HAL
open science

# Modulation thérapeutique du phénotype du macrophage dans la polyarthrite rhumatoïde

Yannick Degboé

## To cite this version:

Yannick Degboé. Modulation thérapeutique du phénotype du macrophage dans la polyarthrite rhumatoïde. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30085 . tel-02121770

**HAL Id: tel-02121770**

**https://theses.hal.science/tel-02121770v1**

Submitted on 6 May 2019

**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 Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

**En vue de l'obtention du**

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**
**Yannick DEGBOÉ**

**le** lundi 16 juillet 2018

**Titre :**

Modulation Thérapeutique du Phénotype du Macrophage
dans la Polyarthrite Rhumatoïde

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**
ED BSB : Immunologie

**Unité de recherche :**
INSERM UMR1043, Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr Jean-Luc DAVIGNON et Pr Arnaud CONSTANTIN

**Jury :**

| | |
|---|---|
| Pr Bruno SÉGUI | Président |
| Pr Florence APPARAILLY | Rapporteuse |
| Pr Thierry LEQUERRÉ | Rapporteur |
| Dr Frédéric BLANCHARD | Examinateur |
| Dr Céline COUGOULE | Invitée |

SOMMAIRE

1. Abréviations 1

2. Introduction 7

2.1. Le macrophage 8

*2.1.1. Généralités 8*

*2.1.2. Hétérogénéité ontogénique des macrophages murins et humains 11*

*2.1.3. Hétérogénéité fonctionnelle des macrophages : la polarisation 15*

2.2. La polyarthrite rhumatoïde 20

*2.2.1. Généralités 20*

*2.2.2. Prédisposition à la polyarthrite rhumatoïde 22*

*2.2.3. La phase préclinique 24*

*2.2.4. Les phases cliniques de la polyarthrite rhumatoïde – la phase effectrice 26*

*2.2.5. Rôle du monocyte et du macrophage lors de la phase effectrice de la polyarthrite rhumatoïde 27*

*2.2.6. Monocytes/ macrophage et évolution de la polyarthrite rhumatoïde 42*

2.3. Les biothérapies de la polyarthrite rhumatoïde 47

*2.3.1. Généralités 47*

*2.3.2. Découverte du rôle du TNF dans la polyarthrite rhumatoïde 49*

*2.3.3. Propriétés des agents anti-TNF 51*

*2.3.4. Mécanismes d'action des agents anti-TNF 56*

*2.3.5. Effets anti-inflammatoires des agents anti-TNF dans la polyarthrite rhumatoïde 59*

*2.3.6. Effet des agents anti-TNF sur les monocytes/macrophages 60*

3. Résultats expérimentaux 63

3.1. Objectifs globaux du travail de thèse 64

3.2. Article 1 - Reversion of inflammatory polarization of rheumatoid macrophages by anti-TNF agents through an IL-10/STAT3 mechanism. 66

3.3. Article 2 - Anti-TNF certolizumab pegol induces antioxidant response in human monocytes via reverse signaling 101

3.4. Article 3 – Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent 110

4. Résultats supplémentaires 120
4.1. Viabilité des macrophages en présence de bDMARDs 121
*4.1.1. Objectifs* *121*
*4.1.2. Matériels et méthodes* *121*
*4.1.3. Résultats* *122*
*4.1.4. Discussion* *125*
4.2. Effet des bDMARDs sur les marqueurs membranaires de polarisation exprimés au décours de la différenciation de macrophages issus de patients atteints de PR 126
*4.2.1. Objectif* *126*
*4.2.2. Matériels et méthodes* *126*
*4.2.3. Résultats* *126*
*4.2.4. Discussion* *128*
4.3. Effet des bDMARDs sur les marqueurs membranaires de polarisation exprimés au décours de la différenciation de macrophages issus de sujets sains 129
*4.3.1. Objectif* *129*
*4.3.2. Matériels et méthodes* *129*
*4.3.3. Résultats* *129*
*4.3.4. Discussion* *131*
4.4. Effet de l'abatacept sur les marqueurs membranaires de polarisation des macrophages issus de monocytes de sujets sains 132
*4.4.1. Objectif* *132*
*4.4.2. Matériels et méthodes* *132*
*4.4.3. Résultats* *132*
*4.4.4. Discussion* *133*
4.5. Sous-populations monocytaires de patients atteints de PR et de sujets sains 134
*4.5.1. Objectif* *134*
*4.5.2. Matériels et méthodes* *134*
*4.5.3. Résultats* *134*
*4.5.4. Discussion* *134*
4.6. Corrélation activité clinique /marqueurs membranaires des monocytes/macrophages 135
*4.6.1. Objectif* *135*
*4.6.2. Matériels et méthodes* *135*
*4.6.3. Résultats* *135*
*4.6.4. Discussion* *137*

4.7. Corrélation pronostic clinique/marqueurs membranaires 138

*4.7.1. Objectif* *138*

*4.7.2. Matériels et méthodes* *138*

*4.7.3. Résultats* *138*

*4.7.4. Discussion* *141*

**5. Discussion générale et perspectives** **142**

5.1. Etude de l'influence des bDMARDs de la PR sur la polarisation du macrophage 143

5.2. Etude du lien entre les marqueurs de polarisation du macrophage et l'activité de la PR 145

5.3. Etude du reverse signalling induit par le certolizumab pégol, un agent anti-TNF 147

5.4. Etude de l'effet du dendrimère ABP sur la polarisation des cellules de la lignée monocytaire 147

5.5. Conclusion 148

**6. Références bibliographiques** **149**

**7. Résumés** **171**

# Abréviations

## 1. ABRÉVIATIONS

ABA : Abatacept

ABP : Aza-BisPhosphonate

ACPA : Anticorps Anti-Peptides Citrullinés

ADA : Adalimumab

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

AICD : Activation Induced Cell Death

AnxA : Annexine A

AP1 : Activator Protein 1

bDMARD : biothérapie

BMP : Bone Morphogenic Protein

CCL : C-C chemokine ligand

CCR : Récepteur au CC chimiokines

CDC : Cell-Dependent Cytotoxicity

CDP : Common DC Precursor

CXCL : CXC-chemokine ligand

CXCR : Récepteur au CXC chimiokines

CX3CL1 : Fractalkine

CD : Cluster of Differentiation

CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

csDMARD : traitements de fond synthétiques conventionnels

CSF-1R : récepteur au M-CSF

COX2 : CycloOXygénase 2

CO7 : COmplement component 7

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRP : C Reactive Protein

CZP : Certolizumab Pégol

DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns

DARC : Duffy Antigen Receptor for Chemokines

DAS28 : Disease Activity Score

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DMARD : Disease-Modifying AntiRheumatic Drug = traitements de fond synthétiques conventionnels

EGF : Epidermal Growth Factor

ESR : Vitesse de sédimentation

ETA : Etanercept

EULAR : European League Against Rheumatism

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

FAK : Focal Adhesion Kinase

FcR : Récepteur au fragment Fc des immunoglobulines

FDA : Food and Drug Administration

FGF : Fibroblast Growth Factor

fMLP : formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine

FR : Facteurs Rhumatoïdes

Gal : Galectine

GITR : Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor-related Receptor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GOL : Golimumab

HLA-DR : Human Leucocyte Antigen-DR

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

IFN : Interféron

IL : Interleukine

iNOS : NO Synthase inductible

IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

JAK : Janus Kinase

LXA4 : Lipoxine A4

LPS : lipopolysaccharide

Ly6C : Lymphocyte antigen 6 Complex

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

Mar : Marésine

MBDA : MultiBiomarker Disease Activity

MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor

MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated Protein 5

MDM : Macrophages Dérivés de Monocytes

MDP : Monocyte DC Precursor

MerTK : Mer Tyrosine Kinase

MIP-1 : Macrophage Inflammatory Protein 1

miR : micro-ARN

MLKL : Mixed Lineage Kinase domain-Like protein

MMP : MétalloProtéases de Matrice

MoDC : Cellules Dendritiques dérivées de Monocytes

MSH : Melanocyte-Stimulating Hormone

mTNF : TNF membranaire

MTX : Méthotrexate

MyD88 : myeloid differentiation primary response protein 88

M1 : Macrophage inflammatoire induit par LPS + IFNγ

M2 : macrophage alternatif

NADPH oxydase : Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide-PHosphate oxydase

NFκB : Nuclear Factor kappa B

NFAT : Nuclear Factor associated with Activated T

NLR : Nucleotide Oligomerization Domain-like receptors

NLRP3 : NOD-Like Peceptor family Pyrin domain containing 3

NO : monoxyde d'azote

NR4A1 : Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1

OPG : Ostéoprotégérine

OSM : OncoStatine M

PAD : PeptidylArginine Déiminase

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PD-1 : Programmed cell Death 1

PD-L1 : Programmed Death Ligand 1

PI3 Kinase : Phosphoinisitide 3 Kinase

PNN : PolyNucléaires Neutrophiles

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

PROS : Vitamin K-dependent Protein S

PRR : Pattern-Recognition Receptors

PTEN : Phosphatase and TEnsin homologue deleted on chromosome 10

RLR : Retinoic acid-Inducible Gene I- like Receptors

RANK : Receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL : RANK ligand

ROS : Espèces radicalaires de l'oxygène

RTX : Rituximab

RvD : Résolvine D

SAA : Serum Amyloid A

SNP : Single-Nucleotide Polymorphism

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

sTNF : TNF soluble

TACE : TNF Alpha Converting Enzyme = ADAM17

TAM : Tyro3, Axl, Mer

TCZ : Tocilizumab

tDMARD : Traitements de fond synthétiques ciblées

TGF : Transforming Growth Factor

Th : Lymphocyte T auxilliaire

TIM-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin domain-containing protein 3

TIMP : Tissue Inhibitor of MetalloProteinase

TIR : Toll/Interleukin-1 Receptor

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNF : TNF Receptor

TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain

TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand

Treg : Lymphocyte T régulateur

TSP2 : Thrombospondine

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

TWEAK : Tumor necrosis factor-like WEAK inducer of apoptosis

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

YKL40 : human cartilage glycoprotein 39

# Introduction

## 2. INTRODUCTION

### 2.1. Le macrophage

Les macrophages sont des cellules immunitaires innées, impliquées dans l'inflammation, le développement tissulaire et l'homéostasie. Leurs fonctions les plus décrites sont la phagocytose [1] et la production de médiateurs pro-inflammatoires, anti-inflammatoires ou angiogéniques.

J'ai pris le parti de présenter ce chapitre comme une introduction non exhaustive à la biologie du macrophage. La question des fonctions du macrophage, fondamentale pour un travail concernant son phénotype, sera spécifiquement abordée dans le second paragraphe, par le prisme de sa contribution à la polyarthrite rhumatoïde.

#### 2.1.1. Généralités

L'activité des macrophages s'étend au-delà de l'immunité innée puisque (i) d'une part ils agissent à l'interface avec l'immunité adaptative, notamment de par leur production cytokinique et de leur capacité de présentation d'antigènes, (ii) d'autre part ils participent à des processus physiologiques non strictement immunologiques tels que les processus cognitifs [2] et la thermorégulation [3].

La fonction des macrophages est liée à la capacité à intégrer les stimuli de leur environnement. Cette intégration passe notamment par l'expression d'un panel de récepteurs : de cytokines, de l'immunité innée (Pattern-Recognition Receptors, PRR) et phagocytaires.

Les macrophages expriment les six familles de récepteurs de cytokines de l'immunité innée ***(Figure 1)*** :

- Les récepteurs aux hématopoïétines (cytokines de classe I). Ils présentent une chaine commune définissant la spécificité au ligand (γ-chain pour l'IL-2, β -chain pour le GM-CSF(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)), reconnaissent notamment le GM-CSF et l'IL-6, signalent par une voie JAK-STAT (Janus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription) dépendante [4].
- Les récepteurs aux interférons (cytokines de classe II). Ces récepteurs hétérodimériques signalisent par une voie JAK-STAT dépendante [5].
- Les récepteurs de la famille du TNF. Ils reconnaissent notamment le TNF (Tumor Necrosis Factor), Fas-ligand, CD40-ligand, la liaison au ligand induisant une trimérisation du récepteur [6]. Ces récepteurs sont actifs sous forme de trimères exprimés à la membrane mais peuvent être clivés et donc présents sous forme soluble dans le microenvironnement. Ces récepteurs ont la particularité de posséder un domaine de mort sur leur queue cytoplasmique et signalisent par des adaptateurs associés au domaine de mort, tels que TRADD (Tumor necrosis factor

Receptor type 1-Associated Death Domain) et FADD (Fas-Associated protein with Death Domain).

- Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines. Ceux-ci reconnaissent les cytokines de la famille de l'IL-1 telles que l'IL-1α/β, l'IL-1ra (InterLeukin-1 receptor antagonist), l'IL-18 et l'IL-33, ou des facteurs de croissance tels que le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) [7]. Ils sont caractérisés par un domaine extra-cellulaire « immunoglobulin-like » et peuvent signaliser après dimérisation, par les domaines TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor) de leur queue cytoplasmique, en impliquant notamment les intermédiaires de signalisation IRAK (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase) et MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88).
- Les récepteurs du TGF (Transforming Growth Factor), reconnaissant notamment le TGFβ. Ils possèdent une activité sérine/thréonine kinase et signalisent via un complexe hétérotétramérique induisant la formation de complexes Smad ou par des voies Smad-indépendantes (MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinases, PI3 Kinase – Phosphoinisitide 3 Kinase, Rho GTPases) [8].
- Les récepteurs aux chémokines et au fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine), reconnaissent notamment l'IL-8 (interleukine 8), CCL2 (C-C chemokine ligand 2 / MCP1 – Monocyte Chemoattractant Protein 1). Ces récepteurs possèdent 7 domaines transmembranaires et sont couplés à des protéines G hétérotrimériques médiant la cascade de signalisation intracellulaire [9].

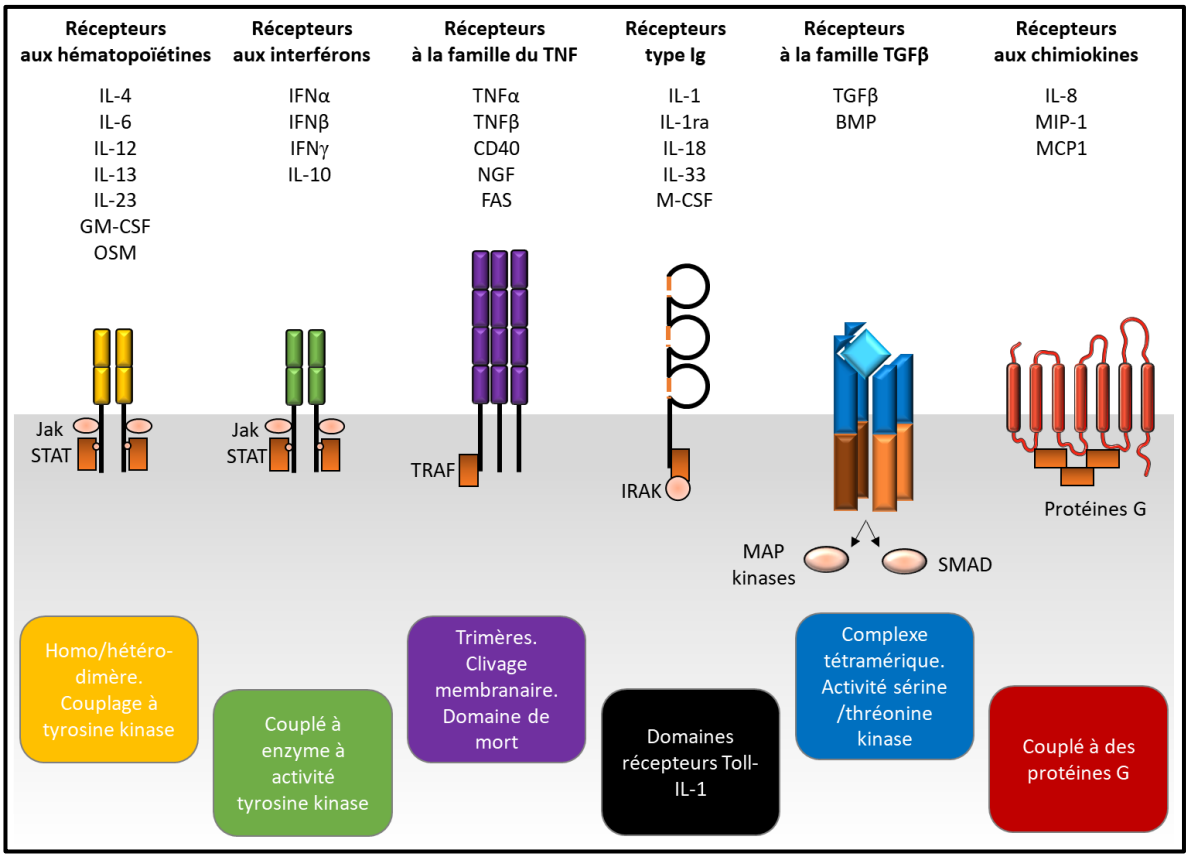


***Figure 1. Les récepteurs aux cytokines.*** *BMP: Bone Morphogenic Protein, CD: Cluster of Differentiation, G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor, GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, IL : Interleukine, IL-1ra: InterLeukin 1 receptor antagonist, Jak: Janus kinase, IFN: Interféron, IRAK: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase, MAP kinase : Mitogen-Activated Protein kinase, MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1 = C-C chemokine ligand 2/CCL2, MIP-1 :Macrophage Inflammatory Protein 1 = C-C Chemokine Ligand 3/CCL3, NGF : Nerve Growth Factor, OSM : Oncostatin M, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, TNF: Tumor Necrosis Factor.*

Outre les récepteurs aux cytokines, les macrophages expriment aussi des PRR. Ces PRR sont à même de reconnaitre des motifs dits « conservés », à la surface de la cellule (*via* un récepteur membranaire), ou dans le compartiment intracellulaire (endosome, cytosol). Parmi les signaux reconnus menant à une activation pro-inflammatoire du macrophage, l'on distingue :

- Les signaux de dangers extrinsèques (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs)
- Les signaux de dangers intrinsèques (Danger-Associated Molecular Patterns, DAMPs).

Il existe 3 différents types de PRR cellulaires (membranaires ou cytoplasmiques) :

- Les récepteurs de type Toll (Toll-Like Receptors, TLR), reconnaissant des motifs de danger intra (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) ou extracellulaires (TLR2, TLR4, TLR5) [10].
- Les récepteurs de type NOD (Nucleotide Oligomerization Domain-like receptors, NLR), tels que NLRP3 (NOD-Like Peceptor family Pyrin domain containing 3) et NOD1, reconnaissant des motifs cytoplasmiques essentiellement bactériens, et induisant la formation de l'inflammasome [11].
- Les récepteurs de type RLR (Retinoic acid-Inducible Gene I- like Receptors), tels que RIG-I et MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Protein 5), reconnaissant des motifs viraux cytosoliques et induisant une puissante réponse interféron (IFN) de type 1 [12].

Enfin, l'intégration des stimuli de l'environnement par les macrophages passe par les récepteurs phagocytaires :

- Les récepteurs « scavengers », tels que CD36 et CD163, liant notamment des lipoprotéines modifiées [13].
- Les récepteurs de type Lectine, tels que le récepteur au mannose (CD206), dectine-1 et DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin, CD209), possédant un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone [14].
- Les récepteurs gamma au fragment Fc des immunoglobulines tels que CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRII), CD64 (FcγRI), liant les immunoglobulines notamment des particules opsonisées [15].

La famille des macrophages est hétérogène, tant par les phénotypes observables, que par leur origine ontogénique que par leurs fonctions. Nous aborderons spécifiquement cette hétérogénéité dans les paragraphes suivants.

### 2.1.2. Hétérogénéité ontogénique des macrophages murins et humains

Les macrophages résidents sont présents dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Pendant des années, le dogme prévalent était celui de macrophages « infiltrants » dérivés de monocytes circulants et donc d'un progéniteur hématopoïétique post-natal. Ce concept a été remis en question dans les années 2010, suite à la découverte de précurseurs embryonnaires à l'origine de populations spécifiques de macrophages dits « résidents » du cerveau – la microglie – [16] ou de l'épiderme – les cellules de Langerhans [17].

En modèle murin, l'hématopoïèse embryonnaire se subdivise en 3 vagues ***(Figure 2)*** [18] avec :

- Une vague primitive de précurseurs érythro-myéloïdes issue du sac vitellin au jour E7.5. Ces cellules expriment le récepteur au M-CSF (CSF-1R), mais pas le facteur de transcription c-Myb.
- Une seconde vague, dite « transitoire définitive », issue de l'endothélium hémogénique du sac vitellin. Cette vague produit les précurseurs érythro-myéloïdes (c-Myb$^+$) qui migreront vers le foie fœtal lors de la mise en place du système vasculaire sanguin au jour E8.5.
- Une troisième vague, dite « définitive », issue de l'endothélium hémogénique du sac vitellin, formant des cellules souches hématopoïétiques (c-Kit$^+$ Sca-1$^+$) au jour E10.5, dans l'aorte, les gonades et le mésonéphros. Ces précurseurs établiront l'hématopoïèse définitive du foie fœtal puis de la moelle fœtale.

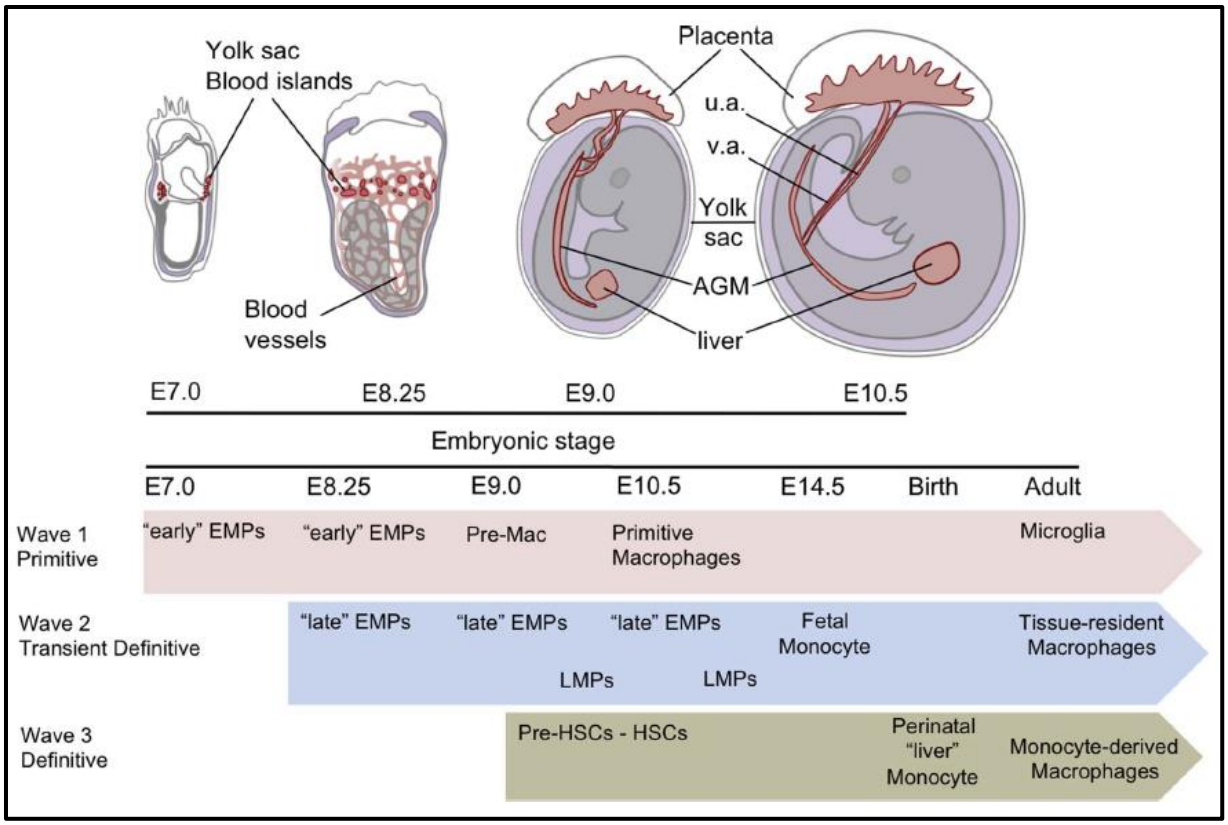



***Figure 2. Les trois programmes embryonnaires hématopoïétiques.*** *YS : sace vitellin, Ery : précurseur érythroïde, Mac : précurseur macrophagique, EMPs : précurseur érythromyéloïde, LMPs : progéniteurs lymphomyéloïdes, HSCs : cellules souches hématopoïétiques, u.a. : artère ombilicale, v.a. : veine ombilicale. Issu de : Hoeffel et al. 2018 Cellular Immunology, Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages [18].*

Actuellement, 3 mécanismes sont identifiés pour la génération et le maintien des macrophages chez la souris ***(Figure 3)*** [19]:

- Dans les tissus dits « fermés » tels que le cerveau, l'épiderme et le poumon, les macrophages sont exclusivement issus de l'hématopoïèse fœtale et se maintiennent par auto-renouvellement. A noter le statut particulier du foie où les cellules de Kupffer auraient une contribution minoritaire de l'hématopoïèse néonatale.
- Les tissus « ouverts à cinétique lente », tels que le cœur ou le pancréas, où le contingent issu de l'hématopoïèse adulte remplace lentement le contingent embryonnaire au-delà de 2 mois.
- Les tissus « ouverts à cinétique rapide », tels la lamina propria et le derme où les macrophages sont issus de l'hématopoïèse adulte. Ils dérivent donc de monocytes circulants et dépendent constamment du compartiment sanguin pour leur renouvellement. Le contingent embryonnaire de ces tissus y est usuellement remplacé rapidement (<2mois).

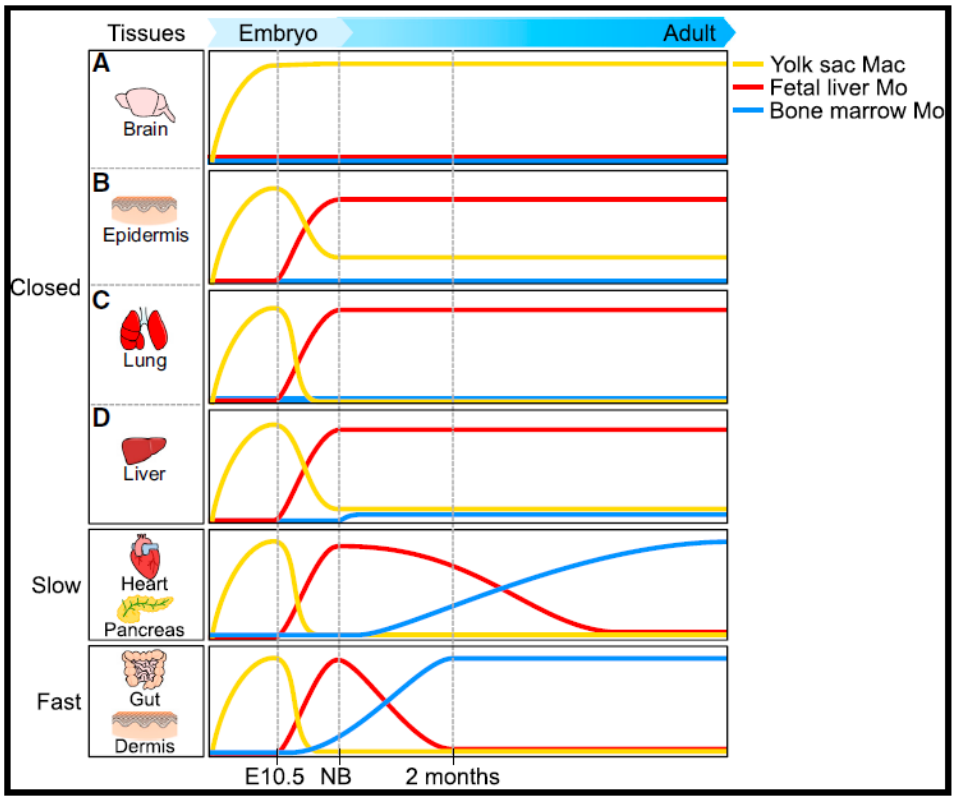



*Figure 3. Hétérogénéité de l'ontogénie des macrophages résidents des tissus adultes à l'état physiologique.*
*Issu de Ginhoux et al. 2016 Immunity, Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis [19].*

Il est important de noter que l'essentiel des études évalue l'ontogénie des macrophages murins et non celle des macrophages humains. La transposabilité des données générées à l'ontogénie des macrophages humain n'est que supputée. En termes de phénotype :

- Les macrophages murins résidents expriment les marqueurs F4/80, CD64, CD14 et MerTK.
- Les macrophages murins infiltrants issus de monocytes expriment eux des niveaux élevés de CD11b, CCR2 et Ly6C.

Les données concernant le phénotype des macrophages de la synoviale rhumatoïde humaine sont limitées et ne tiennent pas compte de leur ontogénie [20, 21]. Ces études suggèrent :

- Une expression générale de CD68
- Une expression significative de CD86, associé à une expression limitée de CD80
- Les macrophages de la couche intimale exprimeraient un niveau élevé CD163 et CD32, alors que l'expression de CD64, CD200R, CD14 et CD16 serait presque absente.
- Les macrophages de la couche sous-intimale exprimeraient abondamment CD163, CD32 et CD64. Ils présenteraient un faible niveau d'expression de CD14 et CD200R. Il existerait un niveau élevé de co-expression de CD64 avec CD163 et CD32.

