



Etude de l'efficacité des stratégies d'immunothérapies actives anti-cytokine et évaluation des conséquences de la vaccination anti-TNF dans des modèles infectieux

Nadia Belmellat-Bouadi

► To cite this version:

Nadia Belmellat-Bouadi. Etude de l'efficacité des stratégies d'immunothérapies actives anti-cytokine et évaluation des conséquences de la vaccination anti-TNF dans des modèles infectieux. Biologie moléculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCD028 . tel-01818519

HAL Id: tel-01818519

<https://theses.hal.science/tel-01818519>

Submitted on 19 Jun 2018

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.

UNIVERSITÉ PARIS 13, SORBONNE PARIS CITÉ

UFR SANTE-MÉDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

Année 2016

THESE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13

Discipline: Biologie, mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Etude de l'efficacité des stratégies d'immunothérapies actives anti-cytokine
et évaluation des conséquences de la vaccination anti-TNF dans des modèles
infectieux**

Présentée et soutenue publiquement par

Nadia BELMELLAT-BOUADI

Le Jeudi 3 novembre 2016

Jury

Pr Denis Mulleman (Université de Tours)	Rapporteur
Dr Loïc Guillot (INSERM UMR S938)	Rapporteur
Dr Lhousseine Touqui (Institut Pasteur)	Examineur
Pr Etienne Carbonnelle (Université Paris 13)	Examineur
Dr Eric Assier (Université Paris 13)	Co- encadrant
Pr Marie-Christophe Boissier (Université Paris 13)	Directeur

**Travail réalisé au sein de l'UMR 1125 INSERM « Physiopathologie, cibles et thérapies
de la polyarthrite rhumatoïde » à Bobigny.**

Je dédie cette thèse

A la mémoire de mon père

Tu restes toujours dans mon esprit et dans mon cœur

A ma très chère maman

Merci pour l'amour et la tendresse dont tu m'as toujours entouré

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse et directeur du laboratoire Marie-Christophe Boissier. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Merci pour toutes les discussions scientifiques enrichissantes.

Ma reconnaissance s'adresse également à mon encadrant, le Dr Eric Assier. Merci pour tes conseils, ta disponibilité et ton écoute. Merci de m'avoir donné la chance d'effectuer mon stage de M2 avec toi et de m'avoir fait confiance pour la suite.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à mes collaborateurs notamment le Dr Bernhard Ryffel. Sans lui, ce travail n'aurait jamais vu le jour ! Merci de m'avoir accueilli chaleureusement dans votre laboratoire pour réaliser mes manip. Merci pour votre patience et votre encadrement. Vos qualités humaines et scientifiques m'ont beaucoup aidé à réussir mon projet. Merci pour cette belle aventure.

Je remercie les membres de mon jury : le Pr Denis Mulleman et le Dr Loïc Guillot pour le temps et l'intérêt qu'ils ont accordé en évaluant ce travail. Un grand merci au Pr Etienne Carbonnelle et au Dr Lhousseine Touqui qui ont gentiment accepté d'être examinateurs.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire Li2P (notamment Delphine, Roxane, Magali, Anne, Mylène, Luca) et toutes les personnes avec qui j'ai partagé de bons moments (Sarrah, Benjamin, Kasia).

Je tiens aussi à remercier les membres de ma famille, ma sœur et à mon frère pour leur soutien et encouragement.

Et pour finir, j'adresse mes remerciements à mon mari Salim. Tu es toujours présent pour m'aider, m'orienter et m'écouter. Merci d'être là pour t'occuper de notre petite princesse Thiziri pendant que moi je rédige et je travaille sur mon projet de thèse.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	4
SOMMAIRE	6
ABREVIATIONS.....	11
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	17
INTRODUCTION	19
Partie 1 : La polyarthrite rhumatoïde.....	20
I. Histoire et facteurs.....	20
A. Histoire de la polyarthrite rhumatoïde	20
B. Données épidémiologiques	20
C. Caractéristiques cliniques de la polyarthrite rhumatoïde	21
D. Diagnostic et évolution de la pathologie	23
E. La polyarthrite rhumatoïde : maladie multifactorielle	24
1. Les facteurs génétiques	25
a. Incidence familiale	25
b. CMH et PR.....	25
2. Les facteurs environnementaux.....	27
a. Rôle du tabac	27
b. Agents viraux et infectieux	28
c. Facteurs hormonaux et contraceptifs oraux	29
d. Vitamine D	29
II. Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	30
A. Inflammation de la membrane synoviale et populations cellulaires impliquées.....	30
1. Les macrophages	31
2. Les lymphocytes T	32
3. Les lymphocytes Th17	36
4. Les lymphocytes T régulateurs	38
5. Les lymphocytes T CD8+	39
6. Les lymphocytes B	41
B. Destruction ostéo-cartilagineuse	44
1. Les synoviocytes de type B	44
2. Les ostéoclastes	45
III. Rôle des cytokines dans la polyarthrite rhumatoïde	49
A. Le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α).....	49

1. Histoire	49
2. Structure du TNF- α	50
3. Rôle physiologique et pathologique du TNF	51
a. Rôle du TNF dans la PR	53
i. Chez les patients PR	53
ii. Dans les modèles expérimentaux d'arthrite	55
b. Autres maladies TNF dépendantes	56
i. Maladies inflammatoires intestinales	56
ii. Choc septique	56
iii. Spondylarthrite ankylosante	57
iv. Le psoriasis	57
v. Les maladies respiratoires	58
vi. Les maladies du système nerveux central	58
vii. Les maladies rénales	59
viii. Les maladies cardiovasculaires	59
B. Rôle des autres cytokines dans la PR	59
IV. Place de l'angiogenèse dans la PR	62
A. Les facteurs de l'angiogenèse	63
1. Vascular endothelial growth factor (VEGF)	63
a. VEGF-A	64
b. VEGF-B	65
c. VEGF-C	65
d. VEGF-D	66
e. VEGF-E	66
f. VEGF-F	67
g. Les angiopoïétines	67
h. Placental growth factor (PIGF)	67
2. Les récepteurs du VEGF	69
a. VEGF-R1	69
b. VEGF-R2	69
c. VEGF-R3	70
d. Les neuropilines	70
B. Rôle et mécanismes de l'angiogenèse dans la PR	71

V. Prise en charge thérapeutique de la PR	73
A. Les traitements classiques	73
B. Les biothérapies et les traitements anti-cytokines	73
1. Les biothérapies ciblant le TNF- α	74
a. Anticorps monoclonaux anti-TNF- α	75
b. Récepteur soluble du TNF- α	75
c. Effets secondaires des biothérapies anti-TNF- α	77
2. Autres biothérapies	78
C. Immunothérapies actives anti-cytokines	79
1. Principe	79
2. Vaccination anti-cytokine entière	82
a. Vaccination anti-TNF- α	82
b. Vaccination contre d'autres cytokines	84
3. Vaccination anti-peptides de cytokine	84
Partie 2 : Susceptibilité aux infections sous traitements anti-TNF-α	85
A. <i>Listeria monocytogenes</i>	85
1. Découverte de <i>L. monocytogenes</i>	86
2. Manifestations cliniques de la listériose	87
3. Dissémination intracellulaire et mode d'infection	88
4. Rôle du TNF et mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte en réponse à l'infection par <i>Listéria</i>	89
B. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	92
1. Infection par <i>M. tuberculosis</i>	93
2. Place du TNF- α dans la réponse immunitaire au cours de l'infection par <i>M. tuberculosis</i>	96
3. Effets de la neutralisation du TNF- α et la tuberculose	97
OBJECTIFS	99
RESULTATS	101
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	163
I. Inhibition de l'angiogenèse et efficacité dans l'arthrite	164
A. Les traitements anti-VEGF	164
B. Mode d'action et efficacité des vaccins peptides anti-VEGF	166
C. Comparaison de différentes stratégies d'inhibition du VEGF	168

II. Vaccination anti-TNF : efficacité et effets secondaires.....	169
A. Vaccination anti-TNF dans les modèles d'arthrites	170
B. Vaccination anti-TNF dans des modèles infectieux.....	171
III. Biothérapies anti-TNF et la stratégie vaccinale anti-TNF : Les mécanismes d'actions	
.....	177
REFERENCES	182

ABREVIATIONS

ACPA	Anticorps anti-protéines citrullinées
Ac	Anticorps
ACR	American College of Rheumatology
AEC	Arthrite expérimentale au collagène
Ag	Antigène
AIA	Arthrite induite par adjuvant
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
Ang	Angiopoïétine
BCR	B cell receptor
CIIf	Collagène de type II bovin
CAIA	Arthrite induite par des anticorps anti-collagène
CD	Cluster de différenciation
CE	Cellule endothéliale
CFA	Adjuvant complet de Freund
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CRP	Protéine C réactive
CTLA-4	Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques
DMARDS	Disease-modifying anti-rheumatic drugs
DC	Cellule dendritique

EAE	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
Ebi3	Epstein-Barr virus-induced gene 3
EC	Cellule endothéliale
EGF	Endothelial growth factor
EULAR	EUropean League Against Rheumatisms
FGF	Fibroblast growth factor
FR	Facteur rhumatoïde
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Gp130	Glycoprotéine 130
HLA	Human leukocyte antigen
Hsp	Heat shock protein
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase
Ig	Immunoglobuline
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IL-12Rβ2	Chaîne bêta du récepteur de l'IL-12
IL-6Rαs	Chaîne alpha soluble du récepteur de l'IL-6
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IWHS	Iowa Women's Health Study
iTreg	T régulateur induit

Jak	Janus family kinase
KDR	Kinase domain receptor
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
KO	Knock-out
LES	Lupus érythémateux systémique
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LT-α	Lymphotoxine α
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
mDC	Cellule dendritique myéloïde
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MIP	Macrophage-inflammatory protein
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MTX	Méthotrexate
NF-κB	Nuclear factor-kappa-B
NGF	Facteur de croissance des nerfs
NK	Natural killer
NP	Neuropiline
OVA	Ovalbumine
PAD	Peptidylarginine déiminase
PADRE	Pan-DR

PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEG	Polyéthylène glycol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIGF	Placental growth factor
PNN	Polymorphonucléaire Neutrophile
PPAD	Peptidylarginine déiminase de <i>P. Gingivalis</i>
PR	Polyarthrite rhumatoïde
Pré-B	Précurseur B
Pro-B	Progéniteur B
PRR	Pattern- recognition receptor
PsA	Rhumatisme psoriasique
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTNP22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RANK	Receptor activator of nuclear factor- κ B
RANTES (CCL-5)	Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
RASF	Fibroblastes synoviaux de patients PR
SHM	Hypermutation somatique
SF	Synoviocyte fibroblastique
STAT	Signal transducer and activator of transcription

sVEGF	Soluble vascular endothelial growth factor
sVEGF-R	Soluble vascular endothelial growth factor receptor
TACE	Tumor necrosis factor- α -converting enzyme
TCR	Récepteur des cellules T
Teff	Lymphocyte T effecteur
TGF-β	Transforming growth factor
Th	Lymphocyte T helper
TIR	Toll–interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TNF-K	TNF- α couplé à la KLH
TRAF1-C5	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1, complement component 5
TRAP	Phosphatase acide résistante à l'acide tartrique
Treg	Cellules T régulatrices
TTg	Souris transgéniques pour le TNF- α humain
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	Récepteur du VEGF
VLP	Virus-like-particle
VS	Vitesse de sédimentation
ZAP70	Zeta-chain-associated protein kinase 7

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde .	22
Figure 2: Modèle global de développement des maladies auto-immunes et de la PR	24
Figure 3 : Différentes phases de la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde	31
Figure 4 : Effet des cytokines dans la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2	35
Figure 5 : Rôle des Th17 dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde	37
Figure 6 : Rôles des lymphocytes B dans la polyarthrite rhumatoïde.	43
Figure 7 : Cytokines activant l'ostéoclastogénèse dans la polyarthrite rhumatoïde.	47
Figure 8 : Site d'action des médicaments anti-rhumatismaux sur la différenciation des ostéoclastes et l'érosion de l'os.	48
Figure 9 : Action du TNF- α dans la pathogenèse de la PR.	54
Figure 10 : principaux membres de la famille du VEGF et ses récepteurs.	63
Figure 11 : Angiogenèse synoviale dans la PR induite par l'hypoxie et l'inflammation.	68
Figure 12 : Structure des différents anti-TNF avec les sites immunogéniques.	76
Figure 13 : Les différentes étapes de la dissémination de L.m dans l'organisme.	89
Figure 14 : Physiopathologie de l'infection par M. tuberculosis.	95
Figure 15 : rôle du TNF- α dans l'activation et la formation du granulome au cours de l'infection.	96
Figure 16 : Hypothèses sur les mécanismes d'action des anticorps polyclonaux anti-TNF	180
Figure 17 : Hypothèses sur les seuils d'inhibition du TNF par les différentes stratégies anti-TNF	181
Tableau 1: Autres biothérapies passives utilisées dans la PR	79
Tableau 2 : Vaccination anti-cytokine dans différents modèles	81

INTRODUCTION

Partie 1 : La polyarthrite rhumatoïde

I. Histoire et facteurs

A. Histoire de la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) a été décrite pour la première fois en 1800 par Augustin Jacob Landré-Beauvais (Landré-Beauvais, 2001), ce dernier lui ayant donné le nom de «goutte asthénique primitive», puisque l'étiologie de la maladie n'était pas connue et que les personnes atteintes étaient pâles et fatiguées. En 1862, Sir Alfred Barring Garrod, médecin au King's College nommait pour la première fois cette maladie : arthrite rhumatoïde (Garrod, A.B, 1867).

B. Données épidémiologiques

La PR est le rhumatisme inflammatoire auto-immun le plus fréquent dans le monde. Sa prévalence varie entre 0,5% et 1% de la population mondiale adulte et peut fortement fluctuer en fonction des pays (Roux et al., 2007). Cette maladie touche majoritairement des patients âgés de 25 à 55 ans et survient trois fois plus chez les femmes que chez les hommes, bien que la sévérité de la maladie ne diffère pas en fonction du sexe. La PR constitue un véritable problème de santé publique, puisque plus de 50% des patients perdent leur autonomie ainsi que leur activité professionnelle. De plus, la durée de vie des patients est réduite de 5 à 10 ans en raison de complications cardiovasculaires et de vascularites (Myllykangas-Luosujärvi et al., 1995).

C. Caractéristiques cliniques de la polyarthrite rhumatoïde

La PR est une maladie chronique, inflammatoire, systémique et progressive. Cette pathologie, qui touche les articulations, s'accompagne d'une inflammation de la membrane synoviale qui va se chroniciser. L'articulation est la jonction entre deux os, lorsqu'elle est saine, elle est composée de deux os recouverts de cartilage et délimitée par la capsule articulaire elle-même tapissée par la membrane synoviale qui produit le liquide synovial et assure la lubrification de l'articulation. Autour de l'articulation se trouvent les muscles et ligaments attachés aux os par les tendons ce qui maintient et rend l'articulation mobile. Dans une articulation, la membrane synoviale forme une mince couche constituée de synoviocytes macrophagiques (type A) et fibroblastiques (type B). Dans la pathologie (PR), la membrane synoviale est hypertrophiée suite au recrutement de différents types cellulaires provenant du sang périphérique. Cette hypertrophie de la membrane synoviale est appelée « pannus ». Ce dernier envahit les tissus environnants et induit la dégradation du cartilage des articulations et cause son érosion (figure 1). A long terme, ce processus inflammatoire peut aboutir à la destruction de l'os. Ce pannus, par contact direct et par la production des médiateurs solubles notamment les cytokines et des MMP (métalloprotéinase matricielle), entraîne une destruction ostéo-cartilagineuse plus au moins sévère (Nogueira et al., 2016) . Ce phénomène inflammatoire est accompagné d'une formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-vascularisation). Chez tous les patients, l'inflammation de la synoviale provoque des douleurs diurnes et nocturnes.

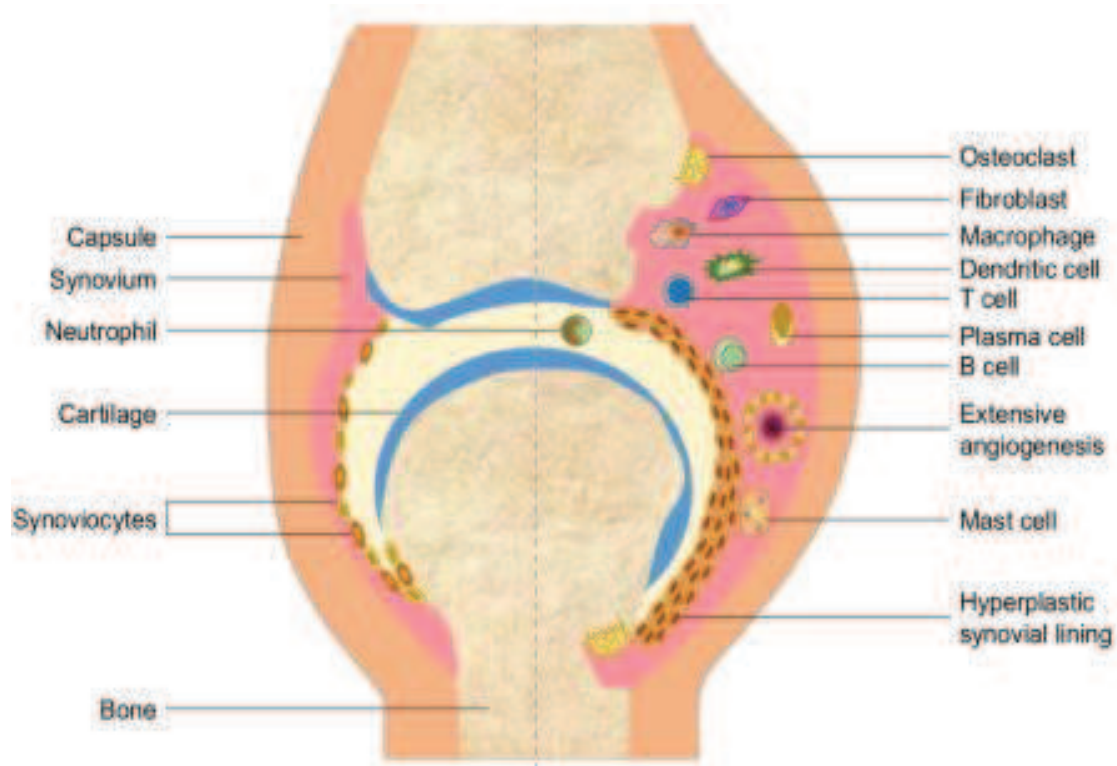


Figure 1 : Pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde (d'après Nogueira et al., 2016).

Dans une articulation saine (à gauche), le tissu synovial est constitué de la membrane synoviale (une à deux couches de cellules) et des tissus connectifs sous-jacents. Au début de la maladie (à droite), la membrane synoviale s'épaissit à cause de la prolifération des synoviocytes, accompagnée d'une forte néovascularisation. Plusieurs types cellulaires notamment les lymphocytes T et les lymphocytes B (qui pourront se transformer en plasmocytes) infiltrent la membrane synoviale. Au stade précoce de la PR, la membrane synoviale commence à envahir le cartilage ; au stade avancé, la membrane synoviale se transforme à un pannus qui va peu à peu détruire le cartilage puis éroder l'os sous-jacent.

La PR évolue d'une manière progressive sur plusieurs années, cependant chez certains patients, une forme agressive peut se développer en quelques mois et conduire à une incapacité physique des malades (Prete et al., 2011).

Des manifestations extra-articulaires de l'inflammation (manifestations cutanées, oculaires, pulmonaires, troubles du système nerveux et anomalies hématologiques) augmentent considérablement la mortalité des patients polyarthritiques.(Guillemin et al, 2005).

D. Diagnostic et évolution de la pathologie

Le diagnostic de la PR au stade précoce est très difficile, un diagnostic clinique et biologique est essentiel pour définir la maladie. Afin de rendre le diagnostic de la PR plus facile, l'*American College of Rheumatology* (ACR) a défini des caractéristiques et des critères de classification de la maladie en 1987 (Arnett et al., 1988), puis remis à jour en 2010 (Aletaha et al., 2010). Ces critères ACR/EULAR (*European League Against Rheumatism*) sont basés sur des examens cliniques, radiologiques et sérologiques.

La présence de facteur rhumatoïde (FR), est l'un des paramètres permettant d'évaluer la PR. Le FR correspond à des anticorps (principalement IgM) dirigés contre la partie Fc des immunoglobulines G (IgG). Ces facteurs sont présents chez environ 75% des patients. Des études ont montré l'existence d'une corrélation entre le taux de FR présent dans le sang des patients et l'activité de la maladie.

La citrullination de certaines protéines (vimentine, fibrinogène, alpha-énolase et collagène de type II) est également considérée comme un facteur essentiel dans la physiopathologie de la PR. Ces modifications post-traductionnelles induisent la génération d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA). Ces ACPA peuvent être détectés jusqu'à 12 ans avant le début de la maladie et sont associés à une maladie progressive et érosive. Les patients atteints de PR ont un fort taux sérique en métalloprotéinase matricielle 3 (MMP)-3 (Courvoisier et al., 2008).

L'examen radiologique des patients comporte des clichés des différentes articulations pouvant être touchées dans la PR (les mains, les poignets et les pieds), afin de rechercher les signes

d'érosion des articulations et d'observer la diminution progressive et symétrique de l'épaisseur du cartilage due au processus de destruction.

E. La polyarthrite rhumatoïde : maladie multifactorielle

L'étiologie de la PR n'est pas bien connue, cependant plusieurs facteurs ont été identifiés, notamment des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux (figure 2).

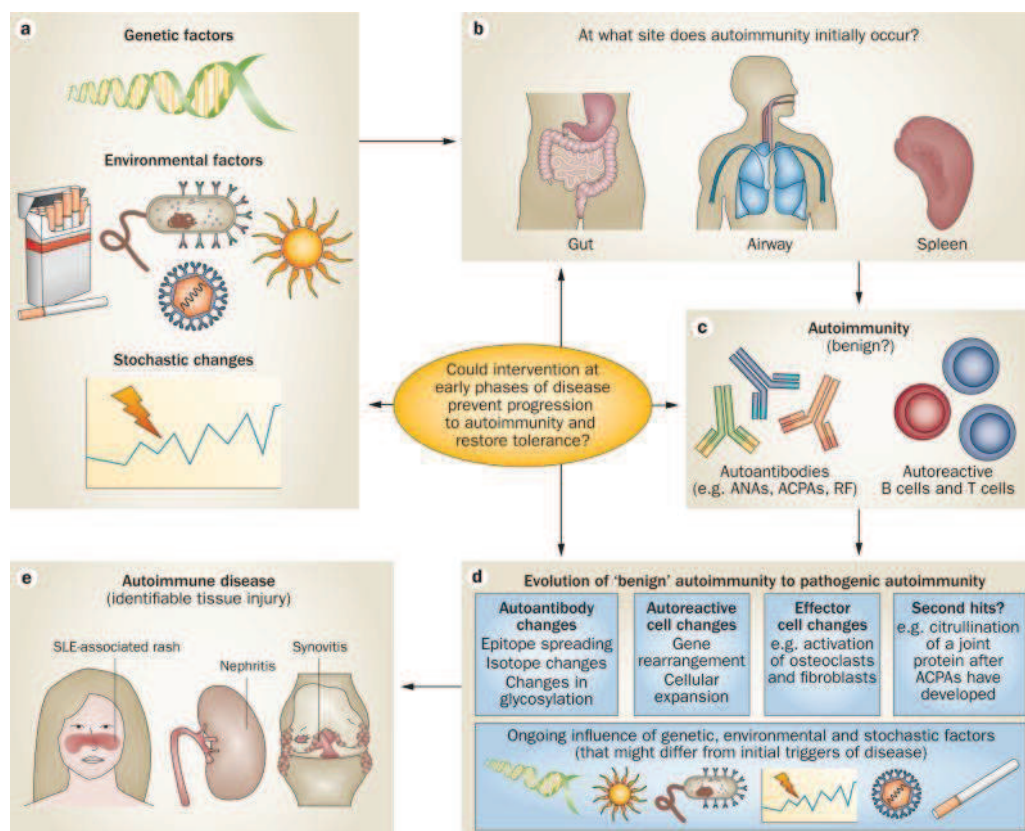


Figure 2: Modèle global de développement des maladies auto-immunes et de la PR

(d'après Deane and El-Gabalawy, 2014). (a): la combinaison des facteurs génétiques, environnementaux et stochastiques peuvent favoriser la réponse auto-immune dans différents organes (a). Dans un premier temps, l'auto-immunité peut être présente en l'absence d'une lésion tissulaire cliniquement apparente, mais peut être détectée par l'analyse des marqueurs biologiques de la maladie (b, c). A long terme et en présence de certains facteurs

environnementaux ou pathogènes, la réponse auto-immune aboutit à des lésions tissulaires cliniquement apparentes (d, e).

1. Les facteurs génétiques

Des études ont estimé que la contribution des facteurs génétiques dans la PR est d'environ 50% (MacGregor et al., 2000) (Barnetche et al., 2008) (YAMAMOTO et al., 2015).

a. Incidence familiale

Des études épidémiologiques effectuées sur des jumeaux et sur des familles ont confirmé le rôle des facteurs génétiques dans le développement de la PR. En effet la prévalence de la maladie est 6 à 30 fois plus importante chez les jumeaux dizygotes et chez les jumeaux monozygotes respectivement (Silman and Pearson, 2002).

b. CMH et PR

Une association génétique dans la PR a été mise en évidence pour la première fois en 1970 par Stastny (Stastny, 1978). Depuis, il a été démontré que le risque de développer une PR est augmenté par les gènes codants pour les molécules du complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH, « human leukocyte antigen » chez l'homme). De plus, des études ont démontré l'association des gènes HLA-DR et la PR (Criswell, 2010).

Dans différents groupes ethniques, une association entre l'expression de HLA-DR4 et DR1 et la PR a été observée (McMichael et al., 1977) (Gonzalez-Gay et al., 2002) (Winchester et al., 1992) (Stuhlmüller et al., 2016). Ces derniers ont en commun une séquence d'acides aminés QKRAA/QRRAA/RRRAA (Auger and Roudier, 1997). Au cours de la PR, la citrullination des protéines de l'organisme permettrait la liaison de l'épitope partagé (EP) aux molécules

HLA. En effet, les acides aminés de cette séquence sont situés dans la région qui intervient dans la liaison des antigènes (Ag) aux molécules HLA. Cela permet la présentation des Ag aux récepteurs des lymphocytes T. Ceci suggère un rôle essentiel de l'EP dans le développement et l'évolution de la PR. D'autres gènes situés entre les gènes du CMH I et II ont une importance dans le développement de la PR d'une façon indépendante des allèles DRB1 contenant l'EP (Jawaheer et al., 2002). Suite à des recombinaisons, certains fragments de l'haplotype HLA-A1-B8-DR3 peuvent apparaître en l'absence de HLA-DR3 et sont alors impliqués dans le développement de la PR indépendamment de HLA-DRB1 (Jawaheer et al., 2002). De plus, cet haplotype a été retrouvé précédemment dans d'autres maladies auto-immunes, comme le diabète de type I ou le lupus. Il est aussi associé à des modifications de fonctions immunitaires lors de l'infection par HIV (Kaslow et al., 1990). Plus récemment, des études ont montré l'implication de HLA-C dans la pathologie (Nordang et al., 2013). Les gènes non-CMH peuvent être également associés à la susceptibilité à la PR, mais aussi au phénotype de la maladie et à la réponse aux traitements.

L'association de gène PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22*) est très importante (Viatte et al., 2013). Ce gène a été associé également à d'autres maladies auto-immunes comme le diabète de type I et le lupus érythémateux systémique (LES) (Michou et al., 2007). A l'heure actuelle, 5 isoformes de l'enzyme PADI (peptidylarginine deiminase) ont été découvertes : PADI-1, PADI-2, PADI-3, PADI-4 et PADI-6. Plusieurs études ont démontré la surexpression de gènes PADI-4 dans la PR. Une association entre des gènes de PADI-4 et la susceptibilité à la PR a été démontrée dans des populations européennes, asiatiques et nord-américaines (Kang et al., 2006). Cependant, d'autres études sur des populations anglo-saxonnes, espagnoles et françaises n'ont pas confirmé ces observations (Burr et al., 2010, Martinez et al., 2005).

La famille de gène STAT est composée de six membres. Les traitements par des DMARDS (*disease modifying anti-rheumatic drugs*) diminuent l'expression de STAT4 dans les cellules dendritiques de la membrane synoviale (Walker et al., 2006). Depuis une trentaine d'années, certains composants du complément sont considérés comme pouvant être associés à la pathogenèse de la PR. En effet, le gène TRAF1 code une protéine intracellulaire impliquée dans la transduction du signal par les récepteurs TNF-R1 et R2 et par CD40. Dans des populations nord-américaines et suédoises, une association a été démontrée entre la région TRAF1/C5 et le développement de la PR (Plenge et al., 2007).

Bien que tous ces gènes STAT, TRAF1, PADI4, etc...soient impliqués dans l'induction de la PR, dans la majorité des cas la présence d'ACPA est nécessaire (Rantapää-Dahlqvist et al., 2003). D'autres études ont mis en évidence l'implication de CTLA-4 dans le développement de la PR chez les patients ACPA positifs (Daha et al., 2009).

2. Les facteurs environnementaux

A côté des facteurs génétiques impliqués dans le développement de la PR, de nombreux facteurs environnementaux sont aussi impliqués : le tabac, des agents viraux et infectieux, des facteurs hormonaux et l'apport en vitamine D.

a. Rôle du tabac

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que le tabac est le facteur environnemental majeur dans le développement de la PR (Chang et al., 2014). Certaines études montrent que le tabagisme augmente le risque de développer une PR chez les femmes. Cependant, d'autres rapports et méta-analyses montrent un risque élevé chez les hommes en comparaison avec femmes (Chang et al., 2014),(Krishnan et al., 2003). Le lien avec la présence d'ACPA n'a été mis en évidence que récemment. Une étude de 2007 a démontré que chez les fumeurs, seuls

les patients ACPA positifs avaient un risque accru de développer une PR. Les personnes fumant plus de 40 paquets par an ont deux fois plus de risques de développer une PR que les personnes non fumeuses. Il est important de noter que chez les anciens fumeurs, le risque de développer la maladie reste accru (Costenbader et al., 2006).

Récemment, plusieurs études ont établi un lien entre la consommation de cigarette et la réponse anti-TNF- α chez les patients. En effet, l'étude menée par Hyrich et al (*The British Society for Rheumatology Biologics Register*) a montré que la réponse clinique à l'infliximab est réduite chez les patients fumeurs. Plus récemment, Abhishek et al a observé dans ses différentes analyses que les patients fumeurs traités par anti-TNF- α ont moins de chance d'atteindre une réponse modérée comparés aux non-fumeurs (OR (95% CI) 0,20 (0,05–0,83), $p = 0,03$) (EULAR, 2010).

b. Agents viraux et infectieux

Différents agents pathogènes (virus ou bactéries), semblent avoir un rôle dans le développement de la PR. La protéine de choc thermique, dnaJ présente chez *Escherichia coli* est considérée comme un facteur de susceptibilité, puisque cette protéine à une homologie de 11 acides aminés avec la troisième région hypervariable de la région HLA-DRB1*0401 (Albani et al., 1992) où se situe l'épitope partagé. Une homologie de séquence est aussi retrouvée entre la même région de HLA-DRB1*0401 et la glycoprotéine gp110 du virus Epstein-Barr, lui aussi mis en cause dans une prédisposition au développement de la PR (Roudier et al., 1988). La bactérie responsable de la parodontite *Porphyromonas gingivalis* est également associée à la physiopathologie de la PR (Scher et al., 2014). Des études menées par Mercado, F. B et al ont mis en évidence le lien entre l'augmentation de la sévérité de la PR et l'augmentation de la perte osseuse pendant une parodontite (Mercado et al., 2003).

De plus, des points communs existent entre les deux maladies notamment dans les lésions parodontales ainsi que dans le liquide synovial des patients atteints de PR et dans la réponse immune sévère caractérisée par le recrutement des cellules inflammatoires provenant de la circulation sanguine (Nikolopoulou-Papaconstantinou et al., 1987).

c. Facteurs hormonaux et contraceptifs oraux

La PR se développe préférentiellement chez les femmes, laissant penser que les facteurs hormonaux ont un rôle prépondérant dans l'induction de cette pathologie. Pendant la grossesse, les symptômes de la PR s'améliorent, mais ils réapparaissent trois à quatre mois après l'accouchement. Les femmes ayant eu des enfants ont moins de chance de développer une PR (Nelson et al., 1993). L'amélioration des symptômes de la PR au cours de la grossesse est expliquée par une augmentation de la proportion en lymphocytes T régulateurs (Treg), associée à la mise en place d'un environnement cytokinique anti-inflammatoire (Förger et al., 2008). Des études menées dans les années 70 ont démontré que la prise de contraceptifs oraux par les femmes peut protéger contre le développement d'une PR. Cependant des méta-analyses plus récentes ont démontré que les femmes sous contraceptifs oraux ne sont pas protégées de la survenue de la maladie (Qi et al., 2014).

d. Vitamine D

La vitamine D est une hormone essentielle pour l'homéostasie osseuse. Cette hormone joue un rôle suppresseur de la réponse pro-inflammatoire (Guillot et al., 2010). La vitamine D diminue le risque de développer certaines maladies auto-immunes telles que le diabète de type I et la sclérose en plaque, mais son action dans la PR est ambiguë. En 2004, une étude portant sur des femmes post-ménopausées de la cohorte IWHS (*Iowa Women's Health Study*) a montré que l'apport en vitamine D diminue le risque de développer une PR (Merlino et al.,

2004). Cependant, une analyse sur la cohorte NHS (*Nurses' Health study*) n'a pas confirmé cette association (Costenbader et al., 2008). Plus récemment, une étude a démontré que le niveau de la vitamine D est réduit chez les patients (Lin et al., 2016). Le rôle protecteur de la vitamine D reste donc controversé dans la PR.

II. Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

La physiopathologie de la PR n'implique pas l'action d'un seul type cellulaire, mais de nombreuses interactions entre différentes cellules et facteurs qui vont contribuer au déclenchement de la maladie, de l'inflammation de la membrane synoviale jusqu'à la phase de destruction articulaire (figure 3).

A. Inflammation de la membrane synoviale et populations cellulaires impliquées

Le déclenchement de l'inflammation et l'apparition d'une synovite implique plusieurs cytokines et acteurs cellulaires. En effet, le mécanisme physiopathologique de la maladie est basé sur l'interaction des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), des lymphocytes T et B, des macrophages, des synoviocytes et des ostéoclastes.

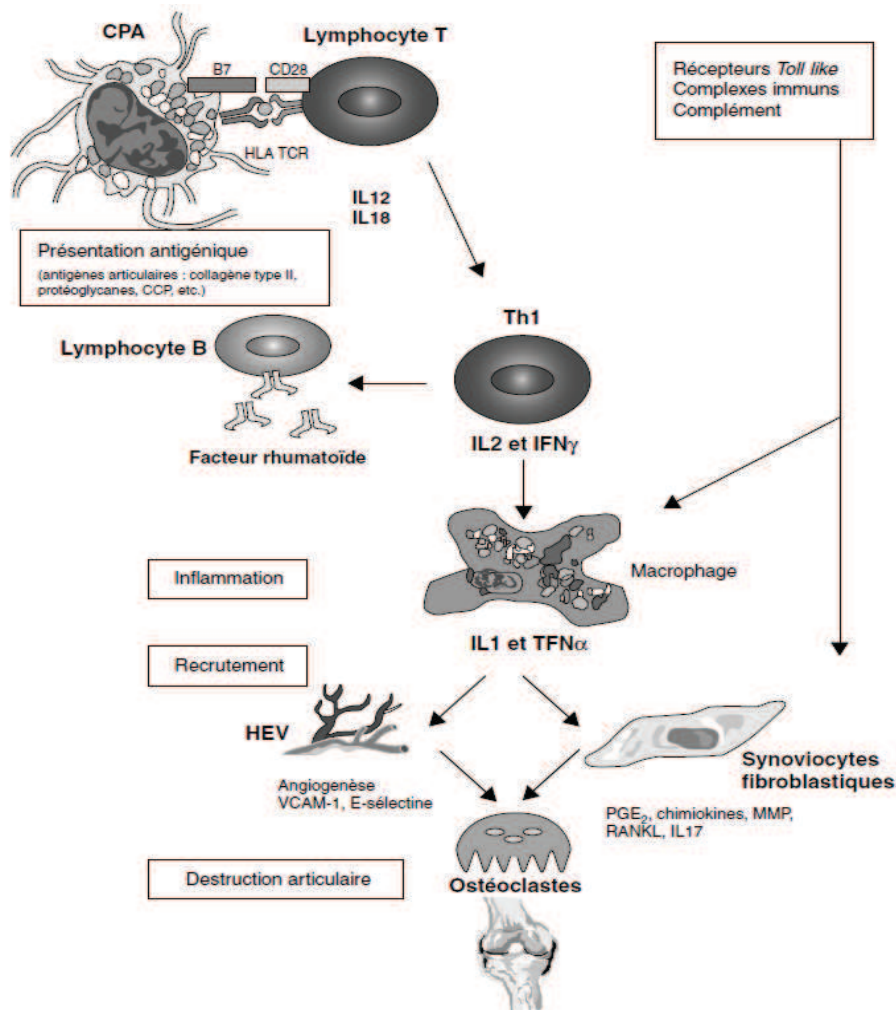


Figure 3 : Différentes phases de la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

(d'après Benhamou and Fautrel, 2009).

1. Les macrophages

Comme les cellules dendritiques et les lymphocytes B, les macrophages sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T. Les macrophages sont divisés en deux grandes catégories selon leurs phénotypes et des cytokines qu'ils produisent : les macrophages inflammatoires (de type M1) et les macrophages anti-inflammatoires (de type M2, ayant un

rôle dans la réparation tissulaire). En présence d'IFN- γ , de GM-CSF et de TNF- α , ces cellules se différencient en macrophages M1 produisant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IL-23 et de faibles quantités d'IL-10. La polarisation des macrophages M2 se fait en présence des cytokines IL-4, IL-13 et IL-10. Les M2 sont caractérisés par une forte production d'IL-10, mais aussi par une faible production d'IL-12 et d'IL-23 (Udalova et al., 2016).

Dans la PR, ce sont les macrophages de type M1 qui sont retrouvés en majorité et en forte quantité dans la membrane synoviale (Mantovani et al., 2002). Le nombre de macrophages dans la membrane synoviale est corrélé avec la progression de la maladie chez les patients. Ces cellules peuvent être activées par plusieurs facteurs présents localement dans les articulations, comme l'IFN- γ produit par les lymphocytes Th1. L'activation des macrophages peut être aussi le résultat d'un contact direct avec les lymphocytes T. Dans le tissu synovial, cette activation induit une forte production locale de cytokines et de chimokines notamment de l'IL-1 β , du TNF- α , de l'IL-6, de l'IL-8, du GM-CSF, du MIP-1 α et du MCP-1 (Li et al., 2012) (Kinne et al., 2007). Durant la pathologie, les macrophages vont jouer un rôle dans l'amplification et le développement de la cascade d'événements pathologiques via l'activation des synoviocytes fibroblastiques et contribuer à la dégradation de la matrice. Au niveau local, les macrophages sont impliqués dans l'infiltration et l'activation des cellules inflammatoires dans les articulations. Au niveau systémique, les macrophages contribuent à l'amplification de la maladie par la production de cytokines pro-inflammatoires (notamment le TNF- α), le développement et l'activation chronique des monocytes circulants.

2. Les lymphocytes T

Différentes études ont mis en évidence le rôle crucial des lymphocytes T dans la PR (McInnes and Schett, 2011). Chez les patients, la proportion de lymphocytes T auto-réactifs serait plus

élevée que chez les sujets sains. Dans le thymus, les lymphocytes T qui reconnaissent les peptides du soi associés aux molécules du CMH, subissent une délétion clonale par apoptose. Cependant, chez les patients atteints de PR, cette sélection thymique dite négative est altérée, ce qui explique le nombre élevé de lymphocytes T auto-réactifs en périphérie. De plus, dans la synoviale rhumatoïde, le taux de lymphocytes Th1 est particulièrement important.

Les lymphocytes T expriment à leur surface des récepteurs spécifiques, le TCR (T Cell Receptor). Chez l'homme, ces lymphocytes expriment très majoritairement les chaînes α et β du TCR. L'activation des lymphocytes T $\alpha\beta$ par les peptides dont ils sont spécifiques nécessite l'interaction avec le CMH (« restriction par le CMH »). Une faible proportion de lymphocytes T exprime les chaînes γ et δ du TCR. Contrairement aux T $\alpha\beta$, la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T $\gamma\delta$ n'est pas restreinte par le CMH. Des études ont mis en évidence le rôle pathologique des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la PR. En effet, les patients atteints de PR ont beaucoup de T $\gamma\delta$ infiltrés dans leurs membranes synoviales et ont une inflammation tissulaire accrue en comparaison avec des patients ayant peu de ces cellules (Jacobs and Haynes, 1992).

Parmi les lymphocytes T $\alpha\beta$, on distingue deux sous-populations : celles qui expriment le co-récepteur CD4 et celles qui expriment CD8. Les lymphocytes T CD4+, nommés aussi T auxiliaires (Th), ont pour rôle principal la régulation des autres cellules de l'immunité, soit par contact direct avec ces cellules, soit par sécrétion de cytokines. Les lymphocytes T CD8+ sont des cellules cytotoxiques capables de tuer des cellules cibles, après activation. Des expériences menées sur des modèles animaux ont mis en évidence le rôle majeur des lymphocytes T. Dans un modèle d'arthrite induite par adjuvant, le transfert de cellules T spécifiques entraîne le développement de cette maladie chez des animaux naïfs (Cohen et al., 1985).

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle essentiel dans l'initiation et le contrôle de la réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD4⁺ activés infiltrent fortement la membrane synoviale des patients atteints de PR. Ces lymphocytes orchestrent à la fois l'inflammation locale et l'infiltration cellulaire desquelles vont découler d'autres événements inflammatoires.

Parmi les lymphocytes T CD4⁺, on distingue plusieurs sous-populations en fonction du profil cytokinique qu'elles produisent après activation. Les Th1 se différencient sous l'action de l'IL-12 et elles secrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2, l'IFN- γ et la lymphotoxine α (LT- α). Ces cellules se développent préférentiellement au cours d'infections par les bactéries intracellulaires et dans l'hypersensibilité cutanée retardée. Les lymphocytes Th1 ont pour rôle principal l'activation des macrophages qui produisent à leur tour des radicaux oxygénés libres et de l'oxyde nitrique qui sont des éléments essentiels dans la réponse anti-bactérienne. De plus, les Th1 stimulent la fonction de phagocytose et accroissent la capacité des macrophages à présenter l'antigène en augmentant le CMH de classe II.

Dans une PR établie, les Th1 produisent de l'IFN- γ et du TNF- α mais aussi de l'IL-10. Des études ont démontré qu'au stade précoce de la pathologie une corrélation existe entre la fréquence en lymphocytes T producteurs d'IFN- γ et l'activité de la maladie, démontrant ainsi le rôle essentiel des Th1 dans l'initiation de cette pathologie (Kanik et al., 1998).

Les lymphocytes Th2 sont capables d'activer l'immunité humorale et jouent un rôle dans la protection contre les pathogènes extracellulaires (figure 4). Ils se différencient sous l'action de l'IL-4 et produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 ou l'IL-10. La différenciation de cette sous population sous l'effet des cytokines implique la transduction de signal via STAT6. En effet, des études *in vitro* ont démontré que l'activation de STAT6 est nécessaire à la forte expression du gène régulateur des Th2, GATA-3 (Kurata et al., 1999).

Les Th2 prédominent après une infection par certains pathogènes tels que les nématodes gastro-intestinaux et les helminthes. Ces lymphocytes ont un rôle anti-inflammatoire qui passe par la production des cytokines anti-inflammatoires : l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, l'IL-9, l'IL-10, l'IL-25.

Les Th1 et Th2 se régulent mutuellement. Le facteur de transcription T-bet exprimé par les Th1 inhibe l'action de GATA-3 par liaison directe, empêchant ainsi la différenciation des Th2 (Hwang et al., 2005). Un effet inverse existe puisque GATA-3 en diminuant la signalisation via STAT-4 et le récepteur $\beta 2$ à l'IL-12, inhibe la différenciation des Th1 (Usui et al., 2003). Par ailleurs, les Th1 sécrètent de l'IFN- γ qui inhibe la prolifération des Th2. Réciproquement, les cytokines IL-4 et IL-6 agissent sur les T naïfs en bloquant leurs différenciations en Th1. Dans la PR, les patients développent de faibles réponses Th2. Par conséquent, la réponse Th1 n'est pas modulée au début de la maladie et entraîne sa persistance et une évolution vers une inflammation chronique (Skapenko et al., 1999).

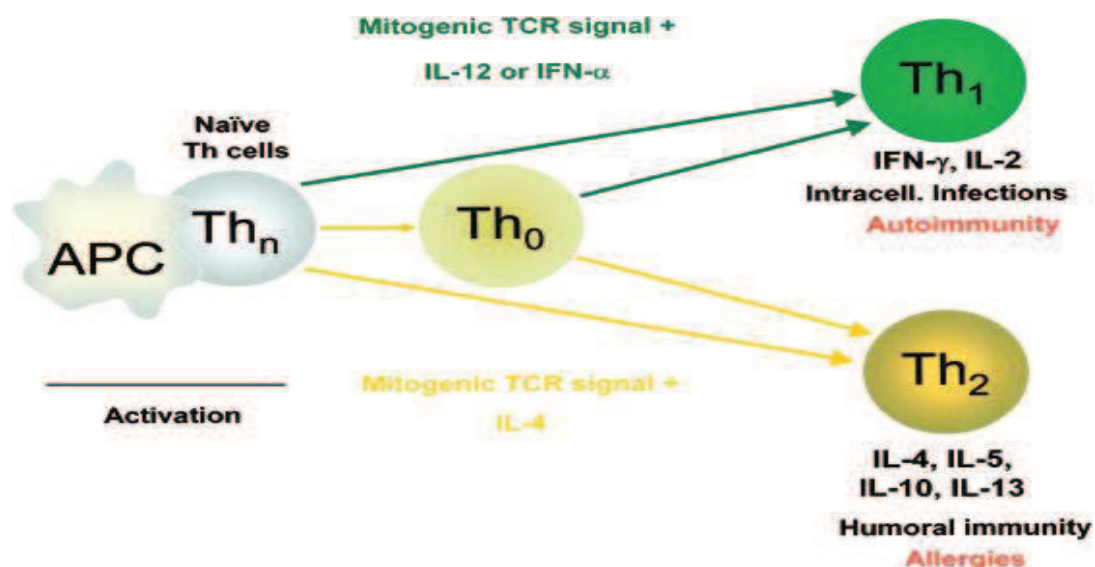


Figure 4 : Effet des cytokines dans la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2

(d'après (Biedermann et al., 2004)). les cellules Th naïves sont activées par les cellules présentatrices d'antigènes (APC). La présence des cytokines au cours de l'activation par

l'APC (signal mitogénique transduit par le TCR et reconnaissance des molécules de co-stimulation), peuvent conduire à la différenciation des Th0 en lymphocytes Th1 ou Th2.

3. Les lymphocytes Th17

Ces lymphocytes jouent un rôle clé dans le développement d'une réponse protectrice contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Leur rôle a été identifié pour la première fois dans la réponse immunitaire contre *Borrelia burgdorferi*.

Ces cellules jouent également un rôle dans le développement des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque et les maladies inflammatoires de l'intestin (Weaver et al., 2007).

Les lymphocytes Th17 expriment les cytokines IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21 et TNF- α . L'IL-21 agit de façon autocrine sur leur développement.

Les mécanismes moléculaires de la différenciation des cellules Th17 ont été étudiés depuis environ une quinzaine d'années. Un certain nombre de cascade de signalisation et de facteurs de transcriptions ont été identifiés dans la différenciation des Th17. Chez la souris, la différenciation des cellules Th17 est initiée par le TGF- β , l'IL-6 et l'IL-21, qui activent STAT3 et induisent l'expression du facteur de transcription ROR γ t. (Azizi et al., 2013). L'IFN- γ et l'IL-4 produits respectivement par les Th1 et les Th2, inhibent le développement des Th17. Cependant le TGF- β , en combinaison avec l'IL-6 et l'IL-1 est nécessaire au développement des lymphocytes Th17, alors qu'il possède un effet inhibiteur sur les Th1 et les Th2 (Kotake et al., 1999). Les Th 17 stimulés par l'IL-23 favorisent l'ostéoclastogenèse. L'IL-17 produite par ces cellules induit l'expression de RANKL à la surface des ostéoblastes et des synoviocytes fibroblastiques. L'interaction entre RANKL et RANK exprimé par les

précurseurs ostéoclastiques est indispensable pour leur différenciation et leur activation (Bettelli et al., 2006). De par son implication dans l'induction et le développement d'une inflammation chronique, l'induction de lésions du cartilage et l'induction d'une érosion osseuse, l'IL-17 joue un rôle important dans la destruction des articulations (figure 5) (Chabaud et al., 2000).

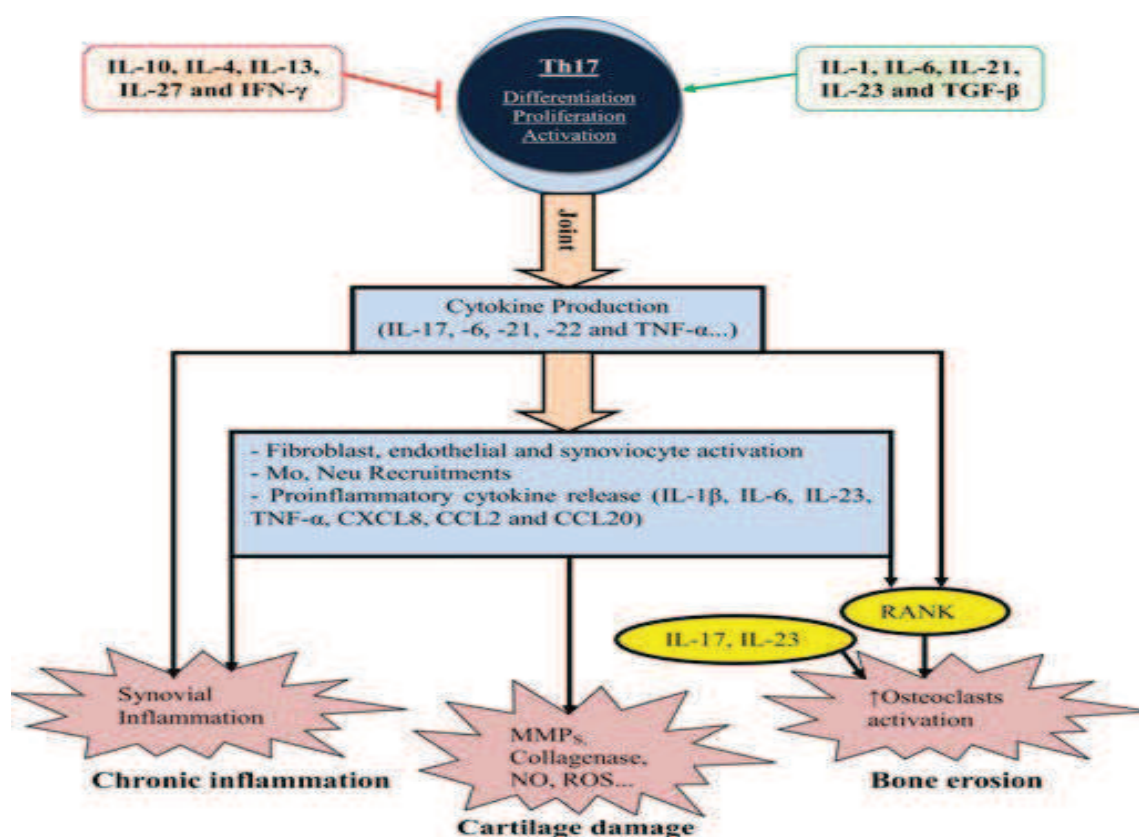


Figure 5 : Rôle des Th17 dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde

(d'après AZIZI et al, 2013). Dans l'articulation, les Th17 produisent des cytokines qui activent les ostéoclastes, les macrophages, et induisent l'infiltration des leucocytes. Ces derniers secrètent des cytokines, des chemokines et des radicaux libres favorisant l'inflammation et la destruction du cartilage. Les Th17 peuvent agir directement sur l'ostéoclastogenèse en favorisant la production de RANKL.

4. Les lymphocytes T régulateurs

Ces cellules sont capables d'inhiber l'initiation de la réaction immunitaire et de diminuer la réponse immune établie. Ces lymphocytes regroupent deux catégories : les Tregs naturels (nTreg) et les Tregs induits (iTreg).

Les T régulateurs naturels se développent et sont sélectionnés dans le thymus. Ces lymphocytes représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4+ en périphérie. Les nTreg ont un phénotype mémoire et expriment le facteur de transcription FoxP3. Chez l'homme, des mutations du gène FoxP3 entraînent un syndrome grave appelé « immune disorder, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome » (IPEX).

En périphérie, l'induction de la population iTreg, résulte de différentes stimulations, notamment la présentation de l'antigène en présence d'IL-10. Les lymphocytes iTreg peuvent se développer également en présence de TGF- β et d'IL-35. Parmi les sous-populations de Treg induites, on trouve les CD4+ CD25++, mais il existe aussi une autre population très fréquente (Tr1), qui n'expriment pas FoxP3, mais qui a une forte capacité à produire de l'IL-10 (Groux et al., 1997).

L'activité régulatrice des Treg a été démontrée pour la première fois chez la souris par l'équipe de Sakaguchi. En effet, le transfert de cellule CD4+CD25- chez des souris BALB/c dépourvues de thymus entraîne le développement de maladies auto-immunes spécifiques d'organe (colite, diabète insulino-dépendant, ...) (Sakaguchi et al., 1995). Par contre, le co-transfert de cellules CD4+CD25- et de cellules CD4+CD25++ inhibe le développement de pathologies auto-immunes induites expérimentalement (Mottet et al., 2003). Dans le modèle d'AEC, la déplétion des cellules CD4+CD25++ avant immunisation par le CII (collagène de type II) augmente la sévérité des arthrites et diminue leur délai d'apparition. Cette

exacerbation est inhibée par injection de cellules CD4⁺CD25⁺⁺ (Morgan et al., 2003). Les caractéristiques de ces cellules CD4⁺CD25⁺⁺ sont très proches entre l'homme et la souris. L'accumulation des Treg dans les articulations arthritiques est observée dans plusieurs études chez la souris et chez l'homme (Miyara et al., 2011). Les Treg sont peu prolifératifs et ont pour rôle d'inhiber la prolifération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que leur production de cytokines, de manière contact dépendante (Taams et al., 2001).

Les Treg inhibent la réponse T grâce à l'expression de CTLA-4 à leur surface. Le rôle et l'importance de CTLA-4 a été mis en évidence dans une expérience de transfection de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ avec un plasmide codant pour FoxP3, conférant une capacité régulatrice à ces cellules T transfectées (Hori et al., 2003). Chez les patients atteints de PR, une concentration élevée en Treg avec une capacité suppressive accrue est retrouvée au sein du tissu synovial en comparaison du sang périphérique (van Amelsfort et al., 2004). Cependant, il semble que les T effecteurs (Teff) soient moins sensibles à la suppression par les Treg (van Amelsfort et al., 2004).

5. Les lymphocytes T CD8⁺

A l'heure actuelle, les cellules T CD8⁺ sont classées en quatre sous-types en fonction de leur niveau de différenciation, de leur état d'activation et de leur production de cytokines : naïve, effecteur, mémoire centrale et mémoire effecteur (Carvalho et al., 2013).

Les lymphocytes T CD8⁺ sont dits naïfs lorsqu'ils n'ont pas encore rencontré leurs antigènes correspondants. Ce type de cellules se trouve généralement dans le sang périphérique et le tissu lymphatique. La sous population T CD8⁺ mémoire centrale a déjà rencontré son antigène spécifique, et sa présence va induire une forte réponse proliférative, ainsi que la

production d'une variété de cytokines. Les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs quant à eux, ont une propriété cytotoxique et proliférative. En effet, ils peuvent induire la mort des cellules infectées par cytolyse, par la sécrétion de protéines cytolytiques telles que la perforine et les granzymes. Les lymphocytes T CD8⁺ mémoire effecteurs ont des propriétés intermédiaires, présentant une plus faible capacité à induire des réponses cytotoxiques que les cellules effectrices et une capacité beaucoup plus élevée de produire des cytokines que le sous-type mémoire.

