpG-ODN by AC is

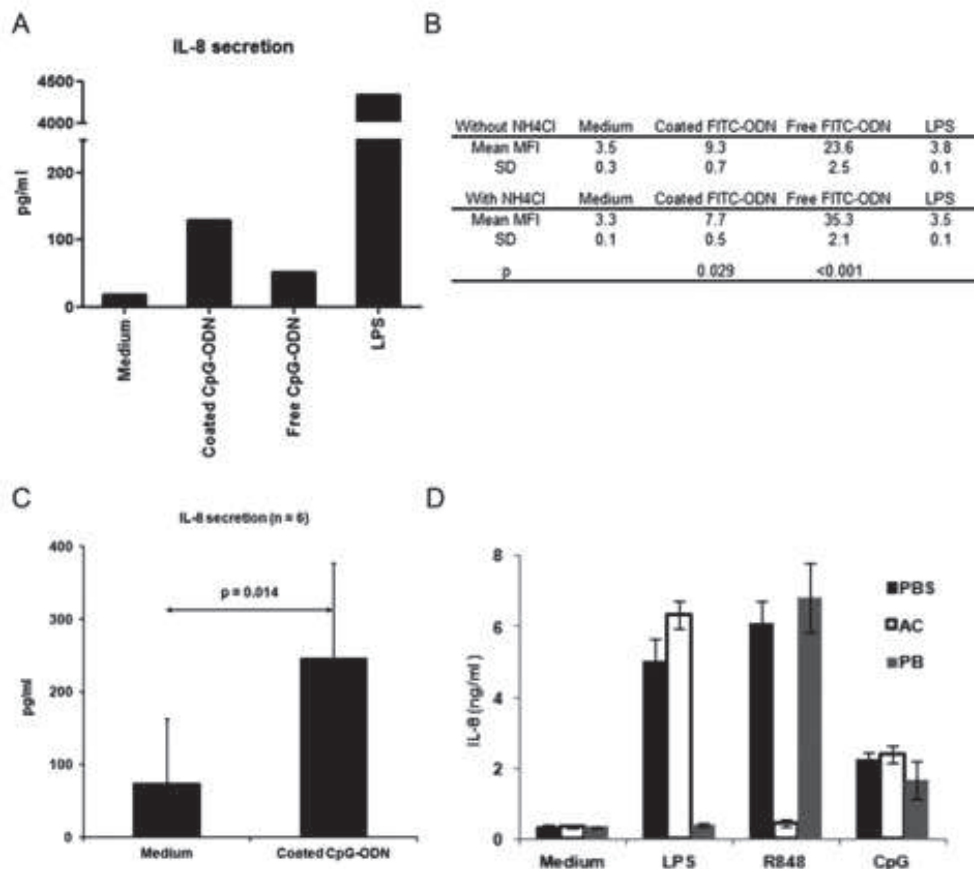


Figure 4. Human primary PMNs express a functional cell surface TLR9. (A–C) UV-treated nitrocellulose plates were incubated with PBS or FITC-CpG-ODN 2006 in PBS and the efficiency of the ODN cross-linking was verified by measuring the FITC fluorescence using a fluorometer. Human PMNs were isolated from healthy individuals and cultured in the cross-linked plate for 16 h. As a control, cells were activated with free (noncross-linked) FITC-CpG-ODN 2006 or LPS (5 ng/mL). The actual concentrations were 0.48 and 1 μM for the cross-linked and the free ODN, respectively. (A) The level of PMN activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. (B) Cultured PMNs were also analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence in the absence or presence of ammonium chloride (AC, NH₄Cl). The impact of AC on the FITC fluorescence was estimated by a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test on the MFI measured (mean ± SD of triplicates). (A, B) One representative experiment of three experiments performed is shown. (C) PMNs were isolated from healthy individuals and the capacity of the cross-linked ODN to trigger surface TLR9-mediated cell activation was tested. IL-8 secretion was determined by ELISA. The cumulative results (normalized to the actual concentration of the cross-linked ODN measured with the fluorometer) are shown as mean ± SD. Data are from six experiments performed in triplicates. Statistical significance measured by a Student's *t*-test. (D) Isolated PMNs were cultured in medium supplemented with PBS, AC, or PB. Cells were stimulated or not with 7.5 ng/mL LPS, 0.3 μg/mL R848, or 2 μM free CpG-ODN, and activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Data are shown as mean ± SD of one experiment representative of six performed in triplicates.

due to the presence of endotoxins. Similar results were obtained in the presence of bafilomycin A1 (Supporting Information Fig. S4). Bafilomycin A1 is, however, able to inhibit TLR9 signaling in PBMC (Supporting Information Fig. 5).

TLR9 surface expression is upregulated in response to PMN stimulation

We next investigated whether the expression of the cell surface TLR9 is modulated upon PMN activation. Cells from healthy individuals were incubated with different TLR ligands or purified nucleosomes, an autoantigen that activates PMNs in a TLR9-independent manner [32]. Interestingly, CpG-ODN-mediated PMN activation led to an upregulation of the cell surface TLR9 in part of the donors (Fig. 5A). No significant effect was observed in

response to the control GpC-ODN (ODN with GpC motifs instead of CpG). Activation with R848 or LPS also led to surface TLR9 upregulation in some donors. Importantly, nucleosome-induced PMN activation was associated with a concentration-dependent upregulation of the cell surface TLR9 in most of the donors (Fig. 5A and B). In most cases, surface TLR9 upregulation was associated with an upregulation of the intracellular TLR9 (Supporting Information Fig. 6), with LPS being a potent inducer of endosomal TLR9 expression and nucleosomes potent inducers of surface TLR9 expression. Modulation of TLR9 expression is therefore not restricted to TLR9 ligands. Priming of PMNs with GM-CSF was not efficient in upregulating cell surface TLR9, although it enhanced PMN activation by free CpG-ODN and upregulated intracellular TLR9 (Supporting Information Fig. 7). Activation-induced upregulation of TLR9 expression was

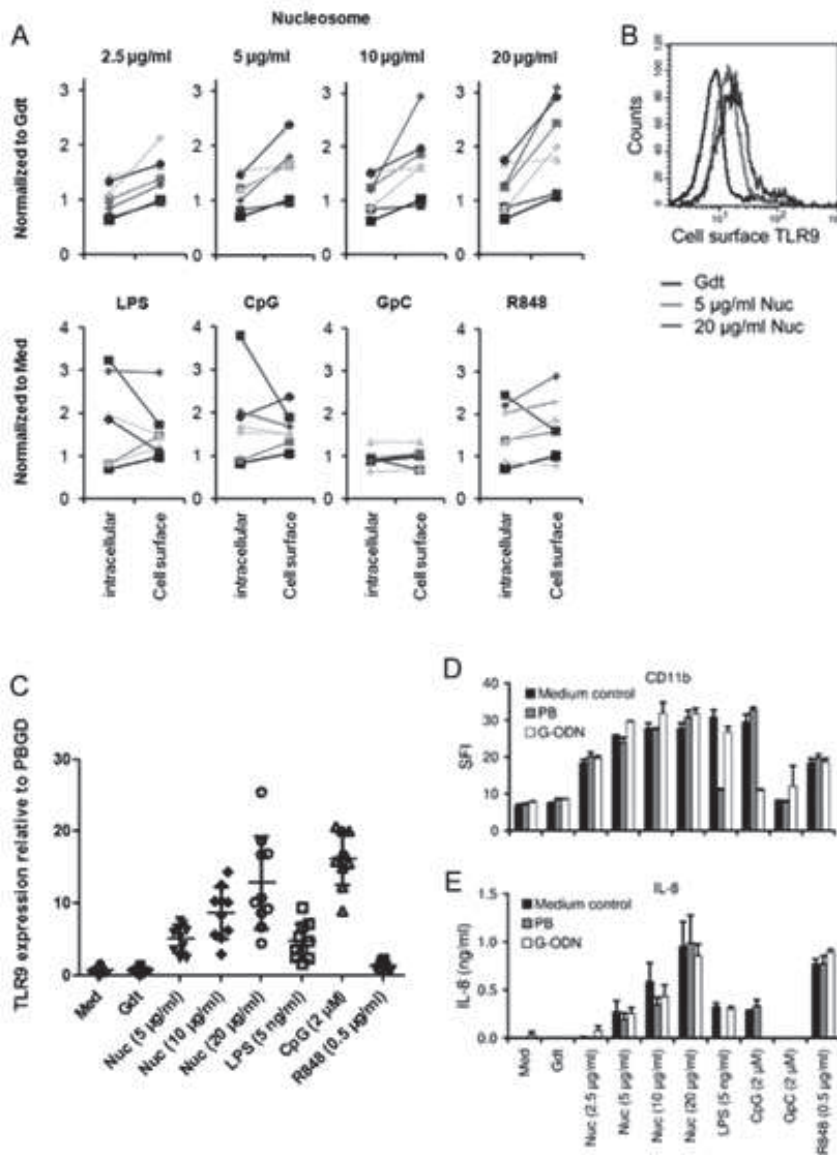


Figure 5. Surface TLR9 is upregulated in human PMNs upon cell activation. PMNs were isolated from seven independent healthy donors and cultured with different concentrations of nucleosomes, LPS (5 ng/mL), CpG-ODN (2 µM), GpC-ODN (2 µM), or R848 (0.5 µg/mL). (A) After 16 h, cells were stained for surface and intracellular TLR9 (clone 5G5) and analyzed by flow cytometry as described in Figure 1. The fluorescence was normalized to that of the gradient or medium controls in order to visualize the modulation (fold increase) of TLR9 expression induced by either nucleosomes or the TLR ligands, respectively. Shown are all the donors tested; each line represents a donor. (B) A typical flow cytometry histogram showing the nucleosome-induced upregulation of cell surface TLR9 in human PMNs is depicted. Cell surface TLR9 expression was measured in untreated PMNs (Gdt) and PMNs stimulated with nucleosomes (Nuc). (C) TLR9 expression was analyzed in PMNs at the mRNA level by quantitative RT-PCR. PMNs were untreated or stimulated and the activation-induced TLR9 upregulation was determined. TLR9 mRNA levels were normalized to porphobilinogen deaminase mRNA levels and were compared using a Student's t-test. The results show ten independent healthy donors (each dot represents one donor) with mean ± SD (depicted as fold increase). PMN activation was verified by measuring the CD11b upregulation by (D) flow cytometry and (E) IL-8 secretion by ELISA. Data are shown as mean + SD of triplicates from one donor of the seven donors tested in (A). Data are representative of seven independent experiments. PB: polymyxin B; G-ODN: TLR9 antagonist; Med: medium; Gdt: nucleosome purification buffer; Nuc: nucleosomes.

confirmed in PMNs at the mRNA level by quantitative RT-PCR (Fig. 5C). TLR9 mRNA were strongly increased by nucleosomes in a dose-dependent manner (16.7-fold increase at 20 µg/mL; $p < 0.0001$ versus the purification buffer (Gdt)) and by the cognate TLR9 agonist (CpG-ODN, 20.9-fold increase; $p < 0.0001$ versus medium). LPS also led to a significant increase of TLR9 mRNA levels (6.05-fold increase; $p = 0.0001$ versus medium), whereas R848 surprisingly induced a lower but still significant increase (1.72-fold increase; $p = 0.026$ versus medium). PMN activation was verified by measuring the CD11b upregulation (Fig. 5D) and IL-8 secretion (Fig. 5E). Nucleosomes trigger a concentration-dependent PMN activation that was not inhibited by PB or the TLR9 antagonist ODN containing a G5 motif (G-ODN). As a control, LPS and CpG induced PMN activation but were inhibited by PB or G-ODN, respectively, whereas GpC-ODN did not activate. Therefore, the

nucleosome-mediated PMN activation and the surface TLR9 upregulation occurred independently of TLR9 triggering and are not influenced by endotoxins. R848 activated PMNs and was not inhibited by PB or G-ODN. Thus, all the potential stimuli led to PMN activation, indicating that the modulation of endosomal/cell surface TLR9 expression is correlated with cell activation.

Discussion

We have shown for the first time that primary human and mouse PMNs express TLR9 at the cell surface. This is also the first demonstration that an ectodomain-cleaved functional TLR9 is expressed at the cell surface of human primary cells. Previous studies have already reported that monocytes and B lymphocytes

express a cell surface TLR9 [24–27,29] but PMNs have not been described. Moreover, the functionality and the processing of the cell surface TLR9 have not been addressed so far. Although activation by the cross-linked ODN was relatively low, IL-8 secretion was significantly increased. It therefore suggests that the surface-expressed TLR9 is less functionally efficient than the endosomal TLR9. Nevertheless, other causes, essentially technical reasons, may explain the apparent low activity of the surface TLR9 using this approach. For example, we observed that the nitrocellulose plates used are not optimal for PMN activation. Thus, when PMNs were cultured with CpG-ODN 2006 in solution in standard cell culture plates and nitrocellulose plates in parallel, cell activation was much stronger in standard plates (our unpublished observations). Moreover, UV irradiation only allowed the cross-linking of low amounts of CpG-ODN ($0.51 \pm 0.20 \mu\text{M}$, final concentration), whereas we found that $2 \mu\text{M}$ of the same ODN is required for optimal PMN activation in standard plates. By measuring the FITC fluorescence at all steps of the cross-linking procedure, we have clearly shown that the cross-linked ODN did not reach endosomal TLR9. Activation could therefore only be achieved through the triggering of surface TLR9. The flow cytometric analysis of the FITC fluorescence confirmed that the free CpG-ODN reached the endosome, as evidenced by the increased signal intensity in the presence of AC. On the contrary, a decrease in signal intensity was observed with the cross-linked ODN in the presence of AC, indicating that this ODN only bound to the cell surface and was not taken up by PMNs. Altogether, we have confirmed that the CpG-ODN used in the present study triggers only TLR9 and that this cross-linked ODN is cell bound. Therefore, the signal triggered at the cell surface of human PMNs by the cross-linked ODN is TLR9 mediated. Most importantly, to support our conclusions and to discriminate between TLR9 located at the plasma membrane from TLR9 located in the endosomes, we have shown that CpG-ODN-mediated PMN activation is not inhibited by AC or bafilomycin A1, demonstrating that TLR9 can also signal from the cell surface. Finally, we observed that intracellular TLR9 and cell surface TLR9 are upregulated in most donors upon activation. TLR9 upregulation occurred not only in PMNs activated with CpG-ODN but also in the presence of LPS, R848, or nucleosomes, as reported previously, and is therefore TLR9 independent and even not TLR restricted.

In conclusion, PMNs express a functional cell surface TLR9 that is upregulated upon PMN activation. Therefore, CpG-ODNs do not need to be accumulated in subcellular compartments for TLR9 binding and signaling in PMNs. Our results might partly explain why CpG-ODNs are still able to activate immune cells in the absence of granulins (although at a lower extent) as granulins has been described to particularly potentiate the delivery of CpG-ODNs to endosomal TLR9 [22]. We suggest that surface TLR9 expression works as a rescue mechanism for PMN activation when pathogen-derived TLR9 ligands have no access to endosomal TLR9 or when intracellular TLR9 is resistant to activation. Alternatively, surface TLR9 may also be involved in the transport of extracellular TLR9 ligands to endosomes. Finally, the cell surface TLR9 may recognize ligands that normally do not activate intracellular

TLR9 as previously reported for transfected cell lines [21]. TLR9 carrying mutations in the transmembrane region can access the cell surface and responds to extracellular DNA, which leads to fatal inflammation in vivo [34]. Particularly, cell surface TLR9 might be involved in the typical immune response to self-DNA that characterizes some inflammatory autoimmune diseases [35], especially systemic lupus erythematosus, particularly if self-DNA is able to upregulate cell surface TLR9. This is indeed the situation we mimicked in the present work with purified nucleosomes. Recently, impaired trafficking of TLR9 and TLR7 was shown to provoke systemic lethal inflammation [36]. Increased cell-surface expression of TLR9 may be a pro-inflammatory activation marker during infectious or autoimmune diseases. Thus, identification of TLR9 cell-surface expression in PMNs is critical for our further understanding of the triggering and the regulation of inflammation, and might lead to the discovery of so far unknown TLR9 ligands specific for the cell-surface receptor. Our results also contribute in delineating the mechanisms involved in the recognition of DNA. Nevertheless, future studies will be required to determine whether the intracellular and cell surface TLR9 are encoded by the same gene, whether they represent isoforms or whether the endosomal TLR9 may be translocated to the cell surface.

Materials and methods

Mice

TLR9-deficient mice [8] on a C57BL/6 genetic background were obtained from Professor H. Wagner (Munich, Germany). WT C57BL/6 control mice were purchased from Charles River. Experiments were approved by the local animal ethics committee (Regierungspräsidium Tübingen, § 4 Abs. 3 and the Darwin Committee of the University of Paris 13).

Human samples

Heparin or EDTA blood from random, healthy individuals was used. Human experiments were approved by the local ethics committee (reference 386/2006V). Alternatively, blood samples were obtained from the blood bank of Bobigny.

Nucleosome purification

Mononucleosomes (major lupus autoantigens known to induce PMN activation [37]) were purified by ultracentrifugation onto sucrose gradients as described previously [38]. As a control, an empty gradient (not loaded with chromatin) was prepared. The preparations contain low endotoxin levels (10–50 IU/mg nucleosomes) as determined using a Limulus Amebocyte Lysate assay (BioWhittaker). A similar concentration (in IU/mL) was measured in purified nucleosomes and in the purification buffer (empty gradient) that was used as a negative control. Nucleosome

preparations were always first tested using PMNs cultured with and without the LPS inhibitor PB (Fluka). For endocytosis assays, nucleosomes were dialyzed against PBS and conjugated to FITC as previously described [39].

Cell isolation, culture, and activation

Human PBMCs and PMNs were freshly isolated from peripheral blood by dextran density centrifugation [37]. Contaminating RBCs were lysed using a hypotonic buffer. Mouse neutrophils were isolated from BM cells obtained from adult WT and TLR9-KO mice (sex and age matched, 8–12 weeks old). Neutrophils were enriched by positive selection for Ly-6G⁺ cells using magnetic beads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. Contaminating RBC were lysed. Human (defined as CD3⁻, CD19⁻, CD56⁻, CD11b⁺, CD66b⁺ cells, purity >90% of living cells) and mouse PMNs (defined as F4/80⁻, CD3⁻, B220⁻, CD11b⁺, Ly6G^{high} cells, purity >90%) were cultured in RPMI 1640 medium (BioWhittaker), supplemented with 10% FCS (PAA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (both from Gibco), and 50 µM 2-ME (Roth). For cell activation studies, human and mouse PMNs were plated into 96-well plates at a density of 1 or 1.5 × 10⁶ cells/mL, respectively. G-CSF (50 ng/mL, ImmunoTools) was added to mouse PMNs. Cells were either incubated in medium alone or activated with purified nucleosomes, the purification buffer as negative control (empty gradient (Gdt)), R848 (Alexis), LPS (from *Salmonella typhimurium* or *Escherichia coli*, Sigma), CpG-ODN 2006 (5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3', Metabion or Invivogen) and 1826 (5'-tccatgacgttctctgacgtt-3', Metabion), GpC-ODN 2006 (Metabion), and FITC-CpG-ODN 2006 (Invivogen). All ODNs were phosphorothioate. Experiments were conducted in the presence/absence of PB (6.25–25 µg/mL), AC (2 mM, Roth), or a TLR9 antagonist (G-ODN, 4 µM, Metabion). After 16 h, cell culture supernatants were harvested and cells were analyzed by flow cytometry.

Antibodies and flow cytometry

All antibodies were purchased from BD Biosciences, if not stated otherwise. The antibodies used are described in Supporting Information. Human PMNs and PMBCs were first incubated with PBS/5% heat-inactivated human serum, whereas PBS/2% heat-inactivated autologous mouse serum was used for mouse PMNs. After washing, cells were incubated with the indicated mAbs or the corresponding isotype controls in PBS/serum/0.01% sodium azide to reduce the unspecific uptake of mAbs. For surface TLR9 staining, cells were incubated with FITC-CpG-ODN 2006 or with anti-TLR9-FITC (5G5 mAb) or anti-N-terminal region of TLR9 (26CS93 mAb) or the corresponding isotype controls and then with anti-FITC-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) or GAM-PE. For intracellular staining, cells were first stained for surface markers, permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), and incubated with anti-TLR9-FITC or anti-N-terminal region of TLR9 (or the corresponding isotype controls), washed and then with anti-FITC-Alexa Fluor

488 or GAM-PE or directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 in PBS/0.1% saponin (Sigma). All incubations were carried out at 4°C for 30 min. Cells were finally fixed with 1% paraformaldehyde and analyzed on a four-color FACSCalibur apparatus (Becton Dickinson). Data were evaluated with CELLQuest software (Becton Dickinson).

In some cases, PMNs were stained, incubated in the presence/absence of 0.1% TB and immediately analyzed by flow cytometry to determine whether the signal detected is an intracellular or a cell-surface staining. To confirm the inhibition of extracellular fluorescence, cells were stained with the anti-CD66b-FITC mAb. As a control, to analyze nucleosome endocytosis (not inhibited by TB) PMNs were incubated with or without 10 µM FITC-nucleosomes at 37°C in 10% FCS-containing PBS for 30 min.

Confocal microscopy

To demonstrate the cell-surface expression of TLR9, PMNs were incubated with FITC-CpG-ODN 2006 or were consecutively incubated with anti-TLR9-FITC (or the corresponding isotype control) followed by anti-FITC-Alexa Fluor 488 in PBS/serum/0.01% sodium azide (30 min, 4°C for all steps). To stain the cell surface, cells were incubated with Alexa Fluor 555-conjugated CTB (20 µg/mL, Molecular Probes) and fixed. For intracellular TLR9 staining, cells were permeabilized and incubated with anti-TLR9-FITC (or the corresponding isotype control) and then with anti-FITC-Alexa Fluor 488 or directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 in PBS/0.1% saponin. To stain the nucleus, cells were then incubated with TO-PRO-3 (1/1,000, Molecular Probes). Finally, cells were mounted on Lab-Tek Chambered 1.0 borosilicate coverglass systems (Nunc) and kept in the dark at 4°C. Confocal microscopy was conducted using an inverted LSM510 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss) fitted with a Plan-Apochromat 63×/1.4 OIL DIC objective, and the pinhole was set to scan layers of 1 µm. FITC and Alexa 488 were excited at 488 nm with an argon-ion laser. Alexa 555 and TO-PRO-3 were excited at 543 and 633 nm, respectively, with helium–neon lasers. Images were acquired by single-track measurement and scales are indicated.

ELISA

Detection of IL-8 and MIP-2 secretion by human and mouse PMNs was analyzed by sandwich ELISA using OptEIA set or mAb pairs and streptavidin-peroxidase conjugate from BD Biosciences or R&D Systems, respectively, and according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations in cell culture supernatants are depicted as mean ± standard deviation of triplicates.

Cell surface TLR9 functional assay

Nitrocellulose plates (Millipore, MSHA S4510) were activated by UV irradiation at 254 nm (UV Stratalinker 1800, Stratagene,

20 J/cm²) and coated with PBS or FITC-CpG-ODN 2006 in PBS (1.5–2.5 μM) for 4 h at room temperature. The presence of the FITC-CpG-ODN 2006 was confirmed by measuring the FITC fluorescence using a SPECTRA Fluor fluorometer (TECAN). Plates were then washed three times with PBS and the last wash was measured with the fluorometer to confirm the absence or free (unbound) FITC-CpG-ODN. The plate was filled with PBS and the FITC fluorescence was measured in order to estimate the CpG-ODN binding efficiency. Plates were then emptied and used for cell culture using human PMNs (1.5 × 10⁶ cells/mL). LPS and free FITC-CpG-ODN 2006 were used as controls. After 16 h, the FITC fluorescence in the plate was measured. Cell culture supernatants were then transferred, the FITC fluorescence was measured and the IL-8 secretion was estimated by ELISA. Simultaneously, PMNs were harvested and analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence in the presence/absence of AC (10 mM).

cDNA synthesis and quantitative RT-PCR analysis

For quantitative PCR analysis of TLR9 mRNA levels, total RNA was isolated from 2 × 10⁶ PMNs with Trizol reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's protocol. RNA template was treated with DNase I (amplification grade) and reverse-transcribed into cDNA by using Superscript II Reverse Transcriptase (both from Invitrogen). Prior to PCR, the resulting cDNA samples were treated for 30 min at 37°C with four units of RNase H (Ambion). The quantity and quality of the isolated RNA were established by UV spectroscopy and by the ability of the sample to be linearly amplified in a serial dilution with the low abundance housekeeping gene porphobilinogen deaminase. mRNA levels were determined with a PRISM 7000 sequence detection system with SYBR Green (both from Applied Biosystems) as the fluorophore and the following oligonucleotide primers (SA Biosciences): 5'-tgaagacttcaggccaactg-3' (forward), 5'-tgcacggtcaccaggtgt-3' (reverse). Quantitative PCR data were analyzed with 7000 Systems SDS Software v1.2.3 (Applied Biosystems) and checked for correct amplification and dissociation of the products. TLR9 mRNA levels were normalized to porphobilinogen deaminase mRNA levels and were calculated according to the cycle threshold method.

Statistical analysis

The mean FITC fluorescences measured by flow cytometry in the presence/absence of AC were compared using a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test. The mean IL-8 concentrations induced in PMNs by either the medium alone or the coated CpG-ODN were compared using a Student's *t*-test after normalization of the different experiments to the actual concentration of the coated CpG-ODN. CD11b expression and MIP-2 secretion by mouse PMNs were compared using a Student's *t*-test. The TLR9 mRNA levels in untreated and activated PMNs were compared using a Student's

t-test. The SigmaStat software was used and a *p* value < 0.05 was considered significant.

Acknowledgements: We thank Prof. H. Wagner (Munich, Germany) and Dr. L. Grosse-Hovest (Tübingen, Germany) for the gift of TLR9-deficient mice and aliquots of anti-TLR9 mAb, respectively, and F. Poirier (University of Paris 13, Bobigny, France) for technical advice. This work was supported by grants from the German Research Foundation (DFG, DE 879/1-1 and 879/1-2), the University of Tübingen (IZKF-Nachwuchsgruppe, 1604-0-0 and 1604-0-1) and the Fritz-Thyssen Foundation to Dr. Patrice Decker and by the University of Paris 13 as well as Inserm. Part of the research of Dr. Dennis Lindau was performed within the framework of project D1-101 of Top Institute Pharma. I.J. received a fellowship from the German Research Foundation (Graduiertenkolleg 794). B.J.W. was supported by a fellowship from the fortune-program of the University of Tübingen (1793-0-1).

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Nathan, C., Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6: 173–182.
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L. et al., Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010, 115: 335–343.
- García-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M. et al., Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011, 3: 73ra20.
- Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S. et al., Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011, 3: 73ra19.
- Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J. M., Yang, D., Gong, W. H. and Yoshimura, T., Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 2001, 69: 698–704.
- Bennouna, S., Bliass, S. K., Curiel, T. J. and Denkers, E. Y., Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* 2003, 171: 6052–6058.
- van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. and van Kooyk, Y., Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 2005, 201: 1281–1292.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M. et al., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, 408: 740–745.

- 9 Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C. J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S. et al., Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 2005. **174**: 6129–6136.
- 10 Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T. and Nagata, S., Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J. Exp. Med.* 2005. **202**: 1333–1339.
- 11 Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Luppa, P. B., Schmitz, F., Haas, T. et al., CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *Eur. J. Immunol.* 2006. **36**: 431–436.
- 12 Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Müller, T., Lutz, E. and Wagner, H., The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines Toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008. **28**: 315–323.
- 13 Lätz, E., Schoenemeyer, A., Vintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E. et al., TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 2004. **5**: 190–198.
- 14 Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. and Wagner, H., Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 2002. **32**: 1958–1968.
- 15 Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Luppa, P., Lipford, G. B., Wagner, H. and Bauer, S., Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 2004. **34**: 2541–2550.
- 16 Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G. P., Chapman, H. A. and Barton, G. M., The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 2008. **456**: 658–662.
- 17 Park, B., Brinkmann, M. M., Spooner, E., Lee, C. C., Kim, Y. M. and Ploegh, H. L., Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* 2008. **9**: 1407–1414.
- 18 Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K. et al., CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998. **17**: 6230–6240.
- 19 Kim, Y. M., Brinkmann, M. M., Paquet, M. E. and Ploegh, H. L., UNC93B1 delivers nucleotide-sensing Toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 2008. **452**: 234–238.
- 20 Brinkmann, M. M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H. L. and Kim, Y. M., The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* 2007. **177**: 265–275.
- 21 Barton, G. M., Kagan, J. C. and Medzhitov, R., Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 2006. **7**: 49–56.
- 22 Park, B., Buti, L., Lee, S., Matsuwaki, T., Spooner, E., Brinkmann, M. M., Nishihara, M. et al., Granulin is a soluble cofactor for Toll-like receptor 9 signaling. *Immunity* 2011. **34**: 505–513.
- 23 Hayashi, F., Means, T. K. and Luster, A. D., Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003. **102**: 2660–2669.
- 24 Dasari, P., Nicholson, I. C., Hodge, G., Dandie, G. W. and Zola, H., Expression of Toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol.* 2005. **236**: 140–145.
- 25 Baijée, E. E., Flohe, S., Lendemanns, S., Bauer, S., Mueller, N., Kreuzfelder, E. and Grosse-Wilde, H., Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* 2006. **145**: 456–462.
- 26 Cunningham-Rundles, C., Radigan, L., Knight, A. K., Zhang, L., Bauer, L. and Nakazawa, A., TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency. *J. Immunol.* 2006. **176**: 1978–1987.
- 27 Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Lafarge, S., Chavarin, P., Pozzetto, B., Richard, Y. and Garraud, O., Identification of two subpopulations of purified human blood B cells. *Immunology* 2008. **125**: 430–437.
- 28 Eaton-Bassiri, A., Dillon, S. B., Cunningham, M., Rycyzyn, M. A., Mills, J., Sarisky, R. T. and Mbow, M. L., Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 2004. **72**: 7202–7211.
- 29 Saikh, K. U., Kissner, T. L., Sultana, A., Ruthel, G. and Ulrich, R. G., Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J. Immunol.* 2004. **173**: 7426–7434.
- 30 Lee, J., Mo, J. H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A. N., Liu, Y. T., Lee, H. K. et al., Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 2006. **8**: 1327–1336.
- 31 Van Strijp, J. A., Van Kessel, K. P., van der Tol, M. E. and Verhoef, J., Complement-mediated phagocytosis of herpes simplex virus by granulocytes. Binding or ingestion. *J. Clin. Invest.* 1989. **84**: 107–112.
- 32 Lindau, D., Rönnefarth, V., Erbacher, A., Rammensee, H. G. and Decker, P., Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* 2011. **41**: 669–681.
- 33 Fuxman Bass, J. I., Gabelloni, M. L., Alvarez, M. E., Vermeulen, M. E., Russo, D. M., Zorreguieta, A., Geffner, J. R. et al., Characterization of bacterial DNA binding to human neutrophil surface. *Lab. Invest.* 2008. **88**: 926–937.
- 34 Mouchess, M. L., Arpaia, N., Souza, G., Barbalat, R., Ewald, S. E., Lau, L. and Barton, G. M., Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity* 2011. **35**: 721–732.
- 35 Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A., Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 2003. **19**: 837–847.
- 36 Fukui, R., Saitoh, S., Kanno, A., Onji, M., Shibata, T., Ito, A., Onji, M. et al., Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* 2011. **35**: 69–81.
- 37 Rönnefarth, V. M., Erbacher, A. I. M., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Nordheim, A., Rammensee, H. G. and Decker, P., TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2006. **177**: 7740–7749.
- 38 Decker, P., Le Moal, A., Briand, J. P. and Müller, S., Identification of a minimal T cell epitope recognized by antinucleosome Th cells in the C-terminal region of histone H4. *J. Immunol.* 2000. **165**: 654–662.
- 39 Decker, P., Wolburg, H. and Rammensee, H. G., Nucleosomes induce lymphocyte necrosis. *Eur. J. Immunol.* 2003. **33**: 1978–1987.

Abbreviations: **AC:** ammonium chloride · **CpG-ODN:** ODNs containing CpG motifs · **CTB:** cholera toxin subunit B · **G-ODN:** ODN containing a G5 motif (TLR9 antagonist) · **GpC-ODN:** ODN with GpC motifs instead of CpG · **ODNs:** oligonucleotides · **PB:** polymyxin B · **PMNs:** polymorphonuclear cells · **TB:** Trypan blue

Full correspondence: Dr. Patrice Decker, University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA4222, Li2P, 74 Rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France
Fax: +33-1-48-38-88-93
e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

See accompanying Commentary:
<http://dx.doi.org/10.1002/eji.201343882>

Current address: Dr. Dennis Lindau, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Department of Tumor Immunology, Radboud University, 6525 GA Nijmegen, The Netherlands

Current address: Dr. Viktoria M. Rönnefarth, Hain Lifescience GmbH, 72147 Nehren, Germany

Current address: Dr. Ivan Jelcic, Department of Neurology, University Hospital, Zurich, Switzerland

Received: 30/9/2011

Revised: 29/3/2013

Accepted: 14/5/2013

Accepted article online: 18/5/2013

II. ARTICLE n°2

Inflammation Develops in a Toll-like Receptor 9-Independent Manner in Experimental Arthritis and Rheumatoid Arthritis

Julie Mussard, Matthieu Ribon, Gaëlle Clavel, Marie-Christophe Boissier and Patrice Decker

Article en préparation

Travaux présentés oralement (International Congress of Autoimmunity, Nice, 2014) et par affiche (American College of Rheumatology, Boston, 2014 ; European Workshop for Rheumatology Research, Lisbonne, 2014)

L'inflammation se développe indépendamment du TLR9 dans l'arthrite expérimentale et la polyarthrite rhumatoïde.

Le rôle du TLR9 dans le développement et/ou le maintien de l'inflammation chronique chez les patients PR n'est pas clairement défini. Or, des facteurs environnementaux comme les infections peuvent participer au développement de la maladie chez l'homme. De plus, le relargage de ligands endogènes au cours de l'arthrite pourrait participer à la chronicité de l'inflammation. Néanmoins, aucune association claire entre les polymorphismes nucléotidiques du TLR9 et la présence d'ACPA ou de FR n'a été rapportée chez les patients. Plusieurs études réalisées chez la souris et le rat suggèrent que le TLR9 peut jouer un rôle dans le développement de l'arthrite. Toutes ces études montrent que l'injection de ligands du TLR9 au niveau local (dans l'articulation) ou en systémique induit ou amplifie les arthrites. Nous savons que le TLR9 peut reconnaître des ligands atypiques et que les ADN ne sont pas reconnus uniquement par le TLR9. D'autre part, l'activation par certains ligands TLR9 peut induire une réponse immunorégulatrice. Ainsi, les études utilisant des ligands ne démontrent pas l'implication directe du TLR9 dans les modèles animaux de la PR.