Faute d'étude, l'origine des macrophages synoviaux n'est pas clarifiée. Chez l'Homme et en modèles murins, on suppose qu'une part des macrophages « infiltrants » de la synovite (membrane synoviale en condition inflammatoire) proviennent de la différenciation de monocytes sanguins en contexte inflammatoire [22]. Leur devenir après la résolution de l'inflammation est méconnu. En d'autres termes, même s'il a été montré que des monocytes/macrophages inflammatoires peuvent rentrer en apoptose, voire nécrose, du fait d'une « activation-induced cell death » [23, 24], nous ne savons pas si une partie de ces cellules est à même de remplacer les cellules résidentes, ni si elles gardent un potentiel d'auto-renouvellement *in situ*. La contribution des macrophages issus de l'hématopoïèse adulte dans les synovites, rend pertinente l'utilisation du modèle de macrophages dérivés *in vitro* de monocytes. Ceux-ci reflèteraient la contribution des monocytes inflammatoires devenus macrophages tissulaires. Toutefois, les limites indéniables de ce modèle incluent : le choix des facteurs utilisés pour différencier et activer les macrophages dans un système réductionniste, la difficulté à étudier le devenir de ces cellules après la résolution de l'inflammation à partir d'un système *in vitro,* la difficulté à intégrer la contribution de tous les acteurs cellulaires présents *in vivo* et l'absence de reflet de la contribution des macrophages résidents issus de précurseurs embryonnaires. En effet, la membrane synoviale saine possède aussi des synoviocytes macrophagiques, dont les propriétés fonctionnelles en environnement inflammatoire et les mécanismes de génération et de maintien à l'état d'homéostasie, sont largement méconnus et probablement différents de ceux des macrophages infiltrants. Jusqu'à très récemment, la plupart des études abordant la place des cellules monocytaires dans l'arthrite, ne prenaient pas compte de ces éléments ontogéniques. Les monocytes étaient étudiés en tant que précurseurs des macrophages. Il est maintenant clair que le destin de ces cellules est plus complexe. Ils peuvent :

- Rester des cellules patrouilleuses circulantes transitant notamment par les ganglions lymphatiques.
- Devenir des monocytes inflammatoires en cas de stimulation immunologique.
- Se différencier en macrophages inflammatoires.
- Constituer le compartiment source de remplacement de certains de macrophages d'origine embryonnaire.
- Se différencier en cellules dendritiques.
- Voire se différencier en ostéoclastes [25].

Par ailleurs, les macrophages synoviaux ont rarement été étudiés de manière extensive du fait de la difficulté d'accès aux prélèvements synoviaux. En effet, les limites à la réalisation d'une biopsie synoviale sont :

- Ethiques : faire subir à un patient un acte invasif alors même que celui-ci ne conditionne en règle générale ni le diagnostic, ni la prise en charge thérapeutique.
- Techniques : du fait du caractère invasif de la biopsie, le gold standard étant la biopsie arthroscopique [26]. Toutefois les techniques récentes de micro-biopsies échoguidées permettent désormais d'envisager la réalisation du geste de manière plus large [27, 28].
- Méthodologiques : du fait de la difficulté d'inclure une population homogène et numériquement importante de patients, et du fait des questionnements sur le caractère représentatif du site analysé en micro-biopsies par rapport à l'ensemble de l'articulation [29].

### 2.1.3. Hétérogénéité fonctionnelle des macrophages : la polarisation

La première description du macrophage inflammatoire, dans un contexte de stimulation bactérienne (Bacille de Calmette et Guérin, listéria) date de 1962 [30]. Ce n'est secondairement que le rôle central de l'IFNγ a été identifié pour expliquer les capacités tumoricides et microbicides de cette cellule passant notamment par la production de radicaux libres [31].

Le prototype de l'activation alternative du macrophage en présence d'IL-4 est décrit en 1992 [32]. Ce phénotype est caractérisé par une morphologie en « broche » (spindle-shaped), une expression élevée du CD206 (récepteur au mannose), une capacité élevée de clairance des ligands mannosylés, une augmentation restreinte de l'expression du CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II), une moindre production d'anions superoxyde ($O2^{\bullet-}$) et une sécrétion réduite de cytokines inflammatoires (IL-1, TNF, IL-8) qui l'opposent au macrophage activé par l'IFNγ.

Le concept de polarisation M1/M2 a été proposé au début des années 2000 [33]. Il reposait sur l'observation d'un métabolisme de l'arginine différent entre les macrophages issus de souches murines typiquement Th1 (C57BL/6, B10/D2) et de souches typiquement Th2 (Balb/c, DBA/2), constatation similaire à celles faites pour les lymphocytes T auxiliaires Th1 et Th2 de ces mêmes souches murines. Les macrophages de souches Th1 produisent plus de NO (monoxyde d'azote) à partir de l'arginine et les macrophages de souche Th2 métabolisent préférentiellement l'arginine en ornithine. La polarisation M1, dite « classique », induite par l'IFNγ, est alors opposée à la polarisation M2, dite « alternative », induite par l'IL-4 (M2a) ***(Figure 4)*** [34]. Pour certains auteurs la polarisation M1/M2 est la résultante de l'influence cytokinique des lymphocytes Th1 ou Th2 sur le macrophage.

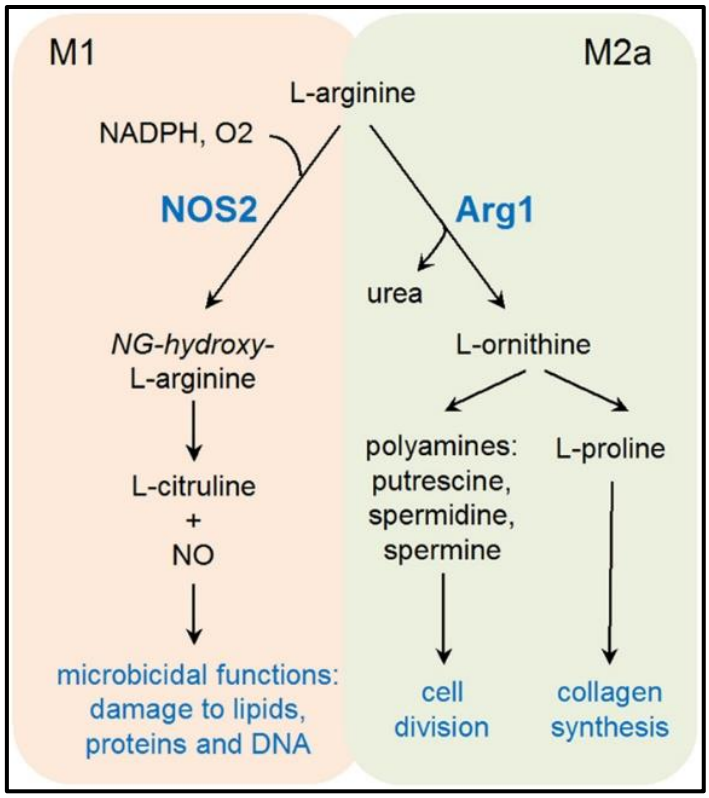



***Figure 4. Représentation schématique du catabolisme de la L-arginine des macrophages M1 et M2a.*** *Issu de Muraille 2014 Frontiers in Immunology, Th1/Th2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? [34].*

La vision d'une polarisation dichotomique M1/M2 s'est progressivement enrichie d'une multitude de phénotypes (M2a, M2b, M2c, …) [35-38]. De manière non exhaustive, citerons aussi, les macrophages des plaques d'athérome [39] et les macrophages associés aux tumeurs [40]. Dans ce modèle de spectre, l'IFNγ +/- LPS (lipopolysaccharide), l'IL-4, l'IL-13, les immuns complexes associés aux ligands de TLR, l'IL-10, la dexaméthasone puis secondairement le M-CSF (« M2-like ») [41] et le GM-CSF (« M1-like ») [42, 43] étaient les principales sources de polarisation du macrophage. Le concept de spectre supposait alors qu'entre les extrêmes M1 (induit par l'IFNγ) et M2 (induit par l'IL-4), il existait des phénotypes intermédiaires participant notamment à l'immunorégulation ou à la réparation tissulaire ***(Figure 5)*** [44]. Ce concept a la vertu de faciliter la compréhension de la plasticité du macrophage, mais souffre de plusieurs limites : il est réductionniste et ne tient pas compte de pluralité des stimuli i*n vivo*, il ne tient pas compte de la source et du contexte de stimulation, il repose sur des marqueurs phénotypiques et fonctionnels qui peuvent être pris en défaut en particulier *in vivo* en pathologie humaine où l'expression des marqueurs n'est pas toujours dichotomique. Par ailleurs, la plupart des études ayant été réalisées en modèle murin, la transposition à l'Homme, qui plus est en condition pathologique, n'est pas nécessairement pertinente [45].

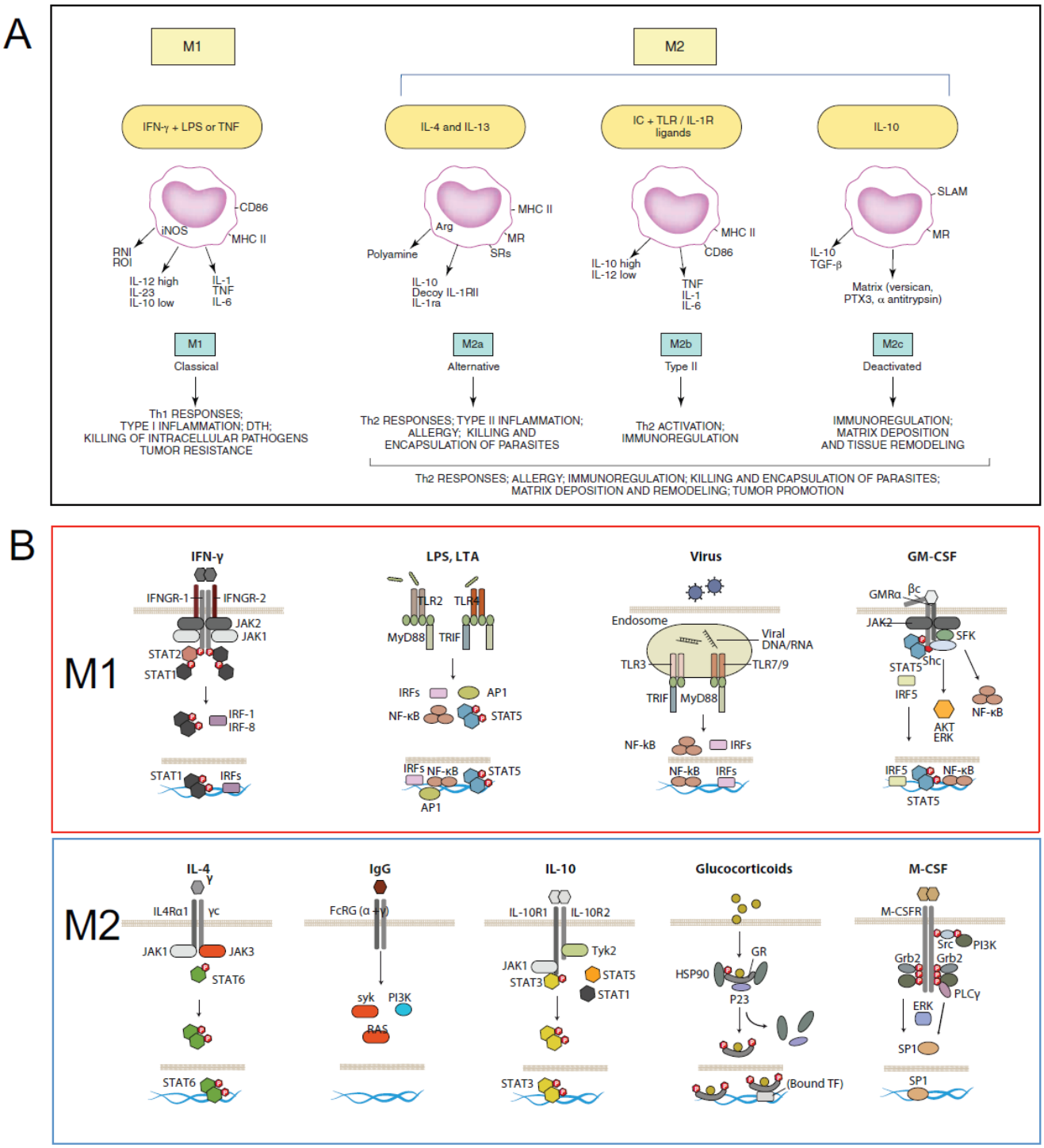



*Figure 5. Le paradigme M1/M2, origine et bases moléculaires. (A) Modèle M1-M2. (B) Voies de signalisations impliquées dans les stimulations M1/M2. Issu de Martinez et al. 2014 F1000Prime Reports, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [44].*

C'est dans ce contexte qu'ont été développées, pour affiner la connaissance de la polarisation du macrophage, des approches moléculaires, en particulier transcriptomique [46, 47] et plus récemment les puissantes approches dites de criblage à haut débit et de single cell technology [48, 49].

Le macrophage est caractérisé par sa plasticité, illustrée par une modulation de sa réponse en fonction des stimuli. La constatation (i) de l'exposition dynamique dans le temps et l'espace à une pluralité de stimuli, (ii) de l'absence de phénotype univoque M1 ou M2 dans plusieurs conditions physiologiques ou pathologiques [50], (iii) de l'évolution de la plasticité phénotypique du macrophage au cours de processus pathologiques [51], a amené à proposer le concept multidimensionnel d'activation du macrophage [52]. Ce paradigme intègre l'influence de l'ontogénie, des signaux environnementaux tissu-spécifiques [53] présents notamment à l'état d'homéostasie, des signaux de stress générés en condition pathologique, ainsi que la dimension temporelle ***(Figure 6)*** [52]. En conséquence, une stimulation « identique » appliquée à 2 populations de macrophages différant par la dimension temporelle (cinétique de stimulation) ou par la dimension spatiale (ontogénie, tissu étudié) aboutira à une activation non similaire des 2 populations étudiées.

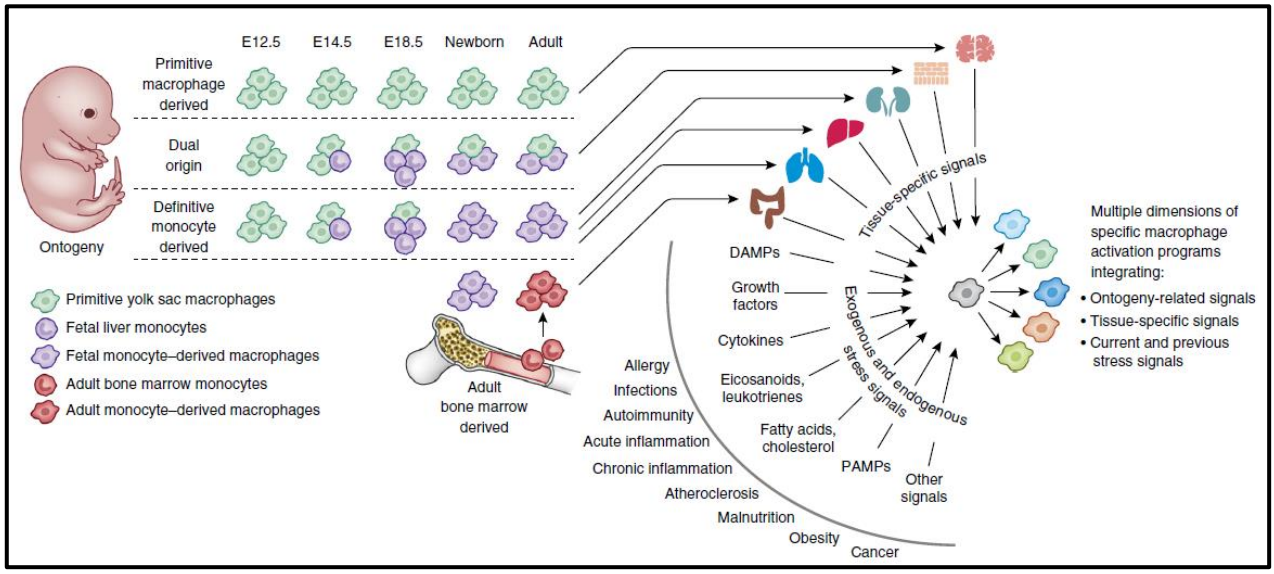
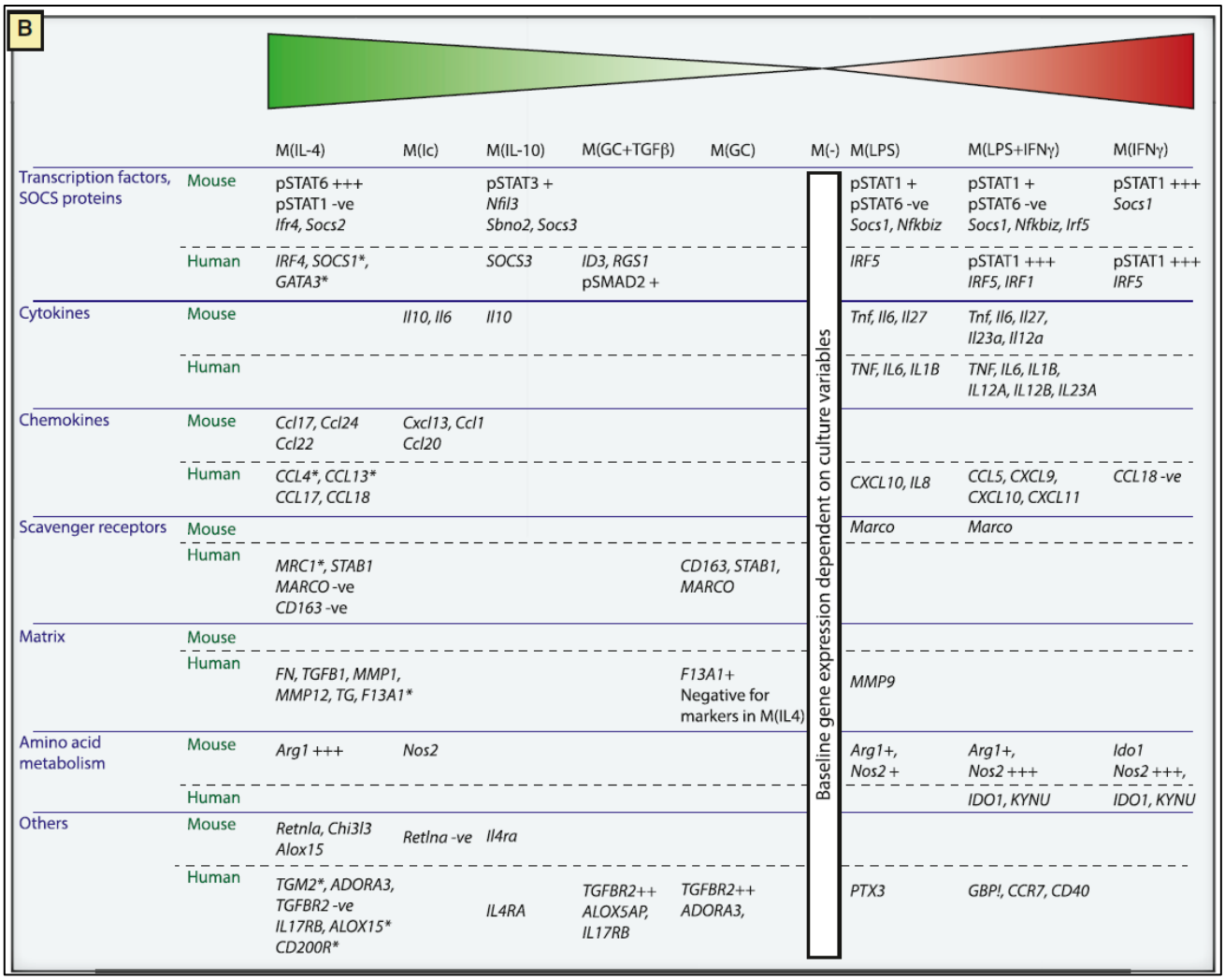



***Figure 6. Modèle intégratif multidimensionnel d'activation du macrophage.*** *Dans cette vision multidimensionnelle, l'activation du macrophage est conditionnée par l'ontogénie, les conditions micro-environnementales, les signaux de stress. Issu de Ginhoux 2016 Nature Immunology, New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function [52].*

Les termes M1 et M2 ne tiennent pas compte du caractère multidimensionnel de l'activation du macrophage. Un groupe d'experts internationaux a en ce sens proposé que dans les études *in vitro*, les macrophages soient plutôt nommés en fonction des modalités de stimulation (par exemple M(IL10)), afin d'être plus informatif sur la nature des conditions expérimentales ***(Figure 7)*** [54].



| B | | M(IL-4) | M(Ic) | M(IL-10) | M(GC+TGFβ) | M(GC) | M(-) | M(LPS) | M(LPS+IFNγ) | M(IFNγ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Transcription factors, SOCS proteins | Mouse | pSTAT6 +++<br>pSTAT1 -ve<br>*Ifr4, Socs2* | | pSTAT3 +<br>*Nfil3*<br>*Sbno2, Socs3* | | | Baseline gene expression dependent on culture variables | pSTAT1 +<br>pSTAT6 -ve<br>*Socs1, Nfkbiz* | pSTAT1 +<br>pSTAT6 -ve<br>*Socs1, Nfkbiz, Irf5* | pSTAT1 +++<br>*Socs1* |
| | Human | *IRF4, SOCS1*, GATA3** | | *SOCS3* | *ID3, RGS1*<br>pSMAD2 + | | | *IRF5* | pSTAT1 +++<br>*IRF5, IRF1* | pSTAT1 +++<br>*IRF5* |
| Cytokines | Mouse | | *Il10, Il6* | *Il10* | | | | *Tnf, Il6, Il27* | *Tnf, Il6, Il27, Il23a, Il12a* | |
| | Human | | | | | | | *TNF, IL6, IL1B* | *TNF, IL6, IL1B, IL12A, IL12B, IL23A* | |
| Chemokines | Mouse | *Ccl17, Ccl24*<br>*Ccl22* | *Cxcl13, Ccl1*<br>*Ccl20* | | | | | | | |
| | Human | *CCL4*, CCL13*<br>CCL17, CCL18* | | | | | | *CXCL10, IL8* | *CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11* | *CCL18 -ve* |
| Scavenger receptors | Mouse | | | | | | | *Marco* | *Marco* | |
| | Human | *MRC1*, STAB1*<br>*MARCO -ve*<br>*CD163 -ve* | | | | *CD163, STAB1, MARCO* | | | | |
| Matrix | Mouse | | | | | | | | | |
| | Human | *FN, TGFB1, MMP1, MMP12, TG, F13A1** | | | | *F13A1+*<br>Negative for markers in M(IL4) | | *MMP9* | | |
| Amino acid metabolism | Mouse | *Arg1 +++* | *Nos2* | | | | | *Arg1+,*<br>*Nos2 +* | *Arg1+,*<br>*Nos2 +++* | *Ido1*<br>*Nos2 +++,* |
| | Human | | | | | | | | *IDO1, KYNU* | *IDO1, KYNU* |
| Others | Mouse | *Retnla, Chi3l3*<br>*Alox15* | *Retlna -ve* | *Il4ra* | | | | | | |
| | Human | *TGM2*, ADORA3, TGFBR2 -ve*<br>*IL17RB, ALOX15**<br>*CD200R** | | *IL4RA* | *TGFBR2++*<br>*ALOX5AP, IL17RB* | *TGFBR2++*<br>*ADORA3,* | | *PTX3* | *GBP!, CCR7, CD40* | |

***Figure 7. Description des macrophages activés.*** *Divisions fonctionnelles à partir de macrophages murins générés avec du M-CSF ou de macrophages dérivés de monocytes humains par du M-CSF. L'astérisque indique une corroboration des gènes humains impliqués dans l'activation IL-4, par « deep sequencing ». Issu de Murray et al. 2014 Immunity, Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines [54].*

## 2.2. La polyarthrite rhumatoïde

### 2.2.1. Généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un rhumatisme inflammatoire chronique, de type auto-immun, caractérisé par :

- L'apparition d'une rupture de tolérance, qui chez une majorité de patients s'exprime par une immunisation contre des peptides citrullinés endogènes (auto-anticorps *ad hoc* : anticorps anti-peptides citrullinés, ACPA) [55-57].
- Une modification des cellules stromales synoviales et des cellules immunes, qui développent un phénotype agressif (Cf. Chapitre 2.5.), participant aux phénomènes inflammatoires et à la destruction articulaire [58].
- Un tropisme articulaire prédominant, responsable de destructions articulaires et d'atteintes extra-articulaires, illustrés dans la ***Figure 8***.

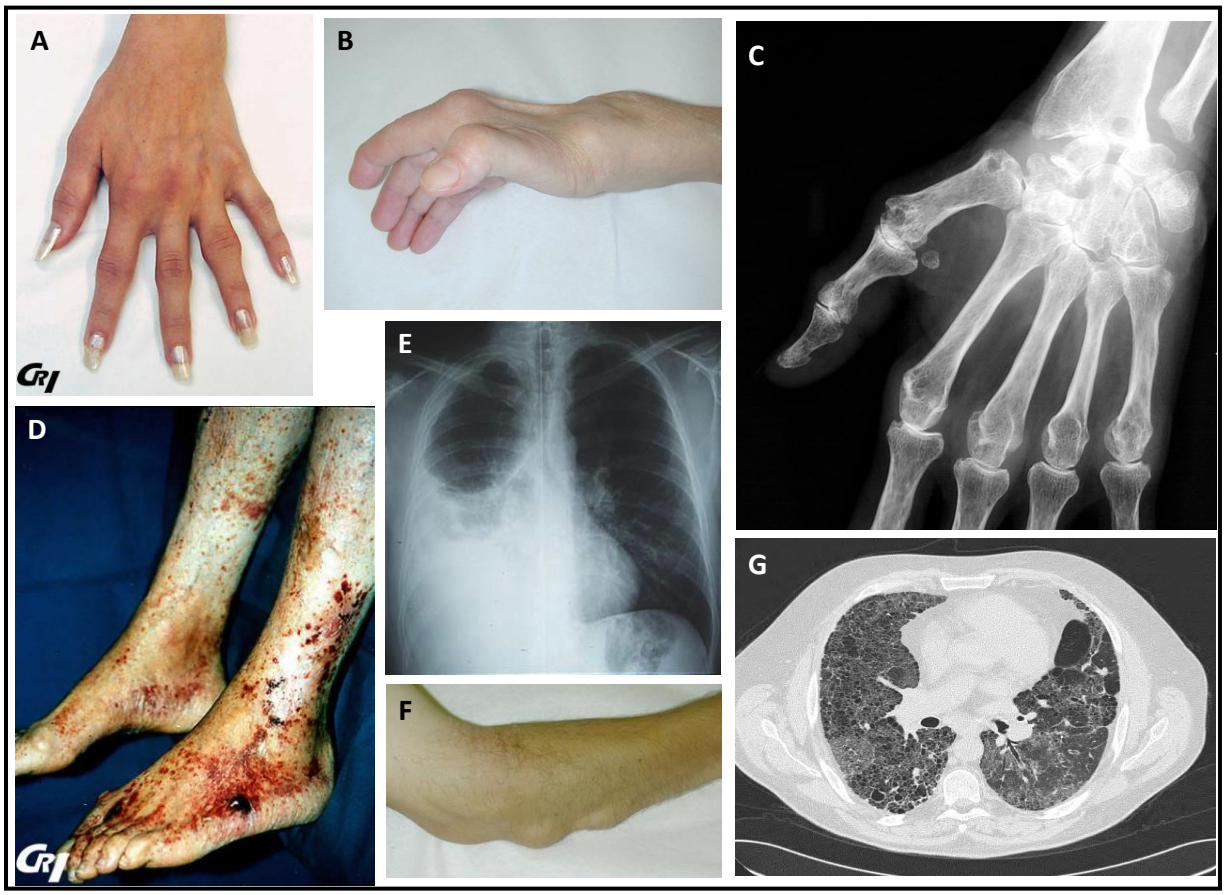



***Figure 8. Atteintes de la polyarthrite rhumatoïde.*** *(A) Arthrites des métacarpo-phalangiennes et interphalangiennes proximales. (B) Déformation de la main avec « coup de vent cubital », aspect du poignet « en dos de chameau » et « pouce en Z ». (C) Radiographie standard de main gauche montrant des érosions et pincements articulaires (carpe et métacarpo-phalangiens). (D) Vascularite rhumatoïde des membres inférieurs. (E) Pleurésie rhumatoïde droite. (F) Nodules rhumatoïdes de la face d'extension*

*de l'avant-bras. (G) Atteinte interstitielle pulmonaire rhumatoïde. Iconographie issue des banques d'image du Club Rhumatismes et Inflammations (CRI), du COllège Français des Enseignants en Rhumatologie (COFER) et de ma bibliothèque personnelle.*

Cette maladie à prédominance féminine touche environ 0.5% de la population caucasienne dans les pays occidentaux, dont la France [59].

Son évolution se fait par poussées, avec une mise en jeu du pronostic fonctionnel articulaire du fait d'une destruction articulaire intéressant principalement les petites articulations distales, ainsi que des effets délétères systémiques incluant une ostéoporose secondaire [60] et une majoration du risque cardiovasculaire [61].

L'histoire naturelle de la maladie est classiquement découpée en 4 phases ***(Figure 9)*** :

- Une première phase non pathologique de prédisposition à la maladie.
- S'ensuit la phase dite « préclinique » avec apparition d'une auto-immunité contre des protéines du soi modifié, sans manifestation clinique associée.
- L'apparition de l'arthrite définit la phase clinique. La phase précoce correspond à celle de la PR « débutante ».
- Enfin, l'arthrite se chronicise ce qui définit la quatrième étape : la PR « établie ».

Au contraire de la connaissance des différentes étapes de la phase effectrice de la PR, celle de l'initiation de la maladie reste parcellaire. A ce jour le *primum movens* de la rupture de tolérance immunitaire n'est pas clairement identifié. Firestein et McInnes ont proposé 2 modèles non mutuellement exclusifs, menant au développement d'une PR clinique [58] ***(Figure 9)***. Dans le *premier modèle*, la pathogénie repose sur un dérèglement primitif de l'immunité adaptative avec une réponse aberrante à une modification post-traductionnelle des peptides endogènes (citrullination notamment). La production d'auto-anticorps est précoce, avec un élargissement progressif du répertoire d'autoanticorps. Cette étape accompagne et amplifie une inflammation qui, après un second événement non élucidé, engendre une synovite non résolutive et la destruction articulaire. Dans le *second modèle*, l'activation aberrante de l'immunité innée et du stroma seraient des phénomènes précoces. Ces altérations seraient responsables d'un cercle vicieux inflammatoire, médié par le stroma, source de peptides arthritogènes et de l'auto-immunité, aboutissant à l'inflammation synoviale persistante.