Le rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans la polyarthrite rhumatoïde a attiré relativement peu d'attention, cela est probablement dû aux résultats contradictoires obtenus dans les modèles animaux d'arthrite. Cela rend difficile l'évaluation d'un effet global des T CD8⁺ dans le processus de la maladie. En effet, dans le modèle de polyarthrite inflammatoire induite par le chlorure de mercure chez le rat brun de Norvège (Brown Norway Rat), la déplétion des T CD8⁺ par l'anticorps monoclonal OX-8 réduit l'incidence et la sévérité de la maladie (Larsson, P., 1986). En parallèle, ils constatent une augmentation de la production d'INF- γ . Cette étude suggère un rôle agressif des TCD8⁺ via leur propriété cytotoxique dans ce modèle d'arthrite.

Toutefois, le traitement des rats DA avec l'anticorps OX-8, dans le modèle d'arthrite induite avec l'huile conduit à une apparition précoce de la maladie, ce qui indique un rôle protecteur des T CD8⁺, probablement médié par leurs fonctions suppressives (Larsson et al., 1989). Dans l'AEC de la souris DBA/1, les études utilisant un anticorps anti-CD3 ont également montré un rôle protecteur des T CD8⁺ (Carvalho H et al 2013). L'ensemble de ces études et d'autres expériences menées par d'autres équipes suggèrent un rôle important des T CD8⁺ dans les différents modèles expérimentaux d'arthrites (à la fois dans l'initiation et au cours de

la maladie). De plus, l'effet global de l'élimination des cellules T CD8+ varie selon le modèle expérimental et la phase de la maladie.

Plusieurs preuves indirectes suggèrent que les cellules T CD8+ sont impliquées dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde. Des études menées par l'équipe de Martinez-Taboada et al, sur le nombre et la fonction de ces lymphocytes dans la PR et chez les contrôles sains concluent que les patients atteints de PR ont tendance à avoir une diminution du nombre de cellules T CD8+ circulant, bien que les différences ne soient pas statistiquement significatives (Martinez-Taboada et al., 2001).

6. Les lymphocytes B

Lors de la migration des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques ou rate), ces cellules peuvent rencontrer des antigènes par des interactions avec d'autres cellules du système immunitaire, telles que des cellules dendritiques ou des macrophages. Ces lymphocytes peuvent, soit se différencier en plasmocytes, ou intégrer la réaction du centre germinatif (GC). Dans le GC, les cellules B subissent une expansion clonale, la commutation isotypique (RSE) et des mutations somatiques. Ce processus aboutit à la production de cellules B de haute affinité formant ainsi le compartiment des cellules B mémoires de l'immunité humorale (Vazquez et al., 2015). Dans la membrane synoviale, les lymphocytes B ne représentent qu'une petite fraction. A l'état normal, les lymphocytes B qui expriment des récepteurs capables de reconnaître les antigènes du soi sont éliminés par apoptose ou par anergie. Chez les patients atteints de PR, il existe un défaut de sélection de ces cellules B auto-réactives (Samuels et al., 2005). Suite à ce déficit, ces cellules produisent des auto-anticorps, notamment le facteur rhumatoïde (FR) et des anticorps anti-protéine

citrullinée (ACPA), ces derniers étant détectables plusieurs années avant le déclenchement de la PR. Les lymphocytes B se différencient dans la moelle osseuse à partir de cellules hématopoïétiques totipotentes. Leur degré de maturation dépend de microenvironnements spécialisés. Ces cellules expriment le marqueur CD20 (B220), des récepteurs de la partie Fc des immunoglobulines (FcγR), un récepteur spécifique d'antigène (BCR), mais également des TLRs, ainsi que d'autres marqueurs tels que CD5, CD19, CD45, etc... Les lymphocytes B ont la capacité d'activer des lymphocytes T CD4⁺ et de produire des anticorps. Néanmoins, il existe également des cellules B ayant des fonctions régulatrices (Breg ou B10) (Bouaziz et al., 2008). Ces cellules produisent de l'IL-10 et entraînent une diminution de la réponse Th1 (Mauri et al., 2003). Plusieurs équipes ont démontré l'implication des lymphocytes B dans la PR (Yanaba et al., 2007), (Terato et al., 1995). De plus la déplétion des lymphocytes B par un anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) induit une amélioration des signes cliniques de la PR (Andersson et al., 2008).

Ces cellules vont jouer un rôle important dans la pathologie de la PR (figure 6). En effet, elles favorisent l'activation et l'expansion de cellules T, ce qui induit une forte production de TNF-α. Cela, déclenche l'activation de certaines cellules, notamment les macrophages qui induisent à leur tour l'amplification de processus inflammatoire (Martinez-Gamboa et al., 2006). La reconnaissance de complexes immuns par les TLR9 présents à la surface des lymphocytes B, entraîne l'activation du BCR et induit l'activation et la différenciation des cellules B en plasmocytes dans la synoviale. Ces plasmocytes produisent des auto-anticorps, tels que le FR (Mauri and Ehrenstein, 2007).

La liaison ligands/TLR va également induire la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α ou l'IL-6 qui vont amplifier le processus inflammatoire, en activant d'autres acteurs de la pathogenèse de la PR.

La population de cellules B10 exerce une capacité suppressive au cours de la PR. Il a été démontré dans l'AEC, que les lymphocytes B10 réduisent l'incidence des arthrites de plus de 50%, de plus, ils diminuent la sévérité de la maladie et inhibe l'activation et la différenciation des cellules Th1 (Mauri et al., 2003).

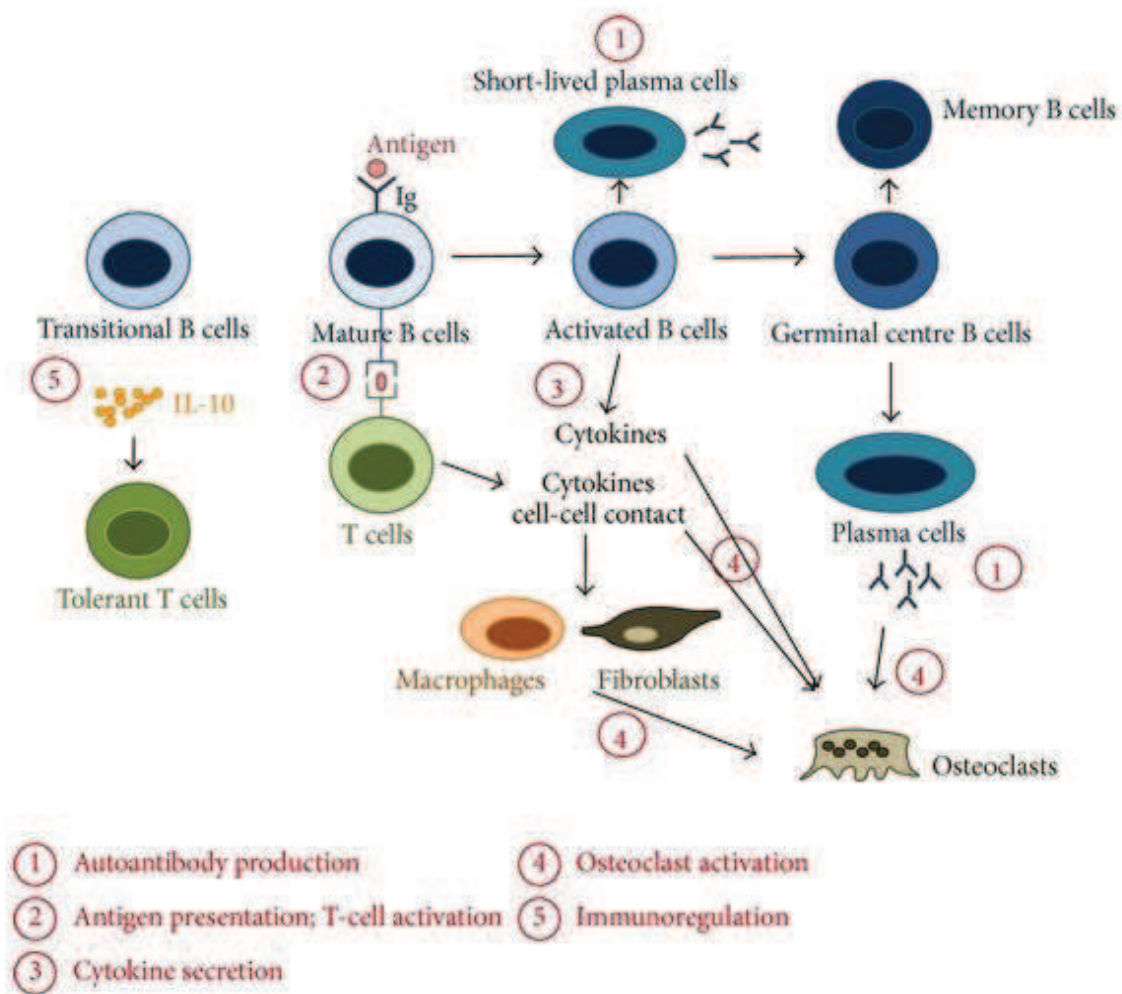


Figure 6 : Rôles des lymphocytes B dans la polyarthrite rhumatoïde.

(D'après Bugatti et al., 2014). Les interactions entre les cellules B et T induisent l'activation et la différenciation des cellules B (plasmocytes), responsables de la production des auto-anticorps (1). Les cellules B activées fournissent de l'aide aux lymphocytes T et induisent la différenciation des cellules T effectrices qui produisent des cytokines pro-inflammatoires (2).

Les lymphocytes B peuvent avoir également des effets sur des cellules non immunitaires via la production de cytokines pro-inflammatoires (3). Les différentes cytokines, produites par les lymphocytes B activés, les lymphocytes T, macrophages et fibroblastes, favorisent la différenciation et l'activation des ostéoclastes (4). De plus les lymphocytes B peuvent avoir un rôle immunorégulateur par leur production d'IL-10 (5).

B. Destruction ostéo-cartilagineuse

Comme indiqué précédemment, la PR est une maladie chronique autoimmune caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale aboutissant à la formation d'un pannus ou synovite rhumatoïde. La formation du pannus synovial induit la destruction du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral. Par un contact cellulaire ou par sécrétion d'enzymes, ce pannus, va entraîner l'activation des chondrocytes et des ostéoclastes, ce qui induit à la dégradation du cartilage et à l'érosion osseuse par la suite.

Cette phase de destruction implique trois types cellulaires : les ostéoclastes, les chondrocytes et les synoviocytes de type B (SB).

1. Les synoviocytes de type B

Les SB assurent l'apport des éléments nutritifs et lubrifiants pour l'articulation. Au cours de la PR, en présence de cytokines pro-inflammatoires, les SB expriment à leur surface des molécules d'adhésions telles que les intégrines, et secrètent des métalloprotéases de la matrice (MMP). Ces protéines entraînent la dégradation progressive du cartilage et l'inhibition de la production de collagène. Des dégradations du cartilage dans les zones en dehors du pannus

sont également observées, elles sont dues aux protéines pro-inflammatoires, mais aussi aux MMP sécrétées par les autres cellules présentes dans la synoviale et les polynucléaires neutrophiles (PNN). De plus, une dégradation plus profonde est due à la production de MMP par les chondrocytes. Ces cellules fibroblastiques sont impliquées dans l'érosion osseuse en produisant de fortes quantités de RANKL, principal activateur des ostéoclastes et l'inhibiteur de l'activation des ostéoblastes.

2. Les ostéoclastes

Au cours de la PR, les précurseurs des ostéoclastes accumulés au site de l'inflammation vont se différencier en ostéoclastes sous l'effet de différents facteurs comme le M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) et RANKL. RANKL est synthétisée principalement par les ostéoblastes activés, les lymphocytes T activés et les synoviocytes de type B. Cette protéine joue un rôle essentiel dans la différenciation des ostéoclastes (figure 7). Des études dans un modèle d'arthrite ont montré l'absence de lésions osseuses chez les souris n'exprimant plus le gène RANKL (Pettit, A.R, 2001).

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées dérivées de la lignée des monocytes. Ces cellules sont capables d'induire la résorption osseuse par leur adhérence étroite à la surface de l'os par des interactions avec les intégrines et les protéines de la matrice. Ces cellules dégradent l'os via la synthèse d'enzymes telles que la cathepsine K, matrice métalloprotéinase 9 (MMP9) et TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase).

La première description indirecte de ces cellules dans la résorption osseuse observée dans la PR remonte au 19ème siècle. Les ostéoclastes dans la PR ont été définitivement identifiés et caractérisés en détail par l'utilisation de techniques d'immunohistochimie. Des études chez

l'animal ont mis en évidence le rôle crucial des ostéoclastes dans la pathogenèse de l'érosion osseuse articulaire notamment dans les modèles d'arthrite induites par adjuvant, collagène et par transfert de sérum (Kong et al., 1999), (Romas et al., 2002)(Pettit et al., 2001). De plus, les souris déficientes en ostéoclastes, sont totalement protégées de la résorption osseuse (Pettit et al., 2001), (Redlich et al., 2002).

Le développement des ostéoclastes se produit localement dans le tissu synovial à la suite de l'expression des deux médiateurs ostéoclastogéniques essentiels, M-CSF et RANKL. Cela implique la migration des cellules de la lignée monocyttaire de la moelle osseuse vers les articulations. Certaines données suggèrent que le TNF exprimé dans le tissu synovial, stimule la migration des précurseurs des ostéoclastes à partir de la moelle osseuse vers le sang périphérique (Li et al., 2004). L'inhibition de RANK-L, ou M-CSF plus RANKL dans différents modèles d'arthrites a montrés un blocage de la différenciation des ostéoclastes et l'arrêt de l'érosion osseuse (Ohno et al., 2008). Un essai clinique chez les patients atteints de PR a également montré que le blocage de RANKL par un anticorps neutralisant (denosumab) ralentit la progression de l'érosion osseuse, alors qu'il ne retarde pas l'inflammation (Cohen et al., 2008).

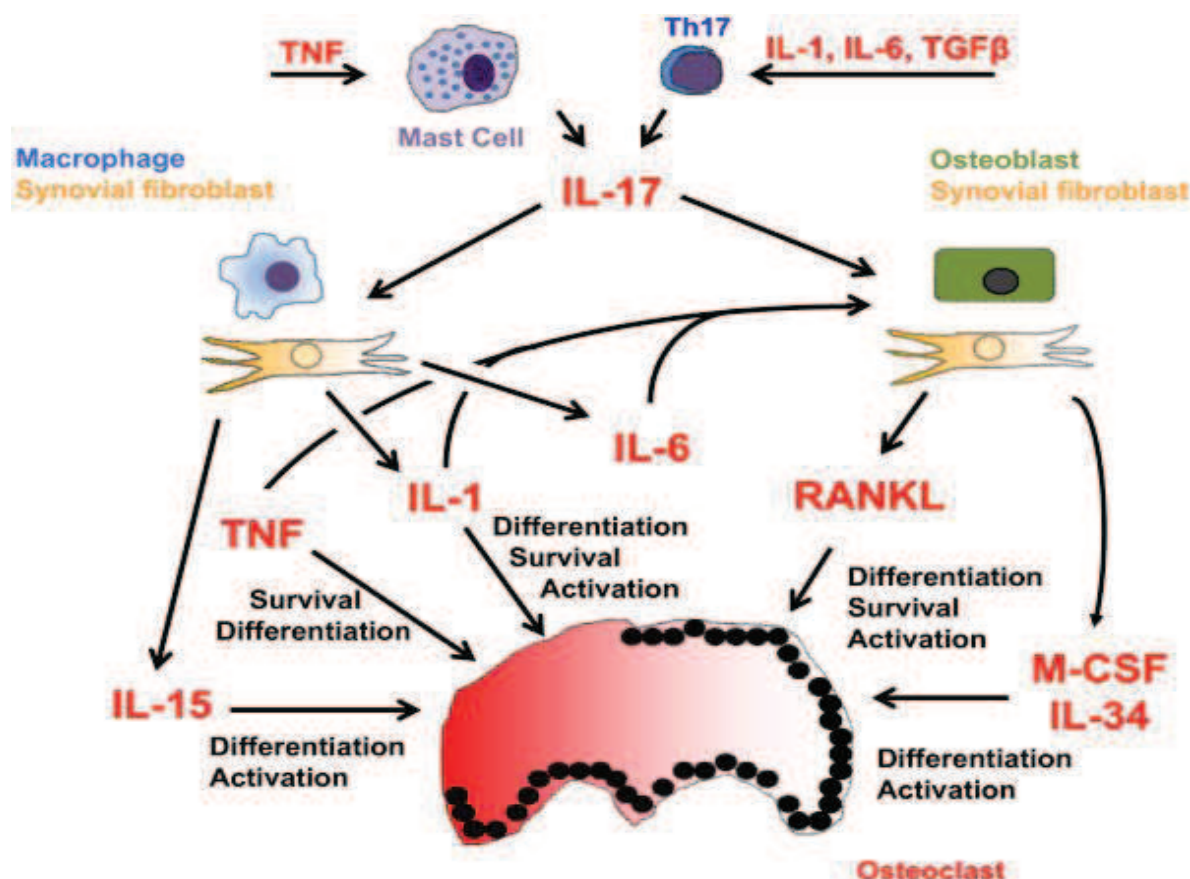


Figure 7 : Cytokines activant l'ostéoclastogenèse dans la polyarthrite rhumatoïde.

(D'après Braun and Zwerina, 2011): les cytokines proinflammatoires (TNF, IL-1, IL-6 et IL-17) régulent positivement l'expression de RANKL dans les ostéoblastes et fibroblastes synoviaux. Ces cytokines agissent d'une manière directe ou indirecte sur les ostéoclastes et favorisent leur différenciation, survie ainsi que leur activation, ce qui induit par la suite la destruction osseuse.

L'inhibition des cytokines avec des anti-TNF- α (infliximab, étanercept, adalimumab, certolizumab-pegol, golimumab) et anticorps anti-récepteur de l'IL-6 (IL-6R) (tocilizumab), est l'une des approches les plus efficaces pour ralentir ou arrêter le processus de destruction osseuse dans la PR (figure 8), et peut empêcher la progression de la perte osseuse systémique. L'explication de cet effet est double. Tout d'abord, ces inhibiteurs sont généralement plus efficaces que les médicaments traditionnels. Deuxièmement, le blocage du TNF et de l'IL-6R

exerce des effets directs sur l'ostéoclastogenèse. Cet argument est soutenu par des observations dans des essais cliniques (Vis et al., 2006), ainsi que par des études montrant que le TNF et l'axe IL-6/IL-6R induisent directement la différenciation des précurseurs ostéoclastiques.

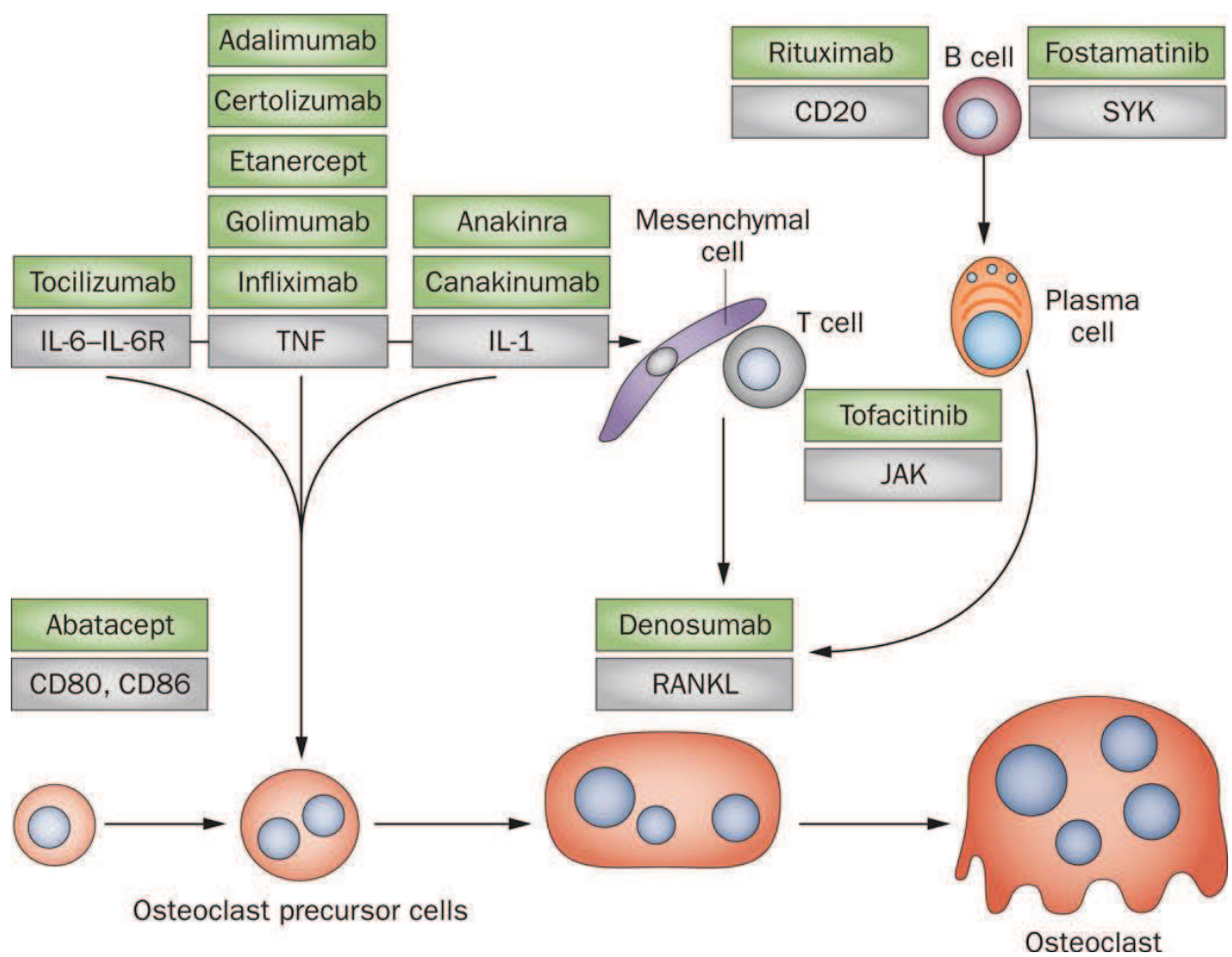


Figure 8 : Site d'action des médicaments anti-rhumatismaux sur la différenciation des ostéoclastes et l'érosion de l'os.

(Schett and Gravallesse, 2012). Les inhibiteurs du TNF, IL-1 et IL-6R bloquent l'expression de RANKL par les cellules mésenchymateuses et les cellules T.

III. Rôle des cytokines dans la polyarthrite rhumatoïde

A chaque phase de la PR, des médiateurs solubles sont sécrétés par différents types cellulaires impliqués dans la pathogenèse de la maladie. Ces facteurs vont jouer un rôle crucial dans l'initiation, l'entretien de l'inflammation et la destruction articulaire.

Le terme de cytokine a été utilisé pour la première fois en 1974 pour décrire la famille de polypeptides sécrétés par une grande variété de cellules engagées dans des réactions inflammatoires (Cohen et al., 1974). Actuellement, le mot « cytokine » est donné pour certaines protéines solubles impliquées dans les échanges et les communications intracellulaires.

Dans la PR, les différentes cytokines vont agir en parallèle ou en synergie, induisant ainsi une dérégulation de la balance cytokinique en faveur des cytokines pro-inflammatoires. De nombreuses études chez l'Homme et dans les modèles expérimentaux d'arthrite ont permis de mettre en évidence le rôle majeur du TNF- α dans la PR, ce qui a conduit au développement de stratégies thérapeutiques visant à inhiber son expression.

A. Le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α)

1. Histoire

Historiquement, le TNF fait référence à un "facteur" induit par des infections bactériennes qui ont entraîné une régression tumorale. Dès la fin du XIXe siècle, des chercheurs comme Dr. P. Brunes puis le Dr. William Coley ont mené des expériences pour traiter de nombreux types de cancers en provoquant des infections aiguës.

En 1975, l'équipe de Carswell a découvert que l'endotoxine bactérienne, LPS, induit la production et la libération de TNF- α chez les souris (Carswell et al., 1975). Le transfert du sérum de ces souris a provoqué une nécrose et la régression des tumeurs transplantées (sarcome de Meth) chez la souris. Ainsi, *in vitro*, ils montrent que le TNF- α est cytotoxique pour les cellules fibroblastiques L929 (Dayer et al., 1985). Les propriétés anti-cancéreuses de cette cytokine ont incité de nombreux laboratoires de recherche à caractériser la structure moléculaire du TNF- α .

2. Structure du TNF- α

Le TNF- α appartient à une superfamille de protéines transmembranaires de type II (protéines ancrées à la surface membranaire par un phospholipide ou une chaîne lipidique). Les protéines de cette famille présentent un domaine d'homologie extracellulaire THD (TNF homology domain). La superfamille du TNF est composée d'une première famille dite « classique » : TNF- α , LT- α , LT- β , LT- $\alpha\beta$ 2, Apo2L/TRAIL, TL1A, LIGHT, FasL, RANKL et CD40L. La deuxième famille EF-disulfure est composée d'APRIL, BAFF, TWEAK et EDA. La troisième catégorie comporte les protéines CD27L, CD30L, GITRL, 4-1BBL (Locksley et al., 2001).

Chez l'Homme, le gène codant le TNF- α est situé sur le chromosome 6, au sein des gènes codant les molécules HLA. Il code une protéine native transmembranaire (tmTNF ou pro-TNF) composée de 233 acides aminés et d'un poids moléculaire de 26 kDa (Bradley, 2008).

La production de TNF- α est régulée positivement par la présence d'IL-1, d'IFN- γ et d'IL-2, et négativement par la présence d'IL-10, de prostaglandine ou de corticostéroïdes. Le TNF- α est produit par de nombreuses cellules, notamment par les macrophages activés ainsi que par les

lymphocytes T. Dans un premier temps cette cytokine est secrétée sous forme d'un précurseur, exprimé à la surface des cellules. La TACE (*tumor necrosis factor- α -converting enzyme*) clive la partie extracellulaire du pro-TNF et libère le TNF- α sous sa forme soluble de 17kDa (sTNF) (Tracey et al., 2008). Le sTNF et le tmTNF sont biologiquement actifs sous forme d'homotrimères et possèdent des propriétés distinctes (Bradley, 2008). Le TNF- α soluble induit un signal intracellulaire après sa liaison avec le récepteur 1 (TNF-R1) et récepteur 2 (TNF-R2).

Le TNF- α est difficilement détectable. En revanche, sous l'effet de divers stimuli reconnus par les cellules productrices de TNF- α (comme les macrophages), l'ARN messager (ARNm) du TNF- α peut être traduit en 30 minutes. Grâce aux modifications post-transcriptionnelles, une partie des ARNm sera dégradé. L'ARNm sera traduit en pro-TNF- α trimérique.

3. Rôle physiologique et pathologique du TNF

Comme indiqué précédemment, le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire avec effet pléiotropique sur plusieurs types cellulaires. Par son rôle pro-inflammatoire, cette protéine, va jouer un rôle critique dans les maladies auto-immunes (Bystrom et al., 2016) (Le Blay et al., 2012).

De nombreuses études suggèrent que le TNF- α soluble, mais aussi la forme membranaire sont impliqués dans la réponse inflammatoire. Le tmTNF exerce ses fonctions biologiques via le contact direct entre les cellules, contrairement au sTNF qui agit sur des sites présents sur différentes cellules. Il a été démontré chez les souris transgéniques pour le TNF- α , que le tmTNF seul est suffisant pour induire des arthrites (Allenbach et al., 2008).

Le tmTNF se lie au récepteur du TNF- α et induit un reverse signaling dans la cellule productrice (Watts et al., 1999). Cette liaison du TNF- α à son récepteur se traduit par plusieurs effets biologiques qui contribuent à la modulation de l'inflammation locale.

L'un des principaux rôles biologiques du TNF- α , est la défense de l'hôte contre les infections bactériennes, virales et parasitaires. Des études ont montré que la co-culture de cellules exprimant le tmTNF avec des lymphocytes T infectés par le VIH induit la mort cellulaire. De même, le contact direct entre les CD4⁺ et les macrophages via le tmTNF inhibe la croissance bactérienne (dans le modèle d'infection à *Leishmania*). Des études menées sur des souris transgéniques exprimant uniquement le tmTNF, suggèrent que le tmTNF seul est suffisant pour contrôler l'infection à *Leishmania* (Allenbach et al., 2008). *In vitro*, la co-culture des cellules T exprimant tmTNF avec des lymphocytes T mémoires, semble suffisante et nécessaire pour induire une réponse intra-cellulaire anti- *Francisella tularensis*.

En 2005, l'équipe de David Torres a pu démontrer que le tmTNF participe à la réponse immunitaire anti-*Listeria* chez les souris transgéniques pour le tmTNF. En absence de sécrétion de TNF- α soluble, le tmTNF améliore la capacité des macrophages à tuer *L. monocytogenes* (Torres et al., 2005).

La réponse immunitaire contre *Mycobacterium tuberculosis* est régulée par plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes T, macrophages, mais aussi par la production de cytokines comme l'INF- γ , l'IL-12 et le TNF- α (Sia et al., 2015)

Dans ce contexte, le rôle du TNF- α a été largement étudié par des approches de neutralisation ou chez des souris transgéniques, infectées par différentes souches de mycobactéries. Ainsi, le tmTNF seul, semble suffisant afin de résister à une infection aiguë par *M. tuberculosis* mais insuffisant pour maintenir une protection sur le long terme (Saunders et al., 2005). Cette

cytokine est aussi impliquée dans l'homéostasie tissulaire en raison de son action pro-apoptotique et de sa capacité à activer les MMP de la matrice extracellulaire.

a. Rôle du TNF dans la PR

Au cours de la PR, la synoviale est infiltrée par plusieurs types de cellules telles que des lymphocytes T activées et des macrophages. Ces cellules et les cytokines qu'elles produisent contribuent au maintien de l'inflammation et à la progression de la maladie. Des analyses immunohistochimiques ont mis en évidence la présence et la production de TNF- α par les macrophages activés localisés à la jonction du cartilage avec le pannus (Chu et al., 1991) (Alsalameh et al., 1999) (Brennan FM, 2008).

Le TNF- α induit l'activation et l'accumulation des leucocytes ainsi que l'activation des cellules endothéliales. Il entraîne l'activation et la survie des synoviocytes fibroblastiques.

De plus, il joue un rôle crucial dans l'angiogenèse qui est observée au cours de la PR. Le TNF- α permet une production rapide de diverses cytokines pro-inflammatoires ainsi que des protéines de phase aigüe.

i. Chez les patients PR

Des études faites en *ex vivo* révèlent l'importance du TNF- α dans la pathologie humaine. En effet, l'ajout de TNF- α recombinant dans la culture des synoviocytes humaines et de fibroblastes dermiques entraîne la production de collagénase et de prostaglandine E2 (PGE2) (Dayer et al., 1985).

Les expériences menées *in vitro*, ont montré que le TNF- α active directement les ostéoclastes et induit la résorption osseuse (Thomson et al., 1987). De plus, le TNF- α induit l'activation des leucocytes et des cellules endothéliales, l'activation et la survie des fibroblastes synoviaux, mais aussi l'angiogenèse (Clavel et al., 2003). L'utilisation des anticorps anti-TNF induit une baisse de production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le GM-CSF (Butler et al., 1995) (Haworth et al., 1991). Cela suggère un rôle central de cette cytokine dans le processus inflammatoire au cours de la PR (figure 9).

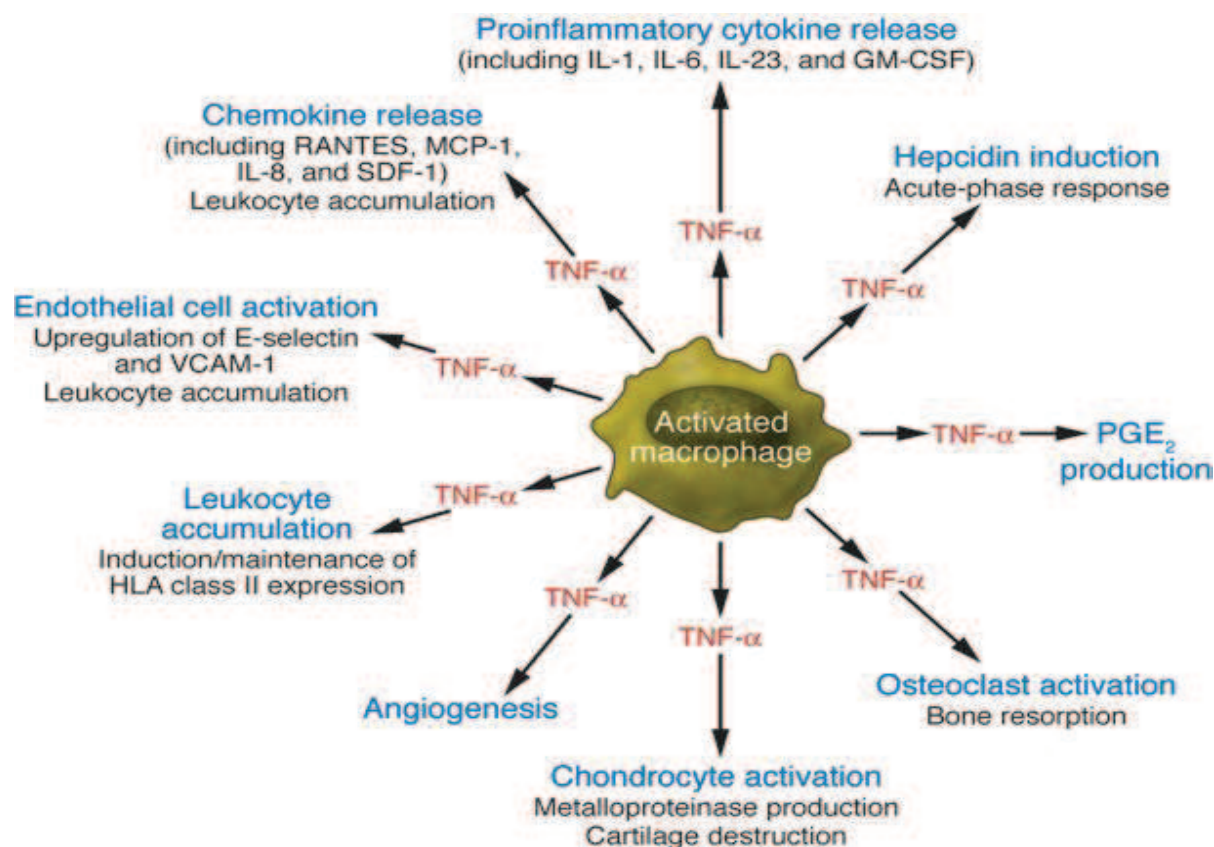


Figure 9 : Action du TNF- α dans la pathogenèse de la PR. (d'après Brennan FM, 2008).

Le TNF est sécrété par les macrophages activés au niveau de la membrane synoviale des patients arthritiques. Cette cytokine est impliquée dans la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-1. Le TNF- α induit la production de chimiokines, ce

qui favorise la migration des leucocytes de la circulation sanguine vers les tissus enflammés. Cette migration est optimisée par la production de molécules d'adhérence notamment les intégrines, VCAM-1. Le TNF- α va jouer un rôle dans la destruction du cartilage et l'activation des ostéoclastes, via la production d'enzymes comme les MMP. Enfin, le TNF peut favoriser l'angiogénèse par son action sur les cellules endothéliales.

ii. Dans les modèles expérimentaux d'arthrite

Les modèles expérimentaux ont eu un rôle clé dans la confirmation de l'importance du TNF- α dans la PR. Le modèle d'arthrite expérimentale au collagène est l'un des modèles expérimentaux les plus utilisés pour étudier la maladie. Ce modèle ressemble beaucoup à la PR. Le modèle d'AEC est induit chez les souches de souris susceptibles au collagène de type II. Comme chez l'homme, la susceptibilité à la maladie est liée aux molécules de classe II du CMH et le développement de la maladie s'accompagne d'une réponse immune B et T anti-collagène, ce qui induit une inflammation et une destruction articulaire. Différentes équipes avaient pu montrer que l'utilisation d'un anticorps anti-TNF diminue l'atteinte articulaire chez les souris traitées (Piguet et al., 1992). Ces résultats suggèrent un rôle essentiel de cette cytokine dans ce modèle d'arthrite induit. L'effet de blocage du TNF était comparé aux effets de blocage de l'IL-1 β dans l'AEC. Les résultats obtenus ont montré que l'inhibition du TNF- α , améliore la maladie après l'apparition des symptômes or le blocage de l'IL-1 β est efficace sur une arthrite bien établie (Joosten et al., 1996). Cela suggère que le TNF- α aurait un rôle important dans le processus inflammatoire contrairement à l'IL-1 qui jouerait plutôt un rôle dans la dégradation du cartilage (Joosten et al., 1999).

Les souris transgéniques pour le TNF- α humain ont été largement utilisées comme modèle de PR. En effet, les souris surexprimant le TNF humain (hTNF), développent des arthrites

spontanées quelques semaines après leur naissance. Les arthrites développées par ces souris partagent de nombreuses caractéristiques avec la polyarthrite rhumatoïde humaine (Keffer et al., 1991). La souris Tg197 développe des arthrites dès la 3^{ème} semaine de vie. Ces souris développent une hyperplasie de la membrane synoviale et leurs articulations sont infiltrées par des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes. A un stade plus tardif, on observe la formation d'un pannus, ainsi qu'une dégradation du cartilage et la production de tissus fibreux. Les anticorps anti-TNF- α inhibent le développement des arthrites aussi bien cliniquement qu'histologiquement chez de jeunes Tg197 ou des souris plus âgées, et protègent ces souris de la cachexie (Shealy et al., 2002)(Douni et al., 2004). Ces modèles ont permis de mieux comprendre la physiopathologie de la PR.

b. Autres maladies TNF dépendantes

i. Maladies inflammatoires intestinales

Certaines études chez des patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ont montré une augmentation du TNF- α dans les échantillons intestinaux (Breese et al., 1994). De plus les souris surexprimant le TNF- α développent des symptômes proches de la maladie de Crohn (Kontoyiannis et al., 1999). L'infliximab est considéré comme un traitement efficace chez les patients atteints de la maladie de Crohn. De plus, l'utilisation de l'anticorps anti-TNF- α humanisé CDP571 est considérée comme traitement efficace chez les patients atteints d'une maladie modérée. Cependant, des études ultérieures ont montrées que CDP571 n'est pas efficace pour un traitement à long terme (Sandborn et al., 2004).

ii. Choc septique

Le TNF- α est une cytokine régulatrice, elle joue un rôle crucial dans la réponse aux infections, dans la réponse tumorale et les pathologies inflammatoire. En effet, cette protéine

est impliquée dans le choc septique. Au cours d'une infection, l'organisme produit une forte quantité de cytokines pro-inflammatoires. Cette production de cytokines est initiée d'une part par la phagocytose de pathogènes et d'autre part par la présence d'endotoxine ou de lipopolysaccharides (LPS) dans la circulation et sur la membrane bactérienne Gram -. Cela stimule les cellules immunitaires telles que les monocytes/macrophages et conduit à la production des cytokines inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF- α (Dinarello, 1997). Dans les modèles expérimentaux, l'injection de plus ou moins fortes doses de TNF- α entraîne un choc septique chez les souris qui peut être prévenu par le traitement par des anticorps anti-TNF- α (Tracey et al., 1987).

iii. Spondylarthrite ankylosante

La spondylarthrite ankylosante (SpA) est une maladie rhumatismale inflammatoire affectant principalement le rachis et les articulations sacro-iliaques. Cette maladie peut conduire à des déficits structurels et fonctionnels et une diminution de la qualité de vie. Des études menées sur des patients ont mis en évidence la présence de TNF- α au niveau des articulations sacro-iliaques et cela au stade précoce de la maladie. De plus, le niveau de TNF- α dans le sérum est corrélé à l'activité de la maladie (Bradley, 2008b). Les études cliniques chez les patients atteints de SpA montrent une amélioration significative des symptômes de la maladie sous anti-TNF- α (Etanercept et Inflixmab) (Inman et al., 2006)(Baraliakos et al., 2005), cela montre un rôle prépondérant de cette cytokine dans la SpA.

iv. Le psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau pour laquelle l'infiltration cellulaire entraîne une hyperkératose, avec formation de plaques psoriasiques. Plusieurs caractéristiques cliniques comme l'aspect, la rougeur et la localisation des plaques permettent de discerner les

différentes formes de psoriasis. Chez les patients, le TNF- α , et ses récepteurs TNF-R1 et TNF-R2 sont fortement détectés dans les lésions cutanées ainsi que dans le sang. Cette cytokine est impliquée dans la migration des cellules de Langerhans et diminue l'expression de la E-cadherin au cours de la maladie. Un essai clinique utilisant de l'infliximab a montré une diminution de la surface des plaques de psoriasis ainsi qu'une diminution de la sévérité de la maladie (Gottlieb et al., 2004). D'autres études plus récentes montrent une efficacité de traitement avec l'etanercept et adalimumab (Gordon et al., 2012), (Papp et al., 2012).

v. Les maladies respiratoires

Le TNF- α est également impliqué dans la bronchite chronique, le syndrome de détresse respiratoire et asthme (Mukhopadhyay et al., 2006). Dans l'asthme, le TNF- α joue un rôle dans l'inflammation locale. Des études ont déjà démontré une augmentation du TNF- α libéré par les leucocytes dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire des patients asthmatiques. Les études cliniques sur des patients PR souffrant d'asthme ont montrées que le traitement avec infliximab améliore les symptômes de l'asthme (Bradley, 2008).

vi. Les maladies du système nerveux central

Dans le cas des maladies du système nerveux central, comme la sclérose en plaques (SEP), le TNF- α est produit principalement par la microglie et les astrocytes en réponse à divers processus pathologiques. Cette cytokine possède des effets contradictoires dans ce type de pathologie. Ainsi, le blocage du TNF- α dans un modèle murin de lésions ischémiques du cerveau entraîne une amélioration des symptômes (Nawashiro et al., 1997), alors que des souris déficientes en TNF- α sont très susceptibles au développement d'une encéphalite autoimmune expérimentale (EAE) (Liu et al., 1998). Chez les patients atteints de SEP,

l'inhibition du TNF- α par une protéine de fusion du récepteur de type I du TNF- α (lénercept) ne montre aucune amélioration de la maladie et au contraire l'exacerbe.

vii. Les maladies rénales

Le TNF- α est aussi impliqué dans des maladies rénales, telles que la néphropathie associée au diabète de type 2 (Navarro-González et al., 2009). La neutralisation de cette cytokine dans ces pathologies rénales a montré une grande variabilité dans l'efficacité de différents anti-TNF, suggérant un rôle controversé du TNF- α dans ces pathologies.

viii. Les maladies cardiovasculaires

Le rôle du TNF- α a aussi été démontré dans certaines maladies cardio-vasculaires, comme l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde ou le rejet de greffe cardiaque. Cependant, les essais cliniques avec les anti-TNF- α ne mettent pas en évidence d'effet dans l'insuffisance cardiaque congestive (Bradley, 2008b)

B. Rôle des autres cytokines dans la PR

Comme nous l'avons vu précédemment, à chaque phase de la PR, à côté du TNF- α , différentes cytokines sont sécrétées par différents types cellulaires et jouent un rôle important dans le développement de la pathologie (Venkatesha et al., 2015).

Bien que l'étiologie précise des maladies autoimmunes ne soit pas connue, il est généralement admis qu'un déséquilibre de la balance cytokinique joue un rôle majeur dans la pathogenèse de ces maladies. Dans la PR, on observe un déséquilibre en faveur des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines sont produites principalement par les cellules Th1 et Th17. Les cellules Th1 secrètent principalement de l'IFN- γ , de l'IL-2 et du TNF- α , alors que les Th17

produisent de l'IL-17A, du TNF- α et de l'IL-6. Les cellules Th2 secrètent des cytokines anti-inflammatoires : l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 ou encore l'IL-15. Néanmoins, dans le cas de la PR, la sécrétion par les Th2 ne compense pas la production de cytokines pro-inflammatoires, d'où le déséquilibre cytokinique.

La première cytokine décrite comme étant impliquée dans la pathogenèse de la PR a été l'interleukine-1 (IL-1). Cette cytokine a été identifiée par différentes équipes utilisant des méthodes de dosages biologiques différents (Dayer, 2002). La culture de synoviocytes humains avec l'IL-1 induit la stimulation des chondrocytes. Ces dernières produisent à leur tour de la MMP-1 et de la PGE2 (Dayer et al., 1979). L'IL-1 comprend l'IL-1 α , responsable de l'inflammation locale et l'IL-1 β , sécrétée principalement par les monocytes/macrophages et qui a une action à plus grande distance (Dinarello, 1996). Des études menées sur des modèles expérimentaux ont mis en évidence le rôle prépondérant de l'IL-1 dans la destruction articulaire. Ainsi, des injections intra-articulaires d'IL-1 induisent une inflammation de la synoviale, une infiltration de leucocytes dans la cavité articulaire et la membrane synoviale, ainsi qu'une déplétion des protéoglycanes (Loo and Berg, 1990). De plus, chez le lapin, une surexpression d'IL-1 β via l'utilisation d'adénovirus, entraîne le développement d'une arthrite chez ces animaux (Ghivizzani et al., 1997). A l'inverse, les études bloquant l'IL-1 β dans plusieurs modèles expérimentaux d'arthrite ont montré une diminution de la sévérité de la maladie (van den Berg, 2001).

L'antagoniste du récepteur de l'IL-1, IL-1Ra, est un inhibiteur naturel de l'IL-1 β capable d'inhiber la résorption osseuse et la production de PGE2 induite par l'IL-1 (Seckinger et al., 1990). Par la suite, un autre membre de la famille de l'IL-1 a été découvert, l'IL-18. L'injection d'IL-18 à des souris DBA/1 dans le modèle d'arthrite au collagène induit le développement d'arthrites sévères avec des érosions (Gracie et al., 1999).

Hormis le rôle majeur du TNF- α et de l'IL-1 β dans le processus inflammatoire de la PR, il existe d'autres cytokines très impliquées dans la maladie : l'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire produite par les lymphocytes Th17. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de forte quantité d'ARNm de l'IL-17 au niveau des articulations des patients (Moran et al., 2009). L'IL-17 favorise la sécrétion d'IL-6, d'IL-8, d'IL-21, de TNF- α et de PGE2 (Peck and Mellins, 2009).

Au cours de la PR, l'IL-17 joue un rôle important dans le processus d'angiogénèse. En effet, cette cytokine stimule les synoviocytes fibroblastique (FLS) pour produire du VEGF. De plus, l'IL-17 induit l'expression de cyclooxygénase-2 (COX-2) par les synoviocytes, ce qui induit l'augmentation de PGE2 observée au cours de l'inflammation. Dans certaines études, une surexpression locale d'IL-17 augmente la vascularisation. *In vitro*, cette cytokine favorise la formation des vaisseaux sanguins en matrigel (Pickens et al., 2010). Dans le modèle d'AEC, il a été montré que la surexpression d'IL-17 entraîne une destruction articulaire, montrant *in vivo* un rôle de l'IL-17 dans l'érosion osseuse. Le blocage de l'IL-17 par des anticorps monoclonaux a montré la contribution de cette cytokine dans le processus inflammatoire destructeur (Chabaud et al., 2000). La production d'IL-23 par les cellules dendritiques et les macrophages activés entraîne la production d'IL-17, suggérant un rôle de l'IL-23 dans la régulation de l'IL-17 (Lubberts et al., 2005).

Une autre cytokine est aussi très impliquée dans la pathogenèse de la PR et exerce également une activité pro-inflammatoire : le vascular endothelial growth factor (VEGF). Le rôle de cette cytokine sera détaillé dans la prochaine partie du manuscrit.

Pour contrebalancer les effets délétères des cytokines pro-inflammatoires, la présence de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-13 ou l'IL-10 ainsi que les inhibiteurs naturels des cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-1Ra, est nécessaire (van de Loo and

van den Berg, 2002) La surexpression locale d'IL-10 entraîne une amélioration de l'AEC (Saidenberg-Kermanac'h et al., 2003). L'IL-10 est préférentiellement produite par les cellules T régulatrices, tout comme l'IL-35 (appartenant à la famille de l'IL-12) qui montre également des propriétés suppressives dans le modèle d'AEC (Niedbala et al., 2007). D'autres cytokines de la superfamille de l'IL-1 (IL-33), de la superfamille de l'IL-2 (IL-15 et IL-21) jouent également un rôle plus ou moins bien défini dans la PR.

IV. Place de l'angiogenèse dans la PR

Le phénomène d'angiogenèse, ou la formation de néo-vaisseaux, est important dans plusieurs pathologies telles que la rétinopathie, le psoriasis, la croissance tumorale et la PR. La croissance de nouveaux vaisseaux sanguins contribue probablement à l'infiltration de la membrane synoviale, la prolifération cellulaire et la formation de pannus synovial.

Le processus d'angiogenèse est régulé par des facteurs pro- et anti-angiogéniques. Ces médiateurs comprennent les cytokines, les chémokines, les facteurs de croissance, les molécules d'adhésion, les protéinases et les composés de la matrice extracellulaires (Szekanecz and Koch, 2001).

A. Les facteurs de l'angiogenèse

1. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Le VEGF est un des médiateurs principaux du processus d'angiogenèse. La famille du VEGF comprend sept protéines codées par des gènes différents : le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E, le VEGF-F (Ferrara et al., 2003) et le PlGF (placental growth factor) (figure 10). Toutes ces cytokines ont une séquence commune caractérisée par 8 résidus cystéines (« nœud à cystéines »). Ces membres exercent leur action via des récepteurs VEGF-R1, VEGF-R2 et VEGF-R3. La neuropiline-1 (Nrp-1) et Nrp-2 sont des co-récepteurs pour certains membres de la famille du VEGF. Cette cytokine augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins. Le PlGF se fixe spécifiquement sur le VEGF-R1 et induit sa phosphorylation. Certaines études *in vitro*, ont montré que le PlGF stimule la croissance et la migration des cellules endothéliales. VEGF-R1 et VEGF-R2 sont deux récepteurs à activité tyrosine kinase exprimés principalement par les cellules endothéliales.

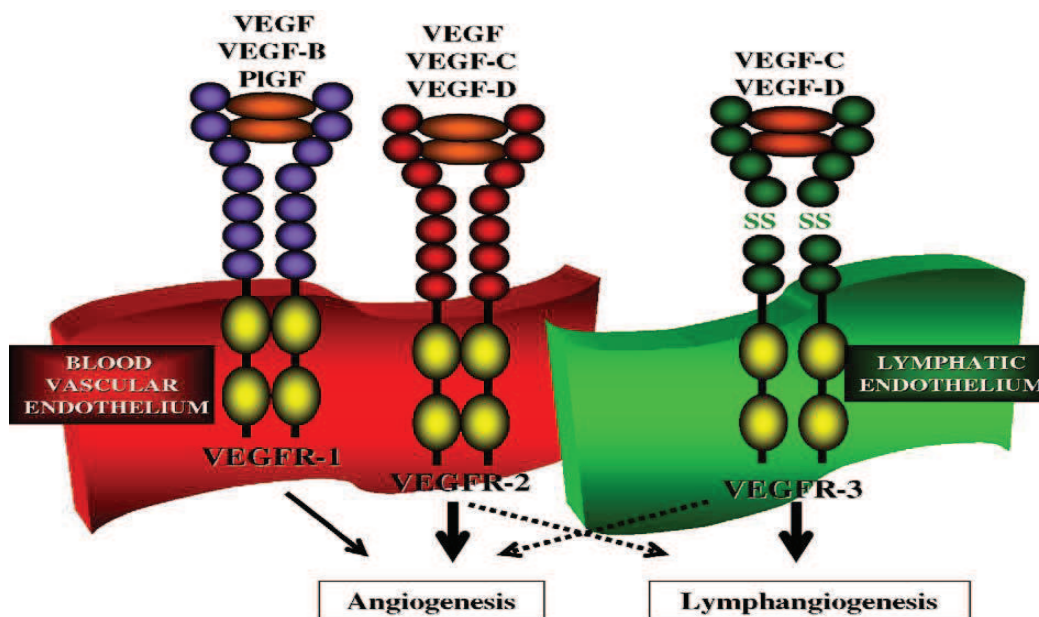


Figure 10 : principaux membres de la famille du VEGF et ses récepteurs. (d'après Tammela et al., 2005)(Nash et al., 2006). Les VEGF-R1 et -R2 sont exprimés sur les cellules

endothéliales des vaisseaux sanguins. Ces deux récepteurs lient le VEGF (VEGF-A), B, D et PlGF et induisent l'angiogenèse. Le VEGF-C et D sont capables de se lier au récepteur 3 et jouent un rôle principalement dans la lymphangiogenèse.

a. VEGF-A

Cette cytokine est produite par plusieurs types de cellules telles que les cellules endothéliales, les macrophages, et les lymphocytes T. Son rôle principal est l'induction de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse, mais aussi dans la formation de tubes à partir des cellules endothéliales. En effet, elle favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Le gène codant pour le VEGF-A est situé sur le chromosome 6. Cette cytokine se lie au récepteur VEGF-R1 et R2, mais aussi aux co-récepteurs Nrp-1 et 2. La surexpression de VEGF-A induit une forte angiogenèse dans les tissus (figure 11).

Le VEGF-A a été initialement décrit comme étant un facteur sécrété par les cellules de carcinome, favorisant la perméabilité des vaisseaux. Cette cytokine induit également la migration des cellules endothéliales. De plus, elle augmente la vasodilatation par induction de eNOS (endothélial nitric oxide synthase) et la production d'oxyde nitrique NO (Maracle and Tas, 2014). Le VEGF-A favorise aussi la survie des cellules endothéliales en induisant l'expression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Maracle and Tas, 2014). A l'heure actuelle, il existe au moins six isoformes différentes du VEGF-A (121, 145, 165, 183, 189 et 206 acides aminés). Certains isoformes se lient également à l'héparine sulfate et à la neuropiline. Ces isoformes du VEGF-A peuvent être piégés dans la matrice extracellulaire.

b. VEGF-B

Chez l'Homme, le gène codant pour le VEGF-B est localisé sur le chromosome 11 (11q13) ; il a une taille d'environ 4000 pb; il contient huit exons et six introns (Maracle and Tas, 2014). Deux isoformes de cette molécule sont actuellement connus : le VEGF-B₁₆₇ et le VEGF-B₁₈₆. Le VEGF-B₁₆₇ est exprimé par beaucoup de tissus notamment les muscles squelettiques et le myocarde, en revanche, le VEGF-B₁₈₆ est exprimé uniquement par certains tissus et à une faible quantité

Le VEGF-B se lie au VEGF-R1 et Nrp-1. De plus, il peut former un hétérodimère avec le VEGF-A (Tammela et al., 2005)(Nash et al., 2006). Le VEGF-B₁₆₇ peut se lier à l'héparine sulfate, de cette manière, il est séquestré dans la matrice extracellulaire. A l'inverse, le VEGF-B₁₈₆ diffuse librement.

Le rôle du VEGF-B est mal connu. Cependant, les souris déficientes pour cette cytokine ont de plus petits cœurs que les souris normales et ont du mal à se remettre après un infarctus du myocarde induit expérimentalement. Ces observations suggèrent que le VEGF-B intervient dans la réparation des dommages au cours de l'athérosclérose (Bellomo et al., 2000). De plus, le VEGF-B aurait aussi un rôle dans l'angiogenèse impliquée dans l'inflammation. En effet, dans l'AEC, les souris dépourvues de cette cytokine ont une angiogenèse diminuée (Mould et al., 2003). Enfin, de fortes concentrations en VEGF-B sont associées avec le développement de métastases dans le cas du cancer colorectal (Kawakami et al., 2003).

c. VEGF-C

Le gène codant pour cette cytokine est situé sur le chromosome 4 (4q34), et est formé de sept exons. Le VEGF-C est synthétisé sous forme d'un propeptide ; il subit une maturation protéolytique formant un dimère sécrété constitué de deux sous-unités de 29 et 31 kDa. Cette

cytokine a une forte affinité pour le VEGF-R2 et -R3 (Joukov et al., 1997). Le VEGF-C est exprimé par plusieurs tissus comme le cœur, les intestins, le placenta et la thyroïde. Il joue un rôle mitogénique et favorise la migration des cellules endothéliales.