Un bon moyen d'étudier le rôle direct du TLR9 dans le développement des arthrites est d'utiliser un modèle où le TLR9 n'est pas exprimé, à condition d'utiliser les bonnes souris témoins même si cela demande un effort conséquent. Dans ce but, nous avons induit l'AEC chez des souris déficientes pour le gène du TLR9, que nous avons comparées à des souris « true littermate » sauvages. L'arthrite est induite chez ces souris mâles C57BL/6 par deux injections intradermiques de 50µg de CII de poulet (CIIp) au jour 0 (J0) et à J21 émulsionné dans du CFA. Nous avons reproduit cette expérience par 3 fois, de manière indépendante. Le développement des arthrites est suivi par observation des pattes en attribuant un score clinique allant de 0 à 4 (dix articulations évaluées par souris). Nous montrons ici pour la première fois que le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'AEC. En effet, les souris TLR9-KO développent des arthrites aussi sévères que les souris sauvages (Figure 13). Ce résultat a été confirmé par une analyse histologique des pattes. Brièvement, les pattes ont été fixées, décalcifiées puis coupées. Les coupes ont été marquées par hématoxyline/éosine. L'inflammation (infiltration de cellules inflammatoires et prolifération de cellules synoviales) et la destruction (irrégularités, destruction du cartilage et érosion osseuse) ont été analysées et un score histologique a été attribué en fonction de la sévérité de l'atteinte (0 : normal, à 3 :

sévère). Les souris TLR9-KO ont une synovite et une destruction osseuse aussi sévères que les souris sauvages, corroborant les observations cliniques (Figure 14).

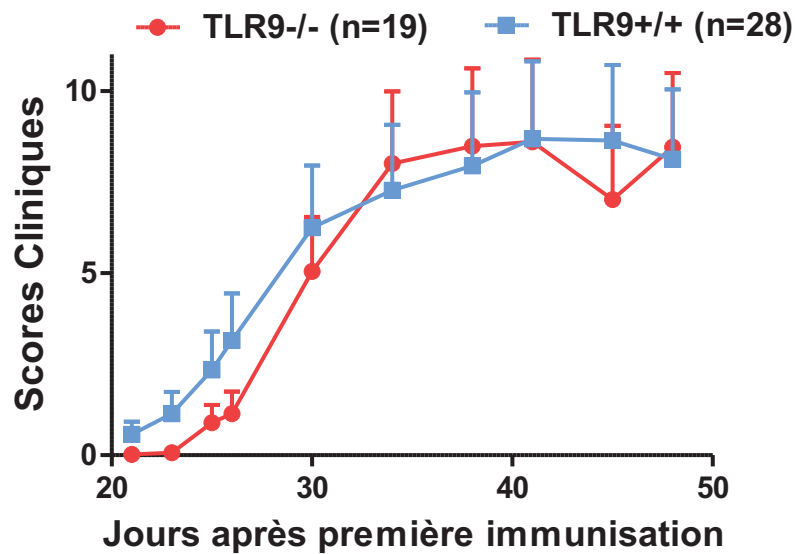


Figure 13: Le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'AEC.

19 souris TLR9-KO et 28 souris sauvages ont été immunisées avec 50µg de CIIp dans du CFA à J0 et J21. Les scores cliniques ont été établis sur observation des pattes. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les erreurs types sont représentées.

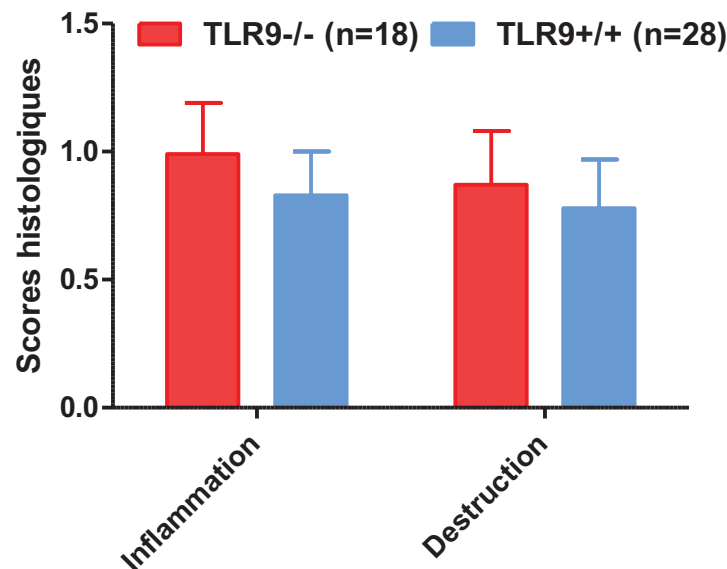


Figure 14: L'inflammation et la destruction articulaire sont similaires chez les souris TLR9-KO et sauvages.

L'inflammation (infiltration cellulaire) et la destruction articulaires ont été évaluées par histologie (score de 0 : normal à 3 : sévère). Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les erreurs types sont représentées.

Afin de mieux caractériser les phénomènes observés, nous avons dosé par ELISA les Ac anti-CIIp dans les plasmas de ces souris, 58 jours après l'induction des arthrites (Figure 15). En accord avec les résultats précédents, les deux groupes de souris produisent des taux similaires d'Ac anti-CII totaux (A), d'isotypes IgG1 (B) ou d'IgG2a (décrits comme pathogènes) (C). Les ratios IgG1/IgG2a (D) sont comparables, suggérant que la balance Th1-Th2 n'est pas altérée chez les souris TLR9-KO. Des résultats similaires ont été obtenus à J27.

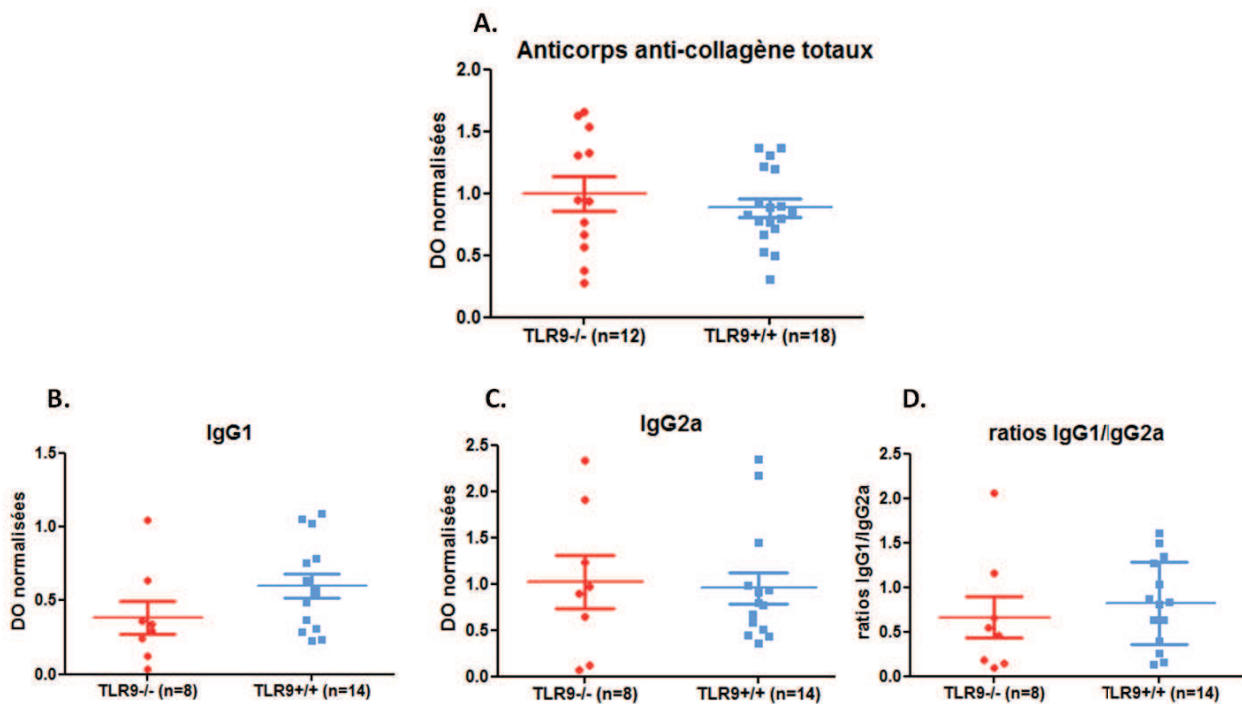


Figure 15: La production d'anticorps anti-collagène est similaire chez les souris n'exprimant pas le TLR9 comparées aux souris sauvages.

Les Ac anti-CII totaux (A), les isotypes IgG1 (B) ou IgG2a (C) parmi les anti-CII ont été mesurés par ELISA. (D) Les ratios IgG1/IgG2a ont été calculés pour chaque souris. Les densités optiques (DO) normalisées par rapport à un contrôle positif sont représentées ainsi que les moyennes et les erreurs types.

L'ostéoclastogénèse est un phénomène important dans la physiopathologie de la PR. Nous avons voulu connaître l'influence du TLR9 dans la différenciation de cellules souches en ostéoclastes dans notre protocole d'arthrite. Nous avons isolé les cellules de moelle osseuse de souris TLR9-KO et sauvages après un protocole d'AEC. Nous les avons cultivées avec du M-CSF et du RANKL durant 5 jours afin d'induire leur différenciation en ostéoclastes. Les ostéoclastes sont caractérisés par leur nombre de noyaux (au moins 3) et par l'activité de leur enzyme TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) qui est résistante au tartrate, permettant la coloration de ces cellules en marron-violacé. Ainsi, le TLR9 n'influence pas l'ostéoclastogénèse dans notre modèle car le nombre d'ostéoclastes compté est identique dans les deux groupes de souris (Figure 16).

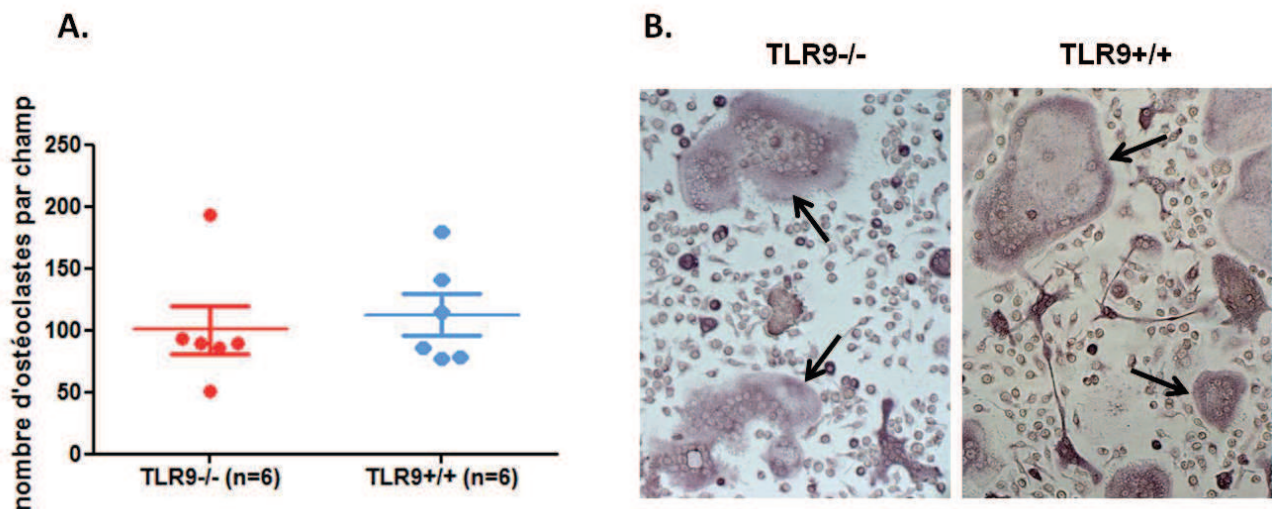


Figure 16: Les cellules de souris TLR9-KO et sauvages ont les mêmes capacités d'ostéoclastogénèse.

Les cellules de moelle osseuse de souris TLR9-KO et sauvages après un protocole d'AEC ont été différenciées en ostéoclastes *in vitro*. Les cellules considérées comme des ostéoclastes possèdent plus de 3 noyaux et ont une activité TRAP positive. (A) Les ostéoclastes ont été comptés. Chaque point correspond à la moyenne de 4 puits de culture pour chaque souris. (B) Image représentative de la culture (grossissement X200). Les flèches montrent des ostéoclastes caractérisés par leur nombre de noyaux. Le marquage marron-violacé est caractéristique de l'activité TRAP de ces cellules.

Les cytokines plasmatiques ont été mesurées par Multiplex, 27 jours après l'induction des arthrites (Figure 17). Bien que les souris TLR9-KO et sauvages développent des arthrites aussi sévères, les souris sauvages sécrètent plus d'IL-12p70 comparées aux TLR9-KO. Concernant les autres molécules testées (IL-6, VEGF, IL-5, IL-4, TNF α , IL1 β , IL-10, IFN- γ , IL-33, MIP-2, IL-17, IL-23p19), les taux sont similaires entre les souris TLR9-KO et sauvages. En particulier, les taux d'IL-6, cytokine connue pour être impliquée dans le développement de l'AEC, sont élevés dans les deux groupes de souris.

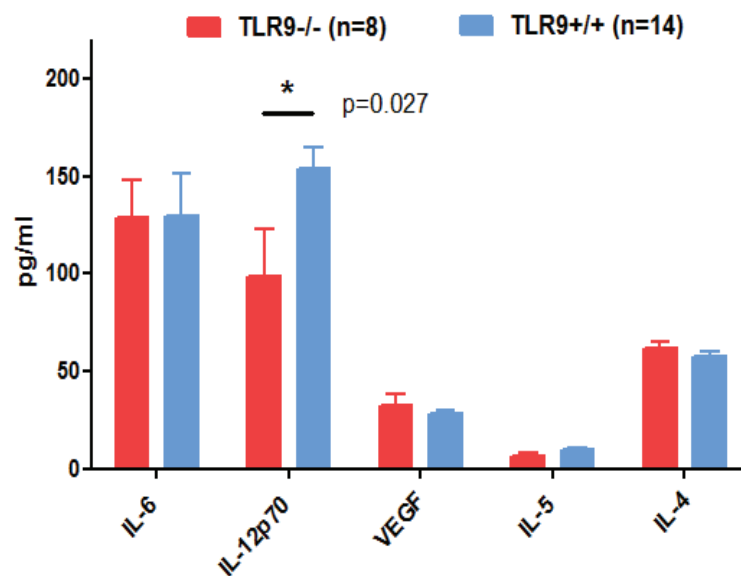


Figure 17: Cytokines produites in vivo pendant l'AEC.

Les taux de cytokines plasmatiques ont été mesurés par Multiplex 27 jours après l'induction des arthrites chez 8 souris TLR9-KO et 14 sauvages. Les moyennes et les erreurs types sont représentées. Test statistique : test t.

De récentes études suggèrent que le TLR9 régule négativement le TLR7(210). Nous avons voulu tester cette hypothèse dans notre modèle. En effet, en absence de TLR9, une plus forte activité du TLR7 pourrait expliquer le développement des arthrites. Nous avons tout d'abord mesuré l'expression du TLR7 par cytométrie en flux dans les leucocytes du sang de nos souris, 62 jours après l'induction des arthrites (Figure 18). Les leucocytes du sang des deux groupes de souris expriment le TLR7 dans des taux similaires.

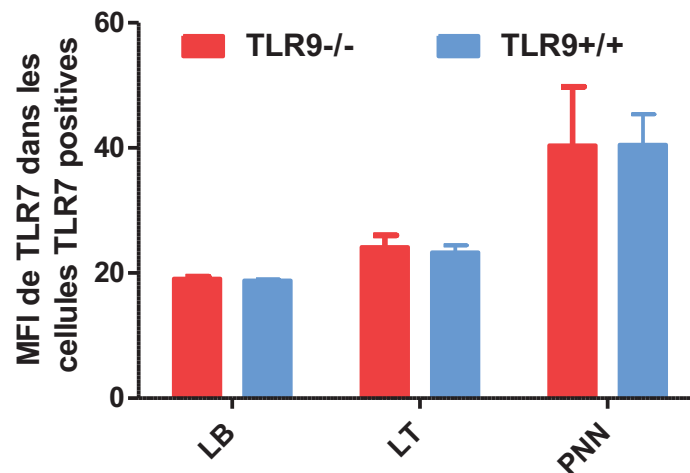


Figure 18: Les souris TLR9-KO expriment le TLR7 à des taux similaires comparées aux souris sauvages dans l'AEC

L'expression du TLR7 intracellulaire a été évaluée *ex vivo* par cytométrie en flux dans les LB (CD19+), LT (CD3+) et PNN (Ly6G+) du sang des souris TLR9-KO et sauvages à J62. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de TLR7 dans les cellules TLR7 positives a été représentée. Les moyennes et les erreurs types sont montrés.

Dans le but d'étudier si l'absence du TLR9 pourrait amplifier les réponses du TLR7 dans l'arthrite, nous avons mesuré le taux de certaines cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules de souris TLR9-KO et sauvages après l'AEC en réponse à différents ligands TLR (4/7/9) (Figure 19). Pour cette expérience, différents organes ont été récupérés (sang, rate et ganglions drainant lymphatiques) sur des souris TLR9-KO et sauvages 49 jours après la première immunisation. Les cellules totales ont été préparées et cultivées avec différents ligands TLR. Après 24 heures de culture, nous avons mesuré les taux de TNF α , d'IL-12p40/p70 et d'IL-6 par ELISA. Il s'avère que les cellules de souris TLR9-KO sécrètent significativement plus de TNF α , d'IL-12p40/p70 et d'IL-6 après stimulation par le ligand TLR7 (imiquimod) dans le sang et de TNF α dans les ganglions, comparé aux souris sauvages. La même tendance est retrouvée pour des ligands TLR4 dans le sang mais de manière non significative ($p=0,057$). Nous n'avons pas observé de telles différences dans la rate. Ce résultat n'est pas retrouvé chez des souris n'ayant pas subi de protocole d'AEC. Les souris n'exprimant pas le TLR9 répondent donc plus fortement à la stimulation du TLR7 suggérant un phénomène de compensation *in vivo* dans notre modèle d'arthrite.

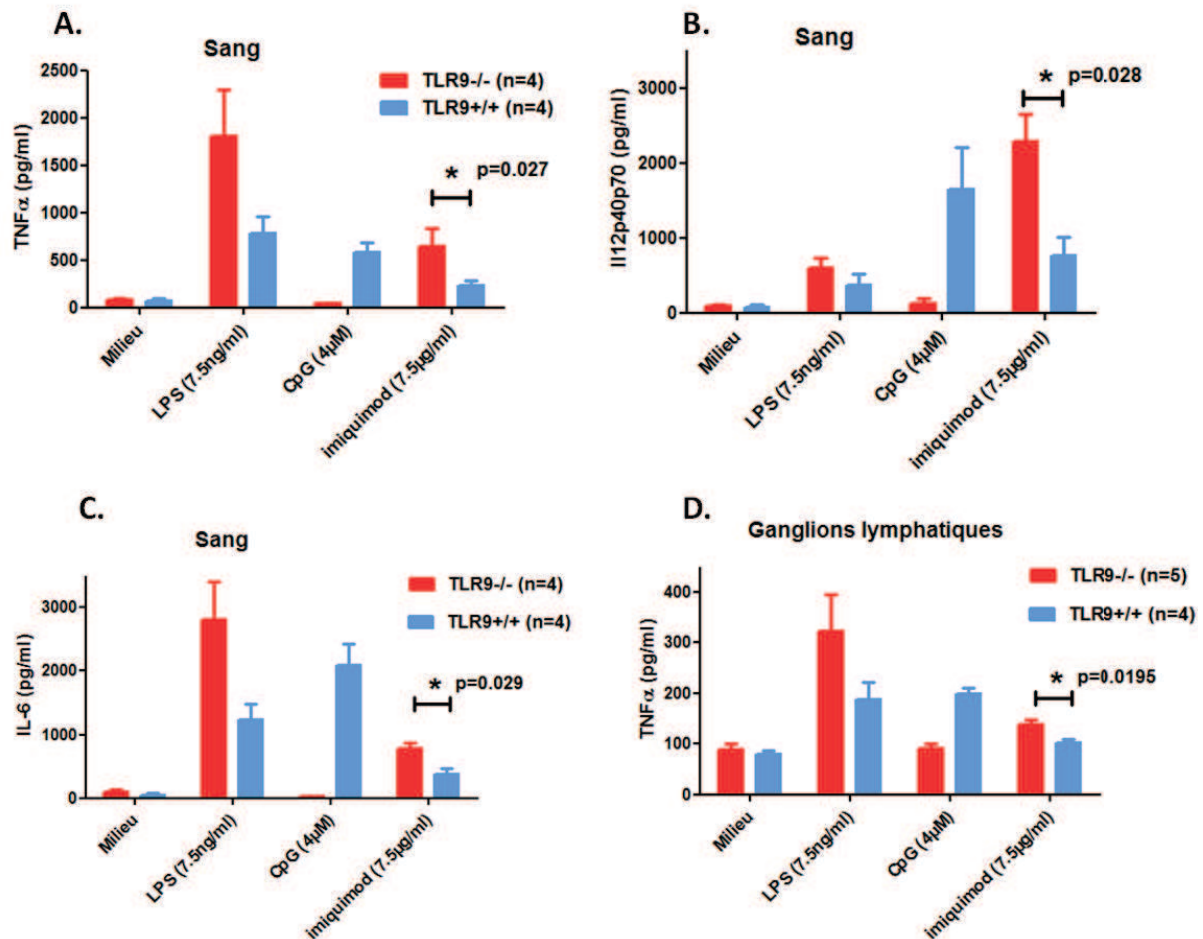


Figure 19: Les souris TLR9-KO répondent plus fortement à un ligand TLR7

Les cellules de sang et de ganglions lymphatiques de souris TLR9-KO et sauvages après l'AEC ont été isolées et cultivées avec différents ligands TLR (LPS pour TLR4 ; CpG pour TLR9 ; imiquimod pour TLR7). Les surnageants ont été récoltés et la présence de TNF α (A, D), d'IL-12p40/p70 (B) et d'IL-6 (C) a été dosée par ELISA. Les moyennes et les erreurs types sont représentées. Test statistique : Mann-Whitney

Notons qu'au cours de l'AEC, les souris TLR9-KO ne présentent pas d'anomalies d'activation du complément ni de la composition leucocytaire.

En parallèle, nous avons effectué une étude chez l'homme dans le but de comparer l'expression du TLR9 chez les patients PR et chez des donneurs sains *ex vivo*. L'idée est qu'une stimulation du TLR9 *in vivo* (chez les patients PR) par ses ligands endogènes pourrait induire sa surexpression. Pour se faire, les leucocytes totaux du sang périphérique ont été obtenus par lyse des globules rouges. Les cellules ont été marquées par un Ac anti-TLR9 (clone 5G5) avec ou sans perméabilisation préalable afin d'évaluer l'expression du TLR9 intracellulaire ou à la surface des cellules. Les cellules marquées ont été analysées par cytométrie en flux et les sous-populations cellulaires ont été distinguées par l'utilisation de « gate ». Les cellules de patients PR ont une expression du TLR9 similaire à celle des cellules

de donneurs sains (Figure 20). Ceci est vrai pour l'expression intracellulaire de ce récepteur sur les monocytes, les PNN et les lymphocytes (non montré). Nous n'avons de plus pas noté de surexpression du TLR9 à la surface des PNN de patients, expression jamais évaluée auparavant mais qui aurait pu être associée à la reconnaissance de ligands non classiques. Par ailleurs, l'expression du TLR9 n'est pas corrélée à l'activité de la maladie mesurée par le DAS28, la protéine C réactive ou la vitesse de sédimentation (non montré). Nous n'avons pas déterminé si le TLR9 retrouvé à la surface des PNN des patients PR était fonctionnel, comme c'est le cas chez les donneurs sains (article n°1).

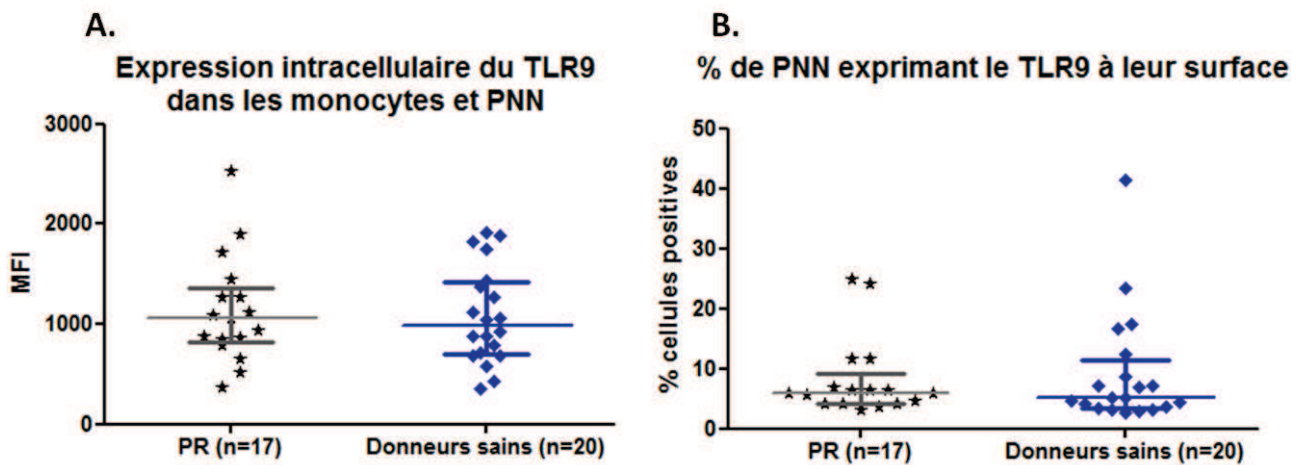


Figure 20: Le TLR9 n'est pas surexprimé dans les cellules de patients PR.

Les leucocytes totaux de 17 patients PR et de 20 donneurs sains ont été obtenus après lyse des érythrocytes. Les cellules ont été marquées par un Ac anti-TLR9-FITC puis par un Ac anti-FITC Alexa 488 et analysées par cytométrie en flux en utilisant différentes gates. (A) Marquage intracellulaire du TLR9 dans les monocytes et les PNN. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) est représentée. Le pourcentage de PNN exprimant le TLR9 de surface est représenté en (B). Pour (A) et (B), les médianes et interquartiles sont montrés.

Le but de notre travail était de déterminer si oui ou non le TLR9 participait au développement des arthrites. L'ensemble de nos résultats montre clairement que le TLR9 ne joue pas un rôle crucial dans le développement de l'AEC et suggère que les ligands TLR9 potentiels retrouvés chez les patients PR n'induisent pas de surexpression du TLR9, comme cela pourrait être le cas suite à une stimulation répétée du TLR9 *in vivo* et en accord avec nos observations (Figure 21).

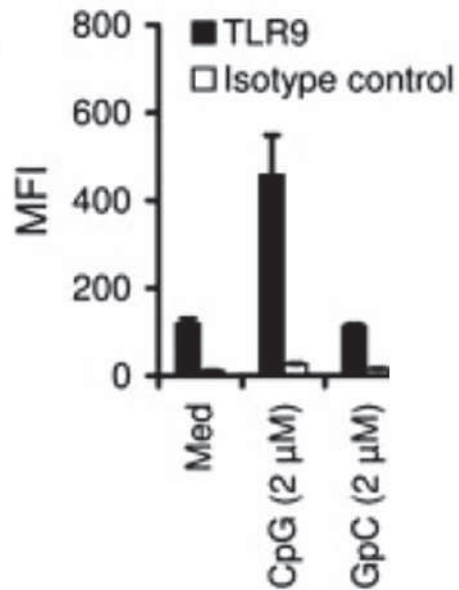


Figure 21: Le TLR9 est surexprimé après stimulation par son ligand activateur

Les neutrophiles d'un donneur sain ont été isolés par gradient de densité puis cultivés durant 16h avec 2μM de CpG-ODN (ligand TLR9 activateur) ou 2μM de GpC-ODN (ligand TLR9 non activateur). Un marquage intracellulaire du TLR9 a été effectué sur ces cellules (comparé à son isotype contrôle) puis analysé par cytométrie en flux. La moyenne des MFI des trois puits de culture et les écarts types sont représentés.

III. ARTICLE n°3

C1q is Mandatory for disease development in experimental arthritis and expression of its receptors correlates with disease activity in patients

Matthieu Ribon, Julie Mussard, Roxane Hervé, Marina Botto, Marie-Christophe Boissier and Patrice Decker

Article en préparation

Travaux présentés oralement (International Congress of Autoimmunity, Nice, 2014 ; American College of Rheumatology, Boston, 2014) et par affiche (European Workshop for Rheumatology Research, Lisbonne, 2014)

C1q est indispensable pour le développement de l'arthrite expérimentale au collagène et l'expression de ses récepteurs est positivement corrélée à l'activité de la maladie chez les patients.

Ce travail n'étant pas mon sujet principal de thèse, il sera moins détaillé que le précédent.

Le système du complément est un ensemble de protéines qui participe à la défense et à l'élimination des pathogènes ainsi que les cellules apoptotiques. L'activation de la voie classique se met en place après la fixation de C1q à des complexes immuns. L'activation du complément engendre la production de C3a, une anaphylatoxine qui recrute les granulocytes et les monocytes, qui favorise la costimulation des LT CD4 et maintient l'inflammation. Une des caractéristiques de la PR est la présence d'ACPA chez les patients, qui peuvent être sous forme de CI. Ceux-ci pourraient activer le complément via la voie classique. Le système du complément est par ailleurs fortement activé chez les patients et les protéines du complément sont présentes dans l'articulation(168,169). De manière surprenante, peu d'études se sont focalisées sur le niveau d'implication du système du complément chez ces patients et en particulier sur le rôle de C1q. De plus, les résultats obtenus dans les modèles animaux sont inattendus. Une étude a par exemple montré que, dans un modèle de transfert de sérum de souris K/BxN (modèle sans immunisation active mais dépendant des Ac), la protéine C1q n'est pas nécessaire au développement de la maladie alors que C5 est indispensable(173). Les mécanismes impliquant C1q sont probablement plus compliqués que la simple reconnaissance des CI. En effet, cette protéine peut être activée par d'autres ligands tels que les cellules en apoptose(295) et se fixe à la surface des bactéries indépendamment de la présence d'Ac. Il est donc possible que C1q soit activé directement par des ligands endogènes. De plus, le rôle de C1q à différents stades de la maladie et les ligands reconnus restent à éclaircir. Notre hypothèse serait que C1q intervient dans le développement des arthrites lors de phases plus précoces que celles analysées jusqu'à présent, en particulier avant la production d'auto-Ac. Dans ce but, nous avons utilisé des souris C57BL/6 mâles n'exprimant pas le C1q que nous avons comparées à des souris sauvages « true littermate » dans un protocole d'AEC (immunisation active, 50µg de collagène de poulet à J0 et J21 dans du CFA). Nous avons montré que C1q est absolument nécessaire au développement de l'AEC car les souris C1q-KO sont protégées du développement des arthrites (Figure 22). Ce résultat a été confirmé par une analyse histologique des pattes. Nous avons exclu que cette protection était due à un problème d'immunisation, à un biais dans la réponse au CFA, à une composition leucocytaire altérée ou à une inhibition de l'ostéoclastogénèse chez les souris C1q-KO. De manière intéressante, il ne

s'agit pas non plus d'un défaut d'activation du complément puisque le C3a est normalement produit au cours de la maladie (Figure 23).

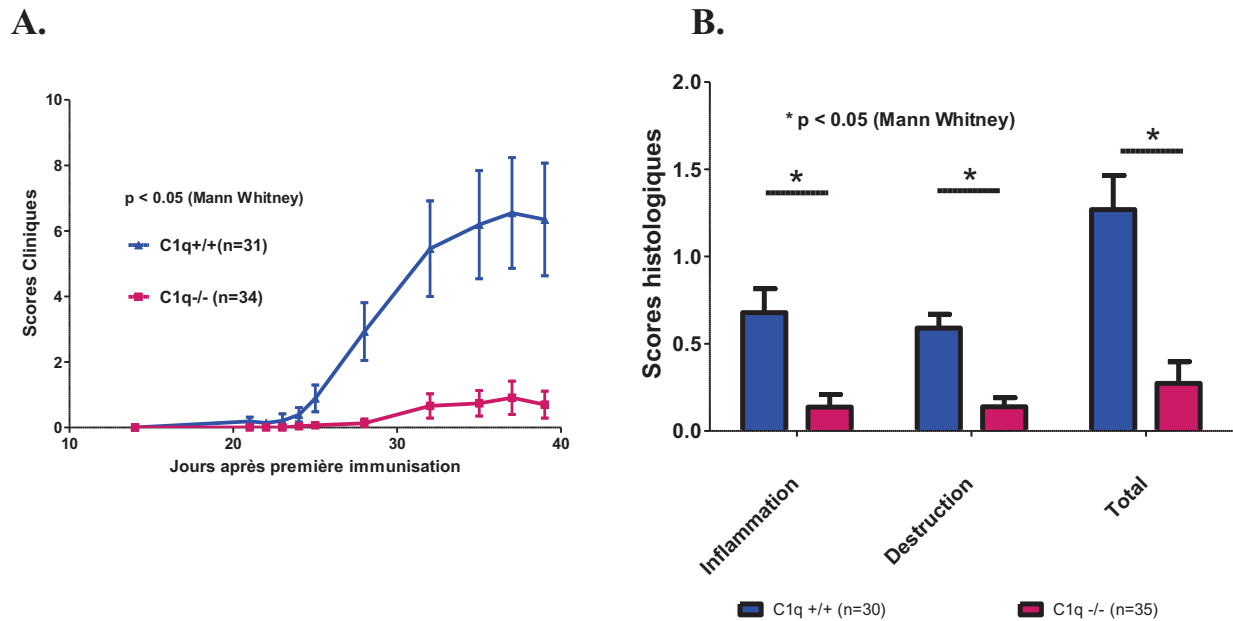


Figure 22: C1q est indispensable au développement de l'arthrite

34 souris C1q-KO et 31 souris sauvages ont été immunisées avec 50µg de CII de poulet dans du CFA. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes. (A) Le développement des arthrites a été évalué par observation des pattes. (B) L'inflammation et la destruction articulaires ont été déterminées par observation des lames histologiques colorées par hématoxyline/éosine (0 : pas d'atteinte, 3 : atteinte sévère). Les moyennes et les erreurs types sont représentées. Les scores cliniques et histologiques ont été déterminés comme décrit dans l'article n°2. Test statistique : Mann-Whitney

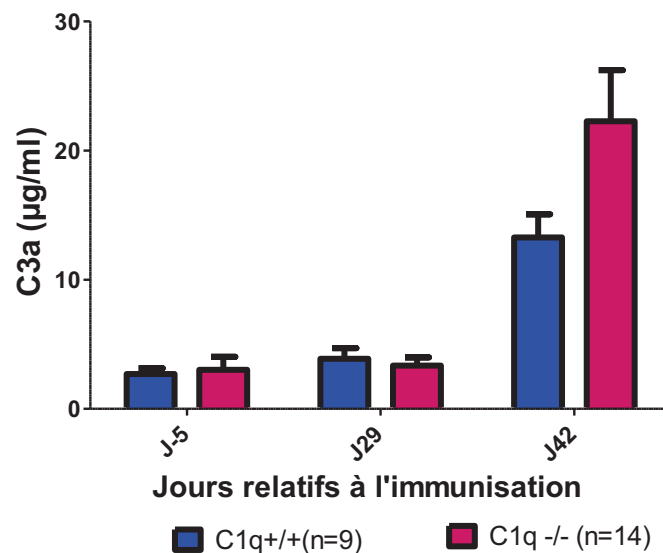


Figure 23 : C3a est produit chez les souris C1q-KO lors de l'AEC

Les taux de C3a ont été mesurés par ELISA dans les plasmas des souris 5 jours avant, 29 et 42 jours après la première immunisation.