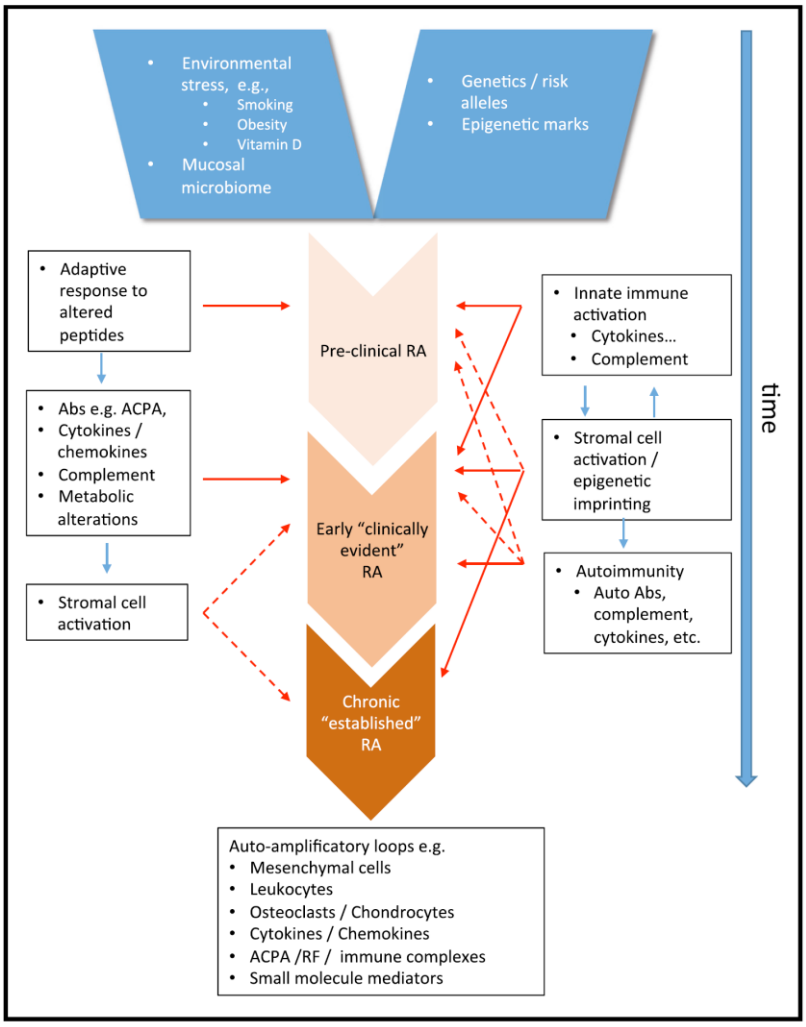



***Figure 9. Séquence des événements menant au développement d'une polyarthrite rhumatoïde cliniquement détectable : deux modèles potentiels.*** *Issu de Firestein & McInnes 2017 Immunity, Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [58].*

### 2.2.2. Prédisposition à la polyarthrite rhumatoïde

Les facteurs identifiés prédisposant à la PR sont majoritairement d'origine génétique et minoritairement d'origine non-génétique.

Les facteurs d'origine génétique ***(Figure 10)*** expliquent 60% du risque de développement d'une PR [62]. L'on retient classiquement le portage d'allèles *HLA-DRB1* codant l'épitope partagé [63] et les modifications épigénétiques impliquant la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones [64, 65]. Nous noterons aussi l'identification de *loci* codant des protéines pertinentes dans la biologie du monocyte/macrophage tels que :

- *PADI4* impliqué dans la citrullination de peptides potentiellement arthritogènes [66] et la génération d'ACPA par un modèle « haptène/porteur » (où la PAD joue le rôle de porteur) [67].
- *PTPN22*, codant pour une tyrosine phosphatase, impliquée dans la régulation de la citrullination PAD4-dépendante et de la NETose [68].
- *CCL21* codant pour une chémokine sécrétée par et attirant les macrophages M1/inflammatoires via le récepteur CCR7. Cette chimiokine intervient dans la circulation vers le site inflammatoire et les organes lymphoïdes secondaires [69, 70], mais aussi potentiellement dans le développement de structures lymphoïdes ectopiques au cours de la PR [71].
- *TNFRSF9* (CD137) et *TNFAIP3* respectivement impliqués (i) dans la prolifération des monocytes et la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en monocytes/macrophages [72], (ii) et dans la régulation de la signalisation NFκB (Nuclear Factor Kappa B) et de l'apoptose induite par le TNF [73].
- *IL6ST* (Gp130) impliqué dans la signalisation de l'IL-6 [74].
- *STAT4* impliqué dans la signalisation de l'IL-12 et de l'IL-23 [75].
- *IRF5* impliqué dans la polarisation dite M1/inflammatoire [76].
- *CD40* exprimé sur les cellules présentatrices telles que le macrophage et impliqué dans la costimulation des lymphocytes T [77].

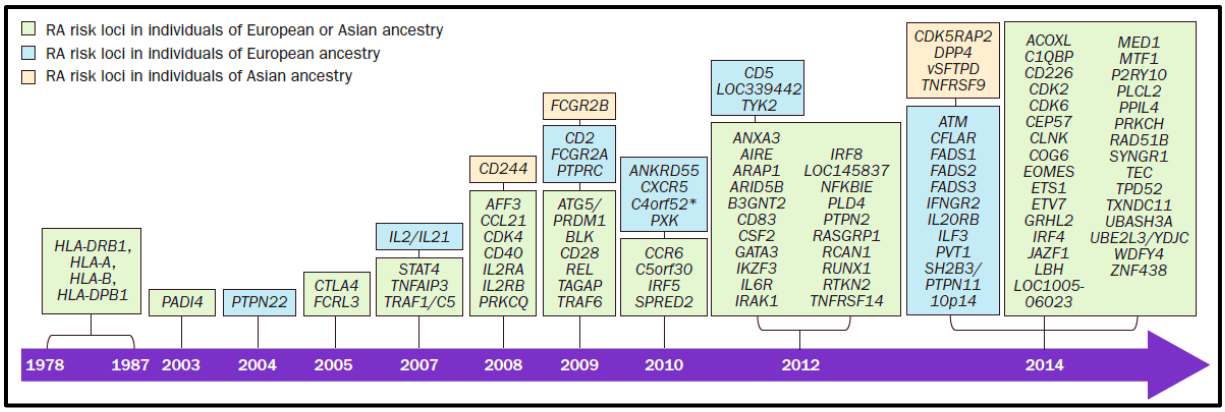



***Figure 10. Panorama historique des polymorphismes de susceptibilité identifiés dans la polyarthrite rhumatoïde.*** *Les loci à risque, identifiés par les études pangénomiques (genome-wide) avec un seuil de significativité de $p<5.0\ 10^{-8}$, ont été inclus. * Synonyme : C4orf52 = SMIM20. RA : polyarthrite rhumatoïde. Issu de Yamamoto et al. 2015 Nat. Rev. Rheumatol., Genetics of rheumatoid arthritis in Asia – present and future [78].*

Les facteurs d'origine non génétique, expliquent quant à eux 40% du risque. Le tabagisme [79], le sexe féminin [80], le microbiote parodontal [81, 82], l'obésité [83] sont les facteurs les plus univoques.

### 2.2.3. La phase préclinique

Cette phase correspond à la rupture de tolérance immunitaire. Un des éléments critiques semble être la présence de peptides arthritogènes. La modification post-traductionnelle la plus étudiée est la citrullination enzymatique des résidus arginine par la peptidyl-arginine déiminase ***(Figure 11)***.

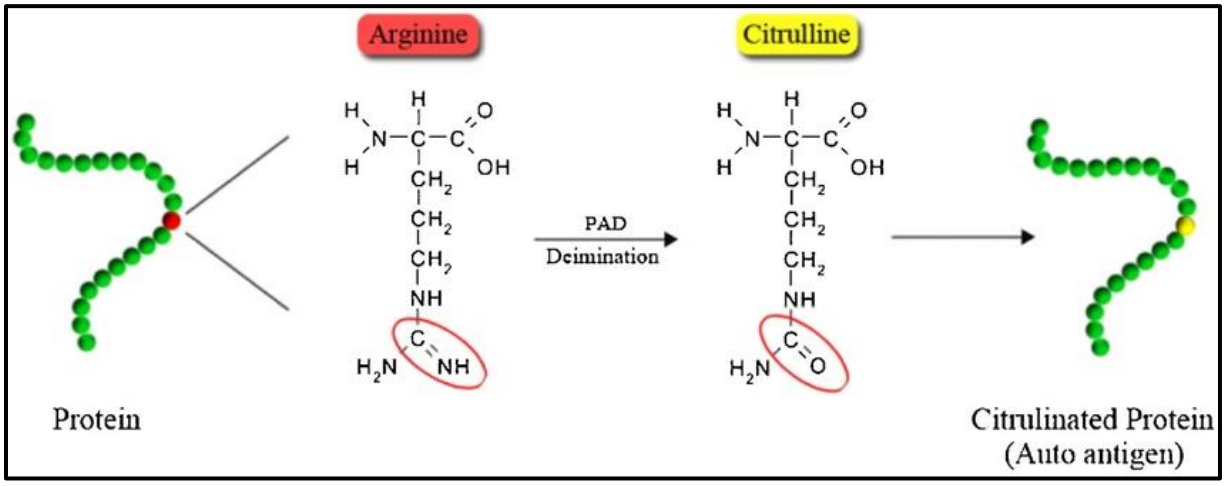



***Figure 11. Déimination ou citrullination de protéine par l'enzyme peptidyl arginine déiminase (PAD).*** *Issu de Kumar et al. 2016 Biomedicine Pharmacotherapy, Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis [84].*

La peptidylarginine déiminase (PAD) est une enzyme calcium-dépendante, responsable de la transformation de résidus arginine en résidus citrulline. In vivo, l'expression de l'ARNm des isoformes PAD2 et PAD4 est objectivée dans les cellules mononucléées du sang périphérique CD14+, les monocytes [66]. L'expression de l'ARNm de PAD4 se perd durant le processus de différenciation du monocyte en macrophage. Au niveau protéique, monocytes et macrophages présentent des niveaux similaires de PAD4 alors que PAD2 n'est de manière surprenante détectée que dans le macrophage. Cette observation est liée à une modification post-transcriptionnelle : (i) l'ARNm de PAD2 est détectable dans le sang périphérique et le liquide synovial mais la traduction semble avoir lieu uniquement lors du processus de différenciation accompagnant la migration vers la synoviale, (ii) l'expression de l'ARNm de PAD4 est perdue graduellement durant le processus d'infiltration synoviale mais la protéine déjà présente au stade monocytaire n'est pas dégradée lors de de la migration vers la synoviale et de la différenciation macrophagique qui l'accompagne ***(Figure 12)*** [66]. Il a été montré que la région 3' UTR est importante dans la régulation de la traduction de PAD2 et que la citrullination de protéines intracellulaires (vimentine) est dépendante du niveau en $Ca^{2+}$. Dans les macrophages, la vimentine est spécifiquement citrullinée après augmentation du $Ca^{2+}$ cytoplasmique. Les

protéines PAD2 et PAD4 sont détectables dans la synoviale rhumatoïde, leur niveau d'expression étant corrélé à l'intensité de l'inflammation synoviale (hyperplasie synoviale, infiltrat, hypervascularisation) [85]. Les PAD2 et PAD4 des macrophages synoviaux sont de potentielles sources d'épitopes ciblés par les ACPA, mais aussi des cibles antigéniques des ACPA (en tant que porteur d'haptène) [67]. De plus, les PAD pourraient se retrouver dans l'environnement des monocytes et macrophages nécrotiques, causant la citrullination de protéines extracellulaires, telles que la fibrine. Le peptide devient alors la cible des ACPA, spécifiques de la maladie.

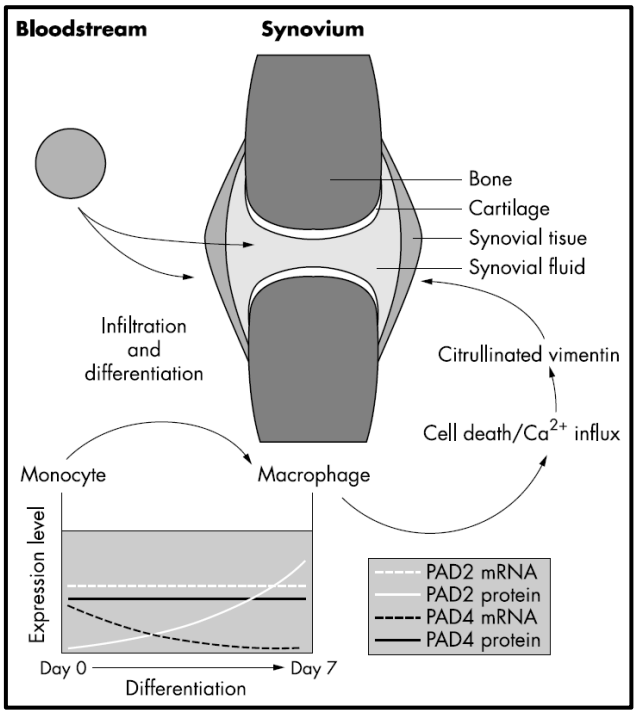
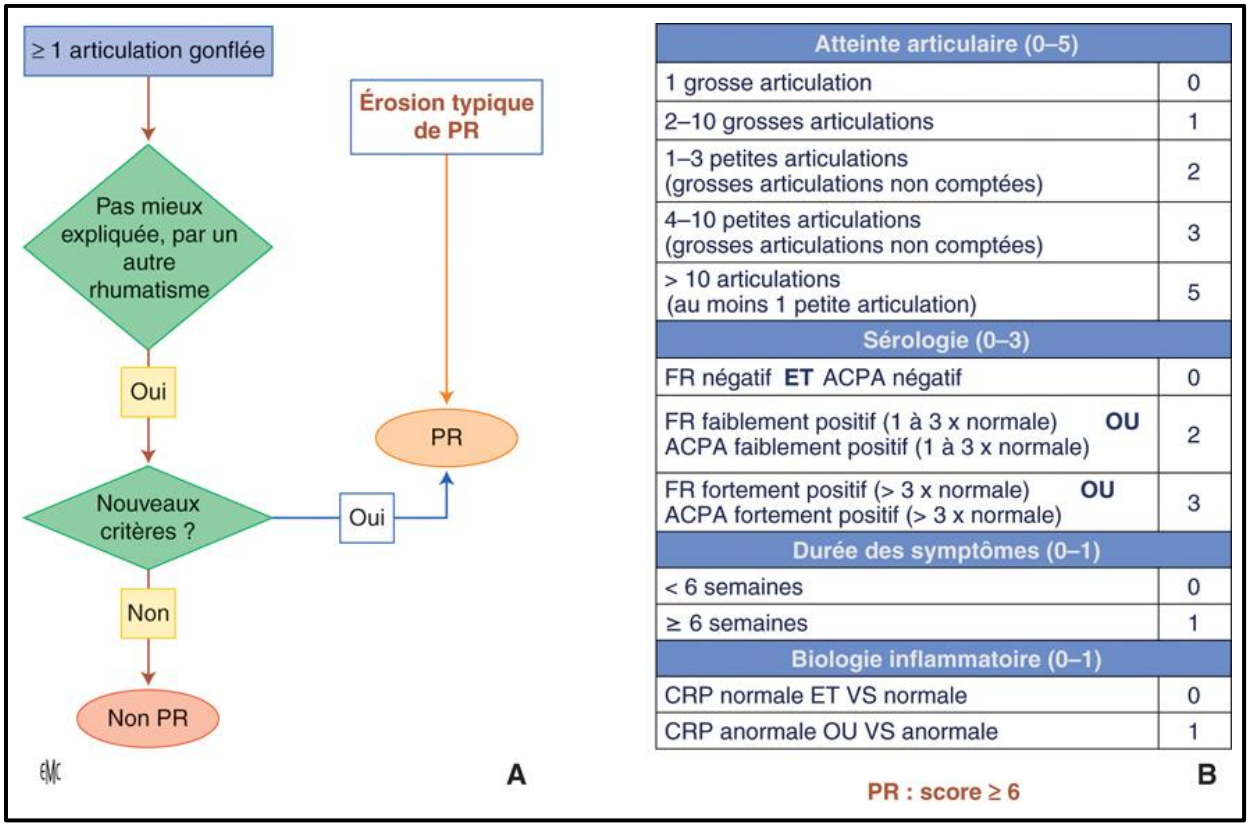



*Figure 12. Modèle d'infiltration synoviale PAD (peptidyl arginine déiminase). Issu de Vossenaar et al. 2004 Annals of Rheumatic Diseases, Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages [66].*

Des modifications différentes telles que la carbamylation, l'oxydation des cibles antigéniques et la génération d'adduit acétaldéhyde-malondialdéhyde, ont aussi été décrites et sont ciblées par l'auto-immunité rhumatoïde [86, 87]. En dehors des ACPA, d'autres auto-anticorps tels que les facteurs rhumatoïdes (non liés à la modification de peptides endogènes) sont retrouvés dans la PR. L'auto-immunité rhumatoïde peut dans certains cas précéder de plusieurs années l'apparition de l'arthrite [88].

### 2.2.4. Les phases cliniques de la polyarthrite rhumatoïde – la phase effectrice

L'apparition de l'arthrite définit la phase clinique. Cette phase est caractérisée par une inflammation synoviale, ou synovite, qui sera détaillée plus loin. La phase clinique initiale est celle de la PR débutante *(Figure 13)*. A cette étape, le rhumatisme peut ne pas être classifié [89] et l'on parle alors d'arthrite « indifférenciée ».




| Atteinte articulaire (0–5) | |
|---|---|
| 1 grosse articulation | 0 |
| 2–10 grosses articulations | 1 |
| 1–3 petites articulations (grosses articulations non comptées) | 2 |
| 4–10 petites articulations (grosses articulations non comptées) | 3 |
| > 10 articulations (au moins 1 petite articulation) | 5 |
| **Sérologie (0–3)** | |
| FR négatif **ET** ACPA négatif | 0 |
| FR faiblement positif (1 à 3 x normale) **OU** ACPA faiblement positif (1 à 3 x normale) | 2 |
| FR fortement positif (> 3 x normale) **OU** ACPA fortement positif (> 3 x normale) | 3 |
| **Durée des symptômes (0–1)** | |
| < 6 semaines | 0 |
| ≥ 6 semaines | 1 |
| **Biologie inflammatoire (0–1)** | |
| CRP normale ET VS normale | 0 |
| CRP anormale OU VS anormale | 1 |

*Figure 13. Critères ACR/EULAR 2010 pour la classification et le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde. ACPA : anticorps anti. CRP : C réactive protein. FR : facteurs rhumatoïdes. PR : polyarthrite rhumatoïde. VS : vitesse de sédimentation. Issu de Combe et al. 2015 Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : épidémiologie, clinique et diagnostic.*

Après une durée variable d'évolution, la PR est dite « établie » ou « chronique ». La synovite est auto-entretenue, sans résolution de l'inflammation, avec une dégradation articulaire.

Au cours de la PR clinique, la membrane synoviale subit des modifications majeures : (i) une hyperplasie de la couche bordante avec prolifération des synoviocytes et infiltrat immunitaire comprenant des macrophages, (ii) un infiltrat sous-intimal de cellules mononucléées. Cet ensemble, appelé pannus synovial, présente un caractère localement agressif car participant activement au délabrement articulaire.

### 2.2.5. Rôle du monocyte et du macrophage lors de la phase effectrice de la polyarthrite rhumatoïde

La lignée myélo-monocytaire génère une part importante des événements associés à la synovite rhumatoïde et à la destruction articulaire. Parmi les cellules composant cette lignée, les macrophages sont des effecteurs essentiels de la synovite rhumatoïde par le biais de leur production de médiateurs inflammatoires et de leur interaction locale avec les cellules immunitaires et non immunitaires. Nous présenterons ici les fonctions de macrophages présents au sein de la synovite rhumatoïde.

#### *2.2.5.1. La contribution des monocytes*

Les monocytes sont issus d'un précurseur médullaire. Après leur sortie du compartiment médullaire, ils patrouillent dans le compartiment sanguin. Trois sous-populations de monocytes sanguins ont été identifiées sur la base de l'expression des marqueurs de surface CD14 (co-récepteur du LPS) et CD16 (récepteur FcγRIII des IgG). Les monocytes $CD14^{hi}$ $CD16^{-}$ dits « classiques » sont majoritaires, les monocytes $CD14^{hi}$ $CD16^{lo}$ dits « intermédiaires » et les monocytes $CD14^{lo}CD16^{hi}$ dits « non-classiques » [90]. D'autres marqueurs [91, 92] tels que :

- $CCR2^{hi}$ $CD163^{+}$ pour les monocytes classiques et intermédiaires,
- $CCR2^{lo}$ $CD163^{-}$ $CD62^{lo}$ $CX3CR1^{hi}$ pour les monocytes non-classiques,
- HLA-$II^{hi}$ $CD74^{hi}$ pour les monocytes intermédiaires,

ont été proposés pour décrire les sous-populations de monocytes humains. Toutefois CD14 et CD16 restent les marqueurs les plus communément utilisés. Le dogme de la classification des monocytes en 3 sous-populations est affiné par l'apport des technologies plus récentes telle que le Single-cell RNA Sequencing [93]. La population des monocytes serait composée de 4 et non 3 sous populations. Les 2 principales correspondraient aux 2 populations majoritaires : monocytes classiques et monocytes non-classiques. Par contre, il semblerait que la population dite intermédiaire soit hétérogène et se compose (i) de monocytes exprimant une combinaison unique de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la différenciation et le trafficking (*MXD1, CXCR1, CXCR2, VNN2*), (ii) et de monocytes possédant une signature génétique « cytotoxique » (*PRF1, GNLY, CTSW*) en plus du jeu de gènes caractéristiques des monocytes classiques. Le rôle spécifique de ces 2 sous-populations est méconnu.

Au cours de la PR, une dérégulation de l'homéostasie des monocytes et macrophages a été mise en évidence. Il existe une expansion des monocytes intermédiaires $CD14^{hi}$ $CD16^{lo}$ dans le sang et le liquide synovial [94-97].

Comparativement aux monocytes classiques, ces monocytes intermédiaires sont des contributeurs majeurs à la production de TNF [98]. Par ailleurs, ils promeuvent l'expansion des lymphocytes Th17 [96]

et Th1 [97] qui ont été identifiés comme impliqués dans la PR. De plus les monocytes/macrophages de la PR présentent une expression augmentée des récepteurs Toll-like 2, 3, 4 qui contribuent à la physiopathologie rhumatoïde (Cf. paragraphe 2.5.2.) [99], une résistance à l'apoptose [100] et une dérégulation des microARN, tels que miR-146 et miR-155 impliqués dans la polarisation du macrophage [101, 102].

Chez l'Homme, en condition inflammatoire, les monocytes migrent du sang vers le foyer inflammatoire. L'efflux des monocytes du sang vers la synoviale est notamment contrôlé par les chimiokines CCL2 (MCP1), CX3CL1 (fractalkine) et CXCL8 (IL-8). *In situ*, ces monocytes se différencient en macrophages dits « infiltrants » et exercent leur action pro-inflammatoire.

La contribution des monocytes Ly6C$^-$ à l'arthrite murine reste sujet à débat. La présence de monocytes non-classiques Ly6C$^-$ contribuerait à la phase effectrice de l'arthrite murine (transitoire) induite par transfert de sérum K/BxN ***(Figure 14)*** [103]. Dans un premier temps, ils se différencieraient en macrophages inflammatoires M1 et médieraient les manifestations inflammatoires. Dans un second temps, ils modifieraient leur phénotype vers un type M2 favorable à la résolution de l'arthrite. Par ailleurs, les macrophages résidents limiteraient le développement de l'arthrite. Ce modèle n'a pour l'instant pas été confirmé chez l'Homme.

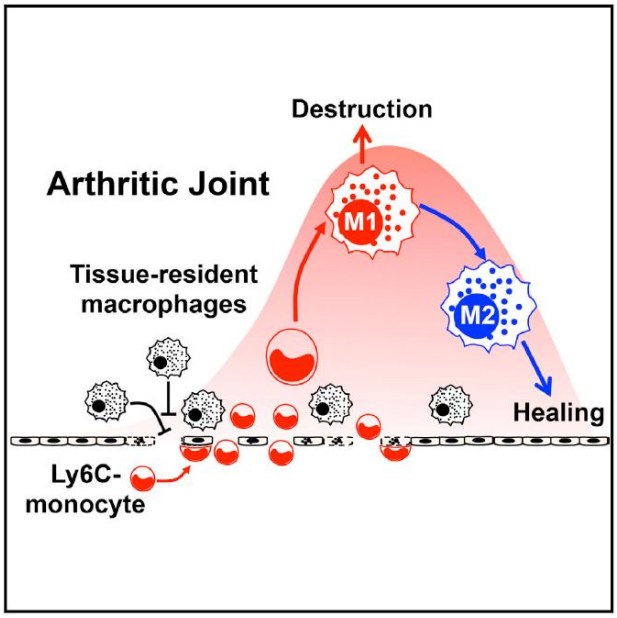



***Figure 14. Contribution des monocytes non-classiques au développement de l'arthrite murine par transfert de sérum K/BxN.*** *Issu de Misharin et al. 2014 Cell Reports, Nonclassical Ly6C$^-$ monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice [103].*

NR4A1 (Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1) est un facteur de transcription contrôlant la différenciation et la survie des monocytes Ly6C$^-$. Les données expérimentales chez la souris NR4A1$^{-/-}$

[104], suggèrent que contrairement aux monocytes Ly6C$^{+}$ (inflammatoires) les cellules Ly6C$^{-}$ (patrouilleurs) ne participent pas à l'induction et à la progression de l'arthrite murine induite par transfert de sérum. *A contrario*, un potentiel régulateur, *via* la mobilisation de lymphocytes Treg, est suspecté [105].

La question de la nature du/des précurseur(s) ostéoclastiques en situation physiologique et en contexte inflammatoire, tel que la PR, n'est pas résolue. Une des sources possibles est le monocyte circulant. La génération *in vitro* d'ostéoclastes, à partir de monocytes, a permis de montrer que l'ostéoclaste dérivait préférentiellement des monocytes murins inflammatoires FcγRIV$^{-}$ Ly6C$^{hi}$ (par opposition au FcγRIV$^{+}$ Ly6C$^{lo}$) et des monocytes humains correspondants *i.e.* CD14$^{hi}$ CD16$^{-}$ (par opposition aux CD14$^{lo}$ CD16$^{hi}$) [106]. De plus, cette étude a montré que la déplétion « sélective » de monocytes murins inflammatoires Ly6C$^{hi}$, par un anticorps anti-CCR2, réduisait drastiquement l'ostéoclastogénèse et la destruction osseuse dans le modèle d'arthrite par transfert de sérum K/BxN. Il semble que le potentiel des monocytes CD16$^{-}$ humains à se différencier en ostéoclastes soit lié à l'expression de l'intégrine αVβ3 en présence de M-CSF et RANKL, expression non retrouvée chez les monocytes CD16$^{+}$ [107]. Un autre précurseur ostéoclastique a été identifié chez la souris arthritique SKG : le précurseur médullaire CD11b$^{-/lo}$ Ly6C$^{hi}$ [108]. Ce précurseur est phénotypiquement distinct des MDPs (monocyte DC precursors), des CDPs (common DC precursors) et des sous-populations de monocytes. Par ailleurs, il aurait la particularité d'être immunomodulateur, notamment en supprimant la prolifération des lymphocytes T CD4$^{+}$ et T CD8$^{+}$.

#### *2.2.5.2. Activation des macrophages dans la polyarthrite rhumatoïde*

Par opposition aux macrophages « infiltrants » différenciés à partir de monocytes sanguins en condition inflammatoire, il est décrit des macrophages « résidents ». Leur origine exacte n'est pas élucidée. Ils pourraient être issus d'une hématopoïèse soit embryonnaire, soit post-natale [109]. Ces macrophages sont caractérisés par leur longue durée de vie, une potentielle capacité de renouvellement et un phénotype plus favorable à l'homéostasie qu'à l'inflammation [103].

La réalité de la polarisation M1/M2 n'est pas démontrée dans la PR. Les données concernant cette polarisation sont essentiellement issues des modèles murins, alors qu'il existe peu de données en pathologie humaine. Dans la PR, il n'existe pas de dichotomie claire M1/M2 dans le liquide articulaire et la membrane synoviale. Les macrophages co-expriment des marqueurs M1 et M2. Toutefois, sur le plan fonctionnel, il existe des éléments en faveur d'un biais alternatif des macrophages résidents et d'un biais inflammatoire des macrophages infiltrants [20, 110].

Plusieurs types de stimuli sont à même d'activer les macrophages au cours de la PR ***(Figure 15)***.