Le VEGF-C est un chémoattractant pour les macrophages et son récepteur est exprimé par une fraction de monocyte du sang périphérique ainsi que par les macrophages activés dans les tissus (Skobe et al., 2001). Avec le temps, l'expression du VEGF-C diminue dans la plupart des tissus, mais reste élevée dans les ganglions drainants (Lymboussaki et al., 1999).

d. VEGF-D

Comme le VEGF-C, la forme mature du VEGF-D se lie et active le VEGF-R2 et VEGF-R3. Cette cytokine favorise la prolifération des cellules endothéliales. *In vivo*, le VEGF-D induit fortement l'angiogenèse, mais moins la lymphangiogenèse. Le VEGF-D murin se lie uniquement au récepteur 3 (Tammela et al., 2005). Cela suggère que le VEGF-D a des rôles différents chez la souris et chez l'homme. Cette cytokine est présente dans différents tissus chez l'homme ainsi que chez la souris. Néanmoins, chez la souris, le VEGF-D est très abondant dans la peau et le poumon pendant l'embryogenèse. Il est aussi exprimé dans plusieurs types tumoraux : mélanome, cancer du sein, cancer du poumon.

e. VEGF-E

Le VEGF-E est un dimère de 44kDa, il ne possède que 20% à 25% d'identité de séquence avec le VEGF-A. Il ne contient pas de domaine de liaison à l'héparine. Le VEGF-E stimule la prolifération des cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire avec une activité similaire au VEGF-A et se lie spécifiquement au VEGF-R2 (Meyer et al., 1999).

f. VEGF-F

Le VEGF-F a été identifié à partir du venin de serpent. Il en existe deux isoformes, la vammine (110 acides amines) et VR-1 (109 acides amines). Ces deux protéines possèdent 50% d'homologie avec le VEGF-A et se lient au VEGF-R2 (Suto et al., 2005). *In vitro* et *in vivo*, le VEGF-F bloque l'activité du VEGF-A (Yamazaki et al., 2005).

g. Les angiopoïétines

D'autres médiateurs de l'angiogénèse sont identifiés depuis une vingtaine d'années : les angiopoïétines. Cette famille comprend 4 ligands (Ang-1 à -4) qui se fixent sur deux récepteurs à activité tyrosine kinase, Tie-1 et Tie-2. Les angiopoïétines agissent en synergie avec le VEGF pour favoriser la maturation et la stabilisation des néo-vaisseaux (Semerano et al., 2011). Les quatre angiopoïétines partagent la capacité de se lier à Tie2. Ang-1 agit de façon paracrine pour induire la phosphorylation de Tie2, et favorise le maintien et la stabilité vasculaire (Metheny-Barlow and Li, 2003). Ang-1 protège les cellules endothéliales de l'apoptose, agit sur leur survie, et permet leur migration. Ang-2 est exprimé par les cellules endothéliales, est induite principalement par l'hypoxie et est fortement exprimée dans le cas des tumeurs. De plus, cette protéine joue un rôle dans la déstabilisation des vaisseaux préexistants.

h. Placental growth factor (PIGF)

Le PIGF est un facteur de croissance exprimé dans plusieurs tissus humains : placenta, mais aussi le poumon, le cœur, la glande thyroïdienne. Il existe quatre isoformes : PIGF-1, PIGF-2, PIGF-3 et PIGF-4. PIGF se lie au VEGF-R1. Certains membres de cette famille (PIGF-1, PIGF-3), ne possèdent pas de domaine de liaison avec l'héparine. Contrairement à PIGF-4 qui est capable de se lier à l'héparine. PIGF2 est la seule isoforme se liant à NP-1 et NP-2.

Un défaut en PlGF altère l'angiogenèse, l'inflammation et la cicatrisation (Carmeliet et al., 2001).

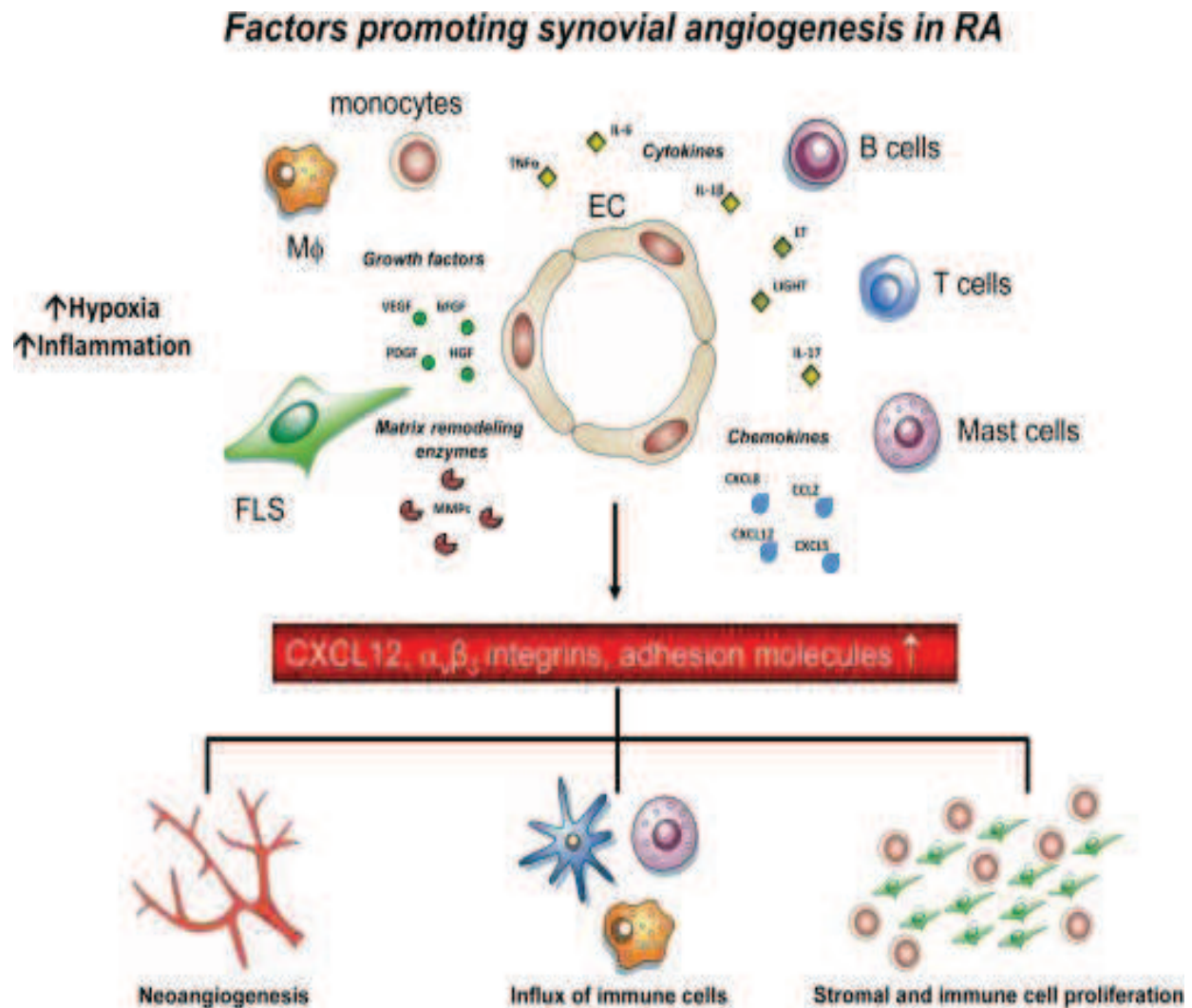


Figure 11 : Angiogenèse synoviale dans la PR induite par l'hypoxie et l'inflammation.

(D'après Maracle and Tas, 2014). Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans l'angiogenèse au cours de la PR, tels que les fibroblastes (FLS), macrophages, lymphocytes T et B. Plusieurs médiateurs chimiques sont également impliqués (VEGF, TNF, IL-1 β , MMP...). Toutes ces cellules et facteurs stimulent les cellules endothéliales à surexprimer des

chimiokines et des molécules d'adhérence nécessaires à la néo-vascularisation, migration et prolifération cellulaire.

2. Les récepteurs du VEGF

a. VEGF-R1

Le VEGF-R1 ou fms tyrosine kinase (Flt-1) est une protéine de 180 kDa. Elle est composée d'une partie extracellulaire (constitué de sept domaines de type Ig), une seule partie transmembranaire et un domaine intracellulaire de type tyrosine kinase (TK) (Shibuya et al., 1990). C'est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-A, le VEGF-B et PlGF. Au cours du développement, ce récepteur est exprimé par l'endothélium et les angioblastes.

Le VEGF-R1 joue un rôle dans la migration des monocytes et augmente les propriétés adhésives des cellules NK (Barleon et al., 1996)(Lyden et al., 2001)(Chen et al., 2002). Ce récepteur est impliqué dans la régulation de l'angiogenèse et la vascularisation. Cependant, il joue un rôle principal dans la libération des facteurs de croissance spécifiques d'un tissu (LeCouter et al., 2003). Le VEGF-R1 existe aussi sous forme soluble. Son rôle est l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF (Kendall and Thomas, 1993). Ce récepteur soluble agit comme un antagoniste spécifique du VEGF-A et du PlGF. Le VEGF-R1 soluble est fortement exprimé dans le plasma de personnes atteintes de cancer, d'ischémie ou de pré-éclampsie (Toi et al., 2002) (Levine et al., 2004).

b. VEGF-R2

Le VEGF-R2 est une protéine de 150 kDa (Terman et al., 1991). Il a été appelé kinase domaine récepteur (KDR) chez l'homme. Le VEGF-R2 est exprimé par plusieurs types

cellulaire: les cellules endothéliales, les cellules neurales, les ostéoblastes, les mégacaryocytes et les cellules souches hématopoïétiques (Matsumoto and Claesson-Welsh, 2001). Comme le VEGF-R1, ce récepteur est impliqué dans l'activation, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De plus, il augmente la perméabilité vasculaire. Le VEGF-R2 est nécessaire au rôle anti-apoptotique du VEGF sur les cellules endothéliales de veine de cordon ombilicale (Gerber et al., 1998).

c. VEGF-R3

Le VEGF-R3 ou flt-4 est une protéine de 195 kDa composée de six domaines extracellulaires de type Ig. Il lie le VEGF-C et le VEGF-D. L'épissage alternatif du gène codant pour ce récepteur génère deux isoformes qui diffèrent dans leur domaine C-terminal. Plusieurs études ont démontré que dans certaines pathologies, notamment les tumeurs vasculaire, ce récepteur est surexprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Pajusola et al., 1993). Le VEGF-R3 joue un rôle dans le développement cardiovasculaire et le réseau vasculaire primaire au cours de l'embryogenèse.

d. Les neuropilines

Il existe deux neuropilines : la neuropiline-1 (NP-1) et la neuropiline-2 (NP-2). Chez l'homme, le gène codant la NP-1 est localisé sur le chromosome 10 et celui codant la NP-2 se trouve sur le chromosome 2. Chacun de ces deux gènes est constitué de 17 exons (Bielenberg et al., 2006). Les neuropilines comprennent dans leur domaine extracellulaire un domaine liant le complément, un domaine homologue du facteur de coagulation V/VII et un domaine MAM (meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu) impliqué dans la dimérisation de ce récepteur (Miao and Klagsbrun, 2000). Au cours de l'embryogenèse, la NP-1 est exprimée par les systèmes nerveux et cardiovasculaire (Kitsukawa et al., 1995).

Chez l'adulte, ce récepteur est exprimé par des cellules endothéliales, des cellules tumorales, des ostéoblastes et des cellules stromales de la moelle osseuse, mais aussi les poumons, le cœur, le foie, les reins, le pancréas (Soker et al., 1998) (Tordjman et al., 1999).

La NP-1 peut lier le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF, tandis que NP-2 lie le VEGF-A, le VEGF-C et le PlGF (Makinen et al., 1999)(Gluzman-Poltorak et al., 2001). La NP-1 est un co-récepteur, facilitant l'interaction entre le VEGF₁₆₅ et le VEGF-R2 ; il est aussi impliqué dans la formation de complexes avec le VEGF-R1 et augmente l'angiogenèse tumorale *in vivo*. Des études ont démontré que la surexpression de NP-1 chez des souris chimériques entraîne une augmentation de la formation de capillaires et de vaisseaux sanguins accompagnée d'hémorragies et de malformations cardiaques. Il existe une forme soluble de NP-1 agissant comme antagoniste naturel de la NP-1. Ce co-récepteur soluble inhibe la liaison du VEGF₁₆₅ à ses récepteurs sur les cellules tumorales et à l'endothélium. Sur les cellules endothéliales, la NP-1 soluble empêche la phosphorylation des tyrosines du VEGF-R2 induite par le VEGF₁₆₅ (Gagnon et al., 2000).

B. Rôle et mécanismes de l'angiogenèse dans la PR

L'augmentation de l'angiogenèse est associée à plusieurs maladies inflammatoires, notamment la néovascularisation oculaire et la PR. Dans le cas de la PR, l'angiogenèse précède les signes cliniques et histologiques de l'inflammation (Hirohata and Sakakibara, 1999). Elle est aussi nécessaire à la persistance de l'inflammation et donc au maintien de la pathologie (Semerano et al., 2011). Au cours de la PR, les leucocytes migrent de la circulation sanguine vers la membrane synoviale. Cette migration implique un certain nombre de molécules d'adhérence cellulaire, telles que les sélectines, les intégrines ainsi que leurs

ligands. De plus, d'autres médiateurs inflammatoires comme les cytokines et des chimiokines peuvent promouvoir à la fois l'adhérence cellulaire, et l'angiogenèse. Ce dernier induit l'activation, la prolifération et la migration des cellules endothéliales ; ainsi les macrophages activés entrent dans la membrane synoviale et participent au développement du pannus et à l'érosion osseuse (Månsson et al., 1995). Il a été démontré *in vitro*, que le liquide synovial provenant des patients atteints de PR, agit sur les cellules endothéliales humaines, en modifiant leur morphologie. Il leur confère une structure en tube et induit l'angiogenèse (Semble et al., 1985). Chez les malades, le nombre de vaisseaux sanguins de la membrane synoviale est corrélé avec l'hyperplasie synoviale et l'infiltration des cellules mononucléées (Rooney et al., 1988). De plus, une prolifération vasculaire a été mise en évidence au niveau des articulations enflammées en comparaison avec des articulations non enflammées (FitzGerald et al., 1991). Les taux de VEGF dans le sérum des patients sont augmentés et corrélés avec les marqueurs de l'inflammation tels que la CRP (Harada et al., 1998). Même chez les patients atteints de PR depuis moins de 2 ans, les taux de VEGF sont élevés. Ce résultat est en adéquation avec les résultats précédents qui suggèrent que l'angiogenèse est impliquée dans les premiers stades de la PR (Ballara et al., 2001). Chez les patients suivis pour une polyarthrite débutante, les taux sériques de marqueurs de l'inflammation sont fortement corrélés avec les signes cliniques et biologiques d'arthrites, ainsi qu'avec la destruction articulaire (Clavel et al., 2007). La sévérité des arthrites est corrélée avec les taux de VEGF dans la PR et dans l'arthrite juvénile idiopathique (Maeno et al., 1999).

V. Prise en charge thérapeutique de la PR

La prise en charge des patients atteints de PR associe plusieurs types de traitements. On distingue des traitements dits « de fond » et les traitements ciblés dits les biothérapies anti-cytokines.

A. Les traitements classiques

Les anti-inflammatoires stéroïdiens, comme les corticostéroïdes, agissent sur l'inflammation et le gonflement. La toxicité des glucocorticoïdes est dépendante de la concentration à laquelle ils sont utilisés, il est donc important de les utiliser à une dose la plus faible possible (Saag et al., 1994).

Le méthotrexate est un produit anti-cancéreux, utilisé depuis une soixantaine d'années. Il est efficace à la fois sur les symptômes cliniques et sur les signes radiologiques de la PR. Il représente le traitement de premier choix. Il peut être associé également aux traitements ciblés, développés par la suite. D'autres DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs) comme la salazopyrine et le léflunomide sont utilisés plutôt en seconde ligne. Néanmoins, l'efficacité de ces traitements apparaît plusieurs semaines, voir même plusieurs mois après le début de traitement. L'utilisation précoce de ces traitements peut entraîner une rémission seulement chez certains patients et reste inefficace chez la majorité d'entre eux.

B. Les biothérapies et les traitements anti-cytokines

Les différentes études sur la PR ont permis de mieux connaître les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette maladie. Cela a permis le développement d'une

nouvelle catégorie de traitement : les biothérapies passives, qui sont utilisées depuis une vingtaine d'années.

Le développement d'une immunothérapie sélective permet de cibler non seulement des médiateurs biologiques, tels que des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) mais aussi des cellules ayant un rôle lésionnel dans la PR. Ces traitements ont pour but de réduire les signes cliniques de la maladie.

Différentes formes d'immunothérapies ont été développées : des anticorps monoclonaux neutralisant une cytokine ou son récepteur, des protéines recombinantes ciblant les molécules de co-stimulation, des antagonistes de récepteurs, des récepteurs solubles de cytokine. Les premières immunothérapies autorisées pour traiter les patients atteints de PR ciblaient les cytokines pro-inflammatoires. Par la suite, d'autres immunothérapies ciblant les cellules B ou encore les cellules T ont été autorisées. D'autres thérapies sont basées sur des inhibiteurs de molécules impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire.

1. Les biothérapies ciblant le TNF- α

Le TNF- α est la cytokine majeure impliquée dans la physiopathologie de la PR et donc le développement de traitements ciblant cette cytokine a semblé être un choix logique pour traiter la maladie. En effet, les anticorps monoclonaux et des récepteurs solubles anti-TNF- α (figure 12) ont démontré une grande efficacité dans le traitement de la PR (Aaltonen et al., 2012).

a. Anticorps monoclonaux anti-TNF- α

Ils ont comme caractéristique de reconnaître aussi bien le TNF- α soluble que le TNF- α membranaire, mais aucun d'autres eux ne reconnaît la lymphotoxine alpha (LT- α).

- L'infliximab (Remicade®) est un anticorps chimérique composé de la région variable (25%) d'un anticorps murin anti-TNF- α avec la séquence d'une IgG1 humaine (75%). Cet anticorps reçut une AMM dans la maladie de Crohn en 1998, puis dans la PR et bien d'autres pathologies impliquant le TNF- α . Il est établi qu'il reconnaît aussi bien les monomères de 17 kDa que les homotrimères de 51 kDa du TNF- α soluble (Scallon et al., 2002). Depuis 2013, des biosimilaires de l'infliximab sont utilisés chez les patients (Choy, 2014).

- L'adalimumab et le golimumab sont des anticorps humains, le premier obtenu par la technologie de phage display, alors que le second a été obtenu à partir de souris transgéniques immunisées par le TNF- α humain. Ces deux derniers, comme l'infliximab, sont des anticorps monoclonaux entiers de type IgG.

- Le certolizumab est un fragment Fab reconnaissant le TNF- α , couplé à du polyéthylène glycol, ce qui lui confère une certaine stabilité (Fleischmann et al., 2009).

b. Récepteur soluble du TNF- α

L'éтанercept (Enbrel®) a été développé et commercialisé avant l'infliximab (Moreland et al., 1997). Il est composé d'une protéine de fusion associant deux fractions p75 du TNF-R2 avec un fragment Fc d'une IgG1 (figure 12). Il se lie aux formes homotrimériques du sTNF (TNF- α soluble) et du mTNF (TNF- α membranaire), mais pas à la forme monomérique de sTNF (Scallon et al., 2002). L'étanercept peut reconnaître également la LT- α . Contrairement à l'infliximab, l'utilisation d'étanercept bloque la LT- α et entraîne un défaut dans la structure des centres germinatifs et une pauvreté du réseau des cellules dendritiques folliculaires (FDC)

dans les amygdales, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules B mémoires. De plus, l'étanercept se lie uniquement à une seule molécule de mTNF, tandis que l'infliximab et adalimumab peuvent se lier jusqu'à 2 homotrimères. Cette protéine de fusion entraîne une diminution du taux de CRP dans la PR et les spondylarthropathies. En revanche, l'étanercept a peu d'effet dans la maladie de Crohn (Sandborn et al., 2001)

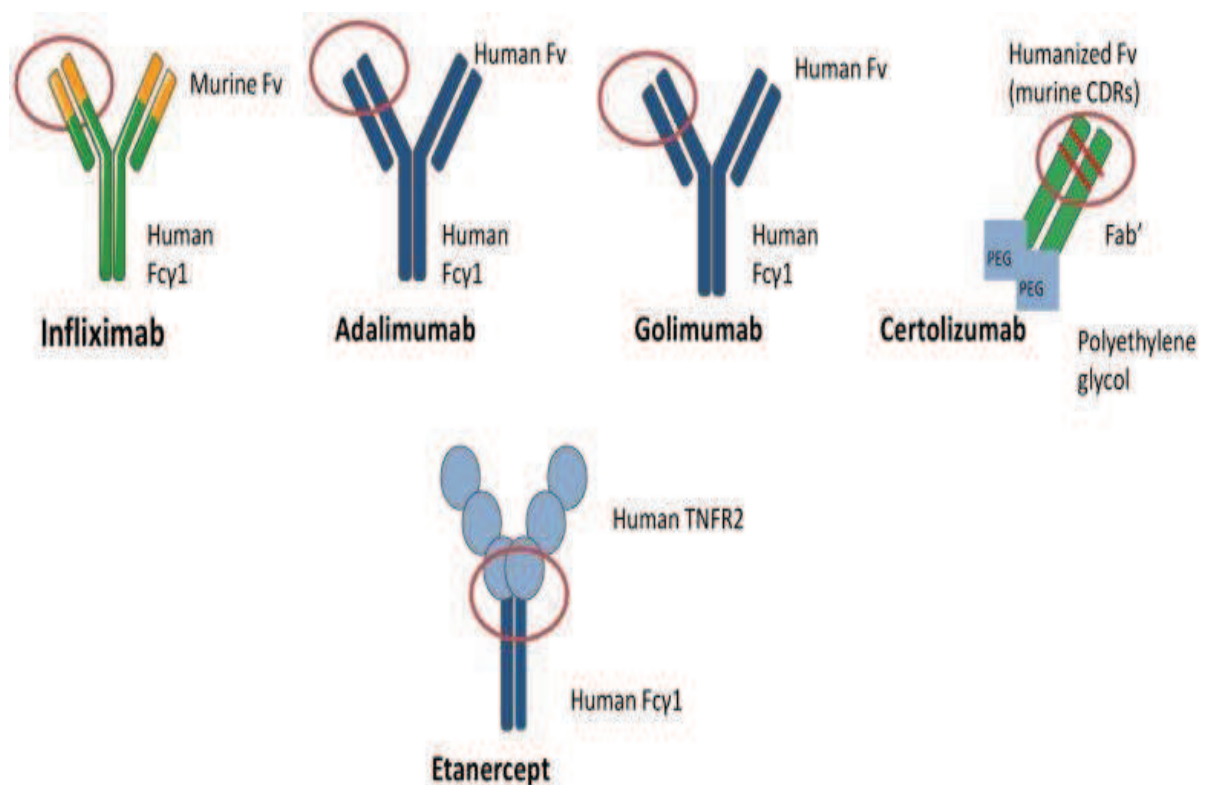


Figure 12 : Structure des différents anti-TNF avec les sites immunogéniques. (d'après Jani et al., 2014).

c. Effets secondaires des biothérapies anti-TNF- α

Malgré une grande efficacité des antagonistes du TNF- α dans le traitement des maladies inflammatoires, ces traitements peuvent entraîner des effets secondaires importants chez les patients. La complication majeure liée à l'utilisation des inhibiteurs du TNF- α est l'augmentation de l'incidence des infections (Shale et al., 2010) (Saidenberg-Kermanac'h et al., 2012) (van Dartel et al., 2013) (Bernal et al., 2016) (Keane et al., 2001).

En effet, le TNF- α est produit par de multiples cellules immunitaires (Vassalli, 1992) et a un rôle important dans la mise en place de la réponse de l'hôte vis-à-vis des agents infectieux. Le TNF- α permet l'activation et le recrutement des macrophages, la formation de granulomes, ainsi que le maintien de ces derniers. Il a été rapporté que, sous anti-TNF- α , les patients peuvent développer tous types d'infections opportunistes et on observe une réactivation de la tuberculose (Winthrop, 2012) (Bouchentouf et al., 2014) (Singh, 2016) (Yun et al., 2015).

Les fortes doses d'anti-TNF- α sont plus particulièrement associées à des risques accrus d'infections (Leombruno et al., 2009). Néanmoins, la recherche systématique d'une tuberculose latente chez les patients candidats au traitement par anti-TNF- α entraîne une diminution de ce risque. Contrairement à l'éтанercept, l'infliximab est plus susceptible de causer la réactivation d'une tuberculose latente (Furst et al., 2004) (Rychly and DiPiro, 2005).

D'autres effets secondaires ont pu être observés sous anti-TNF- α . Ainsi, l'éтанercept augmente également l'incidence des infections à mycobactéries ou fongiques (telles que les candidoses) (Aikawa et al., 2015). L'infliximab augmente l'incidence des infections à *Listeria*. Ces deux traitements seraient associés à une augmentation de maladies autoimmunes, telles que le lupus ou des maladies démyélinisantes, ou au développement d'anticorps anti-ADN. L'association, traitement par anti-TNF- α et augmentation de

néoplasies, ou d'insuffisance cardiaque, n'est pas clairement démontrée (Efimov et al., 2009). Les études menées par Wolfe *et al.* en 2007 ont démontré une association entre l'utilisation de biothérapies et le développement de cancers cutanés, hors mélanomes (Wolfe and Michaud, 2007) (Le Blay et al., 2012).

L'utilisation des biothérapies dans le traitement de la PR a amélioré la qualité de vie de nombreux patients. Cependant, bien que ces traitements soient combinés aux traitements de fond afin d'améliorer leur effet, moins d'1/3 des patients atteignent la rémission. Au cours du temps, certains patients ne répondent plus au traitement du fait du développement d'anticorps anti-médicament. Cette réaction est particulièrement observée avec les anticorps chimériques, plus rarement pour les anticorps humanisés. Environ 40% des patients ayant une PR active ne répondent jamais au traitement par un anti-TNF- α (Vander Cruyssen et al., 2006). L'utilisation d'un second antagoniste du TNF- α chez les patients n'ayant pas répondu au premier n'est pas efficace. La question reste donc de savoir si dans ce cas le traitement anti-TNF- α doit être remplacé par une biothérapie dont le mécanisme d'action est différent.

2. Autres biothérapies

D'autres traitements ont été développés dans le but de cibler d'autres cytokines ou un type cellulaire impliqué dans la PR (tableau 1)

Tableau 1: Autres biothérapies passives utilisées dans la PR (Boissier et al 2011).

Cible	Type de molécule	Nom de la molécule	Nom du médicament
IL-1	IL- 1Ra	Anakinra	Kineret®
IL-6R	Anticorps monoclonal	Tocilizumab	Ro-Actemra®
Lymphocytes T activé	CTLA4-Ig (protéine de fusion)	Abatacept	Orencia®
Lymphocytes B CD20	Anticorps monoclonal	Rituximab	Mabthera®

C. Immunothérapies actives anti-cytokines

Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des immunothérapies utilisées pour traiter la PR est basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant les cytokines. Malgré l'efficacité de ces traitements, cette stratégie présente des inconvénients, tels que le coût (environ 10 à 15 K€ par an et par patient), ainsi que le développement d'une résistance vis-à-vis du traitement au cours du temps. Ces inconvénients laissent place au développement d'autres stratégies thérapeutiques. Parmi celles-ci se trouve l'immunothérapie active anti-cytokine.

1. Principe

L'immunothérapie active anti-cytokine est basée sur le principe de la vaccination et sur la capacité du système immunitaire à développer une réponse contre des antigènes spécifiques.

Le but d'une telle stratégie est de générer de forts taux d'anticorps neutralisants la cytokine ciblée. Plusieurs types de vaccins anti-cytokine ont été développés.

Une vaccination basée sur la modification d'une protéine du soi en introduisant des épitopes T étrangers immunodominants dans la structure native de la cytokine. Cela permet de générer une réponse T helper (Th) contre l'épitope, suffisante pour stimuler les B autoréactifs spécifiques de la cytokine. Cette méthode a montré son efficacité à engendrer des auto-anticorps contre le TNF- α dans un modèle d'AEC (Dalum et al., 1999) ou contre l'IL-5 dans un modèle expérimental d'asthme (Tan et al., 2007).

Un autre type de vaccination consiste à utiliser les plasmides codant pour la cytokine cible. Ce type de vaccination permet la présentation antigénique par le CMH I et le CMH II et stimule la réponse mémoire (Tighe et al., 1998). La présence de séquence CpG dans le plasmide explique sa capacité à servir d'adjuvant via la voie du TLR9. L'utilisation de vaccins à ADN codant pour des protéines pro-inflammatoires dans des modèles murins, permet de protéger les animaux dans l'AEC et dans l'EAE (Shen et al., 2007), (Youssef et al., 1998).

Une technique alternative, consiste à coupler une protéine biologiquement inactive à une protéine porteuse très immunogène. La réponse Th contre la protéine porteuse va aider les cellules B auto-réactives à s'activer et se différencier en plasmocytes, permettant ainsi l'obtention d'auto-anticorps anti-cytokine. Dans ce contexte, plusieurs protéines porteuses ont été utilisées : des pseudo-particules virales (virus like particles, VLPs) (Röhn et al., 2006), de l'hémocyanine de patelle (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) (Le Buanec et al., 2007), de l'ovalbumine (OVA) (Uyttenhove and Van Snick, 2006) ou encore des épitopes Pan DR (PADRE) (Uyttenhove et al., 2004).

De nombreux vaccins anti-cytokine ont été testés dans différents modèles animaux (tableau 2). Les avantages de l'immunothérapie active sont sa simplicité et son coût moindre par rapport à l'immunothérapie passive.

Tableau 2 : Vaccination anti-cytokine dans différents modèles (Delavallée et al., 2010)

Cytokine ciblée	Produit	Maladie	Espèce animale
mIL-1 β	peptides de mIL-1 β / KLH	AEC	Souris
mIL-1 α /mIL-1 β	mIL-1 α /mIL-1 β /VLP	AEC	Souris
mIL-6	Analogues de mIL6	AEC, EAE	Souris
mIL-17	mIL-17A / VLP Q β	AEC, CAIA, EAE	Souris
mIL-27	plasmide mIL-27 p28	AIA	Rat
mRANK-L	TRANCE-RANK-L/VLP Q β	Ostéoporose	Souris
rRANTES	plasmides RANTES	AA	Rat
mTNF α	mTNF α / epitopes T modifiés	AEC, Cachexie	Souris
hTNF α	hTNF α / KLH	Arthrite, Crohn	Souris TTg
rTNF α	plasmide rTNF α	AIA	Rat
mTNF α	plasmide hTNF α	AEC	Souris
mTNF α	peptide du TNF α / VLPbiot.	AEC	Souris

mTNF α	peptidesdu	mTNF α -	TNF α	AEC	Souris
	/VLPbiot.				

AIA : arthrite induite par adjuvant ; CAIA : arthrite induite par des anticorps anti-collagène ; AEC : arthrite expérimentale au collagène ; h : humain ; KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin ; m : murin ; MCP : monocyte chemoattractant protein ; r : rat ; RANK-L : Receptor activator of NF- κ B ligand ; RANTES (CCL-5) : Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted ; TTg : souris transgéniques pour le hTNF- α ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; VLP : Virus-like particles.

2. Vaccination anti-cytokine entière

a. Vaccination anti-TNF- α

L'immunisation contre le TNF- α a été développée en 1999 par Dalum et al (Dalum et al., 1999). Cette stratégie a été testée d'abord dans des modèles murins de cachexie et d'AEC. Dans ces deux pathologies, les symptômes sont diminués par vaccination avec du TNF- α murin possédant des épitopes T modifiés n'induisant pas de réponse T anti-TNF- α .

De même, dans le modèle d'AEC, la vaccination par un plasmide hétérologue codant le TNF- α induit la production d'anticorps anti-TNF et protège les souris des arthrites. Dans le modèle d'arthrite induite par un adjuvant, l'injection d'un ADN nu codant le TNF- α inhibe les arthrites (Wildbaum et al., 2000) (Jia et al., 2013). Les travaux précliniques menés au sein de notre équipe avec un vaccin anti-TNF- α humain (hTNF-K) développé par la société NéoVacs, montrent que l'immunisation avec hTNF-K induit la production d'un fort titre d'anticorps neutralisants chez les souris transgéniques pour le TNF- α humain (TTg) (Le Buanec et al., 2006) (Semerano et al., 2012). Ces souris transgéniques expriment constitutivement la

cytokine humaine et développent des arthrites cliniques dès 8 semaines de vie. Nous avons montré que la vaccination des souris avec le vaccin hTNF-K les protègent cliniquement et histologiquement lorsqu'elles sont traitées avant le début des arthrites (Delavallée et al., 2008). Ce traitement est aussi efficace pour le traitement d'arthrites établies (Delavallée et al., 2009). La production d'anticorps induite par le vaccin suit une courbe en cloche. Après 2 à 4 mois, le taux d'anticorps diminue et une aggravation de la maladie peut être observée. Un rappel par le vaccin inverse à la fois ces deux phénomènes : la diminution des anticorps dirigés contre le TNF- α et l'aggravation des arthrites. Par ailleurs, l'injection de TNF- α humain natif chez les animaux vaccinés n'induit pas de surproduction d'anticorps anti-TNF, ce qui montre la nécessité de la coopération avec les lymphocytes T anti-KLH.

Les études précliniques chez la souris TTg ont contribué à l'initiation d'un essai clinique de phase Iia multicentrique mené par la société NéoVacs dans la maladie de Crohn (identifiant ClinicalTrials.gov: NCT01291810) et dans la PR (identifiant ClinicalTrials.gov: NCT01040715). L'étude dans la PR a été menée sur 40 patients ayant reçu des anti-TNF- α au préalable, mais n'étant plus répondeurs à au moins un de ces traitements. Parmi ces patients, 24 ont développé des anticorps anti-TNF- α , associés chez 48% de ces derniers à une réponse clinique modérée à bonne après un an (Durez.P et al, 2014)

En 2014, la société NéoVacs a mené une étude clinique de phase IIb dans la PR (identifiant ClinicalTrials.gov: NCT01040715). Malheureusement, les résultats obtenus après 6 mois ne confirment pas l'efficacité de ce vaccin chez les patients.

b. Vaccination contre d'autres cytokines

Comme cité dans le tableau précédent, un vaccin anti-IL-17 a été conçu par le couplage de la cytokine à des VLP. L'utilisation de ce vaccin dans l'AEC, entraîne la production d'anticorps neutralisant l'IL-17 et protégeant les animaux des arthrites (Röhn et al., 2006).

De même, des molécules VLP ont été couplées à la cytokine l'IL-1 α ou l'IL- β de manière à induire une réponse anticorps rapide. Comme pour l'IL-17, ces vaccins ont démontré leur efficacité dans l'AEC où ils protègent les souris de l'inflammation et de la dégradation de l'os et du cartilage (Spohn et al., 2008).

3. Vaccination anti-peptides de cytokine

Il s'agit d'une approche alternative à l'utilisation de cytokines entières, permettant de limiter le coût du vaccin. Des peptides de cytokines peuvent être définis dans la zone d'interaction de la cytokine avec son récepteur pour induire des anticorps bloquants. Ces peptides sont couplés à des protéines porteuses pour les rendre immunogènes.

Cette technique a été utilisée pour neutraliser le TNF- α dans l'arthrite au collagène. Des peptides du TNF couplés à des VLP ou à la KLH induisent la production d'anticorps anti-TNF qui protègent du développement des arthrites (Spohn et al., 2007)(Sun et al., 2016).

De même, des peptides de l'IL-1 β situés dans la zone d'interaction avec son récepteur ont été définis d'après des modèles informatiques, puis couplés à la KLH de manière à les rendre immunogènes. Dans les modèles d'AEC, ces vaccins induisent une forte production d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-1 β . L'un des peptides protège les souris de l'inflammation et de la destruction articulaire (Bertin-Maghit et al., 2005).

Les immunothérapies passives anti-TNF utilisées dans la PR, basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (infliximab, adalimumab, certolizumab) ou de récepteurs solubles recombinants (etanercept), sont connues pour avoir des effets secondaires non négligeables. On assiste en effet à la multiplication de certaines infections bactériennes sous anti-TNF, notamment la réactivation de la tuberculose.

Partie 2 : Susceptibilité aux infections sous traitements anti-TNF- α

Comme nous l'avons déjà vu, les traitements ciblant le TNF- α ont été parmi les premières immunothérapies ciblées disponibles en thérapeutique et ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de pathologies autoimmunes et inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, les spondylarthrites, la maladie de Crohn ou le psoriasis. Cependant, il apparaît que le blocage du TNF- α augmente le risque de réactivation d'une tuberculose ou la survenue d'autres infections (Atzeni et al., 2015). Des études récentes ont montrés que le risque de développer une infection comme la listériose ou /et encore une tuberculose est plus grand pour les patients traités par des anticorps monoclonaux anti-TNF- α que pour ceux traités par le récepteur soluble du TNF- α (Olleros et al., 2002) (Abreu et al., 2013).

A. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (L. m) est une bactérie opportuniste Gram positive, responsable d'une infection alimentaire (la listériose). Bien que la listériose ait été découverte dans les années 1920, ce n'est que dans les années 80 que l'on établit un lien formel entre la maladie et la consommation des aliments contaminés (Jeffrey M, 1988). La listériose est diagnostiquée principalement dans les pays industrialisés. Cette infection constitue un véritable problème de santé publique.

Le modèle d'infection par *L.m* est très utilisé pour étudier les interactions hôte-pathogène puisque cette bactérie élabore de nombreuses stratégies pour franchir les barrières biologiques de l'organisme afin d'infecter les cellules (Corr and O'Neill, 2009) (Stavru et al., 2011) (Cossart, 2011) .

Une partie de mes travaux de thèse m'ont permis d'étudier la réponse immunitaire contre cette bactérie. J'ai donc étudié le rôle et l'implication du TNF- α dans le contrôle de la réponse anti-*Listeria* et je me suis intéressée aux effets de la neutralisation du TNF- α (notamment avec la stratégie vaccinale) au cours de cette infection.

1. Découverte de *L. monocytogenes*

Le nom de *Listeria* a été donné en l'honneur de Joseph Lister, inventeur de l'antisepsie dans la chirurgie opératoire. Cependant, l'isolement et la découverte de la bactérie est attribué à E.G.D. Murray et en 1926, cette bactérie est officiellement identifiée *Bacterium monocytogenes* comme étant à l'origine d'une septicémie mortelle affectant les lapins et les cochons d'Inde du laboratoire de E.G.D. Murray (Murray et al., 1926).

L.m est un petit bacille Gram positif (0,4 à 1,5 μ m) appartenant au règne des bactéries et à l'embranchement des Firmicutes. Il existe 6 espèces de *Listeria* : *monocytogenes*, *innocua*, *ivanovii*, *grayi*, *seeligeri*, *welshimeri*, mais seules *L. monocytogenes* et *ivanovii* sont infectieuses pour l'homme.

L.m est une bactérie intracellulaire, aérobie, anaérobie facultative et non sporulée mobile entre 10 et 25°C grâce à ses flagelles. On la retrouve dans divers milieux comme les eaux (lacs, rivières, eaux d'égout), le sol ou la végétation, mais l'habitat naturel de cette bactérie semble être les plantes en décomposition. Les animaux domestiques ruminants sont

considérés comme des porteurs asymptomatiques. La listeria est très résistante, en effet, elle a la capacité de se multiplier dans des fourchettes de température comprises entre -2° et +45°C, sa température optimale étant entre +30 et +39°C. Elle peut également survivre dans des solutions très concentrées en sel ou dans des milieux où le pH s'étend de 4,6 à 9,6, voire même plusieurs mois dans la boue (Watkins and Sleath, 1981) (King et al., 2003).

2. Manifestations cliniques de la listériose

Les infections à L.m sont mortelles dans 20% à 30% des cas. La bactérie peut contaminer un certain nombre d'aliments, cependant, la consommation de ces aliments en petites quantités ne provoque pas l'apparition des symptômes. Lorsque les aliments sont fortement contaminés, la listériose peut se manifester sous plusieurs formes.

La période d'incubation est comprise entre 48 heures et 3 mois. La durée d'incubation chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli est beaucoup plus courte (10 à 70 jours) ce qui rend difficile l'isolement de la source contaminée.

Chez les personnes en bonne santé cette infection se manifeste par un état grippal, de la fièvre et une gastroentérite (Vázquez-Boland et al., 2001)(Wing and Gregory, 2002). Autrefois considérée comme une manifestation silencieuse de la maladie, il apparaît actuellement que ces troubles intestinaux soient accompagnés dans 70% des cas par une atteinte de la rate (Aureli et al., 2000)(Dalton et al., 1997). Chez les sujets immunocompétents, la bactérie est éliminée spontanément en quelques jours. En revanche, les manifestations cliniques sont beaucoup plus sévères chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli comme chez les femmes enceintes, les nouveau-nés, les personnes âgées, les personnes infectées par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), ou les patients PR traités par anti-TNF. Les

femmes enceintes constituent un risque potentiel de dissémination de la listeria chez la mère comme chez le fœtus.

L.m peut infecter le placenta, induire la formation d'abcès et franchir la barrière placentaire. Les infections materno-fœtales sont responsables d'avortements ou d'infections néonatales avec un taux de mortalité très fort (Lecuit et al., 2004). L'infection du fœtus se manifeste par la présence de microabcès dans plusieurs organes notamment le foie, la rate et la peau. Cependant, en raison d'ingestion de liquide amniotique contaminé, la bactérie est présente en forte concentration dans les intestins et le poumon du fœtus. La contamination peut également survenir durant l'accouchement et cela se manifeste par une conjonctivite importante voir une méningite.

3. Dissémination intracellulaire et mode d'infection

L'infection par *L.m* commence par l'ingestion des aliments contaminés et sa dissémination repose sur la capacité de la bactérie à franchir les barrières physiologiques (barrière intestinale, placentaire et hémato-encéphalique). *L.m* a la capacité de résister à la mort intracellulaire après phagocytose par les macrophages et de ce fait coloniser de nombreuses cellules non phagocytaires (figure13) (Cossart and Toledo-Arana, 2008).

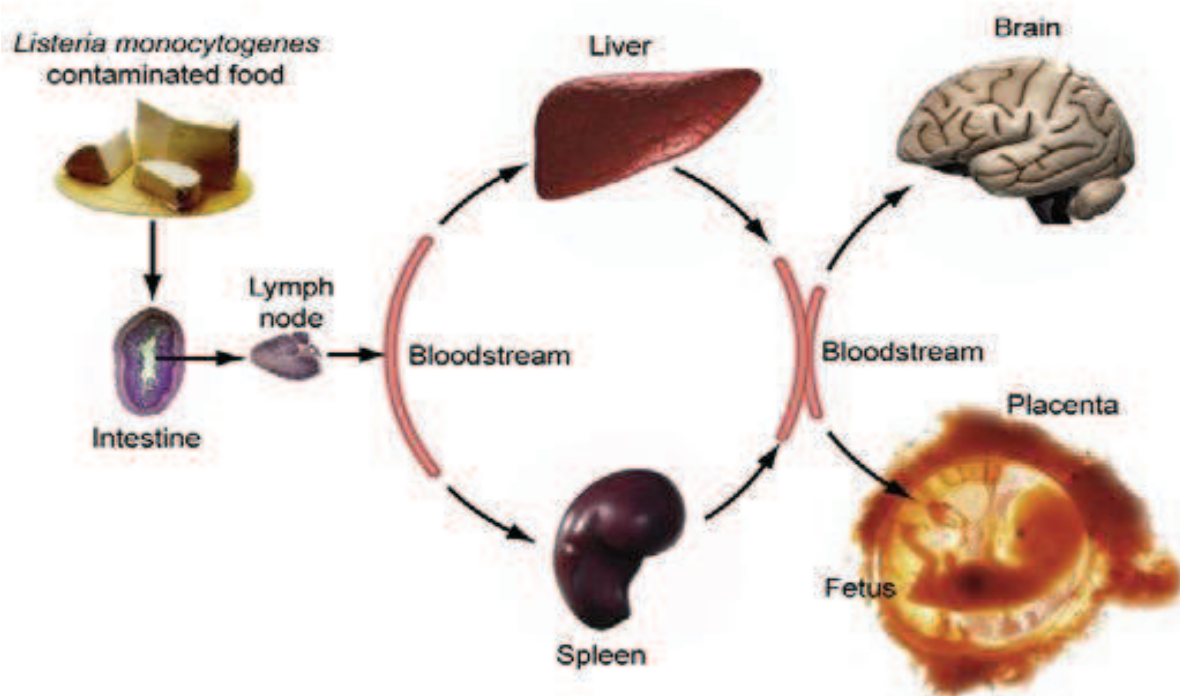


Figure 13 : Les différentes étapes de la dissémination de L.m dans l'organisme.

(D'après Cossart and Toledo-Arana, 2008)

4. Rôle du TNF et mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte en réponse à l'infection par Listéria

L.m est l'un des modèles les plus utilisés afin d'étudier l'immunité innée et adaptative. En effet, ces deux types de réponses sont mises en place afin de contrôler complètement l'infection (Zenewicz and Shen, 2007). Dans des modèles murins, suite à l'infection par L.m, cette dernière se retrouve dans le foie et la rate où elle est internalisée par les macrophages résidents (Golovliov et al., 2003)(Aoshi et al., 2009).

Les premières cellules de l'immunité innée qui rentrent en contact avec *Listéria* sont les macrophages et les neutrophiles (Pamer, 2004). Ces cellules jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance bactérienne en ingérant les pathogènes et en produisant des substances antimicrobiennes (Rogers and Unanue, 1993). Les neutrophiles sont très vite recrutés sur le lieu de l'inflammation et leur déplétion par administration d'anticorps anti-Gr1 augmente la susceptibilité des souris à l'infection par *Listéria* (Czuprynski et al., 1994)(Conlan and North, 1994).

Une fois arrivés sur le site de l'inflammation, les neutrophiles vont produire des chimiokines comme CSF-1 (Colony-Stimulating Factor-1) et MCP-1 (Monocytes/macrophages Chemoattractant Protein-1) destinées à attirer les macrophages sur ce même site (Guleria and Pollard, 2001).

Les macrophages résidants comme les cellules de Kupffer dans le foie sont les premiers initiateurs de la mort bactérienne. En réponse à l'infection, les macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-12 afin notamment d'activer les cellules NK (Havell, 1987) (Shaughnessy and Swanson, 2007). Ces dernières produisent de l'IFN- γ dont le rôle est d'activer les macrophages et d'augmenter leur activité anti-bactérienne (Tripp et al., 1993). TNF- α et IFN- γ sont essentiels à la réponse précoce contre *Listéria* puisque les souris déficientes en ces cytokines ou en leurs récepteurs meurent rapidement après l'infection (Pfeffer et al., 1993)(Harty and Bevan, 1995) (Yin and Ferguson, 2009) (Pitt et al., 2016). Au cours de l'infection ces différentes cellules immunitaires produisent des réactifs oxygénés et des intermédiaires azotés importants dans l'induction de la mort bactérienne (Remer et al., 2002). Des études ont montré le rôle de iNOS dans la réponse anti-*Listeria* et les souris déficientes en iNOS sont beaucoup moins résistantes à l'infection et

montrent une charge bactérienne beaucoup plus élevée que celle des souris sauvages (MacMicking et al., 1995)(Shiloh et al., 1999).

La production de TNF- α et de NO est donc essentielle pour contenir l'infection. Même si les macrophages semblent être la source majeure de leur production, il semble qu'un certain type de cellules dendritiques nommées TipDC (TNF and iNOS-producing DC) produisent elles aussi ces deux protéines.

L'IFN- γ est également une cytokine importante pour le contrôle de l'infection primaire par *Listeria*, et les lymphocytes NK et T $\gamma\delta$ en sont une source de production (Tripp et al., 1993). Plusieurs travaux ont montré que l'apoptose des cellules T ainsi que la perte de cellules produisant du TNF sont à l'origine de l'augmentation de la charge bactérienne dans les tissus (Carrero et al., 2004) (Auerbuch et al., 2004).

La mise en place d'une réponse anti-*Listeria* par l'immunité innée est essentielle pour contenir l'infection dans un premier temps. Cependant, une réponse adaptative est nécessaire pour éradiquer totalement les bactéries et les DC semblent assurer le lien entre l'immunité innée et adaptative (Charles A. Janeway and Medzhitov, 2002) (Arnold-Schrauf C, 2014). La présentation d'antigène se fait généralement par le CMH de classe I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) suite à la dégradation par le protéasome des protéines secrétées par *L.m.* Les peptides sont ainsi transportés jusqu'au RE où ils sont chargés sur le CMH de classe I pour être présentés aux cellules T CD8⁺ (Guermonprez et al., 2003)(Finelli et al., 1999). Les CPA professionnelles peuvent également présenter des antigènes issus des bactéries dégradées par le lysosome. Les peptides sont alors présentés par le CMH de classe II aux cellules T CD4⁺. Les antigènes issus du lysosome peuvent également être chargés par le CMH I via un processus de cross-présentation.

Les souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) mettent en place une réponse innée et résistent dans un premier temps à l'infection (Carrero et al., 2006). Elles développent par la suite une infection chronique en raison de leur incapacité à éliminer complètement les bactéries. Chez ces souris, le transfert de cellules T CD8⁺ permet une élimination complète des bactéries (Nickol and Bonventre, 1977)(Bhardwaj et al., 1998).

Les cellules T CD8⁺ spécifiques de *Listeria* sont détectables environ quatre à cinq jours après infection et le pic de réponse de ces cellules intervient après sept à neuf jours (Busch et al., 1998). Les T CD8⁺ confèrent une protection immunitaire contre *Listéria* grâce à deux mécanismes : par la lyse des cellules infectées grâce à la synthèse de perforine et de granzyme B et par la production d'IFN- γ pour activer les macrophages. D'autres études portant sur la réponse adaptative contre *Listéria* suggèrent que les T CD4⁺ aident à l'activation des macrophages au cours de l'infection.

B. *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis est l'agent responsable de la tuberculose humaine. Ce pathogène a été découvert en 1882 par Robert Koch. Le bacille tuberculeux ou bacille de Koch (BK) appartient à l'ordre des *Actinomycetales*, au sous-ordre des *Corynebacterineae* et à la famille des *Mycobacteriaceae* comprenant un seul et unique genre *Mycobacterium* (Daniel, 2006).

Les espèces appartenant au genre *Mycobacterium* peuvent être divisées en deux groupes principaux selon leur temps de croissance : les espèces à croissance lente qui nécessitent plus de 7 jours pour former des colonies visibles sur des supports solides, et les espèces à croissance rapide qui exigent moins de 7 jours. Les espèces à croissance lente sont souvent pathogènes pour l'Homme ou les animaux alors que les espèces à croissance rapide sont

habituellement considérées comme non pathogènes pour l'Homme, bien que d'importantes exceptions existent (Shinnick and Good, 1994). Ainsi on peut également distinguer 3 groupes au sein du genre *Mycobacterium* selon leur pathogénie : les mycobactéries pathogènes strictes pour l'Homme, les mycobactéries pathogènes opportunistes et les bactéries non pathogènes dites saprophytes présentes dans l'environnement. Dans le groupe des pathogènes stricts, on trouve *M. leprae*, l'agent responsable de la lèpre et *M. tuberculosis* qui forme avec les espèces suivantes, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, et *M. canettii*, le sous-groupe appelé « complexe *M. tuberculosis* ». Les mycobactéries autres que celles du complexe *M. tuberculosis* sont communément regroupées sous le nom de mycobactéries non-tuberculeuses (NTM). Ce sont des pathogènes opportunistes de l'Homme responsables de pathologies notamment chez les sujets immunodéprimés (Wagner and Young, 2004) ou des espèces sans pathologie connue comme *M. smegmatis*.

Le bacille tuberculeux est une bactérie immobile à gram-positif se présentant sous forme de bâtonnet droit ou légèrement incurvé de 0,2-0,5 µm de largeur sur 2-4 µm de longueur. *M. tuberculosis* est un parasite intracellulaire, il contient une forte teneur en lipides (40-60% du poids sec de la paroi) une spécificité conférant la propriété d'acido-alcool-résistance aux mycobactéries, ce qui permet leur identification en microscopie avec la coloration Ziehl-Neelsen. Les mycobactéries conservent la coloration par la fuchsine phéniquée (fuchsine de Ziehl) malgré l'action combinée de l'alcool et des acides, là où dans les mêmes conditions, toutes les autres bactéries sont décolorées.

1. Infection par *M. tuberculosis*

La tuberculose est principalement une infection pulmonaire qui débute généralement par l'inhalation d'aérosols contenant des bacilles tuberculeux. L'agent infectieux, *M. tuberculosis* parvient jusqu'aux alvéoles pulmonaires où les cellules immunitaires de l'individu infecté,

notamment les macrophages, vont le phagocyter (Dheda et al., 2016). Néanmoins, *M. tuberculosis*, possède de nombreux dispositifs pour échapper aux agressions du macrophage et survivre au sein même des cellules immunitaires (Cambier et al., 2014). Ainsi, un individu réagira de trois manières différentes face à une infection par des germes tuberculeux, en fonction de son âge, de son patrimoine génétique, et surtout de l'état de son système immunitaire (Figure 14) (Kaufmann and McMichael, 2005). Cas (i) : le système immunitaire combat l'infection et le bacille tuberculeux est éradiqué, il s'agit d'un cas rare, voire inexistant. Cas (ii) : le système immunitaire est débordé par l'infection, la tuberculose se déclare chez l'individu infecté et il faut la traiter. Il s'agit du cas typique pour les sujets immunodéficients, soumis à certains traitements médicaux. Cas (iii) : l'infection est ici contenue par le système immunitaire dans des structures complexes multicellulaires « les granulomes ». L'individu ne développe pas la maladie immédiatement, on parle ici de « *primo*-infection » et de « bacilles dormants ». Il s'agit du cas le plus fréquent, il survient pour environ 90% des personnes contaminées. Mais certains facteurs, comme par exemple une réinfection ou une immunodépression passagère, peuvent déstabiliser l'équilibre entre la charge bactérienne et le système immunitaire. Les structures de confinement mis en place par le système immunitaire ne sont plus en mesure de circonscrire l'infection, la tuberculose se déclare, c'est la phase de réactivation. Cette particularité de *M. tuberculosis* de pouvoir entrer dans une phase dite de « dormance » participe à sa large dissémination dans le monde. L'OMS estime qu'un tiers de la population terrestre est infectée par des germes dormants de *M. tuberculosis* (Dheda et al., 2016). Qu'il soit dormant ou métaboliquement actif, le bacille de Koch est protégé par une enveloppe qui forme une barrière imperméable aux solutés, conférant aux mycobactéries une résistance naturelle aux antibiotiques et aux attaques de l'hôte. Cette enveloppe mycobactérienne complexe reste encore aujourd'hui un champ d'investigation scientifique important.