Par contre, nous avons montré que les souris C1q-KO produisent significativement moins d'Ac anti-CII (totaux, IgG1 et IgG2a) mais sans modifications du ratio IgG1/IgG2a. Afin de mieux comprendre les mécanismes protecteurs, nous avons mesuré les cytokines produites *in vivo* au cours de l'AEC et avons observé que les souris C1q-KO produisent moins d'IL-6 (Figure 24).

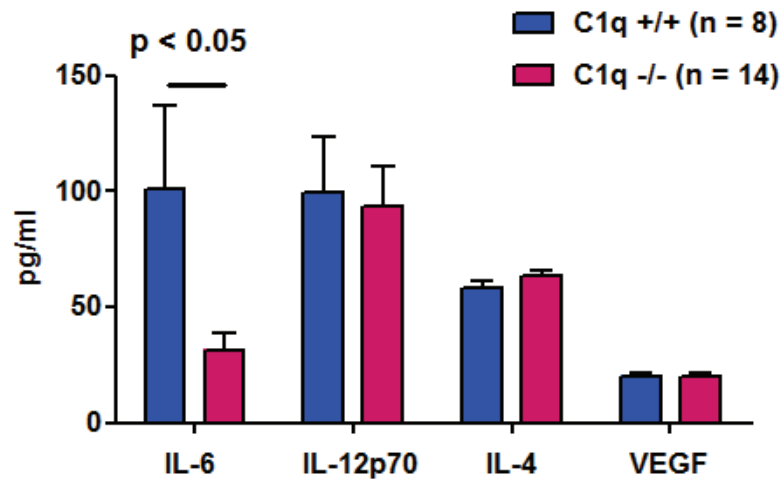


Figure 24: Les souris C1q-KO produisent moins d'IL-6 *in vivo* au cours de l'AEC.

Les taux de cytokines et de VEGF plasmatiques ont été mesurés par Multiplex 29 jours après l'induction des arthrites chez 14 souris C1q-KO et 8 sauvages. Les moyennes et les erreurs types sont représentées. Test statistique : Mann-Whitney.

En parallèle, afin de comprendre l'influence de C1q dans la maladie chez l'homme, nous avons mesuré la capacité des leucocytes du sang de 27 patients PR à lier C1q soluble. Ceci a été réalisé par cytométrie en flux et reflète le niveau d'expression de tous les récepteurs à C1q. Nous avons observé une corrélation positive et statistiquement significative entre la capacité des PNN à fixer C1q et l'activité de la maladie estimée par le DAS28 (Figure 25) ou la concentration en CRP, suggérant un lien entre C1q et inflammation dans la PR. Des résultats similaires ont été retrouvés en sélectionnant uniquement les patients non traités par biothérapie.

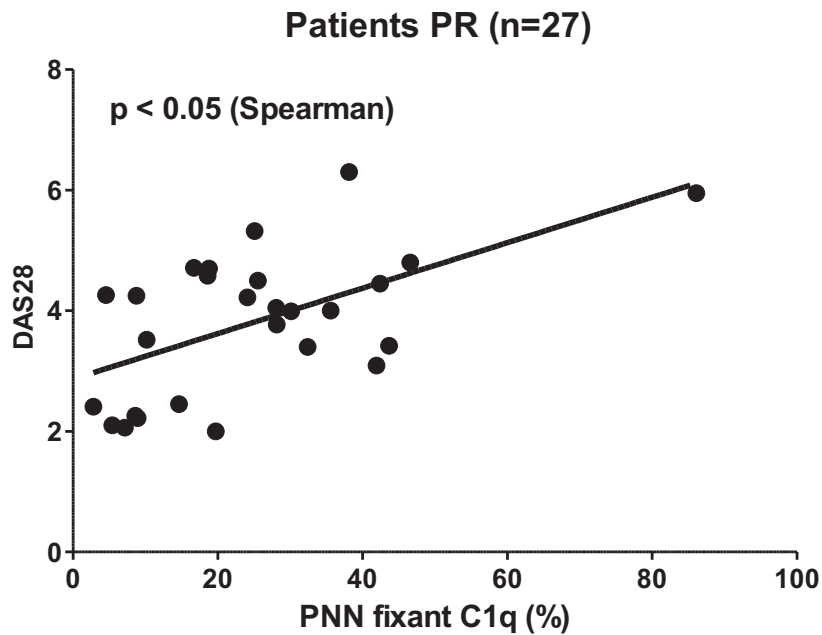


Figure 25: Corrélation entre la fixation de C1q sur les PNN et le DAS28

Les leucocytes totaux de 27 patients PR ont été obtenus après lyse des érythrocytes puis incubés ou non avec 25µg/ml de protéine C1q recombinante. Les cellules ont ensuite été marquées avec un Ac anti-C1q puis analysées par cytométrie en flux en sélectionnant les PNN à l'analyse. Les résultats obtenus ont été corrélés avec le DAS28 pour chaque patient. Test statistique : Spearman ($r = 0,447$)

Ainsi, nos résultats diffèrent des autres études réalisées dans des modèles de PR puisque nous rapportons pour la première fois que le C1q est nécessaire au développement des arthrites dans le modèle AEC. C1q pourrait donc être impliqué lors des phases précoces. L'importance du C1q dans le développement des arthrites est confortée par nos données chez les patients.

IV. ARTICLE n°4 :

TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen.

Dennis Lindau, Julie Mussard*, Armin Rabsteyn*, Matthieu Ribon, Ina Kötter, Annette Igney, Gosse J Adema, Marie-Christophe Boissier, Hans-Georg Rammensee, Patrice Decker.

* contribution égale

Ann Rheum Dis 2013, 73(12):2199-207

Les neutrophiles produisent de l'IFN- α en réponse à des ligands TLR9 et à de la chromatine, un auto-antigène majeur dans le lupus. La production induite par la chromatine est indépendante du TLR9 et est accompagnée de Nétose.

L'IFN- α est une cytokine clé dans la réponse antivirale. Sa contribution a aussi été établie dans certaines maladies auto-immunes comme le lupus(296) où elle est présente en forte concentration dans les séras de patients et pourrait contribuer à la rupture de tolérance en induisant la maturation des mDC. Dans la circulation, l'IFN- α est produite principalement par les pDC en réponse à une stimulation des TLR7 et TLR9 notamment. Dans le lupus, les principaux ligands conduisant à cette production par les pDC sont les CI composés d'ADN ou d'ARN(150). Or, les pDC représentent moins de 1% des leucocytes circulants du sang et des expériences *in vitro* de déplétion des pDC suggèrent l'existence d'autres sources d'IFN- α (297). Par exemple, il a été montré qu'une sous-population de PNN, les « low-density granulocytes » pouvaient sécréter de l'IFN- α chez les patients lupiques (sans avoir identifier les stimuli)(298) et que la Nétose pouvait induire la production de cette cytokine indirectement via l'engagement des pDC(91,299). De plus, il existe une signature IFN-I chez certains patients PR et la Nétose semble être forte dans la PR(116). Nous nous sommes donc intéressés à quelles pouvaient être les cellules productrices d'IFN- α dans un contexte sain ou pathologique (lupus, PR), en nous focalisant sur les neutrophiles, cellules fortement activées dans ces maladies. Nous avons aussi cherché à connaître quels étaient les ligands potentiellement inducteurs de cette production et si le TLR9 pouvait être impliqué dans ces mécanismes.

Ex vivo et sans stimulation, les leucocytes du sang ne sécrètent pas d'IFN- α , que ce soit parmi les PBMC ou parmi les granulocytes. Par contre, nous avons montré que, en plus des pDC et des monocytes, les PNN produisent de l'IFN- α en réponse à du CpG-ODN. Ceci a été retrouvé chez tous les types de donneurs (sains, lupus et PR) avec des individus plus ou moins répondeurs dans chaque groupe et en utilisant plusieurs techniques. Par ailleurs, cette production est accompagnée d'une activation des PNN, et peut être augmentée ou induite chez les donneurs non répondeurs par d'autres cytokines (G-CSF, GM-CSF) et par la co-culture avec des PBMC autologues.

Nous avons de la même manière montré que les PNN produisent de l'IFN- α en réponse à de la chromatine libre (ici du mononucléosome), un fort auto-Ag du lupus mais également présent dans les articulations de patients PR où il pourrait jouer un rôle pro-inflammatoire mais pas celui d'auto-Ag. Cette production est concentration dépendante, est augmentée chez

les donneurs non répondeurs par la co-culture avec des PBMC autologues mais n'est pas augmentée par du GM-CSF ou du G-CSF. La chromatine induit aussi la surexpression de senseurs de l'ADN ainsi que la Nétose des PNN. L'utilisation de souris TLR9-KO nous a permis de confirmer ces résultats et de démontrer que la sécrétion d'IFN- α par les PNN en réponse à la chromatine est indépendante du TLR9 contrairement au CpG-ODN. Ceci est en accord avec nos publications antérieures où nous avons démontré que la chromatine induit l'activation des PNN indépendamment du TLR9(247). Ceci pourrait expliquer l'effet du GM-CSF sur l'activité du CpG et non de la chromatine puisque nous avons montré qu'il induit la surexpression du TLR9.

Ces résultats sont importants car les PNN sont 100 fois plus nombreux dans le sang que les pDC, même s'ils produisent moins d'IFN- α . Ainsi, nos résultats suggèrent que les PNN ont la capacité de produire de l'IFN- α chez les donneurs sains et les patients et que l'évènement principal pour cette induction est la présence ou non du stimulus adéquat chez les patients *in vivo*.

Downloaded from ard.bmj.com on July 25, 2014 - Published by group.bmj.com



TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen

Dennis Lindau, Julie Mussard, Armin Rabsteyn, et al.

Ann Rheum Dis published online September 7, 2013
doi: 10.1136/annrheumdis-2012-203041

Updated information and services can be found at:

<http://ard.bmj.com/content/early/2013/09/07/annrheumdis-2012-203041.full.html>

These include:

Data Supplement

"Supplementary Data"

<http://ard.bmj.com/content/suppl/2013/09/07/annrheumdis-2012-203041.DC1.html>

References

This article cites 45 articles, 24 of which can be accessed free at:

<http://ard.bmj.com/content/early/2013/09/07/annrheumdis-2012-203041.full.html#ref-list-1>

P<P

Published online September 7, 2013 in advance of the print journal.

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Advance online articles have been peer reviewed, accepted for publication, edited and typeset, but have not yet appeared in the paper journal. Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

EXTENDED REPORT

TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen

Dennis Lindau,^{1,2} Julie Mussard,³ Armin Rabsteyn,¹ Matthieu Ribon,³ Ina Kötter,⁴ Annette Igney,⁴ Gosse J Adema,² Marie-Christophe Boissier,^{3,5} Hans-Georg Rammensee,¹ Patrice Decker^{1,3}

Handling editor Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-203041>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr P Decker, University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA4222, Li2P, 74 Rue Marcel Cachin, Bobigny 93017, France; patrice.decker@univ-paris13.fr

JM and AR contributed equally to this paper.

Received 27 November 2012

Revised 2 June 2013

Accepted 18 August 2013

ABSTRACT

Objectives Interferon (IFN) α is a key immunoregulatory cytokine secreted by activated plasmacytoid dendritic cells (PDC) that constitute less than 1% of leucocytes. IFN α plays an important role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). Nevertheless, the natural IFN α inducers in SLE as well as the different IFN α secreting cell types are only partially characterised.

Methods Chromatin was purified from calf thymus. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), neutrophils and mouse bone marrow neutrophils were purified and cultured with different stimuli. IFN α production was estimated by flow cytometry, ELISA and a bioassay, and gene expression by quantitative real time PCR. Neutrophil activation and NETosis were analysed by flow cytometry, ELISA and confocal microscopy.

Results Neutrophils produced a bioactive IFN α on stimulation with purified chromatin. IFN α secretion was observed with steady state neutrophils purified from 56 independent healthy individuals and autoimmune patients in response to free chromatin and not chromatin containing immune complexes. Chromatin induced IFN α secretion occurred independently of Toll-like receptor 9 (TLR9). Neutrophil priming by granulocyte-colony stimulating factor, granulocyte macrophage-colony stimulating factor or IFN α was not necessary but PBMC sustained IFN α secretion by neutrophils. PDC were 27 times more efficient than neutrophils but blood neutrophils were 100 times more frequent than PDC. Finally, neutrophil activation by chromatin was associated with NETosis and DNA sensor upregulation.

Conclusions Neutrophils have the capability of producing IFN α on selective triggering, and we identified a natural lupus stimulus involved, unveiling a new mechanism involved in SLE. Neutrophils represent another important source of IFN α and important targets for future therapies aimed at influencing IFN α levels.

INTRODUCTION

Chromatin is a key lupus autoantigen¹ organised in nucleosomes (repetitive packing units² with a core particle composed of 146 bp dsDNA and a histone octamer³). Apoptotic cells are sensed by peroxisome proliferator activated receptor delta⁴ and a defective clearance, as observed in lupus patients,⁵ leads to an excess of circulating chromatin and anti-nuclear autoimmunity. Interferon (IFN) α plays an

important role in the pathogenesis of several autoimmune diseases.⁶ Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune disease of unknown aetiology in which elevated serum IFN α concentrations⁷ contribute to the break of peripheral tolerance by inducing differentiation/activation of myeloid dendritic cells⁸ and natural T regulatory cell dysfunction.⁹ The resulting autoimmune response is mainly directed against chromatin¹⁰⁻¹¹ which is detected at higher concentrations in the plasma of SLE patients.¹² IFN α is secreted by activated plasmacytoid dendritic cells (PDC¹³) and is involved in SLE pathogenesis.¹⁴ Particularly, PDC activated by DNA/RNA containing immune complexes are believed to be the main producers of IFN α in SLE. This activation involves natural killer cells,¹⁵ is triggered by toll-like receptor (TLR) 9 or TLR7¹⁶⁻¹⁷ and hampers glucocorticoid activity in SLE.¹⁸ Moreover, serum IFN α activity is associated with autoantibody production.¹⁹ However, PDC represent a minor cell population accounting for less than 1% of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and blood PDC numbers are reduced in SLE patients.⁸ Moreover, PDC depletion experiments suggest that other cells produce IFN α in SLE,⁸ and type I IFN (IFN1) production occurs independently of Fc γ receptors in experimental mouse lupus.²⁰ On the other hand, neutrophils (polymorphonuclear leucocytes (PMN)) represent more than 50% of total blood leucocytes and thus are about 100 times more abundant than PDC. Only recently, a subset of proinflammatory PMN, named low density granulocytes, has been shown to produce IFN α in SLE patients but the natural stimulus has not been characterised.²¹ IFN α production was however not observed or was much lower on activation of steady state PMN. We therefore sought to determine the cellular source of IFN α and the natural lupus stimuli, focusing on PMN and chromatin. Granulocytes are indeed activated in SLE,²² and PMN form immunogenic neutrophil extracellular traps (NET) in SLE on activation with immune complexes.²³⁻²⁴ This mode of innate immunity,²⁵ named NETosis, indirectly leads to IFN α production via PDC activation. Therefore, PMN are usually not considered as IFN α producing cells. Moreover, IFN α induction by free chromatin would represent an early step, before antichromatin autoantibodies are produced,

To cite: Lindau D, Mussard J, Rabsteyn A, et al. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2012-203041

Basic and translational research

Our results indicate that PMN represent important targets for future therapies aimed at lowering IFN α levels in SLE.

MATERIALS AND METHODS

Chromatin purification

Mononucleosomes (HMGB1-free²⁶) were purified from calf thymus by ultracentrifugation onto sucrose gradients.^{27, 28} In this paper, chromatin refers to mononucleosomes (see online supplementary text).

Cell isolation and culture

Human (non-inflammatory) PMN and PBMC were freshly isolated by classic density centrifugation through dextran or Ficoll. Mouse PMN were enriched by positive selection for Ly-6G⁺ cells from the bone marrow of adult wild-type (WT) and TLR9 knockout (KO, H Wagner, Munich, Germany, described by Hemmi and colleagues²⁹) C57BL/6 mice (n=12) using magnetic beads (Miltenyi Biotec).

PMN were cultured in complete medium supplemented or not with monensin (BD Biosciences) and left in medium alone or stimulated, in the absence/presence of polymyxin B or cytokines. After 5 or 15 h, cell culture supernatants were harvested and cells were analysed by flow cytometry (see online supplementary text).

Flow cytometry

PMN were stained with specific monoclonal antibodies or the corresponding isotype controls (BD Biosciences, eBioscience, SouthernBiotech). For intracellular IFN α staining, PMN were first stained for surface markers, fixed and permeabilised with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) and incubated with anti-IFN α -PE (BD Biosciences) in saponin buffer (0.1%, Sigma) (see online supplementary text).

cDNA synthesis and quantitative real time PCR analysis

Total RNA was isolated and reverse transcribed into cDNA. mRNA levels were normalised to the low abundance housekeeping gene porphobilinogen deaminase mRNA levels (see online supplementary text).

NETosis

Induction of NET was estimated by confocal microscopy according to Brinkmann and colleagues,²⁵ with some modifications (see online supplementary text).

ELISA and type I IFN cell reporter system

See online supplementary text.

Statistical analysis

See online supplementary text.

RESULTS

PMN are important producers of IFN α in peripheral blood in response to chromatin

To identify new IFN α producing cells, we first analysed IFN α production by human leucocytes of healthy donors (HD). Cells were isolated by dextran centrifugation and the two layers containing either PMN (gate G1) or PBMC (gate G2, see online supplementary figure S1A–C) were harvested and pooled to obtain total peripheral blood leucocytes (PBL) depleted from platelets and erythrocytes. Cells were not tested *ex vivo* for intracellular IFN α , which would reflect *in vivo* PMN activation by any (unknown) stimulus, but only *in vitro* after culture as the aim was to prove that PMN produce IFN α on stimulation and

to identify the stimulus involved. Non-stimulated cells did not produce IFN α (figure 1A). In contrast, chromatin activated PMN (upper panel) strongly produced IFN α whereas low production was observed with PDC (middle panel). It should be noted that free chromatin and not chromatin containing immune complexes was used. Interestingly, even some chromatin activated monocytes (lower panel) did produce IFN α whereas production by lymphocytes was negligible (middle panel, CD123 negative cells in the lymphocyte gate). As a control, we excluded chromatin preparations containing endotoxins (see online supplementary figure S1D). We then compared the ability of the different cell populations to produce IFN α in response to several stimuli. In total PBL, we showed that the main cells producing IFN α were chromatin activated PMN as well as PMN activated by oligonucleotides containing unmethylated CpG sequences (CpG-ODN, a TLR9 agonist, figure 1B). CpG-ODN is however not a natural lupus stimulus in contrast with chromatin. Thus chromatin activated PMN were also important IFN α producers in addition to PDC. The latter are known as good producers in response to other lupus stimuli, especially immune complexes. When analysing each cell population independently, we verified that CpG activated PDC produce IFN α (see online supplementary figure S2).

PMN isolated from HD and SLE patients produce IFN α on activation with chromatin

We next confirmed the above results with isolated PMN instead of PBL. Moreover, we compared PMN isolated from HD and SLE patients. The purity of the cell population is shown in the online supplementary figure S1E. The complete phenotype is also shown in the online supplementary figure S1A–C (gate G1, upper panels). Both normal (figure 2A) and lupus (see online supplementary figure S3A) PMN produced IFN α in response to nucleosomes or CpG-ODN but not lipopolysaccharide (LPS), as shown by flow cytometry. IFN α production by PMN occurred in a nucleosome concentration dependent manner (figure 2B and see online supplementary figure S3B). Cell activation was confirmed by measuring interleukin 8 (CXCL8) secretion by ELISA (figure 2C and see online supplementary figure S3C). In addition to nucleosomes and CpG-ODN, LPS also induced interleukin 8 secretion in normal and lupus PMN, indicating that the lack of IFN α induction by LPS is not due to inefficient cell activation. More importantly, IFN α secretion by activated PMN was confirmed by ELISA (figure 2D and see online supplementary figure S3D). Nucleosomes induced IFN α secretion in normal and lupus PMN. No secretion was observed in the presence of LPS whereas CpG-ODN induced lower IFN α release than nucleosomes in both normal and lupus PMN.

To support our findings, IFN1 induction was analysed in isolated PMN at the mRNA level. Chromatin strongly upregulated IFN α and IFN β expression in a dose dependent manner (see online supplementary figure S4A, B). Moreover, we showed that IFN1 produced by PMN in response to chromatin was bioactive using a type I IFN cell reporter system (see online supplementary figure S4C).

We then screened HD and SLE patients (figure 3A, black bars) for chromatin induced IFN α production by isolated PMN. The response and intensity were similar in both groups but showed interindividual variability, indicating the existence of good responders and non-responders among HD and SLE patients. PMN did not produce IFN α in the absence of chromatin. Importantly, a similar proportion of donors with IFN α positive PMN on activation with chromatin was observed in HD (8/22, 36.4%) and SLE patients (4/12, 33.3%, $p=1.0$) with no

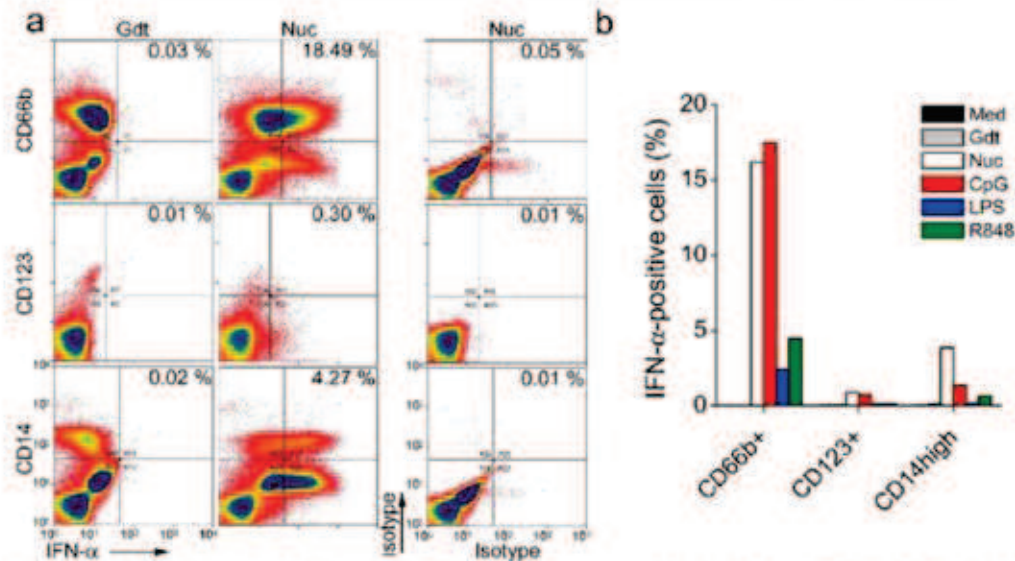


Figure 1 Chromatin activated polymorphonuclear leucocytes (PMN) are key leucocytes producing interferon α (IFN α). (A) Freshly isolated human peripheral blood leucocytes (PBL) were cultured with purified nucleosomes (Nuc 20 μ g/mL) or purification buffer (Gdt) in the presence of monensin. After 15 h, cells were harvested and stained for cell surface markers and intracellular IFN α on fixation/permeabilisation using specific monoclonal antibodies or the corresponding isotype controls (right panels). Cells were analysed by flow cytometry. The percentages of IFN α positive PMN (upper panels, CD66b⁺ cells), plasmacytoid dendritic cells (PDC) (middle panels, CD123⁺ cells) or monocytes (lower panels, CD14^{high} cells) are indicated. Percentages refer to PBL except for the middle panels where a lymphocyte gate was used to better distinguish PDC. Horizontal and vertical lines were set according to staining with isotype controls. (B) PBL were cultured in medium only (Med) or supplemented with the purification buffer, nucleosomes, the CpG-ODN 2006 (CpG), lipopolysaccharide (LPS), a toll-like receptor 4 (TLR4) ligand or R848 (a TLR7/8 ligand) and analysed as in (A). Results show the percentages of IFN α positive PMN (CD66b⁺), PDC (CD123⁺) and monocytes (CD14^{high}) in total PBL. The results show one representative experiment from five independent experiments using normal and systemic lupus erythematosus PBL and two different nucleosome preparations. The colour version of this figure is available online.

significant difference between the mean percentages of IFN α positive PMN. Non-inflammatory PMN from normal and SLE donors have therefore the ability to produce IFN α in response to chromatin.

As other blood components may influence IFN α production by PMN, we also analysed PMN in whole blood. For example, platelets can mediate proinflammatory reactions,^{30–31} especially in SLE.³² Therefore, we analysed whole blood from two HD for whom isolated PMN responded moderately to chromatin (see online supplementary text for definition, and see figure 3A, green bars, donor 21 being tested in two independent experiments) as well as five additional HD and SLE patients (blue bars). Whole blood was cultured in the presence/absence of nucleosomes. IFN α production was estimated by flow cytometry gating on PMN or PDC. Non-stimulated cells did not produce IFN α . In contrast, in all whole blood cultures from either HD or SLE patients (green and blue bars), nucleosomes stimulated PMN to produce IFN α (eight out of eight positive cultures, with 55–99% of the chromatin activated PMN producing IFN α in lupus cultures). The comparison with all cultures with isolated PMN (12 out of 34 positive cultures) indicates that PMN get help from other blood cells to efficiently produce IFN α ($p=0.0022$, excluding the duplicate of HD21). In particular, the percentage of IFN α producing PMN was increased in whole blood compared with isolated PMN (green bars compared with corresponding black bars). This effect was reproducible as whole blood from donor 21 was tested on two different dates.

In total, IFN α positive PMN were detected in 41.7% of HD (10/24) and 46.7% of SLE patients (7/15) by flow cytometry on activation with nucleosomes (figure 3A, $p=1.0$, normal vs SLE donors, with no significant difference between the mean percentages), excluding an intrinsic difference between normal and lupus PMN in IFN α production on exposure to chromatin. Accordingly, no correlation was observed between IFN α production, clinical disease severity of patients and therapy. To support this hypothesis, we also tested three additional patients suffering from another inflammatory autoimmune disease but not characterised by the presence of circulating nucleosomes—namely, rheumatoid arthritis. PMN isolated from these patients produced IFN α on stimulation with chromatin (see online supplementary figure S4D) and to the same extent as HD (see online supplementary figure S4C). The bioactive type I IFN was already detectable 5 h after stimulation. One of the key events is thus the presence of increased concentrations of circulating nucleosomes, a situation met particularly in vivo in SLE patients. IFN α producing PMN were observed in patients positive or negative for antichromatin autoantibodies, suggesting that activation was not mediated by chromatin containing immune complexes. The latter was confirmed by comparing IFN α induction in PMN by chromatin and heat aggregated IgG, which mimic immune complexes. In contrast with aggregated IgG, nucleosome induced IFN α was completely abolished on boiling (see online supplementary figure S5), indicating that immune complex formation is not required.

Basic and translational research

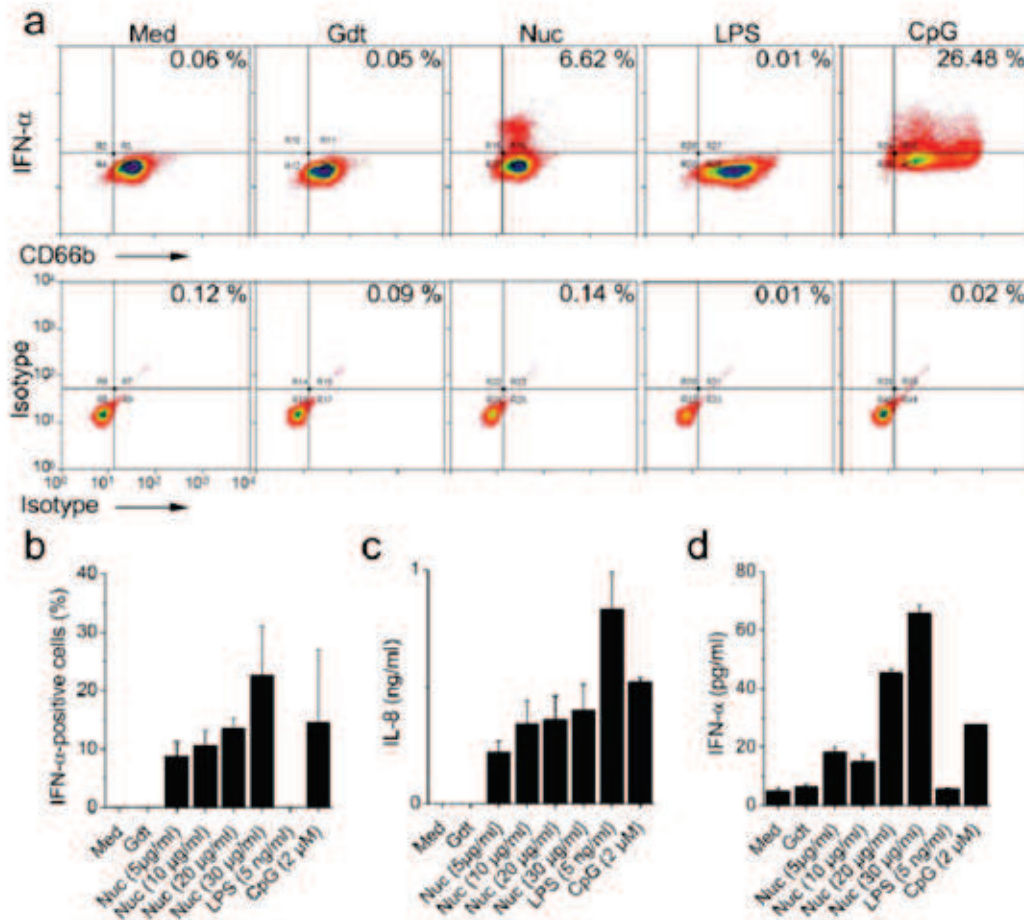


Figure 2 Isolated normal polymorphonuclear leucocytes (PMN) produce interferon α (IFN α) in response to chromatin or toll-like receptor 9 agonists. (A) PMN were freshly isolated from healthy donors and cultured with different stimuli (Nuc 5 μ g/ml). Cells were analysed by flow cytometry as in figure 1A. The upper and lower panels show cells double stained with monoclonal antibodies specific for IFN α and CD66b or the corresponding isotype controls, respectively. Numbers indicate the percentages of IFN α positive PMN (CD66b $^+$ cells). (B) Results from (A) (upper panel) are summarised and show several nucleosome concentrations. (C) The extent of PMN activation was estimated by measuring interleukin 8 (IL-8) secretion by ELISA. (D) IFN α secretion was confirmed by measuring the IFN α concentration in cell culture supernatants by ELISA. In (B–D), results are the mean of triplicates and SDs are indicated. Results show a representative healthy donor from 12 independent experiments using six different nucleosome preparations (except for (D), four independent experiments). See figure 1 for other abbreviations. The colour version of this figure is available online.

In contrast, in whole blood cultures derived from the three lupus patients, less than 17% (0% for patient No 14) of the PDC were IFN α positive in response to chromatin (figure 3A, red bars) and the percentages would be even lower if normalised to the amount of total leucocytes, as shown in figure 1B. Therefore, we compared IFN α production by isolated human blood PMN and PDC. As expected, PDC were much more efficient than PMN in producing IFN α at the single cell level (see online supplementary figure S6). As a mean, CpG-ODN activated PDC produced 27.2 times more IFN α than CpG-ODN activated PMN. However, blood PMN were about 100 times more frequent than PDC (see online supplementary figure S7). Therefore, the lower reactivity of PMN was largely compensated at the whole blood level.

In total, 56 independent blood donors were tested for chromatin induced IFN α production by PMN using different methods.