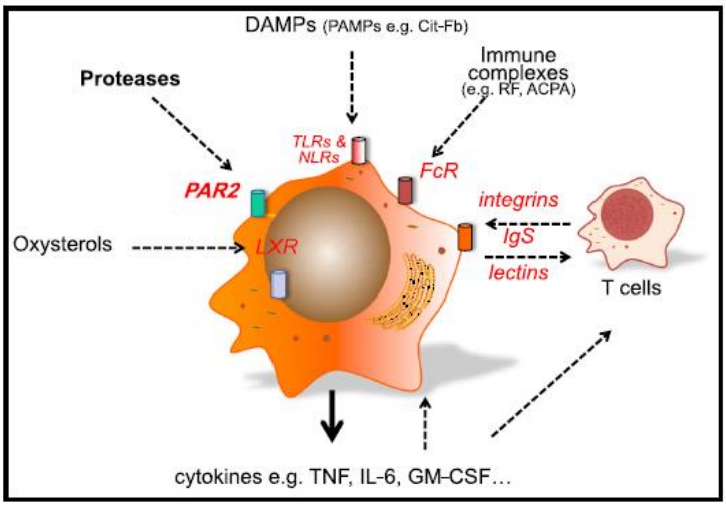



***Figure 15. Les cellules myéloïdes, en particulier les macrophages, sont centrales dans la perpétuation de polyarthrite rhumatoïde.*** *FcR : Fc Receptor, GM-CSF : Granulocyte Macrophage – Colony-Stimulating Factor, IL : Interleukin, NLR : Nucleotide oligomerization domain-Like receptor, PAR2 : Protease Activated Receptor 2, TLR : Toll-Like Receptor, TNF : Tumor Necrosis Factor. Issu de Firestein & McInnes 2017 Immunity, Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [58].*

Les études murines et humaines suggèrent que les ligands endogènes de TLR peuvent être impliqués dans la pathogénie de certaines maladies auto-immunes dont la PR ***(Tableau 1)*** [111, 112].

| TLRs | Ligands and references |
|---|---|
| TLR2 | Biglycan [29], endoplasmin [56], HMGB1 [74], HSP60 [52], HSP70 [53, 54], human cardiac myosin [38], hyaluronan [32, 63, 75] and monosodium urate crystals [72, 73] |
| TLR3 | mRNA [68, 69] |
| TLR4 | Biglycan [29], CD138 [23], α-crystallin A chain [57], β-defensin 2 [47, 48], endoplasmin [56], fibrinogen [30], fibronectin [27], heparan sulphate [28], HMGB1 [21, 41], HSP22 [57], HSP60 [51, 52, 60], HSP70 [53–55], HSP72 [58, 59], hyaluronan [32, 75, 76], monosodium urate crystals [72, 73], OxPAPC [71], resistin [61], S100 proteins [35, 36], surfactant protein A [62] and tenascin-C [37] |
| TLR7 | RNA [66, 67] and small interfering RNA (siRNA) [70] |
| TLR8 | Human cardiac myosin [38] and small interfering RNA (siRNA) [70] |
| TLR9 | DNA [64, 65] and HMGB1[42] |

***Tableau 1. Récepteurs Toll-like et leurs ligands endogènes.*** *Issu de Yu et al. 2010 Journal of Cellular and Molecular Medicine, Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance [112].*

TLR 2 et 4 sont impliqués dans l'inflammation rhumatoïde [113]. TLR4 peut reconnaitre plusieurs ligands : soit endogènes, soit exogènes. Le lipopolysaccharide (LPS) est le ligand exogène le plus classiquement décrit. Certains auteurs lui attribuent un rôle dans la PR par le biais de la reconnaissance de pathogènes des muqueuses. Les muqueuses digestive, buccale et pulmonaire pourraient être un site d'initiation de la PR. La parodontopathie et la dysbiose buccale sont d'ailleurs fréquentes dans la PR et pourraient contribuer au développement de l'immunité spécifique anti-peptides citrullinés. Les germes impliqués dans la parodontopathie et susceptibles d'être reconnus par TLR 2 ou 4 sont :

- *Porphyromonas gingivalis*, reconnu via TLR4 voire TLR2 [114], et qui possède une capacité à citrulliner les protéines pertinentes dans la PR que sont le fibrinogène et l'α-enolase humains [115]
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, reconnu via TLR4 [116], et qui induit une hypercitrullination au sein des neutrophiles et favoriserait le relargage d'auto-antigènes citrullinés [82].

Par ailleurs, TLR4 est capable de reconnaitre des ligands endogènes :

- Natifs : fibrinogène, collagène, fragments d'acide hyaluronique [117],
- Citrullinés [118],
- Au sein de complexes immuns, activant une réponse inflammatoire via TLR4, inhibée avec des antagonistes de TLR4 [119].

L'activation des macrophages passe aussi par le M-CSF. Il s'agit d'un facteur de croissance essentiel au développement des macrophages en condition d'homéostasie. Certains auteurs le considèrent comme un stimulus polarisant les macrophages vers un phénotype alternatif, par opposition au GM-CSF qui induirait une polarisation inflammatoire. Cette vision n'est toutefois pas consensuelle [44, 54]. D'ailleurs, la comparaison de l'effet du M-CSF et du GM-CSF, dans des macrophages humains et murins montre que plus de 80% des gènes sont régulés dans le même sens par les deux stimuli [120, 121]. Plusieurs éléments sont en faveur d'une contribution du M-CSF aux phénomènes inflammatoires de la PR. Le M-CSF promeut la prolifération, la survie et la maturation des monocytes, macrophages et ostéoclastes qui sont des cellules effectrices de la PR [122-124]. L'évaluation *in vitro* de macrophages dérivés de monocytes humains a permis de montrer qu'en présence d'ACPA-complexes immuns, les macrophages exposés au M-CSF produisent plus de TNF que ceux exposés à l'IFNγ, l'IL-4 ou l'IL-10 [125]. De plus, le M-CSF est requis pour le développement de l'arthrite murine induite au collagène [126]. Enfin, le ciblage du M-CSF permet d'améliorer l'arthrite murine [127-130].

Un autre mode d'activation du macrophage au cours de la PR passe par ses récepteurs aux immunoglobulines. Les données de la littérature montrent un rôle pathogène FcγR-dépendant des autoanticorps de la PR. L'engagement du CD32a des macrophages humains, par des complexes immuns ACPA-fibrinogène citrulliné, induit la production de TNF [131]. Les complexes immuns contenant des ACPA induisent une réponse TNF 9 fois plus importante par les macrophages du liquide synovial que par les monocytes sanguins de patients atteints de PR et de sujets contrôles [132].

Outre les ACPA, d'autres anticorps spécifiques de la PR, les facteurs rhumatoïdes (FR), jouent un rôle pathogène. Les FR IgM amplifient la réponse inflammatoire (TNF, IL-1, IL-6) des macrophages (mais pas

des monocytes) aux complexes immuns contenant des ACPA [133]. De plus les surnageants de macrophages activés par ces complexes immuns induisent une plus grande production d'IL-6 par les synoviocytes de patients atteints de PR, lorsque l'activation des macrophages a été faite en présence de FR. Ces deux observations permettent de mieux comprendre la sévérité clinique plus importante des PR FR+ ACPA+ par rapport aux PR séronégatives. L'amplification du potentiel inflammatoire des complexes immuns contenant des ACPA, par les FR IgM et IgA, est dépendante des fonctions effectrices de Fc récepteurs et du complément [55].

#### *2.2.5.3. Production de médiateurs inflammatoires par les macrophages*

Les macrophages synoviaux ont été identifiés comme les principaux producteurs des cytokines inflammatoires telles que le TNF [134], l'IL1, l'IL6. Les taux des cytokines inflammatoires sont plus élevés dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de PR comparativement aux sujets contrôles (arthrose ou autre rhumatisme inflammatoire) [134-136]. Le rôle central de ces cytokines dans l'inflammation rhumatoïde en a d'ailleurs fait des cibles thérapeutiques pour les biothérapies communément utilisées dans la PR (Cf. Chapitre 3).

La production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) et de l'azote participe à la physiopathologie de la PR [137], dans un contexte de défense compromise contre le stress oxydatif [138, 139]. Ces radicaux libres sont générés principalement par les phagocytes (PNN, monocytes et macrophages) via le complexe NADPH oxydase (Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide-PHosphate oxydase) et la phospho-oxydation mitochondriale ***(Figure 16)*** [140]. Cet environnement induit une peroxydation des lipides [141], des dommages oxydatifs de l'ADN [142], une dégradation de la matrice cartilagineuse [143] et un auto- entretien de l'inflammation [144]. Toutefois, l'impact des ROS et du NO au cours de la PR semble être dual avec l'induction dans certains modèles (rats Lewis et macrophages humains mutés pour la protéines phagocyte oxidase $p47^{phox}$ et $gp91^{phox}$), par les macrophages, de Treg (lymphocytes T régulateurs) de manière ROS-dépendante [145] ou même un effet immunomodulateur du NO [146].

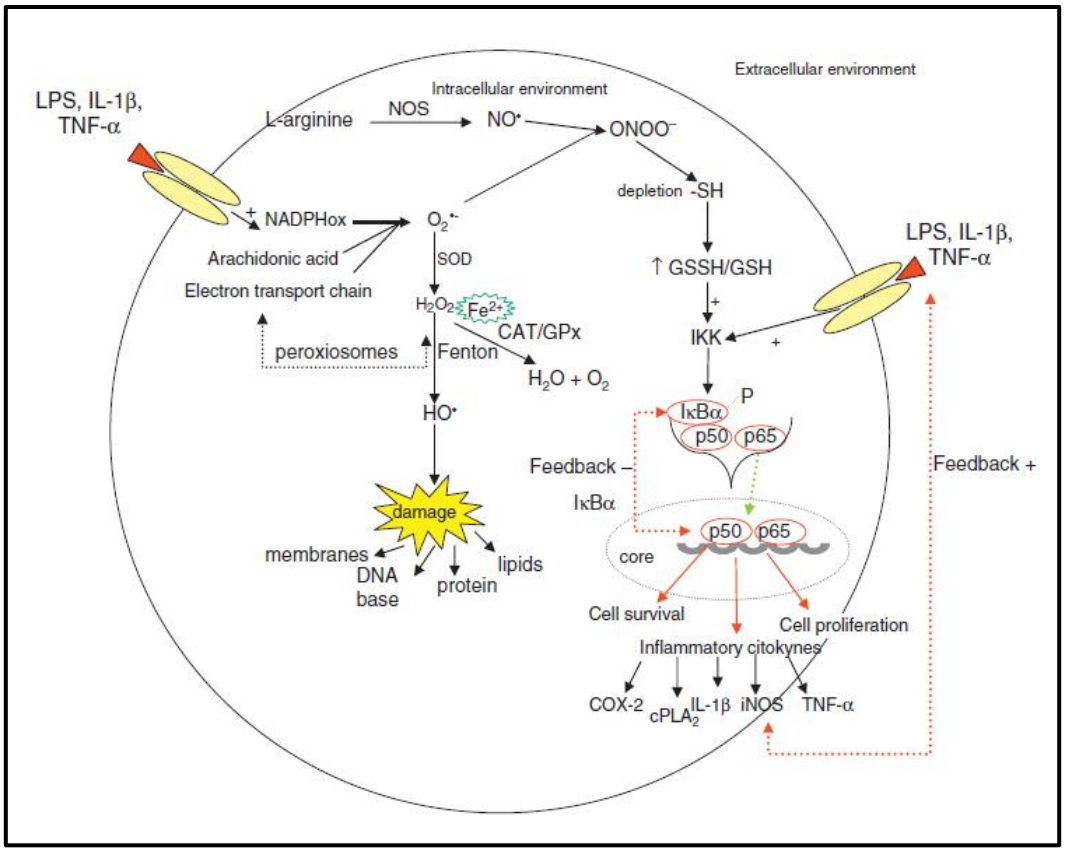



*Figure 16. Formation des espèces radicalaires de l'oxygène et de l'azote et leurs cibles. O2•- : anion superoxyde ; H2O2 : peroxyde d'hydrogène; HO• : radical hydroxyle; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : enzyme catalase endogène ; GPx : enzyme glutathion endogène ; L-arginine : enzyme précurseur de l'oxyde nitrique ; NADPHox : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydase; NO : oxyde nitrique ; NOS : nitric oxide synthase; ONOO- : peroxynitrite; -SH : groupement sulphydryl ; GSSH/GHS : ratio glutathion oxydé/réduit ; IKK : inhibitor kappa kinase; IkBa : inhibitor kappa B; P : phosphorylation; cPLA2 : cytosolic phospholipase A2; COX2 : cyclooxygénase 2; iNOS : inducible nitric oxide synthase; LPS : lipopolysaccharides; TNF-a : tumour necrosis factor alpha; IL-1b : interleukin 1 beta. Issu de Filippin et al. 2008 Clinical and Experimental Immunology, Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis [144].*

Au cours de la PR, il existe une néo-angiogenèse pathologique, partiellement induite par les macrophages [147]. Une des causes est l'hypoxie liée à la demande métabolique augmentée par l'infiltrat, l'inflammation et l'hyperplasie synoviale [148]. Cette angiogenèse favorise le recrutement de cellules inflammatoires et la production de médiateurs inflammatoires, entretenant ainsi la synovite ***(Figure 17)***. Plusieurs facteurs angiogéniques sont retrouvés en grande quantité dans le sérum, le liquide synovial ou la synoviale de patients atteints de PR : des facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), des CXC chimiokines avec motif ELR (Glu-Leu-Arg ; CXCL1, CXCL5, CXCL8/IL-8 et CXCL16), des cytokines telles que le TNF [147]. Les macrophages synoviaux activés et les synoviocytes fibroblastiques produisent nombre de ces facteurs dont le VEGF, le FGFβ (Fibroblast Growth Factor β), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), en réponse au TNF, à l'IL-1 et à l'IL-6

notamment [149-151]. Ils sont aussi la source de facteurs anti-angiogéniques : IP-10/CXCL10, Mig/CXCL9, IFN-γ, TIMPs (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases) et TSP2 (Thrombospondine) [152].

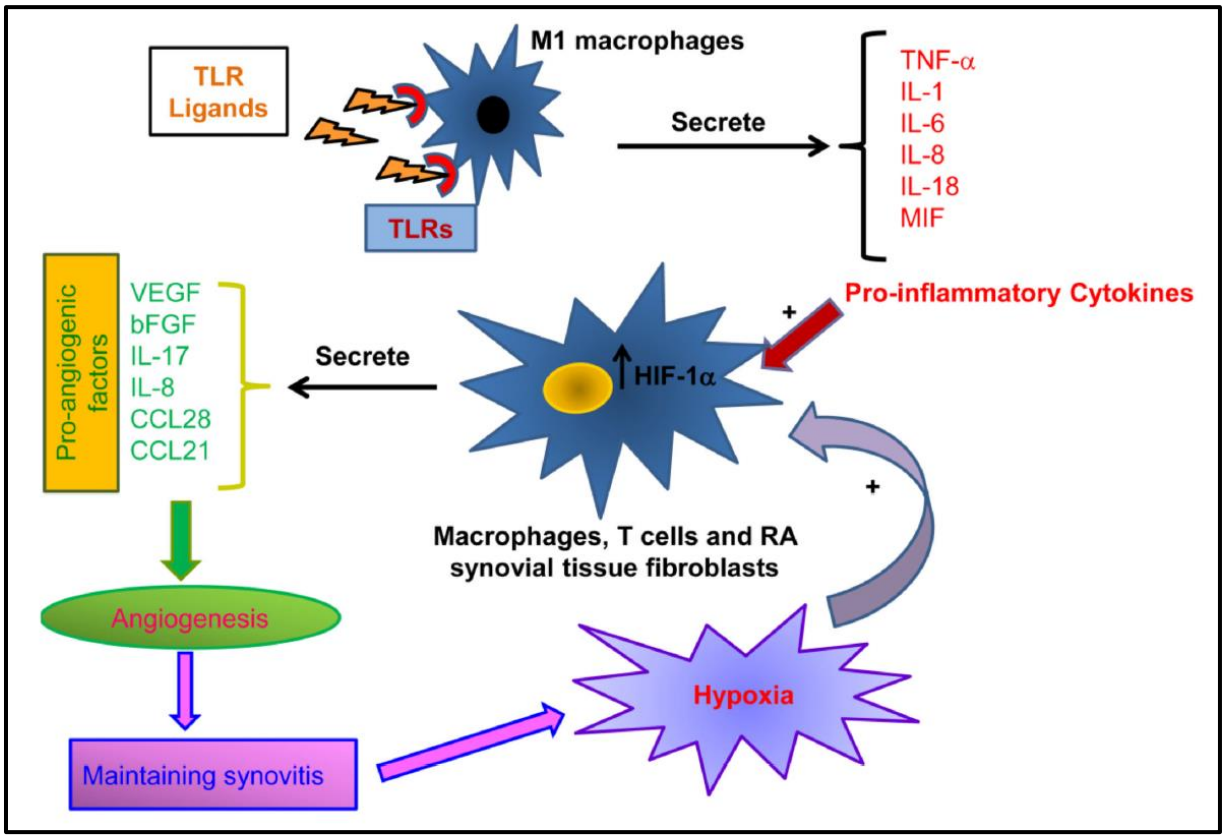



*Figure 17. Induction de l'angiogenèse par les macrophages. bFGF : Fibroblast Growth Factor β, CCL : C-C chemokine Ligand, HIF-1α : Hypoxia Inducible Factor-1α, IL : interleukine, MIF : Macrophage migration Inhibitory Factor TLR : Toll-like Receptor, TNF : Tumor Necrosis Factor, VEGF Vascular Endothelial Growth Factor. Issu de Elshabrawy et al. 2015 Angiogenesis, The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis [149].*

### *2.2.5.4. Destruction articulaire*

Dans la PR, les synoviocytes fibroblastiques développent un phénotype agressif pseudo-tumoral avec indépendance d'ancrage, perte de l'inhibition de contact, résistance à l'apoptose, production de médiateurs inflammatoires [22, 153]. L'interaction fibroblastes / macrophages (i) induit chez les fibroblastes la production de médiateurs inflammatoires activant les macrophages (IL-6, IL-8, GM-CSF, prostanoïdes) [154-156], (ii) contribue directement à la dégradation du cartilage par les fibroblastes (via des collagénases : MMP (métalloprotéase de matrice) 1,3 et 13) [157, 158], (iii) pérennise ainsi la synovite par une boucle auto/paracrine *(Figure 18)*.

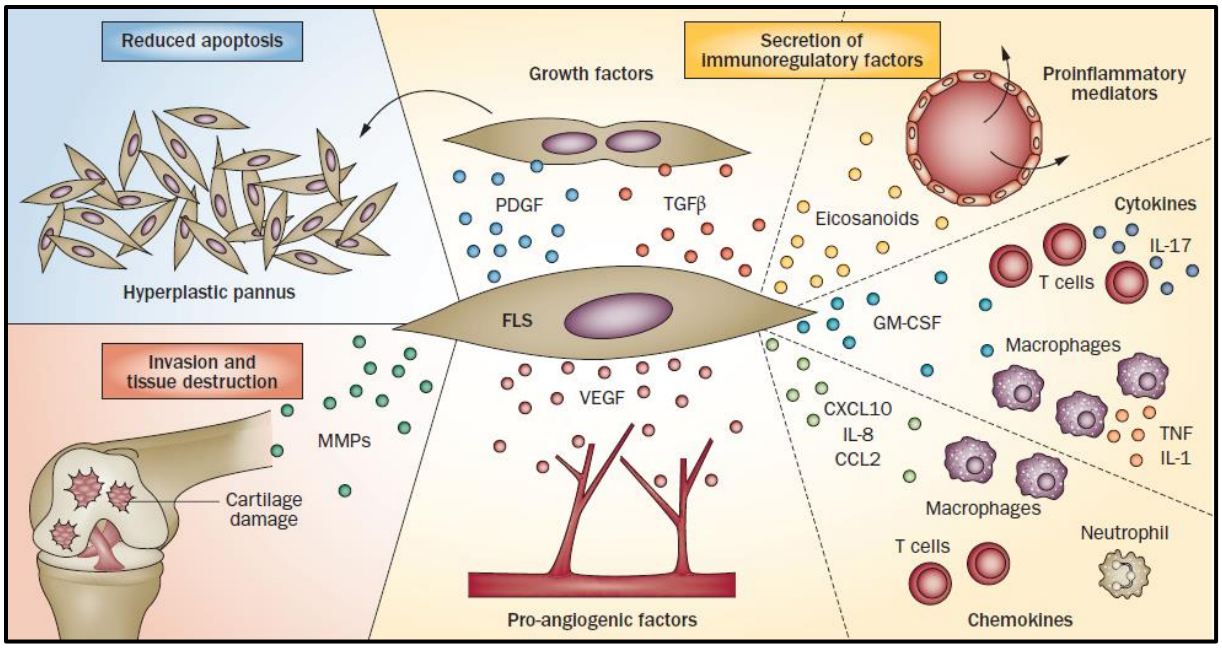



*Figure 18. Rôle des synoviocytes fibroblastiques dans la polyarthrite rhumatoïde. CCL2, CC-chemokine ligand 2; CXCL10, CXC-chemokine ligand 10; FLS, fibroblast-like synoviocytes; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; MMP, matrix metalloproteinase; PDGF, platelet-derived growth factor; RA, rheumatoid arthritis; TGF-β, transforming growth factor β; VEGF, vascular endothelial growth factor. Issu de Bottini et al., 2013 Nature Reviews Rheumatology, Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors [159].*

Les macrophages de l'infiltrat synovial contribuent également à l'atteinte osseuse de la PR. L'ostéoclaste dérive de précurseurs myéloïdes [160]. *In vitro*, une différenciation a pu être montrée à partir de monocytes sanguins et de macrophages [161]. A l'image de ce qui a pu être montré avec les cellules dendritiques conventionnelles [162], il n'est pas exclu que les ostéoclastes générés lors de l'inflammation rhumatoïde puissent être issus d'une transdifférenciation de macrophages inflammatoires. Toutefois, la nature exacte du précurseur majoritairement impliqué dans la PR n'a pas été élucidée. Ses origines supposées sont : le monocyte sanguin recruté en contexte inflammatoire, un précurseur médullaire spécifique, un macrophage infiltrant trans-différencié. L'ostéoclastogénèse est induite en présence de M-CSF et RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) [163, 164]. La régulation de l'ostéoclastogénèse dépend des ostéocytes, des ostéoblastes, de l'équilibre RANKL/M-CSF/OPG (ostéoprotégérine) et de l'environnement induit par les cellules immunitaires [160]. Le macrophage intervient donc à double titre dans l'ostéoclastogénèse de la PR : d'une part en tant que probable précurseur de l'ostéoclaste, d'autre part en tant que producteur de cytokines activant le phénomène (TNF, IL-1 et IL-6) ***(Figure 19)***.

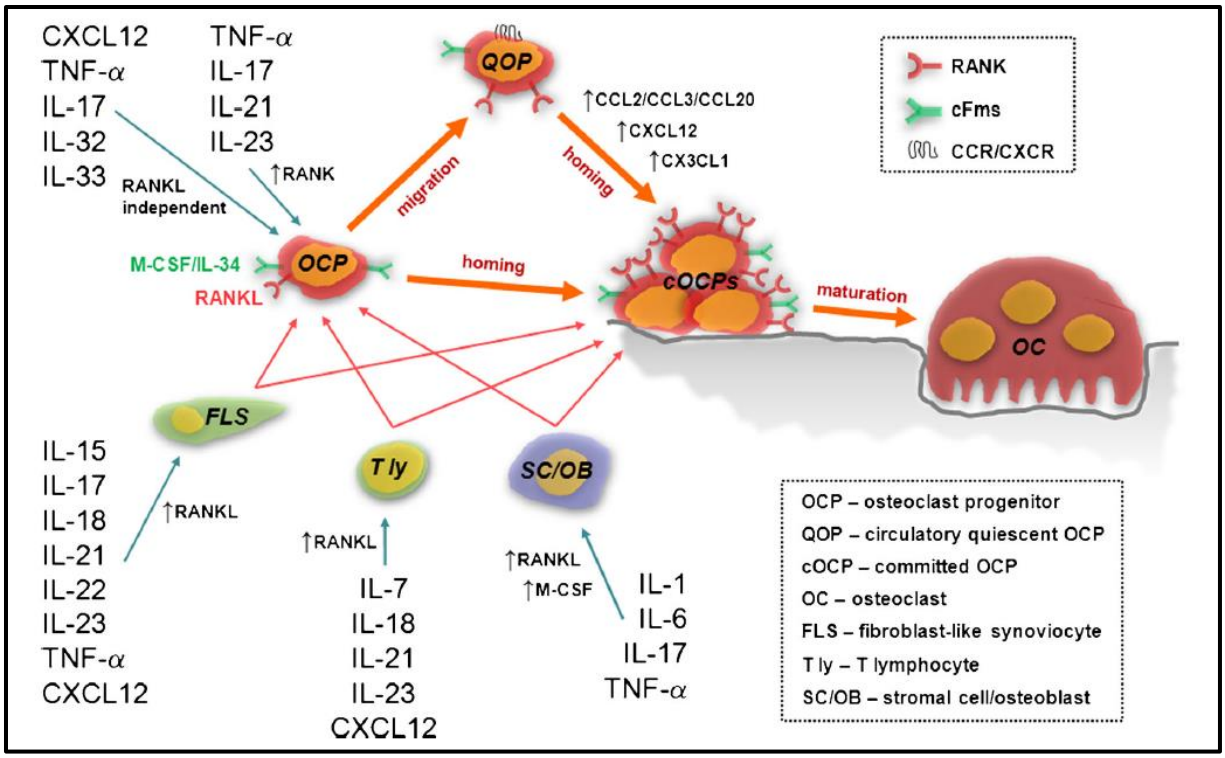



*Figure 19. Induction de l'ostéoclastogénèse en contexte d'arthrite. IL interleukine, TNF-α : tumor necrosis factor α, RANK : receptor activator of nuclear factor-κB, RANKL : RANK ligand, M-CSF : macrophage colony stimulating factor, cFms : récepteur du M-CSF, CXCR/CCR : receptors des chimiokines. Issu de Sucur et al., 2014 International Orthopaedics, Induction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: key to bone destruction in arthritis [165].*

### 2.2.5.5. Interaction avec les autres cellules immunitaires

Les neutrophiles (PNN) participent à la physiopathologie de la PR [166]. Ils sont peu nombreux au sein de la synoviale mais majoritaires dans la synovie. L'interaction PNN/macrophage entretient la synovite rhumatoïde. Il existe une résistance à l'apoptose des PNN [167], ce qui potentialiserait les dégâts tissulaires. Celle-ci semble notamment être le fait de cytokines anti-apoptotiques (GM-CSF, IL-8 voire TNF) potentiellement produites par les monocytes/macrophages et qui à certaines concentrations promeuvent la survie des PNN [167]. Ces médiateurs induisent aussi un priming des PNN, majorant leur potentiel de choc respiratoire lors d'une activation ultérieure [168, 169].

Les monocytes/macrophages favorisent l'afflux des PNN : leur production d'IL8 favorise le chimiotactisme des PNN, le TNF augmente l'expression des molécules d'adhésion du PNN et le GM-CSF qui favorise l'extravasation des PNN [170].

La nétose, mort cellulaire propre aux PNN et servant de défense antibactérienne, est augmentée chez les patients atteints de PR, y compris au sein de la synoviale [171]. Ce mécanisme est augmenté en présence de TNF [171] et entretient l'inflammation. Les PNN influencent aussi les macrophages. La

libération de MPO (myéloperoxydase) par le PNN favoriserait la production de ROS, cytokines inflammatoires et GM-CSF par les macrophages. Le TNF produit par les PNN active les macrophages [170].

Les macrophages contribuent à l'action pro-inflammatoire des lymphocytes T à plusieurs niveaux [172] : (i) ils expriment les molécules HLA- et les molécules CD40, CD80, CD86, responsables respectivement de la présentation d'antigènes et de la costimulation des lymphocytes T CD4; (ii) ils contribuent à la polarisation Th1, Th17 d'une part et Treg d'autre part, via leur production de cytokines (IL-1, IL-6, IL-23, IL-10, TGFβ) [173]; (iii) ils peuvent orienter vers une réponse Th17 de manière cytokine-indépendante et contact-dépendante [174] ; (iv) leur production d'IL-15 et d'IL-18 est chimio-attractante pour les cellules T et induit chez elles la production de TNF et d'IL17 [175, 176] ; (v) la production de CXCL16 par les macrophages synoviaux participe au recrutement de lymphocytes T CXCR6+ [177] ;(vi) leur production de ROS pourrait aussi moduler la réponse T auxiliaire, notamment les T régulateurs (Treg) [145].

Les lymphocytes influencent aussi directement les macrophages ***(Figure 20)*** : (i) par leurs cytokines Th1 et Th17 favorisant la production de TNF, IL-1 et IL-6 par les macrophages [178] ; (ii) leur production de RANKL favorisant l'ostéoclastogénèse [179] ; (iii) les T effecteurs et Treg sont capables d'induire l'apoptose des monocytes/macrophages par les voies FAS/FAS*L, TRAIL* (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand) *ou* TWEAK (Tumor necrosis factor-like WEAK inducer of apoptosis) [180, 181] ; (iv) l'IL-10 produite par les Treg peut induire des macrophages pro-résolutifs [182].

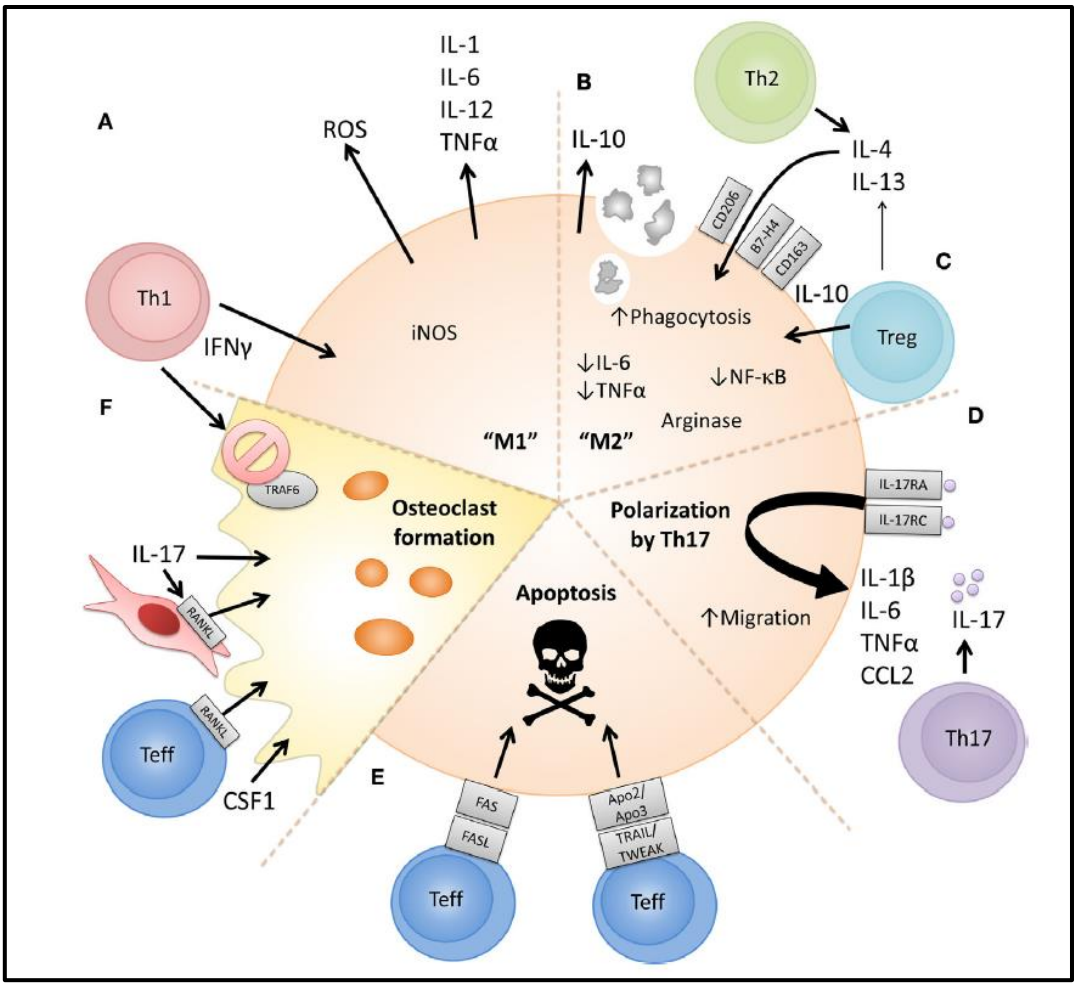



*Figure 20. Proposition des mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les lymphocytes T CD4⁺ peuvent moduler la fonction du monocyte/macrophage. Issu de Roberts et al. 2015 Frontiers in Immunology, The interplay between monocytes/macrophages and CD4⁺ T cells in rheumatoid arthritis [172].*

Les lymphocytes B interagissent aussi avec les macrophages. Le TNF et l'IL6, deux cytokines produites en quantité par les macrophages inflammatoires, sont centrales dans la régulation des fonctions des cellules B. Par ces cytokines, les macrophages exercent une action pro-inflammatoires sur les cellules B. L'interaction est bidirectionnelle car les lymphocytes B modulent aussi la fonction des macrophages. Le rôle pathogène des ACPA produits par les plasmocytes au cours de la PR est reconnu [183]. Les complexes immuns contenant des ACPA induisent notamment une production de TNF par les macrophages [131] et de médiateurs pro-inflammatoires par les monocytes [184]. De plus, la production de cytokines inflammatoires et de RANKL par les lymphocytes B favorise l'ostéoclastogénèse [185]. Par ailleurs, les cellules B dites régulatrices pourraient avoir un potentiel immunomodulateur via leur sécrétion d'IL-10 en induisant des macrophages alternatifs [186-188].