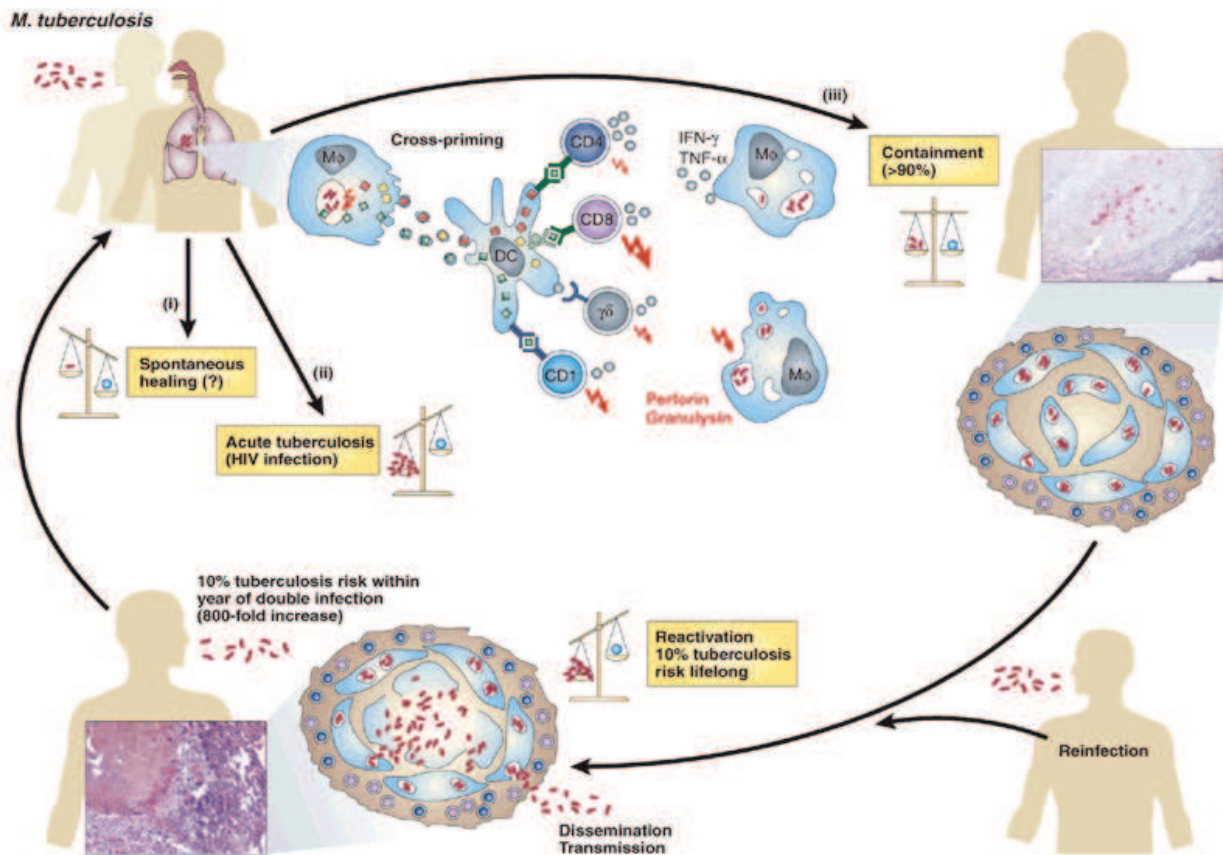


Figure 14 : Physiopathologie de l'infection par *M. tuberculosis*.

(d'après Kaufmann and McMichael, 2005). Le bacille de la tuberculose *M. tuberculosis* infecte l'homme par inhalation de gouttelettes contenant des bacilles. Trois cas de figures sont envisageables : (i) : le bacille est éradiqué par le système immunitaire, (ii) : le système immunitaire est débordé par l'infection, la tuberculose se déclare chez l'individu infecté, (iii) : l'infection ne se déclare pas, les bactéries sont confinées par le système immunitaire dans des granulomes. L'équilibre entre la charge bactérienne et le système immunitaire peut être rompu par des facteurs comme une réinfection ou une immunodépression passagère, c'est la phase de réactivation.

2. Place du TNF- α dans la réponse immunitaire au cours de l'infection par *M. tuberculosis*

Au cours de l'infection, une réponse de l'hôte efficace contre la tuberculose implique la différenciation d'un panel de cellules (lymphocytes, macrophages, ...) (Guirado et al., 2013) (Prezzemolo et al., 2014). Ces cellules contribuent au développement et à la formation du granulome. Le TNF- α va jouer un rôle crucial dans le maintien du granulome au cours de cette réponse puisqu'il stimule la production des chimiokines et l'expression des molécules d'adhérence, ce qui contribue à la formation du granulome (Fallahi-Sichani et al., 2010) (Marino et al., 2011) (figure 15). Des études menées chez la souris déficiente en TNF- α ont montrés une désorganisation des granulomes ce qui provoque une mortalité des souris infectées. De même le TNF- α augmente la capacité phagocytaire des macrophages ; et induite l'apoptose des cellules infectées.

Le TNF- α agit aussi sur les cellules T et contribue à la modulation de la réponse inflammatoire localement, empêchant par cela une destruction des tissus.

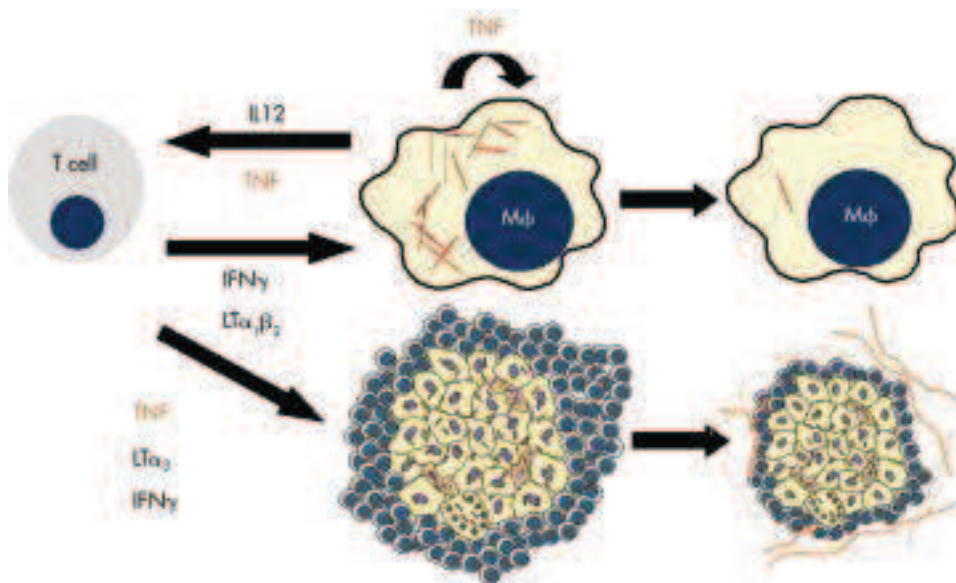


Figure 15 : rôle du TNF- α dans l'activation et la formation du granulome au cours de l'infection. (Ehlers, 2003)

3. Effets de la neutralisation du TNF- α et la tuberculose

Comme indiqué précédemment, le TNF- α a un rôle important durant la réponse contre les infections. Beaucoup d'études décrites dans la littérature ont mis en évidence des effets négatifs du blocage du TNF- α par les biothérapies. En effet, la neutralisation complète du TNF- α doit être évitée pour garder un seuil résiduel de cytokine nécessaire non seulement pour recruter des cellules inflammatoires, mais également pour réguler les mécanismes antibactériens.

Le signal d'alarme sur des cas de tuberculose sous anti-TNF- α a été lancé en 2001 par Kaene et al (Kaene et al., 2001), en rapportant 70 cas répertoriés entre 1998 et 2001 par la FDA's AERS (Food and Drug Association's Adverse Event Reporting System). Parmi ces cas, 67 % étaient traités pour polyarthrite rhumatoïde et 26 % pour maladie de Crohn. De plus 64 de ces cas sont survenus dans des pays de faible endémicité pour la maladie. La tuberculose était extra-pulmonaire et disséminée dans 56 % et 24 % des cas respectivement. Douze décès étaient notés dont 4 directement liés à la tuberculose. Toutes ces données vont être rapidement confirmées par plusieurs études concernant essentiellement la PR (Baronnet et al., 2011). Le risque de tuberculose chez les patients atteints de PR non traités par anti-TNF- α était 2 à 10 fois supérieur à celui de la population générale. Il était encore 2 à 4 fois plus important sous anti-TNF- α . Au cours de la maladie de Crohn, le risque semble similaire (Miehsler et al., 2010), (Winthrop et al., 2013) Toujours selon Baronnet et al., plus de la moitié des tuberculoses survenaient au cours de la première année de traitement par anti-TNF- α , le plus souvent après la 3ème injection. La plupart des cas de tuberculose observés étaient des réactivations de tuberculoses extra pulmonaires dans 60 % des cas et disséminées dans 25 %. La mortalité était élevée (1 fois/10) soit 10 à 20 fois supérieure à la tuberculose commune.

Des études plus récentes ont démontré que le traitement avec l'infliximab était associé à des cas de tuberculose particulièrement sévère. L'intervalle entre l'infection et le début de traitement avec l'infliximab était seulement de 12 semaines (Yasui, 2014)

OBJECTIFS

De nombreux traitements ont fait leur apparition, enrichissant la palette de médicaments disponibles pour traiter la PR. Parmi les traitements actuels utilisés, les anticorps monoclonaux anti-TNF (infliximab, adalimumab, certolizumab, golimumab) et le récepteur soluble du TNF (étanercept), ont montrés une efficacité remarquable dans la PR ainsi que dans d'autres maladies TNF-dépendantes. Néanmoins, ils existent des patients ne répondant pas à ces immunothérapies passives anti-TNF alors que d'autres y échappent au cours du temps. Une stratégie alternative de neutralisation du TNF par la vaccination a été développée au sein de notre laboratoire et en collaboration avec la société NéoVacs. Ce vaccin est composé de TNF humain couplé à une protéine porteuse (KLH). Les travaux précliniques menés au laboratoire ont démontré son efficacité chez la souris TNF transgénique. Cependant, ce vaccin ne reconnaissant pas le TNF de souris, la sécurité de cette approche n'a pas pu être explorée.

La majeure partie de mes travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont eut pour but d'approfondir les connaissances sur les conséquences de la neutralisation du TNF- α par une stratégie vaccinale. Nous avons développé un vaccin anti-TNF murin au laboratoire en complexant la cytokine à la KLH. Notre objectif premier a été d'étudier l'efficacité de ce vaccin dans deux modèles d'arthrite. Nous avons ensuite évalué les conséquences de la neutralisation du TNF par la vaccination dans les modèles d'infection à *Listeria monocytogenes* et à *Mycobacterium tuberculosis*. Cette seconde partie a été menée en collaboration étroite avec l'équipe de Bernhard Ryffel à Orléans (article 2).

Enfin, dans la deuxième partie de mon projet, nous avons cherché à développer une stratégie alternative de neutralisation du VEGF par la vaccination. Cette approche vaccinale, basée sur des peptides ou la cytokine entière a démontré son efficacité dans un modèle murin d'arthrite (article 1).

RESULTATS

Article 1

La vaccination anti-VEGF-A réduit l'inflammation et la destruction articulaire dans des modèles expérimentaux d'arthrite.

Luca Semerano*, Emilie Duvallet*, Nadia Belmellat, Nicolas Marinval, Nicolas Schall, Maëlle Monteil, Géraldine Grouard-Vogel, Emilie Bernier, Marc Lecouvey, Hanna Hlawaty, Sylviane Muller, Marie-Christophe Boissier, Eric Assier

Angiogenesis (2016) 19:39-52.

Contexte

L'angiogenèse est un processus jouant un rôle clé dans la formation et le maintien du pannus synovial au cours de la PR. Plusieurs études ont mis en évidence une surexpression du VEGF dans le liquide et la membrane synoviale des articulations. Le VEGF permettrait l'hyperplasie synoviale et l'infiltration des tissus par les cellules inflammatoires grâce à la formation de néo vaisseaux. La grande variété d'isoformes du VEGF ainsi que l'existence de plusieurs récepteurs et corécepteurs de cette cytokine nécessitent la mise en place de stratégies thérapeutiques très spécifiques.

Dans cette optique, nous avons commencé par évaluer l'intérêt d'une neutralisation du VEGF dans l'AEC grâce à un vaccin constitué de la cytokine entière couplée à la KLH (collaboration

avec NéoVacs). Puis, afin d'inhiber plus spécifiquement l'interaction entre le VEGF-A et son corécepteur, la neuropiline -1 (NP-1), nous avons défini deux peptides dans la séquence du VEGF-A murin, localisés près des zones d'interaction avec NP-1. Ces deux peptides ont été couplés à la KLH pour obtenir deux vaccins Vpep1-K et le Vpep2-K.

Résultats

Dans le modèle d'AEC, nos résultats montrent que les deux vaccins VEGF-K et Vpep1-K réduisent significativement les scores cliniques et histologiques d'arthrite.

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence la capacité neutralisante des anticorps anti-VEGF générés par les deux types de vaccins sur la prolifération des cellules HUVEC induite par le VEGF *in vitro*. Nous avons également montré par une étude histologique des articulations des souris arthritiques que le vaccin VEGF-K induisait une réduction significative du nombre de vaisseaux sanguins dans la membrane synoviale.

Targeting VEGF-A with a vaccine decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis

Luca Semerano^{1,2,3} · Emilie Duvallet^{1,2} · Nadia Belmellat^{1,2} · Nicolas Marival^{2,4} · Nicolas Schall⁵ · Maëlle Monteil^{2,6} · Géraldine Grouard-Vogel⁷ · Emilie Bernier⁷ · Marc Lecouvey^{2,6} · Hanna Hlawaty^{2,4} · Sylviane Muller⁵ · Marie-Christophe Boissier^{1,2,3} · Eric Assier^{1,2}

Received: 2 March 2015 / Accepted: 16 September 2015 / Published online: 29 September 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract

Objectives Inflammation and angiogenesis are two tightly linked processes in arthritis, and therapeutic targeting of pro-angiogenic factors may contribute to control joint inflammation and synovitis progression. In this work, we explored whether vaccination against vascular endothelial growth factor (VEGF) ameliorates collagen-induced arthritis (CIA).

Methods Anti-VEGF vaccines were heterocomplexes consisting of the entire VEGF cytokine (or a VEGF-derived peptide) linked to the carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KLH). Two kinds of vaccines were

separately tested in two independent experiments of CIA. In the first, we tested a kind of the murine cytokine VEGF (VEGF-K), obtained by conjugating VEGF-A to KLH. For the second, we selected two VEGF-A-derived peptide sequences to produce heterocomplexes (Vpep1-K and Vpep2-K). DBA/1 mice were immunized with either VEGF-K, Vpep1-K, or Vpep2-K, before CIA induction. Clinical and histological scores of arthritis, anti-VEGF, anti-Vpep Ab titers, and anti-VEGF Abs neutralizing capacity were determined.

Results Both VEGF-K and Vpep1-K significantly ameliorated clinical arthritis scores and reduced synovial inflammation and joint destruction at histology. VEGF-K significantly reduced synovial vascularization. None of the vaccines reduced anti-collagen Ab response in mice. Both VEGF-K and Vpep1-K induced persistently high titers of anti-VEGF Abs capable of inhibiting VEGF-A bioactivity.

Luca Semerano and Emilie Duvallet have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10456-015-9487-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marie-Christophe Boissier
marie-christophe.boissier@avc.aphp.fr

Luca Semerano
luca.semerano@avc.aphp.fr

Emilie Duvallet
duvallet.emilie@gmail.com

Nadia Belmellat
belmellat.nadia@univ-paris13.fr

Nicolas Marival
nmarival@yahoo.fr

Nicolas Schall
N.Schall@ibmc-cnrs.unistra.fr

Maëlle Monteil
maelle.monteil@univ-paris13.fr

Géraldine Grouard-Vogel
gvogel@neovacs.com

Emilie Bernier
ebemier@neovacs.com

Marc Lecouvey
marc.lecouvey@univ-paris13.fr

Hanna Hlawaty
h.hlawaty@smbh.univ-paris13.fr

Sylviane Muller
s.muller@ibmc-cnrs.unistra.fr

Eric Assier
eric.assier@univ-paris13.fr

¹ Inserm UMR 1125, Sorbonne Paris Cité - Université Paris 13, 74, rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France

² Sorbonne Paris Cité - Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France

Conclusion Vaccination against the pro-angiogenic factor VEGF-A leads to the production of anti-VEGF polyclonal Abs and has a significant anti-inflammatory effect in CIA. Restraining Ab response to a single peptide sequence (Vpep1) with a peptide vaccine effectively protects immunized mice from joint inflammation and destruction.

Keywords VEGF · Peptides · Vaccines · Inflammation · Arthritis

Introduction

Angiogenesis is a key process in rheumatoid arthritis (RA) pathophysiology [1, 2]. The formation of new vessels from preexisting ones allows the delivery of oxygen, nutrients, and the influx of inflammatory cells in the developing synovial pannus. In RA, inflammation and angiogenesis are two closely related processes. Many inflammatory mediators exert significant pro-angiogenic action [3–5], while pro-angiogenic factors, as vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins, up-regulate several pro-inflammatory pathways leading to leukocytes recruitment, infiltration, and secretion of inflammatory mediators [6]. Selective targeting of pro-inflammatory cytokines, or of cells involved in their productions, gave unprecedented results in RA management [7]. Conversely, angiogenesis-targeting treatments only held intriguing preclinical results in arthritis models. Human VEGF-A gene encodes multiple isoforms composed of 121, 145, 165, 189, and 206 amino acids, with overlapping functions due to differential binding to the three different VEGF receptors and co-receptors like neuropilins [8]. VEGF-165 is considered the major player in both physiological and pathological angiogenesis [9]. Experimental evidence supports the notion that VEGF might be endowed with a pro-inflammatory activity in arthritis. Hence, VEGF/VEGF-R system blockade may prove useful for arthritis treatment. VEGF-A and VEGF-R are expressed during collagen-induced arthritis (CIA), and their levels correlate with disease severity and histological

scores of synovial vascularization [10, 11]. VEGF gene transfer aggravates, while anti-VEGF antiserum could delay synovitis onset in mice CIA [10, 12]. Similar results were obtained with anti-VEGF-R1 antibodies in K/BxN mice spontaneous arthritis model [13].

Active anti-cytokine immunization is a potential alternative strategy to monoclonal antibodies (mAbs) to block cytokines involved in disease processes [14]. The aim is to induce the endogenous production of polyclonal anti-cytokine Abs. We have contributed to the development of active anti-TNF vaccination from proof of concept to clinical trial in RA [14–16]. The vaccine is called kinoid of TNF (TNF-K) and is a heterocomplex of the cytokine conjugated to a carrier protein, the keyhole limpet hemocyanin (KLH). Kinoids lead to rupture of tolerance of quiescent cytokine-specific B cells, thereby inducing a polyclonal anti-cytokine Ab response. In principle, kinoids may be obtained from any cytokine of interest.

Bevacizumab is an anti-human VEGF-A monoclonal antibody used for treating several metastatic and non-metastatic solid cancers [17]. A previous report showed that the kinoid of human VEGF-A was as effective as bevacizumab for suppressing tumor angiogenesis and metastases in implanted solid human tumors in mice with severe combined immunodeficiency [18]. Conversely, the potential role of anti-VEGF active immunization in RA is hitherto unexplored.

Here, we report the protective effect on CIA of active immunization targeting VEGF in two sets of experiments. In the first, we elicited an anti-VEGF Ab response by immunizing mice with the kinoid of the entire murine VEGF-A molecule (VEGF-K). In the second, we first identified, inside the VEGF-A molecule, two peptide sequences potentially relevant for VEGF biological activity (Vpep1 and Vpep2). We then immunized the mice with the two distinct peptide vaccines obtained by conjugation of each peptide to KLH in the corresponding heterocomplexes (Vpep1-K and Vpep2-K, respectively). We could show that both immunization strategies induced anti-VEGF Ab response and decreased joint inflammation and destruction in CIA.

Materials and methods

Selection of the peptide derivatives of mouse VEGF-A

The two peptides were chosen in the sequence of the murine VEGF-164 isoform. Murine VEGF-164 shares 90 % identity and 93 % homology with its human counterpart VEGF-165 [19]. VEGF-165 has been recognized as the most potent stimulators of angiogenesis. The choice of Vpep1 (SRCECRPKKDRTKPEN, position 98–113) was

³ Service de Rhumatologie, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP) Groupe hospitalier Avicenne - Jean Verdier – René Muret, 125 rue de Stalingrad, 93000 Bobigny, France

⁴ Inserm UMR 1148, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France

⁵ CNRS, Immunopathologie et chimie thérapeutique/ Laboratory of excellence Medalis, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France

⁶ CNRS UMR 7244, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France

⁷ Néovacs SA, 14 Impasse Reille, 75014 Paris, France

based in part on previous publications that describe the competitive inhibition of VEGF activity of a large peptide defined in the human VEGF-165 sequence (position 111–165) [20]. Vpep1 was chosen upstream of this sequence at the limit of exon 5. This sequence is common to both VEGF-188 and VEGF-120 isoforms. The choice of the small peptide Vpep2 (RCDKPRR, position 158–164) is based on the previous work on the use of a peptide homologous with anti-angiogenic properties [21]. Moreover, the tridimensional structure of murine VEGF-164 was recently described by Parker and co-workers [19, 22] who confirmed the essential role of the arginine residue 164 for VEGF binding to its co-receptor neuropilin-1 (NP1) [23].

Peptide synthesis

Peptides were synthesized using a classical Fmoc (*N*-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl) solid-phase chemistry and purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). Peptides homogeneity was checked by analytical HPLC, and their identity assessed by LC/MS on a Finnigan LCQ Advantage Max system (Thermo Fischer Scientific). Peptides' purity was higher than 90 %.

Vaccines preparation

Murine VEGF-A was purchased from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France), and KLH was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Conjugation of VEGF to KLH to prepare VEGF-K was previously described [18]. Peptide vaccines were prepared as follows: Briefly, the peptides and maleimide-activated KLH (ThermoScientific, 77605) in phosphate-buffered saline (PBS) were incubated for 2 h at room temperature while maintaining the pH at 6.8 (molar ratio of peptide/KLH = 400:1). Cysteine was then added for 1 h at room temperature to neutralize remaining reactive maleimide groups on KLH (molar ratio of cysteine/KLH = 1:1). The cysteine residue in C-5 position of Vpep1 was changed during the synthesis for a serine residue (SRCESRPKKDRTKPEN) to ensure specific coupling of KLH to C-3 cysteine residue. The resulting heterocomplex was named Vpep1-K (Vpep1-KLH). Vpep2-K (Vpep2-KLH) is the result of Vpep2 coupling to KLH via the cysteine residue in position 2. The heterocomplexes (Vpep1-K and Vpep2-K) were then dialyzed through a 10-kD membrane against PBS, pH 7.4, to remove the peptides in excess and free cysteine.

Anti-VEGF Ab titers and VEGF-R binding assays

Serum anti-VEGF Ab titer was assessed by ELISA. Briefly, microtitration plates were precoated with recombinant

murine VEGF-A (Peprotech, 450-32) and subsequently mice sera (1/500 starting dilution) were incubated in the plates. Anti-VEGF IgGs were detected by a rabbit anti-mouse IgG (H + L) linked to horseradish peroxidase (Zymed, 61-6520), revealed after incubation with its OPD substrate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and read at 490 nm.

Inhibition of VEGF-A binding to VEGF-R2 by serum of VEGF-K-immunized mice was also tested by ELISA, using precoated plates with 50 ng of VEGF-R2 per well (R&D systems). Plates were incubated with hyperimmune sera (1/100 starting dilution) and VEGF. VEGF binding was detected by an anti-mouse VEGF Ab linked to Biotin (R&D systems, BAF493), revealed by streptavidin-HRP (Southern Biotech, 7100-05) and OPD substrate (Sigma-Aldrich) and read at 490 nm. The neutralizing activity is expressed as the reciprocal of the highest serum dilution giving 50 percent inhibition of VEGF-A binding to VEGF-R2.

VEGF bioassay

VEGF-A activity was assessed by HUVEC proliferation assay. HUVEC cells (5×10^3) were seeded in as described elsewhere [24]. Cell proliferation was measured by [3 H]thymidine incorporation. The neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the highest serum dilution that neutralizes 50 % of VEGF-A activity, calculated from duplicate measurements.

Anti-VEGF-A-derived peptides assay

Polyvinyl plates (Falcon 3912, Oxnard, CA) were coated overnight at 37 °C with Vpep1 or Vpep2 peptides (2 μ M) in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6). After washing plates and saturation with PBS containing 0.05 % (v/v) Tween (PBS-T) and 1 % (w/v) BSA (PBS-T-BSA), mouse sera diluted 1:2000 in PBS-T were added to coated plates for 1 h. After washing plates, horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse IgG (1:20,000 in PBS; Jackson Immuno Research) was added to plates for 30 min at 37 °C. The peroxidase substrate H_2O_2 and the chromogen 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) were then added for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding HCl 1 M, and absorbance was measured at 450 nm.

Mice

For each experiment, 40–48 DBA/1 (haplotype H-2q) male mice, susceptible to CIA, were purchased from R. Janvier Laboratory (Le Genest Saint-Isle, France). They were aged between 4 to 6 and housed 1 week before the beginning of the study. After weighing, mice were distributed in treatment groups and bred in mixed cages.

Collagen-induced arthritis

Arthritis was induced in DBA/1 mice by using a 1:1 emulsion of bovine type II collagen (CIIb, 50 µg/mice) and Complete Freund Adjuvant (CFA, Difco, France) on day 0 (total volume injected in the tail 100 µL). A boost was given on day 21 by using 100 µL of a 1:1 emulsion of CIIb (50 µg/mice) and Incomplete Freund Adjuvant (IFA, Difco, France). Arthritis onset occurs around 30–35 days after the first collagen injection [25].

Assessment of experimental arthritis

Mice were monitored for evidence of arthritis in their four paws using a blind procedure (16). For each mouse, the clinical severity of arthritis was scored (0, normal; 1, erythema; 2, swelling; 3, deformity; and 4, ankylosis) in 10 joints or group of joints: three joints of the two hind limbs (toes, tarsus, and ankle) and two joints of the two forelimbs (digits, wrist). The maximum score reached for each of the 10 joints was 4, so the individual maximum arthritis clinical score on a given day was 40. The mean arthritic score on each days of clinical observation was calculated for each group of treatment and is represented in Fig. 3a, b.

Mouse anti-collagen type II antibody ELISA

Serum anti-collagen type II Ab production was assessed by ELISA. Anti-CII total IgGs were evaluated in the first study (whole VEGF vaccine study), whereas IgG1 and IgG2a isotypes of anti-CII Ab were evaluated in the second study (VEGF peptides study). After CIIb adsorption on microtitration plates, mice sera (1/1000 dilution) were incubated on coated plates. Anti-CIIb IgGs were detected by either a goat anti-mouse IgG linked to alkaline phosphatase, or a goat anti-mouse IgG1 or IgG2a linked to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), revealed after incubation with its PNP substrate and read at 405 nm. Sera of severely arthritic mice from previous experiments were used as positive controls.

Histological assessment of arthritis

In both sets of experiments, two limbs (right forelimbs and left hind limbs or vice versa in different single experiments) were collected, fixed, decalcified, dehydrated, and set in paraffin blocks. Slides of 7 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin before microscopic observation (optical microscope). At least four serial sections were cut from each paw to ensure extensive evaluation of the arthritic joints. Each joint was evaluated at 40× magnification. At least ten fields per section were

evaluated. In each joint, two parameters were separately assessed using a four-point scale (0–3, where 0 indicated a normal joint and 3 maximally severe arthritis).

The first parameter was inflammation as reflected by synovial membrane thickness (synovial proliferation) and inflammatory cells infiltration. Inflammation was scored as follows: 0: no synovial proliferation and no inflammatory cells infiltration; 1: limited or absent synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating ≤5 % of synovial membrane; 2: synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating between 5 and 50 % of synovial membrane; 3: massive synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating >50 % of synovial membrane. The second parameter was joint destruction (bone erosions, cartilage thickness, and cartilage unevenness). Joint destruction was quantified as follows: 0: no bone erosions, smooth cartilage surface with conserved thickness; 1: the presence of cartilage erosion or unevenness, or thinning involving ≤50 % of cartilage surface with absent or single bone erosion; 2: multiple cartilage erosions or cartilage thinning involving >50 % of cartilage surface, and/or >1 bone erosions involving ≤50 % of articular surface; 3: complete derangement of articular structure. For prevalence determinations, histological inflammation or destruction was defined as an inflammation or destruction score ≥0.5.

Assessment of synovial vascularization

Endothelial cells inside the synovium were detected using *Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia* Lectine I (GSL 1-isolectin B4) immunohistochemical staining with the streptavidin–biotin peroxidase complex method. Knee joint slides were deparaffinized in xylene and dehydrated through serially diluted ethanol solutions down to distilled water. After blocking endogenous peroxidase activity in blocking solutions for 1 h, the slides were pretreated with blocking serum and then incubated with GSL 1-isolectin B4 (20 µg/mL) for 1 h at room temperature. Then, the slides were incubated with goat antibody to GSL 1-isolectin B4 (10 µg/mL) for 1 h, washed, and incubated with biotinylated rabbit anti-goat immunoglobulins (4 µg/mL) for 30 min in moist chamber at room temperature. The samples were incubated with streptavidin–peroxidase for 10 min using diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen. Between each step, the slides were washed three times for 5 min with TBS. They were counterstained by incubation with hemalun for 40 s and mounted with glycerol. All reagents were obtained from Dako (Trappes, France) apart from GSL-1 and antibody against GSL-1, which were obtained from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). For each mouse, three non-serial sections from each knee were studied. Vessel quantification was performed in real time on each section at ×400

magnification with a Zeiss Observer D1 microscope equipped with a motorized stage connected to Histolab software (Microvision, Les Ulis, France), which allows direct morphometric analysis on histological sections. Any GSL-1 stained group of cells with or without a lumen (in the latter case with a diameter $\geq 4 \mu\text{m}$) was considered as an individual vessel. Moreover, any group of cells with a lumen containing red blood cells was considered as a vessel, independent of GSL-1 staining. Conversely, single GSL-1-stained disperse cells were not counted as vessels. Synovial vascular density was calculated as follows: First, the average surface of normal synovium was calculated from several sections of non-arthritis joints. This allowed to calculate an average rectangular area of 153,376 square micrometers (0.150 mm^2), corresponding to a third of normal synovial surface. For each joint section, this rectangular area was placed in the middle of the synovium, and each vessel falling within this area was counted. The number of vessels was divided by the area of the rectangle.

Treatments

Anti-VEGF (entire cytokine) immunization

Immunizations were performed with the kinoid of murine VEGF-A (VEGF-K) emulsified at a 1:1 volume ratio in IFA (Difco, France). Immunized mice ($n = 10$) received 5 VEGF-K intramuscular injections ($17.5 \mu\text{g}$ then $8.5 \mu\text{g}$) at days -40 , -33 , -12 , 9 , and 48 of the experiment (Fig. 3a). Emulsions were prepared in 15-mL sterile polypropylene tubes (Greiner) just before the injections ($100 \mu\text{L}/\text{mouse}$).

As negative control, mice received a 1:1 emulsion of either KLH ($8.75 \mu\text{g}$ then $4.4 \mu\text{g}/\text{IFA}$) or PBS/IFA. KLH and PBS were administered on the same time schedule as VEGF-K or Vpep-Ks in the entire cytokine (Fig. 3a) and in the peptide vaccine (Fig. 3b) experiments, respectively.

Anti-VEGF-derived peptides immunization

Mice received 5 intramuscular injections ($100 \mu\text{L}$) at days -36 , -22 , -8 , 7 , and 37 with KLH-coupled peptides (Vpep1-K or Vpep2-K, $100 \mu\text{g}/\text{mouse}$), or negative control preparations ($50 \mu\text{g}$ KLH or PBS/mouse) emulsified in IFA, on the same time schedule.

Statistical analysis

Data distribution was preliminarily checked by the Kolmogorov–Smirnov test. According to data distribution, values are expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range, unless otherwise specified. According to data distribution and number of comparison groups, a parametric (ANOVA) or nonparametric

(Kruskal–Wallis) test was used. Serial measurements of clinical scores were analyzed considering the area under the curve (AUC) for each subject as a summary measure; these measures were then analyzed as raw data for inter-group comparison (ANOVA). Difference in arthritis onset was calculated with ANOVA. For each mouse, the arithmetic mean of histological scores of inflammation and destruction of the two analyzed limbs was calculated and used as raw measure for inter-group comparison (Kruskal–Wallis). Post hoc comparisons were performed with the appropriate test according to data distribution (Student–Newman–Keuls for parametric data, corrected Mann–Whitney test for nonparametric data). Pearson's correlation was used to correlate histological scores and the AUC of clinical scores for each mouse.

For individual Ab titers, the AUC was calculated and used as a summary measure for Ab response comparison. All statistical analyses were performed with MedCalc software version 10.4 (MedCalc Software bvba, Belgium).

Results

Induction of specific anti-VEGF-A antibody response

Anti-VEGF-A immunization

VEGF-K triggered an Ab response to VEGF-A in immunized mice, while no anti-VEGF-A response was detectable in other groups (Fig. 1a). The geometric mean of anti-VEGF Ab titer (expressed as the reciprocal of the serum dilution) calculated from value distribution in each individual mouse was $19,939 \pm 8122$.

Hyperimmune sera drawn at kill inhibited the proliferation of HUVEC in culture, with serum IC₅₀ ranging from 1/250 to 1/2500 from 6 out of 10 VEGF-K-immunized mice (Fig. 1b). The anti-VEGF neutralizing capacity of the hyperimmune sera was further confirmed by blockade of the binding of VEGF to its VEGF-R-2, as assessed by ELISA (Fig. 1c). The geometric mean of inhibiting titer calculated from value distribution in each individual mouse was 808 ± 599 .

Anti-VEGF-A-derived peptides immunization

Immunization with VEGF-A-derived peptides induced peptide-specific Ab response (Fig. 2). As expected, the Abs induced by a specific peptide did not cross-react with the other peptide (i.e., Abs against the peptide Vpep1 do not recognize Vpep 2 and inversely, Fig. 2a, b).

We then evaluated the capacity of peptide vaccines to induce an Ab response capable of recognizing the entire

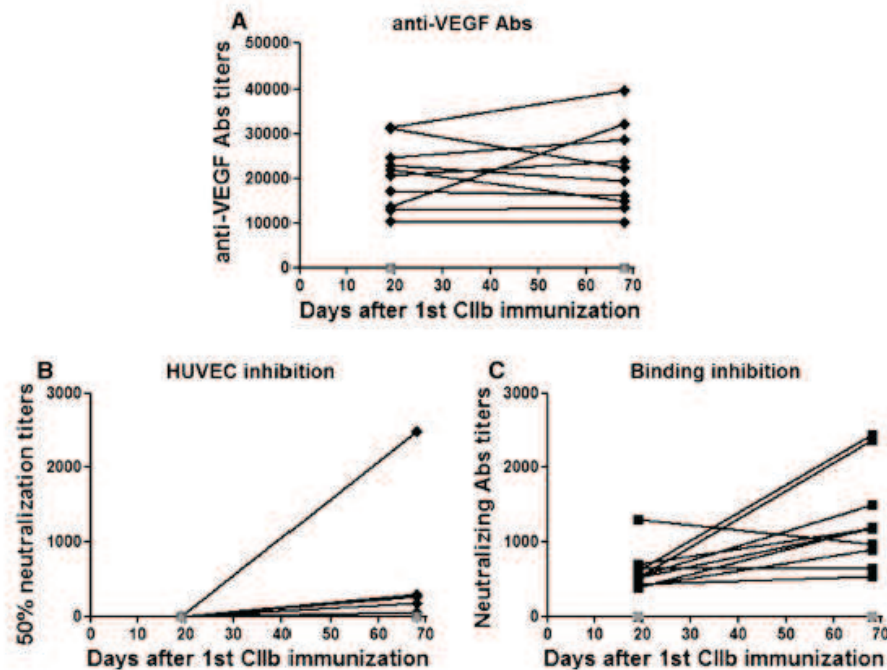


Fig. 1 Induction of anti-VEGF Ab response by VEGF-K immunization. As a result from blood draws at day 19 and 68 (see “Materials and methods”), only VEGF-K-treated mice produced persistently high titers of anti-VEGF Abs, while no anti-VEGF Ab response was detected in the other groups (Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons on the AUC of Ab titers for each individual animal). In **a** Ab titers variations in individual mice are reported

(black diamonds). In **b** HUVEC inhibiting anti-VEGF titers distribution and variation (black diamonds) are shown. In **c** receptor inhibiting anti-VEGF Ab titers distribution and variations are shown. Only VEGF-K (black diamonds) shows inhibiting capacity on HUVEC proliferation. Conversely, PBS (light-gray triangles) and KLH (dark-gray squares) exerted no inhibition

cytokine VEGF-A, in order to block its activity. As shown in Fig. 2c, immune sera from both Vpep1-K- and Vpep2-K-immunized mice recognized the whole cytokine in a similar manner. Conversely, immune sera from KLH-immunized mice did not recognize the VEGF-A peptides (Vpep1 and Vpep2) or the entire cytokine. Additionally, hyperimmune sera drawn at kill from Vpep1-K-immunized mice inhibited murine VEGF-A bioactivity on HUVEC in culture. Sera from 10 out of 13 Vpep1-K-immunized mice exerted measurable inhibition on HUVEC viability after 24 h of culture (see supplementary material 1).

Effect of VEGF-A blockade with active immunization on arthritis

Anti-VEGF-A immunization (entire cytokine)

As expected, in negative control groups (KLH and PBS), arthritis rapidly developed after the second CIIb immunization. Conversely, VEGF-K treatment resulted in significantly lower clinical arthritis scores versus both controls ($p < 0.05$, Fig. 3a), with an increase in clinical scores at the end of the experiment. The global effect of VEGF-K immunization was then a right shift of clinical

score curves corresponding to a significantly delayed arthritis onset versus both control groups (34.1 ± 7.1 , 26.1 ± 4.7 , 24.1 ± 5.0 for VEGF-K, KLH, and PBS, respectively, $p < 0.05$) without reduced maximal clinical index (Amax). The weight of VEGF-K-treated mice was comparable to both negative controls all along the experiment, suggesting good tolerance of the treatment. These results were confirmed in a total of three independent experiments.

Anti-VEGF-A-derived peptides immunization

Vpep1-K-immunized mice had milder clinical scores of arthritis versus negative control groups ($p < 0.05$), whereas no protection was conferred by Vpep2-K (Fig. 3b). Vpep1-K group displayed delayed onset of clinical signs (34.2 ± 5.6 , 29.1 ± 3.1 , 29.7 ± 4.0 days, respectively, for Vpep1-K, KLH, and PBS, $p < 0.05$) and no lower Amax versus controls.

Effect on humoral immune response

In both sets of experiments, anti-CIIb antibodies were evaluated in each mouse's sera by ELISA. The treatment

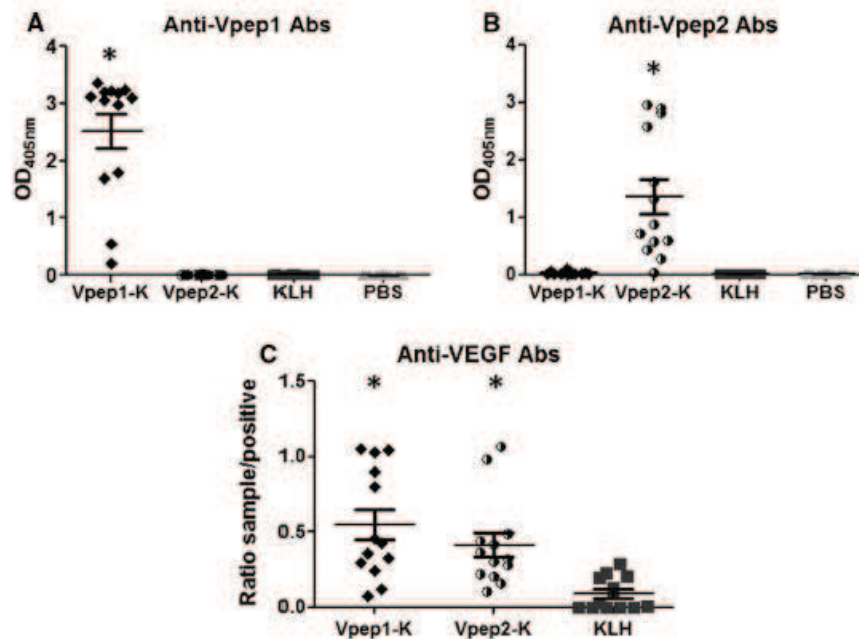


Fig. 2 Induction of peptide- or cytokine-specific Ab response in Vpep1-K- and Vpep2-K-immunized mice. Recognition of the immunizing peptides Vpep1 (a), Vpep2 (b), and of the whole VEGF-A cytokine by hyperimmune sera from Vpep1-K- and Vpep2-K-treated mice, as tested by ELISA (1/100 dilution). Vpep1 (a) and Vpep2 (b) are recognized only by hyperimmune sera from mice immunized with Vpep1-K and Vpep2-K, respectively. c Sera from both Vpep1-K- and Vpep2-K-immunized mice recognize the native VEGF-A

cytokine. Sera were obtained by cardiac puncture at kill. The ability for Abs contained in these sera to recognize the whole VEGF-A cytokine was evaluated by ELISA. Mice sera were diluted 1/100. Vpep1-K (black diamonds), Vpep2-K (black-and-white circles), KLH (black squares), PBS (light-gray triangles). * $p < 0.05$ versus KLH (Kruskal-Wallis test with subsequent post hoc comparisons on the AUC of Ab titers for each individual animal)

with either VEGF-K, Vpep1-K, or Vpep2-K did not alter either total IgG, or IgG1, or IgG2a anti-ClIb antibody levels (Fig. 4a–c, respectively), suggesting that early treatment of mice with anti-VEGF immunogens does not affect anti-ClIb Ab response.

Effect of anti-VEGF-A and anti-VEGF-A-derived peptides immunization on histological inflammation and destruction

At necropsy, histological scores of joint inflammation and destruction were attributed in a blind fashion for each mouse. In their respective set of experiments, mice immunized with VEGF-K and with Vpep1-K had significantly lower histological inflammation and destruction versus both controls (Fig. 5).

Mice immunized with VEGF-K showed lower inflammation (1.04 ± 0.17 , 1.80 ± 0.25 , 2.08 ± 0.20 for VEGF-K, KLH, and PBS, respectively, $p < 0.05$, Fig. 5a) and destruction scores (1.03 ± 0.18 , 1.77 ± 0.24 , 2.13 ± 0.22 for VEGF-K, KLH, and PBS, respectively, $p < 0.05$ Fig. 5b) versus controls. This experiment was independently repeated twice with similar results. Mice immunized with Vpep1-K showed significantly lower histological

inflammation (1.03 ± 0.25 , 1.97 ± 0.20 , 2.23 ± 0.20 for, respectively, Vpep1-K, KLH, and PBS, $p < 0.05$, Fig. 5c) and destruction (0.66 ± 0.17 , 1.45 ± 0.23 , 1.67 ± 0.19 for, respectively, Vpep1-K, KLH, and PBS, $p < 0.05$, Fig. 5d) versus both control groups. Representative examples are shown in Fig. 6.

In both sets of experiments, for each individual mice, destruction and inflammation scores showed good and significant correlation with the AUC of clinical scores ($r = 0.64$, $p < 0.01$ for inflammation-clinical scores AUC and $r = 0.60$, $p < 0.001$ for destruction-clinical AUC, respectively, for VEGF-K; $r = 0.70$, $p < 0.01$ for inflammation-clinical scores AUC and $r = 0.63$, $p < 0.05$ for destruction-clinical scores AUC for Vpep1-K, respectively).

Effect of anti-VEGF-A and anti-VEGF-A-derived peptides immunization on synovial vascularization

Mice immunized with VEGF-K showed significantly lower synovial vascular density versus both KLH and PBS ($p < 0.05$, Fig. 7a, and supplementary Fig. 2). Mice immunized with Vpep1-K had numerically less vessels per

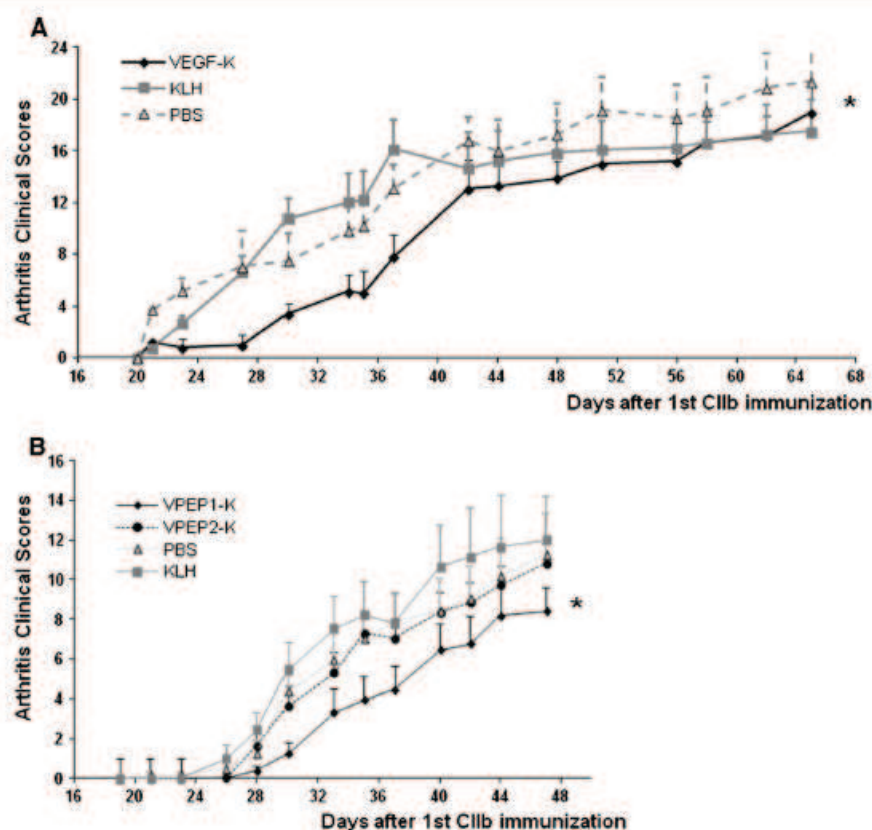


Fig. 3 Effect of active anti-VEGF-A immunization on clinical scores of CIA. Day 0 is considered the day of the first administration of CIIb. **a** Outlines the experimental design of the experiment with the kinoid of the entire VEGF cytokine (VEGF-K). Each treatment group comprised 10 mice. The experimental design of the experience with the peptide heterocomplexes (Vpep1-K and Vpep2-K) is outlined in **b**. Each treatment group comprised 12 mice. Compared to controls (PBS: gray triangles, gray dotted line; KLH gray squares, gray continuous line), immunization with VEGF-K (black diamonds, black

continuous line in **a**) or Vpep1-K (black diamonds, black continuous line in **b**) resulted in significantly lower arthritis scores. Vpep2-K group (black circles, black dotted line in **b**) did not differ from controls. The asterisk indicates a statistically significant difference in clinical scores between treatment groups on the whole duration of the experiments. The differences are calculated with ANOVA, with the area under the curve (AUC) of the clinical scores for each animal as raw value. * $p < 0.05$ versus both PBS and KLH

synovial surface versus Vpep2-K, KLH, and PBS, but this difference did not attain significance (Fig. 7b).

Discussion

Here, we demonstrate for the first time the anti-inflammatory effect of active immunization targeting VEGF-A in an experimental model of RA.

Mice immunization with either VEGF-K (the whole cytokine vaccine) or Vpep1-K (the peptide vaccine) induces anti-VEGF-A Abs production and results in delayed arthritis onset and lower articular inflammation and destruction versus controls.

Moreover, in each individual mouse, the AUC of clinical scores showed a good correlation with histological scores of both inflammation and destruction, which

supports the validity of these results, both at the group and at the individual level. Both the Ab response and clinical and histological results were consistent and reproducible across independent experiments.

Both VEGF-K and Vpep1-K immunization inhibited VEGF-A bioactivity. Only VEGF-K significantly reduced synovial vascularization. Vpep1-K also seemed to reduce synovial vessels density versus controls, but this difference did not reach significance, probably because in Vpep1-K experiments all mice developed less severe arthritis and had lower synovial vessels counts compared to the experiments with VEGF-K.

Both vaccines were well tolerated by animals, as reflected by mice weight and mortality rates, not different from controls. Anti-VEGF-A immunization may control histological inflammation and destruction probably in virtue of both an anti-angiogenic and an anti-

Fig. 4 Anti-collagen Ab production in vaccinated and control mice. In both the animals vaccinated with the entire cytokine vaccine (in **a** anti-CII total IgG) and in those vaccinated with the peptidic vaccine (in **b** IgG1 anti-CII; in **c** IgG2a anti-CII), the anti-CII Ab production did not differ from control mice (Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons on the geometric mean of Ab titers for each individual animal). VEGF-K (black diamonds), Vpep1-K (black circles), Vpep2-K (black-and-white circles), KLH (black squares), and PBS (light-gray triangles)

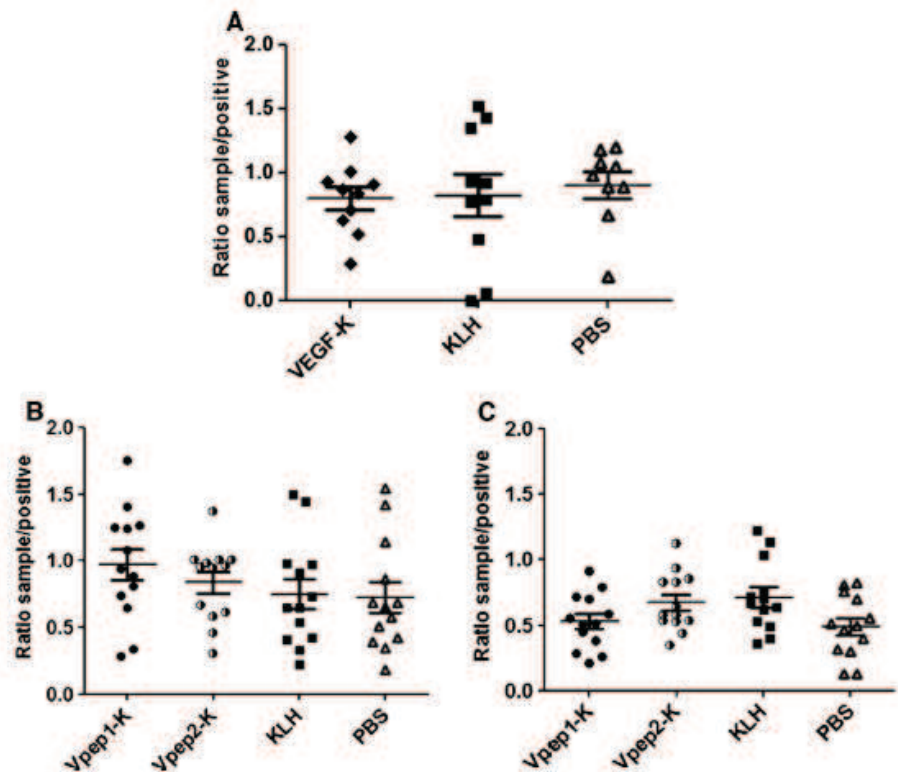
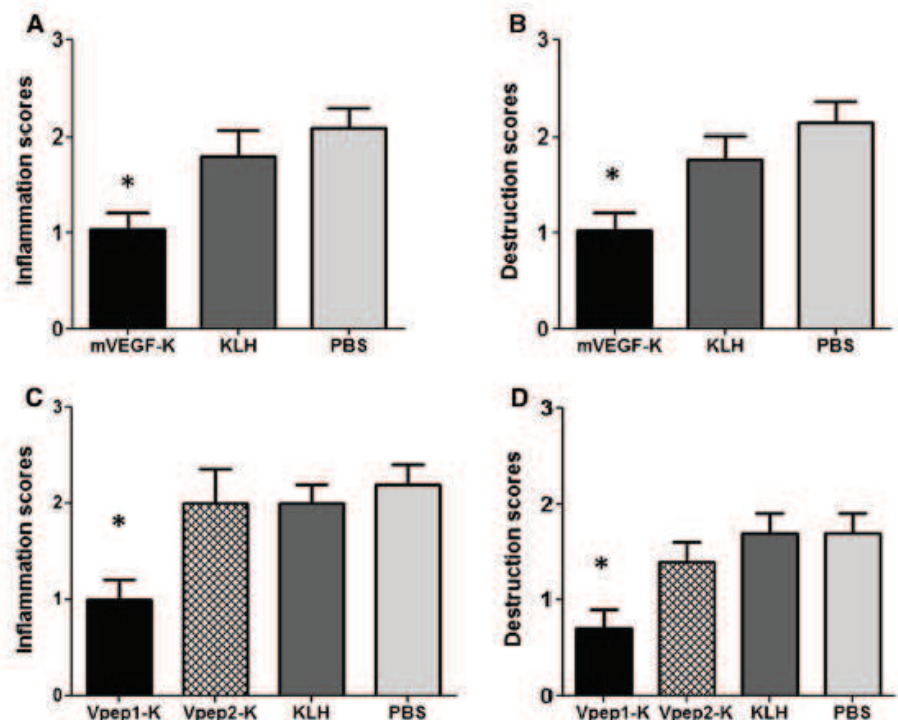


Fig. 5 Effect of active anti-VEGF-A immunization on histological scores of CIA. Both VEGF-K (black histograms **a**, **b**) and Vpep1-K (black histograms **c**, **d**) immunization resulted in significantly lower histological inflammation (**a**, **c**) and destruction (**b**, **d**) scores versus PBS (light-gray histograms) and KLH (dark-gray histograms). Vpep2-K group (black-and-white diamond pattern in **c**, **d**) did not differ from controls. * $p < 0.05$ versus both PBS and KLH (Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons)



inflammatory effect. The pro-inflammatory role of VEGF-A is not completely characterized. VEGF-R1 is expressed in monocyte/macrophages [26] and on

dendritic cells [27]. Blockade of VEGF-R1 signaling was shown to reduce macrophage reaction to LPS and IL-6 secretion [26]. VEGF and VEGF-R are expressed during

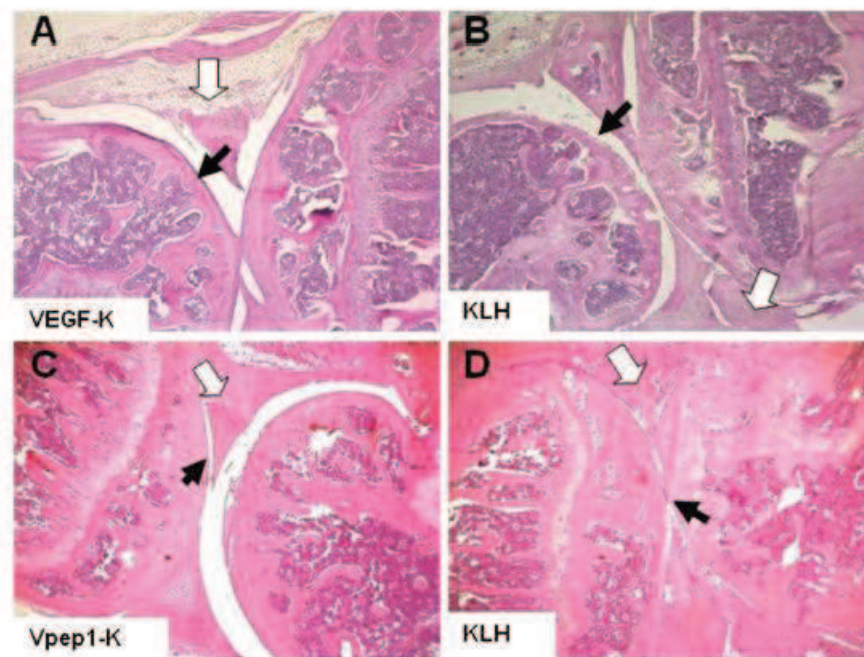


Fig. 6 Representative examples of histological sections from VEGF-K- (a), Vpep1-K- (c), and KLH-immunized mice (b, d). Each slide is a representative of the mean histological score of the corresponding group (VEGF-K, Vpep1-K, or KLH). Compared to control KLH group, both immunizations treatments (a, c) resulted in low or absent inflammatory synovitis (white arrow) and preserved articular surface

(black arrow). Conversely, in KLH-treated control mice (b, d), inflammatory synovitis (white arrow) is testified by the important leukocyte infiltration in the synovium. Structural joint damage, confirmed by joint space narrowing (d, black arrow) and cartilage and bone defects (b, d, black arrows), can be seen

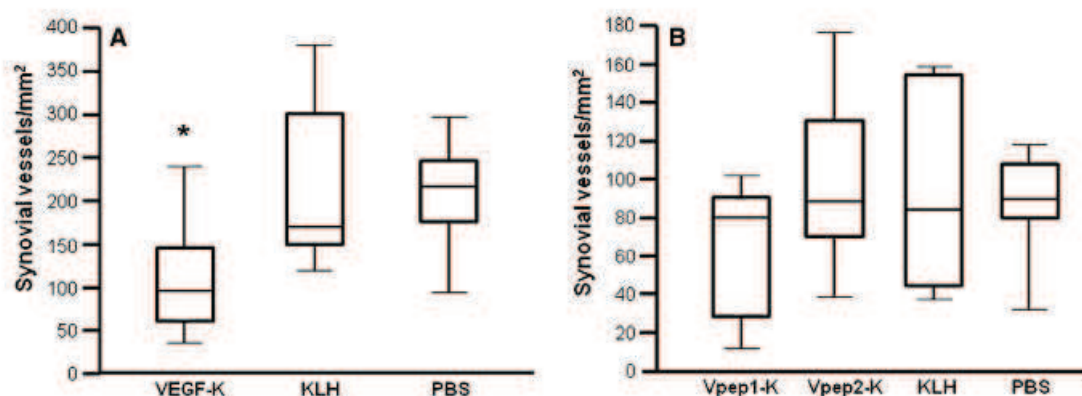


Fig. 7 Effect of anti-VEGF-A vaccines on synovial vascularization (expressed as total number of synovial vessels per square mm). Box and whiskers boxes display median and range values of synovial vessel counts for each treatment group. a VEGF-K immunization resulted in significantly lower synovial vascularization versus both

KLH and PBS (* $p < 0.05$ vs. KLH and PBS, Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons). b Vpep1-K-immunized mice had numerically less synovial vessels versus Vpep2-K-immunized or control mice, but this difference did not reach significance

CIA, and their levels correlate with disease severity and histological scores of synovial vascularization [11]. Moreover, VEGF-A gene transfer aggravates CIA [10], whereas the disease was effectively attenuated by prophylactic administration of anti-murine VEGF rabbit antiserum [12]. Moreover, the interaction of VEGF-A

with its co-receptor NP-1 protects rheumatoid fibroblast-like synoviocytes from apoptosis and may therefore contribute to synovial pannus proliferation with an angiogenesis-independent mechanism [28]. All these elements plead in favor of potential usefulness of VEGF-A blockade in arthritis.