G-CSF, GM-CSF or IFN α do not act synergistically with chromatin on IFN α induction

To determine whether PMN priming is required, we next analysed the influence of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) on IFN α production by PMN in low responders. In such donors, non-activated PMN were IFN α negative whereas less than 20% of PMN produced IFN α in response to chromatin or CpG-ODN (figure 3B, orange bars). G-CSF and GM-CSF slightly increased the spontaneous release of the cytokine and usually had an additive effect on chromatin induced IFN α production by PMN. Therefore, PMN priming is not required but only enhances in some donors IFN α production in response to chromatin. In contrast, G-CSF and GM-CSF often acted synergistically with CpG-ODN. One explanation could be the known upregulation of TLR9 in PMN by GM-CSF and G-CSF which would facilitate CpG-ODN mediated PMN activation. Likewise,

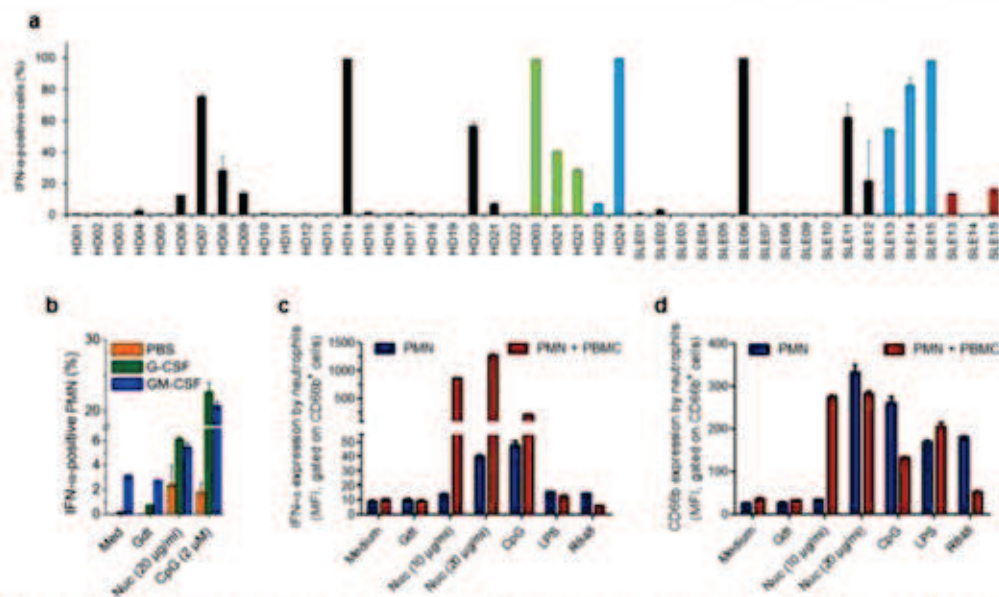


Figure 3 Independent blood donors were tested for chromatin induced interferon α (IFN α) production in polymorphonuclear leucocytes (PMN). (A) Isolated PMN (black bars) as well as PMN in whole blood (gated on CD66b⁺ cells, green and blue bars) from healthy donors (HD) and systemic lupus erythematosus (SLE) patients were activated with 20 μ g/mL of nucleosomes and the percentage of IFN α producing PMN was estimated by flow cytometry, as in figure 2A. Each bar represents a donor tested in triplicate. Green bars (whole blood) represent donors for whom isolated PMN responded moderately to chromatin (donor HD21 was tested twice in independent experiments). Blue bars represent additional donors tested only in whole blood cultures. As a comparison, the percentage of IFN α producing plasmacytoid dendritic cells (PDC) in whole blood cultures was determined in three SLE patients in response to nucleosomes (red bars). Results regarding PDC are not normalised to the total cell number but are percentages of PDC. (B) Isolated normal PMN were preincubated in medium supplemented with phosphate buffered saline (PBS), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) or granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and then activated with different stimuli. PMN were analysed as in (A). (C, D) Normal PMN were cultured alone or cocultured with peripheral blood mononuclear cells in the presence of different stimuli and the extent of IFN α production (C) and CD66b expression (D) by PMN was estimated by flow cytometry. Non-activated PMN did not produce IFN α . Results are the mean of triplicates and SDs are shown. In (A), results are from 22 independent experiments using 12 different nucleosome preparations. In B–D, representative results are from three independent experiments. MFI, mean fluorescence intensity. See figure 1 for other abbreviations. The colour version of this figure is available online.

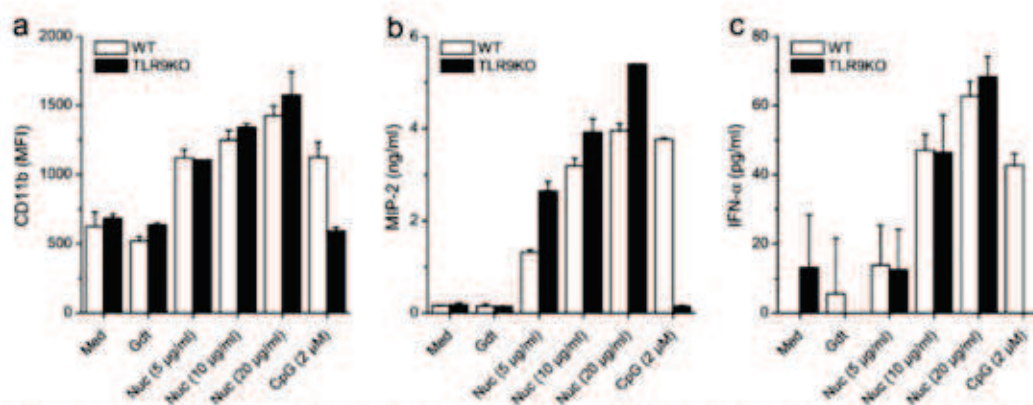


Figure 4 Chromatin triggered interferon α (IFN α) production occurs independently of toll-like receptor 9 (TLR9) in polymorphonuclear leucocytes (PMN). (A–C) PMN were purified from the bone marrow of wild-type and TLR9 knockout (KO) mice and cultured with different stimuli. Cell activation was estimated by measuring CD11b expression on Ly-6G^{high} cells by flow cytometry (A) and by measuring macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) secretion by ELISA (B). IFN α secretion was estimated by ELISA (C). Two mice were used per group (PMN were pooled) and per experiment. The experiment was performed three times ($n = 12$ mice). SDs are shown. The CpG-ODN 1826 was used. See figure 1 for other abbreviations. The colour version of this figure is available online.

Basic and translational research

IFN α production was only slightly enhanced when PMN were activated by nucleosomes in the presence of IFN α (see online supplementary figure S8).

PBMC sustain IFN α production by PMN in low responders

To determine whether in some cases PMN need help from other leucocytes to produce IFN α on activation with chromatin, we compared isolated PMN with cocultures of PMN and autologous PBMC (1:1 ratio, defined as PBL). To estimate the extent of cytokine production, we measured by flow cytometry IFN α mean fluorescence intensity, gating on PMN. In all cultures, the amount of IFN α positive PMN in the absence of stimulation was below 1% of the total PMN. For some donors, nucleosome induced IFN α production was strongly increased in PMN in the presence of PBMC. In the data presented (figure 3C), PMN in the PBL coculture were strongly activated by nucleosomes or CpG-ODN and produced larger amounts of IFN α , particularly in response to nucleosomes, than isolated PMN, as demonstrated by the large IFN α mean fluorescence intensity (61-fold increase with 10 μ g/mL nucleosomes in cocultures), indicating that PBMC strengthen IFN α production by classic PMN in low responders (PMN non-responders remained non-responders when tested in cocultures with PBMC). This cellular cooperation was also observed when we estimated cell activation by measuring CD66b expression by PMN (figure 3D) but was limited to low nucleosome concentrations and was not detected with CpG-ODN.

TLR9 is not required in PMN for chromatin induced IFN α secretion

The role of TLR9 in SLE development is still unclear. TLR9 is activated by unmethylated CpG motifs present in pathogen derived DNA.²⁹ Nevertheless, TLR9 is able to recognise mammalian DNA and even self DNA when DNA has access to TLR9.³³ As nucleosomes are composed of DNA and because the impact of TLR9 in IFN α secretion by PMN has never been investigated, we analysed the role of TLR9 in nucleosome induced IFN α production. Double stranded DNA has been reported to induce IFN α independently of all TLR³⁴ but the pathway triggered by nucleosomes, in which DNA is protected by histones, is unknown. We first verified that mouse PMN do produce and secrete IFN α on activation with different stimuli (detailed in online supplementary figure S9). Then we compared PMN purified from WT and TLR9-KO mice. The phenotype and purity are depicted in the online supplementary figure S10. Nucleosomes induced clear activation of both WT and TLR9-KO PMN, as estimated by CD11b upregulation (figure 4A) and macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) secretion (figure 4B). As expected, CpG-ODN only activated WT PMN. Importantly, nucleosomes induced IFN α secretion by mouse PMN (figure 4C) and independently of TLR9 as it was observed in WT and TLR9-KO PMN. In contrast, CpG-ODN only induced IFN α secretion by WT PMN. TLR9 independence was confirmed with human PMN (see online supplementary figure S11).

Chromatin induced PMN activation is associated with DNA sensor upregulation and leads to NETosis

As some DNA sensors have been suggested to contribute to lupus pathogenesis,^{35–37} we next analysed the consequences of chromatin mediated PMN activation on the gene expression of several sensors. Indeed, some cytoplasmic DNA sensors activate IFN α responses. Interestingly, although chromatin activated PMN in a TLR9 independent manner, chromatin strongly upregulated TLR9 as well as AIM2 (absent in melanoma 2), STING

(stimulator of IFN genes) and DAI (DNA-dependent activator of IFN regulatory factors, at a lower extent) at the mRNA level (figure 5A–D) whereas RNA sensors melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA-5) and retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1) were not upregulated (see online supplementary figure S12).

Finally, NETosis has been shown to trigger IFN α production by PDC (summarised in online supplementary figure S13). Enhanced NETosis may therefore amplify the PMN response and may sustain IFN α production. We thus investigated whether free chromatin also directly induced NETosis. PMN form large NET in response to chromatin compared with non-activated PMN (figure 5E), as demonstrated by the release of the typical chromatin fibres on staining of both DNA and histones. As a control, chromatin used as a stimulus was not stained in the absence of PMN, proving that the NET detected originated from activated PMN.

DISCUSSION

Circulating chromatin induces IFN α production in non-inflammatory PMN, the major PMN population, in both HD and autoimmune patients and in a TLR9 independent manner. IFN α production has been demonstrated at the mRNA and protein levels and as a secreted and bioactive form. Although both normal and lupus PMN are potentially able to produce IFN α in response to chromatin *in vitro*, IFN α production by PMN may only be triggered *in vivo* in patients when concentrations of circulating chromatin are elevated. Actually, plasmas from SLE patients (and not from HD) activate PMN in a nucleosome dependent manner.³⁸ Importantly, IFN α plays a pivotal role in SLE development, as demonstrated by the IFN inducible gene expression signature³⁹ which characterises a clinical subset of SLE patients with more severe disease. This is the first report demonstrating that steady state PMN secrete IFN α and identifying concurrently a major natural lupus stimulus involved, suggesting an initiating role for PMN in SLE pathogenesis. To date, only chromatin containing immune complexes, and not free chromatin (even associated with HMGB1), have been reported to induce IFN α secretion in PDC⁴⁰ and this information is not available for PMN. PMN have been reported to favour IFN α production^{23, 24} but, in contrast with the present data, this mechanism requires autoantibodies and priming by IFN α and therefore occurs after the break of tolerance. Another difference is the involvement of TLR9 in the latter two studies, leading to IFN α production by PDC and not PMN. Nevertheless, a common feature is the formation of NET by activated PMN, which is associated with lupus development on inefficient clearance.⁴¹ Although NETosis is not the IFN inducing factor in our system, it may be involved in a positive feedback loop. Chromatin activated PMN are potentially important IFN α producers in SLE patients and may secrete IFN α early during the disease, before immune complexes are produced (as detailed in online supplementary figure S13), bypassing the classic mechanism requiring the induction of autoantibodies and the formation of immune complexes activating PDC. This pathway does not exclude the known mechanism involving PDC but suggests that PMN have not been considered as another important source of IFN α in SLE. Even if PMN secrete lower amounts of IFN α than PDC at the single cell level, the total amount of IFN α released by PMN should be compensated by the 100-fold excess of circulating PMN compared with PDC. Further studies are required to characterise non-responders (to determine for example if the absence of IFN α production

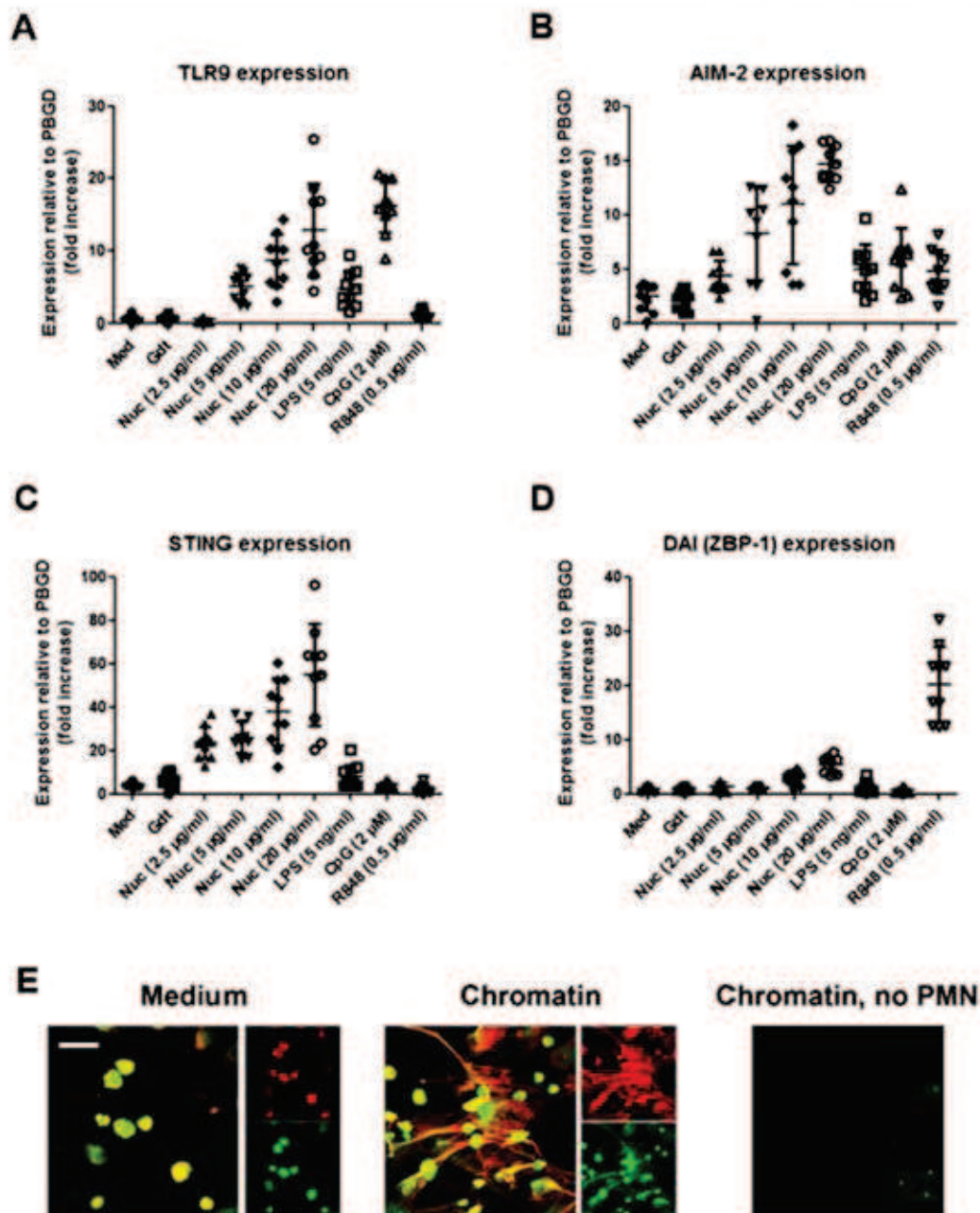


Figure 5 Chromatin stimulates DNA sensor upregulation in polymorphonuclear leucocytes (PMN) and NETosis. PMN were isolated from 10 independent healthy donors and cultured with different stimuli. TLR9 (toll-like receptor 9) (A), AIM2 (absent in melanoma 2) (B), STING (stimulator of IFN genes) (C) and DAI (DNA dependent activator of IFN regulatory factors, at a lower extent) (D) gene expression was analysed at the mRNA level by quantitative real time PCR. mRNA levels were normalised to porphobilinogen deaminase mRNA levels and were compared using a Student's *t* test or a Mann-Whitney rank sum test. The results are depicted as fold increase (each dot represents one donor) with mean±SD. *p*<0.05 for all stimuli (A, B), all Nuc (C), Nuc 10, Nuc 20 and R848 (D). (E) Normal human PMN were cultured in medium alone (left) or with chromatin (middle) and the formation of neutrophil extracellular traps was estimated by confocal microscopy on staining of DNA (green) and histones (red). The individual channels and the merged signals are shown. To verify staining specificity, chromatin was incubated in medium in the absence of PMN and stained under the same conditions (right). The merged signal is shown. The bar represents 10 µm. One representative experiment of two is shown. See figure 1 for other abbreviations. The colour version of this figure is available online.

depends on polymorphisms in the nucleosome receptor gene, once identified, or whether additional factors influence IFN α production) and to identify the pathway triggered.

To our knowledge, this is also the first study analysing the role of TLR9 in IFN α secretion by PMN. Several new DNA receptors have been reported but the nucleosome sensor has not

Basic and translational research

been identified to date. For example, the IFN inducible HIN-200 proteins regulate responses to cytoplasmic dsDNA, among which p202 (a candidate lupus susceptibility factor in mice) represses whereas AIM2 promotes the response to cytoplasmic DNA and leads to activation of the inflammasome and cell death.⁴² Interestingly, expression of p202 and AIM2 are inversely correlated, and the p202 protein inhibits the formation of the inflammasome, favouring chronic innate immune responses.⁴³ Nevertheless, only some of those DNA receptors are involved in IFN1 induction (eg, STING⁴⁴). So far, we showed that some DNA sensors are upregulated by nucleosomes but, except for TLR9, we do not know whether they are required for nucleosome recognition or signalling. We also confirmed that TLR9 expression is modulated in response to non-TLR9 ligands. Similarly, we have reported that TLR9 is upregulated at the protein level by non-TLR9 agonists.³⁸ Chromatin may thus pre-activate PMN in SLE for a further activation by agonists of TLR9 or other DNA sensors.

In conclusion, we have identified a natural lupus stimulus able to induce IFN α production in non-inflammatory PMN in addition to PDC, suggesting that targeting PDC might not abolish the lupus IFN signature. Chromatin activated PMN may also be important targets for therapies aiming to control IFN α secretion,⁴⁵ a key pathogenic event in SLE, especially at the early stages of the disease.

Author affiliations

¹Department of Immunology, University of Tübingen, Institute for Cell Biology, Tübingen, Germany

²Department of Tumour Immunology, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands

³University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA4222, L2P, Bobigny, France

⁴Internal Medicine II, University Hospital, Tübingen, Germany

⁵Rheumatology Department, AP-HP, Avicenne Hospital, Bobigny, France

Acknowledgements We thank Professor Hermann Wagner (Munich, Germany) for the gift of TLR9-KO mice and Dr Xavier Guilloit (Rheumatology Department, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France) for analysing the clinical data. We are grateful to Professor Bruce Beutler (The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA) for the gift of the reporter cells used to quantify IFN1.

Contributors DL performed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. JM, AR and MR performed the experiments and analysed the data. IK and AI recruited the patients and analysed the data. GA, M-CB and H-GR analysed the data. PD designed the project, performed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Funding This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, DE 879/1-1 and DE 879/1-2), the Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung Tübingen (IZKF-Nachwuchsgruppe, 1604-0-0 and 1604-0-1) and the Fritz-Thyssen Foundation to PD, and by the University of Paris 13 and Inserm. Part of the research of DL was performed within the framework of project D1-101 of Top Institute Pharma.

Competing interests None.

Ethics approval The study was approved by the University of Tübingen.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- 1 Mohan C, Adams S, Stanik V, et al. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med* 1993;177:1367-81.
- 2 Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 1975;4:281-300.
- 3 Luger K, Mader AW, Richmond RK, et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;389:251-60.
- 4 Mukundan L, Odgaard JI, Morel CR, et al. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med* 2009;15:1266-72.
- 5 Erbacher AI, Rönnelidh VM, Decker P. Circulating nucleosomes due to a defective clearance of dying cells: consequences for systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2007;40:311-4.

- 6 Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006;25:383-92.
- 7 Preble OT, Black RJ, Friedman RM, et al. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 1982;216:429-31.
- 8 Blanco P, Palucka AK, Gill M, et al. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001;294:1540-3.
- 9 Le Buanec H, Gougeon ML, Mathian A, et al. IFN-alpha and CD46 stimulation are associated with active lupus and skew natural T regulatory cell differentiation to type 1 regulatory T (T1) cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:18995-9000.
- 10 Lu L, Kallisperumal A, Boumpas DT, et al. Major peptide autoepitopes for nucleosome-specific T cells of human lupus. *J Clin Invest* 1999;104:345-55.
- 11 Chabre H, Amoura Z, Piette JC, et al. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995;38:1485-91.
- 12 Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* 1990;86:69-74.
- 13 Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835-7.
- 14 Rozzo SJ, Allard JD, Choubey D, et al. Evidence for an interferon-inducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 2001;15:435-43.
- 15 Hagberg N, Berggren O, Leonard D, et al. IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1beta and LFA-1. *J Immunol* 2011;186:5085-94.
- 16 Barat FJ, Meeker T, Gregorio J, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;202:1131-9.
- 17 Means TK, Latz E, Hayashi F, et al. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 2005;115:407-17.
- 18 Guiducci C, Gong M, Xu Z, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* 2010;465:937-41.
- 19 Weckerle CE, Franek BS, Kelly JA, et al. Network analysis of associations between serum interferon-alpha activity, autoantibodies, and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011;63:1044-53.
- 20 Lee PY, Kumagai Y, Li Y, et al. TLR7-dependent and Fc-gammaR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *J Exp Med* 2008;205:2995-3006.
- 21 Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol* 2010;184:3284-97.
- 22 Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003;197:711-23.
- 23 Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73ra20.
- 24 Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73 ra19.
- 25 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5.
- 26 Rönnelidh VM, Erbacher AIM, Lamkemeyer T, et al. TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2006;177:7740-9.
- 27 Stemmer C, Richalet-Secordel P, van Bruggen M, et al. Dual reactivity of several monoclonal anti-nucleosome autoantibodies for double-stranded DNA and a short segment of histone H3. *J Biol Chem* 1996;271:21257-61.
- 28 Decker P, Singh-Jasuja H, Haager S, et al. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol* 2005;174:3326-34.
- 29 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5.
- 30 Herin V, Slupsky JR, Graf M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-4.
- 31 Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003;19:9-19.
- 32 Duffau P, Seneschal J, Nicco C, et al. Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2010;2:47ra63.
- 33 Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006;7:49-56.
- 34 Ishii KJ, Coban C, Kato H, et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 2006;7:40-8.
- 35 Zhang W, Cai Y, Xu W, et al. AIM2 facilitates the apoptotic DNA-induced systemic lupus erythematosus via arbitrating macrophage functional maturation. *J Clin Immunol* 2013;33:925-37.

- 36 Zhang W, Zhou Q, Xu W, *et al*. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI) promotes lupus nephritis by activating the calcium pathway. *J Biol Chem* 2013;288:13534–50.
- 37 Ahn J, Gutman D, Saijo S, *et al*. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:19386–91.
- 38 Lindau D, Rönnefarth V, Erbacher A, *et al*. Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* 2011;41:669–81.
- 39 Baechler EC, Battiwalla FM, Karypis G, *et al*. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2610–5.
- 40 Urbonaviciute V, Furrrohr BG, Meister S, *et al*. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med* 2008;205:3007–18.
- 41 Hakkim A, Furrrohr BG, Amann K, *et al*. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:9813–8.
- 42 Roberts TL, Idris A, Dunn JA, *et al*. HM-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 2009;323:1057–60.
- 43 Panchanathan R, Duan X, Shen H, *et al*. Aim2 deficiency stimulates the expression of IFN-inducible β 202, a lupus susceptibility murine gene within the Nba2 autoimmune susceptibility locus. *J Immunol* 2010;185:7385–93.
- 44 Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009;461:788–92.
- 45 Meyer O. Interferon-alpha as a treatment target in systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* 2012;79:113–16.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Les neutrophiles expriment un TLR9 de surface fonctionnel

A. Les neutrophiles et le TLR9

Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées sur les sites inflammatoires. Ils jouent un rôle clé dans la lutte contre les pathogènes et peuvent aussi faire le lien entre immunité innée et adaptative par leur interaction avec les DC. Lorsqu'elle est incontrôlée, l'activation de ces cellules peut aussi aboutir à des dommages tissulaires voire à des phénomènes d'auto-immunisation. D'ailleurs, il a été montré que les NET de patients PR exposent des Ag citrullinés impliqués dans la pathologie(116) et que les NET pourraient participer à l'auto-immunisation présente dans le lupus(91,299). Les PNN possèdent un attirail d'outils de lutte contre les pathogènes ; ils expriment notamment tous les TLR (sauf le TLR3) leur permettant de reconnaître la plupart des bactéries et virus. On peut aisément émettre l'hypothèse que la reconnaissance inappropriée d'Ag (PAMP ou dérivés du soi) par les TLR, par exemple sous forme de NET, peut favoriser une trop forte inflammation ou une auto-immunisation induite par les PNN. Le TLR9 est décrit comme un récepteur de l'ADN viral et bactérien séquestré dans les compartiments endolysosomiaux afin d'éviter la reconnaissance d'Ag du soi. Néanmoins, de plus en plus d'études tendent à émousser ces dogmes, tant du point de vue des ligands reconnus que de la localisation de ce récepteur.

Les PNN expriment le TLR9 endosomal et répondent aux ligands TLR9, ce qui conduit à la sécrétion de cytokines et à la surexpression du CD11b. Jusqu'à ce jour, peu d'études se sont attardées sur la localisation subcellulaire du TLR9 dans les cellules primaires, et aucune ne concerne les neutrophiles. De plus, la fonctionnalité de ce TLR9 de surface n'a pas été démontrée dans ces études. Une seule publication a montré que le TLR9 à la surface des LB pourrait agir comme un régulateur négatif du TLR9 endosomal(229) et ce travail a été publié après le notre.

B. Expression du TLR9 à la surface des neutrophiles

La courte durée de vie des neutrophiles primaires et leur extrême activabilité rendent difficiles l'étude de ces cellules. C'est pourquoi le traitement des échantillons nécessite un temps court entre le prélèvement et l'analyse (maximum 20 heures) et un minimum de manipulations. L'étude des différentes populations leucocytaires d'un même prélèvement de sang humain nous a permis de montrer pour la première fois que les PNN primaires expriment le TLR9 à leur surface *ex vivo* (utilisation d'un Ac anti-TLR9, clone 5G5 en cytométrie en flux). De plus, par la même technique nous avons confirmé que les LB et les monocytes expriment bien un TLR9 de surface. Nous avons aussi montré que les LT, les NK et les NKT sont dépourvus de cette expression. Toutes les cellules analysées expriment un TLR9 intracellulaire et l'expression du TLR9 de surface est moins forte que celle-ci. Afin de déterminer quelle forme du TLR9 était exprimée à la surface des neutrophiles, nous avons utilisé les propriétés d'un autre clone d'Ac (26C593) qui reconnaît uniquement la fraction N-ter du TLR9, qui sera clivée lors du processing de ce récepteur, sauf si elle est associée à la forme active du TLR9, comme cela a été montré pour le TLR9 intracellulaire uniquement. Cette fraction ne possédant pas de domaine transmembranaire ne devrait pas être localisée à la membrane si le TLR9 est dans sa forme active processée. Nous avons montré par cytométrie en flux que ce clone ne reconnaît pas ou très peu le TLR9 à la surface des neutrophiles, suggérant que ce récepteur est principalement dans sa conformation active. Cet Ac a aussi été utilisé par l'équipe de Christophe Jamin en 2014 qui a étudié l'expression du TLR9 à la surface des LB(229). Cette étude révèle que le TLR9 à la surface des LB se trouve principalement dans sa forme processée mature, comme nous l'observons pour les neutrophiles. Par ailleurs, nous avons dû montrer la spécificité du clone 26C593 pour le TLR9 par western-blot (Annexe 1 : figure supplémentaire 1 de l'article n°1), confirmant ainsi les résultats obtenus. Nous avons aussi montré que l'expression du TLR9 de surface est modulable par d'autres ligands TLR (4/7/8/9) ou par du nucléosome. En revanche, contrairement au TLR9 endosomal, l'expression du TLR9 de surface n'est pas induite par le GM-CSF. Tous ces ligands induisent en parallèle l'activation des PNN, ce qui laisse supposer que l'activation des PNN est associée à une surexpression du TLR9.

De manière complémentaire chez la souris, nous avons montré que le TLR9 est localisé à la surface des neutrophiles Ly6G⁺ issus de moelle osseuse. Grâce à l'utilisation de souris n'exprimant pas le TLR9, nous avons pu montrer que ce marquage est spécifique de ce récepteur car ni l'Ac anti-TLR9 5G5, ni le ligand CpG ne se fixe sur les cellules de souris TLR9-KO.

C. Fonctionnalité du TLR9 à la surface des neutrophiles

Avant la publication de notre travail, plusieurs études ont fait état de l'expression d'un TLR9 de surface sur d'autres types cellulaires mais aucune n'a prouvé sa fonctionnalité. Ici, nous avons montré, par cytométrie en flux et microscopie confocale, que les neutrophiles primaires humains et de souris sont capables de lier le ligand synthétique du TLR9. L'emploi de deux techniques différentes et l'utilisation de cellules provenant de deux espèces animales renforcent nos observations.

Néanmoins, nous savons que d'autres molécules que le TLR9, notamment la protéine DEC-205(257) ou le CD14(300), peuvent reconnaître les CpG-ODN à la surface cellulaire et participer à la prise en charge de ce ligand. Cependant, les PNN exprimant peu le CD14 (MFI) et pas de DEC-205, nous pouvons exclure l'hypothèse que la fixation du CpG-ODN à la surface des PNN soit due à ces protéines. De plus, la pureté de nos préparations (95%) et l'analyse par cytométrie en flux de la population neutrophile uniquement éliminent l'hypothèse d'une contamination par des monocytes ou des DC exprimant ces protéines. Surtout, les PNN de souris TLR9-KO ne fixent pas le CpG-ODN.

Contrairement à l'étude initiée par l'équipe de C. Jamin publiée ultérieurement à la notre(229), nous avons observé que les LB humains sont capables de lier le CpG-ODN de type B. En effet, les auteurs de cette étude affirment que le TLR9 à la surface des LB n'est pas capable de lier ce ligand. Cette dernière conclusion me semble trop sévère car leurs expériences montrent une fixation concentration-dépendante du CpG-ODN à la surface des LB (cytométrie en flux) même si la co-localisation de ce ligand avec le TLR9 de surface est faible (microscopie confocale). Ces résultats me semblent cohérents avec ceux observés dans notre étude où le signal à la surface des LB est faible mais présent.

La mise en évidence d'une fixation du ligand TLR9 à la surface des neutrophiles ne suffisant pas à démontrer sa fonctionnalité, nous avons étudié plus en profondeur la capacité de ce récepteur à activer les PNN en nous assurant que seule la fraction de surface était responsable de l'activation. Dans un premier temps, nous avons immobilisé par traitement UV du CpG-ODN couplé au fluorochrome FITC sur une plaque de culture en nitrocellulose afin que ce ligand n'atteigne pas l'endosome. Nous avons noté que l'activation des PNN par le ligand immobilisé est faible mais significativement augmentée (sécrétion d'IL-8). Plusieurs explications sont possibles à ce phénomène et peuvent être additionnels:

- le TLR9 de surface serait moins efficace pour l'activation des PNN que la fraction endosomale

- les plaques de nitrocellulose ne sont pas idéales pour la culture des PNN (activation plus faible que dans des plaques standard même avec d'autres stimuli)

- une faible quantité de CpG-ODN est immobilisée sur les plaques après traitement UV (quantité sub-optimale).

Malgré ces problèmes surtout techniques, nous avons démontré ici que les CpG-ODN n'atteignent pas l'endosome et que l'activation des PNN par ce ligand immobilisé est dépendant du TLR9 de surface. L'utilisation de chlorure d'ammonium (AC), un inhibiteur de l'acidification de l'endosome, nous a permis d'affirmer que le CpG-ODN immobilisé se lie uniquement à la surface des PNN. Dans le même but, nous avons utilisé différents autres inhibiteurs de l'acidification de l'endosome sur des préparations de PNN cultivés cette fois ci avec des ligands libres. Chaque inhibiteur utilisé possède ses propres caractéristiques mais ciblent tous l'endolysosome. Certains sont des bases faibles (AC et chloroquine (CQ)) et d'autres inhibent les pompes à proton ATPases des vacuoles lysosomales (bafilomycine A1) ce qui empêche l'acidification et la maturation de l'endosome. L'utilisation de la CQ n'est pas idéale pour l'inhibition du TLR9 endosomal car elle possède d'autres particularité : la CQ bloque l'interaction entre le TLR9 et son ligand(272) et masque les acides nucléiques. Ainsi, la CQ n'agit pas uniquement sur l'inhibition du TLR9 endosomal mais potentiellement aussi sur le TLR9 de surface. Quoi qu'il en soit, l'utilisation de tous ces inhibiteurs (particulièrement la bafilomycine A1 et l'AC) montrent que, contrairement aux PBMC (Annexe 1 : figure supplémentaire 5 de l'article n°1), les neutrophiles répondent au ligand TLR9 bien que la fraction endosomale soit inhibée. Ainsi le TLR9 à la surface des neutrophiles est fonctionnel.