### *2.2.5.6. Macrophage et résolution de l'inflammation*

Outre leur potentiel inflammatoire, les macrophages interviennent aussi dans la résolution de l'inflammation. Pendant longtemps, la résolution de l'inflammation a été vue comme un phénomène passif. Nous savons aujourd'hui que les cellules immunitaires telles que les PNN et macrophages y jouent un rôle actif [189]. La constatation du caractère actif de la résolution de l'inflammation impliquerait que l'inflammation chronique résulte d'une persistance de la phase inflammatoire mais aussi d'une faillite des mécanismes de résolution. La mise en place de l'inflammation résulte de la présence d'autacoïdes (amines actives type histamine, médiateurs lipidiques type prostaglandines ou leucotriènes), de polypeptides (système du complément, chimiokines) et de protéines (cytokines). Ces mêmes familles de médiateurs sont impliquées dans la phase de résolution permettant la restauration du tissu. Parmi ces médiateurs pro-résolutifs, nous retiendrons l'adénosine, la LXA4 (lipoxine A4), la Mar1 (marésine 1), l'AnxA1 (annexine A1), la RvD1 (résolvine D1), α-MSH (α melanocyte-stimulating hormone) et la Gal-1 (galectine-1). Plusieurs de ces médiateurs sont produits par les macrophages lors de la phase de résolution de l'inflammation (lipoxine A4, résolvine D1, marésine 1 notamment).

La phase de résolution peut être scindée en 7 étapes, où les médiateurs pro-résolutifs jouent un rôle fondamental **(Figure 21)** [189, 190]. (i) *La première étape* consiste en une diminution de la migration des neutrophiles par déplétion en chimiokines. Cette déplétion est le fait d'un clivage par les métalloprotéinases, telles que MMP-12 rendant non-fonctionnelles les CXC chimiokines produites par les macrophages pour le chimiotactisme des neutrophiles, et générant des antagonistes de CCL-2, -7, -8 et -13 [191]. La déplétion en chimiokines du chimiotactisme des neutrophiles est aussi liée à la présence de récepteurs leurres D6, séquestrant les CC chimiokines [192], et DARC, séquestrant les CC et CXC chimiokines (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) [193]. La diminution de l'influx neutrophilique est aussi la résultante de l'action des médiateurs pro-résolutifs [189, 194]. (ii) *La deuxième étape* promeut un recrutement non-inflammatoire des monocytes [189]. (iii) La *troisième étape* consiste en l'apoptose des cellules immunes extravasées. Les facteurs inflammatoires tels que le TNF, le GM-CSF et l'hypoxie peuvent promouvoir la survie des neutrophiles [195, 196]. A l'inverse, des médiateurs tels que l'AnxA1 induisent l'apoptose des neutrophiles [197]. (iv) La *quatrième étape* est une augmentation de la phagocytose des cellules apoptotiques, aussi appelée efférocytose, réalisée essentiellement par les macrophages [198, 199]. Les neutrophiles apoptotiques promeuvent leur propre clairance par l'expression de signaux « find me » (fractalkine/CX3CL1, nucléotides ATP et UTP, sphingosine 1-phosphate, lysophosphatidyl-choline) et de signaux « eat me » (phosphatidylsérine) exposés à la membrane du fait du processus de mort cellulaire [190]. La clairance est effectuée par contact cellule-cellule par l'intermédiaire de protéines « d'interface », telles que Gas6 et la protéine S qui facilitent le contact entre la phosphatidylsérine et les récepteurs TAM (Tyro3, Axl, Mer) [200]. Il est

intéressant de noter que ces mêmes récepteurs TAM ont un rôle immunomodulateur favorisant notamment la résolution de l'arthrite murine [201, 202]. (v) La *cinquième étape* est le changement phénotypique des macrophages favorisant le retour à l'homéostasie tissulaire [203]. Outre la présence de médiateurs pro-résolutifs lors de cette étape, le processus d'efférocytose induit la production d'IL-10 et de TGFβ [204], cytokines majeures de l'activation alternative du macrophage. Lors de la résolution, les macrophages murins présentent un phénotype distinct de celui induit par l'IFNγ+LPS ou l'IL-4. Ces macrophages « résolutifs » sont induits par un niveau intra-cellulaire élevé d'AMPc et caractérisés par un enrichissement en molécules de présentation d'antigène, de préparation antigénique et de chimio-attraction T et B. Le profil est le suivant : expression des gènes Timd4 et Tgfb2, marquage de surface $CD209^{+}$ $CD11b^{lo}$ $CD11c^{-}$ $CMH^{+}$ $CD74^{+}$ $CD86^{+}$, expression des chimiokines XCL1, CCL5, CXCL13, niveaux élevés de COX2 (cyclooxygénase 2) et iNOS (NO synthase inductible), tendance à quitter le foyer inflammatoire pour migrer vers la lymphe [205, 206]. (vi) La *sixième étape* est la modulation phénotypique du système immunitaire adaptatif pour l'orienter vers un phénotype tolérogène et mémoire. La présence de médiateurs pro-résolutifs assure, entre autres, une modulation de la réponse Th1 vers un profil Th2 (Gal-1) [207], l'induction de lymphocytes Treg (Gal-1, Gal-9) [208] et de cellules dendritiques tolérogènes (Gal-1) [209]. (vii) La *septième et dernière étape* est la régénération tissulaire à proprement parler.

Plusieurs molécules de la résolution de l'inflammation ont été mises en évidence chez les patients atteints de PR, en particulier dans le compartiment synovial, suggérant un rôle fonctionnel [210, 211]. (i) L'approche métabolomique visant à identifier des médiateurs lipidiques pro-résolutifs au sein du liquide articulaire de patients atteints de PR a notamment mis en évidence la présence de Mar-1, LXA4 et RvD5 [210]. L'expression de la LXA4 et la 15-épi-LXA4 est plus élevée dans le liquide synovial de patients atteints de PR que dans celui de patients atteints d'arthrose [212]. Cette production semble régulée au moins partiellement par l'IL-13 dont l'ARNm est augmenté au sein de la synoviale rhumatoïde comparativement à l'arthrose [212]. (ii) Outre les médiateurs lipidiques, les galectines, β-galactosides liant les lectines, sont aussi impliquées dans la pathogénie de la PR [213, 214]. Il a d'ailleurs été montré que la Gal-9, présente dans le tissu synovial rhumatoïde, induit l'apoptose des synoviocytes fibroblastiques [215]. (iii) Les données concernant l'adénosine suggèrent une implication dans le contrôle de l'inflammation rhumatoïde [216]. L'expression lymphocytaires des récepteurs de l'adénosine $A_{2A}$ et $A_3$ est plus importante chez les patients atteints de PR que chez les contrôles sains. La présence de ces récepteurs se traduit *in vitro* par une diminution des médiateurs inflammatoires TNF, IL-1β, IL-6, MMP-1 et MMP-3. De plus, Leur expression est inversement corrélée à l'activité de la maladie.

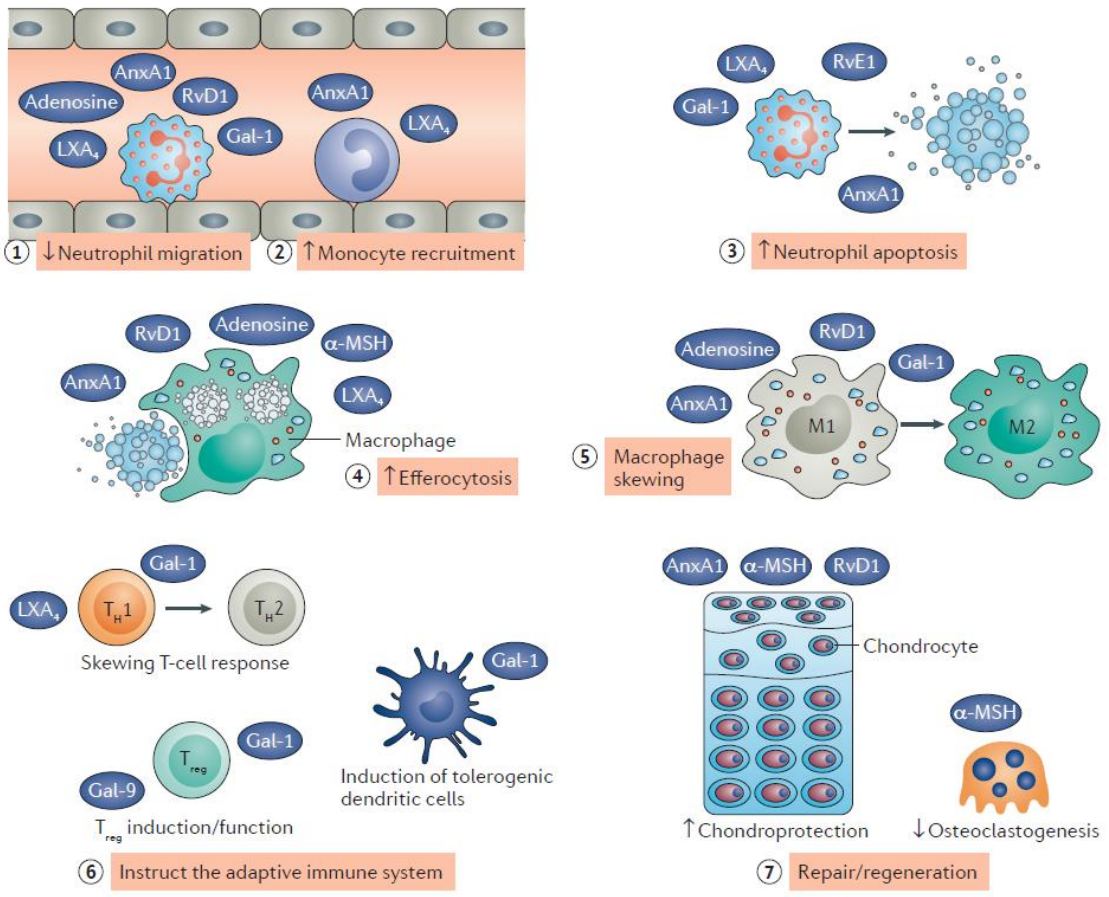



Table | **Examples of proresolving mediators and their bioactions**

| Effectors of resolution (mediator type) | Proresolving bioactions | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Step 1 | Step 2 | Step 3 | Step 4 | Step 5 | Step 6 | Step 7 |
| Adenosine (autacoid) | Yes | — | — | Yes | — | — | Yes |
| Hydrogen sulfide (autacoid; gaseous mediator*) | Yes | — | — | Yes | — | — | Yes |
| Lipoxin $A_4$ (autacoid; lipid meditator*) | Yes | Yes | — | Yes | Yes | Yes | Yes |
| Maresin 1 (autacoid; lipid mediator*) | Yes | — | — | Yes | Yes | — | Yes |
| α–MSH (peptide) | Yes | — | — | Yes | — | — | Yes |
| Annexin A1 (protein) | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| Galectin-1 (protein) | Yes | — | Yes | — | Yes | Yes | — |

α-MSH, α-melanocyte-stimulating hormone. *Representative autacoids from the omega-3-derived and omega-6-derived bioactive lipid mediators and gaseous mediators.

*Figure 21. Actions clés des médiateurs pro-résolutifs durant la résulution de l'inflammation. AnxA1 : annexine A1, Gal-1 : galectine-1, LXA4 : lipoxine A4, RvD1 : résolvine D1, α-MSH : α melanocyte-stimulating hormone. Issu de Perretti et al. 2017 Nature Reviews Rheumatology, Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis [189].*

Le potentiel pro-résolutif des macrophages est décrit comme l'apanage des macrophages alternatifs. A ce jour, aucune population de macrophage alternatif n'a clairement été identifiée dans la PR. Toutefois, les macrophages résidents présentent des éléments associés au phénotype alternatif tels que la production d'IL-1ra et d'IL-10, ou l'expression à leur surface de MerTK, CD64, CD14 [20, 110]. Ces éléments en font de potentiels candidats effecteurs de la résolution de l'inflammation

### 2.2.6. Monocyte/macrophage et évolution de la polyarthrite rhumatoïde

#### 2.2.6.1. Monocytes/macrophage et activité clinique

Les monocytes sanguins représentent une population phénotypiquement et fonctionnellement hétérogène [90]. Plusieurs équipes de recherche se sont attachées à en évaluer le lien avec l'activité clinique de la PR.

Il existe une bonne corrélation entre le pourcentage de monocytes CD14+ CD16+ circulant et l'activité clinique (nombre d'articulations gonflées, douloureuses, score DAS28 VS), ou biologique (vitesse de sédimentation, C Reactive Protein) des PR [95, 97, 217, 218]. Le corollaire de cette observation est la diminution de la proportion de monocytes $CD14^+$ $CD16^+$ chez les patients répondeurs ACR20 à 3 mois de traitement conventionnel, contrairement aux non répondeurs [95].

Par ailleurs, il semble aussi exister une relation entre le pourcentage de $CD14^+$ $CD16^+$ circulants et la sévérité de la PR, les patients avec érosions échographiques présentant significativement plus de monocytes $CD14^+$ $CD16^+$ circulants [217].

Certains auteurs ont proposé le ratio sanguin lymphocytes/monocytes comme biomarqueur de l'inflammation systémique [219] et du pronostic oncologique [220]. Une corrélation négative entre ce ratio lymphocyte/monocyte et l'activité de la PR (DAS28) a été observée, suggérant là encore un rôle des monocytes comme marqueurs d'une maladie active [221].

Concernant plus spécifiquement les macrophages $CD68^+$ de la couche bordante de la membrane synoviale, leur analyse a montré que l'importance de l'infiltrat était significativement corrélée à l'activité clinique (DAS28 VS) [222, 223]. Outre son association à l'activité clinique analysée de manière transversale, l'abondance de l'infiltrat macrophagique est aussi un biomarqueur de la réponse thérapeutique DAS28 [222-225]. En d'autres termes, ce paramètre a une bonne sensibilité au changement en contexte thérapeutique. La variation de l'infiltrat macrophagique de la couche bordante explique jusqu'à 3/4 de la variation de l'activité clinique (DAS28) [222].

Le degré d'infiltrat macrophagique est semble-t-il aussi corrélé positivement à la sévérité radiographique [226].

Des marqueurs phénotypiques présents à la surface du macrophage et pouvant être relargués dans le plasma, ont été étudiés en termes de corrélation avec l'activité de la PR. Ainsi, le niveau plasmatique de CD206, reflète le niveau d'activité clinique de la maladie chez les patients traités par méthotrexate et adalimumab (mais pas chez ceux traités uniquement par méthotrexate) [227]. De plus, le niveau plasmatique de CD163 soluble, est plus élevé chez les patients souffrant de PR que chez les sujets sains

et est corrélé aux marqueurs d'activité de la maladie [228]. Il est à noter que ce clivage CD163 est réalisé par TACE (TNF Alpha Converting Enzyme /ADAM-17), la métalloprotéinase responsable du clivage du TNF membranaire [229]. Le CD14 soluble a aussi été étudié dans diverses pathologies. Bien que sa concentration sérique soit augmentée dans la PR [230], il est considéré par certains auteurs comme un marqueur non spécifique d'activation des monocytes [231], dont le niveau d'expression est corrélé à celui aux protéines de la phase aigüe de l'inflammation (IL-6, CRP) [232].

#### 2.2.6.2. Monocyte/macrophage et prédiction de la réponse thérapeutique

Le pourcentage de patients mis en rémission par les traitements de fond synthétiques conventionnels (csDMARD) de première intention est estimé à moins de 25% en routine, voire jusqu'à 65% en cas de stratégie « agressive » de contrôle serré [233-235]. Les progrès thérapeutiques de ces vingt dernières années avec l'avènement des biothérapies (bDMARD), et plus récemment des traitements de fond synthétiques ciblées (tDMARD), ont permis de viser un taux de réponse thérapeutique d'environ 2/3 et un taux de rémission de 20 à 50 % ***(Figure 22)*** [233]. Ces chiffres issus d'essais cliniques incluant des patients sélectionnés avec un suivi régulier sont à relativiser et ne peuvent être extrapolés sans précaution en « vie réelle ». Par ailleurs ce bénéfice s'entend au prix d'un surrisque, notamment infectieux, et d'un coût financier important pour la société.

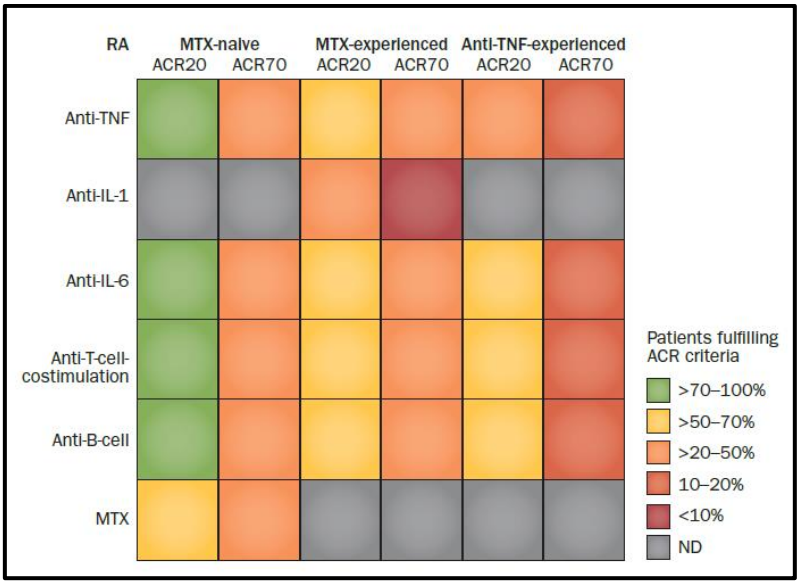



***Figure 22. Réponses ACR20 et ACR70 aux différentes thérapies de la polyarthrite rhumatoïde.*** *Les données sont basées sur les essais cliniques des agents anti-TNF, sur l'anakinra (anti-IL-1), le tocilizumab (anti-IL-6), l'abatacept (anti-costimulation du lymphocyte T), du rituximab (anti-lymphocyte B) et du méthotrexate (MTX ; bras contrôle MTX-naïf des essais cliniques des biothérapies). L'ACR20 et l'ACR70 indiquent une amélioration, selon les critères ACR, ≥20% et*

*≥70% respectivement. ND : non réalisé. RA : polyarthrite rhumatoïde. Smolen et al. 2015 Nature Reviews Rheumatology, Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges [236].*

Eu égard à ces limites, l'identification de biomarqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique pour une médecine personnalisée dans le domaine de la PR, est devenue une problématique prégnante. Je n'aborderai pas dans cette partie la question de la prédiction par les facteurs cliniques (âge, sexe, tabagisme, échec d'une première ligne de traitement) et biologiques traditionnels (présence d'ACPA ou de facteurs rhumatoïdes, CRP élevée) [237]. J'aborde, ici, plus spécifiquement la question des anti-TNF qui sont au centre des résultats proposés dans mon travail. Plusieurs approches (non spécifiques des macrophages) de prédiction de la réponse aux anti-TNF ont été proposées :

- *Les biomarqueurs sériques*. Le score MBDA (MultiBiomarker Disease Activity) intègre 12 marqueurs sériques : EGF (Epidermal Growth Factor), VEGF-A, IL-6, SAA (serum amyloid A), CRP, (VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), MMP-1, MMP-3, TNF-RI (tumour necrosis factor receptor 1), YKL-40 (human cartilage glycoprotein 39), leptin, resistin [238]. Parmi ces marqueurs, VEGF-A, IL-6, VCAM-1, MMP-1 / -3 et TNF-RI sont directement impliqués dans la biologie du macrophage. Ce score a été appliqué aux patients de l'étude de phase 3 RETRO, pour prédire la rechute lors de la décroissance thérapeutique (arrêt ou espacement du DMARD) [239]. Le score à l'inclusion était significativement plus élevé chez les patients présentant une rechute dans l'année. Cette étude a permis de montrer que le score MBDA combiné au statut ACPA est un prédicteur indépendant de la rechute amenant à une prédiction correcte chez plus de 80% des patients. Les patients avec un score MBDA faible et ACPA- rechutaient dans 13.0 % des cas alors que les patients à MBDA élevé et ACPA+ rechutaient dans 76.4% des cas. Une autre étude a mis en évidence l'utilité de la concentration sérique du complexe protéique MRP8/14 (Myeloid-Related Proteins), un agoniste endogène de TLR4, pour prédire la réponse à l'adalimumab, à l'infliximab et au rituximab [240].
- *La Pharmacogénomique*. A ce jour, l'hypothèse privilégiée est que plusieurs gènes sont associés à la réponse clinique mais que chacun a un impact modeste. De multiples études de prédiction de la réponse aux anti-TNF dans la PR ont été réalisées et ont fait l'objet de revues de littérature [241, 242]. Dans les approches par recherche de gènes candidats, plusieurs SNPs (Single-Nucleotide Polymorphism) concernant la biologie du macrophage ont été identifiés : le gène du TNF, les gènes impliqués dans la signalisation du TNF (p38 MAPK), la signalisation TLR2, la signalisation NFκB (Nuclear Factor kappa B). Les études GWAS, qui offrent l'avantage de leur puissance statistique. Toutefois les limites récurrentes de cette approche sont : le manque de

reproductibilité et la pertinence clinique des faibles augmentation d'odds ratio lorsque les effectifs sont faibles [242].

- L'*Epigénétique*. L'étude OPERA visait à identifier, parmi 377 micro-RNA, ceux qui étaient prédictifs de la réponse thérapeutique à l'adalimumab en combinaison au méthotrexate, chez 180 patients présentant un PR débutante [243]. Les taux sanguins bas de miR-22 et les taux élevés de miR-886.3p, étaient associés à une bonne réponse à l'adalimumab. Par ailleurs, des taux sanguins élevés de miR-125b, impliqué dans la régulation de l'activation du macrophage et la régulation négative du TNF, sont associés à une bonne réponse au rituximab [244]. Une étude évaluant le niveau cellulaire (PBMC) de miR-125b chez des patients souffrant de PR récente et naïfs de traitement de fond, a montré sa corrélation négative avec l'activité de la PR (DAS28) [245]. De plus, miR-125b apparaissait comme un potentiel biomarqueur prédictif de la réponse à 3 mois aux traitements de fond conventionnels (majoritairement méthotrexate), avec un niveau plus élevé chez les futurs répondeurs [245]. Une autre étude réalisée sur des patients atteints de PR récente et naïfs de traitement de fond, a montré que le niveau de miR-223 circulant était négativement corrélé à la diminution de l'activité de la maladie (DAS28) à 3 et 12 mois de traitement de fond conventionnel (majoritairement méthotrexate) [246]. Cette observation n'était pas retrouvée chez les PR établies.
- La *Transcriptomique*. Du fait de la variabilité du matériel utilisé dans les études et la multiplicité des gènes identifiés par cette approche à haut débit, son utilisation n'est pas du domaine de la routine de laboratoires [247]. Toutefois, elle représente un apport considérable en tant qu'outil de screening. L'approche transcriptomique semble pour l'instant plus pertinente pour identifier des cibles thérapeutiques que pour des cibles théranostiques dans le domaine de la PR.
- La *Protéomique*. Cette approche est plus récente dans le domaine de la PR. Elle a par exemple permis d'identifier un profil plasmatique protéique spécifique de réponse à l'infliximab, où l'apolipoprotéine A-1 était associée à une bonne réponse alors que le Platelet factor 4 était associé à la non réponse [248]. De même un profil protéique spécifique, incluant les protéines PROS (Vitamin K-dependent Protein S) et CO7 (COmplement component C7) est associé à la réponse à 6 mois au traitement par méthotrexate + étanercept [249].
- La *Métabolomique*. Une étude a permis d'identifier des profils caractéristiques de dérivés carbohydratés chez les patients répondeurs à 6 mois d'anti-TNF [250]. Cette approche est récente dans le domaine de la PR.

Quelques rares études se sont intéressées à l'intérêt théranostique des monocytes/macrophages dans la PR. Il apparait qu'une proportion élevée de monocytes CD14+ CD16+ circulants est associée à une mauvaise réponse thérapeutique au méthotrexate (traitement conventionnel de première intention) à

3 mois [251]. Par ailleurs, le nombre absolu de monocytes totaux et des différentes sous-populations circulantes à 3 mois de traitement par méthotrexate + adalimumab (biothérapie anti-TNF) présente une bonne valeur prédictive de l'évolution clinique à 6 mois [252]. Cette observation doit toutefois être pondérée par le fait que la réponse clinique à l'adalimumab est habituellement obtenue à 12 semaines de traitement, ce qui limite l'intérêt du résultat à la minorité de patients présentant un échappement thérapeutique précoce (au 6$^{e}$ mois) ou présentant une réponse thérapeutique tardive (au-delà de la 12$^{e}$ semaine). Les derniers travaux du groupe d'Ehrenstein ont mis en évidence que l'expression membranaire du TNF à la surface des monocytes circulants, que la liaison de l'adalimumab aux cellules sanguines CD14$^{+}$ et que l'augmentation *ex vivo* de la fréquence des lymphocytes Treg en présence d'adalimumab étaient des biomarqueurs de la réponse à l'adalimumab dans la PR [253]. D'un point de vue mécanistique, l'augmentation du mTNF et l'induction associée de lymphocytes Treg seraient dépendantes de la phosphorylation de p38 MAPK dans le monocyte et de la production d'IL-10 par les monocytes. Ce travail confirme l'intérêt théranostique des modèles cellulaires incluant les monocytes pour prédire la réponse aux anti-TNF de type adalimumab.

Les données concernant l'intérêt pronostique des macrophages infiltrant la synoviale rhumatoïde sont rares. En comparaison aux PR ACPA-, les PR ACPA + présentent un infiltrat synovial plus important de lymphocytes B CD19+ et de lymphocytes T CD3+ et CD8+. Chez les PR ACPA+, un niveau élevé de marqueurs synoviaux macrophagiques (CD68+) et lymphocytaires (CD3+ et CD8+) est associé à une meilleure réponse EULAR [225] aux biothérapies anti-TNF [254].

Les macrophages ont un rôle majeur dans la synovite rhumatoïde. Les données scientifiques établies ces dernières années nous permettent toutefois d'envisager cette cellule en tant qu'effecteur de l'inflammation rhumatoïde, mais aussi sous une autre perspective. La considération de son potentiel immunorégulateur et pro-résolutif de l'inflammation nous ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

La connaissance des divers aspects de la phase effectrice de cette maladie a évolué à un point suffisant pour développer depuis 20 ans les biothérapies qui ont permis de révolutionner le pronostic des patients atteints de PR sévère.

## 2.3. Les biothérapies de la polyarthrite rhumatoïde

Dans ce chapitre, j'ai pris le parti :

- De ne pas aborder les éléments cliniques usuels de la PR, en dehors de ceux dont le commentaire me semblait enrichir la vision biologique du manuscrit.
- De ne pas rapporter les éléments biologiques spécifiques de l'effet des anti-TNF dans la maladie de Crohn, le psoriasis cutané et les spondyloarthrites, lorsque ceux-ci n'avaient pas été reproduits dans la PR : l'extrapolation systématique ne me paraissant pas pertinente.

### 2.3.1. Généralités

Les connaissances des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la PR ont permis le développement des biothérapies (bDMARDs, biological Disease-Modifying AntiRheumatic Drug) de la PR. L'avènement des biothérapies, à la fin des années 90, a révolutionné le pronostic de la PR en proposant une solution thérapeutique efficace aux patients atteints de PR sévère, ayant une réponse inadéquate ou une intolérance aux traitements de fonds synthétiques conventionnels (généralement méthotrexate : MTX) [236]. Certains de ces traitements ont aussi trouvé une place de choix dans la prise en charge d'autres maladies auto-immunes (sclérose en plaque, lupus, vascularites…), de maladies auto-inflammatoires monogéniques (fièvres familiales, …), de maladies auto-inflammatoires polygéniques (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, arthropathies microcristallines, …) et de maladies immunitaires à caractéristiques mixtes (spondyloarthrites, uvéites HLA-B27+, …) [255, 256].

Les cibles thérapeutiques des bDMARDs de la PR permettent de distinguer deux grands types de mécanismes d'action ***(Figure 23)*** :

- Les bDMARDs bloquant l'action de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'initiation et la progression de la PR : TNF (IFX : infliximab, ETA : étanercept, ADA : adalimumab, GOL : golimumab, CZP : certolizumab pégol), IL-6 (TCZ : tocilizumab, sarilumab), IL-1 (anakinra ; non utilisé en pratique courante)
- Les bDMARDs ciblant les événements cellulaires d'amont : l'anti-CD20 (RTX : rituximab) ciblant le lymphocyte B pourvoyeur d'auto-anticorps, le CTLA4-Ig (ABA : abatacept) inhibiteur compétitif de l'interaction de costimulation CPA (Cellule Présentatrice d'Antigène) - Lymphocyte T (CD80/86 – CD28), bloquant le 2$^{e}$ signal activateur du lymphocyte T.