On the other side, it has been shown that VEGF-A might be essential to mediate regulatory T cells (Tregs) infiltration inside the tumor mass [29] via engagement of NP-1, which is highly expressed by Tregs [30]. Blockade of VEGF/VEGF-R2 signaling pathway reduces Tregs proportions and proliferation in both tumor-bearing mice and in patients with metastatic colorectal cancer [31].

In RA, Tregs function might be impaired [32]. Effective anti-TNF [33–36] and anti-IL-6R treatment [37] are associated with the restoration of Tregs function, which might be one of the mechanisms underlying the long-term efficacy of biological treatments in RA. Hence, limiting Tregs proliferation and homing into target tissues by VEGF/VEGF-R2 blockade might be a potential drawback of anti-VEGF-A strategy in RA, which deserves further investigation.

Additional drawbacks of VEGF-A inhibition, as suggested from clinical experience with bevacizumab [38], reside in potentially increased risk of hypertension, proteinuria, left ventricular dysfunction, and thromboembolic events, which should further induce to ponder the benefit/risk ratio of this therapeutic approach in arthritis.

VEGF-K immunization induced high titers of anti-VEGF-A Abs in immunized mice, while no anti-VEGF Ab response was detectable in control groups. Hyperimmune sera from VEGF-K-immunized mice were capable of inhibiting VEGF-A linking to its high-affinity VEGF-R2 and of inhibiting HUVEC proliferation. The average affinity of VEGF-K-induced polyclonal Abs has been reported to be in the 10^{-9} order of magnitude [18]. Hence, polyclonal anti-VEGF Abs can efficiently compete VEGF-A binding to VEGF-R2 (whose K_d is equal to 10^{-11}) only when high tissue Ab concentrations are achieved, which results in global high Ab avidity. The therapeutic action of vaccination-induced Abs might then rely on two factors: the capability to localize the immune response to the sites of inflammation and the wide anti-cytokine Ab repertoire (i.e., clonality) [39]. But the clonality of the Ab response can potentially be restrained to critical molecular domains for cytokine function. This can be achieved with the technique of peptide vaccination. Our group previously reported the protection from septic shock and in CIA using peptide immunogens derived from TNF- α and IL-1 β , respectively [40, 41]. More recently, an anti-IL-23-derived p19-specific peptide was used to produce a heterocomplex that was effective in CIA [42].

In the present work, we aimed at blocking VEGF with VEGF-derived peptides. Vpep1 was selected in the plasmin cleavage site of VEGF-164, a site common to two other isoforms of VEGF (120 and 188). Vpep2 was selected in VEGF-164 C-terminal domain, in a sequence described as a NP-1 binding site [19, 22, 23]. Both peptide vaccines induced an efficient Ab response capable of both

recognizing the KLH-linked specific peptide and the entire VEGF-A molecule. Nevertheless, only Vpep1-K immunization protected mice from arthritis.

Both Vpep1 and Vpep2 were selected within crucial domains for VEGF function, and both peptide vaccines induced Abs capable of recognizing VEGF. The reason why only one peptide led to a positive effect on arthritis might be due to differences in the induced Ab repertoire. Notably, Vpep1 sequence is longer than Vpep2's (16 vs 5 amino acids), which may result in wider polyclonality possibly higher avidity of the immune sera.

Compared to the whole cytokine-kinoid strategy, peptide immunization strategy shows some practical advantages, like lower costs, while in the meantime it seems to offer interesting perspectives. Peptide immunization might allow to restrain the immune response to a selected site in the molecule of interest. Moreover, it might potentially allow to target different peptides from different molecules involved in the pathological process of interest. In a recent report, passive immunotherapy with double anti-angiogenic protein (DAAP), a chimeric decoy receptor which can bind both VEGF-A and angiopoietins, had greater effect than either VEGF-A or angiopoietin blockade in CIA [43]. In the same work, the association of DAAP and anti-TNF was more effective in CIA than either strategy alone. The added value of anti-angiogenic treatments to anti-TNF is extremely relevant. Data from previous pivotal studies indirectly show that the effect size of TNF blockade on CIA outweighs that of anti-VEGF treatments [44]. Even our group could show dramatic inhibition of CIA with an anti-murine TNF monoclonal Ab [45], while in the present work arthritis was only moderately affected. Nevertheless, anti-angiogenic treatments, even if not sufficiently potent *per se*, may exert a synergistic effect in association with treatments that target pro-inflammatory pathways.

Active immunotherapy might then provide the possibility to target multiple pathological processes at the same time, e.g., by immunizing the host with heterocomplexes derived from two (or more) key pro-angiogenic and pro-inflammatory molecules.

The study has several limitations. A major limitation lays in the lack of reference murine VEGF inhibitor as positive control. Bevacizumab, an antihuman VEGF-165 monoclonal antibody, has been reported to ameliorate CIA in the rat [46] and to induce cartilage repair in a rabbit model of osteoarthritis [47]. Nevertheless, bevacizumab seems to have a very weak interaction with mouse VEGF [48] and was therefore not the pertinent control for murine CIA. Choi and co-workers [49] reported the effectiveness of intra-articular anti-VEGF-R1 monoclonal Ab administration in murine CIA, but this approach was not systemic and did not target the VEGF molecule directly. Finally, Yoo et al. [50] inhibited murine CIA with a hexapeptide

that blocked the interaction between VEGF and its receptors. Nevertheless, this peptide convincingly inhibited the interaction of human VEGF-165 with its receptor resulting in HUVEC proliferation and inhibition of VEGF-dependent production of TNF and IL-6 from human PBMC. Nevertheless, the interaction of the hexapeptide with murine VEGF was not tested.

Another limitation of our study is the absence of experiments showing that serum transfer from vaccinated mice protects recipient animals from CIA. Nevertheless, our group had already provided evidence that serum transfer from mice vaccinated with the same anti-VEGF vaccine protected recipient animals from tumor growth [18]. Moreover, we also demonstrated that serum transfer from mice vaccinated against TNF alpha protects mice from arthritis [14]. For these reasons, we considered that the proof of concept of serum transfer had already been acquired.

Several potential disadvantages of the active immunization strategy versus passive immunotherapy have been evoked by the scientific community. The most feared downside would be the induction of permanent immunity against the target cytokine resulting in permanent inhibition of cytokine activity. These downsides have been explored by our group in particular concerning anti-TNF vaccination [14, 51]. We showed that anti-TNF vaccination with TNF kinoid induced a transient anti-TNF Ab response in recipient mice and human [52]. No autoreactive TNF-recognizing T cells were induced. The administration of high doses of TNF to vaccinated mice was not capable of eliciting a novel anti-TNF Ab response, which could be induced only by a boost dose of vaccine. In conclusion, targeting cytokines involved in angiogenesis could be a promising strategy in the treatment of chronic inflammation.

Acknowledgments This research was funded in part by the French Centre National de la Recherche Scientifique and the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034), Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University. Pathophysiology, targets, and therapies of rheumatoid arthritis laboratory received grants from University of Paris 13, Agence Nationale de la Recherche (ANR CYTOVAC project) and Inserm (ITMOs IHP and CMN). VEGF kinoid (VEGF-K) was produced by NéoVacs SA (France). We thank Sonia Varela (animal facilities, Paris13 University) and Philippe Haumont for their technical contributions. Special thanks to Delphine Lemeiter, Roxane Hervé, and Matthieu Ribon for their invaluable help with synovial vascularization study. This work is dedicated to the memory of Anna Starzec.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Paris 13 (ethical approval ID: Ce5/2010/036).

Authors' contributions L.S. participated in acquisition and interpretation of experimental data, performed statistical analysis, drafted and revised the manuscript. E.D. participated in peptide design, carried out mice immunization, evaluation of clinical arthritis, carried out immunoassay, and helped to draft the manuscript. N.B. carried out mice immunization and evaluation of clinical arthritis. N.M. carried out HUVEC inhibition with sera from peptide immunization. N.S. carried out the synthesis and coupling of peptide vaccines and performed peptide immunoassay. M.M. participated in the design and synthesis of peptide vaccines. G.G.V. conceived a part of the study, participated in the coordination and analysis of the data, and helped to draft the manuscript. EB carried out coupling of VEGF kinoid, immunoassay, and receptor binding inhibition assay. ML participated in the coordination of peptide design and synthesis. H.L. participated in the coordination and analysis of HUVEC inhibition and synovial vascularization. S.M. participated in the design, synthesis and coupling of peptide vaccines, analysis of the data and helped to draft the manuscript. M.C.B. conceived of the study, analysis of the data and helped to draft the manuscript. E.A. conceived of the study, participated in the coordination of the study, analysis of the data and helped to draft the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Kinoid technology is patented by NéoVacs SA, and Vpep1 sequence is patented by University of Paris 13. G.G.V. and E.B. are employees of NéoVacs SA. M.C.B. is a member of the scientific board of NéoVacs SA. L.S., E.D., N.B., N.M., N.S., M.M., M.L., H.L., S.M., and E.A. have no competing interests to declare.

References

- Hirohata S, Sakakibara J (1999) Angiogenesis as a possible elusive triggering factor in rheumatoid arthritis. *Lancet* 353:1331
- Mansson B, Carey D, Alini M et al (1995) Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest* 95:1071–1077
- Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN (1991) Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34:1125–1132
- Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA (1993) Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 52:232–234
- Miossec P (2003) Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum* 48:594–601
- Semerano L, Clavel G, Assier E, Denys A, Boissier MC (2011) Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 78:118–123
- Kremer JM, Blanco R, Brzosko M et al (2011) Tocilizumab inhibits structural joint damage in rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to methotrexate: results from the double-blind treatment phase of a randomized placebo-controlled trial of tocilizumab safety and prevention of structural joint damage at one year. *Arthritis Rheum* 63:609–621
- Otrock ZK, Makarew JA, Shamseddine AI (2007) Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 38:258–268

9. Shibuya M (2006) Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 9:225
10. Clavel G, Valvason C, Yamaoka K et al (2006) Relationship between angiogenesis and inflammation in experimental arthritis. *Eur Cytokine Netw* 17:202
11. Clavel G, Marchiol-Foumignault C, Renault G et al (2008) Ultrasound and Doppler micro-imaging in a model of rheumatoid arthritis in mice. *Ann Rheum Dis* 67:1765–1772
12. Lu J, Kasama T, Kobayashi K et al (2000) Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 164:5922–5927
13. De Bandt M, Ben Mahdi MH, Olivier V et al (2003) Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF-RI), but not VEGF-RII, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 171:4853–4859
14. Le Buanec H, Delavallée L, Bessis N et al (2006) TNF α kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNF α protect mice from autologous TNF α -driven chronic and acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19442–19447
15. Delavallée L, Le Buanec H, Bessis N et al (2008) Early and long-lasting protection from arthritis in tumour necrosis factor α (TNF α) transgenic mice vaccinated against TNF α . *Ann Rheum Dis* 67:1332–1338
16. Semerano L, Biton J, Delavallée L et al (2013) Protection from articular damage by passive or active anti-tumour necrosis factor (TNF)- α immunotherapy in human TNF- α transgenic mice depends on anti-TNF- α antibody levels. *Clin Exp Immunol* 172:54–62
17. Amit L, Ben-Aharon I, Vidal L, Leibovici L, Stemmer SM (2013) The impact of Bevacizumab (Avastin) on survival in metastatic solid tumors—a meta-analysis and systematic review. *PLoS One* 8:e51780
18. Rad FH, Le Buanec H, Paturance S et al (2007) VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2837–2842
19. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM (1997) The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* 5:1325–1328
20. Kong JS, Yoo SA, Kim JW et al (2010) Anti-neuropilin-1 peptide inhibition of synovioyte survival, angiogenesis, and experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 62:179
21. Starzec A, Vassy R, Martin A et al (2006) Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci* 79:2370–2371
22. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ et al (2001) The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 276:12153–12161
23. Parker MW, Xu P, Li X, Vander Kooi CW (2012) Structural basis for selective vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) binding to neuropilin-1. *J Biol Chem* 287:11082–11089
24. Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler IJ, Charnahelli H, Klagsbrun M (1997) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem* 272:31582–31588
25. Miellot A, Zhu R, Diem S et al (2005) Activation of invariant NK T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway. *Eur J Immunol* 35:3704–3713
26. Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S et al (2006) Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 108:1849–1856
27. Nam EH, Park SR, Kim PH (2010) TGF- β 1 induces mouse dendritic cells to express VEGF and its receptor (Flt-1) under hypoxic conditions. *Exp Mol Med* 42:606–613
28. Kim WU, Kang SS, Yoo SA et al (2006) Interaction of vascular endothelial growth factor 165 with neuropilin-1 protects rheumatoid synovioytes from apoptotic death by regulating Bcl-2 expression and Bax translocation. *J Immunol* 177:5727–5735
29. Terme M, Tartour E, Taieb J (2013) VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology* 2:e25156
30. Hansen W, Hutzler M, Abel S et al (2013) Neuropilin 1 deficiency on CD4 + Foxp3 + regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med* 209:2001–2006
31. Terme M, Pernot S, Marcheteau E et al (2013) VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res* 73:539–539
32. Boissier MC, Assier E, Biton J et al (2009) Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 76:10–14
33. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR (2007) Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J Exp Med* 204:33–39
34. Biton J, Semerano L, Delavallée L et al (2011) Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol* 186:3899
35. Biton J, Boissier MC, Bessis N (2012) TNF α : activator or inhibitor of regulatory T cells? *Joint Bone Spine* 79:119–123
36. Nie H, Zheng Y, Li R et al (2013) Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 19:322–328
37. Thiolat A, Semerano L, Pers YM et al (2014) Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39 + regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol* 66:273–283
38. Cortes J, Calvo V, Ramirez-Merino N et al (2012) Adverse events risk associated with bevacizumab addition to breast cancer chemotherapy: a meta-analysis. *Ann Oncol* 23:1130–1137
39. Zagury D, Bumy A, Gallo RC (2001) Toward a new generation of vaccines: the anti-cytokine therapeutic vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8024–8029
40. Bertin-Maghit SM, Capini CJ, Bessis N et al (2005) Improvement of collagen-induced arthritis by active immunization against murine IL-1 β peptides designed by molecular modelling. *Vaccine* 23:4228–4235
41. Capini CJ, Bertin-Maghit SM, Bessis N et al (2004) Active immunization against murine TNF α peptides in mice: generation of endogenous antibodies cross-reacting with the native cytokine and in vivo protection. *Vaccine* 22:3144–3153
42. Ratsimandresy RA, Duvallet E, Assier E et al (2011) Active immunization against IL-23p19 improves experimental arthritis. *Vaccine* 29:9329–9336
43. Hah YS, Koh YJ, Lim HS et al (2013) Double-antiangiogenic protein DAAP targeting vascular endothelial growth factor A and angiopoietins attenuates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 15:R85
44. Williams RO, Feldmann M, Maini RN (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9784
45. Saldenbergh-Kermanac'h N, Corrado A, Lemeiter D et al (2004) TNF- α antibodies and osteoprotegerin decrease systemic bone loss associated with inflammation through distinct mechanisms in collagen-induced arthritis. *Bone* 35:1200–1207
46. Wang Y, Da G, Li H et al (2013) Avastin exhibits therapeutic effects on collagen-induced arthritis in rat model. *Inflammation* 36:1460–1467
47. Nagai T, Sato M, Kutsuna T et al (2010) Intravenous administration of anti-vascular endothelial growth factor humanized monoclonal antibody bevacizumab improves articular cartilage repair. *Arthritis Res Ther* 12:R178

Article 2

La vaccination anti-TNF permet de réduire les arthrites expérimentales tout en limitant le risque infectieux

Nadia Belmellat, Luca Semerano, Noria Seguíni, Diane Damotte, Patrice Decker, Bernhard Ryffel, Valérie Quesniaux, Marie-Christophe Boissier, Eric Assier

Contexte :

Le TNF- α est une cytokine jouant un rôle majeur dans le développement des maladies inflammatoires chroniques, notamment la PR. Pour cette raison, elle est la cible principale dans le traitement de cette maladie.

Les immunothérapies anti-TNF- α reposent sur deux types d'inhibiteurs : les anticorps monoclonaux et les récepteurs solubles du TNF- α . Ces traitements ont une action rapide et efficace, cependant, le traitement par ces biothérapies est associé à l'apparition d'effets secondaires. En effet, ces traitements induisent une augmentation des infections, puisque le TNF- α joue un rôle important dans la protection vis-à-vis d'un certain nombre d'infections graves comme la tuberculose.

Des travaux menés au sein de notre laboratoire ont démontré l'efficacité de la vaccination anti-TNF- α humain dans l'arthrite de la souris transgénique pour le TNF- α humain (souris TTg, collaboration avec NéoVacs). Néanmoins, la sécurité de cette stratégie vaccinale ne pouvait pas être évaluée avec le vaccin humain car les anticorps générés ne croisent pas avec le TNF de souris et les souris TTg ne peuvent être utilisées dans les modèles infectieux.

Le but de cette partie de ma thèse était d'évaluer les éventuels effets secondaires de la stratégie vaccinale anti-TNF dans différents modèles d'infection et de comparer les effets de

ce vaccin avec un traitement anti-TNF classique. Pour répondre à cette question nous avons d'abord synthétisé au laboratoire un vaccin murin TNF-KLH.

Ce vaccin a été obtenu par couplage du TNF- α murin à une macromolécule immunogène, la KLH, et permet d'induire la production d'anticorps polyclonaux neutralisants.

Pour évaluer l'efficacité de ce vaccin sur le contrôle de l'inflammation, nous l'avons testé dans le modèle d'arthrite expérimental au collagène (AEC) et dans le modèle de la CAIA (arthrite induite par des anticorps anti-collagène). Dans ces deux modèles, les souris ont été immunisées avant l'induction des arthrites.

Dans la suite de ce projet nous avons évalué les conséquences de la neutralisation du TNF- α par la vaccination dans des modèles infectieux. Nous avons choisi deux modèles d'infections TNF dépendants : l'infection par *Listeria monocytogenes* et par *Mycobacterium tuberculosis*. La réponse immunitaire à ces deux agents infectieux fait intervenir de nombreuses cellules telles que les macrophages ou les neutrophiles afin de limiter la croissance bactérienne. De plus ces cellules produisent des cytokines inflammatoires notamment le TNF. Cette cytokine joue un rôle majeur dans la réponse à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* ou *Listeria monocytogenes*.

Beaucoup d'études ont montré l'importance du TNF- α dans la mise en place de la réponse anti-bactérienne. Ainsi, la neutralisation de cette cytokine avec les biothérapies classiques augmente le risque infectieux chez les patients, ce même résultat étant également observé dans les modèles infectieux. Dans ce contexte, les risques infectieux de la neutralisation du TNF- α par la vaccination ne sont pas encore connus. Je me suis donc intéressée aux effets secondaires éventuels de la neutralisation de TNF- α sur la réponse anti-listeria et anti-tuberculose.

La création d'un vaccin TNF-KLH murin nous a permis d'étudier cette question. Les souris ont été infectées après la vaccination et nous avons suivi l'état de ces souris au cours de l'infection. L'effet de la neutralisation de TNF- α par le vaccin a été comparé au groupe de souris traité par l'éta nercept et des souris TNF^{-/-}.

Résultats :

Les résultats obtenus dans l'AEC démontrent l'efficacité de ce vaccin. En effet, la vaccination permet de réduire les scores cliniques et histologiques de l'arthrite. Cependant, dans la CAIA, le vaccin TNF-KLH réduit les scores histologiques uniquement, peut-être du fait du caractère « explosif » des scores cliniques dans ce modèle.

Le vaccin TNF-KLH a été testé dans un modèle d'infection par *Mycobacterium tuberculosis*. Contrairement à ce qui est observé avec les souris TNF^{-/-}, le vaccin n'a aucun effet sur la réponse anti-bactérienne et permet une survie équivalente sur la durée de l'expérience à celle des souris contrôle, ainsi qu'une charge bactérienne limitée dans les organes. De plus, les analyses immunohistologiques confirment que la vaccination n'a aucun effet sur le recrutement de certaines cellules indispensables pour la formation du granulome.

Des résultats similaires sont observés dans l'infection par *Listeria monocytogenes*. Le blocage du TNF- α par la vaccination n'induit pas de mortalité chez les souris, contrairement à ce qui est observé chez les souris TNF^{-/-} ou traitées par etanercept. Nos résultats indiquent que les animaux vaccinés avec le TNF-KLH sont capables de résister à une dose modérée de *Listeria*. La charge bactérienne dans le foie et la rate est similaire à celle des souris sauvages et groupes contrôles (PBS, KLH), contrairement aux souris TNF^{-/-} et etanercept. Les analyses histologiques menées sur les foies infectés ont permis de montrer que la vaccination anti-TNF n'altère pas le recrutement des neutrophiles et des macrophages sur le site de l'inflammation.

Article 2

Anti-TNF- α vaccination protects from arthritis without sensitizing to infection

Nadia Belmellat^{1,2}, Luca Semerano^{1,2,3}, Noria Segueni⁴, Diane Damotte⁵, Patrice Decker^{1,2}, Bernhard Ryffel⁴, Valérie Quesniaux⁴, Marie-Christophe Boissier^{1,2,3}, Eric Assier^{1,2}

1 UMR 1125 Inserm, Bobigny, France

2 Sorbonne Paris Cité Université Paris 13, Bobigny, France

3 Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP) Groupe hospitalier Avicenne
- Jean Verdier – René Muret, Service de Rhumatologie, Bobigny, France

5 Service de pathologie Hôpitaux Universitaires Paris Centre, APHP, Université
Paris Descartes, Paris, France

Email addresses:

Eric Assier	eric.assier@univ-paris13.fr
Nadia Belmellat	belmellat.nadia@univ-paris13.fr
Marie-Christophe Boissier	marie-christophe.boissier@aphp.fr
Diane Damotte	diane.damotte@aphp.fr
Patrice Decker	patrice.decker@univ-paris13.fr
Valérie Quesniaux	quesniaux@cnrs-orleans.fr

Bernhard Ryffel

Bernhard.ryffel@cnrs-orleans.fr

Noria Segueni

noria.segueni@cnrs-orleans.fr

Luca Semerano

luca.semerano@aphp.fr

Corresponding author:

Pr. Marie-Christophe Boissier

UMR 1125 Inserm - Sorbonne Paris Cité - Université Paris 13

74, rue Marcel Cachin 93017 Bobigny, France

Phone: 00 33 01 48 38 76 98

fax: 00 33 01 48 38 88 93

Email: marie-christophe.boissier@aphp.fr

Conflict of interest statement

NB, PD, EA declared that no conflict of interest exists.

MCB, LS

DD

VQ, BR, NS

Abstract

Anti-TNF- α therapy has been a successful treatment strategy for rheumatoid arthritis disease, but is associated with reduced resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*.

We hypothesized that, contrary to actual anti-TNF therapies, TNF- α neutralization by an active immunization could lead to the resolution of autoimmune inflammation without sensitization to infections in mice models.

For this purpose, we developed a vaccine (TNF-KLH) targeting mouse TNF- α and compared its effect to TNF soluble receptor etanercept. We demonstrated in collagen induced-arthritis model that TNF-KLH vaccine protected animals similarly to etanercept. In a Mycobacteria infection model, TNF-KLH vaccine lead to smaller granuloma in organs, increased iNOS expression and B cell infiltration, contrasting with etanercept. Resistance of TNF-KLH vaccinated mice was confirmed in a Listeria infection model, with lower bacterial burden in organs than etanercept treated mice. Large lesions in livers were only observed with etanercept treated mice, which succumb rapidly, whereas all TNF-KLH vaccinated mice survived to infection.

Together, our results indicate that anti-TNF vaccine could protect mice from inflammatory arthritis with limited alteration of host immunity against infection, suggesting the existence of a limiting rate of TNF, protective during infection, that couldn't be impaired by anti-TNF vaccination.

Introduction

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a central mediator of inflammation, tumor growth control, autoimmunity and immune response to infection (Winsauer C, *Cytokine Growth Factor Rev* 2014). This cytokine is synthesized and expressed on the cell surface as a trimeric transmembrane protein that can be cleaved by TNF- α converting enzyme (TACE) protease to generate soluble TNF- α . TNF- α mediates a wide variety of effector functions in rheumatoid arthritis disease (RA), including the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, activations of immune cells and angiogenesis. TNF- α antagonists were developed for RA treatment, leading to two classes of biologic drugs : a soluble TNF- α receptor (etanercept) and monoclonal antibodies (mAbs) such as infliximab, adalimumab, golimumab, or certolizumab. Anti-TNF- α drugs have dramatically changed treatment of RA in terms of clinical control and articular damage prevention. However, these treatments have limitations, such as high costs, frequent therapeutic failures (only 20% of RA patients reach remission) (Singh JA, *CMAJ*, 2009) and increased risks of serious infections, like reactivation of pulmonary tuberculosis (Wallis RS, *Curr Opin Infect Dis.*, 2009). These limitations prompted investigations of an alternative strategy of TNF- α neutralization by a vaccinal approach. A human TNF- α vaccine (hTNF-K) was obtained after chemical coupling the human cytokine to the carrier protein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) (LeBuanec H, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006). Preclinical studies have shown that vaccination with hTNF-K lowered arthritis in the human-TNF- α transgenic mice model, depending of levels of anti-TNF- α antibodies production (Delavallée L, *Ann. Rheum. Dis.*, 2008 ; Assier E, *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012 ; Semerano *Clin. Exp. Immunol.*, 2013). Safety concerns were evaluated in this mice model. In a long term experiment, neutralizing antibodies induced by hTNF-K allowed a protection against arthritis and relapse was restrained by a late boost of

vaccine. On the other hand, anti-TNF- α antibody production couldn't be stimulated by an internal cytokine boost, and no cellular immunity against TNF- α was demonstrated (Delavallée L, *Arthr. Res. Ther.*, 2009). A first clinical trial was conducted with RA patients resistant to TNF-antagonists and gave promising results (Durez P, *PLoS One*, 2014). However, the risk of infections under hTNF-K treatment couldn't be easily studied in mice with this hTNF-K because anti-human TNF- α antibodies didn't cross-react with murine TNF- α .

In order to evaluate this risk, we designed a new vaccine targeting TNF- α by coupling murine TNF- α to KLH (TNF-KLH). Our data point out the protective effect of TNF-KLH vaccine in two models of arthritis. Furthermore, we showed that TNF-KLH vaccine has limited effects on host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes* reflected by differential local immune response to pathogens. These findings suggest that an anti-TNF- α vaccine could control chronic inflammation in mice without modification of pathogen-induced immune response and therefore without deleterious effect.

Results

Vaccination with TNF-KLH reduce clinical and histological signs of arthritis similarly to etanercept

To investigate the anti-inflammatory effect of TNF-KLH *in vivo*, we used the Collagen-Induced Arthritis (CIA) model in DBA/1 mice. Mice were vaccinated three times with 5, 10 or 20 μ g/mice of vaccine (TNF-KLH5, TNF-KLH10 and TNF-KLH20 groups). Control groups were vaccinated with KLH or PBS. All control groups developed arthritis, as

expected, whereas etanercept and TNF-KLH-vaccinated mice were protected against arthritis and showed significant low clinical arthritis scores vs both controls (* $p < 0.05$ for TNF-KLH and etanercept vs PBS and KLH, ANOVA), (Figure 1A). Maximal clinical arthritis index (Amax) was significantly lower in mice vaccinated with 10 μ g of vaccine (* $p < 0.05$ for TNF-KLH10 vs KLH) or treated with etanercept (** $p < 0.01$ for etanercept vs KLH) (Supplementary table 1). Despite this, incidences and onsets of arthritis were not different between groups (Supplementary table 1). Weights of TNF-KLH-treated mice were comparable to PBS and KLH controls all along the experiment (data not shown).

Histological examination of paws of PBS and KLH control mice showed significant evidence of inflammation, with cell infiltration associated with cartilage destruction (Figure 1B-E). By contrast, vaccination with TNF-KLH10 or treatment with etanercept reduced significantly inflammation signs of arthritis (Figure 1F) (* $p < 0.05$ for TNF-KLH10 vs PBS; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ for etanercept vs KLH and PBS controls, ANOVA). TNF-KLH10 or etanercept treatments preserved also against joint destruction (Figure 1G) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ for TNF-KLH10 vs KLH and PBS; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ for etanercept vs KLH and PBS controls, ANOVA).

These protections conferred by TNF-KLH or etanercept were confirmed in the Collagen Antibody-Induced Arthritis model in C57Bl/6 mice (Supplementary figure 1).

Vaccination with TNF-KLH allowed persistence of defense against Mycobacterium tuberculosis infection

We aimed to assess the consequences of the TNF-KLH vaccination at early and established phases of Mycobacteria infection. We immunized mice at days -44, -31, -17 and -4 with TNF-KLH or treated with etanercept (30mg/kg twice a week from day-4 to day 52). Control groups

were constituted by mice vaccinated with KLH or treated with PBS. TNF^{-/-} mice, which are extremely sensitive to virulent *M. tuberculosis* H37Rv infection, were used as a positive control. Excepted 5 naïve mice, all mice were infected on day 0 by intranasal instillation of *M. tuberculosis* H37Rv (10⁴ CFU). TNF^{-/-} mice loosed weight rapidly and needed to be euthanized at day 25 post-infection, the others groups were euthanized in early phase (day 28) or in established phase of infection (day 56).

Blood was collected before (day -10) and during infection (day 28) to evaluate the titer of anti-TNF- α antibodies. As expected, analysis of serum by ELISA showed a sustained production of anti-TNF- α antibodies in mice vaccinated with TNF-KLH (Supplementary figure 2A-B).

At euthanasia, weights of lungs, spleens and livers were evaluated. At early phase of infection, all organs of TNF^{-/-} mice exhibited a marked increase in weight versus the other groups, excepted versus lungs and spleens of etanercept group (Figure 2A-C). At day 56, organs weights were similar between all infected mice (Figure 2D-F).

Liver and lung bacterial loads were compared to TNF^{-/-} and etanercept treated mice. At early phase of infection, total CFU were dramatically increased in the organs in TNF^{-/-} mice versus all other groups (**p<0.01, ***p<0.001 in lung and liver) (Figure 3A-B). At the same time, CFU per organ were similar between TNF-KLH, etanercept and control groups (KLH and PBS). At day 56, total CFU were similar in lungs of all infected mice (Figure 3C).

To determine the effect of TNF-KLH vaccine on organs during early and established infection, we investigated histological changes in lungs and livers. Indeed, at early phase of infection, TNF^{-/-} mice were unable to control *M. tuberculosis* infection and developed a rapid, exacerbated lung inflammation. Lungs of these mice showed many granulomas with large necrotic area (Figure 4D). Within lungs of TNF-KLH, PBS and KLH groups, granulomas

were more discrete, with typical granuloma structure at day 56 (Figure 4A-H). Etanercept treated mice revealed similar granulomas on day 28 but these granuloma were more developed and less structured by day 56 (Figure 4C, 4G). According to Archimed software quantification, at early phase of infection, lung granuloma surface were increased in TNF^{-/-} and etanercept treated mice, without reaching significativity (Figure 4I). At day 56, granuloma surface of TNF-KLH and KLH vaccinated mice seemed to slightly decrease, contrary to etanercept (* p<0.05 versus etanercept group) (Figure 4J). Numbers of granuloma were similar between mice groups at both phases of analysis (Data not shown). The alveolar space was also assessed. At early and established phase of infection, all mice presented lower alveolar space versus uninfected mice (Figure 4K-L). Despite a large decrease observed with etanercept at established phase versus other groups, it didn't reach significativity (Figure 4L). Histological analysis of the liver at early phase of infection (Figure 5A-F), revealed that granulomas of TNF^{-/-} and etanercept groups were significantly larger than other groups (Figure 5G) (* p<0.05 versus TNF-KLH group). TNF^{-/-} and etanercept groups presented also a higher number of granuloma, without reaching significativity (Data not shown). At day 56, liver granuloma surfaces of etanercept group were larger than the other groups (Figure 5H). Histological analyses of lungs and livers suggested that mice treated with either TNF-KLH or KLH or PBS, can control the infection during the progression of the disease.

In order to confirm mycobacterial infiltration in granulomas, a coloration of Ziehl-Neelsen was performed for all mice groups (Supplementary figure 3A). A semi-quantitative evaluation of bacterial staining was conducted in lungs. Microscopic examination of tissues showed that TNF^{-/-} and etanercept treated mice presented higher mycobacterial infiltration than the other groups of mice (Supplementary figure 3B-C, *p<0.05 for etanercept and ***p<0.001 for TNF^{-/-} mice versus TNF-KLH, KLH, PBS treated mice, Anova).

Immunohistochemistry of lung sections were performed in order to investigate the relationship between cellular infiltrations or activation status and TNF- α neutralization.

At early phase of infection, iNOS was expressed in granulomas of all mice groups (Supplementary figure 4A). Histological analysis revealed that lesions in TNF-KLH, KLH and PBS groups were characterized by macrophage infiltration and very low number of neutrophils. In TNF^{-/-} and etanercept groups, iNOS expression by macrophages colocalized with microabscess containing altered neutrophils (Supplementary figure 4A). At day 56, etanercept group, presented more macrophages infiltration, high number of foamy histiocytes expressing iNOS and less neutrophils than in early phase of infection. Lesions of PBS group presented very few neutrophils, and iNOS was expressed in macrophages and foamy histiocytes. Vaccinated mice with KLH or TNF-KLH presented similar cellular infiltration than PBS group excepted a lower number of foamy histiocytes.

These immunohistological results suggested that TNF-KLH vaccinated mice were still able to activate bactericidal function in macrophages within the granuloma and control the infection.

We explored also the effect of TNF-KLH vaccine on lung infiltration by B lymphocytes during *M. tuberculosis* infection (Supplementary figure 5). At early phase of infection, anti-CD45R staining revealed a massive infiltration of B lymphocytes in lungs of TNF-KLH and KLH treated mice, a lower infiltration with PBS, and a nearly absence of B lymphocytes in TNF^{-/-} or etanercept treated mice. The immunostaining revealed a higher perivascular accumulation of B cells in vaccinated mice with KLH and TNF-KLH. At day 56, in vaccinated groups (KLH, TNF-KLH) pulmonary granulomas were well-organized, characterized by the presence of many pulmonary nodules and accumulation of B lymphocytes. The phenotype of PBS group was similar to the vaccinated mice but with less B lymphocytes. By contrast, etanercept group displayed a massive macrophages infiltration with

large necrotic area without typical granulomas and with very few B lymphocytes (Supplementary figure 5).

Vaccination with TNF-KLH allowed persistence of immunity to *Listeria monocytogenes*

A similar vaccination schedule was applied before infection with *Listeria monocytogenes*. Mice were immunized at days -44, -31, -17 and -4 with TNF-KLH or treated by intraperitoneal injections of etanercept (day -4, -2, 0 and 3). Controls groups received PBS or KLH and TNF^{-/-} mice were used as a genetic control. All mice were infected on day 0 by intraperitoneal injection of *Listeria monocytogenes* (10⁴ CFU). Blood was collected before (day -10) and during infection (day 3) to evaluate the titer of anti-TNF- α antibodies. Analysis of serum by ELISA showed production of anti-TNF- α and anti-KLH antibodies in mice immunized with TNF-KLH, with an increase of responder mice between day -10 and day 3 (Supplementary figure 6).

The bacterial load in liver and lung homogenates were assessed at day 4 and showed reduced CFU number in both organs of TNF-KLH vaccinated mice as compared to TNF^{-/-} and etanercept treated mice (* p<0.05 versus etanercept and TNF^{-/-}, ANOVA) (Figure 6A-B). Similar CFU values were observed in liver and spleen of TNF-KLH treated mice and controls groups (PBS, KLH) (Figure 6A-B).

To go further, we investigated histological changes in liver tissue at day 4 post-infection. Analysis of tissue revealed typical and abundant hepatic microabscesses in etanercept and TNF^{-/-} mice (Figure 7B-C). These microabscesses were characterized with diffuse infiltration and necrotic areas (in TNF^{-/-} and etanercept treated mice), whereas liver microabscesses from TNF-KLH, KLH and PBS (Figure 7A-D-E) appeared smaller. Microabscesses surface and number were quantified after image acquisition by a nanozoomer. Hepatic microabscesses of TNF^{-/-} mice presented significantly higher size than other groups, except etanercept (Figure

7F) (* $p < 0.05$, ANOVA). In addition, the number of microabscesses increased significantly in TNF^{-/-} mice (Figure 7G). (** $p < 0.001$ versus PBS; * $p < 0.05$ versus other groups, ANOVA).

Immunohistochemistry of liver sections was performed in order to investigate the cellular composition of microabscesses after 4 days of infection. Analysis of sections revealed an increased accumulation of neutrophil (Ly6G) in TNF^{-/-} and etanercept mice, but not in others groups (TNF-KLH, KLH and PBS) (Supplementary figure 7). Macrophages staining (F4/80) appeared more dispersed and less localized inside microabscesses for etanercept and TNF^{-/-} mice compared to TNF-KLH, KLH and PBS (Supplementary figure 7).

Survival of mice was monitored for 11 days post-infection. All TNF^{-/-} mice died by day 5 and 80% of mice treated with etanercept died by day 6, as expected. By contrast, mice vaccinated with TNF-KLH didn't succumb to infection during this period (Figure 9), showing that unlike etanercept, TNF- α neutralization with TNF-KLH vaccine allowed a control of *Listeria monocytogenes* infection with a clear survival benefit.

Discussion

Here, by using a surrogate of human TNF- α vaccine, we validate the anti-inflammatory effect of a mouse vaccine in an experimental model of rheumatoid arthritis (RA), and show the impact of such therapy on pathogen induced local immune response in two models of infection in TNF vaccinated mice : *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*.

Treatment of RA and inflammatory autoimmune diseases with TNF- α antagonists has proven its efficacy in reducing disease symptoms. However, a major concern is that patients treated with TNF- α blockers have an increased risk of bacterial, viral and fungal serious infections. Tuberculosis is the most common opportunistic infection, and at lesser extend histoplasmosis

and listeriosis (Wallis RS, *Clin Infect Dis*, 2005 ; Hage CA, *Clin Infect Dis*, 2010 ; Peña-Sagredo JL, *Clin Exp Rheumatol*, 2008 ; Che H, *Joint Bone Spine*, 2014). These risks of infection appeared to be dependant of the nature of the TNF- α blockers. Several studies showed that the risk of reactivation of latent tuberculosis following therapy with infliximab and adalimumab mAb is higher than after treatment with recombinant soluble TNF- α receptor etanercept (Wallis RS, *Lancet Infect. Dis*, 2008 ; Harris J, *Clin Exp Immunol*, 2010). The differences in safety profile between both types of treatments may release in part on their TNF- α binding properties. Infliximab forms stable complexes with soluble TNF- α and TNF- α expressed at cell membranes, whereas etanercept interacts with soluble TNF- α and only weakly and reversibly with the transmembrane form (Scallon BJ, *Pharmacol Exp Ther*, 2002). In addition to differential effects on the cytokine, linked to their pharmaceutical properties, TNF- α blockers were found to have a multiple impacts on tuberculosis cellular immunity. IFN- γ -induced maturation of phagosomes containing mycobacteria and induced monocyte apoptosis were altered by infliximab and adalimumab, but not by etanercept (Harris J, *J Infect Dis*, 2008; Shen C, *Aliment Pharmacol Ther*, 2005). TNF- α blockers interfere also with T cell immunity. Some studies have shown that infliximab and adalimumab, but not etanercept, inhibited CD4+T cells activation, IFN- γ production and proliferation (Saliu OY, *J Infect Dis*, 2006; Hamdi H, *Arthritis Res Ther*, 2006). Furthermore, a subset of effector memory CD8+Tcells, specific for *Mycobacterium tuberculosis*, was depleted in patients with RA treated by infliximab. These cells, that expressed transmembrane TNF- α , were susceptible to complement-mediated lysis *in vitro* in the presence of infliximab (Bruns H, *J Clin Invest*, 2009).

Differences in safety profile between TNF- α blockers were also described in mice. Plessner et al., 2007 showed that neutralization of TNF- α with antibody but not with TNF- α receptor fusion molecule exacerbates chronic murine tuberculosis. Of note, in a mice model of

mycobacteria infection, regulatory T cells (Tregs) were found to accumulate in the lung and their depletion resulted in decreased bacterial burdens, suggesting a suppressive role of Treg in tuberculosis immunity (Scott-Browne JP, *J Exp Med*, 2007). TNF- α blockers interfere also with Tregs. In RA patients, infliximab therapy, but not etanercept, restores a FoxP3+ regulatory T-cell subset with more suppressive properties (Ehrenstein MR, *J Exp Med*, 2004; Blache C, *Rheumatology*, 2011). We obtained similar results with a human TNF- α vaccine in the TNF- α transgenic model of arthritis (Biton J, *J Immunol*, 2011).

The development of anti-inflammatory treatments in chronic diseases includes the vaccination against inflammatory cytokines, including anti-TNF- α and anti-IFN- α vaccines. These strategies were largely explored in mice (Spohn G, *J Immunol*, 2007 ; Wan Y, *Cell Immunol*, 2009 ; Lauwerys BR, *Arthritis Rheum*, 2013). Clinical trials in humans were promising in the early phases of development of TNF- α vaccination with TNF vaccine (Durez P, *PLoS One* 2014; ClinicalTrials.gov NCT01040715), although not yet considered as efficient in a larger study with single dose of vaccine (neovacs.fr/products/tnf-kinoid/; ClinicalTrials.gov NCT01911234). Developments are in progress in lupus with IFN- α vaccine. In this context, the persistence of anti-pathogen immunity after anti-TNF- α vaccination is a major issue.

The murine TNF- α vaccine used in the present study is composed of mouse TNF- α linked to KLH carrier protein. This TNF-KLH vaccine induced the production of anti-KLH and anti-TNF- α polyclonal antibodies, and improvement of arthritis in two experimental models : Collagen Induced-Arthritis (CIA) and Collagen Antibody-Induced-Arthritis (CAIA). The protection induced by TNF-KLH vaccination was similar to etanercept.

Using the model of *M. tuberculosis* infection, we showed that vaccination with TNF-KLH didn't increase the sensitivity to the pathogen, while TNF^{-/-} mice would succumb during early phase of infection. It was previously reported that mice treated with a murine homologue of etanercept succumb to *M. tuberculosis* infection (Plessner et al., 2007a). We didn't observe

such effect in our experiment with etanercept. Interestingly in our experiment, direct observation of bacteria after Zielh-Nielsen coloration of tissues highlighted a higher bacteria load in lungs of TNF^{-/-} and etanercept mice than TNF-KLH treated mice.

It is noticeable that dramatic lung inflammation in TNF^{-/-} mice included large granulomas characterized by a many necrotic areas compared to that observed in others groups. Granuloma formation and organization in lungs was not altered with TNF-KLH vaccine in established phase of *M. tuberculosis* infection, by contrast with etanercept. In addition, granulomas observed in the livers of TNF-KLH treated mice were similar to control groups (KLH, PBS). In TNF^{-/-} and etanercept treated mice, liver granulomas were significantly larger.

The protective role of iNOS in infection led us to study its expression during anti- *M. tuberculosis* response. Indeed, mice deficient in iNOS succumbed to tuberculosis infection within 33–45 days and iNOS inhibitors aggravated the course of murine tuberculosis (MacMicking et al., 1997; Flynn et al., 1998). We show here that iNOS was expressed exclusively by macrophages within granulomas during the early phase of infection, and by macrophages and foamy histiocytes during established phase. Strikingly, recruitment of macrophages and neutrophils seemed to be altered by etanercept treatment, since numerous neutrophils and few macrophages were infiltrated at acute phase, whereas at established phase numerous macrophages and foamy histiocytes were infiltrated in lungs. With TNF-KLH treatment, neutrophilic infiltration was rare and few foamy histiocytes were observed during established infection.

The adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* is also mediated by B lymphocytes. Recent study showed that TNF- α secreted by B lymphocytes is of major importance for the aggregate formation (Kondratieva et al., 2014). Our studies show that contrary to etanercept, vaccination with TNF-KLH didn't alter B cell recruitment. At day 56

post-infection, B cells accumulation formed nodules in the lung of all mice groups, except etanercept groups. These data suggested that neutralization of TNF- α with TNF-KLH didn't block the TNF- α secreted locally by B lymphocytes as etanercept. TNF-KLH vaccine allowed cell recruitment in infected tissues, granuloma formation and maintenance during early and established phases of infection.

Results obtained in tuberculosis model were confirmed and reinforced in the *Listeria monocytogenes* infection study. Anti-TNF- α polyclonal antibody production induced by TNF-KLH didn't impair immunity to bacteria and all mice survived, whereas TNF- α neutralization with etanercept resulted in enhanced susceptibility to infection and TNF^{-/-} mice didn't resist to infection. Similarly to immunocompetent mice (PBS and KLH control groups), TNF- α neutralization by TNF-KLH vaccine had no effect on clearance of the bacteria in liver and spleen of infected mice, whereas, etanercept increase bacterial load. Furthermore, the size and number of liver microabscess were similar between TNF-KLH-vaccinated and controls (PBS, KLH) groups at day 4 post-infection. In contrast, TNF^{-/-} mice exhibited increase number and large lesions characterized by necrotic areas. Interestingly, our data showed that immunization with TNF-KLH didn't altered immune cells migration into the liver during *Listeria* infection, whereas etanercept and TNF^{-/-} mice exhibited neutrophils accumulation and reduced macrophages recruitment in lesions.

Although the importance of soluble versus membrane TNF- α has not been investigated in detail in the CIA model, the role of the both forms of TNF- α were well investigated in infections models. Indeed, It has been shown that mice lacking the soluble form of TNF- α but expressing a transmembrane form were able to control *M. tuberculosis* infection, at least during the acute phase (Olleros, M. L. J. Immunol 2002) or during *L. monocytogenes* infection (Torres, D. Am. J. Pathol 2005). These later mice can still form compact granulomas, which prevent bacterial spreading, whereas mice completely lacking TNF- α were severely impaired

in granuloma formation. Expression of a functional transmembrane form of TNF- α also confers partial protection to *L. monocytogenes* infection (Musicki, K *Infect. Immun* 2006; Torres, D. *Am. J. Pathol* 2005), whereas TNF- α or TNF-R1 deficient mice are highly susceptible (Rothe, J., *Nature* 1993).

In summary, we report here that anti-TNF- α active immunotherapy allows the maintenance of host defenses against *M. tuberculosis* and *L. monocytogenes* infection in mice. This is a major point of safety for therapeutic vaccinations in chronic inflammatory diseases. We could speculate that it would be possible to neutralize pathogenic levels of TNF- α efficiently without reaching a minimal level necessary to prevent infections.

Methods

Vaccine design

Murine TNF- α was purchased from PeproTech (315-01A-1000UG, PeproTech France). KLH (keyhole limpet hemocyanin, 77600, Thermo Scientific Pierce), GMBS (N-[g-Maleimidobutyryloxy] Succinimide ester (22309 Pierce) and SATA (N-Succinimidyl S-Acetylthioacetate (26102 Pierce) were purchased from Thermo Scientific Pierce, France. TNF-KLH vaccine results from the chemical coupling of murine TNF- α to the carrier protein KLH. TNF-KLH was prepared as follows : 4mg of murine TNF- α was derivatized with SATA for 2h at room temperature. In parallel, 20mg of KLH was derivatized with GMBS for 30 minutes. For coupling, 1 mole of KLH-GMBS was incubated with 20 moles of TNF-

SATA for 2h at room temperature in presence of hydroxylamide (23225 Thermo Scientific Pierce). The heterocomplexe (TNF-KLH) was dialyzed overnight against PBS by Microcon tube (YM100 Millipore). TNF-KLH was sterilized by centrifugation in a Ultrafree-CL 0.22µm tube (FC40GV 0S Millipore), and then stored at 4°C. Three batches were prepared successively to perform the different experiments. They were validating biochemically by ELISA and western blot. Batches were systematically tested *in vivo* in the CIA model.

Mice

For collagen-induced arthritis (CIA) experiment, 36 DBA/1 male mice (6 weeks old), were purchased from Janvier Laboratory (France). CAIA experiment was conducted with 24 C57Bl/6 male mice (6 weeks old) from the same supplier. Mice were distributed in treatment groups and bred in mixed cages. Body weight was monitored weekly. For *Listeria monocytogenes* (LM) infection study, 40 C57Bl/6 female mice (8 weeks old) were obtained from Janvier Laboratory and 10 TNF- α ^{-/-} mice (TNF^{-/-}, same background) bred in specific pathogen-free animal facility at the National Center for Scientific Research (INEM, Orléans). All mice were kept in sterile confinement in a P2 animal unit. Mice were infected and monitored regularly for clinical status and weighted daily. *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) infection study was conducted with 60 C57Bl/6 female mice (8 weeks old) obtained from Janvier Laboratory and 7 TNF^{-/-} mice (INEM, Orléans). Mice were distributed in treatment groups and bred in mixed cages (excepted for naïve uninfected mice). Body weight was monitored weekly.

Culture of Mycobacterium tuberculosis and Listeria monocytogenes

Mycobacterium tuberculosis (H37Rv strain) and *Listeria monocytogenes* (wild-type L028) were provided by the National Center for Scientific Research (INEM, Orleans). *Listeria* was grown in BHI medium (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories).

Models of arthritis

Collagen-induced arthritis (CIA) was induced in DBA/1 mice by using a 1:1 emulsion of bovine type II collagen (CIIB, 50µg/mice) and Complete Freund Adjuvant (CFA, Difco, France) on day 0 (total volume injected in the tail: 100µl). A boost was given on day 21 by using 100µl of a 1:1 emulsion of CIIB (50µg/mice) and Incomplete Freund Adjuvant (IFA, Difco, France). Arthritis onset occurs around 30-35 days after the first collagen injection (Ratsimandresy R. et al., *Vaccine* 2011).

Collagen antibody-induced arthritis (CAIA) was induced in C57Bl/6 mice, that received an intraperitoneal injection of 5mg / mice of a cocktail of five monoclonal anti-collagen antibodies on day 0 (53100 Arthrogen-CIA® Arthritogenic Monoclonal Antibody, Gentaur, Belgium) and an intraperitoneal injection of LPS (50µg, *E. coli* 0111:B4 strain) on day 3. Arthritis onset occurs around 3-4 days after anti-collagen antibodies injection and peak around day 7-10 (Hutamekalin P et al., *J Immunol Methods*. 2009).

Clinical signs of arthritis were blindly evaluated three times per week. The arthritis of mice monitored in four paws. For each mouse, the clinical severity of arthritis was scored (0, normal; 1, erythema; 2, swelling; 3, deformity; and 4, ankylosis) in 10 joints or group of joints: three joints of the two hind limbs (toes, tarsus, ankle) and two joints of the two forelimbs (digits, wrist). The maximum score reached for each of the 10 joints was 4, so the individual maximum arthritis clinical score on a given day was 40 (Semerano et al.,

Angiogenesis 2016). The mean arthritic score on each days of clinical observation was calculated for each group of treatment.

For histological analysis, both left hind limbs of each mouse were collected, fixed, decalcified, dehydrated and transferred in paraffin blocks. Slides of 7 μ m thickness were stained with haematoxylin and eosin before microscopic observation (optical microscope). At least ten fields per section were blindly evaluated. In each joint, two parameters were separately assessed using a four-point scale (0–3, where 0 indicated a normal joint and 3 maximally severe arthritis). The first parameter was inflammation as reflected by synovial membrane thickness (synovial proliferation) and inflammatory cells infiltration. Inflammation was scored as follows: 0: no synovial proliferation and no inflammatory cells infiltration; 1: limited or absent synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating $\leq 5\%$ of synovial membrane; 2: synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating between 5 and 50% of synovial membrane; 3: massive synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating $>50\%$ of synovial membrane. The second parameter was joint destruction (bone erosions, cartilage thickness, and cartilage unevenness). Joint destruction was quantified as follows: 0: no bone erosions, smooth cartilage surface with conserved thickness; 1: presence of cartilage erosion or unevenness, or thinning involving $\leq 50\%$ of cartilage surface with absent or single bone erosion; 2: multiple cartilage erosions or cartilage thinning involving $>50\%$ of cartilage surface, and/or >1 bone erosions involving $\leq 50\%$ of articular surface; 3: complete derangement of articular structure. For prevalence determinations, histological inflammation or destruction was defined as an inflammation or destruction score ≥ 0.5 (Semerano et al., *Angiogenesis* 2016).

For clinical and histological evaluation of arthritis, blinding was ensured by a random distribution of treatments inside cages, limited by the need to have each treatment group represented, and by the use of tables including only cages and mice numbers.

Anti-TNF immunization in collagen-induced arthritis model

Immunizations were performed with the anti-mouse TNF- α vaccine (TNF-KLH) emulsified in IFA. DBA/1 mice (n=6) were immunized with different doses of TNF-KLH (20 μ g, 10 μ g or 5 μ g) on intramuscular injections at days -21, -7, 7. In the same experiment, one group of mice (n=6) treated three times per week with 30mg/kg of etanercept (PAA0252P1, Pfizer) from day 22. As negative controls, mice received intraperitoneal injection of PBS or intramuscular injections of KLH (10 μ g) emulsified in IFA. KLH and PBS were administered on the same time schedule as TNF-KLH or etanercept respectively.

Anti-TNF- α immunization in *Mycobacterium tuberculosis* infection model

The *Mycobacterium tuberculosis* infection study was performed at the National Center for Scientific Research (INEM, Orleans). Before infection, immunized mice (n=10) received four TNF-KLH intramuscular injections (10 μ g) at days -44, -31, -17 and -4. One group of mice (n=10) received intraperitoneal injections of etanercept (30mg /kg) twice a week from days -4 to day 52. Controls groups were untreated (naïve mice, n=10 mice), treated with KLH (n=10 mice) or received intraperitoneal injections of PBS (n=10 mice). Except naïve mice, all C57Bl/6 and TNF^{-/-} mice (n=7) were infected on day 0 by delivering 10⁴ CFU/lung *M. tuberculosis* (H37Rv strain) into the nasal cavities under ketamine-xylazine anaesthesia. On day 25 post-infection for all TNF^{-/-} mice or day 28 for other groups, 5 animals were euthanized, lung, livers and spleens were harvested and the number of viable bacteria in organ

homogenates was determined by plating serial dilutions in duplicates onto Middlebrook 7H11 (Difco) agar plates containing 10% OADC and incubated at 37 °C. Colonies were enumerated at 3 weeks and results are expressed as log₁₀ CFU per organ. Similar analyses were performed at day 56 with the remaining mice.