Un article publié au même moment que notre étude montre que, dans l'endosome, la partie N-ter du TLR9 reste associée au TLR9 processé dans les DC de souris(227). Ce fragment semble essentiel pour l'activation du TLR9 dans l'endosome. Ces chercheurs ont aussi démontré que les DC issues de rates expriment un TLR9 de surface reconnu par un Ac détectant uniquement la partie N-ter. Etonnamment, un autre Ac spécifique cette fois ci de la forme « full-length » et du complexe « forme processée + fraction N-ter » dans l'endosome ne reconnaît pas ce TLR9 de surface. Pour ces chercheurs, ce TLR9 de surface n'est pas dans sa forme processée active. La raison pour laquelle le deuxième Ac ne le reconnaît pas viendrait du fait qu'il adopte probablement une conformation différente de la fraction endosomale

quand il est exprimé à la surface des DC. Cette conformation pourrait être un moyen d'inhiber le TLR9 de surface et de restreindre ainsi les phénomènes délétères dus à cette expression. Il est à noter que dans cette étude réalisée chez la souris, tous ces Ac sont « faits maison » et donc différents de ceux que nous avons utilisés. Dans notre étude, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que le TLR9 adopte une conformation différente quand il est exprimé à la surface des neutrophiles comparé à l'endosome, bien qu'il soit reconnu par l'Ac 5G5 et non reconnu par le 26C593. Il est aussi possible que ce TLR9 de surface soit une isoforme du TLR9 endosomal. Il serait intéressant d'étudier cette hypothèse et de voir éventuellement s'ils sont codés par le même gène et s'ils reconnaissent les mêmes ligands. De plus, quelques études suggèrent que le TLR9 est exprimé à la surface cellulaire de manière transitoire lors de son adressage(203). Il n'est pas exclu que l'on détecte une partie de ce TLR9 en cours d'adressage bien que ce TLR9 semble être dans sa forme « full-length »(232). Quelles que soient ses caractéristiques structurales, le TLR9 à la surface des neutrophiles primaires est fonctionnel pour les ligands testés.

D. Conséquences de l'expression du TLR9 à la surface des neutrophiles.

L'expression du TLR9 à la surface des cellules peut avoir des conséquences sur la reconnaissance d'Ag et sur l'inflammation. En effet, lorsqu'il est artificiellement exprimé à la surface de cellules de lignées transformées (mutation de son domaine transmembranaire), il reconnaît des ligands classiques et d'autres ligands non accessibles au TLR9 endosomal car normalement dégradés avant d'atteindre ce compartiment cellulaire(234). De plus, le transfert adoptif de cellules souches hématopoïétiques exprimant ce TLR9 muté induit une inflammation systémique fatale aux souris receveuses (notamment par la présence de TNF- α systémique). Une autre étude a montré que l'expression artificielle d'un TLR9 à la surface de macrophages humains induisait une reconnaissance d'ADN du soi(212). Ces études fournissent des éléments importants mais ne représentent pas la réalité *in vivo/ex vivo* car elles sont basées sur des modèles artificiels. Dans notre étude, le TLR9 à la surface des PNN reconnaît *ex vivo* son ligand synthétique et induit la sécrétion d'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire. Cette activation via le TLR9 de surface sur ces cellules pourrait être une solution de secours à l'activation des PNN lorsque les ligands n'ont pas accès à l'endosome ou quand le TLR9 est résistant à l'activation (seuil), mais pourrait aussi être délétère dans d'autres circonstances. Une des perspectives de ce travail serait de tester d'autres ligands du TLR9 (ou même des ligands non reliés au TLR9) dans les mêmes conditions (ADN dérivés de

pathogènes, de mammifère, ou DAMP) afin de voir si le TLR9 à la surface des PNN se comporte de la même manière que la fraction endosomale, ou s'il est capable de reconnaître des ligands différents. C'est dans cette idée que nous avons mesuré l'expression du TLR9 à la surface des PNN de patients PR (Article n°2, figure 20). Dans le cas où il reconnaîtrait des ligands endogènes, le TLR9 de surface pourrait participer à la reconnaissance d'Ag du soi typiques des maladies auto-immunes. A ce propos, dans notre étude, nous avons montré que le nucléosome, un auto-Ag du lupus qui active les PNN indépendamment du TLR9 endosomal(247), induit la surexpression de ce récepteur de surface. Il semblerait que cet auto-Ag ait les mêmes capacités d'induction de l'expression du TLR9, quelque soit la localisation de ce récepteur.

II. Implication du TLR9 dans le développement de l'arthrite chez la souris et à un stade avéré de l'inflammation dans la polyarthrite rhumatoïde

A. Conséquences de l'absence du TLR9 dans l'AEC

1. Le modèle animal

Dans notre étude, nous avons utilisé des souris C57BL/6 déficientes pour le gène TLR9, créées par l'équipe d'Akira(211). Ces souris, souvent utilisées dans des modèles d'infection, ne présentent pas de phénotype particulier (auto-immun ou autre) et se développent normalement. Avant toutes choses, nous avons vérifié que ces souris répondaient au CFA utilisé comme adjuvant dans le protocole d'AEC. En effet, le CFA contient des mycobactéries *M. Tuberculosis* inactivées susceptibles d'être reconnues par le TLR9. Nous devions donc nous assurer que le défaut de TLR9 n'induisait pas de biais dans la réponse au CFA car le TLR9 participe à la réponse anti-*M. Tuberculosis*, en collaboration avec le TLR2(265). Tout comme les souris sauvages « true littermate », les souris TLR9-KO répondent à cet adjuvant (activation cellulaire, cytokines plasmatiques en fortes concentrations) (données non montrées). Ces observations suggèrent d'une part que le défaut de TLR9 n'entraîne pas un défaut de réponse au CFA et d'autre part qu'il n'existe pas de biais de départ causé par l'adjuvant entre les souris sauvages et KO.

Les souris C57BL/6 portent un CMH II d'haplotype H-2^b qui est décrit comme rendant les souris résistantes à l'AEC. Grâce à l'expertise de notre équipe, nous avons optimisé le protocole et induit l'AEC dans les souris sauvages et TLR9-KO avec une incidence comprise entre 50 et 80% selon les expériences. Nous avons testé différents protocoles d'arthrite afin de confirmer nos observations. Par exemple, l'injection de 50µg de LPS après la deuxième immunisation augmente légèrement l'incidence et la sévérité des arthrites dans les 2 groupes de souris, mais ne modifie pas les résultats observés. Nous avons donc choisi de ne pas restimuler TLR4 après le rappel dans du CFA car il a été montré que le TLR4 pouvait collaborer avec le TLR9 et induire une aggravation de la maladie lupique(301) ou être impliqué dans l'AEC chez la souris DBA/1(302). Dans un autre protocole, nous avons utilisé 100µg de CII et nous avons observé des résultats similaires.

2. L'absence de TLR9 n'influence pas le développement de l'AEC

Nous avons montré ici pour la première fois que le TLR9 n'est pas indispensable au développement des arthrites dans le modèle d'AEC. En effet, les souris n'exprimant pas le TLR9 développent des arthrites aussi sévères que les souris sauvages. Nous avons confirmé ces résultats dans 3 expériences indépendantes effectuées avec le même protocole (50µg de CIIp, pas d'injection de LPS) sur 28 souris sauvages et 19 souris TLR9-KO en tout. L'étude histologique des pattes montre que les souris TLR9-KO présentent une inflammation et une destruction articulaire semblables aux sauvages.

Des taux similaires d'Ac anti-CII dans les plasmas des souris KO et sauvages montrent une immunisation forte et identique contre cet Ag dans les deux groupes. La mesure des isotopes IgG1 et IgG2a parmi les Ac anti-CII est équivalente dans les deux groupes de souris et les ratios IgG1/IgG2a semblables suggèrent qu'il n'y a pas de modification de la balance Th1/Th2 chez les souris TLR9-KO. Or, il a été montré que l'activation des DC par le TLR9 favorise une réponse Th1(265,303). Dans notre modèle, il existe certainement d'autres phénomènes indépendants de l'activation des DC via le TLR9 menant à une réponse Th1. D'autre part, il semblerait que le déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur des Th1 ne puisse pas expliquer l'ensemble des mécanismes impliqués dans la PR, et qu'un déséquilibre Th17/Treg pourrait aussi y contribuer. L'élément qui nous permet de dire que le TLR9 contribue en effet aux réponses Th1 est la présence de plus faibles taux d'IL-12p70 dans le plasma des souris TLR9-KO subissant l'AEC (Article 2, Figure 17). Ainsi, bien que le TLR9 semble impliqué dans la production d'IL-12p70 systémique dans notre modèle (comme dans d'autres(304)), il ne modifie pas la balance Th1/Th2.

Le TLR9 est décrit comme ayant des effets sur l'ostéoclastogénèse, dont certains peuvent être contradictoires. Chez la souris, les précurseurs d'ostéoclastes sont sensibles aux ligands TLR car ils expriment les TLR1 à 9(275). Le traitement de précurseurs d'ostéoclastes par des CpG-ODN inhibe l'ostéoclastogénèse. Cependant, si ces précurseurs sont préalablement cultivés avec du RANKL, les CpG-ODN accentuent l'ostéoclastogénèse(275,276). De plus, ces phénomènes semblent être accentués par une synergie entre le TLR9 et les TLR3 et 4(277). Dans notre modèle, les cellules issues de moelle osseuse de souris TLR9-KO ou sauvages après un protocole d'AEC ont des capacités identiques à se différencier en ostéoclastes *in vitro*. Le TLR9 en lui-même n'est donc pas nécessaire à l'ostéoclastogénèse à partir de cellules souches de moelle osseuse, même dans l'arthrite. Pour confirmer ces résultats, nous pourrions utiliser des cellules à des stades moins indifférenciées (cellules de rates) au lieu des

cellules souches non différenciées. Il serait aussi intéressant d'évaluer le nombre d'ostéoclastes *ex vivo* avec un marquage TRAP sur des coupes de pattes de ces souris. Par ailleurs, nous ne savons pas s'il existe des ligands TLR9 dans les articulations de ces souris (ce qui est le cas chez l'homme), qui pourraient moduler l'ostéoclastogénèse.

Plusieurs articles récents montrent que le TLR9 restreint et inhibe le TLR7, notamment sur les LB(210). De plus, une étude concernant l'implication du TLR9 dans un modèle lupique montre que des souris déficientes pour le TLR9 ont un développement de la maladie plus sévère (auto-Ac anti-nucléaire, néphrite...) accompagné d'une surexpression du TLR7 et d'une augmentation de l'activation des LB et des pDC dépendante du TLR7(291). Les auteurs soulignent l'importance du TLR7 dans leur modèle lupique chez la souris TLR9-KO. Nous avons cherché à savoir si dans notre étude, le défaut de TLR9 induisait une augmentation des phénomènes dépendants du TLR7, et si ceux-ci pouvaient expliquer le fait que les souris TLR9-KO développent des arthrites aussi sévères que les sauvages. Dans un premier temps, nous avons étudié par cytométrie en flux l'activation et le pourcentage de différentes populations cellulaires de la rate, du sang et des ganglions lymphatiques (LT, LB, PNN) de nos souris AEC. Nous avons de plus mesuré l'expression du TLR7 par cette même technique. Nous n'avons pas noté de différence de fréquence ou d'activation des différentes populations cellulaires étudiées (données non montrées) ni de différence dans l'expression du TLR7. Néanmoins, nous avons rencontré des difficultés techniques pour l'étude de l'expression du TLR7, certainement dus à la mauvaise qualité des Ac anti-TLR7 commerciaux. Nos marquages étaient très faibles même sur des populations censées exprimer fortement ce récepteur. Une perspective d'étude serait de mesurer l'expression du TLR7 par d'autres techniques (RT-PCR, western-blot). Nous avons donc décidé d'étudier la réponse aux ligands TLR7 dans des cultures de cellules de rate, sang et ganglions lymphatiques issues de nos souris AEC afin d'étudier l'activité fonctionnelle du TLR7. Nous avons stimulé ces cellules avec différents ligands TLR (4/7/9) et mesuré les taux de trois cytokines inflammatoires (IL-12p40/70, IL-6 et TNF α). Nous avons montré que les cellules de souris TLR9-KO après un protocole d'AEC ont des réponses accrues à un ligand TLR7 (imiquimod). Une même tendance est à noter après stimulation par du LPS mais de manière non significative. Ce phénomène est dépendant de l'AEC car nous ne retrouvons pas cette réponse accrue avec des cellules de souris naïves (non montré). Ainsi, dans notre étude, un phénomène de compensation entre le TLR9 et le TLR7 pourrait exister, expliquant peut-être les courbes d'arthrites observées. Afin de connaître la réelle contribution du TLR7 dans notre modèle

d'AEC, nous pourrions utiliser des souris double déficientes pour le TLR7 et le TLR9 (comparées aux simples KO). Il serait ensuite intéressant d'étudier les ligands TLR7 potentiellement impliqués *in vivo* dans l'AEC.

Une autre perspective pour connaître le rôle réel du TLR9 dans le processus inflammatoire conduisant à l'arthrite serait d'employer de l'IFA additionné de ligands TLR9 dans l'émulsion de collagène, ou additionné de tous les ligands TLR sauf de ligands TLR9. Cela nous permettrait d'étudier uniquement la contribution du TLR9 de notre protocole.

B. Expression du TLR9 chez les patients PR

Une forte expression des TLR est retrouvée dans les PBMC (TLR2/4) et les tissus synoviaux de patients PR (TLR2/3/4/7)(268). Ces études manquent souvent de contrôles (donneurs sains ou patients souffrant d'une autre maladie rhumatismale non inflammatoire) et surtout aucune ne concerne le TLR9. Nous ne savons pas si comme certains autres TLR, le TLR9 est fortement exprimé chez les patients PR. Pour répondre à cette question, nous avons mesuré *ex vivo* par cytométrie en flux l'expression du TLR9 dans les populations leucocytaires totales du sang de 17 patients comparée à 20 donneurs sains. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression intracellulaire du TLR9 dans les populations de neutrophiles, de monocytes, de lymphocytes mais aussi à l'expression à la surface de ces cellules. Je parle dans mon étude de l'expression intracellulaire des populations de monocyte et de PNN sans les distinguer. Cela vient d'un problème technique car lors de la fixation et la perméabilisation des cellules (étape nécessaire à un marquage intracellulaire), les populations de monocytes et de PNN ont une taille et une granulosité semblables, ce qui ne permet plus de les différencier en SSC/FSC. Pour remédier à cela, nous aurions pu effectuer au préalable un marquage spécifique des PNN ou des monocytes, rendant plus lourd un marquage déjà constitué de 3 étapes et risquant d'activer les PNN. L'étude de la MFI intracellulaire, c'est-à-dire l'intensité de fluorescence, plutôt que le pourcentage de cellules exprimant le TLR9 nous donne une bonne idée de l'expression intracellulaire de ce récepteur. Nous nous sommes par ailleurs intéressés à l'expression du TLR9 à la surface des neutrophiles car comme l'article n°1 l'illustre, ce TLR9 est fonctionnel et pourrait probablement reconnaître des ligands du TLR9 non classiques, potentiellement pathologiques dans la PR.

Nous avons montré dans l'article n°2 que les patients PR ont une expression du TLR9 similaire aux donneurs sains. Cela est vrai en intracellulaire dans les monocytes/PNN et les lymphocytes (non montré), mais cela est aussi retrouvé à la surface de ces cellules (% des PNN). Ainsi, tout comme les donneurs sains, les PNN de patients PR expriment un TLR9 à leur surface. Nous pourrions déterminer si ce TLR9 est fonctionnel (ce qui n'a pas été réalisé jusqu'à présent) et s'il reconnaît les mêmes types de ligands que les donneurs sains. Nous savons que de l'ADN riche en motifs CpG est retrouvé dans la circulation de patients PR(274). Ainsi, bien que des ligands potentiels du TLR9 soient retrouvés dans la circulation des patients, le TLR9 n'est pas surexprimé comme on pourrait s'y attendre après sa stimulation, ce qui suggère que ce récepteur ne joue pas un rôle crucial dans la PR. Il serait particulièrement intéressant d'étudier la réponse des cellules des patients PR à des ligands TLR, notamment TLR7 et 9. Nous pourrions ainsi voir si, bien qu'il n'y ait pas de surexpression du TLR9 chez les patients, leurs cellules sont plus répondeuses à des ligands retrouvés dans leur environnement ou si le TLR7 prend le relais du TLR9. Une autre perspective intéressante serait d'étudier l'expression et l'activation cellulaire induite par le TLR9 dans les cellules des liquides synoviaux des patients afin de comparer l'expression du TLR9 et l'activation via ce récepteur au niveau local à celles des cellules du sang. Par exemple, le TLR9 n'a pas été étudié sur les PNN au niveau local, bien que ces cellules soient les principales cellules infiltrées dans les articulations de PR et qu'une forte concentration de ligands TLR9 potentiels y soit retrouvée.

III. C1q : une protéine du complément impliquée dans le développement de l'arthrite et dont l'expression des récepteurs est corrélée à l'inflammation

La PR est une maladie où l'immunité adaptative joue un rôle important, la présence d'ACPA étant un des reflets de cette implication. Nous savons que certains facteurs de l'immunité innée pourraient jouer un rôle dans le développement ou le maintien de cette pathologie. Par exemple, le complément est activé chez les patients et C1q est produit dans le tissu synovial(305). C1q est un bon candidat d'étude car il peut potentiellement reconnaître les ACPA, les facteurs rhumatoïdes ou la CRP et ainsi contribuer à l'activation du complément chez les patients. Par ailleurs, des polymorphismes nucléotidiques dans les gènes codant pour C1q ont été identifiés et sont associés à la PR(306). De plus, C1q possède des fonctions non classiques indépendantes de l'activation de la voie classique du complément et de la reconnaissance des CI. Par exemple, cette protéine reconnaît et participe à l'élimination des cellules apoptotiques(307) et se fixe aux NET(308,309). Il est donc possible que C1q soit directement activé par des ligands endogènes. Étonnamment, peu d'études se sont penchées sur l'implication de C1q dans la PR. Nous nous sommes ici intéressés au rôle de C1q dans le développement de l'AEC ainsi que chez l'homme où la fixation de cette protéine à ses récepteurs a été évaluée sur les leucocytes de patients PR.

A. C1q est absolument nécessaire au développement de l'AEC

Peu de données sont disponibles concernant l'implication de C1q dans des modèles animaux d'arthrites. Nous savons cependant que dans le modèle murin de transfert de sérum de souris K/BxN à des souris naïves ou dans le modèle CAIA, tous deux dépendants des Ac, C1q ne semble pas jouer un rôle fondamental(173,174). Néanmoins, dans ces deux modèles, il n'y a pas de rupture de tolérance et pas d'immunisation active, car les Ac pathologiques (entre autre) sont apportés par l'injection. Nous avons voulu connaître l'implication de C1q dans les phases les plus précoces de la maladie, c'est à dire avant la rupture de la tolérance et avant la production d'auto-Ac. Pour cela nous avons utilisé le modèle d'AEC qui est basé sur une immunisation active, contrairement aux deux autres modèles évoqués plus haut. Nous avons montré que C1q est absolument nécessaire au développement de l'AEC car les souris C1q-KO sont protégées. Ceci n'est pas dû à un défaut d'immunisation car le dosage des Ac anti-CII

révèle de forts taux de ces Ac dans les plasmas des souris C1q-KO (non montré). Ces taux sont néanmoins plus faibles que chez les souris sauvages. Ceci pourrait être en partie expliqué par le fait que la protéine C1q possède un domaine collagène-like et partage un épitope dans ce domaine avec le collagène de type II(310). Dans des conditions normales, le C1q et le CII ne présentent pas de réactivité antigénique croisée. Il a été montré que dans certaines circonstances, une modification de C1q aboutit à une réactivité croisée biochimique et biologique entre ces deux molécules. Par exemple, la protéolyse de C1q par une collagénase ou l'exposition de C1q à des ROS relarguées par les PNN modifient cette molécule et la rendent reconnaissable par des Ac anti-CII(311). D'ailleurs, de forts taux de collagénases et de ROS sont présents dans le liquide synovial de patients PR (potentiellement relargués par les granulocytes infiltrés), ce qui pourrait modifier le C1q présent dans les articulations (sous forme de CI principalement). Comparé à d'autres maladies rhumatismales (arthrose par exemple), seul le C1q contenu dans les liquides synoviaux de patients PR est reconnu par des Ac anti-CII(311), ce qui suggère une réaction croisée entre le C1q et le CII dans l'articulation. Cette hypothèse sur la réaction antigénique croisée est corroborée par les études faites chez le rat où une immunisation classique des animaux avec du CII induit une faible production d'Ac qui reconnaissent le C1q dans sa forme modifiée (oxydée) ou non(312). D'ailleurs, l'immunisation des animaux avec du C1q oxydé induit le développement d'arthrites, la production d'Ac anti-C1q (oxydé ou non) mais aussi la production d'une sous-population d'Ac anti-CII. Ces chercheurs ont émis l'idée que l'induction d'une réponse immunitaire anti-CII pouvait passer par le C1q et que cette protéine du complément pouvait être l'un des premiers antigènes endogènes impliqué précocement dans l'induction des arthrites, avant que le collagène ne devienne lui-même un antigène. Il serait intéressant de titrer les Ac anti-C1q dans les plasmas de nos souris afin de voir si les souris sauvages (et éventuellement KO) possèdent une réactivité contre cette protéine en plus de la réactivité contre le CII. Nous pourrions aussi étudier si le C1q est modifié dans notre protocole d'AEC et s'il est reconnu (dans sa forme native ou modifiée) par les Ac anti-CII. Il serait surtout intéressant d'étudier cette réaction croisée dans l'articulation (plutôt qu'en systémique) où le CII et le C1q sont présents dans la PR et donc où cette réaction pourrait se dérouler.

Une autre hypothèse serait que le C1q puisse être impliqué dans le processing et la prise en charge du CII lors de l'immunisation et avant la production d'auto-Ac. Il pourrait faciliter l'apprêtement de cet auto-Ag par les CPA professionnelles, ce qui favoriserait l'immunisation contre le CII.

La protection des souris C1q-KO dans l'AEC n'est pas due à une modification des sous populations leucocytaires ni d'une modification de l'ostéoclastogénèse (non montré). Par ailleurs, le dosage de C3a, qui est une protéine produite lors de l'activation de chacune des voies du complément, montre que le complément s'active dans le plasma lors de l'AEC, chez les souris sauvages mais aussi chez les souris C1q-KO. Ainsi, bien que C1q ne soit pas présent, la cascade du complément est fonctionnelle et les voies alternes et/ou des lectines sont activées *in vivo*. La protection contre les arthrites n'est donc pas due à un défaut d'activation du complément. Il existerait donc d'autres fonctions de la voie classique du complément, médiées par C1q, qui ne sont pas compensées par les deux autres voies, et qui expliqueraient la protection des souris du développement des arthrites.

Pour conclure, C1q est nécessaire au développement de l'arthrite chez la souris, dans ses phases les plus précoces. Néanmoins, ce modèle n'est pas le reflet exact de la maladie chez l'homme et il dépend essentiellement d'une immunisation contre le CII qui présente une réaction croisée avec le C1q. Il serait intéressant d'utiliser un protocole d'arthrite avec une immunisation active, différente de l'AEC, et indépendante du CII (modèle de la méthyl-BSA).

B. La capacité des PNN et des monocytes à lier C1q est corrélée à l'activité de la maladie.

En plus des résultats obtenus chez la souris, nous avons effectué une étude chez l'homme afin de connaître l'importance de C1q dans la PR. Pour cela, nous avons mesuré la capacité des leucocytes du sang de patients à lier C1q. Nous avons incubé *ex vivo* les leucocytes du sang (déplétés des globules rouges) avec de la protéine C1q humaine recombinante à 4°C, suivi d'un marquage par un Ac anti-C1q couplé à un fluorochrome analysable par cytométrie en flux. Nous avons choisi cette méthode car elle reflète l'expression de tous les récepteurs à C1q. En effet, de nombreux récepteurs à cette protéine ont été identifiés (C1qRp, gC1qR, cC1qR, CR1), certains sont encore inconnus, certains sont considérés comme des « binding-protéines » (et non pas des récepteurs) et certaines de leurs fonctions ne sont pas totalement définies. Les principales fonctions décrites de ces récepteurs sont l'induction de la phagocytose, de l'expression de molécules d'adhérence ou encore de la production de superoxydes par les neutrophiles(313). Il pourrait par ailleurs exister une fixation de C1q sur les leucocytes indépendante de ses récepteurs. Par exemple, C1q peut se fixer à des cellules apoptotiques ou être fixé par des cellules via les FcR lors de son association à des CI. Dans

notre étude *ex vivo*, il n'y a pratiquement pas de cellules en apoptose et nous les excluons à l'analyse. Nous ne pouvons pas exclure le fait que C1q puisse déjà être fixé aux cellules via les FcR et associé à des CI mais ce phénomène est probablement très limité car nous n'incubons pas les cellules avec du sérum humain de patient au préalable (qui pourrait être source de CI). Ainsi, nous parlons ici de la capacité des leucocytes du sang à fixer C1q principalement via l'expression de tous ses récepteurs. Nous avons montré une corrélation positive et statistiquement significative entre la capacité des neutrophiles à lier C1q *ex vivo* et l'activité de la maladie représentée par le DAS28. Ce résultat a aussi été retrouvé sur les monocytes. Le DAS28 est un score établi et validé qui tient compte de l'évaluation de la douleur et du nombre d'articulations touchées (28 au maximum), de l'appréciation globale du patient mais aussi de paramètres biologiques (ici la vitesse de sédimentation) qui reflète l'inflammation systémique. Ainsi, la fixation de C1q aux PNN et aux monocytes pourrait refléter les phénomènes inflammatoires retrouvés dans la PR. Il a été par exemple montré qu'un des récepteurs à C1q (gC1qR) était surexprimé en réponse à des cytokines inflammatoires telles que l'IFN γ , le TNF α , ou encore le LPS(314). Il serait par ailleurs intéressant de mesurer la liaison de C1q sur les cellules infiltrées dans l'articulation des patients PR car une étude a montré que les neutrophiles infiltrés exprimaient plus de « récepteurs à C1q » que les cellules circulantes(315). Il faut noter que cette étude datant de 1993 ne précise pas de quel type de récepteurs il s'agit.

Bien que la PR ne soit pas caractérisée par la présence d'Ac anti-C1q, cette protéine semble jouer un rôle dans cette pathologie via sa fixation à des CI (composés parfois d'auto-Ac)(316), par son rôle dans l'activation du complément(161) et éventuellement par ses similarités avec le CII. En effet, il existe chez les patients une réactivité contre le CII notamment dans l'articulation avec la présence d'ACPA anti-CII(317,318). On pourrait émettre l'hypothèse que C1q soit modifié (collagénases, oxydation) localement lors de l'inflammation, ce qui pourrait induire une reconnaissance de cette protéine par les Ac anti-CII et amplifier la réponse inflammatoire localement. Cette hypothèse a déjà été émise dans les années 1990 mais n'a pas été étudiée plus en profondeur depuis(312,319,320).

Pour conclure, le système du complément semble jouer un rôle dans le maintien des phénomènes inflammatoires de la PR chez l'homme. Notre étude chez l'animal montre que C1q est impliqué dans les phases les plus précoces de la maladie, avant l'apparition des anticorps. Il reste à savoir si C1q pourrait être impliqué dans l'auto-immunisation chez l'homme. Même si C1q n'est pas indispensable dans les modèles de CAIA et de K/BxN, il amplifie probablement les réponses inflammatoires chez les patients.

IV. Les neutrophiles sont une source d'IFN- α

L'IFN- α est une cytokine connue pour être sécrétée principalement par les pDC, notamment dans la circulation. Des expériences *in vitro* de déplétion de pDC de patients lupiques suggèrent qu'une autre source cellulaire d'IFN- α existe(297). Nous nous sommes intéressés ici à quelle pouvait être cette autre source chez ces patients, mais aussi chez des donneurs sains ou ceux ayant une pathologie auto-immune dans laquelle l'IFN- α n'est pas décrite comme jouant un rôle prépondérant : la PR. Nous nous sommes aussi attachés à déterminer quels stimuli, naturels ou artificiels, pouvaient induire cette production.

Nous avons montré que, en complément des pDC, les neutrophiles sont une source d'IFN- α . Sans stimulation, aucune de ces cellules ne produit de l'IFN- α . Des ligands TLR, notamment et surtout du CpG-ODN induisent la production de cette cytokine par les PNN, les pDC et les monocytes. Les PNN issus de donneurs sains, de patients lupiques et de patients PR sont capables d'une telle production, bien qu'il existe des donneurs non ou peu répondeurs dans chacun des groupes. Ainsi, des PNN non-inflammatoires sont aptes à produire de l'IFN- α en réponse à des ligands TLR9. Celle-ci s'accompagne d'une activation des PNN (sécrétion d'IL-8, surexpression du CD66b) et est soutenue par le priming des cellules avec du G-CSF ou du GM-CSF chez certains donneurs. Cela peut être expliqué par le fait que ces deux facteurs induisent la surexpression du TLR9, facilitant ainsi la prise en charge du ligand par ce récepteur.

Les nucléosomes sont non seulement un auto-Ag lupique majeur présent dans la circulation des patients, mais peuvent également se déposer au niveau des articulations de patients atteints de PR(273). Dans la PR, les nucléosomes extracellulaires ne représentent pas un auto-Ag mais pourraient exercer un rôle pro-inflammatoire. Nous avons montré que les PNN produisent de l'IFN- α en réponse à du nucléosome libre. Ceci est retrouvé chez les patients lupiques où le nucléosome est un auto-Ag, mais aussi chez les donneurs sains et les patients PR. Le pourcentage de PNN produisant de l'IFN- α en réponse au nucléosome est similaire chez les patients lupiques et chez les donneurs sains, et il existe dans chacun des deux groupes des donneurs répondeurs et non-répondeurs. Ainsi, les PNN de tous ces donneurs sont capables de produire de l'IFN- α de manière similaire mais seuls les PNN de donneurs lupiques sont susceptibles de rencontrer *in vivo* et dans la circulation un tel auto-Ag, et les PNN de patients PR dans l'articulation. Chez les donneurs peu ou non-répondeurs, les PBMC peuvent soutenir la production d'IFN- α par les PNN en réponse au nucléosome. Nous avons

montré que le nucléosome active et induit la production d'IFN- α par les PNN indépendamment du TLR9 bien que cet auto-Ag soit composé en partie d'ADN. Des études complémentaires devront être réalisées afin d'identifier les récepteurs et les voies de signalisation impliqués dans la reconnaissance du nucléosome, mieux comprendre pourquoi certains donneurs ne sont pas répondeurs (polymorphisme du récepteurs au nucléosome ?) ou si d'autres facteurs influencent la production d'IFN- α par les PNN. Par ailleurs, la stimulation des PNN par des nucléosomes induit des phénomènes de Nétose. Bien que la formation de NET dans notre système ne soit pas un facteur induisant la production d'IFN- α , ce phénomène peut y contribuer par une boucle d'amplification. Il pourrait aussi jouer un rôle dans la PR où les NET sont reconnus par les ACPA.

Si l'on compare la production d'IFN- α à l'échelle d'une cellule, les pDC sont plus efficaces que les PNN, mais ces cellules sont 100 fois moins représentées dans la circulation que les PNN. Ainsi, les PNN représentent une source non négligeable d'IFN- α . Par ailleurs, la production d'IFN- α par les PNN ne nécessite pas que la chromatine soit sous forme de CI, contrairement aux pDC(297). Ainsi, les PNN pourraient représenter une source d'IFN- α dans les phases précoces du lupus, avant que les auto-Ac ne soient présents. La figure S11 de l'article n°4 (annexe 2) est une proposition de modèle expliquant la production d'IFN- α dans le lupus. Ce modèle ne peut probablement pas être appliqué au contexte de la PR au niveau systémique car le nucléosome n'est pas présent dans la circulation et l'IFN- α ne semble pas être la cytokine la plus importante dans la physiopathologie de cette maladie. Par contre, on peut se demander s'il existe dans la PR des évènements impliquant la chromatine, l'IFN- α et les neutrophiles au niveau local dans l'articulation car ces trois acteurs y sont présents. Il serait aussi intéressant d'étudier à quel stade de la maladie ces acteurs sont susceptibles de jouer un rôle au niveau local.

CONCLUSION

L'hypothèse générale de mon travail est que certains facteurs de l'immunité innée peuvent jouer un rôle conséquent dans des maladies auto-immunes, notamment pour celles où la contribution de facteurs environnementaux (virus, bactéries) a été suggérée. Je me suis employée lors de ma thèse à étudier certains de ces acteurs de l'immunité innée tels que les PNN, le TLR9 ou le C1q, et de déterminer leur implication dans l'initiation ou le maintien des phénomènes inflammatoires caractéristiques de la PR.

Nous avons tout d'abord montré que les neutrophiles possèdent des fonctions atypiques non décrites, potentiellement impliquées dans des phénomènes inflammatoires retrouvés dans la PR. Nous avons montré que les PNN expriment un TLR9 fonctionnel à leur surface cellulaire et qu'ils produisent de l'IFN- α après stimulation par un ligand TLR9 ou du nucléosome. Le rôle potentiel de l'IFN- α (notamment localement) dans la PR reste à déterminer. Ces nouvelles fonctions des neutrophiles pourraient être à l'origine de la reconnaissance de ligands TLR9 atypiques ou de la production d'IFN- α après activation par des ligands spécifiques. La reconnaissance de ces ligands pourrait aussi conduire à une auto-immunisation pathologique, potentiellement amplifiée par la présence de pathogènes.

D'autre part, nous avons montré chez la souris que le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'arthrite. Ce phénomène pourrait en partie être dû à l'engagement ou à la suractivation du TLR7 dans notre modèle où le TLR9 n'est pas exprimé. Il reste à déterminer si le TLR9 joue un rôle dans des phases de maintien ou d'amplification de la maladie plutôt que dans le déclenchement de celle-ci. Chez les patients PR, il n'y a pas de surexpression de ce récepteur sur les leucocytes du sang, ce qui laisse supposer que les ligands endogènes potentiellement reconnus par le TLR9 ne suffisent pas à induire sa surexpression. Il serait intéressant de mesurer l'expression du TLR7 dans les PBMC de patients (encore jamais réalisé) et d'étudier la réponse de ces cellules à des ligands TLR7 et 9.

Contrairement au TLR9, le C1q est essentiel au développement de l'AEC, indépendamment de sa fonction d'activateur du système du complément. Contrairement aux publications antérieures qui utilisent des modèles passifs de transfert d'arthrite, l'AEC nous permet d'affirmer que le C1q est impliqué dans les phases précoces de la maladie, avant la rupture de la tolérance et avant la production d'auto-Ac. Le travail réalisé chez l'homme nous a permis de démontrer que la capacité de certains leucocytes du sang à fixer C1q est corrélée à l'activité de la PR. Tout ceci suggère que certaines fonctions non classiques de C1q pourraient participer au développement, au maintien ou à l'exacerbation de la PR.

La figure 26 résume les résultats obtenus durant ma thèse et met en lumière les questions soulevées par ces résultats.