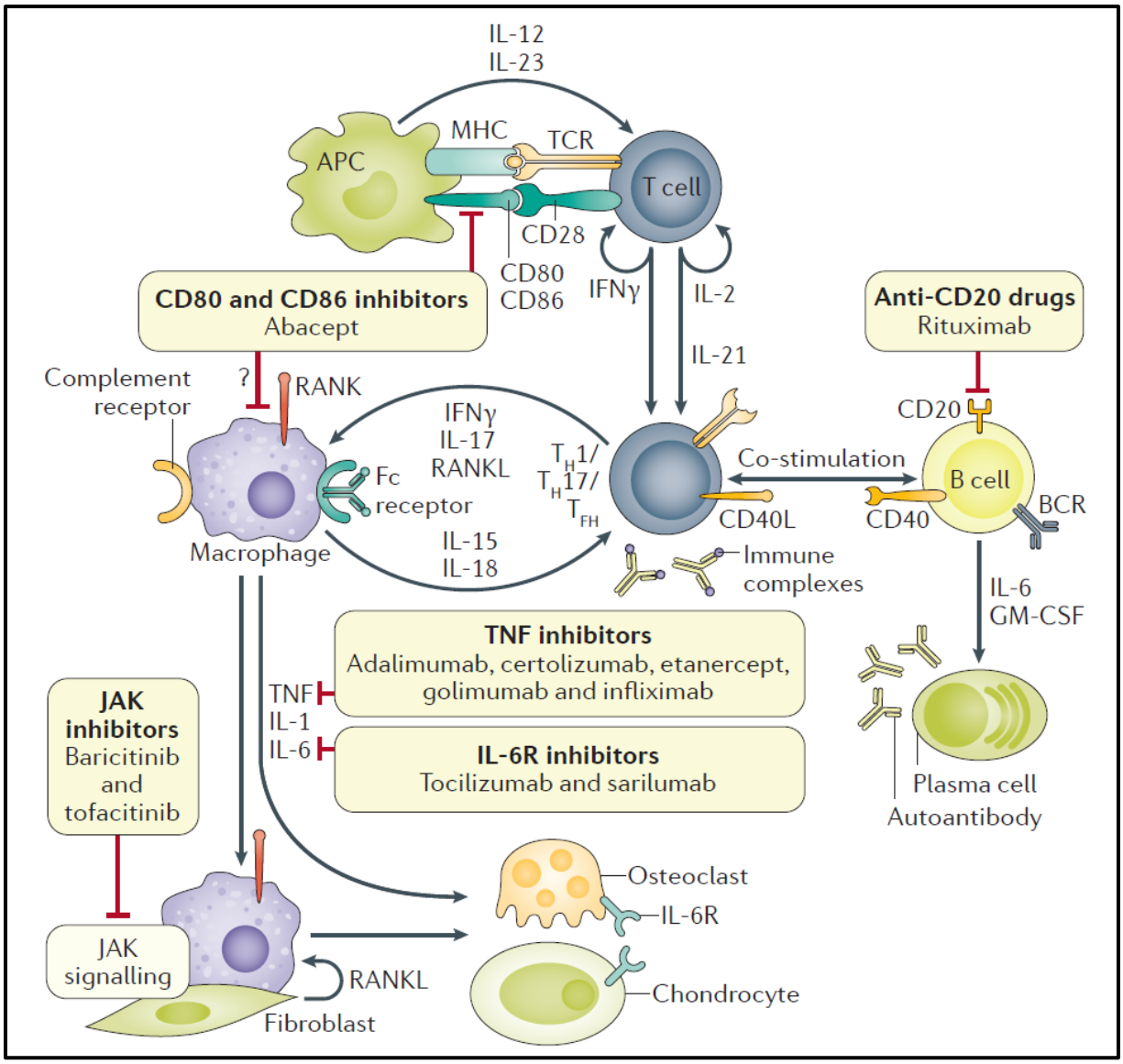



*Figure 22. Traitements de fond non conventionnels de la polyarthrite rhumatoïde. APC, antigen-presenting cell ; BCR, B cell receptor ; CD, cluster of differentiation ; CD40L, CD40 ligand ; GM-CSF, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor ; MHC, major histocompatibility complex ; RANK, receptor activator of nuclear factor-κB ; RANKL, receptor activator of nuclear factor-κB ligand ; TCR, T cell receptor ; TFH, T follicular helper cell ; TH, T helper cell. Issu de Smolen et al., 2018 Nature Reviews Disease Primers, Rheumatoid arthritis [257].*

Compte tenu des résultats obtenus lors de mon travail de thèse, je focaliserai les paragraphes suivants sur les agents anti-TNF.

### 2.3.2. Découverte du rôle du TNF dans la polyarthrite rhumatoïde

Le développement des agents anti-TNF est en grande partie dû au travail de Sir Marc Feldmann et de ses collaborateurs. En association avec Feldmann et de Raviner Maini (autre chercheur ayant collaboré étroitement avec Feldmann et contribué de manière majeure à la « success story » des anti-TNF), l'industrie pharmaceutique s'est ensuite saisie de l'identification du rôle central du TNF dans la PR pour proposer une solution thérapeutique ***(Figure 24)*** [258].

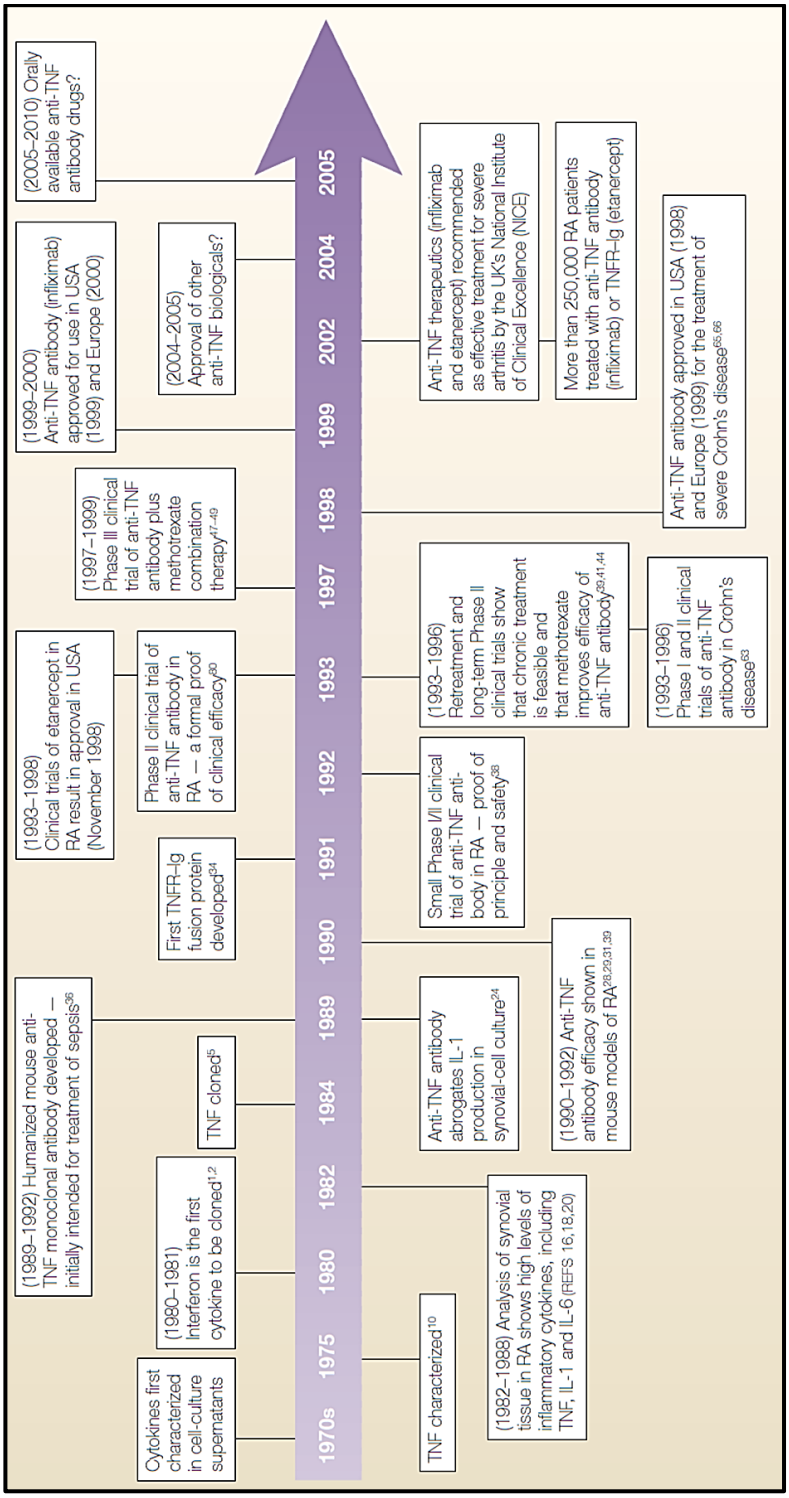


*Figure 24. Développement des traitements anti-TNF pour les maladies inflammatoires chroniques. Ig : Immunoglobuline ; IL : Interleukine ; TNF : Tumor Necrosis Factor ; TNFR : TNF receptor. Issu de Feldmann 2002 Nature Reviews Immunology, Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis [258].*

La description initiale des effets du TNF repose sur les travaux :

- Du groupe de Lloyd Old, qui a identifié ce facteur sérique responsable de la nécrose tumorale [259, 260]
- Du groupe d'Anthony Cerami qui a décrit ses effets métaboliques dans les maladies inflammatoires (cancer, trypanosomiases), notamment la cachexie et l'anémie [261].

Le clonage du TNF a été réalisé ultérieurement par le groupe de Goeddel [262].

Le concept du rôle central du TNF dans les pathologies inflammatoires telles que la PR est né du constat de l'augmentation de l'expression de HLA-DR (Human Leucocyte Antigen-DR) dans les tissus inflammatoires dont la synoviale rhumatoïde [263]. L'expression de HLA-DR sur des cellules en étant habituellement dépourvues suggère la présence d'inducteurs. Le concept alors formulé par Feldmann et Londei était que :

- Dans un tissu atteint par une pathologie auto-immune, les cellules T auto-réactives activent les effecteurs (lymphocytes B, macrophages) [264].
- Ces effecteurs sont responsables de dommages tissulaires, d'une production d'auto-anticorps et d'une production de cytokines.
- La production de cytokines telles que l'interféron, conjuguée aux dommages tissulaires induit l'augmentation de l'expression du HLA de classe II sur les CPA [265].
- Cette augmentation permet l'activation des lymphocytes T auto-réactifs par les CPA [266], menant à un cercle vicieux d'auto-immunité.

Les expériences initiales ont été menées dans le contexte de la thyroïdite auto-immune. Dans la mesure où l'expression des cytokines ne pouvait être réalisée dans ce modèle (biopsies réalisées chez des patients avec une maladie quiescente), où cette pathologie ne nécessitait pas un besoin urgent de recherche biomédicale, Feldmann et Maini se sont tournés vers la PR.

La première étape a été de mesurer les cytokines (pro-inflammatoires, anti-inflammatoires, chimiokines, facteurs de croissance) présentes dans la synoviale rhumatoïde. Il est important de noter que la production des anticorps monoclonaux pouvant cibler des cytokines a pris son essor à cette époque. La première cible ayant fait l'objet d'une publication (Glenn Buchan, post-doc du groupe Feldmann) a été l'IL-1α. Ce travail a montré une dysrégulation de la production d'IL-1 α au cours de la PR, avec une sécrétion prolongée [267].

L'étape suivante a été réalisée par Fionula Brennan, une autre post-doc du groupe Feldmann. Son travail a révélé le rôle central du TNF dans la PR, au travers de l'inhibition de la production de l'IL-1 par les cellules de synoviales rhumatoïdes en présence d'un anticorps anti-TNF. Ce phénomène n'était pas observé avec les synoviales arthrosiques, ni en présence d'anticorps anti-lymphotoxine α [268]. La caractérisation de la cascade inflammatoire de la PR a été réalisée dans les travaux ultérieurs du groupe [269, 270]. Ces travaux ont confirmé un rôle d'amont du TNF dans la PR.

Des travaux extérieurs au groupe ont montré en modèle murin de challenge bactérien, que la dépendance des cytokines « d'aval » au TNF, telle qu'observée avec l'IL-1 et l'IL-6 dans la PR, était en fait un phénomène physiologique, indépendant de la PR [271]. L'augmentation aberrante des cytokines inflammatoires dans la PR est en fait en lien avec l'augmentation de l'expression du TNF et du TNF récepteur dans la synoviale rhumatoïde [134, 272].

Les travaux issus de la collaboration avec Richard Williams (expertise modèle animal) et Robert Schreiber (expertise anticorps monoclonal anti-TNF) ont montré que l'inhibition du TNF réduisait drastiquement l'arthrite induite au collagène de souris génétiquement susceptibles DBA/1 [273]. A partir de 1991, l'ensemble des travaux réalisés validait l'intérêt thérapeutique du ciblage du TNF dans la PR. Dès lors, l'industrie pharmaceutique a développé des agents thérapeutiques anti-TNF, avec le succès que l'on connait.

### 2.3.3. Propriétés des agents anti-TNF

Dans ce paragraphe, j'ai pris le parti de ne pas aborder la question des TNF-kinoïdes [274]. Cette approche vaccinale novatrice propose l'utilisation d'une immunothérapie anti-TNF à visée thérapeutique dans la PR [275]. Toutefois au vu des résultats de l'étude clinique de phase II, il ne s'agit pour l'instant pas d'un traitement validé de la PR.

#### 2.3.3.1. Les données pharmacologiques

Outre leurs différences de cible et de mécanisme d'action, les bDMARDs divergent aussi par leurs structures et caractéristiques pharmacologiques. Les caractéristiques des agents anti-TNF sont résumées dans le **Tableau 2** [276].

**Properties of biologic TNF antagonists.**

| | Infliximab | Adalimumab | Golimumab | Certolizumab | Etanercept |
|---|---|---|---|---|---|
| Structure | Chimeric mAb | Human mAb produced by phage display | Human mAb produced in Transgenic mouse | PEGylated Fab mAb fragment | TNFR2 Fc fusion protein |
| Molecular weight (kDa) | 150 | 150 | 150 | ~95 | 150 |
| Half life | 8–10 days | 10–20 days | 7–20 days | ~14 days | 4 days |
| Ligands | sTNF, tmTNF | sTNF, tmTNF | sTNF, tmTNF | sTNF, tmTNF | sTNF, tmTNF LTα3, LTα2β1 |
| Neutralisation potency for sTNF | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Route of administration | Intravenous Loading doses weeks 0,2, 6 then approx every 8 weeks | Subcutaneous Every other week | Subcutaneous monthly | Subcutaneous Every other week | Subcutaneous Once weekly and twice weekly dosing available |
| tmTNF binding | +++ | +++ | ? (Presumed same as other mAbs) | +++ | ++ |
| complement-dependent cytotoxicity CDC | +++ | +++ | ? (Presumed same as other mAbs) | – | ++/– |
| Antibody dependent cellular cytotoxicity ADCC | +++ | +++ | ? (Presumed same as other mAbs) | – | ++/– |
| Reverse signaling and cytokine suppression | +++ | +++ | ? (Presumed same as other mAbs) | – | +/– |

*Tableau 2. Caractéristiques des biothérapies de la polyarthrite rhumatoïde. ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity ; CDC : Cell-Dependent Cytotoxicity ; LTα3 : lymphotoxin α; LTα2β1 : Lymphotoxin β ; mAb : monoclonal antibody ; TNF : Tumor Necrosis Factor, sTNF : TNF soluble ; tmTNF : TNF trans-membranaire. Issu de Taylor et al., 2010 Current Opinion in Pharmacology, Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases [276].*

La plupart des bDMARDs de la PR sont des anticorps monoclonaux. Toutefois, au sein des anti-cytokines :

- L'étanercept est un récepteur soluble anti-TNF
- Le tocilizumab est un anticorps monoclonal ciblant non pas la cytokine IL-6, mais son récepteur IL-6R.
- L'anakinra est un antagoniste du récepteur de l'IL-1, inhibant donc la signalisation de l'IL-1α et β.

Les anticorps monoclonaux peuvent être chimériques (infli*ximab*, ritu*ximab*), humanisés (certoli*zumab*, tocili*zumab*) ou totalement humains (adalim*umab*, golim*umab*, saril*umab*, secukin*umab*).

En règle générale, les bDMARDs anti-TNF (sauf certolizumab) possèdent un fragment constant d'IgG1. Des améliorations pharmacologiques telles que l'addition d'un radical pegylé (certolizumab pégol) permettent d'améliorer la demi-vie du traitement [277] voire d'en réduire l'immunogénicité [278].

La demi-vie des anti-TNF est variable de 4 jours (étanercept) à 20 jours (adalimumab, golimumab). Le comportement pharmacocinétique des anticorps est caractérisé par une perméabilité cellulaire

modérée (en dehors de certains anticorps antinucléaires par exemple), une filtration rénale minime, une liaison au Fc récepteur néonatal (FcRn) et une distribution lymphatique dépendant notamment de la cible [279]. La demi-vie des anticorps monoclonaux thérapeutiques est conditionnée par leur destruction lysosomale et leur recyclage à la surface de la cellule par le FcRn [280, 281].

L'avidité de la liaison des anti-TNF au TNF varie d'une molécule à l'autre [282]. Par exemple, chaque molécule d'infliximab ou d'adalimumab peut lier jusqu'à 2 molécules de TNF [283], sous forme monomérique ou trimérique [284], formant des complexes stables avec le sTNF (TNF soluble) [284]. L'étanercept se lie exclusivement au TNF trimérique, avec un ratio 1:1, en formant un complexe moins stable susceptible de libérer du TNF bioactif [284]. Son affinité pour le TNF est similaire à celle du TNFR2 (TNF récepteur 2). De plus, l'infliximab lie plus de molécules de mTNF (TNF membranaire), et avec une meilleure affinité que l'étanercept. Je ne présente ici que peu d'études concernant la liaison des anti-TNF au TNF. Il faut toutefois garder à l'esprit qu'il en existe de nombreuses autres, aves des résultats discordants concernant l'avidité et l'affinité de la liaison ***(Tableau 3)*** [285]. Ces différences peuvent être expliquées par des cellules, des méthodes et des techniques différentes. Quoi qu'il en soit, ces différences ne sont pas associées à une efficacité clinique différente dans la PR, mais pourraient expliquer pour partie l'inefficacité de l'étanercept dans la maladie de Crohn et sa moindre efficacité dans le psoriasis cutané.

**Table 1 Comparison of affinity to tumor necrosis factor by anti-tumor necrosis factor agents**

| Target | Method /source | Affinity | Ref. |
|---|---|---|---|
| sTNF | SPR | GOL = ETA > IFX > ADA | [40] |
| sTNF | SPR | ETA > ADA = IFX | [41] |
| mTNF | mTNF-expressing cells (Sp2/0-11A5-1 myeloma cells) | IFX = ADA = ETA | [41] |
| mTNF | mTNF-expressing cells (K2 murine myeloma cells) | IFX = GOL > ADA > ETA | [40] |
| mTNF | PBMCs (T cells) Flow cytometry | IFX = ADA > Certo >> No binding of ETA | [42] |
| mTNF | PBL Flow cytometry | IFX >> No binding of ETA | [43] |
| sTNF | Immunoassay | IFX > ETA (rapid dissociation) | [44] |

**Table 2 Comparison of avidity to tumor necrosis factor by anti-tumor necrosis factor agents**

| Target | Method/source | Avidity | Ref. |
|---|---|---|---|
| sTNF | KinExA® (automated flow immunoassay system) | ETA > ADA IFX | [41] |
| mTNF | [44] | IFX > ETA | [44] |

***Tableau 3. Comparaison de l'affinité et de l'avidité des différents anti-TNF pour le TNF.*** *ADA: Adalimumab; ETA: Etanercept; GOL: Golimumab; IFX: Infliximab; Certo: Certolizumab pegol; PBL: peripheral blood lymphocytes; TNF: Tumor necrosis factor; mTNF: Membrane-bound TNF; sTNF: Soluble TNF; SPR: Surface plasmon resonance. Issu de Billmeier et al., 2016 World Journal of Gastroenterology, Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases [285].*

Outre sa capacité à lier le TNF, l'étanercept lie aussi la lymphotoxine α (connue aussi auparavant sous le nom de TNFβ) [282, 286]. Cette spécificité supplémentaire ne s'accompagne toutefois pas d'un surcroit d'efficacité clinique par rapport aux anticorps monoclonaux pour traiter la PR.

#### 2.3.3.2. L'immunisation anti-biomédicament

Chez certains patients, le système immunitaire peut développer des anticorps anti-biomédicament (AAB). Ce phénomène est une des causes d'échec thérapeutique sous anti-TNF [287, 288] en raison d'une diminution de la concentration efficace du bDMARD [289] et de la diminution de fixation du bDMARD sur sa cible. L'immunogénicité est influencée négativement par :

- Des facteurs liés au patients : une immunisation préalable à un autre anti-TNF [290], une activité plus élevée de la maladie à l'initiation du traitement [287].
- Des facteurs liés à la stratégie thérapeutique : l'absence de thérapeutique combinée avec un DMARD conventionnel de type méthotrexate notamment [291].
- Des facteurs liés au traitement : la présence d'épitopes étrangers murins (infliximab vs adalimumab), bien que les anticorps humains tels que l'adalimumab restent immunogènes [287], la présence d'un fragment Fc, la présence d'épitopes ciblés par le lymphocytes B.

Le rôle de la taille de l'immun complexe (anti-TNF-TNF) de grande taille [292] – avec un potentiel « crosslinking » du récepteur des cellules B responsable d'une activation lymphocytaire B T-indépendante reste à démontrer. Les données concernant le rôle de (i) la voie d'administration (i.v. vs s.c), (ii) du génotype *IL10* [293, 294], (iii) de certains allèles spécifiques du HLA, (iv) des épitopes reconnaissables par les cellules T et leur lien avec l'haplotype HLA du patient, pour l'induction d'une immunogénicité, sont contradictoires [295]. L'humanisation du bDMARD diminue théoriquement le risque de développement d'AAB, optimisant potentiellement la tolérance et le maintien thérapeutique. La capacité à détecter les AAB est dépendante de la technique utilisée (ELISA, antigen binding test, pH-shift anti-idiotype antigen-binding test) [295]. Il est à noter :

- Que la présence d'AAB n'est pas nécessairement neutralisante à un niveau cliniquement perceptible, les patients dits « répondeurs » au traitement pouvant présenter des AAB,
- Et que les patients en échec d'un premier agent anti-TNF avec des AAB répondent mieux à un second anti-TNF que ceux en échec du premier traitement sans AAB [290].

#### 2.3.3.3. Le potentiel immunosuppresseur

Dans les paragraphes suivants, j'ai choisi de ne pas aborder de manière exhaustive les risques inhérents à l'utilisation des anti-TNF, en considérant qu'une analyse exhaustive serait plus appropriée dans un travail clinique. Compte tenu de leur caractère immunosuppresseur, l'utilisation des anti-TNF est particulièrement associée à un surrisque infectieux. Celui-ci est dominé par les infections bactériennes avec une majoration des infections sévères [296] et par les infections atypiques ou opportunistes au premier rang desquelles se trouve la tuberculose [297].

Le risque absolu de réactivation de tuberculose sous bDMARD est de l'ordre de 20 patients pour 10 000. Ce risque dépend notamment du caractère endémique dans la région concernée et de la molécule [296]. A titre indicatif, les données de déclaration spontanée de la FDA (Food and Drug Administration) et des registres européens RATIO et BSRBR mettent en évidence un accroissement du risque encore plus important sous anticorps monoclonal (infliximab, adalimumab) que sous récepteur soluble (étanercept). Les éléments pouvant expliquer un risque plus important sous anticorps monoclonal seraient : une inhibition plus importante *ex vivo* de la prolifération des lymphocytes T CD4+ en réponse aux antigènes mycobactériens en présence d'anticorps monoclonal (vs étanercept) [298], une inhibition plus importante de la production d'IFNg sur des cultures en sang total [299] et une modification de l'expression du TNF membranaire [298]. Par ailleurs les anticorps monoclonaux induisent aussi plus d'apoptose des monocytes (cell-mediated cytotoxicity : CDC ; antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity : ADCC) [300].

La question de l'impact négatif des agents anti-TNF sur la défense anti-cancéreuse n'est pas résolue. Ces traitements sont actuellement considérés comme augmentant le risque de carcinome cutané. Il est toutefois intéressant de relever le rôle potentiellement protecteur des anti-TNF sur le mélanome (qui n'est pas un carcinome cutané) [301]. En effet, le TNF a un effet dual en situation oncologique. Outre ses effets anti-cancéreux, il peut induire (i) l'augmentation de l'AICD (Activation Induced Cell Death) des lymphocytes T $CD8^+$ infiltrants [302], (ii) et l'augmentation l'expression de PD-L1 (Programmed Death Ligand 1) des cellules cancéreuses [303], favorisant ainsi un environnement pro-tumoral. Des inhibiteurs des checkpoints immunitaires, tels que les anti-PD-1 du mélanome, ont été développés [304]. Les échecs thérapeutiques aux anti-PD-1 sont, semble-t-il, en partie liés à l'expression d'un checkpoint immunitaire alternatif : TIM-3 (T-cell Immunoglobulin and Mucin domain-containing protein 3) [305]. De plus, les anti-PD-1 induisent une augmentation de l'expression de TNF dans les cellules de mélanome [301]. Les questions de (i) la contribution de ce TNF (induit par l'anti-PD-1) dans l'évasion tumorale chez les patients ne répondant pas aux anti-PD-1, (ii) et de l'utilisation d'agents anti-TNF en tant que thérapeutique adjuvante inhibant les effets pro-tumoraux du TNF, prennent sens. Il a d'ailleurs été montré sur modèle murin de mélanome que le blocage du TNF et du TNFR1 (récepteur du TNF de type 1) associé à un traitement anti-PD-1, prévenait (i) l'expression des checkpoints immunitaires PD-L1 et TIM-3, (ii) ainsi que la mort cellulaire des lymphocytes T $CD8^+$ infiltrants. Cette modulation permettait, *in fine*, de surpasser la résistance aux anti-PD-1 dans le mélanome expérimental avec un gain de 55 points sur la survie globale à 120 jours avec la combo-thérapie *versus* anti-PD-1 seul [301].

#### 2.3.3.4. Comparaison de l'efficacité des bDMARDs de la polyarthrite rhumatoïde

Il n'existe que peu d'études comparatives des bDMARDs de la PR [306-309]. Hors cas particuliers : séronégativité rhumatoïde [310], antécédent d'échec à une première ligne de bDMARD du même type [311], utilisation en monothérapie [306], ces traitements semblent présenter des profils d'efficacité similaires. Il est toutefois important de noter les particularités de certains traitements en termes de tolérance et d'action à l'échelle cellulaire et sub-cellulaire. Ces points seront abordés dans les paragraphes ultérieurs.

### 2.3.4. Mécanismes d'action des agents anti-TNF

#### 2.3.4.1. La signalisation des récepteurs du TNF

La biologie du TNF a fait l'objet de multiples revues [312, 313]. La transcription de l'ARNm du TNF est régulée par NFκB, c-Jun, AP1 (Activator Protein 1) et NFAT (Nuclear Factor associated with Activated T cells). La protéine est exprimée tout d'abord sous forme membranaire (mTNF, 26 kDa) et relarguée sous forme soluble trimérique (sTNF, 17 kDa) après clivage protéolytique par TACE (TNF Alpha Converting Enzyme, aussi connue sous le nom ADAM17). A noter que TACE est aussi capable de générer du TNFR soluble. Les 2 formes du TNF (sTNF, mTNF) sont capables de lier les TNFR1 et TNFR2. Toutefois, le sTNF semble avoir plus d'affinité pour le TNFR1, alors que le mTNF interagit préférentiellement avec le TNFR2 par le biais d'une interaction cellule-cellule.

Les 2 types de TNFR diffèrent par leur structure (présence d'un domaine de mort notamment) et par leur signalisation ***(Figure 25)***. Schématiquement : (i) le TNFR1 lie le sTNF, voire le mTNF. Cette liaison induit l'assemblage de différents complexes de signalisation générant une action pro-inflammatoire (*via* NFκB, et des MAPK) voire le déclenchement d'une mort cellulaire (via la caspase 8 et MLKL (Mixed Lineage Kinase domain-Like protein)). (ii) Le TNFR2, après engagement du mTNF, peut médier des effets anti-inflammatoires en plus de ses effets pro-inflammatoires (*via* NFκB, des MAPK et AKT) et ne possède pas de domaine de mort cellulaire.