Anti-TNF immunization in *Listeria monocytogenes* infection model

The *L. monocytogenes* infection study was performed at the same place with similar vaccination and infection schedule. One group of mice (n=9) received intraperitoneal injections of etanercept (30mg /kg) at days -4, -2, 0 and 3. Controls groups were treated with KLH (n=9 mice) or PBS (n=10 mice) on the same time schedule as TNF-KLH or etanercept respectively. All groups and TNF-/- mice (n=10) were infected on day 0 by intraperitoneal injection of 10⁴ CFU *L. monocytogenes* (LO28 strain). On day 4 post-infection, 4 mice /group were euthanized, then livers and spleens were harvested and the number of viable bacteria in organ homogenates was determined by plating serial dilutions on trypticase soy broth agar plates (Biovalley) and incubating overnight at 37°C, followed by counting CFU. Moreover, the survival during infection was evaluated until day 11 (n=5-6 mice/group of treatment).

ELISA anti-KLH and anti-TNF antibodies

For each experiment, blood samples were collected at different time points in accordance with the duration of experiments : 19 and 41 days after the third TNF-KLH immunization in *CIA* study; 7 days after the third and fourth TNF-KLH immunization in *Listeria* study ; 7 days after the third and 32 days after the fourth TNF-KLH immunization in *Mycobacterium* study. Serums were obtained and tested for anti-KLH and anti-TNF- α antibody production. Specific anti-mTNF- α and anti-KLH antibodies titers were determined using direct ELISA. Precoated ELISA plates with 50 ng per well mTNF- α (Péprotech) or KLH (Sigma) were incubated with

serial dilutions of sera from immunized and control mice. Specific antibodies were detected by using phosphatase alkaline conjugated rabbit anti-mouse IgG (IgG-PA) (Sigma-Aldrich A1902). Substrate PNP (Sigma-Aldrich) was added for 40 minutes. The optical density (OD) was measured at 405 nm.

Tissue preparation for histochemical and immunohistochemical analysis

In Mycobacterium experiment, lungs and livers collected after euthanasia on days 25-28 and 56, were fixed in 4% buffered formalin. Tissues were dehydrated in ethanol and embedded in paraffin for the histology studies. Sections of 4µm were cut and transferred in glass slides. Hematoxylin and eosin (H&E) stained sections were observed by light microscopy at x400 magnification with a Zeiss Observer D1 microscope equipped with a motorized stage connected to Histolab and Archimed softwares (Microvision, Les Ulis, France). Quantification of the number and size of granuloma were assessed by using Archimed.

For immunohistological analysis, lung and liver sections were fixed in acetone-ethanol (5 minutes), and endogenous peroxidase activity was blocked using PBS with 3% H₂O₂. Endogenous biotin in the liver was blocked using avidin-biotin Kit (Vector Laboratories, SP-2001). The tissue sections were incubated 2h at room temperature or overnight at 4°C with the primary antibody CD45R (AbD Serotec, MC1258G) or iNOS (Abcam, 15323). The sections were then incubated for 30 minutes at 37°C with the appropriate biotinylated secondary antibody. Avidine biotin peroxidase complexes were added to the sections for 30 minutes (ABC Vector kit; Vector Laboratories, PK-6100), after the sections were incubated with diaminobenzidine substrate (Imm PACT™ DAB, Vector: SK-4105, biovalley). After rinsing in water, the sections were counterstained with hematoxylin before mounting and immunohistological analysis were performed with a Zeiss Observer D1 microscope as described above.

In *Listeria* experiment, four mice per group were euthanized at day 4 post-infection. Livers were treated as described above. H&E stained sections were observed by light microscopy and images were obtained by nanozoomer. The number and size of microabscesses were assessed by using the NDPview software (Hamamatsu, Japan). Immunohistological analysis of the livers, for macrophages (F4/80, AbD Serotec, MCA497GA) and neutrophils (Ly6G, Abcam, 25377) infiltrations, were performed as described for CD45R and iNOS staining.

Statistical analysis

In arthritis studies, serial measurements of clinical scores were analyzed considering the area under the curve (AUC) for each subject as a summary measure; these measures were then analyzed as raw data for inter-group comparison (ANOVA). Difference in arthritis onset was calculated with ANOVA. Post-test comparisons were performed according to data distribution (Student-Newman-Keuls).

In *Listeria* studies, statistical evaluation of survival data was determined by Kaplan-Meier (log rank test) and bacterial burden data were analyzed using a one-way ANOVA with Newman-Keuls post test.

Study approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. For experiments in arthritis models, all procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Paris 13 (ethical approval ID: Ce5/2010/036).

Author contributions

NB carried out mice immunization, evaluation of clinical arthritis, carried out immunoassay, Listeria infection, immuno-histological analysis and helped to draft the manuscript. LS performed statistical analysis, drafted and revised the manuscript. NS carried out Mycobacteria infection, bacterial burden and organ weight evaluations. DD participated in the pathological analysis, analysis of the data and help to draft the manuscript. PD participated in the coordination of the study and helped to draft the manuscript. BR and VQ conceived a part of Listeria and Mycobacteria infection study, participated in the coordination and analysis of the data, and helped to draft the manuscript. MCB conceived of the study, analysis of the data and helped to draft the manuscript. EA conceived of the study, carried out coupling of TNF vaccine, participated in the coordination of the study, analysis of the data and drafted the manuscript.

Acknowledgments

Pathophysiology, targets and therapies of rheumatoid arthritis laboratory received grants from University of Paris 13 (BQR), Agence Nationale de la Recherche (ANR CYTOVAC project), Inserm (ProA), Direction Générale de l'Armement, Société Française de Rhumatologie and Pfizer (Passerelle). We thank Sonia Varela (animal facilities, Paris 13 University), Béatrice Marmey, Delphine Lemeiter and Roxane Hervé for their technical contributions. We thank also Matthieu Ribon, Julie Mussard and Marjorie Bénétteau de la Prairie for their help in the project.

References

1. Winsauer C, Kruglov AA, Chashchina AA, Drutskaya MS, Nedospasov SA. Cellular sources of pathogenic and protective TNF and experimental strategies based on utilization of TNF humanized mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 25(2):115-23.
2. Singh JA, Christensen R, Wells GA, Suarez-Almazor ME, Buchbinder R, Lopez-Olivo MA, Ghogomu ET, Tugwell P. A network meta-analysis of randomized controlled trials of biologics for rheumatoid arthritis: a Cochrane overview. *CMAJ.* 2009; 181(11):787-96.
3. Wallis RS. Infectious complications of tumor necrosis factor blockade. *Curr Opin Infect Dis.* 2009; 22(4):403-9.
4. Le Buanec H, Delavallée L, Bessis N, Paturance S, Bizzini B, Gallo R, Zagury D, Boissier MC. TNFalpha kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNFalpha protect mice from autologous TNFalpha-driven chronic and acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(51):19442-7.
5. Delavallée L, Le Buanec H, Bessis N, Assier E, Denys A, Bizzini B, Zagury D, Boissier MC. Early and long-lasting protection from arthritis in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) transgenic mice vaccinated against TNFalpha. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(9):1332-8.
6. Assier E, Semerano L, Duvallet E, Delavallée L, Bernier E, Laborie M, Grouard-Vogel G, Larcier P, Bessis N, Boissier MC. Modulation of anti-tumor necrosis factor alpha (TNF- α) antibody secretion in mice immunized with TNF- α kinoid. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(5):699-703.

7. Semerano L, Biton J, Delavallée L, Duvallet E, Assier E, Bessis N, Bernier E, Dhellin O, Grouard-Vogel G, Boissier MC. Protection from articular damage by passive or active anti-tumour necrosis factor (TNF)- α immunotherapy in human TNF- α transgenic mice depends on anti-TNF- α antibody levels. *Clin Exp Immunol*. 2013; 172(1):54-62.
8. Delavallée L, Semerano L, Assier E, Vogel G, Vuagniaux G, Laborie M, Zagury D, Bessis N, Boissier MC. Active immunization to tumor necrosis factor-alpha is effective in treating chronic established inflammatory disease: a long-term study in a transgenic model of arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11(6):R195.
9. Durez P, Vandepapeliere P, Miranda P, Toncheva A, Berman A, Kehler T, Mociran E, Fautrel B, Mariette X, Dhellin O, Fanget B, Ouary S, Grouard-Vogel G, Boissier MC. Therapeutic vaccination with TNF-Kinoid in TNF antagonist-resistant rheumatoid arthritis: a phase II randomized, controlled clinical trial. *PLoS One*. 2014; 9(12):e113465.
10. Wallis RS, Broder M, Wong J, Lee A, Hoq L. Reactivation of latent granulomatous infections by infliximab. *Clin. Infect. Dis*. 2005;41 Suppl 3:S194-8.
11. Hage CA, Bowyer S, Tarvin SE, Helper D, Kleiman MB, Wheat LJ. Recognition, diagnosis, and treatment of histoplasmosis complicating tumor necrosis factor blocker therapy. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(1):85-92.
12. Peña-Sagredo JL, Hernández MV, Fernandez-Llanio N, Giménez-Ubeda E, Muñoz-Fernandez S, Ortiz A, Gonzalez-Gay MA, Fariñas MC; Biobadaser group. Listeria monocytogenes infection in patients with rheumatic diseases on TNF-alpha antagonist therapy: the Spanish Study Group experience. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26(5):854-9.

13. Che H, Lukas C, Morel J, Combe B. Risk of herpes/herpes zoster during anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis. Systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2014; 81(3):215-21.
14. Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8(10):601-11.
15. Harris J, Keane J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol*. 2010; 161(1):1-9.
16. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 301(2):418-26.
17. Harris J, Hope JC, Keane J. Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2008; 198(12):1842-50.
18. Shen C, Assche GV, Colpaert S, Maerten P, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005; 21(3):251-8.
19. Saliu OY, Sofer C, Stein DS, Schwander SK, Wallis RS. Tumor-necrosis-factor blockers: differential effects on mycobacterial immunity. *J Infect Dis*. 2006; 194(4):486-92.
20. Hamdi H, Mariette X, Godot V, Weldingh K, Hamid AM, Prejean MV, Baron G, Lemann M, Puechal X, Breban M, Berenbaum F, Delchier JC, Flipo RM, Dautzenberg B, Salmon D, Humbert M, Emilie D; RATIO (Recherche sur Anti-TNF et Infections Opportunistes) Study Group. Inhibition of anti-tuberculosis T-lymphocyte function with tumour necrosis factor antagonists. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8(4):R114.

21. Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8⁺ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *J Clin Invest.* 2009; 119(5):1167-77
22. Plessner HL, Lin PL, Kohno T, Louie JS, Kirschner D, Chan J, Flynn JL. Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) by antibody but not TNF receptor fusion molecule exacerbates chronic murine tuberculosis. *J Infect Dis.* 2007; 195(11):1643-50.
23. Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med.* 2007; 204(9):2159-69.
24. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J Exp Med.* 2004; 200(3):277-85.
25. Blache C, Lequerré T, Roucheux A, Beutheu S, Dedreux I, Jacquot S, Le Loët X, Boyer O, Vittecoq O. Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. *Rheumatology (Oxford).* 2011; 50(10):1814-22.
26. Biton J, Semerano L, Delavallée L, Lemeiter D, Laborie M, Grouard-Vogel G, Boissier MC, Bessis N. Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol.* 2011; 186(7):3899-910.
27. Spohn G, Guler R, Johansen P, Keller I, Jacobs M, Beck M, Rohner F, Bauer M, Dietmeier K, Kündig TM, Jennings GT, Brombacher F, Bachmann MF. A virus-like particle-based vaccine selectively targeting soluble TNF- α protects from

- arthritis without inducing reactivation of latent tuberculosis. *J Immunol.* 2007; 178(11):7450-7.
28. Wan Y, Yuan S, Xue X, Li M, Qin X, Zhang C, Wang W, Jiang C, Wu S, Liu Y, Zhu W, Ran Y, Zhang Z, Han W, Zhang Y. The preventive effect of adjuvant-free administration of TNF-PADRE autovaccine on collagen-II-induced rheumatoid arthritis in mice. *Cell Immunol.* 2009; 258(1):72-7.
 29. Lauwerys BR, Hachulla E, Spertini F, Lazaro E, Jorgensen C, Mariette X, Haelterman E, Grouard-Vogel G, Fanget B, Dhellin O, Vandepapelière P, Houssiau FA. Down-regulation of interferon signature in systemic lupus erythematosus patients by active immunization with interferon α -kinoid. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(2):447-56.
 30. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(10):5243-8.
 31. Flynn JL, Scanga CA, Tanaka KE, Chan J. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J Immunol.* 1998; 160(4):1796-803.
 32. Kondratieva TK, Linge IA, Kondratieva EV, Dyatlov AV, Drutskaya MS, Zvartsev RV, Nedospasov SA, Apt AS. Formation of compact aggregates of B-lymphocytes in lung tissue during mycobacterial infection in mice depends on TNF production by these cells and is not an element of the host's immunological protection. *Biochemistry (Mosc).* 2014; 79(12):1358-62.
 33. Olleros ML, Guler R, Corazza N, Vesin D, Eugster HP, Marchal G, Chavarot P, Mueller C, Garcia I. Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin

- infection in the absence of secreted TNF and lymphotoxin-alpha. *J Immunol.* 2002; 168(7):3394-401.
34. Torres D, Janot L, Quesniaux VF, Grivennikov SI, Maillet I, Sedgwick JD, Ryffel B, Erard F. Membrane tumor necrosis factor confers partial protection to *Listeria* infection. *Am J Pathol.* 2005; 167(6):1677-87.
 35. Musicki K, Briscoe H, Tran S, Britton WJ, Saunders BM. Differential requirements for soluble and transmembrane tumor necrosis factor in the immunological control of primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun.* 2006; 74(6):3180-9.
 36. Rothe J, Lesslauer W, Lötscher H, Lang Y, Koebel P, Köntgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 1993; 364(6440):798-802.
 37. Ratsimandresy RA, Duvallet E, Assier E, Semerano L, Delavallée L, Bessis N, Zagury JF, Boissier MC. Active immunization against IL-23p19 improves experimental arthritis. *Vaccine.* 2011; 29(50):9329-36.
 38. Hutamekalin P, Saito T, Yamaki K, Mizutani N, Brand DD, Waritani T, Terato K, Yoshino S. Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic 5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies. *J Immunol Methods.* 2009; 343(1):49-55.
 39. Semerano L, Duvallet E, Belmellat N, Marival N, Schall N, Monteil M, Grouard-Vogel G, Bernier E, Lecouvey M, Hlawaty H, Muller S, Boissier MC, Assier E. Targeting VEGF-A with a vaccine decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *Angiogenesis.* 2016; 19(1):39-

Figures and figures legends

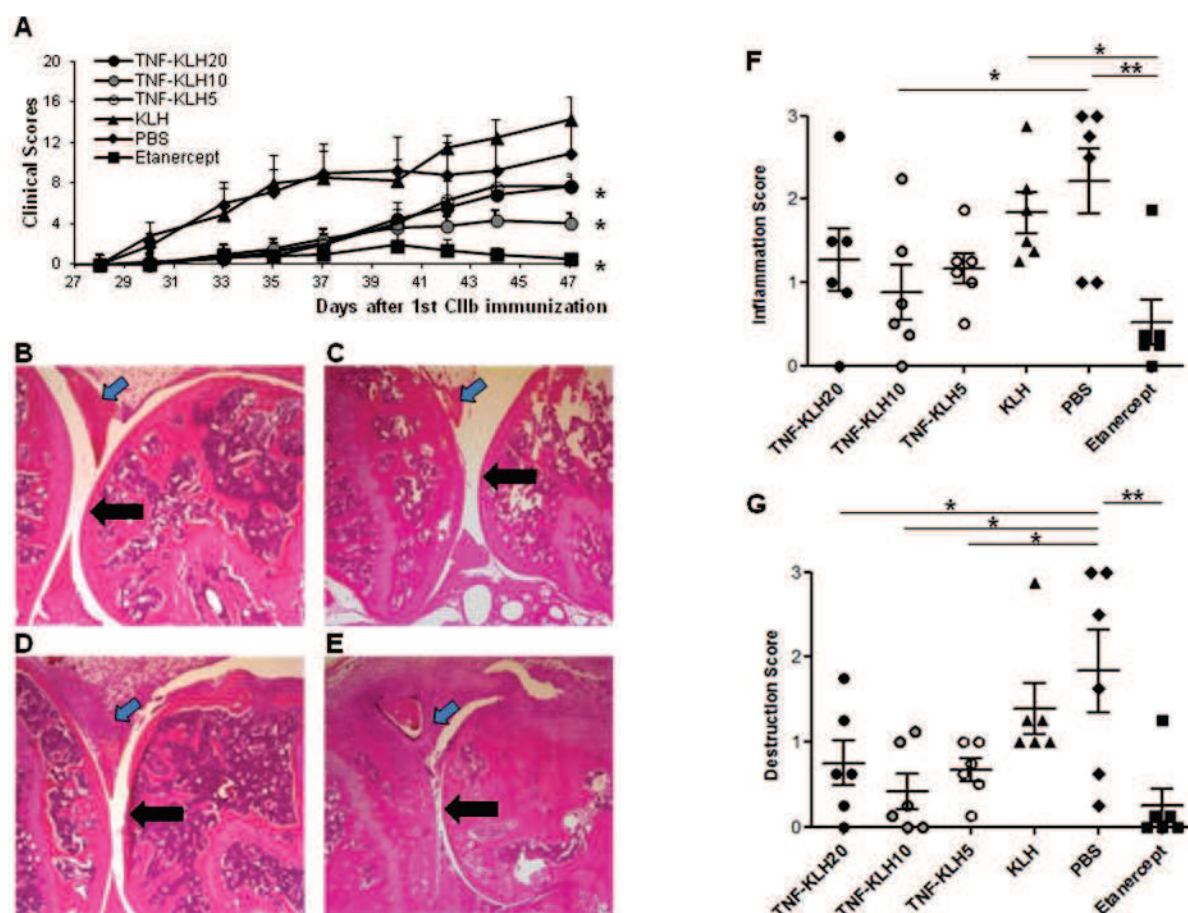


Figure 1: TNF-KLH vaccination protects mice from clinical and histological arthritis.

DBA/1 mice were immunized three times with KLH or with different doses of TNF-KLH (20 μ g, 10 μ g, 5 μ g) at days -21, -7, 7. Collagen-Induced Arthritis (CIA) were induced by two injections of CIIb (day 0 and 21). Treatment with etanercept (30mg/kg, two times/week) or PBS began from day 22. Clinical arthritis was measured using the sum of arthritis scores (0–4) from four paws (Mean, SEM, n =6/group). (A) Treatment with different doses of TNF-KLH or etanercept resulted in significantly lower clinical scores vs controls groups (KLH and PBS). The asterisk indicated a statistically significant difference in clinical scores between treatment groups on the whole duration of the experiments. The differences were calculated with ANOVA, with the area under the curve (AUC) of the clinical scores for each animal as raw value. *: p <0.05 vs. both PBS and KLH. There were no significant differences between

TNF-KLH and etanercept groups. **(B-E)** Histological sections representative of the mean histological score of TNF-KLH and KLH groups. **(B):** TNF-KLH20, **C:** TNF-KLH10, **D:** TNF-KLH5, **E:** KLH). Compared to control KLH group, immunizations with different doses of vaccine resulted in low or absent inflammatory synovitis (blue arrow) and preserved articular surface (black arrow). Conversely, in KLH-treated control mice inflammatory synovitis (blue arrow) and cartilage erosion (black arrow) can be seen. **(F)** Immunization with TNF-KLH10 resulted in lower histological inflammation vs PBS control group. The three doses of TNF-KLH reduced histological destruction in joint tissue compared to PBS group **(G)**. As expected, treatment with etanercept reduced inflammation and destruction **(F- G)**. * $p < 0.05$ for TNF-KLH and ** $p < 0.01$ for etanercept vs PBS (Newman-Keuls test with subsequent *post hoc* comparisons). CIA inhibition with TNF-KLH vaccination was observed in three independent experiments.

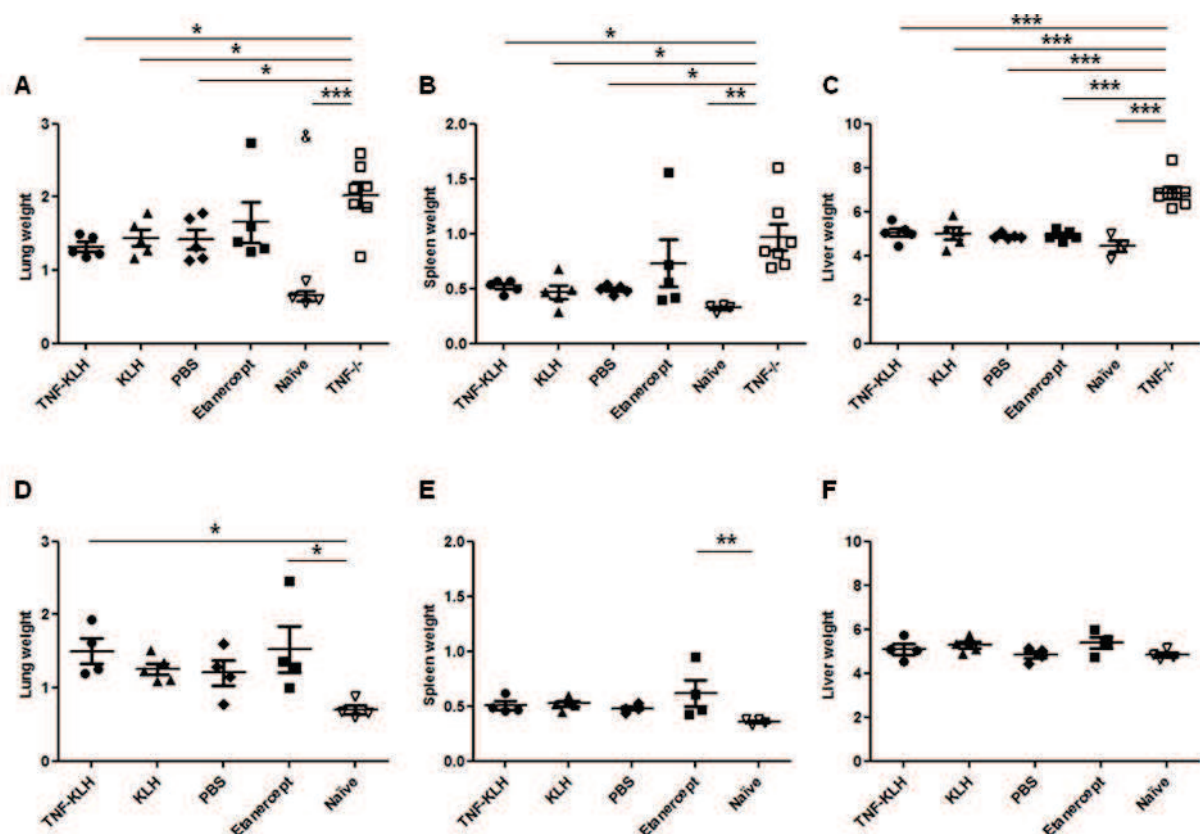


Figure 2: Organ weights during early and established phase of *M. tuberculosis* infection.

C57Bl/6 mice were immunized with KLH (n=10) or with 10 μ g of TNF-KLH vaccine (n=10) at days -44, -31, -17 and -4. One group of mice received 30mg/kg of etanercept (n=10) twice a week from day-4 to day 52. Excepted naïves (n=5), all treated mice and TNF^{-/-} mice (n=7) were infected intranasally with 10⁴ CFU of *Mycobacterium tuberculosis* at day 0. Five mice per treatment (day 28) and all TNF^{-/-} mice (day 25) were euthanized and lung, spleen and liver were weighted. The survival was monitored until day 56 (4-5 mice/group) and organs were weighted at euthanasia. Relative organ weights were calculated as the ratio of absolute organ weights to body weights. The asterisk indicated a statistically significant difference between groups. At early phase of infection, lung (A) and spleen (B) weights from TNF^{-/-} mice were higher than all groups, excepted etanercept (* p<0.05 vs TNF-KLH, KLH, PBS and *** p<0.001 vs Naïve mice; Newman-Keuls test with subsequent *post hoc* comparisons). Spleen

(B) and liver (C) weights were similar between treatments and Naïve mice, contrary to the lung (A); $^{\&}$ $p < 0.05$ Naïve vs TNF-KLH, KLH, PBS and etanercept). Organ weights of TNF-KLH treated mice were similar to PBS and KLH control groups (A-B-C). At established phase of infection, lung (D) and spleen (E) weights of etanercept mice were higher than Naïve mice (* $p < 0.05$ vs Naïve mice). Lung weights of TNF-KLH treated mice were also higher than Naïve mice (* $p < 0.05$ vs Naïve mice). No differences were observed for liver weights (F) between groups.

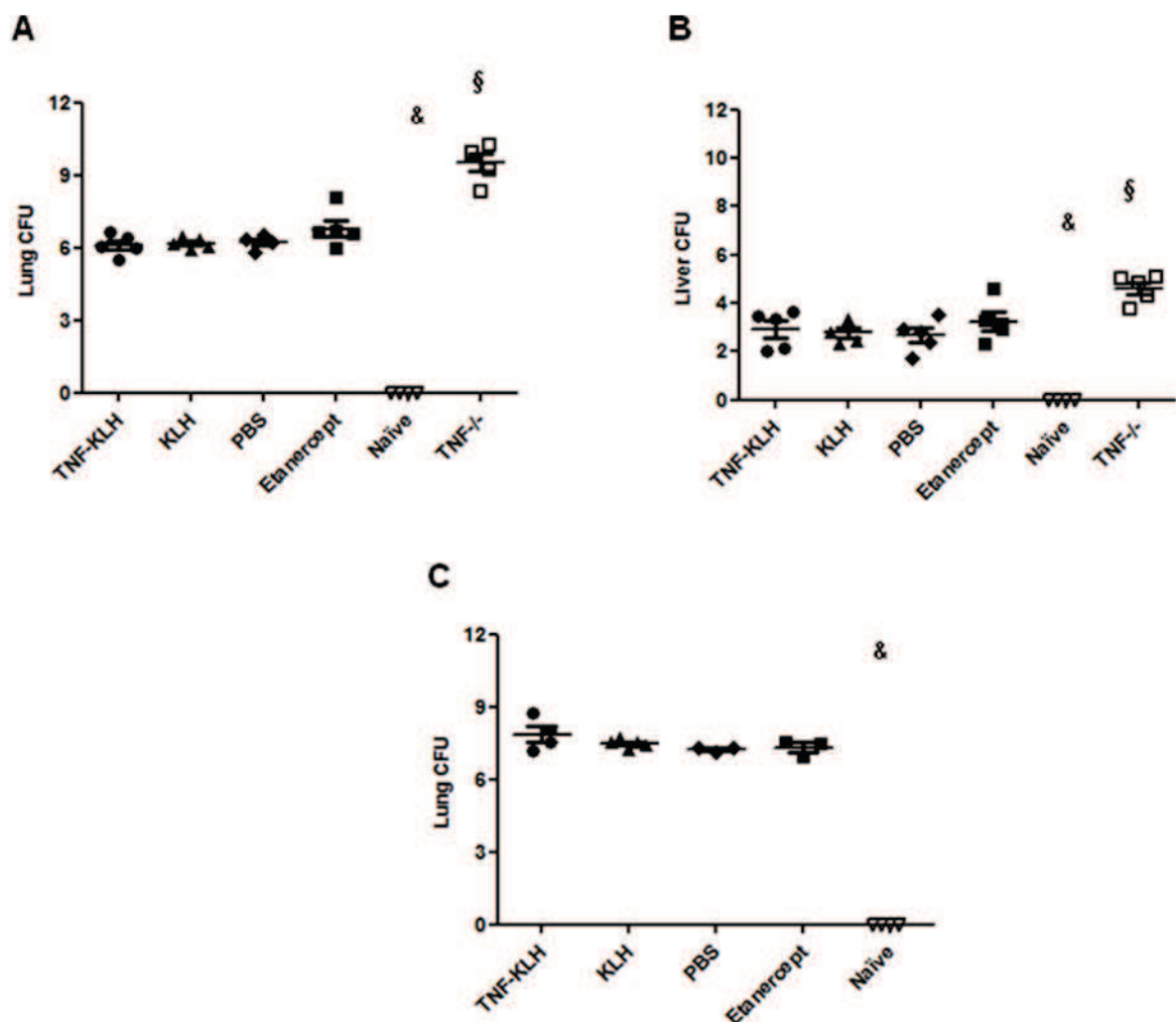


Figure 3: TNF-KLH vaccination doesn't increase bacterial loads in lungs and livers of *M. tuberculosis* infected mice. Vaccination schedule was described above. At early and

established phase of infection, a part of lungs and liver were weighted and used after lysis for bacterial culture and Colony Forming Unit (CFU) evaluation. Results were expressed as Log(10) of CFU count for whole organs. At early phase of infection, TNF-/- mice showed higher CFU in lung (A) and liver (B) than the other groups (§ $p < 0.001$ TNF-/- vs all groups; Newman-Keuls test with subsequent *post hoc* comparisons). As expected, no CFU could be detected with Naïve mice (A-C; & $p < 0.001$ TNF-/- vs all infected mice). CFU numbers in organs of TNF-KLH treated mice were similar to PBS, KLH and etanercept groups at early (A-B) and established (C) phase of infection.

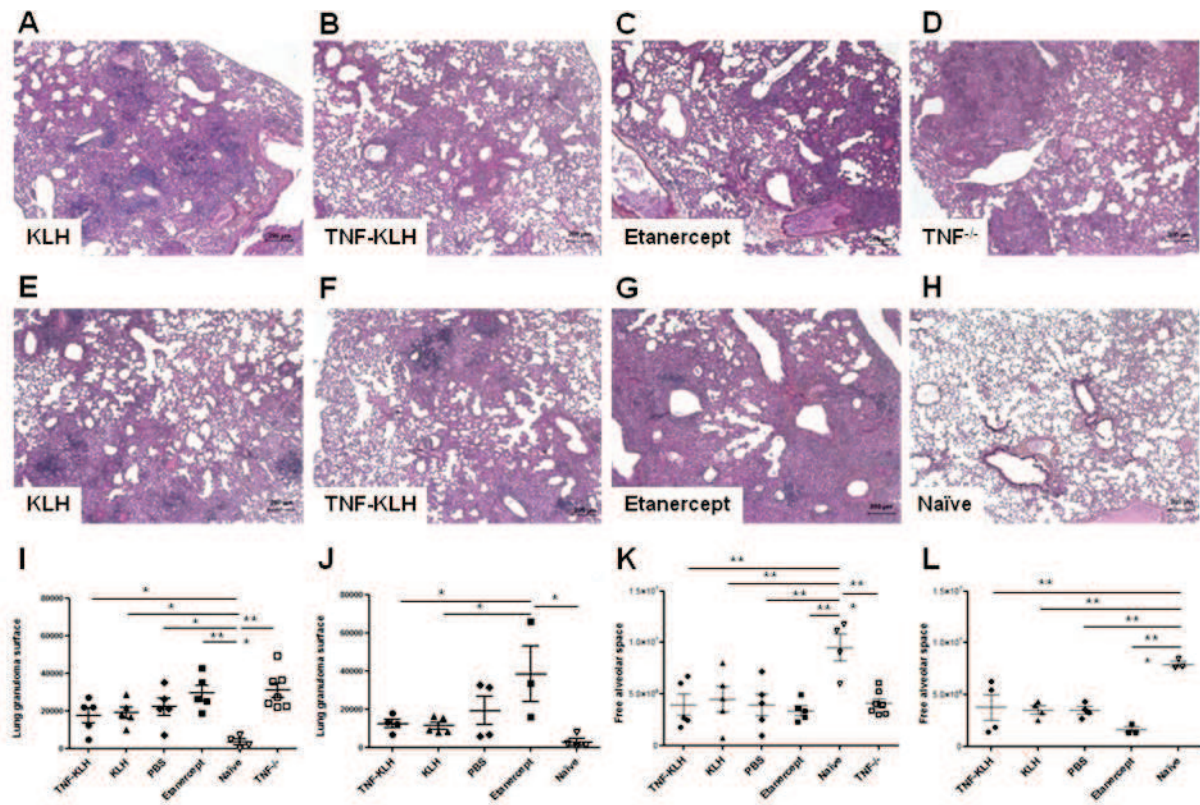


Figure 4: Limited effects of TNF-KLH vaccination on lung granuloma formation during *M. tuberculosis* infection. Granulomas were assessed at early (A-D) and established (E-H) phases of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. 4µm lung sections were stained with hematoxylin-eosin as described in materials and methods ($n = 3-7$ per group). Lungs of TNF-KLH mice (B, F) presented similar granulomas (black arrow) than KLH mice (A, E), whereas

etanercept at established phase (G) and TNF^{-/-} mice at early phase of infection (D) were characterized by larger granulomas. Quantification of lung granuloma surfaces at early (I) and established phase of infection (J) confirmed these observations. Lungs of TNF-KLH mice presented smaller granulomas (J) compared to etanercept and TNF^{-/-} mice (I). (* p<0.05, ** p<0.01, ANOVA).

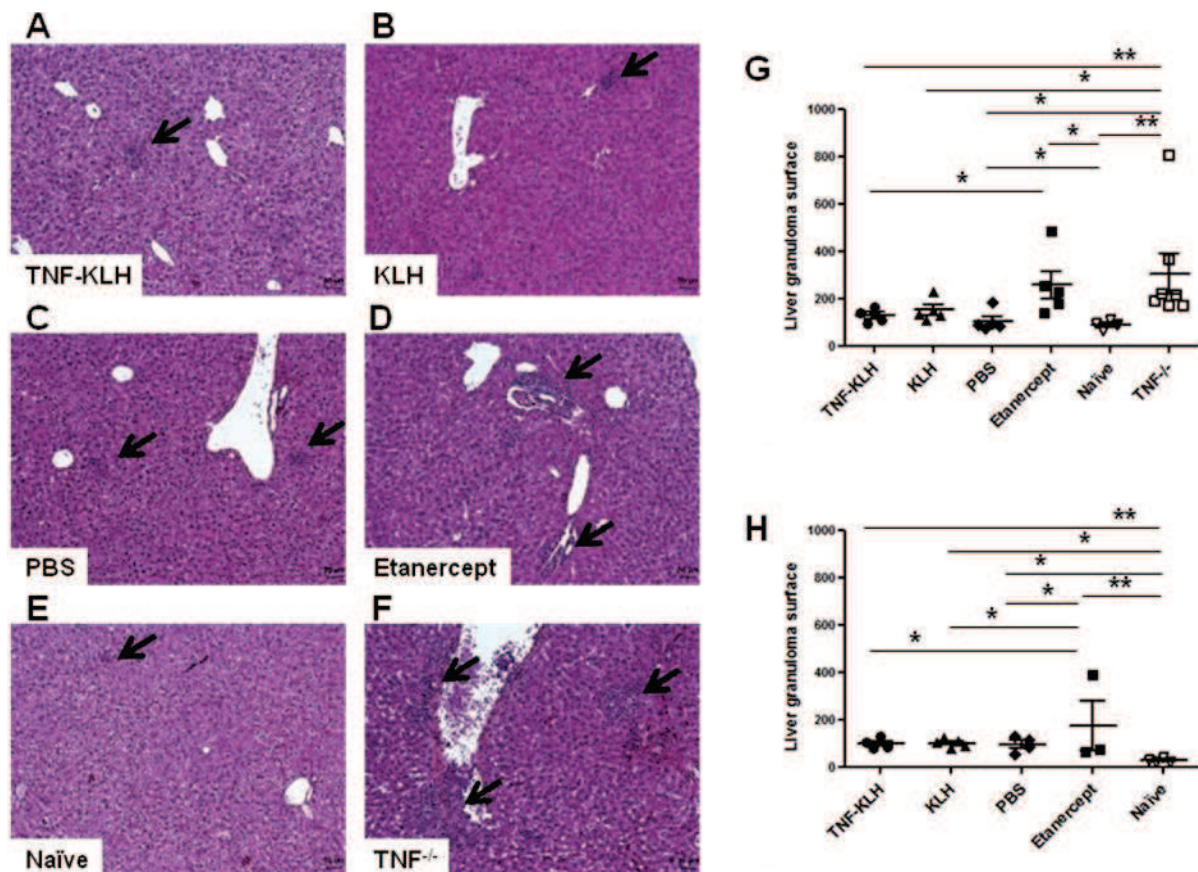


Figure 5: TNF-KLH vaccination doesn't induce larger granuloma formation in liver of *M. tuberculosis* infected mice. Histological analysis of liver was assessed on liver sections stained with hematoxylin-eosin as described in materials and methods ($n = 3-7$ per group). At early phase of infection (A-F), livers of TNF-KLH mice (A) presented similar granulomas (black arrow) than KLH (B) and PBS (C) treated mice, whereas etanercept (D) and TNF^{-/-}

mice (F) were characterized by larger granulomas. Quantification of hepatic granuloma surfaces at early phase (G) and established phase of infection (H) confirmed these observations. Livers of TNF-KLH mice presented smaller granulomas compared to etanercept (G-H) and TNF^{-/-} mice (G). (* p<0.05, ** p<0.01, ANOVA).

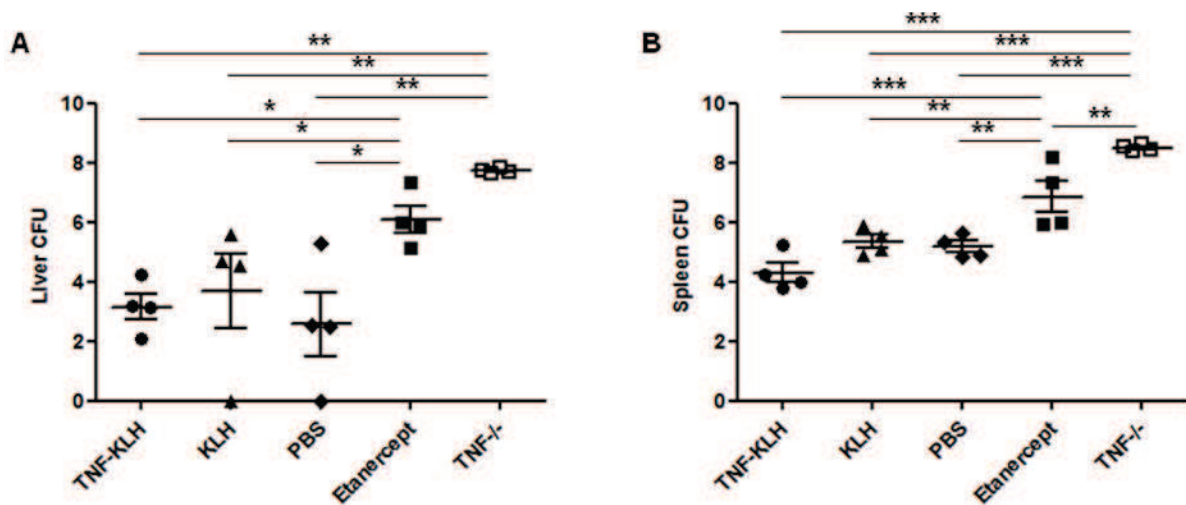


Figure 6: TNF-KLH vaccination doesn't increase bacterial load in liver and spleen during *Listeria monocytogenes* infection. Mice (n=10 per group) were treated with TNF-KLH or KLH at days (-44,-31, -17, -4) or given PBS or 30mg/kg of etanercept (days -4, -2, 0 and 3). TNF^{-/-} mice were used as genetic control. All mice were infected with 10⁴ CFU of *Listeria* at day 0. 4 days after infection, 4 mice per group were euthanized and Colony Forming Units (CFU) were evaluated in liver (A) and spleen (B) as described in materials and methods. In both organs, TNF-KLH, PBS and KLH treated mice presented lower CFU than etanercept and TNF^{-/-} mice. * p<0.05; ** p<0.01, *** p<0.001, ANOVA.

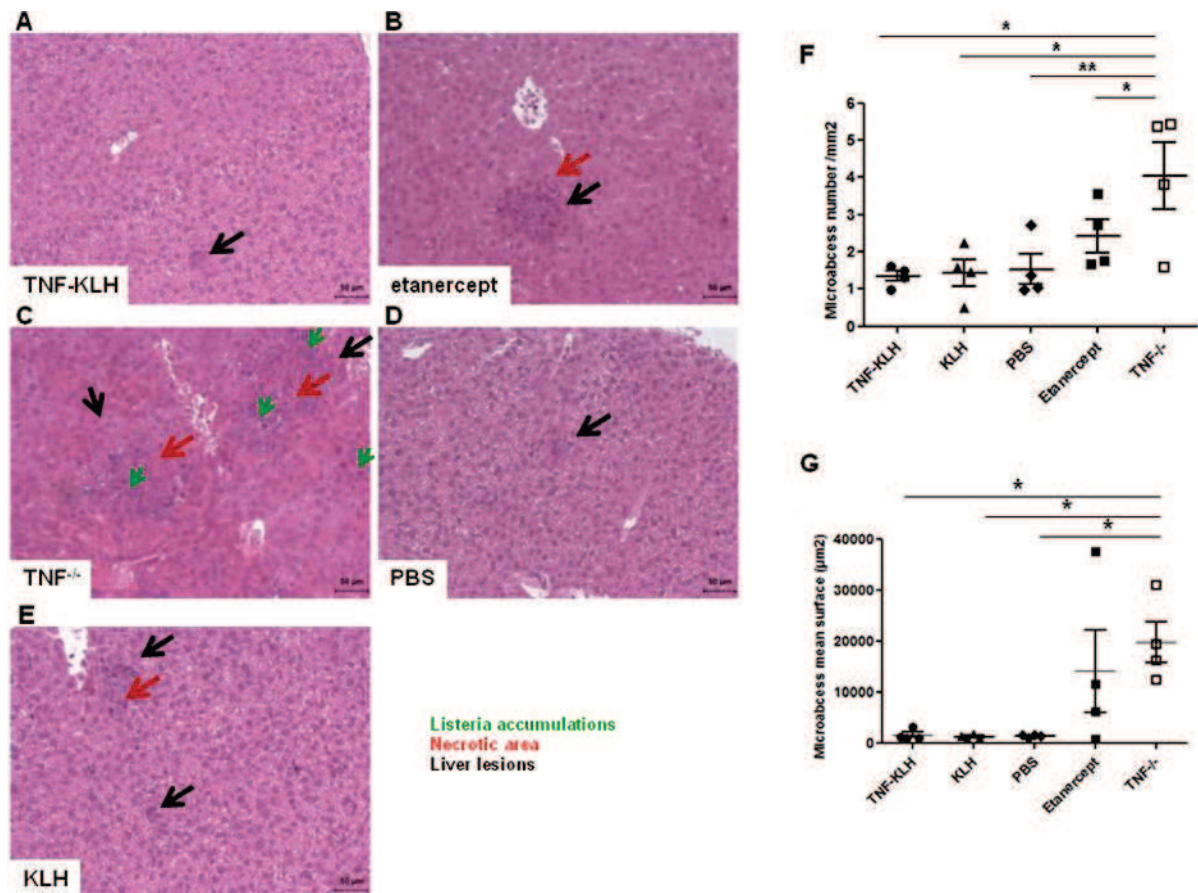


Figure 7: TNF-KLH vaccination doesn't increase number and size of liver lesions during *Listeria monocytogenes* infection. Liver lesions were studied 4 days after infection with *Listeria* after staining of sections with hematoxylin-eosin as described in materials and methods. Upon observation of liver sections (A-E), an increase of size and number of lesions (black arrow), with necrotic areas (red arrow) were noticed with etanercept (B) and TNF^{-/-} mice (C). Listeria accumulation (green arrow) was observed in TNF^{-/-} mice. Liver of TNF-KLH mice (A) presented similar aspects than PBS (D) and KLH (E) treated mice. Quantification of hepatic lesions number and surface was conducted by using NDPview softwar (Hamamatsu, Japan) on slide scan (F-G). TNF-KLH treated mice, as KLH and PBS treated mice, exhibited lower number (F) and smaller lesion surface (G) compared to TNF^{-/-}

mice. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, ANOVA). The increase in number and size of lesions with etanercept didn't reach significance threshold.

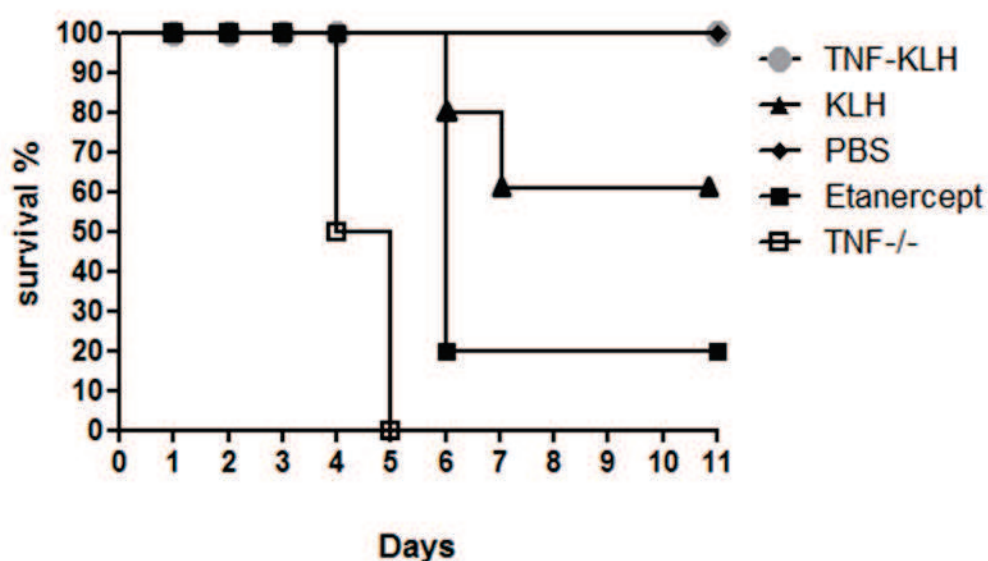
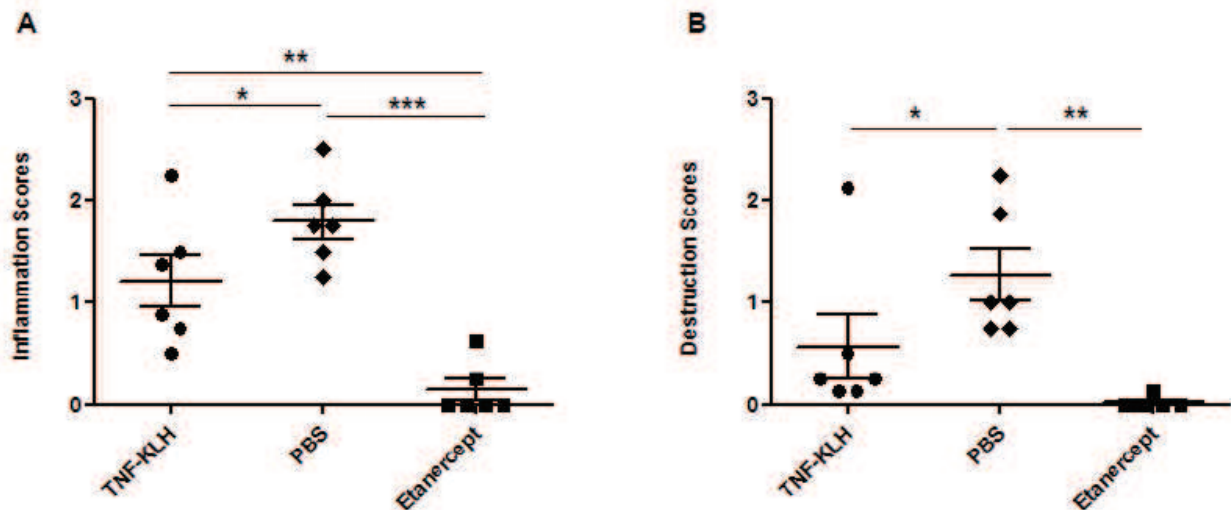
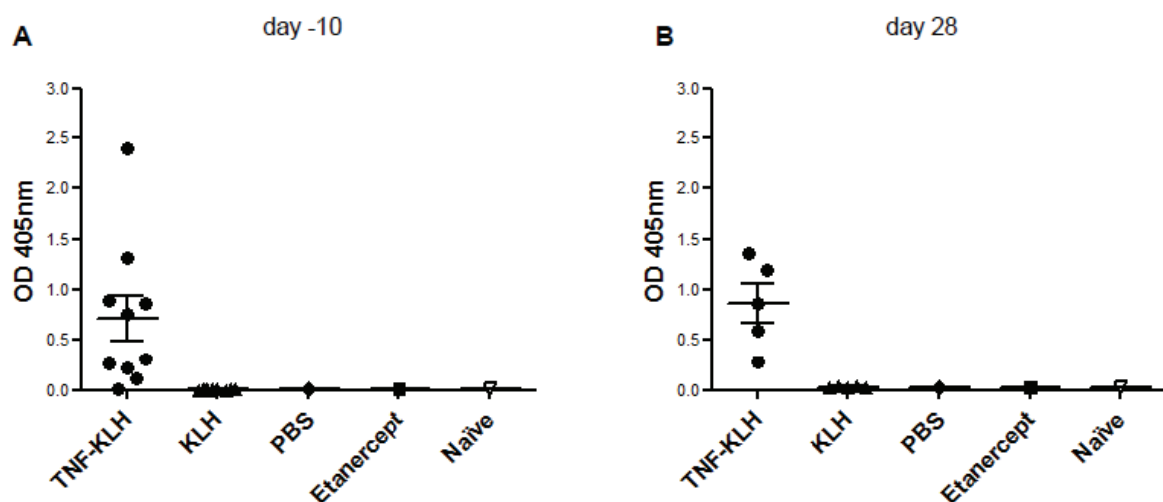


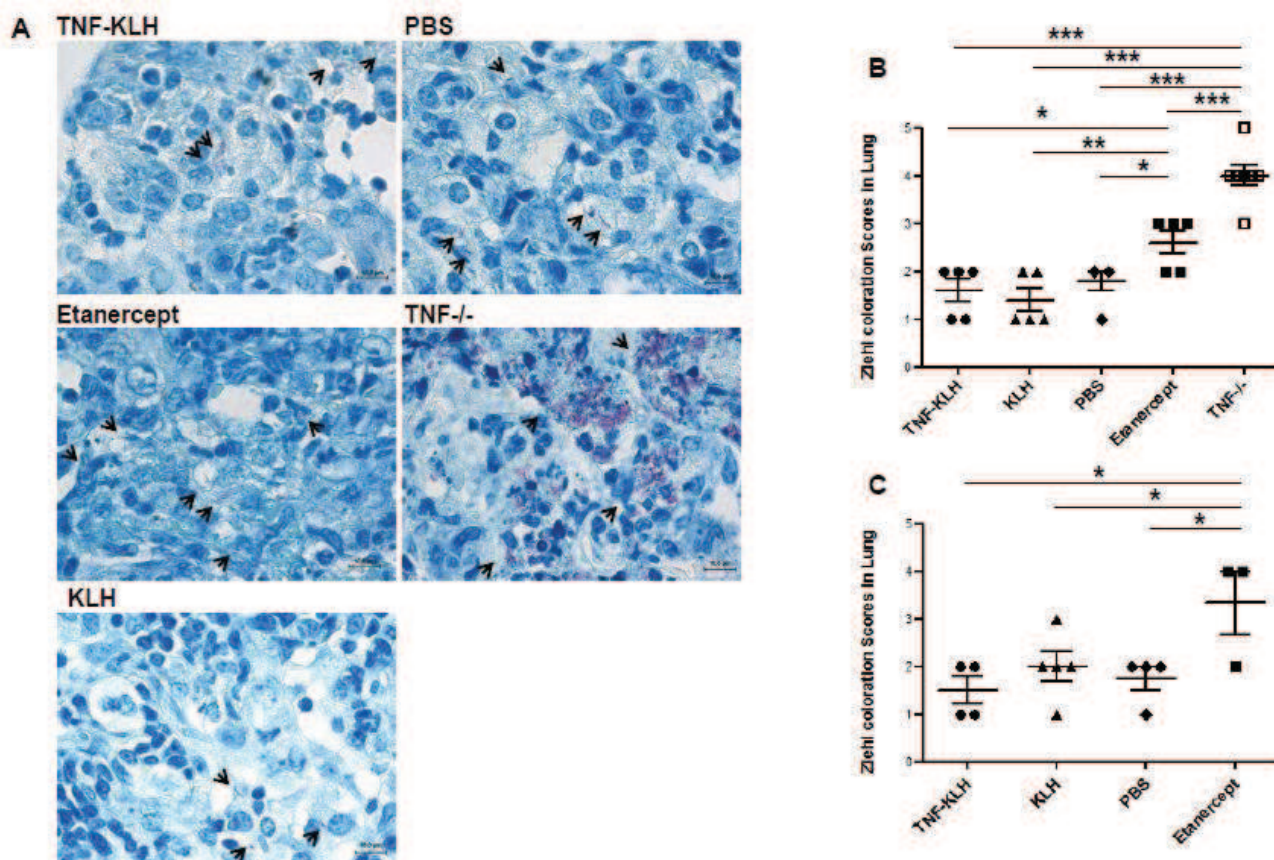
Figure 8: Survival of mice during *Listeria monocytogenes* infection is not reduced by TNF-KLH vaccination. Mice (n=10 per group) were infected with 10^4 CFU of *Listeria* at day 0. 4 mice per group were euthanized for bacterial burden and histological analysis at day 4. Survival was evaluated for 11 days post-infection with the remaining mice. All TNF-/- mice (n=6) died 5 days post-infection. 4 etanercept treated mice died on day 6 (n=5) and 2 mice treated with KLH (n=5). All TNF-KLH (n=6) and PBS (n=6) treated mice survived during this period. Survival of TNF-/- and etanercept groups was significantly reduced compared to PBS, TNF-KLH and KLH groups (*Logrank test for trend*, $p<0.0001$).



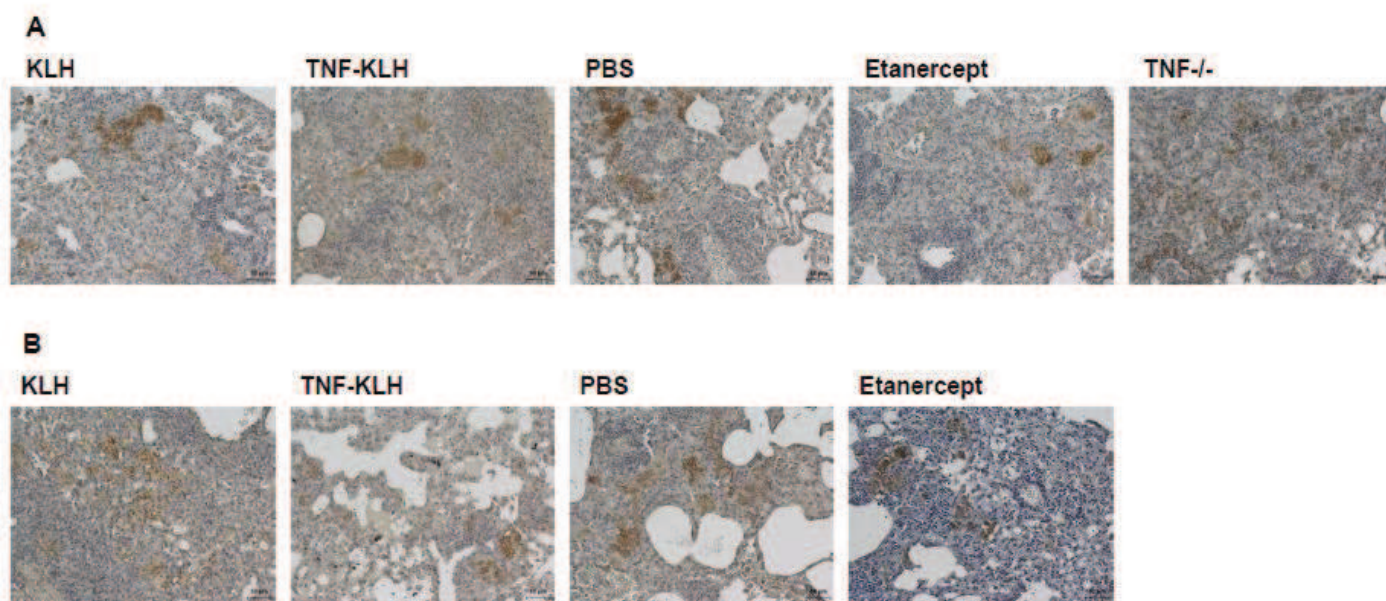
Supplementary figure 1: TNF-KLH vaccination reduces histological signs of arthritis in the Collagen Antibody-Induced Arthritis model. C57Bl/6 female mice were immunized with 10 μ g of TNF-KLH vaccine (n=6) at days -37, -13 and -5. Last groups of mice received 30mg/kg of etanercept (n=6) or PBS (n=6) twice a week from day-5 to day 12. Arthritis was induced by an intraperitoneal injection of a cocktail of five anti-collagen antibodies (5 mg per mice) at day 0 and a boost of 50 μ g LPS at day 3. Arthritis onset occurs around 3-4 days after anti-collagen antibodies injection and peak around day 7-10. After euthanasia at day 12, histological inflammation (A) and destruction (B) after staining of knee sections with hematoxylin-eosin. TNF-KLH vaccinated mice presented lower inflammation and destruction scores than PBS control group (*p<0.05, ANOVA).