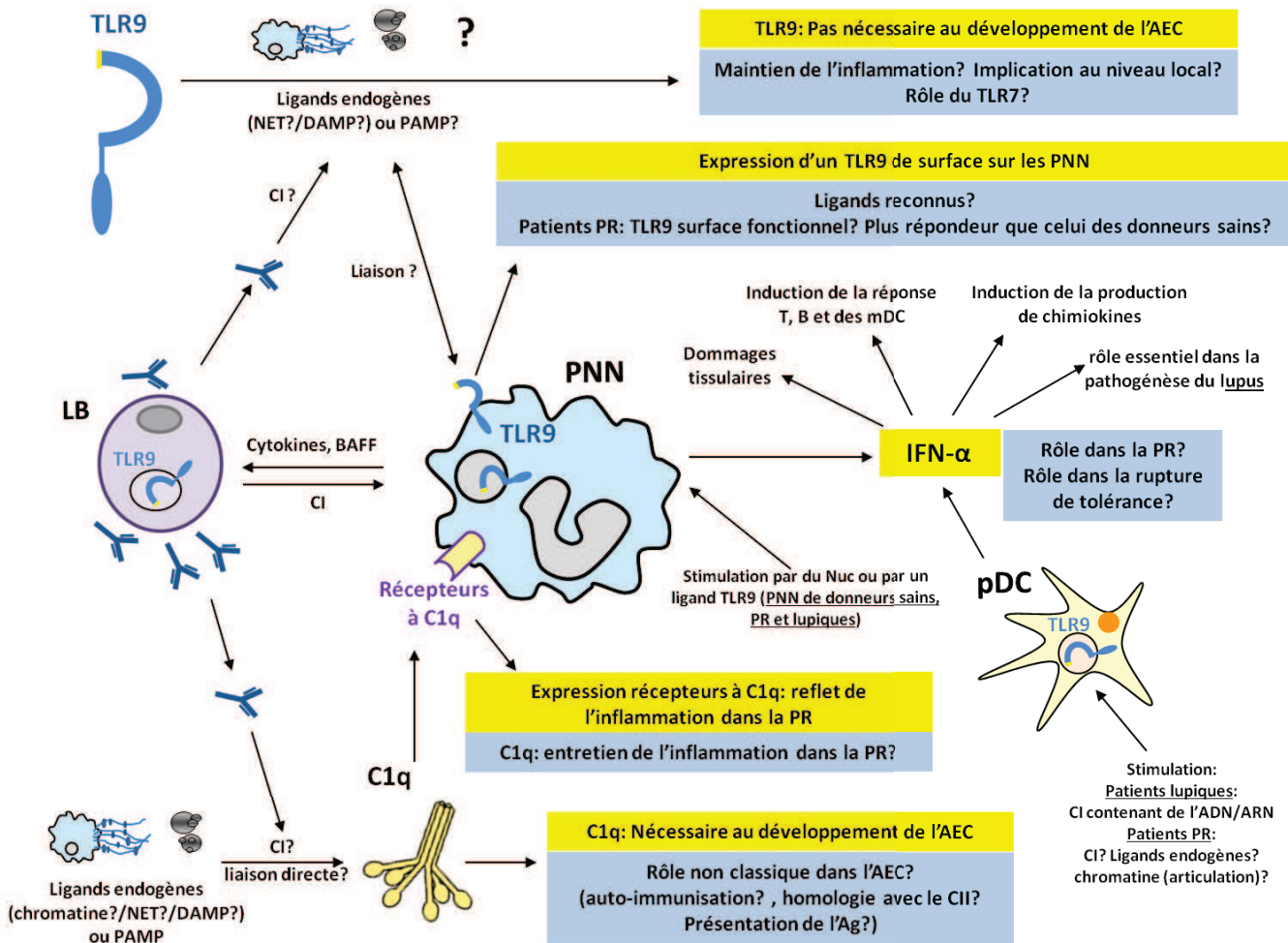


Figure 26 : Schéma résumé des travaux menés, les possibles interactions et les questions soulevées

Ce schéma regroupe les résultats obtenus dans le contexte de la PR principalement, mais aussi dans un contexte sain et lupique (notamment pour l'IFN- α). Le TLR9 ne semble pas jouer un grand rôle dans le développement de l'AEC bien que des ligands endogènes soient retrouvés chez l'homme. La stimulation de ce récepteur induit la production d'IFN- α par les PNN et il est aussi exprimé à la surface de ces cellules. Le rôle de l'IFN- α n'est clairement pas défini dans la physiopathologie de la PR, contrairement au lupus. On sait néanmoins que les PNN sécrètent cette cytokine aussi en réponse à du nucléosome (antigène présent dans la circulation des patients lupiques et localement dans l'articulation des patients PR) et ceci indépendamment des CI (contrairement aux pDC). Ceci pourrait être un phénomène précoce dans certaines maladies auto-immunes comme le lupus, avant que les CI ne soient formés. C1q, molécule participant de manière indirecte et ambiguë à la physiopathologie du lupus, est essentiel au développement de l'AEC et l'expression de ses récepteurs est positivement corrélée à l'activité de la maladie chez les patients PR. C1q pourrait avoir des fonctions non classiques dans les phases les plus précoces de l'AEC et pourrait participer au maintien de l'inflammation chez les patients. **En jaune**: conclusion des résultats obtenus. **En bleu**: questions découlant de ces observations. Ag : antigène ; BAFF : B cell activating factor ; CI : complexe immunitaire ; LB : lymphocyte B ; NET : Neutrophil Extracellular Traps ; Nuc : nucléosome ; pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes ; PNN : polynucléaires neutrophiles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Roux CH, Saraux A, Le Bihan E, Fardellone P, Guggenbuhl P, Fautrel B, et al. Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: geographical variations in prevalence in France. *J Rheumatol*. 2007 Jan;34(1):117–22.
2. Naz SM, Symmons DPM. Mortality in established rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007 Oct;21(5):871–83.
3. Bax M, Huizinga TWJ, Toes REM. The pathogenic potential of autoreactive antibodies in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2014 May;36(3):313–25.
4. Vincent C, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity*. 2005 Feb;38(1):17–24.
5. Landré-Beauvais AJ, 1800 P. Doit on admettre une nouvelle espèce de goutte sous la dénomination de goutte asthénique primitive?: question présentée à l'École de Médecine de Paris de la République française. *J.A. Brosson*; 1800. 30 p.
6. Charcot JM. Études pour servir à l'histoire de l'affection décrite sous les noms de goutte asthénique primitive, nodosités des jointures, rhumatisme articulaire chronique (forme primitive), etc: thèse pour le doctorat en médecine, présentée et soutenue le 16 mars 1853. Rignoux, imprimeur de la Faculté de médecine; 1853. 56 p.
7. Garrod SAB. *The Nature and Treatment of Gout and Rheumatic Gout*. Walton and Maberly; 1859. 642 p.
8. Lipsky PE. Why does rheumatoid arthritis involve the joints? *N Engl J Med*. 2007 Jun 7;356(23):2419–20.
9. Kitas GD, Gabriel SE. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan;70(1):8–14.
10. Van der Linden MPM, Knevel R, Huizinga TWJ, van der Helm-van Mil AHM. Classification of rheumatoid arthritis: comparison of the 1987 American College of Rheumatology criteria and the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria. *Arthritis Rheum*. 2011 Jan;63(1):37–42.
11. Kasturi S, Goldstein BL, Malspeis S, Karlson EW, Costenbader KH. Comparison of the 1987 American College of Rheumatology and the 2010 American College of Rheumatology/European League against Rheumatism criteria for classification of rheumatoid arthritis in the Nurses' Health Study cohorts. *Rheumatol Int*. 2014 Mar;34(3):407–11.
12. Sokolove J, Bromberg R, Deane KD, Lahey LJ, Derber LA, Chandra PE, et al. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PloS One*. 2012;7(5):e35296.
13. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmström V, Feldmann M, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010 Jan;233(1):34–54.
14. Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum*. 2004 Mar;50(3):709–15.
15. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*. 2012 May 1;122(5):1791–802.
16. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Jun;2(6):473–88.
17. Frisell T, Holmqvist M, Källberg H, Klareskog L, Alfredsson L, Askling J. 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*. 2013 Nov;65(11):2773–82.

18. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000 Jan;43(1):30–7.
19. Svendsen AJ, Kyvik KO, Houen G, Junker P, Christensen K, Christiansen L, et al. On the origin of rheumatoid arthritis: the impact of environment and genes--a population based twin study. *PloS One.* 2013;8(2):e57304.
20. Kochi Y, Suzuki A, Yamamoto K. Genetic basis of rheumatoid arthritis: A current review. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jul 29;
21. Astorga GP, Williams RC. Altered reactivity in mixed lymphocyte culture of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1969 Dec;12(6):547–54.
22. McMichael AJ, Sasazuki T, McDevitt HO, Payne RO. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1977 Jun;20(5):1037–42.
23. Legrand L, Lathrop GM, Marcelli-Barge A, Dryll A, Bardin T, Debeyre N, et al. HLA-DR genotype risks in seropositive rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 1984 May;36(3):690–9.
24. Auger I, Sebbag M, Vincent C, Balandraud N, Guis S, Nogueira L, et al. Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3424–32.
25. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Horita T, et al. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatol Oxf Engl.* 2013 Jul;52(7):1172–82.
26. Scally SW, Petersen J, Law SC, Dudek NL, Nel HJ, Loh KL, et al. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2013 Nov 18;210(12):2569–82.
27. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature.* 2014 Feb 20;506(7488):376–81.
28. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2003 Aug;34(4):395–402.
29. Al-Arfaj HF. Klinefelter's syndrome and rheumatoid arthritis: report of a case and review of the literature. *Int J Rheum Dis.* 2010 Feb 1;13(1):86–8.
30. Rovenský J, Imrich R, Lazúrová I, Payer J. Rheumatic diseases and Klinefelter's syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Apr;1193:1–9.
31. Spector TD, Ollier W, Perry LA, Silman AJ, Thompson PW, Edwards A. Free and serum testosterone levels in 276 males: a comparative study of rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and healthy controls. *Clin Rheumatol.* 1989 Mar;8(1):37–41.
32. Cutolo M, Straub RH, Bijlsma JWJ. Neuroendocrine-immune interactions in synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Nov;3(11):627–34.
33. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Intra E, Accardo S. Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991 Jan;34(1):1–5.
34. Booji A, Biewenga-Booji CM, Huber-Bruning O, Cornelis C, Jacobs JW, Bijlsma JW. Androgens as adjuvant treatment in postmenopausal female patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1996 Nov;55(11):811–5.
35. Van den Brink HR, van Everdingen AA, van Wijk MJ, Jacobs JW, Bijlsma JW. Adjuvant oestrogen therapy does not improve disease activity in postmenopausal patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1993 Dec;52(12):862–5.

36. D'Elia HF, Larsen A, Mattsson L-A, Waltbrand E, Kvist G, Mellström D, et al. Influence of hormone replacement therapy on disease progression and bone mineral density in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2003 Jul;30(7):1456–63.
37. Jorgensen C, Picot MC, Bologna C, Sany J. Oral contraception, parity, breast feeding, and severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996 Feb;55(2):94–8.
38. Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum*. 2004 Nov;50(11):3458–67.
39. Islander U, Jochems C, Lagerquist MK, Forsblad-d'Elia H, Carlsten H. Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Mar 15;335(1):14–29.
40. Ostensen M, Villiger PM. The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol*. 2007 Jun;29(2):185–91.
41. Polese B, Gridelet V, Araklioti E, Martens H, Perrier d'Hauterive S, Geenen V. The Endocrine Milieu and CD4 T-Lymphocyte Polarization during Pregnancy. *Front Endocrinol*. 2014;5:106.
42. Förger F, Marcoli N, Gadola S, Möller B, Villiger PM, Østensen M. Pregnancy induces numerical and functional changes of CD4+CD25 high regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Jul;67(7):984–90.
43. Hoovestol RA, Mikuls TR. Environmental exposures and rheumatoid arthritis risk. *Curr Rheumatol Rep*. 2011 Oct;13(5):431–9.
44. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):38–46.
45. Serra-Bonett N, Rodríguez MA. The swollen joint, the thickened artery, and the smoking gun: tobacco exposure, citrullination and rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2011 May 1;31(5):567–72.
46. De Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol*. 2008 Jan;35(1):70–6.
47. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K-A, Lundberg K, et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2662–72.
48. Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, et al. Antibodies to *porphyromonas gingivalis* are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J Rheumatol*. 2010 Jun;37(6):1105–12.
49. Mikuls TR, Payne JB, Reinhardt RA, Thiele GM, Maziarz E, Cannella AC, et al. Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int Immunopharmacol*. 2009 Jan;9(1):38–42.
50. Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patiño-Marin N, Rizo-Rodríguez JC, Little JW, Loyola-Rodríguez JP. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol*. 2009 Dec;36(12):1004–10.
51. Moen K, Brun JG, Valen M, Skartveit L, Eribe EKR, Olsen I, et al. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. *Clin Exp Rheumatol*. 2006 Dec;24(6):656–63.

52. Bartold PM, Marino V, Cantley M, Haynes DR. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol*. 2010 May;37(5):405–11.
53. De Aquino SG, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, van de Loo FAJ, Pruijn GJM, Marijnissen RJ, et al. Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 May 1;192(9):4103–11.
54. Newkirk MM, Zbar A, Baron M, Manges AR. Distinct bacterial colonization patterns of *Escherichia coli* subtypes associate with rheumatoid factor status in early inflammatory arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2010 Jul;49(7):1311–6.
55. Da Rocha Sobrinho HM, Jarach R, da Silva NA, Shio MT, Jancar S, Timenetsky J, et al. Mycoplasmal lipid-associated membrane proteins and *Mycoplasma arthritidis* mitogen recognition by serum antibodies from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2011 Jul;31(7):951–7.
56. Blaschke S, Schwarz G, Moneke D, Binder L, Müller G, Reuss-Borst M. Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000 Apr;27(4):866–73.
57. Balandraud N, Meynard JB, Auger I, Sovran H, Mugnier B, Revirion D, et al. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum*. 2003 May;48(5):1223–8.
58. Saal JG, Krimmel M, Steidle M, Gerneth F, Wagner S, Fritz P, et al. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum*. 1999 Jul;42(7):1485–96.
59. Schett G, McInnes IB. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365:2205–24.
60. Martinez-Gamboa L, Brezinschek H-P, Burmester GR, Dörner T. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. *Autoimmun Rev*. 2006 Aug;5(7):437–42.
61. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*. 2002 Apr 11;416(6881):603–7.
62. Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jun 15;182(12):7459–72.
63. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):530–41.
64. Manzo A, Pitzalis C. Lymphoid tissue reactions in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2007 Nov;7(1):30–4.
65. Peck A, Mellins ED. Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol*. 2009 Sep;132(3):295–304.
66. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2010 Aug 15;127(4):759–67.
67. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775–87.
68. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4100–10.

69. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 2002 Oct;9(10):1069–77.
70. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science.* 2011 Apr 29;332(6029):600–3.
71. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1390–7.
72. Voo KS, Wang Y-H, Santori FR, Boggiano C, Wang Y-H, Arima K, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 24;106(12):4793–8.
73. Bainton DF, Ullyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med.* 1971 Oct 1;134(4):907–34.
74. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003 Oct 1;102(7):2660–9.
75. Lindau D, Mussard J, Rabsteyn A, Ribon M, Kötter I, Igney A, et al. TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann Rheum Dis.* 2013 Sep 7;
76. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007 Aug;28(8):340–5.
77. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011 Aug;11(8):519–31.
78. Sabroe I, Williams TJ, Hébert CA, Collins PD. Chemoattractant cross-desensitization of the human neutrophil IL-8 receptor involves receptor internalization and differential receptor subtype regulation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1997 Feb 1;158(3):1361–9.
79. Sabroe I, Dower SK, Whyte MKB. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2005 Nov 15;41 Suppl 7:S421–6.
80. Parker LC, Whyte MKB, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 2005 Jun;77(6):886–92.
81. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001 Jan 5;487(3):318–22.
82. József L, Khreiss T, Filep JG. CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2004 Nov;18(14):1776–8.
83. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, et al. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2003 May 15;170(10):5268–75.
84. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacker W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009 Oct;5(10):e1000639.
85. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
86. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. 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.* 1996 Feb;59(2):229–40.
87. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007 Jan 15;176(2):231–41.
 88. Patel S, Kumar S, Jyoti A, Srinag BS, Keshari RS, Saluja R, et al. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide Biol Chem Off J Nitric Oxide Soc.* 2010 Apr 1;22(3):226–34.
 89. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013 Oct 17;122(16):2784–94.
 90. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009 Nov;16(11):1438–44.
 91. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011 Mar 9;3(73):73ra20.
 92. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2011 Jul 1;187(1):538–52.
 93. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 25;107(21):9813–8.
 94. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 2012 Sep 3;198(5):773–83.
 95. Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett.* 2008 Feb 15;116(1):1–6.
 96. Costantini C, Calzetti F, Perbellini O, Micheletti A, Scarponi C, Lonardi S, et al. Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc⁺ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN γ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3. *Blood.* 2011 Feb 3;117(5):1677–86.
 97. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood.* 2010 Jan 14;115(2):335–43.
 98. Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol.* 2011 May;23(5):317–26.
 99. Van Gisbergen KPJM, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med.* 2005 Apr 18;201(8):1281–92.
 100. Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2006 May;79(5):977–88.
 101. Bozza S, Fallarino F, Pizzurra L, Zelante T, Montagnoli C, Bellocchio S, et al. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2910–8.

102. Matsushima H, Geng S, Lu R, Okamoto T, Yao Y, Mayuzumi N, et al. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*. 2013 Mar 7;121(10):1677–89.
103. Harden JL, Egilmez NK. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunol Invest*. 2012;41(6-7):738–64.
104. Hilkens CMU, Isaacs JD. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? *Clin Exp Immunol*. 2013 May;172(2):148–57.
105. Rullé S, Ah Kioon M-D, Asensio C, Mussard J, Ea H-K, Boissier M-C, et al. Adrenomedullin, a neuropeptide with immunoregulatory properties induces semi-mature tolerogenic dendritic cells. *Immunology*. 2012 Jun;136(2):252–64.
106. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2011 Sep;34(9):2026–32.
107. Boissier M-C. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2011 May;78(3):230–4.
108. Adamopoulos IE, Bowman EP. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(5):225.
109. Wittkowski H, Foell D, af Klint E, De Rycke L, De Keyser F, Frosch M, et al. Effects of intra-articular corticosteroids and anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007 Aug;66(8):1020–5.
110. Poubelle PE, Chakravarti A, Fernandes MJ, Doiron K, Marceau A-A. 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*. 2007;9(2):R25.
111. Chakravarti A, Raquil M-A, Tessier P, Poubelle PE. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1633–44.
112. Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, et al. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. *PloS One*. 2013;8(5):e62231.
113. Moran EM, Heydrich R, Ng CT, Saber TP, McCormick J, Sieper J, et al. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PloS One*. 2011;6(8):e24048.
114. Raza K, Scheel-Toellner D, Lee C-Y, Pilling D, Curnow SJ, Falciani F, et al. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R120.
115. Rollet-Labelle E, Vaillancourt M, Marois L, Newkirk MM, Poubelle PE, Naccache PH. 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*. 2013;10(1):27.
116. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 27;5(178):178ra40.
117. Pratesi F, Dioni I, Tommasi C, Alcaro MC, Paolini I, Barbetti F, et al. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jul;73(7):1414–22.
118. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1601–8.

119. Monach PA, Nigrovic PA, Chen M, Hock H, Lee DM, Benoist C, et al. 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.* 2010 Mar;62(3):753–64.
120. Abeles AM, Pillinger MH. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis: cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2006;64(1-2):20–4.
121. Cho M-L, Ju J-H, Kim H-R, Oh H-J, Kang C-M, Jhun J-Y, et al. 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.* 2007 Feb 15;108(2):121–8.
122. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):224.
123. Yao Z, Xing L, Qin C, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursor interaction with bone matrix induces osteoclast formation directly by an interleukin-1-mediated autocrine mechanism. *J Biol Chem.* 2008 Apr 11;283(15):9917–24.
124. Li H, Hong S, Qian J, Zheng Y, Yang J, Yi Q. Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells. *Blood.* 2010 Jul 15;116(2):210–7.
125. Kiesel JR, Buchwald ZS, Aurora R. Cross-presentation by osteoclasts induces FoxP3 in CD8+ T cells. *J Immunol.* 2009 May 1;182(9):5477–87.
126. Marie P, Halbout P. OPG/RANKL: role and therapeutic target in osteoporosis. *Médecine Sci.* 2008 Jan;24(1):105–10.
127. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:397–440.
128. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997 Feb 20;385(6618):729–33.
129. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw.* 1995 Dec;6(4):225–30.
130. Chen X, Bäümel M, Männel DN, Howard OMZ, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007 Jul 1;179(1):154–61.
131. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature.* 1986 Feb 6;319(6053):516–8.
132. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct 15;89(20):9784–8.
133. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 1991 Dec;10(13):4025–31.
134. Bessis N, Guéry L, Mantovani A, Vecchi A, Sims JE, Fradelizi D, et al. The type II decoy receptor of IL-1 inhibits murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 2000 Mar;30(3):867–75.
135. Chizzolini C, Dayer J-M, Miossec P. Cytokines in chronic rheumatic diseases: is everything lack of homeostatic balance? *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):246.

136. Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, van De Loo FA, Heinegard D, van Den Berg WB. 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*. 1999 Nov 1;163(9):5049–55.
137. Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5986–90.
138. Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2003 May;42 Suppl 2:ii3–10.
139. Boissier M-C, Semerano L, Challal S, Saldenbergh-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun*. 2012 Sep;39(3):222–8.
140. Xu D, Jiang H-R, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 5;105(31):10913–8.
141. Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature*. 2011 Jul 7;475(7354):110–3.
142. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517.
143. Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2012 Jun;122(11):487–511.
144. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 1999 May;42(5):963–70.
145. Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Di Padova FE, et al. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol*. 2005 Jul;167(1):141–9.
146. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6173–7.
147. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:1–21.
148. Kishimoto T. Interleukin-6 and its receptor in autoimmunity. *J Autoimmun*. 1992 Apr;5 Suppl A:123–32.
149. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, et al. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med*. 1998 Feb 16;187(4):461–8.
150. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005 Oct 17;202(8):1131–9.
151. Hansmann L, Groeger S, von Wulffen W, Bein G, Hackstein H. Human monocytes represent a competitive source of interferon- α in peripheral blood. *Clin Immunol*. 2008 May;127(2):252–64.
152. Brassard DL, Grace MJ, Borden RW. Interferon- α as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol*. 2002 Apr 1;71(4):565–81.
153. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):36–49.

154. Thurlings RM, Boumans M, Tekstra J, van Roon JA, Vos K, van Westing DM, et al. Relationship between the type I interferon signature and the response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2010 Dec;62(12):3607–14.
155. Bokarewa M, Tarkowski A, Lind M, Dahlberg L, Magnusson M. Arthritogenic dsRNA is present in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients with an erosive disease course. *Eur J Immunol.* 2008 Nov;38(11):3237–44.
156. Ying F, Chalise JP, Narendra SC, Magnusson M. Type I IFN protects against antigen-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 2011 Jun;41(6):1687–95.
157. Corr M, Boyle DL, Ronacher LM, Lew BR, van Baarsen LG, Tak PP, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the beneficial effects of systemic interferon beta in mice: implications for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 May;70(5):858–63.
158. Genevay S, Hayem G, Verpillat P, Meyer O. An eight year prospective study of outcome prediction by antiperinuclear factor and antikeratin antibodies at onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002 Aug;61(8):734–6.
159. Amara K, Steen J, Murray F, Morbach H, Fernandez-Rodriguez BM, Joshua V, et al. Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *J Exp Med.* 2013 Mar 11;210(3):445–55.
160. Uysal H, Bockermann R, Nandakumar KS, Sehnert B, Bajtner E, Engström A, et al. Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J Exp Med.* 2009 Feb 16;206(2):449–62.
161. Trouw LA, Haisma EM, Levarht EWN, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Daha MR, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum.* 2009 Jul;60(7):1923–31.
162. Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, et al. 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.* 2008 Mar;58(3):678–88.
163. Van Beers JJBC, Schwarte CM, Stammen-Vogelzangs J, Oosterink E, Božič B, Pruijn GJM. The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and β -actin. *Arthritis Rheum.* 2013 Jan;65(1):69–80.
164. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr 12;344(15):1140–4.
165. Boackle SA. Complement and autoimmunity. *Biomed Pharmacother Biomed Pharmacothérapie.* 2003 Sep;57(7):269–73.
166. Bussone G, Mouthon L. Autoimmune manifestations in primary immune deficiencies. *Autoimmun Rev.* 2009 Feb;8(4):332–6.
167. Ballanti E, Perricone C, di Muzio G, Kroegler B, Chimenti MS, Graceffa D, et al. Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors. *Autoimmun Rev.* 2011 Aug;10(10):617–23.
168. Moffat GJ, Lappin D, Birnie GD, Whaley K. Complement biosynthesis in human synovial tissue. *Clin Exp Immunol.* 1989 Oct;78(1):54–60.
169. Neumann E, Barnum SR, Tarner IH, Echols J, Fleck M, Judex M, et al. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 2002 Apr;46(4):934–45.
170. Di Muzio G, Perricone C, Ballanti E, Kroegler B, Greco E, Novelli L, et al. Complement system and rheumatoid arthritis: relationships with autoantibodies,

- serological, clinical features, and anti-TNF treatment. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Jun;24(2):357–66.
171. Hietala MA, Nandakumar KS, Persson L, Fahlén S, Holmdahl R, Pekna M. Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. *Eur J Immunol*. 2004 Apr;34(4):1208–16.
 172. Wang Y, Rollins SA, Madri JA, Matis LA. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8955–9.
 173. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FMA, Boackle SA, et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):157–68.
 174. Banda NK, Takahashi K, Wood AK, Holers VM, Arend WP. Pathogenic complement activation in collagen antibody-induced arthritis in mice requires amplification by the alternative pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Sep 15;179(6):4101–9.
 175. Banda NK, Levitt B, Wood AK, Takahashi K, Stahl GL, Holers VM, et al. Complement activation pathways in murine immune complex-induced arthritis and in C3a and C5a generation in vitro. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jan;159(1):100–8.
 176. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1994 Oct 22;344(8930):1105–10.
 177. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):3959–64.
 178. Marti L, Scheinberg M. Anti-interleukin 6: first line in rheumatoid arthritis? *Clin Rheumatol*. 2009 Aug;28(8):877–9.
 179. Atzeni F, Benucci M, Sallì S, Bongiovanni S, Boccassini L, Sarzi-Puttini P. Different effects of biological drugs in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2013 Mar;12(5):575–9.
 180. Scott SD. Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Pract*. 1998 Jun;6(3):195–7.
 181. Nanda S. Therapy: Atacicept lacks clinical efficacy in RA. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jun;7(6):313–313.
 182. Fiocco U, Sfriso P, Oliviero F, Pagnin E, Scagliori E, Campana C, et al. Co-stimulatory modulation in rheumatoid arthritis: the role of (CTLA4-Ig) abatacept. *Autoimmun Rev*. 2008 Oct;8(1):76–82.
 183. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 1977 Sep 1;146(3):857–68.
 184. Yoo TJ, Kim SY, Stuart JM, Floyd RA, Olson GA, Cremer MA, et al. Induction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen. *J Exp Med*. 1988 Aug 1;168(2):777–82.
 185. Boissier MC, Feng XZ, Carlioz A, Roudier R, Fournier C. Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1987 Sep;46(9):691–700.
 186. Hegen M, Keith JC, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Nov;67(11):1505–15.

187. Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol*. 1992 Apr 1;148(7):2103–8.
188. Bajtner E, Nandakumar KS, Engström A, Holmdahl R. Chronic development of collagen-induced arthritis is associated with arthritogenic antibodies against specific epitopes on type II collagen. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(5):R1148–57.
189. Goldschmidt TJ, Holmdahl R. Anti-T cell receptor antibody treatment of rats with established autologous collagen-induced arthritis: suppression of arthritis without reduction of anti-type II collagen autoantibody levels. *Eur J Immunol*. 1991 May;21(5):1327–30.
190. Thiolat A, Semerano L, Pers YM, Biton J, Lemeiter D, Portales P, et al. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39+ regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2014 Feb;66(2):273–83.
191. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*. 1996 Nov 29;87(5):811–22.
192. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*. 1999 Nov 26;286(5445):1732–5.
193. Biton J, Semerano L, Delavallée L, Lemeiter D, Laborie M, Grouard-Vogel G, et al. Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Apr 1;186(7):3899–910.
194. Zhou F, He X, Iwakura Y, Horai R, Stuart JM. Arthritis in mice that are deficient in interleukin-1 receptor antagonist is dependent on genetic background. *Arthritis Rheum*. 2005 Dec;52(12):3731–8.
195. Brand DD. Rodent Models of Rheumatoid Arthritis. *Comp Med*. 2005;55(2):114–22.
196. Nandakumar KS, Andrén M, Martinsson P, Bajtner E, Hellström S, Holmdahl R, et al. Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory FcγRIIB. *Eur J Immunol*. 2003 Aug;33(8):2269–77.
197. Nandakumar KS, Holmdahl R. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):223.
198. Kagari T, Doi H, Shimoizato T. The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J Immunol*. 2002 Aug 1;169(3):1459–66.
199. Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. 1985 Oct;42(3):779–89.
200. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):973–83.
201. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991 May 30;351(6325):355–6.
202. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394–7.
203. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2014 Aug;14(8):546–58.
204. Oosting M, Cheng S-C, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschueren IC, et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 21;111(42):E4478–84.

205. Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DCG, et al. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol.* 2007 Jul;8(7):772–9.
206. Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science.* 2013 Mar 22;339(6126):1426–9.
207. Tohmé M, Manoury B. Intracellular Toll-like receptor recruitment and cleavage in endosomal/lysosomal organelles. *Methods Enzymol.* 2014;535:141–7.
208. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober H-J, Okamoto K, et al. Cathepsin K-Dependent Toll-Like Receptor 9 Signaling Revealed in Experimental Arthritis. *Science.* 2008 Feb 1;319(5863):624–7.
209. Matsumoto F, Saitoh S-I, Fukui R, Kobayashi T, Tanimura N, Konno K, et al. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 14;367(3):693–9.
210. Desnues B, Macedo AB, Roussel-Queval A, Bonnardel J, Henri S, Demaria O, et al. 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.* 2014 Jan 28;111(4):1497–502.
211. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000 Dec 7;408(6813):740–5.
212. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol.* 2006;7(1):49–56.
213. Silver AC, Arjona A, Walker WE, Fikrig E. The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity.* 2012 Feb 24;36(2):251–61.
214. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics.* 2003 Jan;81(1):85–91.
215. Török H-P, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology.* 2004 Jul;127(1):365–6.
216. Mockenhaupt FP, Hamann L, von Gaertner C, Bedu-Addo G, von Kleinsorgen C, Schumann RR, et al. Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *J Infect Dis.* 2006 Jul 15;194(2):184–8.
217. Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Mosconi I, Montagna M, Giaquinto C, et al. Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Transl Med.* 2010;8:49.
218. Roszak A, Lianeri M, Sowińska A, Jagodziński PP. Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Mol Biol Rep.* 2012 Aug;39(8):8425–30.
219. Tao K, Fujii M, Tsukumo S, Maekawa Y, Kishihara K, Kimoto Y, et al. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jul;66(7):905–9.
220. De Jager PL, Richardson A, Vyse TJ, Rioux JD. Genetic variation in toll-like receptor 9 and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006 Apr;54(4):1279–82.

221. Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw.* 2000 Sep;11(3):372–8.
222. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw.* 2000 Sep;11(3):362–71.
223. McKelvey KJ, Highton J, Hessian PA. Cell-specific expression of TLR9 isoforms in inflammation. *J Autoimmun.* 2011 Feb;36(1):76–86.
224. Collins B, Wilson IA. Crystal structure of the C-terminal domain of mouse TLR9. *Proteins.* 2014 May 30;
225. Lee BL, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol.* 2014 Jan 14;
226. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lupp A, Lipford GB, Wagner H, et al. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol.* 2004 Sep 1;34(9):2541–50.
227. Onji M, Kanno A, Saitoh S-I, Fukui R, Motoi Y, Shibata T, et al. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat Commun.* 2013;4:1949.
228. Lee S, Kang D, Ra EA, Lee TA, Ploegh HL, Park B. Negative self-regulation of TLR9 signaling by its N-terminal proteolytic cleavage product. *J Immunol.* 2014 Oct 1;193(7):3726–35.
229. Guerrier T, Pochard P, Lahiri A, Youinou P, Pers J-O, Jamin C. TLR9 expressed on plasma membrane acts as a negative regulator of human B cell response. *J Autoimmun.* 2014 Feb 25;
230. Chockalingam A, Cameron JL, Brooks JC, Leifer CA. Negative regulation of signaling by a soluble form of toll-like receptor 9. *Eur J Immunol.* 2011 Aug;41(8):2176–84.
231. Chockalingam A, Brooks JC, Cameron JL, Blum LK, Leifer CA. TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol Cell Biol.* 2009 Apr;87(3):209–17.
232. Lee BL, Moon JE, Shu JH, Yuan L, Newman ZR, Schekman R, et al. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *eLife.* 2013;2:e00291.
233. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 2004 Feb;5(2):190–8.
234. Mouchess ML, Arpaia N, Souza G, Barbalat R, Ewald SE, Lau L, et al. Transmembrane Mutations in Toll-like Receptor 9 Bypass the Requirement for Ectodomain Proteolysis and Induce Fatal Inflammation. *Immunity.* 2011 Nov;35(5):721–32.
235. Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Rycyzyn MA, Mills J, Sarisky RT, et al. Toll-Like Receptor 9 Can Be Expressed at the Cell Surface of Distinct Populations of Tonsils and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Infect Immun.* 2004 Dec;72(12):7202–11.
236. Dasari P, Nicholson IC, Hodge G, Dandie GW, Zola H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol.* 2005 Jul;236(1–2):140–5.
237. Lee J, Mo J-H, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu Y-T, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2006 Dec;8(12):1327–36.
238. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop.* 1991 Jan;(262):3–11.
239. Lamphier MS, Sirois CM, Verma A, Golenbock DT, Latz E. TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1082:31–43.

240. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:709–60.
241. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 15;90(24):11995–9.
242. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity.* 2008 Mar;28(3):315–23.
243. Yasuda K, Rutz M, Schlatter B, Metzger J, Lippa PB, Schmitz F, et al. CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of “natural” phosphodiester DNA. *Eur J Immunol.* 2006 Feb;36(2):431–6.
244. Rigby RE, Webb LM, Mackenzie KJ, Li Y, Leitch A, Reijns MAM, et al. RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. *EMBO J.* 2014 Feb 10;
245. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med.* 2004 Jun 21;199(12):1631–40.
246. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y-H, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007 Oct 4;449(7162):564–9.
247. Lindau D, Rönnefarth V, Erbacher A, Rammensee H-G, Decker P. Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 2011 Mar;41(3):669–81.
248. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):104–7.
249. Ries M, Schuster P, Thomann S, Donhauser N, Vollmer J, Schmidt B. Identification of novel oligonucleotides from mitochondrial DNA that spontaneously induce plasmacytoid dendritic cell activation. *J Leukoc Biol.* 2013 Jul;94(1):123–35.
250. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology Baltim Md.* 2011 Sep 2;54(3):999–1008.
251. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009 Nov;15(11):1318–21.
252. Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007 May;8(5):487–96.
253. Popovic PJ, DeMarco R, Lotze MT, Winikoff SE, Bartlett DL, Krieg AM, et al. High mobility group B1 protein suppresses the human plasmacytoid dendritic cell response to TLR9 agonists. *J Immunol.* 2006 Dec 15;177(12):8701–7.
254. Scharfe-Nugent A, Corr SC, Carpenter SB, Keogh L, Doyle B, Martin C, et al. TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia. *J Immunol.* 2012 Jun 1;188(11):5706–12.
255. El Kebir D, József L, Filep JG. Neutrophil recognition of bacterial DNA and Toll-like receptor 9-dependent and -independent regulation of neutrophil function. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008 Feb;56(1):41–53.
256. Chamilos G, Gregorio J, Meller S, Lande R, Kontoyiannis DP, Modlin RL, et al. Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. *Blood.* 2012 Nov 1;120(18):3699–707.

257. Lahoud MH, Ahmet F, Zhang J-G, Meuter S, Policheni AN, Kitsoulis S, et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2;109(40):16270–5.
258. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu Y-J, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004 Oct 1;173(7):4433–42.
259. Agrawal S, Gupta S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J Clin Immunol*. 2011 Feb;31(1):89–98.
260. Miles K, Heaney J, Sibinska Z, Salter D, Savill J, Gray D, et al. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 17;109(3):887–92.
261. Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, et al. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur J Immunol*. 2003 Nov;33(11):3164–74.
262. El Kebir D, József L, Pan W, Wang L, Filep JG. Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling. *J Immunol*. 2009 Apr 1;182(7):4386–94.
263. ElKebir D, Damlaj A, Filep JG. Toll-like receptor 9 signaling delays neutrophil apoptosis by increasing transcription of mcl-1. *PloS One*. 2014 Jan 22;9(1):e87006.
264. Whitmore MM, DeVeer MJ, Edling A, Oates RK, Simons B, Lindner D, et al. Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res*. 2004 Aug 15;64(16):5850–60.
265. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2005 Dec 19;202(12):1715–24.
266. Ghosh TK, Mickelson DJ, Solberg JC, Lipson KE, Inglefield JR, Alkan SS. TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF- α . *Int Immunopharmacol*. 2007 Aug;7(8):1111–21.
267. Jaen O, Petit-Teixeira E, Kirsten H, Ahnert P, Semerano L, Pierlot C, et al. No evidence of major effects in several Toll-like receptor gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R5.
268. Huang Q-Q, Pope RM. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2009 Oct;11(5):357–64.
269. Hu F, Li Y, Zheng L, Shi L, Liu H, Zhang X, et al. Toll-like receptors expressed by synovial fibroblasts perpetuate Th1 and th17 cell responses in rheumatoid arthritis. *PloS One*. 2014;9(6):e100266.
270. Etem EO, Elyas H, Ozgocmen S, Yıldırım A, Godekmerdan A. The investigation of toll-like receptor 3, 9 and 10 gene polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*. 2011 Oct;31(10):1369–74.
271. Thwaites R, Chamberlain G, Sacre S. Emerging Role of Endosomal Toll-Like Receptors in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2014;5:1.
272. Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Apr 15;186(8):4794–804.
273. Monach PA, Hueber W, Kessler B, Tomooka BH, BenBarak M, Simmons BP, et al. 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*. 2009 Sep 15;106(37):15867–72.
274. Veiko NN, Shubaeva NO, Ivanova SM, Speranskii AI, Lyapunova NA, Spitkovskii DM. Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bull Exp Biol Med*. 2006 Sep;142(3):313–6.
 275. Takami M, Kim N, Rho J, Choi Y. Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J Immunol*. 2002 Aug 1;169(3):1516–23.
 276. Zou W, Schwartz H, Endres S, Hartmann G, Bar-Shavit Z. CpG oligonucleotides: novel regulators of osteoclast differentiation. *FASEB*. 2002 Mar;16(3):274–82.
 277. Krisher T, Bar-Shavit Z. Regulation of osteoclastogenesis by integrated signals from toll-like receptors. *J Cell Biochem*. 2014 Dec;115(12):2146–54.
 278. Mills KHG. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Dec;11(12):807–22.
 279. Wu H-J, Sawaya H, Binstadt B, Brickelmaier M, Blasius A, Gorelik L, et al. Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1911–22.
 280. Alzabin S, Kong P, Medghalchi M, Palfreeman A, Williams R, Sacre S. 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*. 2012;14(3):R142.
 281. Hayashi T, Gray CS, Chan M, Tawatao RI, Ronacher L, McGargill MA, et al. Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2764–9.
 282. Deng GM, Nilsson IM, Verdrengh M, Collins LV, Tarkowski A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):702–5.
 283. Ronaghy A, Prakken BJ, Takabayashi K, Firestein GS, Boyle D, Zvaifler NJ, et al. Immunostimulatory DNA sequences influence the course of adjuvant arthritis. *J Immunol*. 2002 Jan 1;168(1):51–6.
 284. Svelander L, Erlandsson Harris H, Lorentzen JC, Trollmo C, Klareskog L, Bucht A. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce T cell-dependent arthritis in rats. *Arthritis Rheum*. 2004 Jan 1;50(1):297–304.
 285. Miyata M, Kobayashi H, Sasajima T, Sato Y, Kasukawa R. Unmethylated oligo-DNA containing CpG motifs aggravates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2000 Nov;43(11):2578–82.
 286. Hoffmann MH, Skriner K, Herman S, Baumann C, Steiner C-W, Ospelt C, et al. Nucleic acid-stimulated antigen-presenting cells trigger T cells to induce disease in a rat transfer model of inflammatory arthritis. *J Autoimmun*. 2011 May;36(3-4):288–300.
 287. Zeuner RA, Ishii KJ, Lizak MJ, Gursel I, Yamada H, Klinman DM, et al. Reduction of CpG-induced arthritis by suppressive oligodeoxynucleotides. *Arthritis Rheum*. 2002 Aug;46(8):2219–24.
 288. Zeuner RA, Verthelyi D, Gursel M, Ishii KJ, Klinman DM. Influence of stimulatory and suppressive DNA motifs on host susceptibility to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Jun;48(6):1701–7.
 289. Dong L, Ito S, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressing oligonucleotides protect against collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1686–9.
 290. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):417–28.

291. Santiago-Raber M-L, Dunand-Sauthier I, Wu T, Li Q-Z, Uematsu S, Akira S, et al. Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice. *J Autoimmun.* 2010 Jun;34(4):339–48.
292. Christensen SR, Kashgarian M, Alexopoulou L, Flavell RA, Akira S, Shlomchik MJ. Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med.* 2005 Jul 18;202(2):321–31.
293. Nickerson KM, Christensen SR, Shupe J, Kashgarian M, Kim D, Elkon K, et al. TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J Immunol.* 2010 Feb 15;184(4):1840–8.
294. Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, et al. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005 May 15;174(10):6129–36.
295. Erbacher AIM, Rönnefarth VM, Decker P. Circulating nucleosomes due to a defective clearance of dying cells: Consequences for systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2007 Jan 1;40(4):311–4.
296. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity.* 2006 Sep;25(3):383–92.
297. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science.* 2001 Nov 16;294(5546):1540–3.
298. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 Mar 15;184(6):3284–97.
299. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011 Mar 9;3(73):73ra19.
300. Baumann CL, Aspalter IM, Sharif O, Pichlmair A, Blüml S, Grebien F, et al. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *J Exp Med.* 2010 Nov 22;207(12):2689–701.
301. Lee T-P, Huang JC, Liu C-J, Chen H-J, Chen Y-H, Tsai Y-T, et al. Interactions of surface-expressed TLR-4 and endosomal TLR-9 accelerate lupus progression in anti-dsDNA antibody transgenic mice. *Exp Biol Med Maywood NJ.* 2014 Apr 9;
302. Pierer M, Wagner U, Rossol M, Ibrahim S. Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice. *PloS One.* 2011;6(8):e23539.
303. Theiner G, Rössner S, Dalpke A, Bode K, Berger T, Gessner A, et al. TLR9 cooperates with TLR4 to increase IL-12 release by murine dendritic cells. *Mol Immunol.* 2008 Jan;45(1):244–52.
304. Zucchini N, Bessou G, Traub S, Robbins SH, Uematsu S, Akira S, et al. Cutting edge: Overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 May 1;180(9):5799–803.
305. Breitner S, Störkel S, Reichel W, Loos M. 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.* 1995 Apr;38(4):492–8.
306. Trouw LA, Daha N, Kurreeman F a. S, Böhringer S, Goulielmos GN, Westra HJ, et al. Genetic variants in the region of the C1q genes are associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2013 Jul;173(1):76–83.

307. Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 May 15;158(10):4525–8.
308. Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Sep 1;191(5):2647–56.
309. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Apr 1;188(7):3522–31.
310. Heinz HP, Rubin K, Laurell AB, Loos M. Common epitopes in C1q and collagen type II. *Mol Immunol*. 1989 Feb;26(2):163–9.
311. Heinz HP, Brackertz D, Loos M. Enzymatic alteration of C1q, the collagen-like subcomponent of the first component of complement, leads to cross-reactivity with type II collagen. *FEBS Lett*. 1988 Feb 15;228(2):332–6.
312. Trinder PK, Maeurer MJ, Stoerkel SS, Loos M. Altered (oxidized) C1q induces a rheumatoid arthritis-like destructive and chronic inflammation in joint structures in arthritis-susceptible rats. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Feb;82(2):149–56.
313. Ghiran I, Tyagi S-R, Klickstein LB, Nicholson-Weller A. Expression and function of C1q receptors and C1q binding proteins at the cell surface. *Immunobiology*. 2002 Sep;205(4-5):407–20.
314. Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*. 2000 Aug;49(1-2):159–70.
315. Crockard AD, Thompson JM, Malhotra R, McNeill TA. Increased expression of C1q receptors on neutrophils from inflammatory joint fluids. *Immunol Lett*. 1993 May;36(2):195–201.
316. Sawada T, Kanzaki T, Hashimoto S, Suzuki A, Yamada R, Odawara M, et al. Citrullinated antigens as C1q-binding and monoclonal rheumatoid factor (mRF)-binding peptides in synovial fluids from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2009 Dec;27(6):989–92.
317. Haag S, Schneider N, Mason DE, Tuncel J, Andersson IE, Peters EC, et al. Identification of new citrulline-specific autoantibodies, which bind to human arthritic cartilage, by mass spectrometric analysis of citrullinated type II collagen. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2014 Jun;66(6):1440–9.
318. Sakkas LI, Bogdanos DP, Katsiari C, Platsoucas CD. Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis-relevance to treatment. *Autoimmun Rev*. 2014 Nov;13(11):1114–20.
319. Rönnelid J, Klareskog L. Local versus systemic immunoreactivity to collagen and the collage-like region of C1q in rheumatoid arthritis and SLE. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1995;101:57–61.
320. Trinder PK, Maeurer MJ, Brackertz D, Loos M. The collagen-like component of the complement system, C1q, is recognized by 7 S autoantibodies and is functionally impaired in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Immunology*. 1996 Mar;87(3):355–61.
321. Monach PA, Hueber W, Kessler B, Tomooka BH, BenBarak M, Simmons BP, et al. 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*. 2009 Sep 15;106(37):15867–72.

ANNEXES

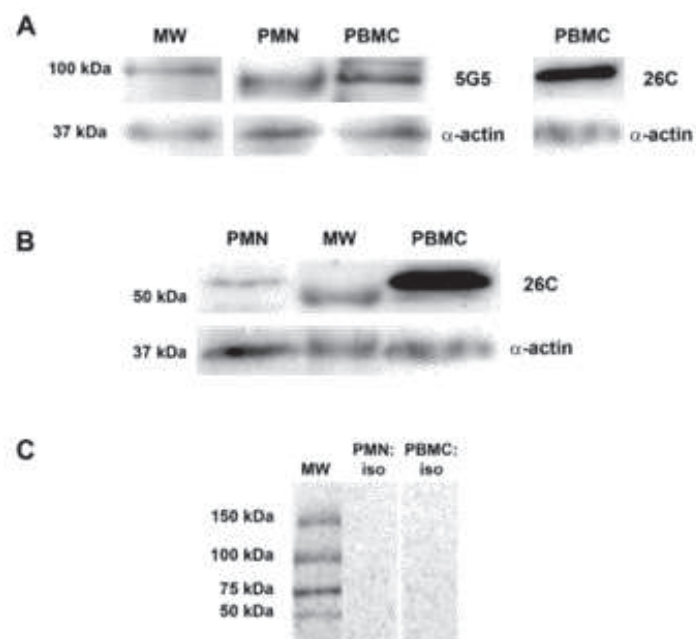
**I. Annexe 1 : figures et informations supplémentaires relatives
à l'article 1 : Primary blood neutrophils express a functional cell
surface Toll-like receptor 9**

Online supporting information

Supporting Materials and methods. The following mAb (from BD Biosciences if not stated) and secondary antibodies conjugated with different fluorochromes were used for flow cytometry analyses: anti-human CD3-PerCP (clone SK7), CD11b-PE (ICRF44), CD19-APC (HIB19), CD56-PE (B159), CD66b-FITC (G10F5), anti-human/mouse TLR9 (5G5, purified, AbD Serotec or FITC-conjugated, Abcam), anti-human/mouse N-terminal region of TLR9 (26C593, recognizes an epitope between amino acids 268-284 in the ectodomain, Abcam), GAM-IgG-PE (Jackson ImmunoResearch) and anti-mouse CD11b-PE (M1/70), Ly-6G-FITC (1A8), F4/80-APC (BM8, eBioscience), CD3-FITC (145-2C11, SouthernBiotech), B220-PE (RA3-6B2).

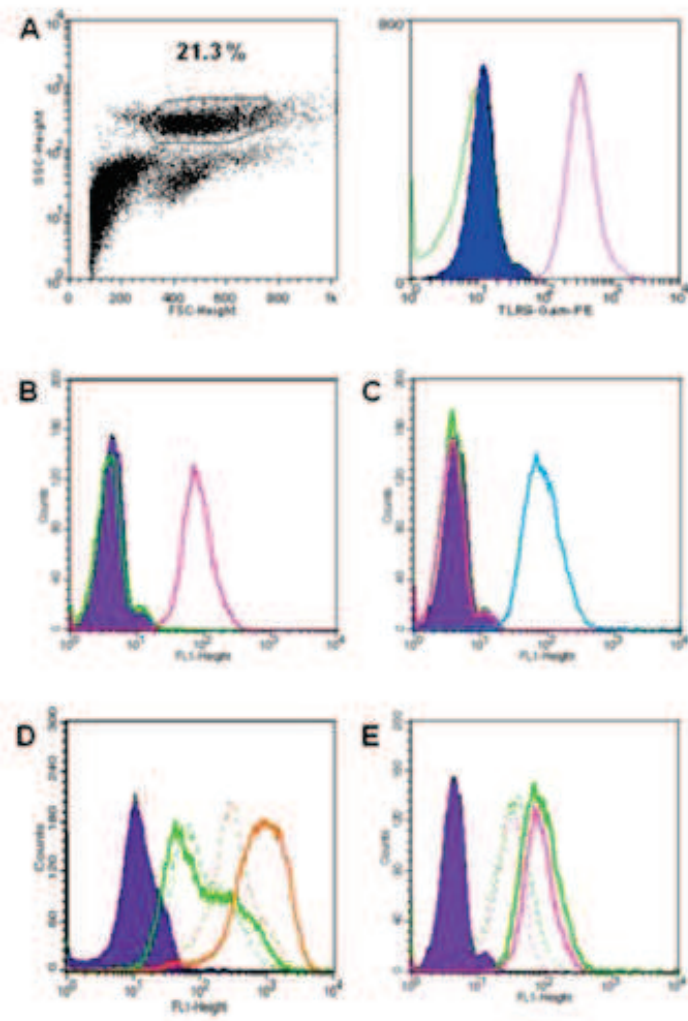
Supporting information Figure 1. The mAb 26C593 is specific for TLR9 and recognizes the N-terminal region of TLR9. Several studies have used this monoclonal antibody and have demonstrated its specificity for TLR9 (e.g., Droemann *et al.*, *Respir. Res.*, 2005, 6:1; Tabeta *et al.*, *Nature Immunol.*, 2006, 7:156), the latter reporting the absence of signal upon staining of macrophages from TLR9-knockout mice. Nevertheless, we have confirmed the antibody specificity by Western blot. Total cell lysates have been prepared on ice from freshly isolated human neutrophils and PBMCs in cold lysis buffer (0.025 M Tris pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1 % NP-40, 5 % glycerol, supplemented with a protease inhibitor cocktail) for 30 minutes. Samples were then centrifuged at 13,000 g, 4° C for 10 minutes and supernatants were harvested. Protein contents were measured by the Bradford method. Samples (25 µg total proteins) were separated on an 8 % SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). After saturation with TBS containing 0.05 % Tween 20 and 5 % non-fat milk, membranes were incubated (overnight, 4° C) with either the 5G5 (7.5 µg/ml) or the 26C593 (26C, 6 µg/ml) monoclonal antibodies or the isotype controls. After washing with TBS-Tween, bound antibodies were detected using a goat anti-mouse secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:6,000, ThermoFisher Scientific, 1 hour at room temperature) and revealed with ECL reagents (ThermoFisher Scientific) using an imaging system (ChemiDoc MP, Bio-Rad). After stripping (62.5 mM Tris pH 6.7, 2% SDS, 98.5 mM 2-ME, 30 min at 55° C), membranes were incubated with an anti-actin antibody (1:500, Santa Cruz, loading control) and a donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000, BioLegend) and revealed as described above. (A) Immunoblotting with 5G5 revealed the expected band at ~ 100 kDa (full-length TLR9) in cell lysates from both PMNs and PBMCs (upper panel) and at similar levels according to the loading control (lower panel). When PBMC lysates were immunoblotted with 26C (right lane) instead of 5G5, the same band was revealed indicating that the 26C mAb does recognize TLR9. (B) 26C recognizes the N-terminal region of TLR9. The active form of TLR9 results from the cleavage

at position 471, generating the active C-terminal fragment (expected size of ~ 62 kDa) and an N-terminal fragment (expected size of ~ 52 kDa). The latter is inactive and should be intracellular and not at the cell surface as it lacks the transmembrane domain. Immunoblotting with 26C revealed the expected fragment of ~ 52 kDa in cell lysates from both PMNs and PBMCs (upper panel). Therefore, TLR9 is processed in both PMNs and PBMCs. (C) Stainings with 5G5 and 26C are specific. Cell lysates from PMNs or PBMCs were immunoblotted with the corresponding isotype controls (iso) instead of mAb. Results are from three independent Western blots using cell lysates from independent donors. In each panel, lanes have been selected from the same experiment and at the same exposure. MW, molecular weight markers.



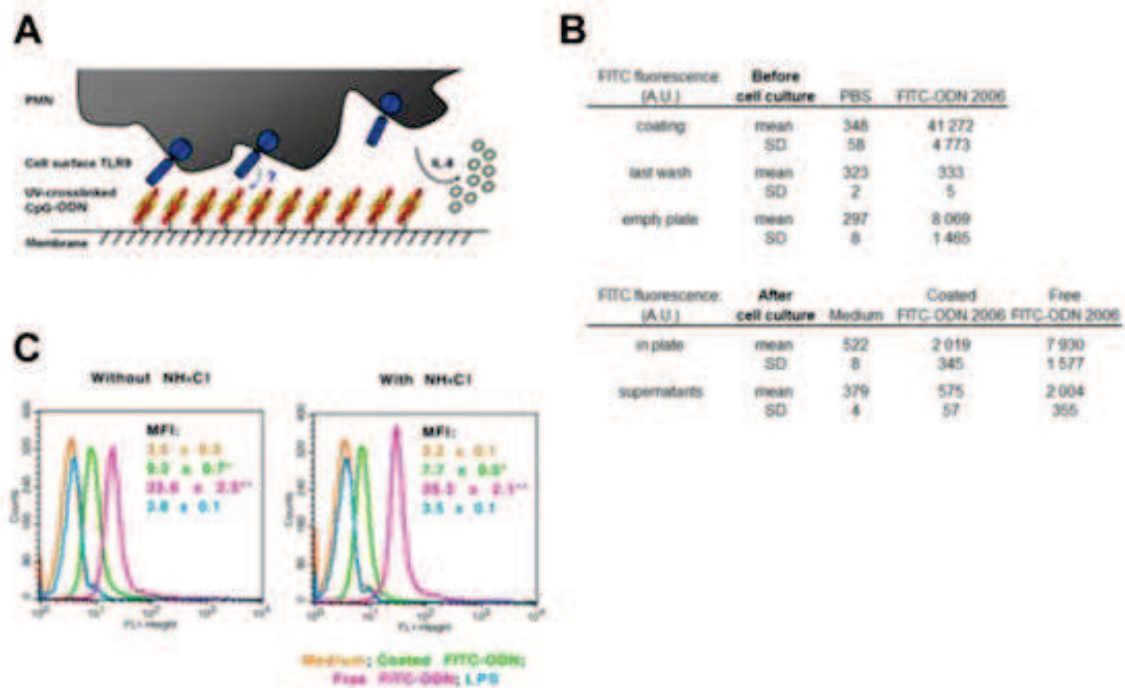
Supporting information Figure 2. TLR9 is present at the cell surface of human PMNs.

(A) Untouched PMNs in whole blood were analyzed ex-vivo upon red blood cell lysis. PMNs were gated and the percentage of PMNs in whole blood is indicated (left panel). Fresh whole blood cells were directly stained at 4° C for cell surface TLR9 (without permeabilization) and analyzed by flow cytometry as described in Figure 1, except that we used a purified anti-TLR9 mAb (5G5) in combination with a GAM-IgG-PE (Jackson ImmunoResearch, right panel). Blue histogram, unstained cells; green histogram, isotype control; pink histogram, TLR9 staining. (B-E) Isolated human PMNs were analyzed by flow cytometry in the presence/absence of trypan blue. (B) The PMN preparation was highly pure according to CD66b staining. Blue histogram, unstained cells; green histogram, isotype control; pink histogram, CD66b staining. (C) PMNs were stained at 4° C for cell surface TLR9. Blue histogram, unstained cells; green histogram, isotype control; pink histogram, anti-FITC antibody alone; open blue histogram, TLR9 staining (anti-TLR9-FITC 5G5 mAb in combination with the anti-FITC-Alexa Fluor 488 antibody). (D) Trypan blue does not inhibit intracellular FITC fluorescence. PMNs were incubated at 37° C with FITC-nucleosomes (green histograms) and an anti-CD66b-FITC (orange histograms) mAb to measure the endocytic activity in the absence (bold histograms) or presence (dashed histograms) of trypan blue. (E) Trypan blue decreases the fluorescence intensity of surface TLR9 (green histograms) and CD66b (pink histograms) staining. PMNs were stained at 4° C for cell surface TLR9 and CD66b in the absence (bold histograms) or presence (dashed histograms) of trypan blue. Data are representative of five independent experiments using PMNs from independent donors.



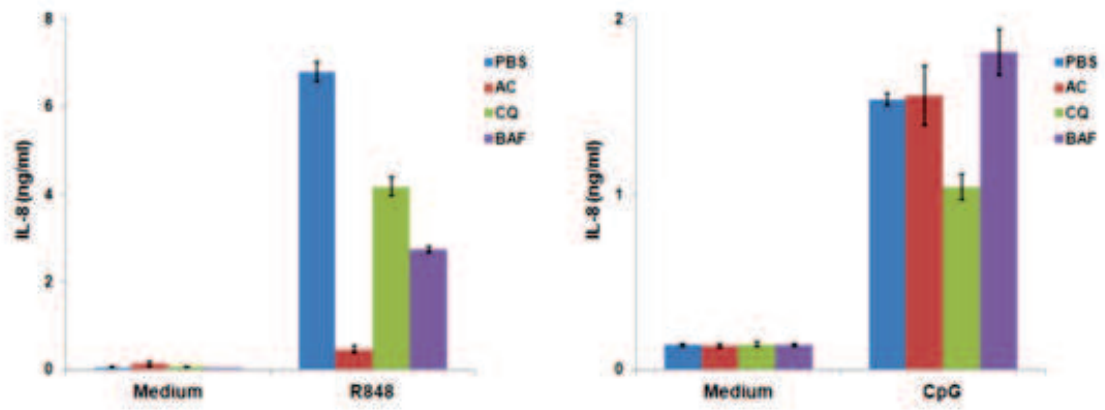
Supporting information Figure 3. TLR9 expressed at the cell surface of neutrophils is functional. (A) Scheme explaining the approach used to specifically trigger the cell surface TLR9. The FITC-CpG-ODN 2006 was cross-linked by UV irradiation into a cell culture plate so that it cannot reach endosomal TLR9. Plates were washed and then incubated with isolated PMNs. Cell activation via the cell surface TLR9 was estimated by measuring IL-8 secretion. (B) UV-treated nitrocellulose plates were incubated with PBS or FITC-CpG-ODN 2006 in PBS (upper panel, before cell culture). The efficiency of the ODN cross-linking was verified by measuring the FITC fluorescence in the plate (coating), in the last wash and in the empty plate after washing using a fluorometer (A.U., arbitrary units). Wells incubated with the FITC-ODN displayed a strong fluorescence, as expected (upper part, “coating”). The plate was washed three times to eliminate unbound CpG-ODNs and the fluorescence in the last wash was measured. No FITC fluorescence was detected in the last wash (upper part), confirming that all free CpG-ODNs were removed. The empty plate was then measured to estimate the amount of CpG-ODNs remaining in the wells (upper part), showing that the ODN was covalently bound to the wells. Human PMNs were then isolated from healthy individuals and cultured in the cross-linked plate (lower panel, after cell culture) for 16 hours. As a control, cells were activated with free (non-cross-linked) FITC-CpG-ODN 2006 or LPS (5 ng/ml). The FITC fluorescence was measured in the plate and in the cell culture supernatants. The cross-linked ODN was still detectable in the cell culture after overnight incubation (lower part, “in plate”) and the fluorescence was much stronger in the presence of the free ODN, indicating that the latter was present at a higher concentration. The fluorescence background was the same in medium and in medium supplemented with LPS (not shown). Only a slight signal was detected in the cell culture supernatants for the cross-linked ODN (lower part), suggesting that only a minority of the ODN is released and that most of it is still nitrocellulose-bound. A stronger signal was detected for the free (not cross-linked) ODN, indicating that part of it was still in solution. Shown is one representative

experiment. (C) Cultured PMNs were also analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence in the absence (left panel) or presence (right panel) of ammonium chloride (NH_4Cl). The impact of ammonium chloride on the FITC fluorescence was estimated by a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test; * $p = 0.029$, ** $p < 0.001$. Representative flow cytometry histograms are shown. MFI are indicated (mean \pm SD of triplicates).



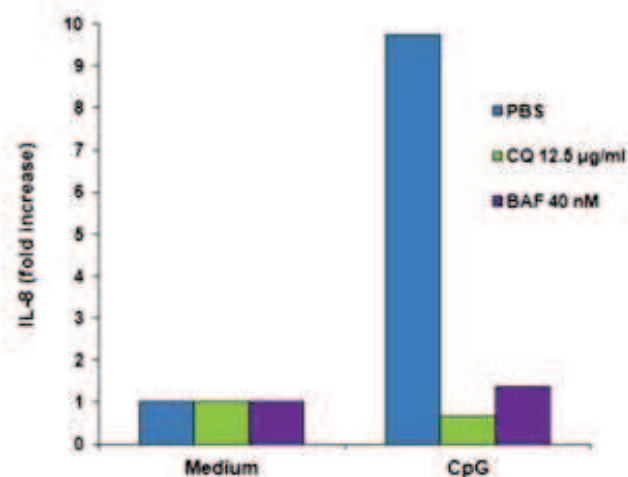
Supporting information Figure 4. Neutrophil surface TLR9 is not inhibited by bafilomycin A1. Isolated PMNs were cultured in medium supplemented with PBS, AC, chloroquine (CQ, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) or bafilomycin A1 (BAF, 40 nM, Sigma). Cells were stimulated or not with 0.25 $\mu\text{g/ml}$ R848 (left panel) or 2.5 μM free CpG-ODN (right panel) and activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Data are representative of three independent experiments using PMNs isolated from three independent donors. Shown are means \pm SD of triplicates.

R848-induced IL-8 secretion was prevented by BAF in PMNs, indicating that endosomal acidification was inhibited. Blocking endosomal acidification by BAF did not inhibit activation by CpG-ODN, confirming that TLR9 can signal from the cell surface. In the presence of CQ, both R848-induced and CpG-ODN-induced PMN activation were partially inhibited. However, it is known that CQ not only inhibits endosomal acidification but also inhibits TLR9 by other mechanisms. Indeed, CQ (in contrast to BAF) inhibits the binding of CpG-DNA to TLR9 (Rutz *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 2004, 34:2541). Moreover, CQ binds to nucleic acids and masks the TLR-binding epitope, resulting in TLR inhibition independently of the inhibition of endosomal acidification in contrast to BAF (Kuznik *et al.*, *J. Immunol.*, 2011, 186:4794). CQ is therefore not helpful to distinguish endosomal from surface TLR9 activity. Those findings support our results and the presence of an active cell surface TLR9 which may be inhibited by CQ.

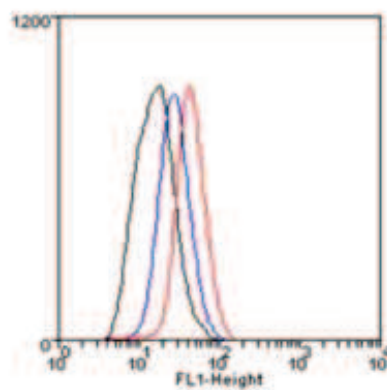


Supporting information Figure 5. Bafilomycin A1 and chloroquine inhibit TLR9 signaling in PBMCs. To verify that bafilomycin A1 (BAF) and chloroquine (CQ) are able to block TLR9 signaling in cells other than PMNs using the same experimental conditions, PBMCs were freshly isolated from the healthy donors depicted in Figure S4 and cultured in the same conditions (in medium supplemented with PBS, CQ (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or BAF (40 nM)). Cells were stimulated or not with 2.5 μM free CpG-ODN 2006 and activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Data are representative of three independent experiments using PBMCs isolated from three independent donors. IL-8 induction is depicted as fold increase.

In PBMCs, TLR9 signaling in response to CpG-ODN is completely inhibited by CQ or BAF, whereas it was not inhibited in PMNs (Figure S4), indicating that the CpG-ODN concentration used can be inhibited. TLR9 can therefore signal from the cell surface in PMNs, supporting the recent finding that TLR9 mutations leading to cell surface expression of TLR9 result in fatal inflammation in vivo (Mouchess et al., *Immunity*, 2011, 35:721).



Supporting information Figure 6. Nucleosomes up-regulate also endosomal TLR9 in PMNs. PMNs were isolated from healthy donors and cultured with different concentrations of nucleosomes. After 16 hours, cells were permeabilized, stained for intracellular TLR9 (clone 5G5) and analyzed by flow cytometry as described in Fig. 1. A typical flow cytometry histogram showing the nucleosome-induced up-regulation of intracellular TLR9 in human PMNs is depicted. TLR9 expression was measured in untreated PMNs (black histogram) and PMNs stimulated with 5 or 20 $\mu\text{g/ml}$ nucleosomes (blue and red histograms, respectively).



II. Annexe 2 : figures et informations supplémentaires relatives à l'article n°4 : TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen.

Online publication only**Materials and Methods**

Chromatin purification. The same endotoxin concentration (as determined using a Limulus Amebocyte Lysate assay (BioWhittaker)) was measured in purified nucleosomes and in the empty gradient loaded with the purification buffer. There is no difference in protein sequence between core histones from calf, human and mouse. Moreover, we have previously demonstrated that nucleosomes purified with this protocol do not contain detectable amounts of the HMGB1 protein and that nucleosome-induced PMN activation occurs in a HMGB1-independent manner (Rönnefarth *et al.*, *J. Immunol.*, 2006, 177:7740).

Cell isolation and culture. Heparin- or EDTA-blood from random healthy individuals or patients was used. Human PMN and PBMC were concomitantly freshly isolated by density centrifugation through dextran as described previously (Rönnefarth *et al.*, *J. Immunol.*, 2006, 177:7740) and the two layers containing either PMN (lower layer) or PBMC (top) were harvested. Alternatively, when starting from higher blood volumes to get more cells, PBMC were isolated by classical density centrifugation through Ficoll. Human experiments were approved by the Tübingen ethics committee (reference 386/2006V). Alternatively, blood samples were obtained from the blood bank of Bobigny. Patients fulfilled the American College of Rheumatology criteria and informed consents were collected. **RA patients, ethics protocol, clinical data.** Mouse experiments were approved by the local ethics committee (Regierungspräsidium Tübingen, § 4 Abs. 3).

The phenotype of human (defined as CD3⁺, CD14^{low}, CD16^{high}, CD19⁻, CD56⁻, CD123⁻, CD11b⁻, CD66b⁻ cells) and mouse PMN (defined as F4/80⁺, CD3⁻, B220⁻, CD11b⁻, Ly-6G^{high}

cells) was estimated by flow cytometry. The purity was > 95 % of living cells and no contaminating PDC were detected.