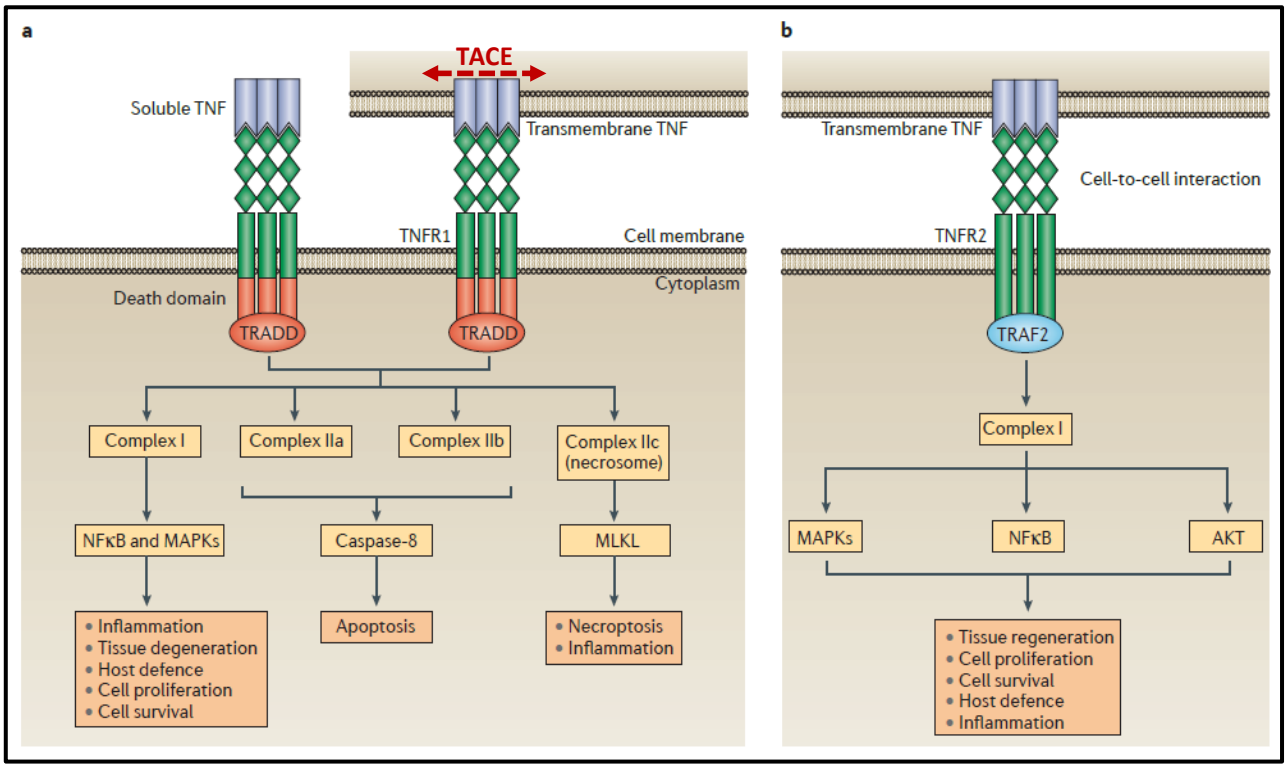



***Figure 25. Signalisation et bioactivité d'aval des récepteurs du TNF.*** *TNF : Tumor Necrosis Factor. TNFR : TNF Receptor. TRADD : TNFR1-Associated Death Domain protein (protéine adaptatrice). NFκB : Nuclear Factor κB. MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases. TRAF2 : TNFR-Associated factor 2. MLKL : Mixed Lineage Kinase domain-Like protein. AKT aussi connue sous le nom de Protein Kinase B. Issu de Kalliolias et al., 2016 Nature Reviews Rheumatology, TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies [312].*

### 2.3.4.2. Mécanismes impliqués dans l'effet des anti-TNF

L'effet des agents anti-TNF s'explique par plusieurs mécanismes d'action, démontrés ou supposés ***(Figure 26)***.

Le mécanisme d'action le plus évident est la neutralisation du TNF produit par les leucocytes, en premier lieu monocytes/macrophages. Les anti-TNF lient le TNF circulant et soluble avec une forte affinité [282]. Les détails de cette liaison sont donnés plus haut dans la ***partie 3.3.2***.

Un autre mécanisme d'action démontré est l'apoptose des leucocytes par CDC (Cell-Dependent Cytotoxicity) et ADCC (Antibody- Dependent Cell-mediated Cytotoxicity). Des détails supplémentaires sont fournis dans la ***partie 5.3.2*** [300].

Les agents anti-TNF sont aussi capables de moduler le système immunitaire ***(Cf. parties 5.2 et 5.3)***. Ces traitements sont à même de modifier le phénotype des cellules immunes et synoviocytes en limitant

leur production de médiateurs de la cascade inflammatoires (cytokines, chimiokines, facteurs angiogéniques), mais aussi d'induire des cellules régulatrices au premier desquelles l'on trouve les Treg [314]. La question de l'induction de macrophages régulateurs ou de lymphocytes B régulateurs dans la PR n'est pas élucidée.

Bien que la surexpression des Fc récepteurs, en particulier CD16, soit associée à la maladie, aucun bénéfice (ou effet négatif) de la liaison des anticorps monoclonaux anti-TNF aux Fc récepteurs n'a pour l'instant été prouvée dans la PR.

Enfin, un mécanisme potentiel, dont la réalité clinique reste à démontrer est le « reverse signalling » ou « outside-to-inside signalling ». Plusieurs travaux, dont des travaux de notre équipe (une partie est détaillée dans la ***section Résultats***) suggèrent que la liaison des anti-TNF au mTNF induit une signalisation dans la cellule exprimant le mTNF ***(Figure 26)***. Cette signalisation aboutirait à : (i) une résistance des cellules monocytaires au LPS par une voie MAPK/ERK dépendante [315], (ii) une apoptose monocytaire [316], (iii) une signalisation anti-inflammatoires avec protection contre le stress oxydatif et production de TGFβ [317, 318].

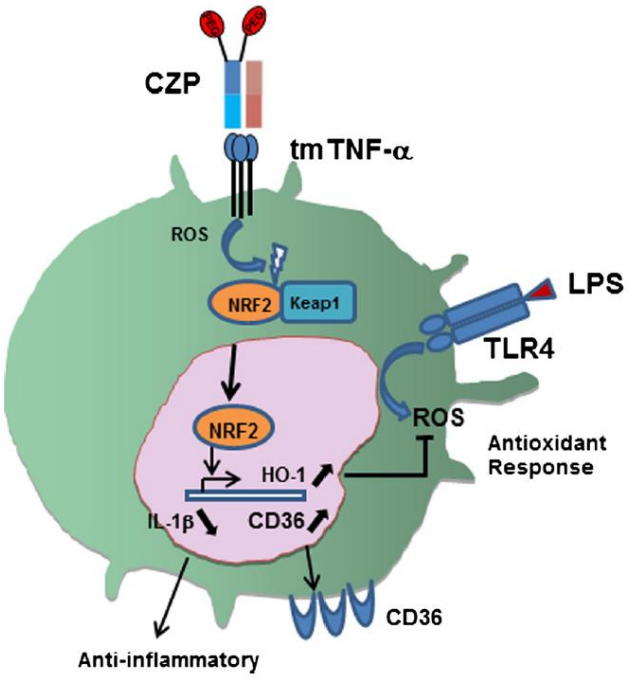



***Figure 26. Représentation schématique du reverse-signalling induit par le certolizumab pegol.*** *tmTNF : TNF (trans)membranaire. ROS : Reactive oxygen species. CZP : Certolizumab pegol. LPS : Lipopolysaccharide. TLR4 : Toll-like receptor 4. NRF2 : Hemeoxygenase 1. CD : Cluster of differentiation. IL : interleukine. Issu de Boyer et al., 2016 Arthritis Research & Therapy, Anti-TNF certolizumab pegol induces antioxidant response in human monocytes via reverse signaling [317].*

### 2.3.5. Effets anti-inflammatoires des agents anti-TNF dans la polyarthrite rhumatoïde

J'ai pris le parti de ne pas aborder ici les éléments cliniques (symptômes, paramètres biologiques et radiographiques usuels, risque cardiovasculaire et ostéoporose notamment) et de me limiter aux effets cellulaires et subcellulaires en rapport avec la biologie du TNF.

#### 2.3.5.1. L'inhibition de la cascade inflammatoire

Le TNF étant une cytokine centrale de la PR, son ciblage permet d'inhiber la plupart des événements de la phase effectrice de la maladie. L'utilisation clinique des anti-TNF a validé les données murines et *in vitro* (CF. paragraphe 3.2.) concernant l'inhibition subséquente des médiateurs inflammatoires d'aval : IL-6, IL-1, etc [270, 319].

De plus l'inhibition clinique du TNF diminue l'afflux des leucocytes [320, 321]. Cette diminution de l'infiltrat cellulaire dans la membrane synoviale et le liquide synovial résulte (i) d'une moindre production de chimiokines impliquées telles que l'IL-8, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, MIP1β/CCL4 [321, 322] et du récepteur CCR2 [323], (ii) d'une moindre expression des molécules d'adhésion ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) et E-selectine [320, 324], (iii) et d'une réduction de l'angiogenèse [325].

#### 2.3.5.2. La modulation des phénotypes cellulaires

Outre l'inhibition attendue des médiateurs de l'inflammation rhumatoïde, le ciblage du TNF est aussi associé à un effet bénéfique sur le compartiment des lymphocytes T. Le TNF soluble est capable d'inhiber les propriétés suppressives des Treg, de manière TNFR2 dépendante [326]. Il est à noter que les Treg expriment constitutivement des niveaux plus élevés de TNFR2 que les lymphocytes T effecteurs. Le mTNF lie préférentiellement ce TNFR2 et donc active et expand les lymphocytes Treg [327]. Les Treg des patients atteints de PR présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles altérées, potentiellement en lien avec la dérégulation du TNF dans cette pathologie. Sur le plan phénotypique, le compartiment Treg des patients atteints de PR présente plus de cellules $TNFR2^+$ et $GITR^+$ (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor-related Receptor), mais par contre expriment un niveau plus faible de FOXP3 (ARNm et protéine) [326]. En termes fonctionnels, ces Treg présentent une capacité réduite à inhiber la production de cytokines inflammatoires des lymphocytes T et monocytes activés et à induire un phénotype régulateur chez les lymphocytes T conventionnels [314]. L'exposition à un traitement anti-TNF restaure ces capacités et est associée à une augmentation des Treg circulants chez les patients répondeurs [314]. Des travaux plus récents du groupe Ehrenstein ont montré que l'adalimumab, au contraire de l'étanercept, favorisait l'interaction monocytes/Treg de patients atteints de PR, en (i) liant le mTNF des monocytes, (ii) et en induisant sa surexpression et sa liaison au TNFR2 sur

les Treg [328]. La conséquence de ce phénomène était l'induction de Treg foxp3$^{+}$, avec un effet suppresseur sur les Th17, de manière IL-2/STAT5 dépendante. L'observation du potentiel des agents anti-TNF à induire des cellules Treg a été reproduite à de multiples reprises dans la PR, mais aussi dans la maladie de Crohn.

Les autres populations cellulaires impliquées dans la pathogénie de la PR sont elles aussi modifiées par les anti-TNF. Nous retiendrons notamment l'induction d'une apoptose des synoviocytes fibroblastiques par la voie PTEN/FAK (Phosphatase and TEnsin homologue deleted on chromosome 10/Focal Adhesion Kinase) [329], la déplétion des structures folliculaires lymphoïdes synoviales [330], un possible effet sur les lymphocytes B (données discordantes) [331], l'induction de cellules dendritiques dérivées de monocytes tolérogènes [332] et l'inhibition de l'ostéoclastogénèse [333].

#### 2.3.5.3. Effet adverse de l'inhibition de la signalisation du TNF récepteur 2

Les anti-TNF sont déconseillés en cas de risque accru, d'antécédent ou de survenue récente d'une pathologie démyélinisante. La survenue d'une pathologie démyélinisante sous anti-TNF reste rare et renvoie à la biologie du TNF [334]. Le TNF est impliqué dans le processus de démyélinisation, et l'on aurait donc pu s'attendre au contraire à un bénéfice des anti-TNF dans les pathologies démyélinisantes. Parmi les hypothèses proposées [334], nous retiendrons (i) l'absence de passage de la barrière hémato-méningée qui favoriserait l'afflux des T auto-réactifs et un maintien de niveau élevé de TNF dans le système nerveux central, (ii) la modulation du profil cytokinique devenant similaire à la sclérose en plaques (IL-10 faible, IL-12 et IFNγ élevés), (iii) la diminution du TNFR2 sous anti-TNF, le TNFR2 étant nécessaire à la prolifération des oligodendrocytes immatures et à la réparation de myéline. Il est intéressant de noter que dans cette dernière hypothèse, les macrophages résidents (microglie) et les monocytes/macrophages hors du système nerveux central présentent un comportement différent, le TNFR2 de la microglie contribuant à protéger de la neuro-inflammation alors que le TNFR2 des monocytes/macrophages « périphériques » y participe [335]. Le bénéfice du ciblage du TNFR2 dépend donc du compartiment macrophagique considéré. Les effets spécifiques des anti-TNF sur les monocytes/macrophages sont abordés dans la partie suivante.

### 2.3.6. Effets des agents anti-TNF sur les monocytes/macrophages

#### 2.3.6.1. L'effet anti-cytokines

J'ai évoqué à plusieurs reprises précédemment la diminution des cytokines inflammatoires d'aval du TNF. Les monocytes/macrophages sont les principaux pourvoyeurs de ces cytokines. L'inhibition thérapeutique du TNF réduit la contribution des monocytes/macrophages à la production de

médiateurs inflammatoires. Cet effet suggère l'induction d'un phénotype monocytaire/macrophagique moins inflammatoire. La question de l'induction thérapeutique d'une polarisation alternative reste entière.

#### 2.3.6.2. L'apoptose des monocytes/macrophages

Les patients traités par anti-TNF présentent une réduction du nombre de macrophages synoviaux [222]. Les mécanismes supposés de cette réduction sont : une diminution de l'influx de monocytes dans la synoviale, une augmentation de la mort cellulaire *in situ*, un efflux des macrophages.

Les données générées *in vitro* sur des monocytes circulants $CD14^+$ montrent un niveau modéré d'apoptose en présence d'infliximab, d'adalimumab, dans une moindre mesure d'étanercept, mais pas en présence de certolizumab [300]. Environ 10% des monocytes étaient susceptibles à l'apoptose (Annexine V+) aux doses correspondant aux concentrations résiduelles à l'état d'équilibre sous traitement (1 à 10 µg/L) et de 20 à 40% des cellules aux doses de l'ordre de grandeur des pics sériques (100 µg/mL). La mort de cellules cibles TNF6.5 (lignée cellulaire murine myélomateuse exprimant le TNF humain) mettait en jeu la CDC et l'ADCC, mais de manière moins intense en présence d'étanercept ***(Cf. Tableau 2)*** [300]. De manière attendue, le certolizumab, dépourvu de fragment Fc, n'induit pas de mort cellulaire par ces mécanismes.

L'examen de biopsies synoviales de patients atteints de PR a permis de montrer que l'infliximab est responsable d'une diminution de plus de 50% de l'infiltrat inflammatoire CD68+, à 24h [336], 48h et 4 semaines [337] de son initiation. Cette réduction de l'infiltrat macrophagique est corrélée à l'activité de la maladie sous traitement [223].

Contrairement aux constatations *in vitro* faites sur des monocytes et des lignées cellulaires, l'inhibition thérapeutique du TNF par l'infliximab ne s'accompagne pas d'une induction d'apoptose des cellules monocytaires. Cette observation est valable dans le compartiment sanguin [338] et dans le tissu synovial, avec une évaluation (TUNEL, caspase 3 active, nucléosomes plasmatiques, fractions C4b/c du complément) faite à 24h [336, 338], 48h ou 4 semaines [337] post-initiation de l'infliximab. Toutefois, les données de la littérature concernant l'induction d'une apoptose des macrophages sont discordantes, puisqu'au moins une étude décrit une augmentation de l'apoptose des macrophages synoviaux ($TUNEL^+$) en présence d'infliximab et d'étanercept [339]. Ces discordances soulèvent la question de la contribution de la modification de migration des monocytes et macrophages dans la réduction de l'infiltrat macrophagique.

#### 2.3.6.3. La migration des monocytes

L'analyse de l'effet d'un traitement par infliximab sur (i) la localisation de granulocytes radiomarqués à l'Indium$^{111}$, (ii) la quantification des populations leucocytaires synoviales, (iii) et l'expression synoviale et sérique de chimiokines (IL-8 et CCL2/MCP1 notamment), a permis de confirmer le rôle du TNF dans la migration des leucocytes lors de la PR [321]. Quinze jours après l'initiation du traitement, (i) l'infiltration des neutrophiles radiomarqués, (ii) l'infiltrat synovial CD3+, CD22+ et CD68+, (iii) et les niveaux synoviaux et sériques d'IL8 et CCL2/MCP1 avaient significativement diminués. Contrairement à la diminution sous infliximab de l'influx articulaire des neutrophiles [321], 14 jours d'inhibition thérapeutique du TNF par l'adalimumab ne réduit pas l'influx monocytaire (marquage technétium 99m) [340]. Cet élément concourt à l'hypothèse d'une réduction de l'infiltrat macrophagique essentiellement basée sur l'efflux macrophagique. Pourtant, il a récemment été montré en modèle murin transgénique (hTNF-Tg) qu'un traitement par infliximab (i) augmentait l'apoptose des macrophages Ly6C+ (dérivant des monocytes recrutés) synoviaux et lymphatiques, (ii) et réduisait l'influx monocytaire synovial en réponse à la diminution de CCL2 [338].

Outre la diminution de l'influx des leucocytes observée sous anti-TNF, il existe aussi (i) une augmentation de l'expression de CCR3 sur les monocytes et lymphocytes T CD4, (ii) associée à une augmentation de la réponse IFN et IL-4 en réponse à la stimulation *in vitro* de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de patients traités par infliximab. Ces résultats suggèrent que le traitement inhibe l'influx synovial de cellules immunitaires, tout en favorisant les fonctions des cellules immunitaires périphériques [341].

La problématique de l'effet des agents anti-TNF sur la migration des monocytes/macrophages dans le compartiment synovial, tout comme celle de l'effet sur la survie des monocytes/macrophages, n'est pas élucidée. Les données concernant l'influx des monocytes en présence d'anti-TNF (infliximab, adalimumab) sont discordantes. L'hypothèse d'une diminution de l'infiltrat macrophagique par augmentation de l'efflux a émergé. Les résultats récents de l'étude murine vont à l'encontre de cette hypothèse formulée chez l'Homme. Il est possible que ces apparentes discordances soient le reflet les spécificités des modèles d'études (humain/murin, *ex vivo*/*in vivo*, type de modèle murin) et éventuellement des différences de mécanismes d'action entre agents anti-TNF.

# Résultats expérimentaux

# 3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

## 3.1. Objectifs globaux du travail de thèse

L'objectif de ce travail de thèse, était de répondre à deux problématiques :

*La première était* d'***évaluer si le concept de polarisation du macrophage permettait de rendre compte des effets thérapeutiques des traitements validés (biothérapies) ou potentiel (dendrimère ABP) de la PR.*** Le macrophage est caractérisé par sa plasticité phénotypique, qui est notamment reflétée par les diverses polarisaitons décrites dans la littérature. Il joue aussi un rôle central dans la pathogénie de la PR. Toutefois, la description de sa contribution à cette maladie a longtemps été limitée à son rôle pro-inflammatoire. Les avancées dans la connaissance de la biologie du macrophage ont permis de mettre en avant (i) l'influence de l'ontogénie sur son comportement tissulaire, (ii) et sa participation à d'autres phénomènes que la génération de l'inflammation, notamment sa résolution. Ces concepts ont contribué à enrichir notre vision de la plasticité du macrophage. A la lumière de ces éléments, il nous a paru important d'évaluer si les traitements de la PR modulaient la polarisation du macrophage rhumatoïde.

La seconde problématique était d'***identifier le mode d'action des traitements de la PR sur le macrophage***. Les biothérapies de la PR, en particulier anti-cytokines, inhibent l'environnement inflammatoire induit lors de la maladie. De ce fait, un effet inhibiteur sur la polarisation pro-inflammatoire du macrophage (« M1 ») est attendu. Toutefois, compte tenu de la plasticité de cette cellule et de sa contribution à la résolution de l'inflammation, il est cohérent de supposer que l'effet des traitements de la PR ne se limite pas à une simple inhibition de la polarisation inflammatoire du macrophage. Nous nous sommes attachés à évaluer s'il existait une induction d'un phénotype dit alternatif (« M2 »).

Ces deux problématiques ont été abordées au cours de 3 études présentées ci-après.

### 3.2. Article 1 - Polarization of Rheumatoid Macrophages by TNF Targeting through an IL-10/STAT3 Mechanism. Page 61.

Article soumis, « under review ». Le manuscrit original est inclus ci-dessous. Il n'a pas été modifié, hormis la mise en page, afin de limiter l'espace utilisé et de faciliter la lecture.

### 3.3. Article 2 - Anti-TNF certolizumab pegol induces antioxidant response in human monocytes via reverse signaling. Page 96.

Arthritis Res Ther. 2016; 18: 56. Published online 2016 Mar 1. doi: 10.1186/s13075-016-0955-8

### 3.4. Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent. Page 105.

Arthritis Res Ther. 2014 Apr 18;16(2):R98. doi: 10.1186/ar4546.

Article 1.

# Polarization of Rheumatoid Macrophages by TNF Targeting through an IL-10/STAT3 Mechanism.

Yannick Degboé [1,2,3,*], Benjamin Rauwel [1], Michel Baron [1], Jean-Frédéric Boyer [1,2], Adeline Ruyssen-Witrand [2,3,4], Arnaud Constantin [1,2,3,#] and Jean-Luc Davignon [1,2,#].

1: Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, INSERM UMR 1043, Toulouse, France.
2: Centre de Rhumatologie, CHU de Toulouse, Toulouse, France.
3: Faculté de Médecine, Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France.
4: UMR1027, INSERM – Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France.
#: These authors contributed equally to the work.
*: Corresponding author

**Correspondence:**
Dr Yannick Degboé
Centre de Rhumatologie, Hôpital Pierre-Paul Riquet
Place du Dr Baylac, TSA 40 031
31059 Toulouse cedex 9, France
E-mail: yannick.degboe@inserm.fr

**Fundings:**
This work has been supported by “la Société Française de Rhumatologie” and by Pfizer.

**Disclosures:**
This work was supported by a Passerelle Grant from Pfizer France.

**Keywords:**
Macrophage, polarization, alternative, anti-TNF agents, TNF, interleukin 10, STAT3.

## ABSTRACT

Macrophages contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). They can display different states of activation or "polarization", notably the so-called inflammatory "M1" and the various alternative "M2" polarizations, characterized by distinct functions. Data regarding the effects of RA anti-cytokine biological disease-modifying anti-rheumatic drugs (bDMARDs) on macrophage polarization are scarce. We aimed to assess *in vitro* modulation of macrophage polarization by bDMARDs targeting pro-inflammatory cytokines in RA.

We generated monocyte derived macrophages using blood samples from 20 RA patients with active RA and 30 healthy controls. We evaluated *in vitro* the impact on M1 inflammatory macrophages of: etanercept (ETA), adalimumab (ADA), certolizumab (CZP), tocilizumab (TCZ), and rituximab (RTX). We assessed the impact on macrophage polarization using flow cytometry and RTqPCR to study the expression of surface markers and perform functional studies of cytokine production, phagocytosis, and negative feedback control of inflammation.

Among evaluated bDMARDs, anti-TNF agents modulated the polarization of inflammatory macrophages by decreasing inflammatory surface markers (CD40, CD80) and favoring alternative markers (CD16, CD163, MerTK). Anti-TNF agents also induced alternative functions in macrophages activated in inflammatory condition with (i) the inhibition of inflammatory cytokines (TNF, IL-6, IL-12), (ii) an increase in phagocytosis. These findings were mechanistically related to an increase in early IL-10 production, responsible for higher negative feedback control of inflammation involving SOCS3 and Gas6. This IL-10 effect was STAT3-dependent.

Anti-TNF agents not only inhibit *in vitro* inflammatory functions of macrophages, but also favor resolution of inflammation through polarization towards alternative features specifically involving the IL-10/STAT3 axis.

## INTRODUCTION

Plasticity is a key feature of macrophages. They can be activated by many stimuli, depending on their environment, resulting in specific states of polarization. Their plasticity is illustrated by various profiles including the so-called M1 pro-inflammatory polarization, and M2 alternative polarizations driving immunoregulatory and wound-healing functions (1, 2). The M1/M2 historical classification is far too simplistic to describe the variety of macrophage phenotypes (3), especially with regards to rheumatoid arthritis (RA).

Although a few studies on synovial tissue failed to identify specific macrophage polarization surface markers in RA synovium (4, 5), several studies have clearly demonstrated that infiltrating synovial macrophages display a pro-inflammatory profile (6). Macrophages play a central effector role in rheumatoid synovitis. They contribute to the inflammatory environment: by producing pro-inflammatory cytokines, especially TNF (7), by enhancing synovial homing of immune cells through chemokines (CCL2, CCL3, CCL5, IL-8, CX3CL1) (8), by producing angiogenic factors (Vascular Endothelial Growth Factor, Fibroblast Growth Factor-β, Platelet-Derived Growth Factor) (9-12), and by inducing oxidative damage through reactive oxygen species(13). Macrophages crosstalk with CD4 T cells is able to induce Th1 and Th17 commitment as identified in RA (14, 15). Moreover, they activate fibroblastic synoviocytes and induce osteoclastogenesis thus contributing to joint destruction in RA (16, 17). In addition to their well described role in the effector phase of RA, macrophages may also contribute to the disease onset, especially by generating arthritogenic citrullinated peptides (18, 19).

Synovitis in active RA is fueled by macrophages generated from newly differentiated blood monocytes. In therapeutic context, those monocytes-derived macrophages are concomitantly exposed to differentiating and activating stimuli as well as to drugs. Infiltration of the synovial sublining by CD68+ macrophages is a biomarker of disease severity

and therapeutic response (20). However, data concerning the effects of RA biological disease-modifying anti-rheumatic drugs (bDMARDs) on macrophage polarization are scarce. Anti-cytokine bDMARDs have been shown to reduce the inflammatory burden provided especially by recruited inflammatory monocytes/macrophages (21-23). Whether or not an alternative polarization of macrophages is related to the therapeutic response in RA remains unknown. This issue is a key point to better understand the mechanism of action of bDMARDs in RA, and to tailor the therapeutic targeting of macrophages in RA.

In the current study, we aimed to assess *in vitro* modulation of monocyte-derived macrophage polarization of RA patients by bDMARDs, especially anti-TNF agents. We found that anti-TNF polarize macrophage towards an alternative pro-resolving phenotype.

## METHODS

### Study participants

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from 20 RA patients and 30 healthy controls. RA patients were recruited in the Rheumatology Centre of the Toulouse University Hospital (CHU Toulouse, France). Inclusion criteria were: age ≥18 years old, RA diagnosis according to the ACR/EULAR 2010 criteria, active RA (DAS28 ≥2.6) and indication for a first or second bDMARD initiation. Blood samples of RA patients were collected before initiation of the bDMARD. Due to the potential effects of corticosteroids on macrophage polarization, we excluded steroid (GC) use > 10 mg prednisone equivalent/day, IV use of steroids, or intra-articular injection of steroids less than 2 weeks before. Healthy controls were recruited from the Etablissement Français du Sang (Toulouse, France). Informed written consent was obtained, and the study protocol regarding RA patients was approved by the local ethics committee (CHU Toulouse – BioTOUL DC 2016-2804).

### Generation of macrophages

CD14+ monocytes were purified by positive magnetic sorting (Affymetrix), from PBMC isolated on Pancoll (Pan Biotech). Purity was measured by flow cytometry (MACSQuant 10, Miltenyi), using a CD14-FITC antibody (clone HCD14, BioLegend). Sample purity was routinely ≥ 95%. Macrophages were derived from monocytes (MDM). Monocytes (0.5 x $10^6$/ml) were differentiated into macrophages in the presence of recombinant M-CSF (50 ng/ml; BioLegend) for 5 days. Cells were cultivated at 37°C/5% $CO_2$ in RPMI medium 1640 + Glutamax (Gibco), supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), Penicillin G (Gibco) and Streptomycin (Gibco).

### Activation of macrophages

MDM were activated or not for 24h as either M1 pro-inflammatory MDM using LPS from E. coli (20 ng/ml; Sigma-Aldrich) and IFNγ (25 ng/ml; Peprotech), or M(IL10) alternative MDM using IL-10 (50 ng/ml; Peprotech), or M(IL4) alternative MDM using IL-4 (25 ng/ml; Peprotech) (24).
M1 MDM were cultivated with or without bDMARDs, during the 24h activation phase. The bDMARDs were used at 10 µg/ml. We evaluated 2 anti-TNF agents (etanercept (ETA), adalimumab (ADA)), 1 anti-IL6-receptor agent (tocilizumab (TCZ)), and 1 anti-CD20 agent (rituximab (RTX); as a control of unspecific impact of the Fc fragment). Certolizumab (CZP) was used in some experiments.

### Flow cytometry analysis

We assessed the effects of bDMARDs on M1 activation by a flow cytometric analysis of membrane markers. Before labelling, MDM were blocked with a Fc receptor blocking solution: Human TruStain FcX (BioLegend). Surface staining was performed using the following murine anti-human antibodies: CD40 APC/Cy7 (clone 5C3, BioLegend), CD80 BV421 (clone 2D10, BioLegend), CD206 AF488 (clone 15-2, BioLegend), CD200R PE (clone OX-108, BioLegend), CD64 PC7 (clone 10.1, BioLegend), MER proto-oncogene tyrosine kinase (MerTK) PE (clone 125518, R&D systems), CD163 FITC (clone GHI/61.1, Miltenyi), CD16 V500 (clone 3G8, BD Biosciences). We evaluated median fluorescence intensity (MFI). Given the high auto-fluorescence of the macrophages, and the

variability of this auto-fluorescence depending on the stimulation, fluorescence levels were expressed as ratio (specific labelling / corresponding isotype).
For intra-cellular staining of phospho-STAT3, cells were fixed and permeabilized with a Transcription Factor Buffer Set (BD), following the manufacturer's protocol. We performed a primary labelling with a rabbit anti-human phospho-Stat3 (Tyr705) (clone D3A7, Cell Signaling Technology) and a secondary labelling with an anti-Rabbit IgG (H+L), $F(ab')_2$ Fragment (Alexa Fluor 647 Conjugate; Cell Signaling Technology).
Cells were analyzed on a MACSQuant 10 (Miltenyi). Data were analyzed using FlowJo v7.6.5 (Tree Star).

**Cytokine measurements**

Culture supernatants were collected and kept at -80°C until analysis. Concentrations of IL-6, IL-10, IL-12 and TNF were determined simultaneously using Cytometric Bead Array (Human Flex set, BD Biosciences). Data acquisition was performed on a LSRII (BD Biosciences) and analysis was performed using FCAP Array v3 (Soft Flow). TGFβ was quantitated by ELISA (Ready-SET-Go, eBioscience, San Diego, CA, USA) on a Varioskan Flash (Thermo Scientific) spectrophotometer and analyzed using the SkanIt™ (Thermo Scientific) program.