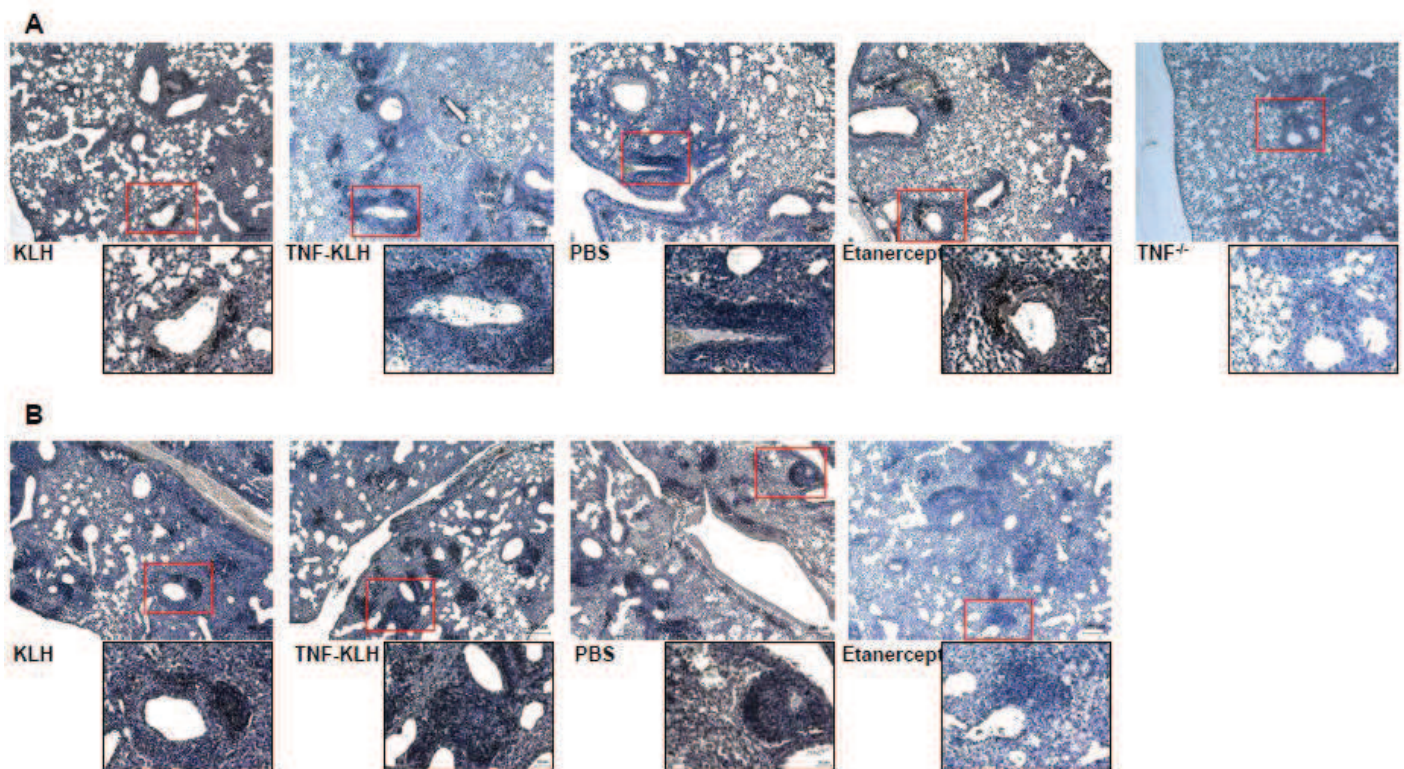
Supplementary figure 2: TNF-KLH vaccination induces a sustained anti-TNF antibody production during *M. tuberculosis* infection. C57Bl/6 mice were immunized with KLH (n=10) or with 10 μ g of TNF-KLH vaccine (n=10) at days -44, -31, -17 and -4. One group of mice received 30mg/kg of etanercept (n=10) twice a week from day-4 to day 52. Excepted naïves (n=5), all mice and TNF^{-/-} mice (n=7) were infected intranasally with 10⁴ CFU of *Mycobacterium tuberculosis* at day 0. Blood was collected at day -10 (A) and during infection at day 28 (B) to evaluate the anti-TNF antibodies production. ELISA analysis showed that TNF-KLH vaccinated mice produced high titers of anti-TNF Abs at day -10 and 28.



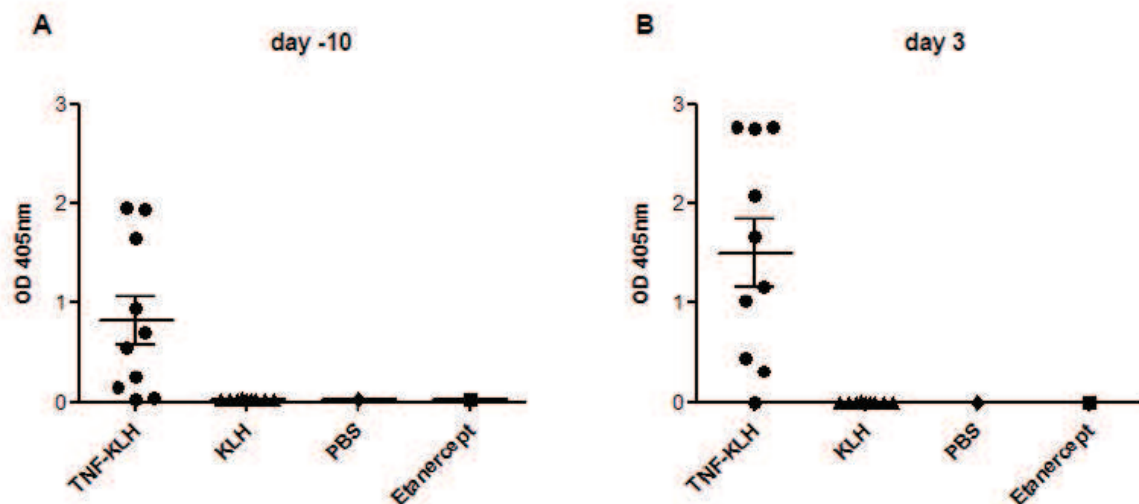
Supplementary figure 3: TNF-KLH vaccination doesn't increase bacterial load in lungs of *M. tuberculosis* infected mice. Ziehl-Neelsen coloration allowed direct recognition of mycobacteria in lung sections. *M. tuberculosis* appeared as red bacilli (arrowheads). Examples of images at early phase of infection (A). Quantification of mycobacteria during the early phase (B) and the established phase (C) of infection was conducted after blind observations of three fields per mice (n=3-7 mice per group). TNF-KLH treated mice presented lower infiltration of lungs during infection than etanercept and TNF-/- mice. (*p<0.05 ANOVA). Scal bar, 10µm.



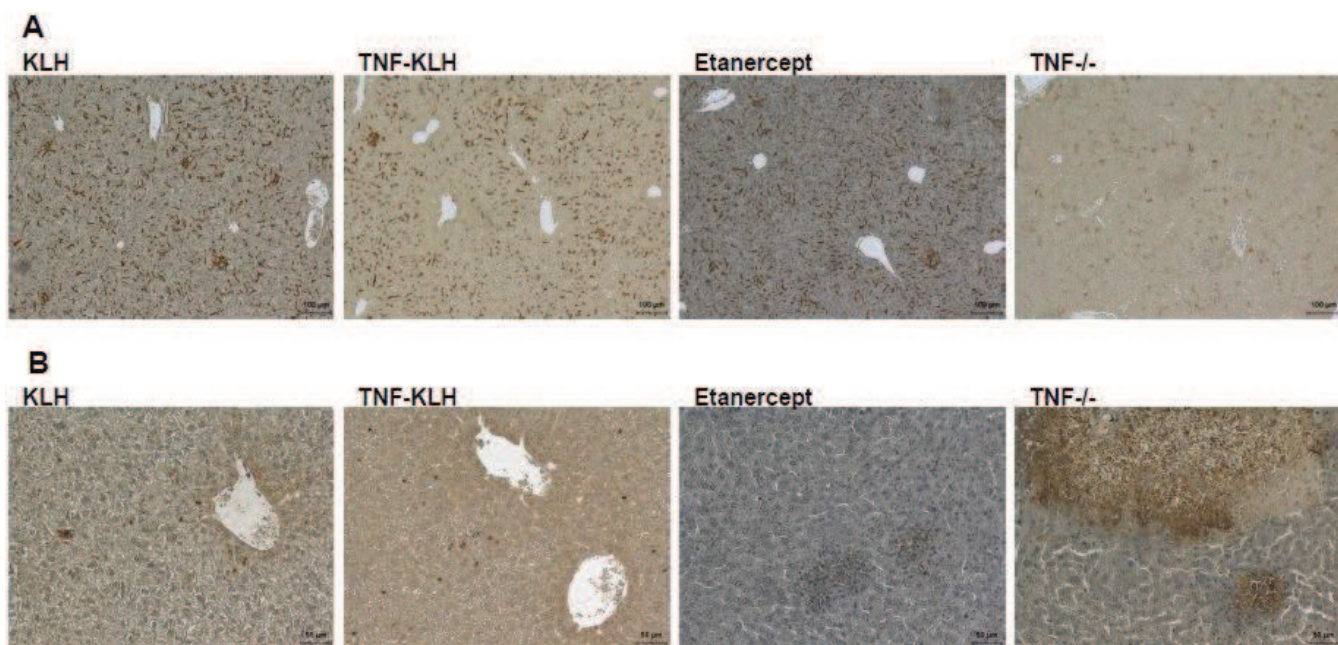
Supplementary figure 4: TNF-KLH vaccination doesn't inhibits iNOS expression in lungs of *M. tuberculosis* infected mice. Immunohistological staining of iNOS was performed as described in materials and methods. (A). TNF-KLH, KLH and PBS groups were characterized by iNOS+ macrophage infiltration of lesions and very low number of unstained neutrophils. In TNF-/- and etanercept groups, iNOS was only expressed by macrophages, closed to altered neutrophils accumulations and necrosis area. At established phase of infection (B), etanercept group, presented more macrophages infiltration and foamy histiocytes expressing iNOS and less neutrophils than in early phase of infection. Lesions of PBS group presented very few neutrophils, and iNOS was expressed in macrophages and foamy histiocytes. Vaccinated mice with KLH or TNF-KLH presented similar cellular infiltration than PBS group excepted a lower number of foamy histiocytes. Scale bar, 200µm.



Supplementary figure 5: TNF-KLH vaccination favors B lymphocyte infiltration in lungs of *M. tuberculosis* infected mice. Immunohistological staining of B lymphocytes expressing CD45R was performed as described in materials and methods. At early phase of infection (A), a massive perivascular accumulation of B lymphocytes was observed in lungs of TNF-KLH and KLH treated mice, a low infiltration with PBS, and a nearly absence in TNF^{-/-} or etanercept treated mice. At established phase of infection, vaccinated groups (KLH, TNF-KLH) were characterized by accumulation of B lymphocytes and many pulmonary nodules. PBS group was similar to the vaccinated mice but with less B lymphocytes. By contrast, etanercept group displayed very few B lymphocytes and massive macrophages infiltration with large necrotic area. Representative image of 3 to 7 mice per group. Scale bar, 200 μ m. X2.5 magnification of red boxes were represented below original picture.



Supplementary figure 6: TNF-KLH vaccination induces a sustained anti-TNF antibody production during *Listeria monocytogenes* infection. C57Bl/6 mice were immunized with KLH (n=9) or with 10 μ g of TNF-KLH vaccine (n=10) at days -44, -31, -17 and -4. One group of mice received 30mg/kg of etanercept (n=9) or PBS (n=10) at day -4, -2, 0 and 3. All mice and TNF^{-/-} mice (n=10) were infected by intraperitoneal injection with 10⁴ CFU of *Listeria monocytogenes* at day 0. Blood was collected at day -10 (A) and at early phase of infection at day 3 (B) to evaluate the anti-TNF antibodies production. ELISA analysis showed that TNF-KLH vaccinated mice produced high titers of anti-TNF Abs with an increase in responder mice between day -10 and day 3.



Supplementary figure 7: TNF-KLH vaccination doesn't alter macrophages and neutrophils infiltration of livers during *Listeria monocytogenes* infection. Immunohistological staining of macrophages expressing F4/80 (A) and neutrophils expressing Ly6G (B) was performed as described in materials and methods. After 4 days of infection, macrophage staining of TNF-KLH treated mice was similar to KLH and PBS groups, whereas macrophages appeared less localized in microabscesses in etanercept and TNF^{-/-} groups. (Scale bar, 100µm). Neutrophils staining (B) were similar between TNF-KLH, KLH and PBS groups, whereas etanercept and TNF^{-/-} groups were characterized by an important accumulation of neutrophils in large lesions. Scale bar, 50µm.

Treatments	Incidence of arthritis (n/group)	Onset of arthritis (days)	Maximal score (Amax /40)
TNF-KLH 20	5/6	38.7 +/- 2.5	8.0 +/- 2.2
TNF-KLH 10	5/6	38.2 +/- 2.4	4.7 +/- 2.4
TNF-KLH 5	6/6	38.8 +/- 1.6	8.0 +/- 1.4
KLH	6/6	33.3 +/- 1.7	14.7 +/- 2.1
PBS	6/6	33.3 +/- 2.2	11.1 +/- 3.3
etanercept	4/6	41.2 +/- 2.8	2.0 +/- 1.7

Supplementary table 1: TNF-KLH vaccination protects mice from Collagen-Induced Arthritis . DBA/1 mice were immunized at days -21, -7, 7 with KLH (n=6) or with different doses of TNF-KLH (20µg, 10µg, 5µg; n=6). Treatment with etanercept (30mg/kg, twice a week; n=6) or PBS (n=6) began from day 22 to day 47. Collagen-Induced Arthritis (CIA) were induced by two injections of CIIb (day 0 and 21). Three parameters of clinical arthritis were evaluated: incidence, onset and Amax. No statistical differences were obtained for incidence and onset of arthritis between treatment groups. By contrast maximal scores of arthritis (Amax) were lower in TNF-KLH and etanercept treated mice versus KLH group. * p<0.05 for TNF-KLH and ** p<0.01 for etanercept vs KLH (Newman-Keuls test with subsequent *post hoc* comparisons). CIA inhibition with TNF-KLH vaccination was observed in three independent experiments.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux que j'ai réalisés durant ma thèse avaient deux objectifs principaux : d'une part, mettre au point un nouveau vaccin anti-VEGF en utilisant des peptides du VEGF et de démontrer pour la première fois son efficacité dans le modèle d'arthrite expérimentale au collagène, d'autre part, évaluer les éventuels effets secondaires du blocage du TNF par une stratégie vaccinale dans un contexte infectieux.

J'ai donc pu confirmer dans la première partie de mes travaux l'efficacité du blocage du VEGF par le vaccin Vpep1-K et par le vaccin VEGF-K et constater que ces deux vaccins ont la capacité de réduire les scores cliniques ainsi que les scores histologiques dans l'AEC. Nous avons pu également mettre en évidence l'inhibition de la vascularisation dans la synoviale des souris traitées avec ces vaccins (Vpep1-K ou VEGF-K). Cependant la vaccination avec le Vpep2-K ne protège pas les souris des arthrites et ne réduit pas la vascularisation au cours de l'arthrite.

I. Inhibition de l'angiogenèse et efficacité dans l'arthrite

A. Les traitements anti-VEGF

Actuellement, des immunothérapies anti-VEGF sont utilisées pour inhiber l'angiogenèse chez les patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et chez les patients atteints de cancers. Chez ces derniers, du fait des doses et des multiples rôles du VEGF, ces traitements entraînent l'apparition d'effets secondaires importants comme : des défauts de cicatrisation, des perforations gastro-intestinales et une hypertension artérielle.

Les effets indésirables de ces médicaments rendent inenvisageable leur utilisation dans le traitement des maladies auto-immunes chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde. Pour limiter les effets secondaires de ces immunothérapies passives, des stratégies vaccinales ciblant des cytokines pro-angiogéniques ont été développées. Certaines sont basées sur

l'utilisation des peptides de cytokines. Ainsi, des travaux ont montré que la vaccination avec des peptides du FGF-2 couplés à des VLP inhibe le développement des tumeurs (Plum et al., 2000). Par ailleurs, la vaccination avec du VEGF-A₁₆₅ couplé à la KLH, induit la production d'anticorps anti-cytokine, inhibant le développement tumoral dans le modèle d'adénocarcinome du côlon CT26 (Rad et al., 2007).

Différentes études ont montré l'importance de l'interaction entre le VEGF-A₁₆₅, son récepteur VEGFR-2 et le corécepteur NP-1 dans l'angiogenèse pathologique. Le blocage spécifique de l'interaction du VEGF-A₁₆₅ avec son corecepteur NP-1 pourrait limiter les effets secondaires d'une telle stratégie. Des techniques *in vitro* basées sur l'utilisation de peptides du VEGF-A₁₆₅ ont été développées pour identifier les séquences impliquées dans cette interaction. La plupart des peptides identifiés ont en commun les 7 derniers acides aminés de l'exon 8 de la séquence protéique du VEGF-A₁₆₅. L'efficacité du peptide A7R (ATWLPPR) a été démontrée au laboratoire dans un modèle murin de tumeur (Starzec et al., 2006). De même, un peptide VEGF-A₁₁₁₋₁₆₅ bloquant l'interaction du VEGF avec NP-1 *in vitro*, s'est révélé efficace *in vivo* dans l'AEC. Ce peptide issu du clivage du VEGF-A₁₆₅ permet de limiter la sévérité des arthrites, l'hyperplasie synoviale et l'angiogenèse dans les articulations (Kong et al., 2010).

Dans cette optique et par homologie entre espèces, nous avons défini deux peptides dans la séquence du VEGF-A₁₆₄ de souris. Le premier devait correspondre à une séquence peptidique brevetée par Zacchary en 2001, localisée entre les acides aminés 125 et 140 de la séquence du VEGF-A₁₆₅ humain. En raison des différents isoformes et des multiples numérotations des acides aminés prenant ou pas en compte le peptide signal, nous nous sommes décalés d'une dizaine d'acides aminés en amont de la séquence peptidique murine ciblée pour définir le peptide Vpep1. Le second peptide, Vpep2, est l'homologue murin d'A7R. Après étude des publications sur la structure du VEGF-A₁₆₅, nous nous sommes rendus compte que le peptide

Vpep1 restait dans la zone d'interaction avec NP-1 et était localisé dans une région commune avec deux autres isoformes du VEGF-A₁₆₄: le VEGF-A₁₈₈ et le VEGF-A₁₂₀. Nous avons couplé ces peptides à la KLH, de manière à obtenir deux candidats vaccins, Vpep1-K et Vpep2-K. Nous avons ensuite évalué l'efficacité de ces vaccins dans l'AEC. Dans ces expériences nous ne pouvions pas utiliser le bevacizumab (Avastin®) comme contrôle positif, car cet anticorps monoclonal anti-VEGF-A₁₆₅ humain ne croise pas avec le VEGF-A₁₆₄ de souris. Depuis, un récepteur soluble du VEGF (aflibercept, Zaltrap®) a été développé et est actuellement disponible en France. Cette molécule inhibe l'action du VEGF et du PlGF chez les mammifères.

B. Mode d'action et efficacité des vaccins peptides anti-VEGF

Comme nous l'avons observé au cours des expériences, quelque soit le peptide couplé à la KLH (Vpep1 ou Vpep2), les souris développent des anticorps spécifiques du peptide contre lequel elles ont été vaccinées. De plus, ces Ac polyclonaux anti-VEGF sont capables de reconnaître la cytokine entière. Le vaccin Vpep1-K (peptide) comme le vaccin VEGF-K (cytokine entière), a démontré son efficacité tant au niveau clinique qu'histologique pour moduler les arthrites dans le modèle d'AEC. Nous avons pu démontrer, *in vitro*, que comme avec le vaccin VEGF-K, les Ac générés par Vpep1-K sont capables d'inhiber la prolifération des cellules HUVEC *in vitro* en réponse au VEGF. L'évaluation histologique de la vascularisation, par marquage des vaisseaux avec la GSL-1, montre que la vaccination avec VEGF-K réduit significativement la vascularisation de la membrane synoviale. La même tendance est observée avec Vpep1-K.

Les résultats obtenus avec Vpep2-K montrent que les Ac générés chez les souris vaccinées reconnaissent le VEGF, mais ne sont pas neutralisants *in vitro* (HUVEC) et ne réduisent pas

la vascularisation de la synoviale dans l'arthrite. Ces résultats expliquent le manque d'efficacité du vaccin Vpep2-K à inhiber les scores cliniques et histologiques d'arthrite.

Le VEGF est connu pour jouer un rôle essentiel dans un certain nombre de phénomènes physiologiques, comme la cicatrisation. Des travaux utilisant un anticorps anti-VEGF de souris ont montré que l'inhibition précoce du VEGF était efficace pour empêcher le développement des arthrites. Cependant cet anticorps est associé à un risque accru de thrombose veineuse. Au cours de nos expériences de vaccination anti-VEGF, aucun effet secondaire n'a été détecté, mais il serait peut être judicieux de les rechercher plus spécifiquement dans des modèles de cicatrisation et d'athérosclérose.

Les résultats obtenus au cours de nos études ont montré une protection partielle vis-à-vis des arthrites avec nos vaccins anti-VEGF. Cette protection incomplète dans l'AEC pourrait s'expliquer de deux manières. D'une part, le VEGF pourrait jouer un rôle important, mais pas central, dans l'AEC. Son inhibition, même totale, n'aurait ainsi qu'une incidence limitée sur le développement des arthrites. De récents résultats obtenus au laboratoire avec l'aflibercept iraient dans ce sens. D'autre part, le vaccin Vpep1-K nécessite peut être une optimisation. En effet, la séquence peptidique ainsi que la longueur sont fondamentaux pour obtenir un vaccin efficace.

On pourrait envisager de dériver ce peptide initial de manière à augmenter l'efficacité de la vaccination. Cependant, l'inhibition partielle d'une cytokine surexprimée dans l'arthrite pourrait être suffisante, de manière à limiter les effets secondaires souvent observés avec les anticorps monoclonaux, et envisager de combiner des vaccins ciblant plusieurs cytokines impliquées dans la PR. Il serait alors possible de moduler conjointement ces cytokines et limiter plus efficacement le développement de la maladie. Cependant, une synergie entre deux approches vaccinales n'a pas encore été démontrée.

C. Comparaison de différentes stratégies d'inhibition du VEGF

Les immunothérapies passives présentent plusieurs inconvénients (coûts, résistances primaires ou secondaires, effets secondaires). Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinases des récepteurs du VEGF sont utilisés en association avec les chimiothérapies dans différents types de cancer. Cependant, bien qu'ils puissent améliorer la survie globale de certains patients, ils sont eux aussi associés à de multiples effets secondaires. La vaccination anti-VEGF s'est révélée efficace dans des modèles tumoraux, mais également dans l'arthrite comme le montre nos travaux. Cette stratégie alternative est basée principalement sur l'utilisation d'une cytokine entière pour constituer un vaccin. Cependant, l'utilisation d'une cytokine complète peut être judicieusement remplacée par des peptides de cytokine pour diminuer les coûts.

De plus, l'utilisation de peptides couplés à la KLH devrait permettre d'obtenir une meilleure production d'anticorps neutralisants. En effet, lors d'une vaccination anti-cytokine entière, les anticorps polyclonaux produits peuvent être dirigés contre tous les épitopes de la cytokine, tandis qu'avec des peptides de cytokine la réponse anticorps est concentrée sur quelques épitopes importants pour l'activité de la cytokine entière (Capini et al., 2004) (Semerano et al., 2012) (Delavallée et al., 2010).

La vaccination anti-peptide de cytokine apporte une sécurité supplémentaire à la stratégie vaccinale, car en limitant les épitopes disponibles, elle limite les risques de réactions croisées potentielles.

II. Vaccination anti-TNF : efficacité et effets secondaires

Les immunothérapies anti-TNF- α utilisés actuellement sont des anticorps monoclonaux ou récepteur soluble neutralisant très efficacement le TNF (Tracey et al., 2008). Ces traitements sont très efficaces dans la PR, mais induisent une susceptibilité accrue aux infections comme la listériose et la tuberculose (Scheinfeld, 2004) (Wallis et al., 2004) (Wallis, 2009).

Des travaux précliniques effectués au laboratoire avaient permis de montrer qu'une stratégie vaccinale utilisant le kinoïde® humain du TNF (TNF-K) de la société NéoVacs (Le Buanec et al., 2006) était efficace dans un modèle de souris transgéniques pour le TNF- α humain (souris TTg) (Assier et al., 2012), (Delavallée et al., 2008) (Semerano et al., 2013). Le premier essai clinique de phase IIa mené avec TNF-K a montré une efficacité potentielle de cette stratégie vaccinale dans la PR (Durez et al., 2014). Très récemment, l'équipe de *Sun J.H et al* a développé un vaccin anti-TNF de souris en couplant des peptides du TNF- α à la KLH. Ce vaccin peptidique a montré son efficacité dans le modèle d'AEC (Sun et al., 2016). Cependant la question des effets secondaires d'une telle stratégie n'avait pas été abordée.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de pouvoir m'impliquer directement dans la production d'un vaccin murin TNF-KLH obtenu par couplage de TNF- α murin complet à la KLH. Ce vaccin permet d'évaluer les effets secondaires de la stratégie vaccinale anti-TNF- α chez la souris. J'ai pu également étudier l'effet de la neutralisation du TNF- α dans deux modèles d'infections : la tuberculose et la listériose, qui sont des modèles TNF- α dépendants. Nous avons pu démontrer que la vaccination anti-TNF ne sensibilise pas les souris à ces deux infections.

Nous avons également approfondi les connaissances sur le rôle de TNF et les effets de la neutralisation de cette cytokine sur le recrutement des cellules immunitaires au foyer infectieux et cela dans les deux modèles d'infections choisis.

A. Vaccination anti-TNF dans les modèles d'arthrites

Comme indiqué précédemment, les travaux de notre équipe ont montré l'efficacité de la vaccination anti-TNF humain dans le modèle d'arthrite des souris TTg. Ces travaux précliniques ont contribué au développement du vaccin TNF kinoide® par la société NéoVacs. Ce vaccin induit la production d'anticorps anti-TNF- α humain qui ne reconnaissent pas le TNF- α de souris. Par conséquent, nous ne pouvons pas utiliser ce vaccin dans les modèles de souris. De plus, l'utilisation de souris TTg dans les modèles infectieux n'est pas possible, car elles expriment toujours le TNF- α murin. L'évaluation des effets secondaires de la stratégie vaccinale anti-TNF- α est rendue possible grâce à l'utilisation du vaccin TNF-KLH murin. Ce vaccin est synthétisé au sein de notre laboratoire en couplant le TNF- α murin avec la KLH. Au cours de nos études (article 2), nous avons montré que ce nouveau vaccin permet de générer des anticorps anti-TNF- α dans toutes les lignées de souris utilisées. Les résultats obtenus *in vitro*, montrent que la capacité neutralisante de ces anticorps est relativement faible, peut être du fait de faibles taux d'anticorps anti-TNF- α détectés dans le sérum des souris vaccinées, ou de la sensibilité de notre test de protection vis-à-vis de la toxicité du TNF sur les cellules L929.

Néanmoins, nous avons démontré dans le modèle d'AEC de la souris DBA/1, que le vaccin TNF-KLH réduit fortement les scores cliniques et histologiques d'arthrite. Par ailleurs, dans le modèle de la CAIA chez la C57Bl/6, le vaccin TNF-KLH permet de limiter les scores

histologiques. L'absence de protection clinique pourrait être expliquée par la sévérité des arthrites dans ce modèle de poussée arthritique.

Ayant démontré l'effet protecteur du vaccin TNF-KLH dans des modèles d'arthrite, nous avons ensuite recherché si l'on pouvait mettre en évidence d'éventuels effets délétères dans des modèles infectieux.

B. Vaccination anti-TNF dans des modèles infectieux

La production de TNF- α est nécessaire pour le bon fonctionnement de la réponse immunitaire, notamment pour le contrôle de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*, de la formation du granulome à son maintien (Ehlers, 2003)(Kaneko et al., 1999).

Nos travaux ont mis en lumière les effets de la vaccination anti-TNF- α dans la listériose et la tuberculose et nous avons comparé cette stratégie à la neutralisation du TNF- α par l'etanercept ou son absence de production chez les souris TNF^{-/-}.

Dans le modèle *Listeria*, nous avons pu observer *in vivo*, que le traitement avec le vaccin TNF-KLH ne sensibilise pas les souris à l'infection, en parallèle, les souris TNF^{-/-} et les souris traitées avec l'etanercept perdent rapidement du poids et meurent quelques jours après l'infection. Au cours de cette expérience, nous avons évalué la charge bactérienne dans le foie et la rate, et les résultats montrent que les souris traitées avec le vaccin, comme les souris immunocompétentes, arrivent à éliminer la bactérie. En revanche, on constate une charge bactérienne très élevée dans les organes de souris TNF^{-/-} et etanercept. Les analyses histologiques des foies des souris ont mis en évidence une destruction tissulaire importante chez les groupes TNF^{-/-} et etanercept. Cette destruction se traduit par de larges micro-abcès

hépatiques et d'importantes zones nécrotiques. Inversement, les souris vaccinées par TNF-KLH et les groupes contrôles présentent moins de lésions.

Etant donné que le TNF- α est indispensable à la mise en place d'une réponse efficace anti-*Listeria* (Pamer, 2004b)(Pfeffer et al., 1993)(Rothe et al., 1993), et afin de mieux comprendre la résistance à l'infection des souris TNF-KLH et des groupes contrôles, nous avons étudié par immuno-histologie le recrutement des cellules immunitaires aux foyers infectieux. Nos résultats indiquent que la neutralisation du TNF par l'etanercept ou son absence (souris TNF^{-/-}), induisent une accumulation de neutrophiles au niveau du foie avec une faible présence de macrophages. En parallèle, chez les souris vaccinées, on constate un recrutement similaire aux groupes contrôles pour ces deux populations. Nous avons également évalué l'activation des macrophages par l'expression d'iNOS. Nous avons pu montrer que la vaccination TNF-KLH ne réduit pas l'expression d'iNOS, contrairement au traitement par l'etanercept. Cela suggère que la neutralisation du TNF- α par la vaccination n'altère pas l'activation des macrophages dans notre modèle infectieux. Nos travaux sont en accord avec des études précédentes réalisées chez les souris TNF^{-/-} et les souris traitées avec l'etanercept dans le modèle d'infection à *Listeria* (Torres et al., 2005).

De nombreuses études ont démontré l'implication du TNF- α dans la réponse anti-tuberculose. En effet, les souris traitées avec des anti-TNF- α et les souris TNF^{-/-} ont montré une sensibilité accrue à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ou par la souche atténuée *M. bovis* (Bacille Calmette-Guerin, BCG). De plus, ces souris semblent incapables de contrôler la réplication de la bactérie et la formation du granulome. Ainsi, l'absence de TNF- α au cours de l'infection par *Mtb* altère l'activation, l'expression des chimiokines et le recrutement des cellules formant le granulome. La réponse immune précoce mise en place par l'hôte implique le recrutement de cellules inflammatoires composées principalement de macrophages et de

neutrophiles (Tsai et al., 2006). Il a été démontré que les macrophages infectés produisent rapidement du TNF- α , ce qui suggère un rôle essentiel de cette cytokine dans la réponse immune contre *Mtb* (Bean et al., 1999). Egalement, l'activation de ces cellules ainsi que la production de NO nécessite la présence de TNF- α (Botha and Ryffel, 2003). Les neutrophiles, ont aussi un rôle primordial dans le contrôle de cette infection. Des études ont montrés que le TNF- α a un rôle important dans la coopération des neutrophiles avec les macrophages alvéolaires pour contrôler la croissance de *Mtb* (Bean et al., 1999)(Kaneko et al., 1999).

Dans ce travail sur le modèle d'infection à *Mtb*, j'ai étudié l'impact de la vaccination anti-TNF- α sur la survie des souris, la charge bactérienne, la formation des granulomes et les populations cellulaires infiltrées.

A la phase aiguë (J11) comme à la phase établie de l'infection par *Mtb* (J56), nos résultats montrent que la vaccination TNF-KLH n'a pas d'impact sur la survie des souris infectées, contrairement au souris TNF^{-/-} qui perdent très rapidement du poids et meurent durant la phase aiguë de l'infection. Dans cette expérience, le traitement des souris avec l'etanercept n'a pas induit de mortalité des souris. Cependant, une étude a montré que l'administration d'un homologue murin de l'etanercept induit une mortalités importantes des souris à la phase aiguë de l'infection par *Mtb* (Plessner et al., 2007a). Dans notre expérience, la quantification des colonies bactériennes dans les lysats de poumons a mis en évidence une charge bactérienne significativement plus élevée chez les souris TNF^{-/-} uniquement. Nous avons recherché la présence de la bactérie dans les tissus en effectuant une coloration de Ziehl-Neelsen des coupes de poumons infectés. On observe une colonisation plus importante des poumons chez les souris TNF^{-/-} ou traitées par etanercept, tandis que le nombre de bactéries chez les souris TNF-KLH est similaire aux groupes contrôles.

Concernant l'infiltration des cellules immunitaires, la neutralisation du TNF par la vaccination n'altère pas le recrutement des lymphocytes, contrairement au traitement etanercept. D'une manière intéressante, à la phase aiguë, on constate que la vaccination induit davantage le recrutement de lymphocytes B qui restent exclusivement autour des vaisseaux sanguins. A la phase établie, ces lymphocytes forment des structures nodulaires au niveau de poumons des souris traitées avec le vaccin et les souris groupes contrôles. En parallèle, on observe peu de nodules formés chez les souris traitées avec l'etanercept. Une étude récente (Kondratieva et al., 2014) montre que le TNF sécrété par les lymphocyte B est impliqué directement dans la formation de ces agrégats, mais l'absence de production de TNF par les B et donc l'absence des agrégats n'a pas d'incidence sur l'issue de l'infection. Il semble donc que d'autres populations cellulaires assurent la sécrétion de TNF localement pour contrôler l'infection par Mtb. Dans la suite de cette étude, nous sommes donc intéressés à l'effet du vaccin sur l'activation des macrophages. Nos résultats montrent que le vaccin TNF-KLH n'altère pas l'expression d'iNOS pendant l'infection. On ne constate pas de différences d'expression entre les groupes de traitement et les souris TNF^{-/-}. Ces résultats sont en accord avec certaines études qui démontrent que la présence de TNF n'est pas nécessaire pour l'expression d'iNOS (Flynn et al., 1998). Il est donc possible que le TNF ne soit pas nécessaire pour l'expression d'iNOS, mais indispensable pour la fonction de cet enzyme. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle précoce des polynucléaires neutrophiles dans l'infection. En effet ces cellules sont rapidement recrutées après l'infection et leur présence précoce dans les poumons a été associée avec une réduction de la charge bactérienne (Pedrosa et al., 2000) (Sugawara et al., 2004) (Barrios-Payán et al., 2006). Dans cette expérience, les analyses histologiques sur le poumon révèlent la présence de rares neutrophiles au cours de l'infection chez les souris TNF-KLH, PBS et KLH. Cependant, chez les souris TNF^{-/-} et etanercept on constate une présence importante de neutrophiles dans les poumons, formant

des micro-abcès avec des plages nécrotiques. On observe une co-localisation de ces micro-abcès avec le marquage iNOS chez ces deux derniers groupes (etanercept et TNF^{-/-}). Il serait donc intéressant de réaliser un marquage des neutrophiles avec un anticorps anti-LY6G pour démontrer l'effet de la neutralisation de TNF sur cette population.

Il est clairement établi que la formation et l'organisation du granulome est importante pour contrôler l'infection (Vynnycky and Fine, 1997). Dans notre expérience, nous avons démontré que la neutralisation du TNF par une stratégie vaccinale n'influence pas la formation du granulome et ne conduit pas à la formation de larges zones nécrotiques. En effet, les souris vaccinées par TNF-KLH, comme les souris contrôles (PBS, KLH), présentent une inflammation et une charge bactérienne réduite tout au long de l'infection (56 jours). De plus, nous avons pu constater une résolution de l'inflammation avec des structures granulomateuses plus organisées au stade établi. L'etanercept ne semble pas affecter le contrôle de l'infection au stade aiguë, en revanche, les souris semblent incapables de contrôler l'infection à la phase établie et on a pu observer une augmentation de la surface de leurs granulomes avec de larges zones nécrotiques.

Il est démontré que les lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle important dans la protection contre une infection aiguë par *M. tuberculosis*. Les souris déficientes en lymphocytes T CD8⁺ succombent rapidement (Mogues et al., 2001). Dans la PR, le traitement des patients avec l'infliximab conduit à la déplétion d'une sous-population de cellules T CD8⁺ spécifique de la tuberculose (Lewinsohn et al., 2003). Il a également été décrit que les Treg ainsi que les T CD4⁺ ont un rôle crucial pendant la tuberculose. Des analyses immuno-histologiques supplémentaires pourraient être intéressantes afin d'identifier l'impact de la vaccination TNF-KLH sur ces populations.

Certaines études ont démontré que le TNF membranaire pourrait être suffisant pour résister à une infection aiguë par *M. tuberculosis* (Olleros et al., 2002), ou par *L. monocytogenes* (Torres et al., 2005). Ces données et nos résultats observés dans les modèles infectieux et *in vitro* avec les cellules L929, suggèrent que les anticorps polyclonaux induits par la vaccination neutralisent seulement le TNF soluble et/ou interagissent faiblement avec le TNF membranaire. Par ailleurs et pour mieux comprendre les mécanismes d'action de ces anticorps polyclonaux induits par la vaccination, on peut envisager d'étudier *in vitro*, l'action de ces anticorps sur le TNF membranaire. Une deuxième hypothèse permettant d'expliquer les différences observées avec l'etanercept, est l'interaction des anticorps polyclonaux avec le TNF localement. En effet, il a été montré qu'avec les pathogènes intracellulaires, le TNF doit être produit localement pour résister à l'infection (Bekker et al., 2000) et que l'administration de TNF par voie systémique est inefficace (Kindler et al., 1989). Sachant que la vaccination anti-cytokine induit une réponse polyclonale avec des anticorps ayant des affinités moyennes, il est possible que ces anticorps forment des interactions réversibles avec le TNF, ce qui permettrait au TNF d'être disponible localement au sein de granulome. Il a été rapporté que la formation de complexes immuns avec les anti-TNF induit une modification de l'activation des macrophages au cours de l'infection aiguë par *M. tuberculosis*, ces macrophages produisant alors davantage d'IL-10, ce qui limite la réponse anti-bactérienne et altère la réponse adaptative (Anderson et al., 2002)(Plessner et al., 2007b). Il serait donc intéressant d'étudier les effets de la vaccination TNF-KLH sur l'activation des macrophages et de doser les différentes cytokines produites par ces cellules notamment l'IL-10.

De plus, des travaux ont montré que l'etanercept bloque aussi la lymphotoxine (Tracey et al., 2008). L'expression de la lymphotoxine (LT), notamment la LT α 3 est nécessaire pour la formation du granulome et à la migration des cellules T, en effet, ces dernières restent en péri-vasculaire en absence de LT α 3 (Solovic et al., 2010). D'autres études ont démontré le

rôle important de la lymphotoxine dans la structure des organes lymphoïdes (Randall et al., 2008)(Tumanov et al., 2003)(Fu and Chaplin, 1999). Ces données pourraient permettre d'expliquer les différences observées entre l'éta nercept et le vaccin au cours de nos expériences dans les modèles infectieux. Il est peu probable que les anticorps polyclonaux induits par le vaccin TNF-KLH croisent avec la lymphotoxine. On pourrait néanmoins vérifier si la vaccination anti-TNF altère la structure des organes lymphoïdes secondaires.

Bien que les mécanismes d'actions des anticorps générés par le vaccin TNF-KLH ne soient pas encore connus, les expériences menées dans un modèle de tuberculose et de listériose, ne mettent pas en évidence un accroissement du risque infectieux. Néanmoins, il est important d'étudier les risques d'une telle stratégie à plus long terme. Ainsi, la réactivation de la tuberculose est l'un des effets majeurs de l'utilisation de traitement anti- TNF. D'autres travaux dans un modèle de réactivation de tuberculose établie sont nécessaires pour s'assurer de la sûreté de cette stratégie. Dans le même sens, il serait intéressant d'envisager des expériences pour évaluer d'autres effets secondaires éventuels de la stratégie vaccinale anti-TNF notamment dans des modèles de cancers.

III. Biothérapies anti-TNF et la stratégie vaccinale anti-TNF : Les mécanismes d'actions

Les anticorps monoclonaux (comme l'infliximab) et l'éta nercept sont largement utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Cependant ces deux anti-TNF ont des modes d'actions très différents (Sedger and McDermott, 2014).

L'infliximab a une affinité très élevée pour le TNF, il forme des complexes stables avec les formes membranaires et solubles du TNF. Il a été rapporté que la fixation de l'infliximab au TNF membranaire peut induire l'apoptose des monocytes (Lügering et al., 2001) (Shen et al., 2005). Cependant, les travaux de *Ellen C et al*, n'ont pas confirmé ces résultats (Ebert,

2009). En revanche, l'étaercept se lie à la forme soluble et à la lymphotoxine LT α . Il a été démontré, *in vitro*, que l'étaercept se fixe moins au TNF membranaire en comparaison avec l'infliximab, il bloque donc moins la signalisation via le TNF membranaire (Scallon et al., 2002b). L'étaercept forme des complexes moins stables et se dissocie très rapidement du TNF, ce qui permet la libération de cette cytokine.

Chaque molécule d'infliximab est capable de se lier à deux molécules de TNF, et chaque homotrimer de TNF peut se lier jusqu'à trois molécules d'infliximab, bloquant ainsi les sites de liaison au récepteur du TNF. En revanche, on pense que la molécule d'étaercept forme un complexe 1: 1 avec le trimère de TNF dans lequel deux des sites de liaison avec le récepteur de TNF sont occupées par étaercept, et le troisième site de liaison de récepteur est libre (Scallon et al., 2002b) .

La pharmacocinétique des deux anti-TNF est également différente. L'infliximab a une demi-vie d'environ 9-41 jours ; administré en intraveineux tous les 6-8 semaines cela peut induire une neutralisation soutenue et complète du TNF. Dans le cas de l'étaercept, la demi-vie de la molécule est beaucoup plus courte (3-5 jours). L'administration du traitement se fait en injection sous-cutanée, deux fois par semaine, cela induit probablement une neutralisation partielle, permettant seulement de réduire les pics de concentration de TNF.

Lors de ce travail, nous avons étudié l'effet de la neutralisation du TNF par la vaccination dans les modèles d'arthrites. Nos résultats avec le vaccin TNF-KLH confirment l'efficacité d'une telle stratégie dans le traitement d'une inflammation chronique dans le modèle d'AEC. Nous avons pu démontrer également que les anticorps polyclonaux générés par la vaccination n'augmentent pas le risque infectieux dans nos modèles.

Les informations actuelles sur les effets et les mécanismes d'actions des biothérapies anti-TNF et mes résultats de thèse suggèrent que les anticorps polyclonaux anti-TNF agissent d'une manière différente de l'etanercept et des anticorps monoclonaux anti-TNF (figure 16). Les travaux menés au sein de notre équipe sur le vaccin TNF kinoïde humain, ont montré des titres d'anticorps neutralisants anti-TNF et une protection des animaux pendant plusieurs semaines après la dernière injection. Après cette période les taux d'anticorps commencent à diminuer. Nos résultats avec le TNF-KLH dans le modèle d'AEC vont dans le même sens. En effet, le dosage des anticorps anti-TNF dans les sera des souris vaccinées a mis en évidence leur production tout au long de l'expérience, avec des taux diminuant progressivement, mais qui suffisent pour réduire les symptômes de la maladie. Ces résultats suggèrent que l'inhibition du TNF par la stratégie vaccinale est partielle et discontinue, ce qui permet de réduire l'amplitude et la durée des pics de TNF.

L'approche vaccinale nécessite de stimuler le système immunitaire pour produire des anticorps, d'où une période de latence pour atteindre des taux protecteurs. La neutralisation du TNF par une stratégie vaccinale est donc moins rapide que sa neutralisation avec l'infliximab ou l'etanercept, mais nécessite une administration moins fréquente. Des travaux ont été réalisés avec le vaccin humain TNF-K, coadministré avec l'infliximab chez la souris transgénique, afin d'assurer une meilleure protection clinique au début des arthrites. Dans cette expérience, la coadministration d'infliximab en attendant que le vaccin induise des anticorps, conduit à une absence d'efficacité du vaccin. En effet, le vaccin étant lui-même constitué de TNF, l'infliximab peut masquer son antigénicité (Semerano et al., 2013).

La lymphotoxine ou le TNF- β , fait partie de la superfamille du TNF. Elle peut induire une signalisation via TNF-R1 et -R2. Du fait de la faible homologie de séquence entre la lymphotoxine et le TNF- α , il est possible que les anticorps polyclonaux générés durant la

vaccination soient également capables de se lier d'une manière faible et réversible à la lymphotoxine (figure 16).

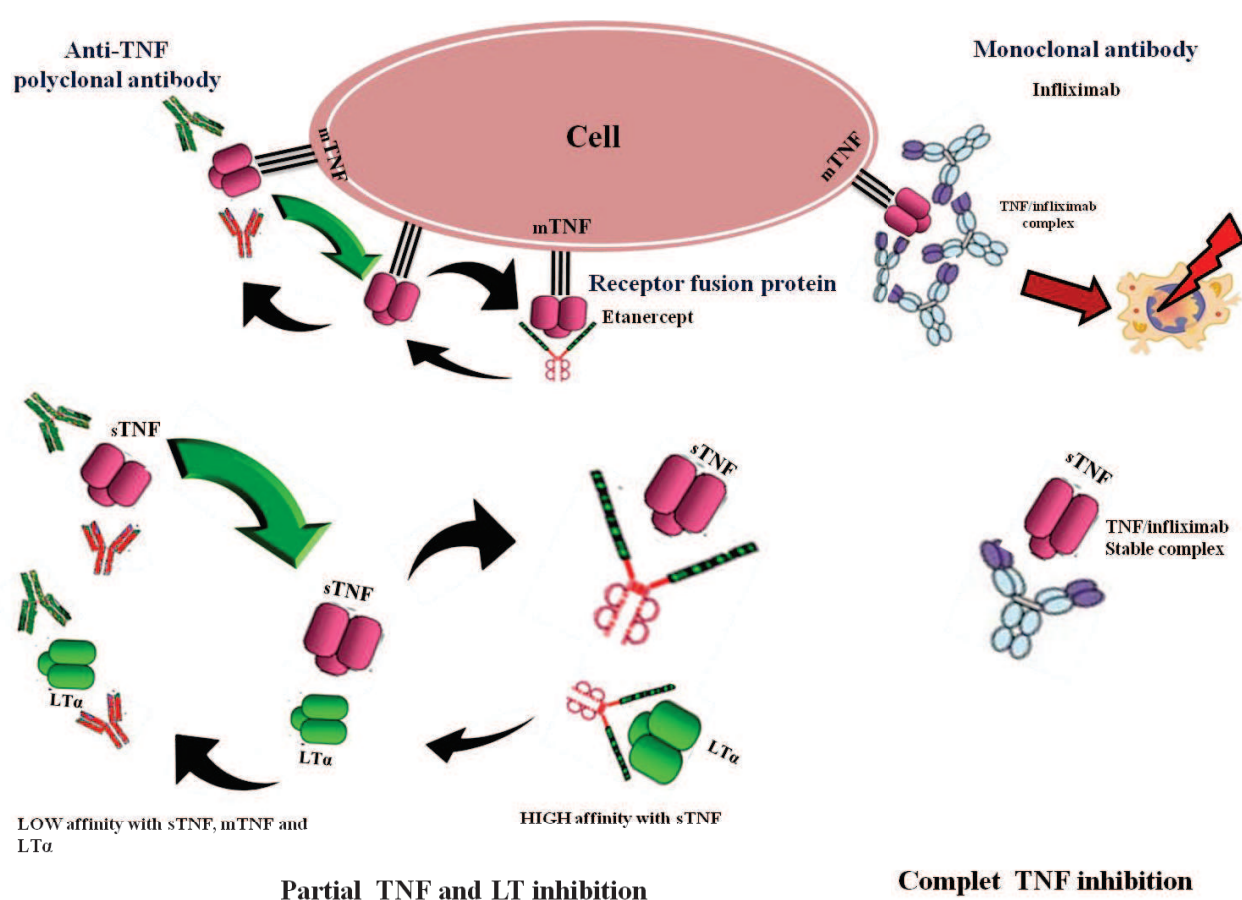


Figure 16 : Hypothèses sur les mécanismes d'action des anticorps polyclonaux anti-TNF

En conclusion, comme de nombreux travaux l'ont montré, la neutralisation complète du TNF par les anticorps monoclonaux anti-TNF augmente le risque infectieux. L'inhibition partielle du TNF avec l'etanercept, peut aussi altérer la réponse antibactérienne, mais les conséquences sont moins graves qu'avec les anticorps monoclonaux. Nos résultats dans les modèles d'infections, suggèrent que les anticorps polyclonaux anti-TNF n'augmentent pas les risques infectieux en comparaison avec les biothérapies anti-TNF. Il est probable que les anticorps polyclonaux limitent partiellement la concentration en TNF- α , notamment lors des pics de production du TNF et/ou en bloquant réversiblement les voies de signalisation de TNF. Cela permet de préserver certains effets bénéfiques du TNF, notamment dans un contexte infectieux. Nos résultats, suggèrent que le blocage du TNF par les anticorps polyclonaux, permet de réduire le seuil de TNF jusqu'à un niveau trop faible pour la progression des arthrites, mais tout en laissant un niveau nécessaire et assez élevé de TNF pour le recrutement cellulaire et l'activation des réponses anti-bactériennes (figure 17).

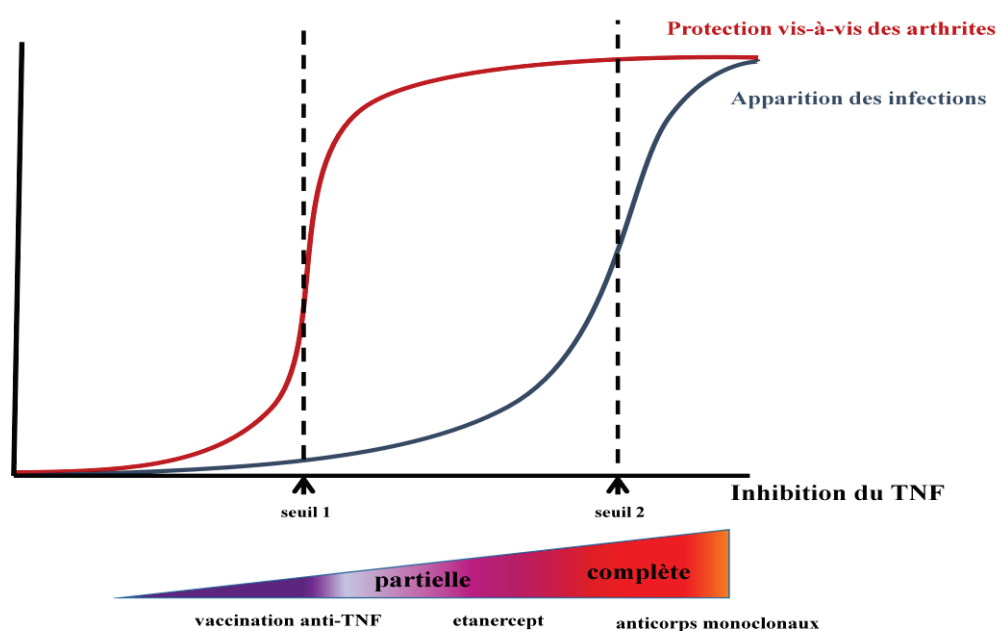


Figure 17 : Hypothèses sur les seuils d'inhibition du TNF par les différentes stratégies anti-TNF

REFERENCES

Aaltonen, K.J., Virkki, L.M., Malmivaara, A., Konttinen, Y.T., Nordström, D.C., and Blom, M. (2012). Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. *PloS One* 7, e30275.

Abreu, C., Magro, F., Vilas-Boas, F., Lopes, S., Macedo, G., and Sarmiento, A. (2013). *Listeria* infection in patients on anti-TNF treatment: Report of two cases and review of the literature. *J. Crohns Colitis* 7, 175–182.

Aikawa, N.E., Rosa, D.T.A., Del Negro, G.M.B., Moraes, J.C.B., Ribeiro, A.C.M., Saad, C.G., Silva, C.A., and Bonfá, E. (2015). Systemic and localized infection by *Candida* species in patients with rheumatic diseases receiving anti-TNF therapy. *Rev. Bras. Reumatol. Engl. Ed.*

Albani, S., Tuckwell, J.E., Esparza, L., Carson, D.A., and Roudier, J. (1992). The susceptibility sequence to rheumatoid arthritis is a cross-reactive B cell epitope shared by the *Escherichia coli* heat shock protein dnaJ and the histocompatibility leukocyte antigen DRB10401 molecule. *J. Clin. Invest.* 89, 327–331.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569–2581.

Allenbach, C., Launois, P., Mueller, C., and Tacchini-Cottier, F. (2008). An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania* major infection. *Eur. J. Immunol.* 38, 720–731.

Alsalameh, S., Winter, K., Al-Ward, R., Wendler, J., Kalden, J.R., and Kinne, R.W. (1999). Distribution of TNF- α , TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF- α is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers. *Scand. J. Immunol.* 49, 278–285.

van Amelsfort, J.M.R., Jacobs, K.M.G., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., and Taams, L.S. (2004). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 50, 2775–2785.

Anderson, C.F., Gerber, J.S., and Mosser, D.M. (2002). Modulating macrophage function with IgG immune complexes. *J. Endotoxin Res.* 8, 477–481.

Andersson, A.K., Li, C., and Brennan, F.M. (2008). Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10, 204.

Aoshi, T., Carrero, J.A., Konjufca, V., Koide, Y., Unanue, E.R., and Miller, M.J. (2009). The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur. J. Immunol.* 39, 417–425.

Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., and Luthra, H.S. (1988). The American Rheumatism

Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31, 315–324.

Arnold-Schrauf, C (2014). Dendritic Cells Coordinate Innate Immunity via MyD88 Signaling to Control *Listeria monocytogenes* Infection.

Assier, E., Semerano, L., Duvallet, E., Delavallée, L., Bernier, E., Laborie, M., Grouard-Vogel, G., Larcier, P., Bessis, N., and Boissier, M.-C. (2012). Modulation of anti-tumor necrosis factor alpha (TNF- α) antibody secretion in mice immunized with TNF- α kinoid. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 19, 699–703.

Auerbuch, V., Brockstedt, D.G., Meyer-Morse, N., O’Riordan, M., and Portnoy, D.A. (2004). Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 200, 527–533.

Auger, I., and Roudier, J. (1997). HLA-DR and the Development of Rheumatoid Arthritis. *Autoimmunity* 26, 123–128.

Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., and Salmaso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 342, 1236–1241.

Azizi, G., Jadidi-Niaragh, F., and Mirshafiey, A. (2013). Th17 Cells in Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 16, 243–253.

Ballara, S., Taylor, P.C., Reusch, P., Marmé, D., Feldmann, M., Maini, R.N., and Paleolog, E.M. (2001). Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 44, 2055–2064.

Baraliakos, X., Listing, J., Rudwaleit, M., Brandt, J., Sieper, J., and Braun, J. (2005). Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 2 years of treatment with the tumour necrosis factor α antibody infliximab. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1462–1466.

Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., and Marmé, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87, 3336–3343.