Cells were cultured in RPMI 1640 medium (BioWhittaker) supplemented with 10 % FCS (PAA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (both from Gibco) and 50 µM 2-ME (Roth). G-CSF (50 ng/ml, ImmunoTools) was added to mouse PMN. Cells ($1-1.5 \times 10^6$ cells/ml) were incubated in medium alone or activated with purified nucleosomes, the purification buffer as negative control, IFN- α (4,000 U/ml, R&D Systems), CpG-oligonucleotides (CpG-ODN, 2006 or 1826, 2 µM, Metabion), R848 (0.5 µg/ml, Alexis) and LPS (5 ng/ml, from *Salmonella typhimurium*, Sigma). In some cases, human PMN were pre-incubated in the presence of polymyxin B (25 µg/ml, Fluka), G-CSF (50 ng/ml, Immunotools) or GM-CSF (1,000 U/ml, Immunotools) for 30 min at 37° C.

cDNA synthesis and quantitative RT-PCR analysis. For quantitative PCR analysis of mRNA levels, total RNA was isolated from 2×10^6 PMN with Trizol reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's protocol. RNA template was treated with DNase I (amplification grade) and reverse-transcribed into cDNA by using Superscript II Reverse Transcriptase (both from Invitrogen). Prior to PCR, the resulting cDNA samples were treated for 30 minutes at 37 °C with four units of RNase H (Ambion). The quantity and quality of the isolated RNA was established by UV spectroscopy and by the ability of the sample to be linearly amplified in a serial dilution with the low abundance housekeeping gene porphobilinogen deaminase (PBGD). mRNA levels were determined with a PRISM 7000 sequence detection system with SYBR Green (both from Applied Biosystems) as the fluorophore and the following oligonucleotide primers (SA Biosciences): 5'-tgaagacttcaggcccaactg-3' (TLR9, forward), 5'-tgcacggtcaccaggtgt-3' (TLR9, reverse), 5'-tgtgctctacaggtgtgga-3' (RIG-I, forward), 5'-cactgggatctgattcgcaaaa-3' (RIG-I, reverse), 5'-

caacatgggcagtgattcagg-3' (MDA-5, forward), 5'-tgggcaactccatttggaag-3' (MDA-5, reverse), 5'-aacatgcagctacaattccaga-3' (DAI, forward), 5'-agtctcgggtcacatctttgc-3' (DAI, reverse), 5'-cacttgatgcttgcctc-3' (STING, forward), 5'-gccacgttgaaattccctttt-3' (STING, reverse), 5'-tgctgcacaaaagtctctcc-3' (AIM2, forward), 5'-ctgcttgccttcttgggtct-3' (AIM2, reverse), 5'-cttgaaggacagacatgactttgga-3' (IFN- α 2, forward), 5'-ggatggttcagccttttga-3' (IFN- α 2, reverse), 5'-atgaccaacaagtctctctcc-3' (IFN- β , forward), 5'-gctcatggaaagagctgtagt-3' (IFN- β , reverse). Quantitative PCR data were analyzed with 7000 Systems SDS Software v1.2.3 (Applied Biosystems) and checked for correct amplification and dissociation of the products. mRNA levels were normalized to PBGD mRNA levels and were calculated according to the cycle threshold method.

Flow cytometry. All incubations were carried out at 4° C for 30 minutes. Cells were analyzed on a FACSCalibur apparatus with CELLQuest software (Becton Dickinson). Donors having more than 2.5 % of IFN- α -positive PMN after activation but no IFN- α -positive PMN without activation were considered positive, provided that IFN- α -positive PMN formed a distinct cell population.

NETosis. Isolated PMN were seeded on glass coverslips coated with poly-L-Lysine (0.001 %, Sigma). After settling, cells were stimulated for 3 hours, washed and fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 minutes. Slides were washed with PBS, blocked for 25 minutes in 2 % BSA/2% goat serum/0.2 % Triton X-100 in PBS and washed again. Slides were then incubated overnight with an anti-H2A-H2B-DNA mAb (clone PL2-3 (Losman *et al.*, J. Immunol., 1992, 148:1561), provided by Dr. Jürgen Dieker, Nephrology Research Laboratory, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands) at 4° C and with a goat anti-mouse IgG secondary antibody conjugated to

Alexa 647 (eBioscience) for 45 minutes at room temperature. Slides were finally washed, incubated with Sytox Green (Invitrogen) to stain the DNA and analyzed by confocal microscopy using a Zeiss LSM 510 microscope.

ELISA. Cytokine secretion by PMN was analyzed by sandwich ELISA using mAb pairs and streptavidin-peroxidase conjugate from BD Biosciences (IL-8, TNF- α), Bender MedSystems (human IFN- α), R&D Systems (MIP-2), BioLegend (IL-6) or Thermo Fisher Scientific (mouse IFN- α). Cytokine concentrations in supernatants are depicted as mean \pm standard deviation of triplicates.

Statistical analysis. The proportions of donors with IFN- α -positive PMN upon activation with chromatin among healthy donors and SLE patients were compared using a Fisher Exact Test with $\alpha = 0.05$. mRNA levels in untreated and activated PMNs were compared using a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test (LPS, CpG and R848 were compared to medium whereas nucleosome concentrations were compared to the empty gradient). The SigmaStat software was used and *p* values < 0.05 were considered significant.

Table S1. Characteristics of SLE patients.

	Sex	Age	SLEDAI	ANA	anti-DNA	anti-ENA	Therapy	Organ involvement					
								kidney	skin	joint	CNS	blood	heart
SLE01	M	63	0	+++	134	-	MMF, Pred	+	+				+
SLE02	F	30	4	+++	-	-	Qu, Pred		+	+			+
SLE03	F	36	2	+++	251	-	Aza, Qu, Pred		+	+	+		
SLE04	F	45	0	+++	98	-	Lef, Pred	+	+		+		+
SLE05	F	55	1	++	-	-	Pred	+					+
SLE06	F	46	5	++	-	-	Pred	+	+				+
SLE07	F	42	0	+++	-	-	Aza, Pred	+	+				+
SLE08	F	42	8	++	-	(+)	Aza, Pred				+		+
SLE09	F	46	1	+++	-	+	Aza, Pred	+		+			+
SLE10	F	68	2	+++	-	-	Qu, Pred		+	+			
SLE11	M	27	2	+++	-	+	Aza, Pred		+				+
SLE12	F	61	8	++	-	-	MMF, Pred	+	+		+		
SLE13	F	26	0	+++	140	-	Pred	+		+			
SLE14	F	57	2	++	53	-	Pred	+	+	+			
SLE15	F	63	2	+++	240	-	MMF, Pred	+	+	+			+

SLE, systemic lupus erythematosus; SLEDAI, SLE disease activity index; ANA, anti-nuclear antibody titer; anti-DNA, anti-double-stranded DNA antibody titer (IU/ml); anti-ENA, anti-extractable nuclear antigen antibody titer; CNS, central nervous system; MMF, mycophenolate mofetil; Pred, prednisolone; Qu, hydroxychloroquine, Aza, azathioprine; Lef, leflunomide.

Figure S1. Phenotype of PMN and PBMC in total leukocytes (A-C), immunogenicity of purified nucleosomes (D) and phenotype/purity of isolated PMN (E). (A-E) Human leukocytes were freshly isolated by dextran centrifugation. (A) The two layers corresponding to either PMN (gate G1) or PBMC (gate G2) were pooled. (B-C) PMN (upper panels) and PBMC (lower panels) were characterized by flow cytometry upon staining of cell surface molecules with specific mAb or the corresponding isotype controls. The percentage of cells positive or with high expression (CD11b, CD16, CD14) in G1 or G2 is indicated. PMN and PBMC show the expected phenotypes. The leukocyte population contained 40-50 % of PMN (CD66b⁺CD123⁺ cells), 0.5 % of CD123⁺CD14⁺ cells (most of them are PDC) and 8 % of monocytes (CD14^{high}CD66b⁻ cells). Grey histogram, isotype control; open histogram, antibody staining. (D) To exclude the presence of endotoxins in purified nucleosomes, isolated PMN were cultured with different stimuli in the presence or absence of polymyxin B, a LPS inhibitor. Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Nucleosome induced PMN activation, which was not inhibited by polymyxin B. On the contrary, LPS-induced activation was completely inhibited by polymyxin B. As expected, activation by the CpG-ODN or R848 was not influenced by polymyxin B, indicating that purified nucleosomes do not contain endotoxins. Results are representative of ten independent experiments. In D, results are the mean of triplicates and standard deviations are indicated. (E) Phenotype and purity of isolated human PMN. PMN were freshly isolated from peripheral blood and stained with mAb specific for CD66b and CD11b or the corresponding isotype controls. Cells were analyzed by flow cytometry and the percentage of PMN is indicated. Horizontal and vertical lines represent staining with isotype controls. CD66b⁺CD11b⁺ cells are non-activated PMN. Upon activation, PMN have the following phenotype: CD66b^{high}CD11b^{high} (not shown). The experiment was performed forty times. See Figure 1 and main text for abbreviations.

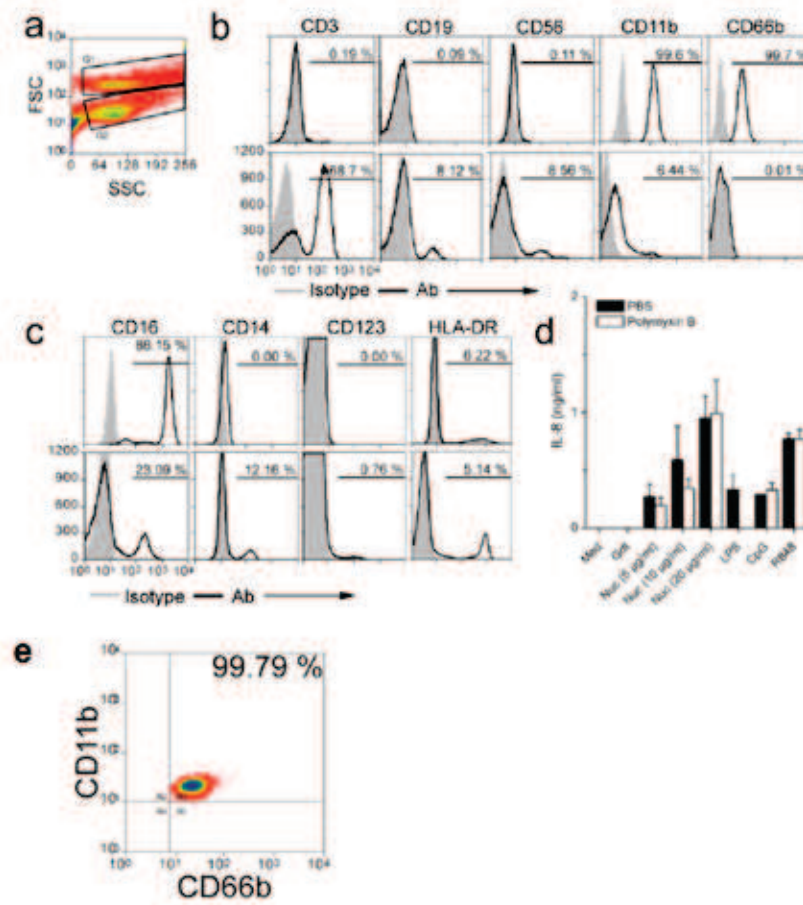


Figure S1

Figure S2. Analysis of IFN- α -producing cells among the different cell populations in PBL. Cells were cultured in medium only (Med) or supplemented with the purification buffer, nucleosomes, the CpG-ODN 2006 (CpG), LPS or R848 and analyzed as in Figure 1. Results show the percentages of IFN- α -positive cells among PMN, monocytes and PDC in the respective gate. Nucleosomes and oligonucleotides containing unmethylated CpG sequences (CpG-ODN) were the best inducers of IFN- α in PMN, PDC and monocytes (depicted are the percentages of IFN- α -producing cells in each individual cell population). IFN- α induction was low in response to LPS (a TLR4 ligand) and usually low or moderate with R848 (a TLR7/8 ligand).

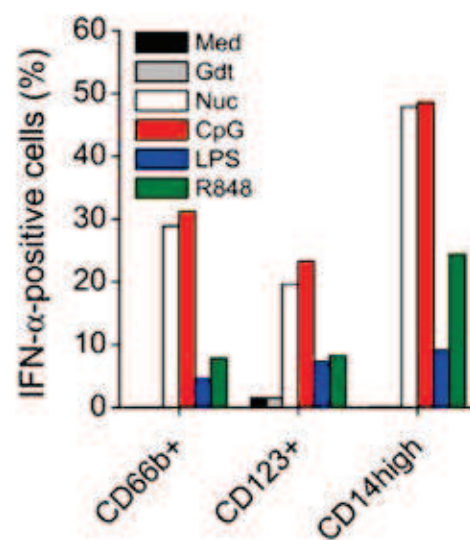


Figure S2

Figure S3. Isolated lupus PMN produce IFN- α in response to chromatin or TLR9 agonists. (A) PMN were freshly isolated from SLE patients and cultured with different stimuli (Nuc, 5 μ g/ml) as in Figure 2. Cells were analyzed by flow cytometry as in Figure 1 A. The upper and lower panels show cells double-stained with mAb specific for IFN- α and CD66b or the corresponding isotype controls, respectively. Numbers indicate the percentages of IFN- α -positive PMN. (B) The results from A (upper panel) are summarized and show several nucleosome concentrations. (C) The extent of PMN activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. (D) IFN- α secretion was confirmed by measuring the IFN- α concentration in cell culture supernatants by ELISA. In B-D, results are the mean of triplicates and standard deviations are indicated. Results show a representative lupus patient from eight independent experiments using four different nucleosome preparations (except for D, four independent experiments). See Figure 1 for abbreviations.

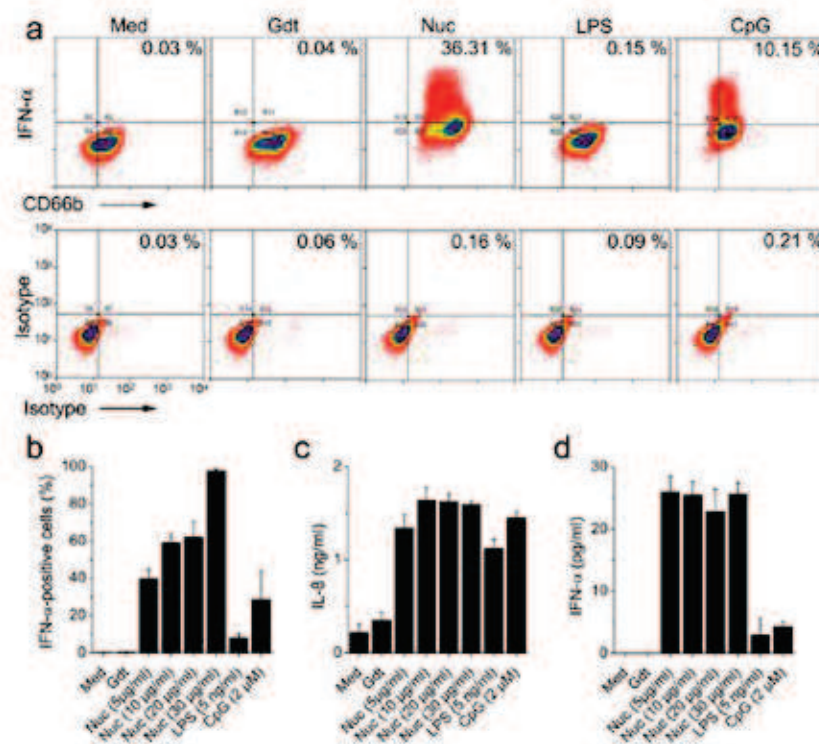


Figure S3

Figure S4. Isolated PMN up-regulate type I IFN at the mRNA level and secrete a bioactive type I IFN. (A, B) Chromatin induces a significant up-regulation of type I IFN. PMN were isolated from ten healthy donors and stimulated with different stimuli for 15 hours. IFN- α (A) and IFN- β (B) mRNA levels were analyzed by quantitative RT-PCR and normalized to porphobilinogen deaminase (PBGD) mRNA levels. Results (depicted as fold increase (each dot represents one donor) with mean \pm SD) are from ten experiments on ten independent donors and were compared using a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test. $p < 0.05$ for all stimuli except Nuc 2.5 (A) and Nuc 2.5, Nuc 5 and LPS (B). (C, D) Chromatin stimulates PMN isolated from 3 healthy donors (HD, C) and 3 rheumatoid arthritis (RA, D) patients to produce a bioactive form of type I IFN. Total type I IFN secretion was determined after 15 hours (except for panel D bottom, 5 hours) using an IFN bioassay and luciferase reporter assay as described previously (Jiang et al., Nature Immunol., 2005, 6:565). Cell culture supernatants were over-layed on ISRE-L929 IFN reporter cells and incubated for 4-6 hours. The reporter cells were lysed in Passive Lysis Buffer (Promega), mixed with firefly luciferin substrate (Biosynth) and measured in a luminometer. Results are from six experiments on six independent donors. See Figure 1 for abbreviations. Shown are means and SD of triplicates.

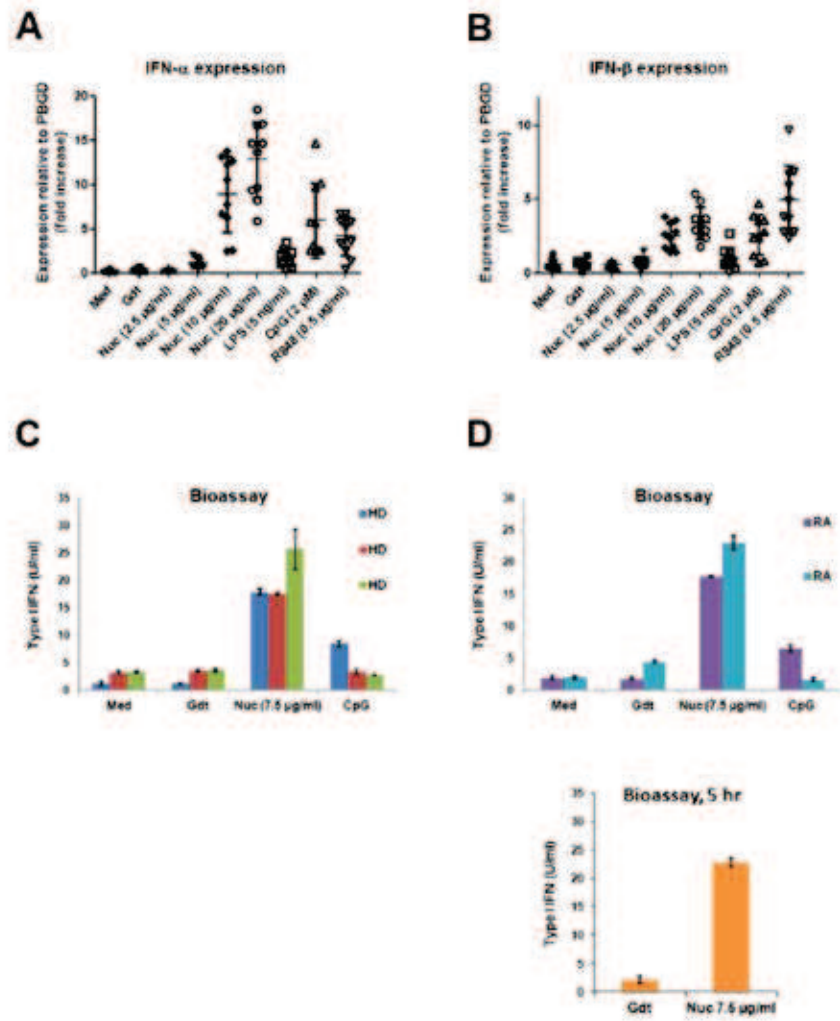


Figure S4

Figure S5. Chromatin-induced type I IFN production by PMN occurs independently of immune complex formation. (A) Boiled nucleosomes, but not boiled aggregated IgG, lose their IFN-stimulatory activity. Isolated human PMN were activated by nucleosomes (Nuc) or purified IgG pre-treated at 63° C to mimic immune complexes (aggregated IgG, agg. IgG). The different stimuli were either used native or after treatment at 95° C. Type I IFN induction was estimated in the cell culture supernatants using the cell reporter system described in online Figure S4. (B) The residual activity of boiled aggregated IgG is not due to the presence of endotoxins. PMN were pre-incubated with or without the LPS inhibitor polymyxin B and cultured. IFN production was measured as described above. The LPS activity was completely lost in the presence of polymyxin B whereas the activity of aggregated IgG was not affected.

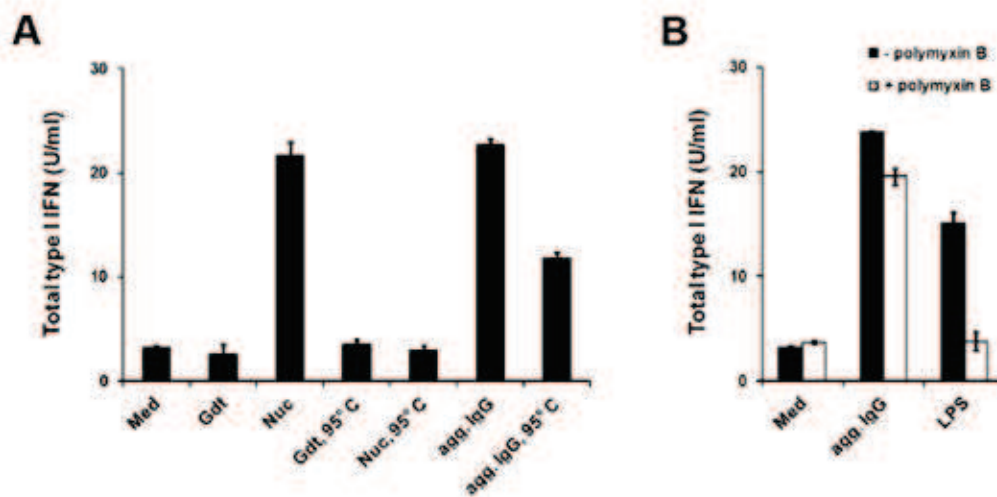


Figure S5

Figure S6. Comparative analysis of IFN-I production by human blood PMN and PDC. PMN (isolated by density centrifugation) and PDC (isolated by BDCA4 positive selection from PBMC using MACS magnetic beads) were both cultured at 10^6 cells/ml and cultured in medium alone or supplemented with CpG-ODN. Type I IFN induction was estimated in the cell culture supernatants as described in online Figure S4. Shown are the means and SD from three independent experiments using different donors.

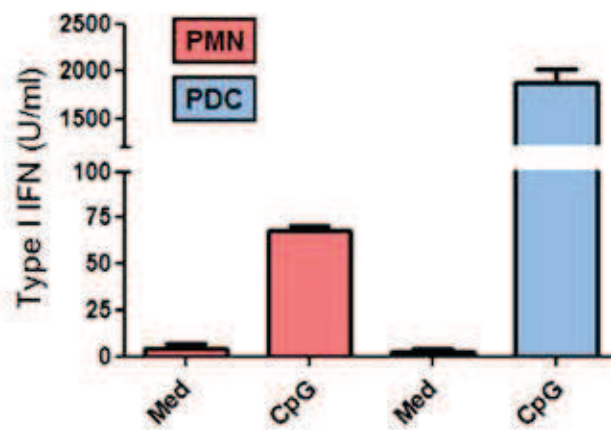


Figure S6

Figure S7. Influence of IFN- α on IFN-I production by human blood PMN. Isolated PMN were cultured in medium alone or activated with purified nucleosomes (Nuc) in the absence/presence of IFN- α (IFN). Type I IFN induction was estimated in the cell culture supernatants as described in online Figure S4. Results are from two independent experiments. Shown are the means and SD of triplicates from one representative donor.

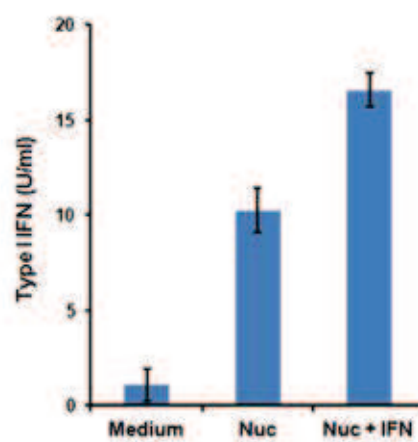


Figure S7

Figure S8. Purified mouse neutrophils secrete type I IFN upon activation. PMN were purified from the bone marrow by Ly-6G positive selection and cultured in medium alone (Med) or activated with different stimuli (CpG-ODN 1826, 4 μ M; R848, 0.5 μ g/ml; poly I:C, 20 μ g/ml (PharmaTech); PMA, 20 ng/ml (Calbiochem)). Cell activation was estimated by measuring CD11b up-regulation (A) and ROS production (B) by flow cytometry, by assessing NO₂⁻ production by a chemical reaction (C) and by analyzing cytokine production by ELISA (D). Intracellular ROS production was assessed with dihydrorhodamine 123 (Sigma) which becomes fluorescent upon oxidation during a respiratory burst. To detect nitrites, cell culture supernatants were mixed with Griess reagent (Promega) and the absorbance was read at 550 nm. For other methods, see main text. (E) Total type I IFN secretion by stimulated mouse PMN was determined as in online Figure S4 using the cell reporter assay. CpG-ODN, R848 and PMA induce PMN activation and type I IFN secretion, in contrast to poly I:C. Indeed, PMN do not express TLR3. Poly I:C can only activate PMN when transfected in order to trigger cytoplasmic RNA helicases. MFI, mean fluorescence intensity.

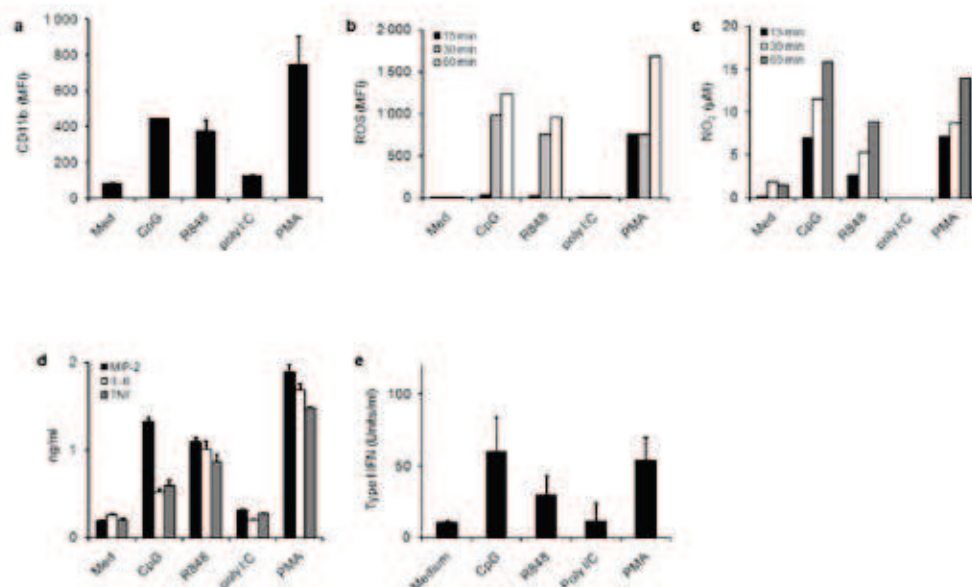


Figure S8

Figure S9. Phenotype and purity of PMN isolated from WT and TLR9-KO mice. PMN were purified from the bone marrow by Ly-6G positive selection. (A) Cells were stained with specific mAb or the corresponding isotype controls and analyzed by flow cytometry. The percentage of PMN (purity) and the percentage of cells positive for each marker is indicated. WT and TLR9-deficient PMN have the same phenotype. (B) A representative PMN enrichment is shown. The percentage of PMN (Ly-6G^{high}CD11b⁺ cells) is indicated. The box contains PMN according to the staining with isotype controls. The experiment was performed three times.

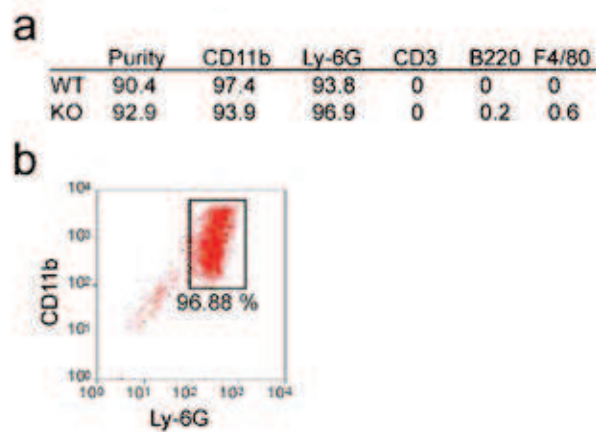


Figure S9

Figure S10. Chromatin does not up-regulate RNA sensors in PMN. PMN were isolated from ten independent healthy donors and cultured with different stimuli. MDA-5 (A) and RIG-I (B) gene expression was analyzed at the mRNA level by quantitative RT-PCR. mRNA levels were normalized to PBGD mRNA levels. The results are depicted as fold increase (each dot represents one donor) with mean \pm SD. They are from ten independent experiments and were compared using a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test. $p < 0.05$ for R848 only.

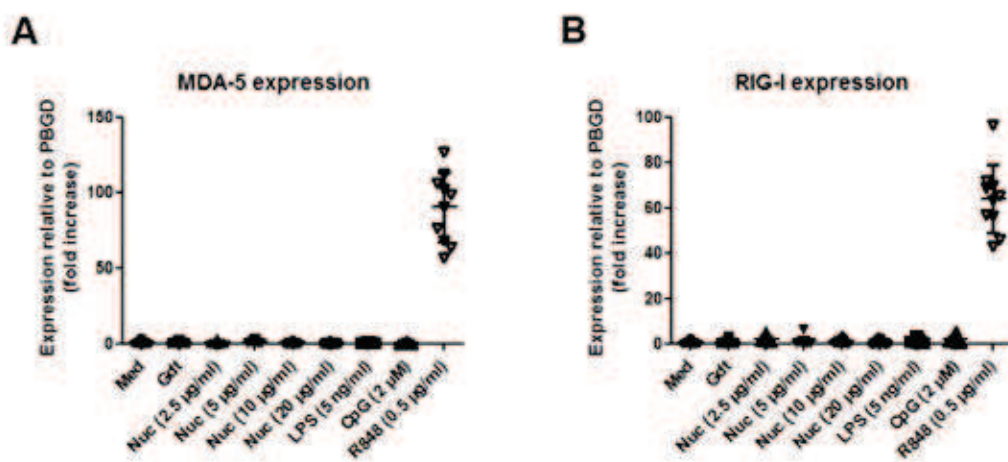


Figure S10

Figure S11. Scheme of the current model (blue arrows) and our new model (red arrows) explaining how IFN- α is produced in SLE patients. In the current model, impaired clearance of late apoptotic cells leads to secondary necrosis and the release of nucleosomes in the extracellular milieu. Circulating nucleosomes are recognized by MDC and induce MDC activation, which in turn favors the break of peripheral tolerance by stimulating Th lymphocytes and subsequently B lymphocytes. The latter secrete autoantibodies yielding immune complexes which deposit into tissues and induce inflammation and tissue damages upon activation of the complement system. Moreover, DNA/RNA-containing immune complexes stimulate PDC to secrete IFN- α which enhances MDC differentiation/activation, the break of tolerance and tissue damages. This mechanism is promoted by platelets and natural killer cells. Our model suggests that upon nucleosome release by late apoptotic cells and nucleosome accumulation in the circulation due to inefficient clearance by the complement protein C1q and/or DNase1, circulating nucleosomes not only activate MDC but also directly stimulate PMN to secrete IFN- α (initiation phase). PMN represent thus a primary source of IFN- α which directly triggers MDC differentiation/activation, the break of tolerance and consequently the secretion of autoantibodies and the production of immune complexes as described above. Anew the latter induce inflammation and tissue damages whereas some of them stimulate PDC to secrete IFN- α at a later step (perpetuation phase). PDC are therefore also involved in this model where they sustain MDC differentiation/activation, the break of tolerance and tissue damages, representing thus an amplification loop. Moreover, PMN-derived IFN- α perpetuates the inflammatory process and tissue damages. IFN- α secretion by PMN upon activation by free nucleosomes is therefore an earlier and triggering event occurring before chromatin-containing immune complexes are formed and before PDC are activated. Later, NETosis (or “netting” PMN) may be involved in a positive-feedback loop. DC, dendritic cells.

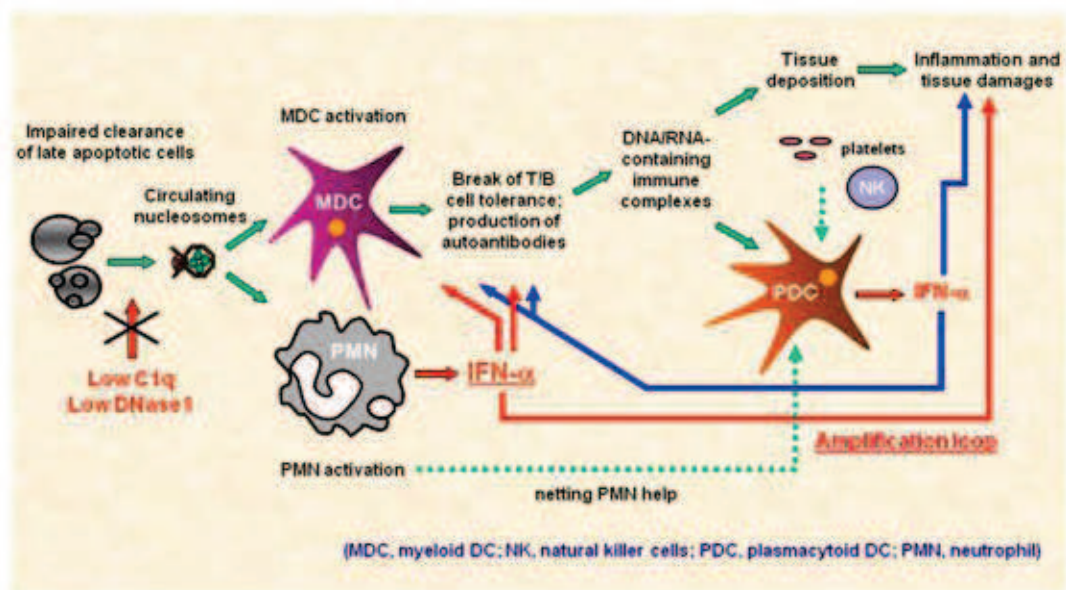


Figure S11