Barnetche, T., Constantin, A., Cantagrel, A., Cambon-Thomsen, A., and Gourraud, P.-A. (2008). New classification of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis susceptibility: a combined analysis of worldwide samples. *Arthritis Res. Ther.* 10, R26.

Baronnet, L., Barnetche, T., Kahn, V., Lacoïn, C., Richez, C., and Schaefferbeke, T. (2011). Incidence of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis. A systematic literature review. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 78, 279–284.

Barrios-Payán, J., Aguilar-León, D., Lascrain-Ledezma, R., and Hernández-Pando, R. (2006). [Neutrophil participation in early control and immune activation during experimental pulmonary tuberculosis]. *Gac. Médica México* 142, 273–281.

- Bean, A.G., Roach, D.R., Briscoe, H., France, M.P., Korner, H., Sedgwick, J.D., and Britton, W.J. (1999). Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 3504–3511.
- Bekker, L.G., Moreira, A.L., Bergtold, A., Freeman, S., Ryffel, B., and Kaplan, G. (2000). Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect. Immun.* *68*, 6954–6961.
- Bellomo, D., Headrick, J.P., Silins, G.U., Paterson, C.A., Thomas, P.S., Gartside, M., Mould, A., Cahill, M.M., Tonks, I.D., Grimmond, S.M., et al. (2000). Mice Lacking the Vascular Endothelial Growth Factor-B Gene (*Vegfb*) Have Smaller Hearts, Dysfunctional Coronary Vasculature, and Impaired Recovery From Cardiac Ischemia. *Circ. Res.* *86*, e29–e35.
- Benhamou, M., and Fautrel, B. (2009). Biothérapies et rhumatismes inflammatoires. *Médecine Thérapeutique* *15*, 188–196.
- van den Berg, W.B. (2001). Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* *30*, 7–16.
- Bernal, J.A., Andrés, M., Jovaní, V., García Sevilla, R., Begazo, A., and Vela, P. (2016). Primary tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor-alpha antagonists and a negative initial screening. *Reumatol. Clin.* *12*, 81–84.
- Bertin-Maghit, S.M., Capini, C.J., Bessis, N., Chomilier, J., Muller, S., Abbas, A., Autin, L., Spadoni, J.-L., Rappaport, J., Therwath, A., et al. (2005). Improvement of collagen-induced arthritis by active immunization against murine IL-1beta peptides designed by molecular modelling. *Vaccine* *23*, 4228–4235.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235–238.
- Bhardwaj, V., Kanagawa, O., Swanson, P.E., and Unanue, E.R. (1998). Chronic *Listeria* Infection in SCID Mice: Requirements for the Carrier State and the Dual Role of T Cells in Transferring Protection or Suppression. *J. Immunol.* *160*, 376–384.
- Biedermann, T., Röcken, M., and Carballido, J.M. (2004). TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* *9*, 5–14.
- Bielenberg, D.R., Pettaway, C.A., Takashima, S., and Klagsbrun, M. (2006). Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp. Cell Res.* *312*, 584–593.
- Boissier, M. C. Biothérapies en rhumatologie. Ed. Springer Verlag France, Paris. (2011).
- Botha, T., and Ryffel, B. (2003). Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 3110–3118.

- Bouaziz, J.-D., Yanaba, K., and Tedder, T.F. (2008). Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.* 224, 201–214.
- Bouchentouf, R., Yasser, Z., and Aitbenasser, M.A. (2014). [Disseminated tuberculosis following infliximab therapy for Crohn disease: a case report]. *Rev. Pneumol. Clin.* 70, 366–369.
- Bradley, J. (2008a). TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214, 149–160.
- Bradley, J. (2008b). TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214, 149–160.
- Braun, T., and Zwerina, J. (2011). Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 13, 235.
- Breese, E.J., Michie, C.A., Nicholls, S.W., Murch, S.H., Williams, C.B., Domizio, P., Walker-Smith, J.A., and MacDonald, T.T. (1994). Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 106, 1455–1466.
- Brennan FM, I.B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 118, 3537–3545.
- Burr, M.L., Naseem, H., Hinks, A., Eyre, S., Gibbons, L.J., Bowes, J., Wilson, A.G., Maxwell, J., Morgan, A.W., Emery, P., et al. (2010). PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 666–670.
- Busch, D.H., Pilip, I.M., Vijh, S., and Pamer, E.G. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8, 353–362.
- Butler, D.M., Maini, R.N., Feldmann, M., and Brennan, F.M. (1995). 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.* 6, 225–230.
- Bystrom, J., Clancy, F., Taher, T.E., Mangat, P., Jawad, A.S., Williams, R.O., and Mageed, R.A. (2016). TNF α in the regulation of Treg and Th17 cells in rheumatoid arthritis and other autoimmune inflammatory diseases. *Cytokine*.
- Capini, C.J., Bertin-Maghit, S.M., Bessis, N., Haumont, P.M., Bernier, E.M., Muel, E.G., Laborie, M.A., Autin, L., Paturance, S., Chomilier, J., et al. (2004). Active immunization against murine TNF α peptides in mice: generation of endogenous antibodies cross-reacting with the native cytokine and in vivo protection. *Vaccine* 22, 3144–3153.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., et al. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 7, 575–583.

Carrero, J.A., Calderon, B., and Unanue, E.R. (2004). Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. *J. Exp. Med.* *200*, 535–540.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 3666–3670.

Carvalho, H., da Silva, J.A.P., and Souto-Carneiro, M.M. (2013). Potential roles for CD8+ T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* *12*, 401–409.

Chabaud, M., Garnero, P., Dayer, J.-M., Guerne, P.-A., Fossiez, F., and Miossec, P. (2000). CONTRIBUTION OF INTERLEUKIN 17 TO SYNOVIUM MATRIX DESTRUCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *Cytokine* *12*, 1092–1099.

Chang, K., Yang, S.M., Kim, S.H., Han, K.H., Park, S.J., and Shin, J.I. (2014). Smoking and Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 22279–22295.

Charles A. Janeway, J., and Medzhitov, and R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197–216.

Chen, W.S., Kitson, R.P., and Goldfarb, R.H. (2002). Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *Vivo Athens Greece* *16*, 439–445.

Choy, E., and Ira Allen (2014). Biosimilar Safety Considerations in Clinical Practice. *Semin. Oncol.* *41*, S3–S14.

Chu, C.Q., Field, M., Feldmann, M., and Maini, R.N. (1991). Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *34*, 1125–1132.

Clavel, G., Bessis, N., and Boissier, M.-C. (2003). Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* *70*, 321–326.

Clavel, G., Bessis, N., Lemeiter, D., Fardellone, P., Mejjad, O., Ménard, J.-F., Pouplin, S., Boumier, P., Vittecoq, O., Le Loët, X., et al. (2007). Angiogenesis markers (VEGF, soluble receptor of VEGF and angiopoietin-1) in very early arthritis and their association with inflammation and joint destruction. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *124*, 158–164.

Cohen, I.R., Holoshitz, J., van Eden, W., and Frenkel, A. (1985). T lymphocyte clones illuminate pathogenesis and affect therapy of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* *28*, 841–845.

Cohen, S., Bigazzi, P.E., and Yoshida, T. (1974). Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell. Immunol.* *12*, 150–159.

Cohen, S.B., Dore, R.K., Lane, N.E., Ory, P.A., Peterfy, C.G., Sharp, J.T., van der Heijde, D., Zhou, L., Tsuji, W., Newmark, R., et al. (2008). Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month,

multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum.* 58, 1299–1309.

Conlan, J.W., and North, R.J. (1994). Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 179, 259–268.

Corr, S.C., and O'Neill, L.A.J. (2009). *Listeria monocytogenes* infection in the face of innate immunity. *Cell. Microbiol.* 11, 703–709.

Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host–pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 19484–19491.

Cossart, P., and Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.* 10, 1041–1050.

Costenbader, K.H., Feskanich, D., Mandl, L.A., and Karlson, E.W. (2006). Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am. J. Med.* 119, 503.e1–e9.

Courvoisier, N., Dougados, M., Cantagrel, A., Goupille, P., Meyer, O., Sibilia, J., Daures, J.P., and Combe, B. (2008). Prognostic factors of 10-year radiographic outcome in early rheumatoid arthritis: a prospective study. *Arthritis Res. Ther.* 10, R106.

Criswell, L.A. (2010). Gene discovery in rheumatoid arthritis highlights the CD40/NF- κ B signaling pathway in disease pathogenesis. *Immunol. Rev.* 233, 55–61.

Czuprynski, C.J., Brown, J.F., Maroushek, N., Wagner, R.D., and Steinberg, H. (1994). Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 152, 1836–1846.

Daha, N.A., Kurreeman, F.A.S., Marques, R.B., Stoeken-Rijsbergen, G., Verduijn, W., Huizinga, T.W.J., and Toes, R.E.M. (2009). Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 1255–1260.

Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., and Griffin, P.M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* 336, 100–105.

Dalum, I., Butler, D.M., Jensen, M.R., Hindersson, P., Steinaa, L., Waterston, A.M., Grell, S.N., Feldmann, M., Elsner, H.I., and Mouritsen, S. (1999). Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF- α . *Nat. Biotechnol.* 17, 666–669.

Daniel, T.M. (2006). The history of tuberculosis. *Respir. Med.* 100, 1862–1870.

van Dartel, S.A.A., Fransen, J., Kievit, W., Flendrie, M., den Broeder, A.A., Visser, H., Hartkamp, A., van de Laar, M.A.F.J., and van Riel, P.L.C.M. (2013). Difference in the risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab, infliximab and etanercept: results from the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring (DREAM) registry. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 895–900.

Dayer, J.-M. (2002). The saga of the discovery of IL-1 and TNF and their specific inhibitors in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 69, 123–132.

Dayer, J.M., Bréard, J., Chess, L., and Krane, S.M. (1979). Participation of monocyte-macrophages and lymphocytes in the production of a factor that stimulates collagenase and prostaglandin release by rheumatoid synovial cells. *J. Clin. Invest.* 64, 1386–1392.

Dayer, J.M., B., and A. (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* 162, 2163–2168.

Deane, K.D., and El-Gabalawy, H. (2014). Pathogenesis and prevention of rheumatic disease: focus on preclinical RA and SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 212–228.

Delavallée, L., Le Buanec, H., Bessis, N., Assier, E., Denys, A., Bizzini, B., Zagury, D., and Boissier, M.-C. (2008a). Early and long-lasting protection from arthritis in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) transgenic mice vaccinated against TNFalpha. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 1332–1338.

Delavallée, L., Le Buanec, H., Bessis, N., Assier, E., Denys, A., Bizzini, B., Zagury, D., and Boissier, M.-C. (2008b). Early and long-lasting protection from arthritis in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) transgenic mice vaccinated against TNFalpha. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 1332–1338.

Delavallée, L., Semerano, L., Assier, E., Vogel, G., Vuagniaux, G., Laborie, M., Zagury, D., Bessis, N., and Boissier, M.-C. (2009). Active immunization to tumor necrosis factor-alpha is effective in treating chronic established inflammatory disease: a long-term study in a transgenic model of arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11, R195.

Delavallée, L., Duvallet, E., Semerano, L., Assier, E., and Boissier, M. (2010). Anti-cytokine vaccination in autoimmune diseases. *Swiss Med. Wkly.*

Dheda, K., Barry 3rd, C.E., and Maartens, G. (2016). Tuberculosis. *The Lancet* 387, 1211–1226.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095–2147.

Dinarello, C.A. (1997). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112, 321S – 329S.

Douni, E., Sfrikakis, P.P., Haralambous, S., Fernandes, P., and Kollias, G. (2004). Attenuation of inflammatory polyarthritis in TNF transgenic mice by diacerein: comparative analysis with dexamethasone, methotrexate and anti-TNF protocols. *Arthritis Res. Ther.* 6, R65–R72.

Durez, P., Vandepapeliere, P., Miranda, P., Toncheva, A., Berman, A., Kehler, T., Mociran, E., Fautrel, B., Mariette, X., Dhellin, O., et al. (2014). Therapeutic vaccination with TNF-Kinoid in TNF antagonist-resistant rheumatoid arthritis: a phase II randomized, controlled clinical trial. *PloS One* 9, e113465.

Ebert, E.C. (2009). Infliximab and the TNF- α system. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G612–G620.

Efimov, G.A., Kruglov, A.A., Tillib, S.V., Kuprash, D.V., and Nedospasov, S.A. (2009). Tumor Necrosis Factor and the consequences of its ablation in vivo. *Mol. Immunol.* 47, 19–27.

Ehlers, S. (2003). Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann. Rheum. Dis.* 62, ii37–ii42.

Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–676.

Finelli, A., Kerksiek, K.M., Allen, S.E., Marshall, N., Mercado, R., Pilip, I., Busch, D.H., and Pamer, E.G. (1999). MHC class I restricted T cell responses to *Listeria monocytogenes*, an intracellular bacterial pathogen. *Immunol. Res.* 19, 211–223.

FitzGerald, O., Soden, M., Yanni, G., Robinson, R., and Bresnihan, B. (1991). Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 50, 792–796.

Fleischmann, R., Vencovsky, J., van Vollenhoven, R.F., Borenstein, D., Box, J., Coteur, G., Goel, N., Brezinschek, H.-P., Innes, A., and Strand, V. (2009). Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 805–811.

Förger, F., Marcoli, N., Gadola, S., Möller, B., Villiger, P.M., and Østensen, M. (2008). Pregnancy induces numerical and functional changes of CD4+CD25 high regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 984–990.

Fu, Y.X., and Chaplin, D.D. (1999). Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 399–433.

Furst, D., Breedveld, F., Kalden, J., Smolen, J., Burmester, G., Bijlsma, J., Dougados, M., Emery, P., Keystone, E., Klareskog, L., et al. (2004). Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor α (TNF α) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases, 2004. *Ann. Rheum. Dis.* 63, ii2–ii12.

Gagnon, M.L., Bielenberg, D.R., Gechtman, Z., Miao, H.Q., Takashima, S., Soker, S., and Klagsbrun, M. (2000). Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2573–2578.

Garrod, A.B (1867). *La goutte. Sa nature, son traitement et le rhumatisme goutteux.*

Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the

phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273, 30336–30343.

Ghivizzani, S.C., Kang, R., Georgescu, H.I., Lechman, E.R., Jaffurs, D., Engle, J.M., Watkins, S.C., Tindal, M.H., Suchanek, M.K., McKenzie, L.R., et al. (1997). Constitutive intra-articular expression of human IL-1 beta following gene transfer to rabbit synovium produces all major pathologies of human rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 159, 3604–3612.

Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Shibuya, M., and Neufeld, G. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 18688–18694.

Golovliov, I., Baranov, V., Krocova, Z., Kovarova, H., and Sjöstedt, A. (2003). An Attenuated Strain of the Facultative Intracellular Bacterium *Francisella tularensis* Can Escape the Phagosome of Monocytic Cells. *Infect. Immun.* 71, 5940–5950.

Gonzalez-Gay, M.A., Garcia-Porrua, C., and Hajeer, A.H. (2002). Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 31, 355–360.

Gordon, K., Papp, K., Poulin, Y., Gu, Y., Rozzo, S., and Sasso, E.H. (2012). Long-term efficacy and safety of adalimumab in patients with moderate to severe psoriasis treated continuously over 3 years: Results from an open-label extension study for patients from REVEAL. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66, 241–251.

Gottlieb, A.B., Evans, R., Li, S., Dooley, L.T., Guzzo, C.A., Baker, D., Bala, M., Marano, C.W., and Menter, A. (2004). Infliximab induction therapy for patients with severe plaque-type psoriasis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51, 534–542.

Gracie, J.A., Forsey, R.J., Chan, W.L., Gilmour, A., Leung, B.P., Greer, M.R., Kennedy, K., Carter, R., Wei, X.-Q., Xu, D., et al. (1999). A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 104, 1393–1401.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397–402.

Guillemin, F., Saraux, A., Guggenbuhl, P., Roux, C., Fardellone, P., Le Bihan, E., Cantagrel, A., Chary-Valckenaere, I., Euler-Ziegler, L., Flipo, R., et al. (2005). Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1427–1430.

Guillot, X., Semerano, L., Saidenberg-Kermanac'h, N., Falgarone, G., and Boissier, M.-C. (2010). Vitamin D and inflammation. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 77, 552–557.

Guirado, E., Schlesinger, L.S., and Kaplan, G. (2013). Macrophages in Tuberculosis: Friend or Foe. *Semin. Immunopathol.* 35, 563–583.

- Guleria, I., and Pollard, J.W. (2001). Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Infect. Immun.* 69, 1795–1807.
- Harada, M., Mitsuyama, K., Yoshida, H., Sakisaka, S., Taniguchi, E., Kawaguchi, T., Ariyoshi, M., Saiki, T., Sakamoto, M., Nagata, K., et al. (1998). Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 27, 377–380.
- Harty, J.T., and Bevan, M.J. (1995). Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma. *Immunity* 3, 109–117.
- Havell, E.A. (1987). Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *J. Immunol.* 139, 4225–4231.
- Haworth, C., Brennan, F.M., Chantry, D., Turner, M., Maini, R.N., and Feldmann, M. (1991). Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: Regulation by tumor necrosis factor- α . *Eur. J. Immunol.* 21, 2575–2579.
- Hirohata, S., and Sakakibara, J. (1999). Angiogenesis as a possible elusive triggering factor in rheumatoid arthritis. *Lancet Lond. Engl.* 353, 1331.
- Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Adv. Immunol.* 81, 331–371.
- Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L., and Glimcher, L.H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307, 430–433.
- Inman, R.D., Clegg, D.O., Davis, J.C., Whitmore, J.B., and Solinger, A. (2006). Etanercept in adult patients with early onset ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.* 33, 1634–1636.
- Jacobs, M.R., and Haynes, B.F. (1992). Increase in TCR gamma delta T lymphocytes in synovia from rheumatoid arthritis patients with active synovitis. *J. Clin. Immunol.* 12, 130–138.
- Jani, M., Barton, A., Warren, R.B., Griffiths, C.E.M., and Chinoy, H. (2014). The role of DMARDs in reducing the immunogenicity of TNF inhibitors in chronic inflammatory diseases. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 53, 213–222.
- Jawaheer, D., Li, W., Graham, R.R., Chen, W., Damle, A., Xiao, X., Monteiro, J., Khalili, H., Lee, A., Lundsten, R., et al. (2002). Dissecting the Genetic Complexity of the Association between Human Leukocyte Antigens and Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 585–594.
- Jeffrey M, and J Z (1988). *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. *CMAJ Can. Med. Assoc. J.* 138, 413–418.
- Jia, T., Pan, Y., Li, J., and Wang, L. (2013). Strategies for active TNF- α vaccination in rheumatoid arthritis treatment. *Vaccine* 31, 4063–4068.

Joosten, L.A., Helsen, M.M., van de Loo, F.A., and van den Berg, W.B. (1996). Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum.* 39, 797–809.

Joosten, L.A., Helsen, M.M., Saxne, T., van De Loo, F.A., Heinegard, D., and van Den Berg, W.B. (1999). IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 5049–5055.

Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. (1997). Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* 16, 3898–3911.

Kaneko, H., Yamada, H., Mizuno, S., Udagawa, T., Kazumi, Y., Sekikawa, K., and Sugawara, I. (1999). Role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 79, 379–386.

Kanik, K.S., Hagiwara, E., Yarboro, C.H., Schumacher, H.R., Wilder, R.L., and Klinman, D.M. (1998). Distinct patterns of cytokine secretion characterize new onset synovitis versus chronic rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 25, 16–22.

Kaslow, R.A., Duquesnoy, R., VanRaden, M., Kingsley, L., Marrari, M., Friedman, H., Su, S., Saah, A.J., Detels, R., and Phair, J. (1990). A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Lancet* 335, 927–930.

Kaufmann, S.H.E., and McMichael, A.J. (2005). Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med.* 11, S33–S44.

Kawakami, M., Furuhashi, T., Kimura, Y., Yamaguchi, K., Hata, F., Sasaki, K., and Hirata, K. (2003). Expression analysis of vascular endothelial growth factors and their relationships to lymph node metastasis in human colorectal cancer. *J. Exp. Clin. CANCER Res.* 22, 229–238.

Keane, J., Gershon, S., Wise, R.P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwiertman, W.D., Siegel, J.N., and Braun, M.M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 345, 1098–1104.

Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., and Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10, 4025–4031.

Kendall, R.L., and Thomas, K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10705–10709.

King, T., Ferenci, T., and Szabo, E.A. (2003). The effect of growth atmosphere on the ability of *Listeria monocytogenes* to survive exposure to acid, proteolytic enzymes and bile salts. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 133–143.

Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., and Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Dev. Camb. Engl.* 121, 4309–4318.

Kondratieva, T.K., Linge, I.A., Kondratieva, E.V., Dyatlov, A.V., Drutskaya, M.S., Zvartsev, R.V., Nedospasov, S.A., and Apt, A.S. (2014). Formation of compact aggregates of B-lymphocytes in lung tissue during mycobacterial infection in mice depends on TNF production by these cells and is not an element of the host's immunological protection. *Biochem. Biokhimiia* 79, 1358–1362.

Kong, J.-S., Yoo, S.-A., Kim, J.-W., Yang, S.-P., Chae, C.-B., Tarallo, V., De Falco, S., Ryu, S.-H., Cho, C.-S., and Kim, W.-U. (2010). Anti-neuropilin-1 peptide inhibition of synoviocyte survival, angiogenesis, and experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 179–190.

Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., et al. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402, 304–309.

Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F., and Kollias, G. (1999). Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements: Implications for Joint and Gut-Associated Immunopathologies. *Immunity* 10, 387–398.

Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., et al. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 103, 1345–1352.

Krishnan, E., Sokka, T., and Hannonen, P. (2003). Smoking-gender interaction and risk for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 5, R158–R162.

Kurata, H., Lee, H.J., O'Garra, A., and Arai, N. (1999). Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 11, 677–688.

Landré-Beauvais, A.J. (2001). The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 68, 130–143.

Larsson, P., Goldschmidt, T.J., Klareskog, L., and Holmdahl, R. (1989). Oestrogen-Mediated Suppression of Collagen-Induced Arthritis in Rats. *Scand. J. Immunol.* 30, 741–747.

Le Blay, P., Mouterde, G., Barnetche, T., Morel, J., and Combe, B. (2012). Risk of malignancy including non-melanoma skin cancers with anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis: meta-analysis of registries and systematic review of long-term extension studies. *Clin. Exp. Rheumatol.* 30, 756–764.

Le Buanec, H., Delavallée, L., Bessis, N., Paturance, S., Bizzini, B., Gallo, R., Zagury, D., and Boissier, M.-C. (2006). TNFalpha kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNFalpha protect mice from autologous TNFalpha-driven chronic and acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19442–19447.

Le Buanec, H., Paturance, S., Couillin, I., Schnyder-Candrian, S., Larcier, P., Ryffel, B., Bizzini, B., Bensussan, A., Burny, A., Gallo, R., et al. (2007). Control of allergic reactions in mice by an active anti-murine IL-4 immunization. *Vaccine* 25, 7206–7216.

LeCouter, J., Moritz, D.R., Li, B., Phillips, G.L., Liang, X.H., Gerber, H.-P., Hillan, K.J., and Ferrara, N. (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299, 890–893.

Lecuit, M. (2005). Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 430–436.

Leombruno, J.P., Einarson, T.R., and Keystone, E.C. (2009). The safety of anti-tumour necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: meta and exposure-adjusted pooled analyses of serious adverse events. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 1136–1145.

Levine, R.J., Maynard, S.E., Qian, C., Lim, K.-H., England, L.J., Yu, K.F., Schisterman, E.F., Thadhani, R., Sachs, B.P., Epstein, F.H., et al. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 350, 672–683.

Li, P., Schwarz, E.M., O’Keefe, R.J., Ma, L., Boyce, B.F., and Xing, L. (2004). RANK signaling is not required for TNF α -mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNF α -mediated inflammatory arthritis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 19, 207–213.

Lin, J., Liu, J., Davies, M.L., and Chen, W. (2016). Serum Vitamin D Level and Rheumatoid Arthritis Disease Activity: Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 11.

Liu, J., Marino, M.W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., Bettadapura, J., Slavin, A.J., Old, L., and Bernard, C.C.A. (1998). TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat. Med.* 4, 78–83.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 104, 487–501.

Loo, A.A. van de, and Berg, W.B. van den (1990). Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* 49, 238–245.

van de Loo, F.A.J., and van den Berg, W.B. (2002). Gene therapy for rheumatoid arthritis. Lessons from animal models, including studies on interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1 receptor antagonist as potential disease modulators. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 28, 127–149.

Lubberts, E., Koenders, M.I., and van den Berg, W.B. (2005). The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.* 7, 29–37.

Lügering, A., Schmidt, M., Lügering, N., Pauels, H.G., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2001). Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 121, 1145–1157.

Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., et al. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 7, 1194–1201.

Lymboussaki, A., Olofsson, B., Eriksson, U., and Alitalo, K. (1999). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF-C Show Overlapping Binding Sites in Embryonic Endothelia and Distinct Sites in Differentiated Adult Endothelia. *Circ. Res.* 85, 992–999.

MacGregor, A.J., Snieder, H., Rigby, A.S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K., and Silman, A.J. (2000). Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 43, 30–37.

MacMicking, J.D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D.S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q.W., Sokol, K., and Hutchinson, N. (1995). Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81, 641–650.

MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., and Nathan, C.F. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5243–5248.

Maeno, N., Takei, S., Imanaka, H., Takasaki, I., Kitajima, I., Maruyama, I., Matsuo, K., and Miyata, K. (1999). Increased circulating vascular endothelial growth factor is correlated with disease activity in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 26, 2244–2248.

Makinen, T., Olofsson, B., Karpanen, T., Hellman, U., Soker, S., Klagsbrun, M., Eriksson, U., and Alitalo, K. (1999). Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J. Biol. Chem.* 274, 21217–21222.

Månsson, B., Carey, D., Alini, M., Ionescu, M., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., Heinegård, D., and Saxne, T. (1995). Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J. Clin. Invest.* 95, 1071–1077.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555.

Maracle, C.X., and Tas, S.W. (2014). Inhibitors of angiogenesis: Ready for prime time? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 28, 637–649.

Marino, S., Linderman, J., and Kirschner, D.E. (2011). A Multi-Faceted Approach to Modeling the immune response in Tuberculosis. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 3, 479–489.

- Martinez, A., Valdivia, A., Pascual-Salcedo, D., Lamas, J.R., Fernández-Arquero, M., Balsa, A., Fernández-Gutiérrez, B., de la Concha, E.G., and Urcelay, E. (2005). PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *44*, 1263–1266.
- Martinez-Gamboa, L., Brezinschek, H.-P., Burmester, G.R., and Dörner, T. (2006). Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. *Autoimmun. Rev.* *5*, 437–442.
- Martinez-Taboada, V.M., Blanco, R., Fito, C., Pacheco, M.J., Delgado-Rodriguez, M., and Rodriguez-Valverde, V. (2001). Circulating CD8⁺ T cells in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: a review. *Semin. Arthritis Rheum.* *30*, 257–271.
- Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2001*, re21.
- Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. B cells. *Arthritis Res. Ther.* *9*, 205.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., and Londei, M. (2003). Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* *197*, 489–501.
- Mercado, F.B., Marshall, R.I., and Bartold, P.M. (2003). Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J. Clin. Periodontol.* *30*, 761–772.
- Merlino, L.A., Curtis, J., Mikuls, T.R., Cerhan, J.R., Criswell, L.A., Saag, K.G., and Iowa Women's Health Study (2004). Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.* *50*, 72–77.
- Metheny-Barlow, L.J., and Li, L.Y. (2003). The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis. *Cell Res.* *13*, 309–317.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H.J., and Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* *18*, 363–374.
- Miao, H.Q., and Klagsbrun, M. (2000). Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* *19*, 29–37.
- Michou, L., Lasbleiz, S., Rat, A.-C., Migliorini, P., Balsa, A., Westhovens, R., Barrera, P., Alves, H., Pierlot, C., Glikmans, E., et al. (2007). Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1649–1654.
- Miehlsler, W., Novacek, G., Wenzl, H., Vogelsang, H., Knoflach, P., Kaser, A., Dejaco, C., Petritsch, W., Kapitan, M., Maier, H., et al. (2010). A decade of infliximab: The Austrian evidence based consensus on the safe use of infliximab in inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* *4*, 221–256.

- Miyara, M., Gorochoy, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., and Amoura, Z. (2011). Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* *10*, 744–755.
- Mogues, T., Goodrich, M.E., Ryan, L., LaCourse, R., and North, R.J. (2001). The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Exp. Med.* *193*, 271–280.
- Moran, E.M., Mullan, R., McCormick, J., Connolly, M., Sullivan, O., FitzGerald, O., Bresnihan, B., Veale, D.J., and Fearon, U. (2009). Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor- α , Oncostatin M and response to biologic therapies. *Arthritis Res. Ther.* *11*, R113.
- Moreland, L.W., Baumgartner, S.W., Schiff, M.H., Tindall, E.A., Fleischmann, R.M., Weaver, A.L., Ettlinger, R.E., Cohen, S., Koopman, W.J., Mohler, K., et al. (1997). Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med.* *337*, 141–147.
- Morgan, M.E., Suttmüller, R.P.M., Witteveen, H.J., van Duivenvoorde, L.M., Zanelli, E., Melief, C.J.M., Snijders, A., Offringa, R., de Vries, R.R.P., and Toes, R.E.M. (2003). CD25⁺ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* *48*, 1452–1460.
- Mottet, C., Uhlig, H.H., and Powrie, F. (2003). Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 3939–3943.
- Mould, A.W., Tonks, I.D., Cahill, M.M., Pettit, A.R., Thomas, R., Hayward, N.K., and Kay, G.F. (2003). Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum.* *48*, 2660–2669.
- Mukhopadhyay, S., Hoidal, J.R., and Mukherjee, T.K. (2006). Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respir. Res.* *7*, 125.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., and Swann, M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* *29*.
- Myllykangas-Luosujärvi, R., Aho, K., Kautiainen, H., and Isomäki, H. (1995). Shortening of life span and causes of excess mortality in a population-based series of subjects with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *13*, 149–153.
- Nash, A.D., Baca, M., Wright, C., and Scotney, P.D. (2006). The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm. Pharmacol. Ther.* *19*, 61–69.
- Navarro-González, J.F., Jarque, A., Muros, M., Mora, C., and García, J. (2009). Tumor necrosis factor- α as a therapeutic target for diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 165–173.

- Nawashiro, H., Martin, D., and Hallenbeck, J.M. (1997). Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 778, 265–271.
- Nelson, J.L., Koepsell, T.D., Dugowson, C.E., Voigt, L.F., Daling, J.R., and Hansen, J.A. (1993). Fecundity before disease onset in women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 36, 7–14.
- Nickol, A.D., and Bonventre, P.F. (1977). Anomalous high native resistance to athymic mice to bacterial pathogens. *Infect. Immun.* 18, 636–645.
- Niedbala, W., Wei, X.-Q., Cai, B., Hueber, A.J., Leung, B.P., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 3021–3029.
- Nikolopoulou-Papaconstantinou, A.A., Johannessen, A.C., and Kristoffersen, T. (1987). Deposits of immunoglobulins, complement, and immune complexes in inflamed human gingiva. *Acta Odontol. Scand.* 45, 187–193.
- Nogueira, E., Gomes, A.C., Preto, A., and Cavaco-Paulo, A. (2016). Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 12, 1113–1126.
- Nordang, G.B.N., Flåm, S.T., Maehlen, M.T., Kvien, T.K., Viken, M.K., and Lie, B.A. (2013). HLA-C alleles confer risk for anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis independent of HLA-DRB1 alleles. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 1973–1982.
- Ohno, H., Uemura, Y., Murooka, H., Takanashi, H., Tokieda, T., Ohzeki, Y., Kubo, K., and Serizawa, I. (2008). The orally-active and selective c-Fms tyrosine kinase inhibitor Ki20227 inhibits disease progression in a collagen-induced arthritis mouse model. *Eur. J. Immunol.* 38, 283–291.
- Olleros, M.L., Guler, R., Corazza, N., Vesin, D., Eugster, H.-P., Marchal, G., Chavarot, P., Mueller, C., and Garcia, I. (2002). Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection in the absence of secreted TNF and lymphotoxin- α . *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 3394–3401.
- Pajusola, K., Aprelikova, O., Armstrong, E., Morris, S., and Alitalo, K. (1993). Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene* 8, 2931–2937.
- Pamer, E.G. (2004a). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 812–823.
- Pamer, E.G. (2004b). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 812–823.
- Papp, K.A., Poulin, Y., Bissonnette, R., Bourcier, M., Toth, D., Rosoph, L., Poulin-Costello, M., Setterfield, M., and Syrotuik, J. (2012). Assessment of the long-term safety and

effectiveness of etanercept for the treatment of psoriasis in an adult population. *J. Am. Acad. Dermatol.* *66*, e33–e45.

Peck, A., and Mellins, E.D. (2009). Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin. Immunol.* *132*, 295–304.

Pedrosa, J., Saunders, B.M., Appelberg, R., Orme, I.M., Silva, M.T. and, and Cooper, A.M. (2000). Neutrophils Play a Protective Nonphagocytic Role in Systemic Mycobacterium tuberculosis Infection of Mice. *Infect. Immun.* *68*, 577–583.

Pettit, A.R., Ji, H., von Stechow, D., Müller, R., Goldring, S.R., Choi, Y., Benoist, C., and Gravalles, E.M. (2001). TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am. J. Pathol.* *159*, 1689–1699.

Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kündig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Krönke, M., and Mak, T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* *73*, 457–467.

Pickens, S.R., Volin, M.V., Mandelin, A.M., Kolls, J.K., Pope, R.M., and Shahrara, S. (2010). IL-17 Contributes to Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* *184*, 3233–3241.

Piguet, P.F., Grau, G.E., Vesin, C., Loetscher, H., Gentz, R., and Lesslauer, W. (1992). Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* *77*, 510–514.

Pitt, J.M., Blankley, S., Potempa, K., Graham, C.M., Moreira-Teixeira, L., McNab, F.W., Howes, A., Stavropoulos, E., Pascual, V., Banchereau, J., et al. (2016). Analysis of Transcriptional Signatures in Response to *Listeria monocytogenes* Infection Reveals Temporal Changes That Result from Type I Interferon Signaling. *PLoS ONE* *11*.

Plenge, R.M., Seielstad, M., Padyukov, L., Lee, A.T., Remmers, E.F., Ding, B., Liew, A., Khalili, H., Chandrasekaran, A., Davies, L.R.L., et al. (2007). TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1199–1209.

Plessner, H.L., Lin, P.L., Kohno, T., Louie, J.S., Kirschner, D., Chan, J., and Flynn, J.L. (2007a). Neutralization of Tumor Necrosis Factor (TNF) by Antibody but not TNF Receptor Fusion Molecule Exacerbates Chronic Murine Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* *195*, 1643–1650.

Plessner, H.L., Lin, P.L., Kohno, T., Louie, J.S., Kirschner, D., Chan, J., and Flynn, J.L. (2007b). Neutralization of Tumor Necrosis Factor (TNF) by Antibody but not TNF Receptor Fusion Molecule Exacerbates Chronic Murine Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* *195*, 1643–1650.

Plum, S.M., Holaday, J.W., Ruiz, A., Madsen, J.W., Fogler, W.E., and Fortier, A.H. (2000). Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. *Vaccine* *19*, 1294–1303.

Prete, M., Racanelli, V., Digiglio, L., Vacca, A., Dammacco, F., and Perosa, F. (2011). Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun. Rev.* *11*, 123–131.

Prezzemolo, T., Guggino, G., La Manna, M.P., Di Liberto, D., Dieli, F., and Caccamo, N. (2014). Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Front. Immunol.* 5, 180.

Qi, S., Xin, R., Guo, W., and Liu, Y. (2014). Meta-analysis of oral contraceptives and rheumatoid arthritis risk in women. *Ther. Clin. Risk Manag.* 10, 915–923.

Rad, F.H., Le Buanec, H., Paturance, S., Larcier, P., Genne, P., Ryffel, B., Bensussan, A., Bizzini, B., Gallo, R.C., Zagury, D., et al. (2007). VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2837–2842.

Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B.A.W., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., and van Venrooij, W.J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2741–2749.

Redlich, K., Hayer, S., Ricci, R., David, J.-P., Tohidast-Akrad, M., Kollias, G., Steiner, G., Smolen, J.S., Wagner, E.F., and Schett, G. (2002). Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J. Clin. Invest.* 110, 1419–1427.

Remer, K.A., Pfister, H., Fatzer, R., Leib, S.L., and Jungi, T.W. (2002). [The role of nitric oxide in Listeria encephalitis of ruminants and in rats intracisternally infected with Listeria monocytogenes]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 115, 259–266.

Rogers, H.W., and Unanue, E.R. (1993). Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to Listeria monocytogenes in mice. *Infect. Immun.* 61, 5090–5096.

Röhn, T.A., Jennings, G.T., Hernandez, M., Grest, P., Beck, M., Zou, Y., Kopf, M., and Bachmann, M.F. (2006). Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 36, 2857–2867.

Romas, E., Sims, N.A., Hards, D.K., Lindsay, M., Quinn, J.W.M., Ryan, P.F.J., Dunstan, C.R., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (2002). Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am. J. Pathol.* 161, 1419–1427.

Rooney, M., Condell, D., Quinlan, W., Daly, L., Whelan, A., Feighery, C., and Bresnihan, B. (1988). Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31, 956–963.

Rothe, J., Lesslauer, W., Lötscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Köntgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., and Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. *Nature* 364, 798–802.

Roudier, J., Rhodes, G., Petersen, J., Vaughan, J.H., and Carson, D.A. (1988). The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 27, 367–371.

Roux, C.H., Saraux, A., Le Bihan, E., Fardellone, P., Guggenbuhl, P., Fautrel, B., Masson, C., Chary-Valckenaere, I., Cantagrel, A., Juvin, R., et al. (2007). Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: geographical variations in prevalence in France. *J. Rheumatol.* *34*, 117–122.

Rychly, D.J., and DiPiro, J.T. (2005). Infections Associated with Tumor Necrosis Factor- α Antagonists. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* *25*, 1181–1192.

Saag, K.G., Koehnke, R., Caldwell, J.R., Brasington, R., Burmeister, L.F., Zimmerman, B., Kohler, J.A., and Furst, D.E. (1994). Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. *Am. J. Med.* *96*, 115–123.

Saidenberg-Kermanac'h, N., Bessis, N., Deleuze, V., Bloquel, C., Bureau, M., Scherman, D., and Boissier, M.-C. (2003). Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis. *J. Gene Med.* *5*, 164–171.

Saidenberg-Kermanac'h, N., Semerano, L., Naccache, J.M., Brauner, M., Falgarone, G., Dumont-Fischer, D., Guillot, X., Valeyre, D., and Boissier, M.-C. (2012). Screening for latent tuberculosis in anti-TNF- α candidate patients in a high tuberculosis incidence setting. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* *16*, 1307–1314.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 1151–1164.

Samuels, J., Ng, Y.-S., Coupillaud, C., Paget, D., and Meffre, E. (2005). Human B cell tolerance and its failure in rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1062*, 116–126.

Sandborn, W.J., Hanauer, S.B., Katz, S., Safdi, M., Wolf, D.G., Baerg, R.D., Tremaine, W.J., Johnson, T., Diehl, N.N., and Zinsmeister, A.R. (2001). Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* *121*, 1088–1094.

Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Radford-Smith, G., Kovacs, A., Enns, R., Innes, A., and Patel, J. (2004). CDP571, a humanised monoclonal antibody to tumour necrosis factor α , for moderate to severe Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled trial. *Gut* *53*, 1485–1493.

Saunders, B.M., Tran, S., Ruuls, S., Sedgwick, J.D., Briscoe, H., and Britton, W.J. (2005). Transmembrane TNF Is Sufficient to Initiate Cell Migration and Granuloma Formation and Provide Acute, but Not Long-Term, Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *J. Immunol.* *174*, 4852–4859.

Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X.-Y., Shealy, D., and Wagner, C. (2002a). Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *301*, 418–426.

Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X.-Y., Shealy, D., and Wagner, C. (2002b). Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *301*, 418–426.

Scheinfeld, N. (2004). A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J. Dermatol. Treat.* 15, 280–294.

Scher, J.U., Bretz, W.A., and Abramson, S.B. (2014). Periodontal Disease and Subgingival Microbiota as Contributors for RA Pathogenesis: Modifiable Risk Factors? *Curr. Opin. Rheumatol.* 26, 424–429.

Schett, G., and Gravallesse, E. (2012). Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 656–664.

Seckinger, P., Klein-Nulend, J., Alander, C., Thompson, R.C., Dayer, J.M., and Raisz, L.G. (1990). Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonists block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production. *J. Immunol.* 145, 4181–4184.

Sedger, L.M., and McDermott, M.F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 453–472.

Semble, E.L., Turner, R.A., and McCrickard, E.L. (1985). Rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fluid effects on primary human endothelial cell cultures. *J. Rheumatol.* 12, 237–241.

Semerano, L., Clavel, G., Assier, E., Denys, A., and Boissier, M.-C. (2011). Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 78, 118–123.

Semerano, L., Assier, E., and Boissier, M.-C. (2012). Anti-cytokine vaccination: a new biotherapy of autoimmunity? *Autoimmun. Rev.* 11, 785–786.

Semerano, L., Biton, J., Delavallée, L., Duvallet, E., Assier, E., Bessis, N., Bernier, E., Dhellin, O., Grouard-Vogel, G., and Boissier, M.-C. (2013). Protection from articular damage by passive or active anti-tumour necrosis factor (TNF)- α immunotherapy in human TNF- α transgenic mice depends on anti-TNF- α antibody levels. *Clin. Exp. Immunol.* 172, 54–62.

Shale, M.J., Seow, C.H., Coffin, C.S., Kaplan, G.G., Panaccione, R., and Ghosh, S. (2010). Review article: chronic viral infection in the anti-tumour necrosis factor therapy era in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 31, 20–34.

Shaughnessy, L.M., and Swanson, J.A. (2007). The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 12, 2683–2692.

Shealy, D.J., Wooley, P.H., Emmell, E., Volk, A., Rosenberg, A., Treacy, G., Wagner, C.L., Mayton, L., Griswold, D.E., and Song, X.-Y.R. (2002). Anti-TNF-alpha antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. *Arthritis Res.* 4, R7.

Shen, C., Assche, G.V., Colpaert, S., Maerten, P., Geboes, K., Rutgeerts, P., and Ceuppens, J.L. (2005). Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21, 251–258.

Shen, Y., Chen, J., Zhang, X., Wu, X., and Xu, Q. (2007). Human TNF- α gene vaccination prevents collagen-induced arthritis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 7, 1140–1149.

Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., and Sato, M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5, 519–524.

Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinanuer, M., and Nathan, C. (1999). Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10, 29–38.

Shinnick, T.M., and Good, R.C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 13, 884–901.

Sia, J.K., Georgieva, M., and Rengarajan, J. (2015). Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. *J. Immunol. Res.* 2015, 747543.

Silman, A.J., and Pearson, J.E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4, S265–S272.

Singh, J.A. (2016). Infections With Biologics in Rheumatoid Arthritis and Related Conditions: a Scoping Review of Serious or Hospitalized Infections in Observational Studies. *Curr. Rheumatol. Rep.* 18, 61.

Skapenko, A., Wendler, J., Lipsky, P.E., Kalden, J.R., and Schulze-Koops, H. (1999). Altered memory T cell differentiation in patients with early rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 491–499.

Skobe, M., Hamberg, L.M., Hawighorst, T., Schirner, M., Wolf, G.L., Alitalo, K., and Detmar, M. (2001). Concurrent Induction of Lymphangiogenesis, Angiogenesis, and Macrophage Recruitment by Vascular Endothelial Growth Factor-C in Melanoma. *Am. J. Pathol.* 159, 893–903.

Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735–745.

Solovic, I., Sester, M., Gomez-Reino, J.J., Rieder, H.L., Ehlers, S., Milburn, H.J., Kampmann, B., Hellmich, B., Groves, R., Schreiber, S., et al. (2010). The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur. Respir. J.* 36, 1185–1206.

Spohn, G., Keller, I., Beck, M., Grest, P., Jennings, G.T., and Bachmann, M.F. (2008). Active immunization with IL-1 displayed on virus-like particles protects from autoimmune arthritis. *Eur. J. Immunol.* 38, 877–887.

Starzec, A., Vassy, R., Martin, A., Lecouvey, M., Di Benedetto, M., Crépin, M., and Perret, G.Y. (2006). Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci.* 79, 2370–2381.

Stastny, P. (1978). Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 298, 869–871.

Stavru, F., Archambaud, C., and Cossart, P. (2011). Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol. Rev.* 240, 160–184.

Stuhlmüller, B., Mans, K., Tandon, N., Bonin, M.O., Smiljanovic, B., Sörensen, T.A., Schendel, P., Martus, P., Listing, J., Detert, J., et al. (2016). Genomic stratification by expression of HLA-DRB4 alleles identifies differential innate and adaptive immune transcriptional patterns - A strategy to detect predictors of methotrexate response in early rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol.* 171, 50–61.

Sugawara, I., Udagawa, T., and Yamada, H. (2004). Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect. Immun.* 72, 1804–1806.

Sun, J.H., Zhang, Y.H., Kuang, J.Y., Liu, G., Liu, Y.X., and Liu, B.H. (2016). Active immunisation targeting soluble murine tumour necrosis factor alpha is safe and effective in collagen-induced arthritis model treatment. *Clin. Exp. Rheumatol.* 34, 242–246.

Suto, K., Yamazaki, Y., Morita, T., and Mizuno, H. (2005). Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J. Biol. Chem.* 280, 2126–2131.

Szekanecz, Z., and Koch, A.E. (2001). Chemokines and angiogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 202–208.

Taams, L.S., Smith, J., Rustin, M.H., Salmon, M., Poulter, L.W., and Akbar, A.N. (2001). Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur. J. Immunol.* 31, 1122–1131.

Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., and Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 65, 550–563.

Tan, G.-H., Wang, C.-C., Huang, F.-Y., Wang, H., Huang, Y.-H., and Lin, Y.-Y. (2007). Active immunotherapy of allergic asthma with a recombinant human interleukin-5 protein as vaccine in a murine model. *Chin. Med. J. (Engl.)* 120, 1517–1522.

Terato, K., Harper, D.S., Griffiths, M.M., Hasty, D.L., Ye, X.J., Cremer, M.A., and Seyer, J.M. (1995). Collagen-Induced Arthritis in Mice: Synergistic Effect of *E. Coli* Lipopolysaccharide Bypasses Epitope Specificity in the Induction of Arthritis with Monoclonal Antibodies to Type II Collagen. *Autoimmunity* 22, 137–147.

Terman, B.I., Carrion, M.E., Kovacs, E., Rasmussen, B.A., Eddy, R.L., and Shows, T.B. (1991). Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6, 1677–1683.

Thomson, B.M., Mundy, G.R., and Chambers, T.J. (1987). Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J. Immunol.* *138*, 775–779.

Tighe, H., Corr, M., Roman, M., and Raz, E. (1998). Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol. Today* *19*, 89–97.

Toi, M., Bando, H., Ogawa, T., Muta, M., Hornig, C., and Weich, H.A. (2002). Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int. J. Cancer* *98*, 14–18.

Tordjman, R., Ortéga, N., Coulombel, L., Plouët, J., Roméo, P.-H., and Lemarchandel, V. (1999). Neuropilin-1 Is Expressed on Bone Marrow Stromal Cells: A Novel Interaction With Hematopoietic Cells? *Blood* *94*, 2301–2309.

Torres, D., Janot, L., Quesniaux, V.F.J., Grivennikov, S.I., Maillet, I., Sedgwick, J.D., Ryffel, B., and Erard, F. (2005). Membrane Tumor Necrosis Factor Confers Partial Protection to *Listeria* Infection. *Am. J. Pathol.* *167*, 1677–1687.

Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G., and Tak, P.P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* *117*, 244–279.

Tracey, K.J., Fong, Y., Hesse, D.G., Manogue, K.R., Lee, A.T., Kuo, G.C., Lowry, S.F., and Cerami, A. (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* *330*, 662–664.

Tripp, C.S., Wolf, S.F., and Unanue, E.R. (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 3725–3729.

Tsai, M.C., Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C., Tufariello, J., Flynn, J., and Chan, J. (2006). Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.* *8*, 218–232.

Tumanov, A.V., Grivennikov, S.I., Shakhov, A.N., Rybtsov, S.A., Koroleva, E.P., Takeda, J., Nedospasov, S.A., and Kuprash, D.V. (2003). Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunol. Rev.* *195*, 106–116.

Udalova, I.A., Mantovani, A., and Feldmann, M. (2016). Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 472–485.

Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* *18*, 415–428.

Uyttenhove, C., and Van Snick, J. (2006). Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2868–2874.

Uyttenhove, C., Arendse, B., Stroobant, V., Brombacher, F., and Van Snick, J. (2004). Development of an anti-IL-12 p40 auto-vaccine: protection in experimental autoimmune encephalomyelitis at the expense of increased sensitivity to infection. *Eur. J. Immunol.* *34*, 3572–3581.

Vander Cruyssen, B., Van Looy, S., Wyns, B., Westhovens, R., Durez, P., Van den Bosch, F., Mielants, H., De Clerck, L., Peretz, A., Malaise, M., et al. (2006). Four-year follow-up of infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients with long-standing refractory disease: attrition and long-term evolution of disease activity. *Arthritis Res. Ther.* *8*, R112.

Vassalli, P. (1992). The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 411–452.

Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 584–640.

Venkatesha, S.H., Dudics, S., Acharya, B., and Moudgil, K.D. (2015). Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 887–906.

Viatte, S., Plant, D., and Raychaudhuri, S. (2013). Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *9*, 141–153.

Vis, M., Havaardsholm, E.A., Haugeberg, G., Uhlig, T., Voskuyl, A.E., van de Stadt, R.J., Dijkmans, B. a. C., Woolf, A.D., Kvien, T.K., and Lems, W.F. (2006). Evaluation of bone mineral density, bone metabolism, osteoprotegerin and receptor activator of the NFkappaB ligand serum levels during treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 1495–1499.

Vynnycky, E., and Fine, P.E. (1997). The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol. Infect.* *119*, 183–201.

Walker, J.G., Ahern, M.J., Coleman, M., Weedon, H., Papangelis, V., Beroukas, D., Roberts-Thomson, P.J., and Smith, M.D. (2006). Changes in synovial tissue Jak-STAT expression in rheumatoid arthritis in response to successful DMARD treatment. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 1558–1564.

Wallis, R.S. (2009). Infectious complications of tumor necrosis factor blockade. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *22*, 403–409.

Wallis, R.S., Broder, M.S., Wong, J.Y., Hanson, M.E., and Beenhouwer, D.O. (2004). Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *38*, 1261–1265.

Watkins, J., and Sleath, K.P. (1981). Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water. *J. Appl. Bacteriol.* *50*, 1–9.

Watts, A.D., Hunt, N.H., Wanigasekara, Y., Bloomfield, G., Wallach, D., Roufogalis, B.D., and Chaudhri, G. (1999). A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of

members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in “reverse signalling.” *EMBO J.* 18, 2119–2126.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., and Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 821–852.

Wildbaum, G., Youssef, S., and Karin, N. (2000). A targeted DNA vaccine augments the natural immune response to self TNF-alpha and suppresses ongoing adjuvant arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 5860–5866.

Winchester, R., Dwyer, E., and Rose, S. (1992). The genetic basis of rheumatoid arthritis. The shared epitope hypothesis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 18, 761–783.

Winthrop, K.L., Baxter, R., Liu, L., Varley, C.D., Curtis, J.R., Baddley, J.W., McFarland, B., Austin, D., Radcliffe, L., Suhler, E., et al. (2013). Mycobacterial diseases and antitumour necrosis factor therapy in USA. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 37–42.

YAMAMOTO, K., OKADA, Y., SUZUKI, A., and KOCHI, Y. (2015). Genetic studies of rheumatoid arthritis. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 91, 410–422.

Yamazaki, Y., Tokunaga, Y., Takani, K., and Morita, T. (2005). Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 8858–8864.

Yanaba, K., Hamaguchi, Y., Venturi, G.M., Steeber, D.A., Clair, E.W.S., and Tedder, T.F. (2007). B Cell Depletion Delays Collagen-Induced Arthritis in Mice: Arthritis Induction Requires Synergy between Humoral and Cell-Mediated Immunity. *J. Immunol.* 179, 1369–1380.

Yasui, K. (2014). Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and the risk of biologic anti-TNF- α reagents. *Pediatr. Rheumatol. Online J.* 12, 45.

Yin, J., and Ferguson, T.A. (2009). Identification of an IFN- γ -Producing Neutrophil Early in the Response to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 182, 7069–7073.

Youssef, S., Wildbaum, G., Maor, G., Lanir, N., Gour-Lavie, A., Grabie, N., and Karin, N. (1998). Long-lasting protective immunity to experimental autoimmune encephalomyelitis following vaccination with naked DNA encoding C-C chemokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 3870–3879.

Yun, H., Xie, F., Delzell, E., Chen, L., Levitan, E.B., Lewis, J.D., Saag, K.G., Beukelman, T., Winthrop, K., Baddley, J.W., et al. (2015). Risk of Hospitalized Infection in Rheumatoid Arthritis Patients Receiving Biologics Following a Previous Infection While on Treatment with Anti-TNF Therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1065–1071.

Zenewicz, L.A., and Shen, H. (2007). Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: A short overview. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 9, 1208–1215.

RESUME

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme inflammatoire le plus fréquent. Cette maladie s'accompagne d'une hyperplasie de la membrane synoviale qui entoure les articulations. La formation du pannus synovial est sous la dépendance de cytokines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques. Les immunothérapies anti-TNF utilisées dans le traitement de la PR présentent des inconvénients (perte d'efficacité, risque infectieux), ce qui laisse la place pour le développement d'une stratégie vaccinale anti-TNF. Dans la première partie de mes travaux, nous avons développé des vaccins anti-VEGF afin d'étudier les liens entre angiogenèse et inflammation dans l'arthrite expérimentale au collagène (AEC). Dans la deuxième partie, nous avons développé un vaccin anti-TNF de souris afin d'évaluer les conséquences de la neutralisation du TNF- α par la vaccination dans des modèles infectieux.

Le ciblage du VEGF avec un vaccin constitué de VEGF entier ou de peptides du VEGF couplés à la KLH, a permis une protection clinique et histologique dans l'AEC. Dans notre deuxième axe de recherche, nous avons développé un vaccin anti-TNF de souris (TNF-KLH). Ce vaccin est aussi efficace que l'etanercept dans l'AEC, mais n'augmente pas le risque infectieux dans un modèle d'infection à *Mycobacterium tuberculosis*. Dans le modèle d'infection à *Listeria monocytogenes*, TNF-KLH n'augmente pas la charge bactérienne et n'induit pas de mortalité, contrairement à l'etanercept.

Mes travaux de thèse montrent que la stratégie vaccinale anti-cytokine est efficace dans l'arthrite, et que le ciblage du TNF par une telle stratégie ne semble pas altérer la réponse anti-infectieuse dans nos modèles.

Efficacy of active immunotherapies against cytokines and consequences of anti-TNF vaccination in infectious models.

SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is the most frequent inflammatory rheumatism. This disease is accompanied by hyperplasia of the synovial membrane surrounding the joint. Pannus formation is controlled by pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. Anti-TNF immunotherapies used in the treatment of RA presents many drawbacks (loss of efficacy, infections), which leaves some place for the development of an anti-TNF immunization strategy. In the first part of my work, we developed an anti-VEGF vaccine to study the links between angiogenesis and inflammation in collagen-induced arthritis (CIA) model. In the second part, we developed a mouse anti-TNF vaccine to assess the consequences of the neutralization of TNF- α by vaccination in infectious models.

Inhibition of VEGF with a vaccine consisting of whole VEGF or VEGF peptide coupled to KLH, showed a clinical and histological protection in the CIA model. In the second part of my work, we developed a mouse anti-TNF vaccine (TNF-KLH). This vaccine is as effective as etanercept in CIA, but does not increase the risk of infection in *Mycobacterium tuberculosis* model. In *Listeria monocytogenes* model, unlike etanercept, immunization with TNF-KLH does not increase the bacterial burden and mortality.

My work contributed to the development of active anti-VEGF vaccine and our results show a partial protection with this strategy. Also, we demonstrate that targeting TNF by active immunotherapy does not alter the immune response in our models of infections.

Mots clés : polyarthrite rhumatoïde, TNF, VEGF, vaccination, infection

Discipline : Biologie, mention Biologie Moléculaire et Cellulaire.

UMR 1125 INSERM, Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, Cedex.