**Gene expression analysis**

Total RNA from $1.5 \times 10^6$ monocytes was isolated using High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and complementary DNA (cDNA) synthesized with RevertAid Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene expression was performed using LightCycler 480 SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics GmbH) and a LightCycler 480 System instrument (Roche Diagnostics GmbH). All primers were designed using ProbeFinder Software (Roche Applied Science website), and synthesized by Sigma Life Science (St Quentin Fallavier, France).
GAPDH forward: 5'-acccactcctccacctttgac-3', GAPDH reverse: 5'-ctgttgctgtagccaaattcgt-3'.
TNFα forward:.5'-cagcctcttctccttcctga-3', TNFα reverse: 5'-acccactcctccacctttgac-3'
IL10 forward: 5'-aacaagagcaaggccgtgg -3', IL10 reverse: 5'-gaagatgtcaaactcactcatggc-3'
GAS6 forward: 5'- acctcatgggcaacttcttc-3', GAS6 reverse: 5'-ggctgcattcgttgacatc-3'
SOCS3 forward: 5'-agacttcgattcgggacca-3', SOCS3 reverse: 5'-aacttgctgtgggtgaccat-3'

**Phagocytosis assay**

Phagocytosis ability was assessed by flow cytometry using pHrodo green *E.coli* bioparticles®, following the protocol recommended by the manufacturer. Briefly, 100 000 cells (1 000 000/mL) per well were cultivated in a 96-well plate. They were activated for 24h as M1 in the presence or absence of bDMARD. Then, culture medium was replaced by 100 µL of pHrodo bioparticles resuspended in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco), and incubated for 90 min at 37°C / 5% $CO_2$. Cells were then harvested after 10 min of incubation on ice in cold DPBS and assessed by flow cytometry (MACSQuant Q10). In some experiments, inhibition of CD16-dependent phagocytosis was performed during the activation phase, with a LEAF purified anti-human CD16 antibody (clone 3G8, BioLegend) used at 10 µg/ml. All conditions were performed in duplicate.

**Pharmacological inhibition of STAT3**

MDM activated for 24h as M1 MDM were cultivated during this activation phase with cucurbitacin I (50 mM, Sigma) a selective JAK2/STAT3 inhibitor, or with STATTIC (1 µM, Selleckchem) an inhibitor of phospho-tyrosine binding to the SH2 domain of STAT3.

**Statistical analysis**

In most of the experiments, non-activated MDM and M1 MDM cultivated in the presence of bDMARDs were compared to untreated M1 MDM by Sigma Plot v12.5 (Systat Software Inc.). We tested whether values had a gaussian distribution (Shapiro-Wilk test). In case of Gaussian distribution, samples were compared using a Student paired t-test; otherwise, medians were compared by a Wilcoxon

matched pairs test. Multiple groups comparison was performed by a One-way ANOVA and Bonferroni's post-test, or Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test in case of non-Gaussian distribution. We evaluated the correlation between CD16 membrane expression in MDM and DAS28 ESR at inclusion by the Pearson r correlation coefficient. We evaluated the association between CD16 expression in MDM (categorized as low *i.e.* ≤2.1 versus high *i.e.* >2.1) and DAS28 ESR at inclusion (categorized as low-to-moderate *i.e.* ≤5.1 versus high *i.e.* >5.1) by a Fisher's exact test and evaluated the strength of this association with odds ratio (OR) calculation. We assessed the influence of the background treatment regimen (GC, methotrexate (MTX)) on the expression of polarization markers in the different conditions of activation, by a two-way ANOVA. A p value<0.05 was considered to be significant, with: ***: p value <0.001, **: 0.001≤p< 0.1, *: 0.01≤p< 0.05.

## RESULTS

### Patient characteristics

We included 20 RA patients with active RA and 30 healthy controls. Blood samples were collected in 15/20 patients (75%) before initiation of the first bDMARD, and in 5/20 patients (25%) before initiation of the second bDMARD. Choice of bDMARD therapy was determined by the treating physician: etanercept in 9 patients, adalimumab in 3 patients, rituximab in 3 patients, tocilizumab in 2 patients, abatacept in 1 patient, golimumab in 1 patient, and certolizumab in 1 patient. At inclusion, 9 patients (45.0%) had MTX background, and 6 patients (30.0%) had GC background. The patient characteristics are provided in Table 1.

### Validation of surface markers of macrophage polarization

PBMC from 16 RA patients and 20 controls were differentiated into MDM and activated or not as M1 pro-inflammatory macrophages, M(IL4) alternative macrophages, and M(IL10) alternative macrophages (Figure 1A). The possibility of using surface markers to discriminate these different polarization states was assessed by flow cytometry. In RA patients, CD40 and CD80 were highly expressed in M1 macrophages, but poorly expressed in MDM and M2 macrophages. We considered these markers as M1 markers. CD16 and CD163 were highly expressed in M(IL10), expressed at an intermediate level in MDM and M(IL4), and poorly expressed in M1 macrophages. We thus considered CD16 and CD163 as M(IL10) markers. MerTK was expressed at a similar level, *i.e.* intermediate, in MDM, M(IL4), and M(IL10), and at lower level in M1, leading us to consider MerTK as a pan-M2 marker. CD206 and CD200R were expressed at high level in M(IL4), at low-to-intermediate level in MDM and M(IL10), and at lower level in M1 macrophages, leading us to consider them as M(IL4) markers. CD64 was associated with both M1 and M(IL10) polarization states, thus non-discriminative for further experiments.

When compared to controls, RA patients macrophages displayed a biased plasticity. They were prone to express higher level of inflammatory markers after M1 activation (CD40, CD80, CD64), and lower level of M(IL4) markers (CD206, CD200R) and M(IL10) markers (CD16, CD64) in the *ad hoc* activation condition. Surprisingly, CD163 expression was higher in macrophages from RA patients. Despite these differences, discrimination using selected surface markers was similar in RA patients and in healthy controls.

We next confirmed the functional relevance of those polarization markers in RA patients. Among the selected markers, only CD16 membrane expression in MDM was specifically correlated with disease activity measured at inclusion by the DAS28 ESR and DAS28 CRP (Figure 1B). In our model, CD16 was considered as a marker of alternative polarization (M(IL10)). We categorized and CD16 expression as high (>2.1) and low (≤2.1), and disease activity as high (DAS28 ESR>5.1) and low-to-moderate (2.6<DAS28 ESR≤5.1). We observed a significant association between high CD16 expression in MDM and low-to-moderate disease activity at inclusion (Fisher's exact test p value = 0.0406, OR = 17.5 [1.2-250.5]; Figure 1C).

**Anti-TNF agents favor alternative over pro-inflammatory surface markers**

We then assessed the impact of anti-TNF agents (ADA, ETA), the anti-IL-6 receptor drug (TCZ), and RTX used as control on polarization surface markers in MDM from 16 RA patients and 21 healthy controls activated as M1 pro-inflammatory macrophages (Figure 2, supplemental Figure S1-S2). In RA patients as well as in controls, compared to M1 untreated macrophages, anti-TNF agents induced a significant modulation of polarization surface markers: (i) a decrease in M1 markers (CD40 and CD80), (ii) an increase in M(IL10) markers (CD16, CD163) and in the pan M2 marker MerTK (Figure 2, supplemental Figure S1) and (iii) no effect on M(IL4) markers (CD206 and CD200R) (supplemental Figure S2). Although the modulation of polarization markers by anti-TNF agents was similar in RA patients and controls, decrease in CD40 was observed with a greater extent in RA patients and increase in CD16 was observed with a greater extent in controls.

TCZ induced a slight but significant CD40 decrease in controls, and a slight but significant increase in CD206 in RA patients and controls. The anti-CD20 drug (RTX) slightly but significantly reduced CD40 in controls.

To take into account the possible impact of background treatment regimen at inclusion on our results, we evaluated the influence of prior exposure to GC<10 mg/day, MTX and bDMARD on the *in vitro* modulation of membrane polarization markers by bDMARDs (supplemental Figure S3). Prior exposure to GC and MTX slightly impacted the expression of polarization markers. GC background (supplemental Figure S3A) accounted for: (i) 5.7% of the total variance of CD80 expression ($p=0.0053$), (ii) and 7.6% of the total variance of MerTK expression ($p=0.0146$). MTX background (supplemental Figure S3B) accounted for: (i) 16.0% of the total variance of CD206 expression ($p<0.0001$), (ii) and 3.4% of the total variance of CD64 expression ($p=0.0168$). Prior exposure to bDMARD impacted the expression of polarization markers. bDMARD background (supplemental Figure S3C) accounted for: (i) 6.7% of the total variance of CD163 expression ($p=0.0225$), (ii) 41.0% of the total variance of MerTK expression ($p<0.0001$), (iii) and 9.9% of the total variance of CD64 ($p=0.0015$).

To take into account the contribution of the Fc fragment of the fusion protein or monoclonal antibodies used in our experiments on polarization, we compared ETA and ADA to CZP (Fc-free PEGylated TNF inhibitor fab fragment), and RTX (with Fc but not relevant for macrophages, because it targets CD20). Since we observed similar surface marker patterns with ETA, ADA and CZP, but not with RTX, we considered the modulation of polarization surface markers by anti-TNF agents to be independent of the presence of Fc (supplemental Figure S4).

**Anti-TNF agents decrease the production of pro-inflammatory cytokines**

We next investigated whether phenotypic changes were associated with functional changes.

We evaluated the impact of bDMARDs on the secretion of soluble pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-6, IL-12) in cell culture supernatants, and on mRNA expression (TNF). Cytokine secretion was assessed in MDM from 10 RA patients and 12 healthy controls activated as M1 pro-inflammatory macrophages (Figure 3A, supplemental Table S1). In RA patients as well as in controls, anti-TNF agents induced a significant decrease in pro-inflammatory cytokines compared to M1 untreated macrophages. Notably, we observed a strong decrease in IL-12 and IL-6.

ADA competed with antibodies in TNF detection assays and thus prevented the detection of soluble TNF in supernatants (supplemental Figure S5A). However, *tnf* mRNA decreased from 6 hours post-activation in M1 MDM treated with ADA when compared to non-treated M1 MDM, indicating thus an inhibition of TNF gene expression by ADA (Figure 3B).

The concentration of ETA was set to inhibit pro-inflammatory cytokines production and inhibit the pro-inflammatory phenotype. TNF secretion was decreased by ETA from the first hours of M1 activation (supplemental Figure S6). At 24 hours post-activation, we observed a dose-

dependent inhibition of TNF concentration by ETA. ETA at 10 µg/mL did not affect TNF secretion in RA patients, and significantly decreased TNF in controls, who notably secreted lower levels of TNF (supplemental Table S1). However, a high concentration of ETA (100 µg/mL) was associated with a reduced secretion of TNF in cell culture supernatants from controls (supplemental Figure S5B).

TCZ significantly decreased IL6 and TNF production in healthy controls but not in RA patients.

RTX slightly, but significantly decreased TNF in RA patients.

**Anti-TNF agents increase phagocytic capacity**

Phagocytosis is the hallmark of macrophages. Clearance of debris and apoptotic bodies contributes to resolve of inflammation. We assessed the impact of bDMARDs on the phagocytic capacity of MDM from 5 healthy controls activated as M1 pro-inflammatory MDM. Phagocytosis was higher in M(IL10) and M(IL4) activated MDM than in M1 MDM (Figure 3C). Anti-TNF agents, but neither TCZ nor RTX, induced an increase of phagocytosis in M1 MDM (Figure 3D). Considering that CD16 is known to be implicated in phagocytosis, and that surface expression of CD16 is increased in our study by anti-TNF agents, we assessed its contribution to *in vitro* phagocytosis by a specific inhibition with a blocking anti-CD16 antibody. The results showed that this increase in phagocytosis by ADA treatment was, at least in part, CD16-dependent (Figure 3E).

**The impact of anti-TNF agents on macrophage polarization involves IL10**

In the presence of anti-TNF agents, we observed a selective preservation of M(IL10) markers (but not M(IL4) markers), associated with functional modifications including a lower production of inflammatory cytokines and a higher phagocytic capacity. IL-10 is a major cytokine of the negative feedback control of inflammation and increases phagocytosis. We thus assessed the implication of IL-10 in the modulation of macrophage polarization induced by anti-TNF agents in an M1 inflammatory context (Figure 4A-D, supplemental Figure S7A-C). *Il10* mRNA was induced by M1 activation with fast kinetics. We observed a biphasic modulation of IL-10 in the presence of anti-TNF agents in M1 MDM. First, at an early time-point *il10* mRNA was increased in the presence of anti-TNF agents (2 hours post-activation) (Figure 4A). This finding was consistent with the higher IL-10 secretion in cell culture supernatants, in the presence of anti-TNF agents, notably between 2 and 6 hours post-activation (Figure 4B). Second, at 24h of M1 activation, we observed a decrease in IL-10 with anti-TNF agents but not with TCZ and RTX (Figure 4C, supplemental Figure S7A). This decrease was potentially related to the neutralization of the inflammatory environment by anti-TNF agents. This biphasic modulation suggested a critical role for early IL-10 production in macrophage polarization in the presence of a TNF blockade. Therefore, we next assessed the impact of the early neutralization of IL-10 on the anti-TNF agents-induced polarization (supplemental Figure S7B). IL-10 inhibition from the start of the 24h activation phase resulted in a dramatic decrease in M2 alternative surface markers and an increase in M1 inflammatory surface markers (Figure 4D, supplemental Figure S7C).

**Anti-TNF agents amplify IL-10-related negative control of inflammation**

IL-10 controls the inflammatory process through induction of various proteins including Suppressors of cytokine signaling (SOCS), MerTK and its ligand Gas6 (25, 26). SOCS are a family of intracellular cytokine-inducible proteins known to be major regulators of macrophage phenotypes (27). SOCS3 can act downstream from MerTK, which plays a major role in phagocytosis of apoptotic cells and controls many other functions such as immunoregulation. Notably, MerTK inhibits the Toll-like receptors-mediated innate immune response *via* its ligand Gas6, and *via* an increase in SOCS3 level (28, 29). Using RTqPCR, we aimed to assess the contribution of the negative feedback control of inflammation by Gas6 and SOCS3, on the modulation of macrophage

polarization induced by anti-TNF agents. *Gas6* was expressed at baseline. M1 inflammatory activation decreased *gas6* expression. Anti-TNF agents maintained the level of *gas6* expression over time until 24 hours post-activation (Figure 4E), with a higher level in the presence of ADA than ETA. M1 activation induced *socs3* expression. Anti-TNF agents enhanced this expression in the first hours post-activation (Figure 4F).

**Anti-TNF agent-induced switch from inflammatory to alternative macrophage polarization involves STAT3**

Given that IL-10 is involved in the impact of anti-TNF agents on polarization, and that STAT3 is a key transcription factor in M(IL10) commitment, we evaluated the implication of STAT3 in the modulation of macrophage polarization induced by anti-TNF agents in an M1 inflammatory context. In addition to its implication in IL10 signaling, STAT3 is also a key transcription factor in IL-6 signaling. In the presence of LPS, STAT3 activation is transient in the presence of IL-6, whereas it is sustained with IL-10 (30). We observed after 24h of M1 activation that intracellular expression of phospho-STAT3 (pSTAT3) was higher in the presence of anti-TNF than in M1 untreated cells (Figure 5A). Both anti-TNF agents displayed a decreased induction of M(IL10) markers in the presence of selective inhibitors of STAT3: cucurbitacin I and STATTIC (Figure 5B-C).

## DISCUSSION

This study demonstrates that anti-TNF agents downregulate surface markers and cytokines associated with an inflammatory phenotype in macrophages, and favor properties such as phagocytosis and negative feedback of inflammation supporting the resolution of inflammation through an IL-10/STAT3 pathway.

Studies addressing the impact of pro-inflammatory cytokine blockades on monocyte/macrophage phenotypes and functions are scarce (21, 31-33). Herein, we provide new data based on macrophages from RA patients that provide new concept of the mode of action of bDMARDs. This is of help to understand the action of anti-TNF bDMARDs in RA.

Infiltrating synovial macrophages originate from blood monocytes. These macrophages are considered as short lifespan cells constantly recruited in the inflammatory synovium: they experience activation-induced cell death (34, 35), apoptosis induced by therapeutic agents (22, 32, 36), and eventually efflux from synovium (37). We used monocyte-derived macrophages submitted to pro-inflammatory conditioning to model the contribution of these infiltrating macrophages to rheumatoid synovitis. In therapeutic condition, newly generated infiltrating macrophages are exposed to the drug from their maturation to their death. Considering the constant turnover of non-resident inflammatory macrophages, it appears that blocking the polarization of macrophages toward an inflammatory phenotype in the presence of anti-TNF is relevant.

Here we have provided data concerning the plasticity of macrophages and discriminative markers of polarization. Some authors opposed M-CSF and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) as respectively M2 and M1 stimuli. However, this concept is debated (2, 24, 38, 39). Notably, M-CSF may contribute to the inflammatory milieu, with an involvement in collagen induced arthritis (40) and with the induction in macrophages of a high pro-inflammatory response to rheumatoid arthritis-specific immune complex containing ACPA (41). Interestingly, drugs targeting M-CSF are able to inhibit arthritis in murine models of RA (42, 43). As widely proposed (2), we used M-CSF which is known to be the main growth factor involved in macrophages differentiation in homeostasis. As expected, the differentiation process with M-CSF induced a partial M2 “alternative” phenotype bias in MDM that was reversible with pro-inflammatory activation provided by TLR4 ligand + IFNγ.

Anti-TNF agents are commonly used in RA patients. In the current study, we took ADA as a representative of anti-TNF monoclonal antibodies, ETA as a soluble anti-TNF receptor, and CZP as an anti-TNF agent devoid of the Fc fragment. Anti-TNF agents were used at 10

µg/ml, a concentration corresponding to the steady-state level in clinical studies.

Our current study demonstrated that in inflammatory conditions, anti-TNF agents but not TCZ favor CD16, CD163 and MerTK expression while decreasing CD40 and CD80. Ambarus *et al.* (44) depicted the impact of polarizing cytokines on macrophage surface markers of monocyte-derived macrophages from healthy controls. Even though the experimental protocols were different, our results for polarization markers were consistent with their study. Moreover, we have discovered suitable surface markers of macrophage polarization in RA patients. The discriminative ability of our selected polarization surface markers was similar in RA patients and in controls. To our knowledge, this work is the first to provide such data for RA patients.

A functional hallmark of macrophages is the production of cytokines. As expected from treatments neutralizing a major inflammatory cytokine, anti-TNF agents decreased the production of inflammatory cytokines (IL-6, IL-12, TNF). This decrease is probably due to a blockade of the inflammatory positive loop. In most of the experiments, anti-TNF agents displayed similar properties. Only high concentrations of ETA were able to drastically inhibit TNF production in cell culture supernatants, suggesting a positive loop of TNF regulation that is lost only when TNF is completely neutralized.

Regarding IL-10, we observed a biphasic modulation of IL10 production in the presence of anti-TNF agents: (i) early increase in IL-10, (ii) a decrease at later time-points. Given that IL-10 is a major cytokine of the negative feedback control of inflammation, these findings suggested an implication of IL-10 in the modulation of the M1 MDM phenotype in the presence of anti-TNF agents. This hypothesis was confirmed by the antagonization of anti-TNF agents effects by IL-10 neutralization. We propose that the early increase in IL-10 is a major contributor to the modulation of inflammatory macrophages' polarization by anti-TNF (Figure 6). We observed a decrease in IL-10 at 24 hours post-activation. We considered that this decrease was a consequence of the inhibition of the inflammatory milieu provided by the TNF. We have previously shown that CZP, an anti-TNF agent, induce NRF2 activation (21), a marker involved in the anti-inflammatory pathways (45) and IL-10 production (our current study). On the contrary, anti-IL-6R does neither induce NRF2 nor IL-10 production (46-48). Our findings, showing a specific IL-10-dependent modulation of macrophages polarization by anti-TNF agents, thus reflect the differences between bDMARDs on IL-10 regulation. We provide here additional evidence to the concept that a TNF blockade induce a regulatory phenotype in immune cells (49).

Another hallmark of macrophage function is phagocytosis. M1 MDM activated in the presence of anti-TNF agents displayed higher surface expression of phagocytic receptors (CD16, CD163, MerTK) and higher levels of phagocytosis. Clearance of apoptotic bodies, notably involving MerTK, is a critical point for homeostasis and resolution of inflammation. M(IL10) polarization potentiates clearance of apoptotic bodies through MerTK (26). Our data emphasize that anti-TNF agents orientate inflammatory macrophages towards a pro-resolving phenotype.

In addition to the increase in phagocytosis by anti-TNF agents, we observed an increase in MerTK surface expression, and in *gas6* mRNA. MerTK is, like other TAM receptors, involved in negative regulation of TLR-mediated inflammation by antigen presenting (28). MerTK expression is linked to M2(IL-10) alternative polarization. GAS6, a TAM receptor ligand, has been shown to inhibit TNF, IL-6, and IL-1 secretion in human monocytes (50). Overexpression of TAM ligands is known to increase SOCS3 levels and contributes to dampen murine arthritis (29). Moreover, IL-10 favors efferocytosis *via* MerTK/Gas6, and Gas6 is known to be able to drive anti-inflammatory effects through IL-10 induction (26). Our results emphasize an upregulation of MerTK, *gas6*, and phagocytosis in the presence of anti-TNF agents, consistent with an upregulation of the negative feedback control of inflammation by TNF blockade involving MerTK and its counterparts.

IL-10 is known to signal through Jak1/STAT3 pathway. We have shown that modulation of macrophages' polarization by anti-TNF agents was IL-10/STAT3 dependent. The implication

of the IL-10/STAT3 axis may be related to the increase in IL-10 (mRNA and protein) at early time-points.

In conclusion, we showed that anti-TNF agents not only inhibit *in vitro* inflammatory functions of macrophages, but also favor pro-resolving features of macrophages specifically involving the IL-10/STAT3 axis. Such a shift in macrophage polarization in inflammatory context is expected to contribute to the clinical benefit of anti-TNF agents in RA.


## ACKNOWLEDGMENTS

Flow cytometry experiments were performed in the CPTP-INSERM U1043 core facility connected to 'Toulouse Réseau Imagerie' network. We thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche, and Anne-Laure Iscache for technical assistance.

## FUNDINGS

YD received a fellowship from la Société Française de Rhumatologie.

AC and JLD received a Passerelle Grant from Pfizer France.


## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published.
Study conception and design: YD, AC, JLD.
Acquisition of data: YD, BR, MB, ARW, AC.
Analysis and interpretation of data: YD, BR, MB, JFB, ARW, AC, JLD.

## REFERENCES

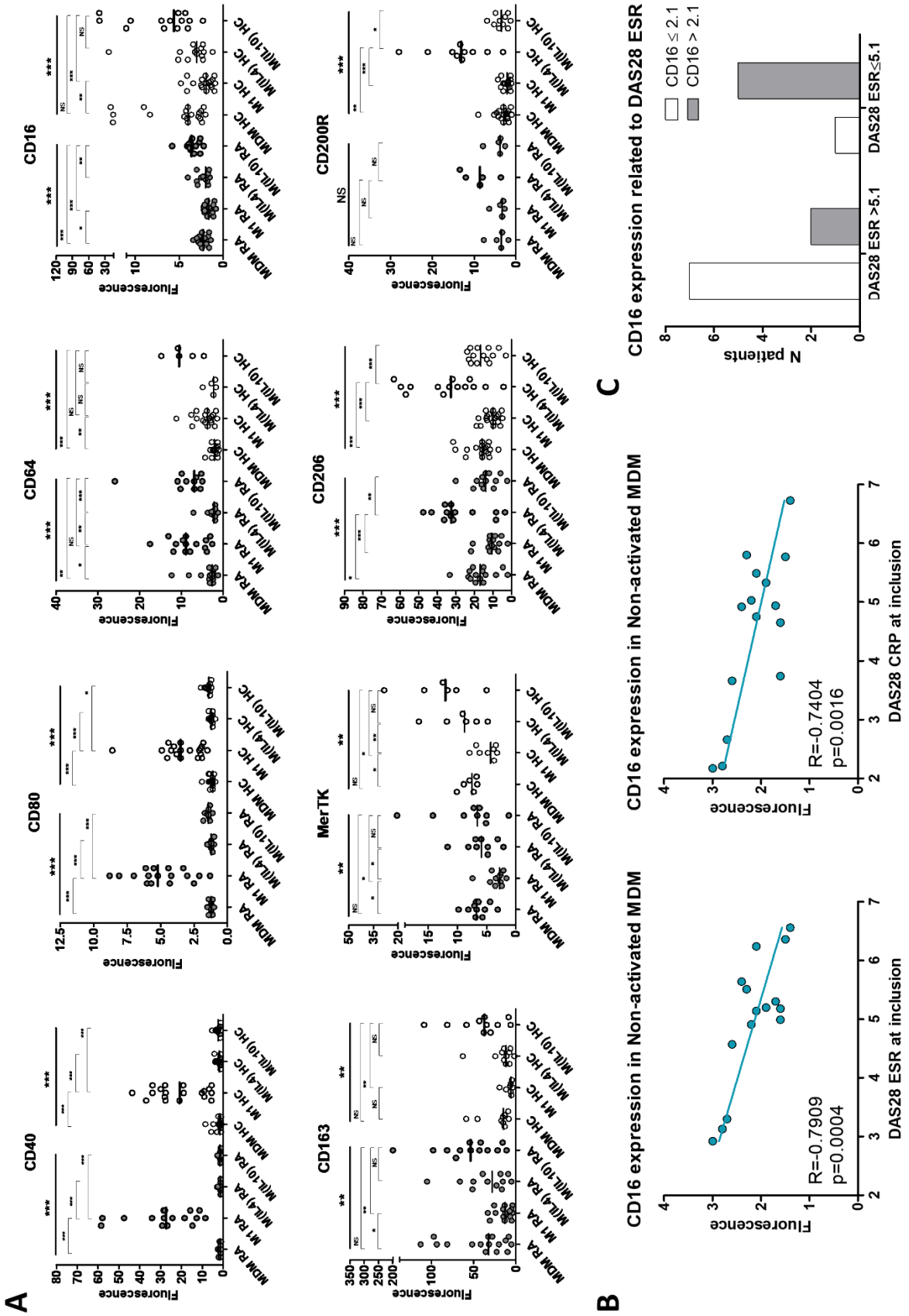

1. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* (2010) 32(5):593-604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
2. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* (2014) 6:13. Epub 2014/03/29. doi: 10.12703/P6-13.
3. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* (2014) 40(2):274-88. Epub 2014/02/18. doi: org/10.1016/j.immuni.2014.01.006.
4. Ambarus CA, Noordenbos T, de Hair MJ, Tak PP, Baeten DL. Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res Ther* (2012) 14(2):R74. Epub 2012/04/13. doi: 10.1186/ar3796.
5. Balsa A, Dixey J, Sansom DM, Maddison PJ, Hall ND. Differential expression of the costimulatory molecules B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in rheumatoid synovial tissue. *Br J Rheumatol* (1996) 35(1):33-7. Epub 1996/01/01.
6. Soler Palacios B, Estrada-Capetillo L, Izquierdo E, Criado G, Nieto C, Municio C, et al. Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile. *J Pathol* (2015) 235(3):515-26. doi: 10.1002/path.4466.
7. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (1991) 34(9):1125-32.
8. Szekanecz Z, Koch AE. Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* (2016) 12(1):5-13. doi: 10.1038/nrrheum.2015.157.
9. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis* (2015) 18(4):433-48. doi: 10.1007/s10456-015-9477-2.
10. Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Kadiombo AT, Sakairi T, et al. Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* (2012) 51(9):1571-9. doi: 10.1093/rheumatology/kes093.
11. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* (1987) 329(6140):630-2. doi: 10.1038/329630a0.
12. Maruotti N, Annese T, Cantatore FP, Ribatti D. Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases. *Vasc Cell* (2013) 5(1):11. doi: 10.1186/2045-824X-5-11.
13. Miesel R, Murphy MP, Kroger H. Enhanced mitochondrial radical production in patients which rheumatoid arthritis correlates with elevated levels of tumor necrosis factor alpha in plasma. *Free Radic Res* (1996) 25(2):161-9.
14. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* (2007) 9(1):202. Epub 2007/02/20. doi: 10.1186/ar2107.
15. Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* (2015) 6:571. Epub 2015/12/05. doi: 10.3389/fimmu.2015.00571.
16. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* (2010) 233(1):233-55. Epub 2010/03/03. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x.
17. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* (2007) 7(4):292-304. doi: 10.1038/nri2062.
18. Arnoux F, Mariot C, Peen E, Lambert NC, Balandraud N, Roudier J, et al. Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114(47):E10169-E77. doi: 10.1073/pnas.1713112114.
19. Vossenaar ER. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases* (2004) 63(4):373-81. doi: 10.1136/ard.2003.012211.
20. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, Baeten D, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum*

*Dis* (2005) 64(6):834-8. Epub 2004/12/04. doi: 10.1136/ard.2004.029751.
21. Boyer JF, Baron M, Constantin A, Degboe Y, Cantagrel A, Davignon JL. Anti-TNF certolizumab pegol induces antioxidant response in human monocytes via reverse signaling. *Arthritis Res Ther* (2016) 18:56. Epub 2015/01/01. doi: 10.1186/s13075-016-0955-8.
22. Catrina AI, Trollmo C, af Klint E, Engstrom M, Lampa J, Hermansson Y, et al. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum* (2005) 52(1):61-72. Epub 2005/01/11. doi: 10.1002/art.20764.
23. Smeets TJ, Kraan MC, van Loon ME, Tak PP. Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue. *Arthritis Rheum* (2003) 48(8):2155-62. Epub 2003/08/09. doi: 10.1002/art.11098.
24. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* (2014) 41(1):14-20. Epub 2014/07/19. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
25. Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* (2003) 170(6):3263-72. Epub 2003/03/11.
26. Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* (2012) 189(7):3508-20. Epub 2012/09/04. doi: 10.4049/jimmunol.1200662.
27. McCormick SM, Heller NM. Regulation of Macrophage, Dendritic Cell, and Microglial Phenotype and Function by the SOCS Proteins. *Front Immunol* (2015) 6:549. Epub 2015/11/19. doi: 10.3389/fimmu.2015.00549.
28. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* (2001) 293(5528):306-11. Epub 2001/07/14. doi: 10.1126/science.1061663.
29. van den Brand BT, Abdollahi-Roodsaz S, Vermeij EA, Bennink MB, Arntz OJ, Rothlin CV, et al. Therapeutic efficacy of Tyro3, Axl, and Mer tyrosine kinase agonists in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* (2013) 65(3):671-80. Epub 2012/12/04. doi: 10.1002/art.37786.
30. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* (2003) 4(6):551-6. Epub 2003/05/20. doi: 10.1038/ni938.
31. Aeberli D, Kamgang R, Balani D, Hofstetter W, Villiger PM, Seitz M. Regulation of peripheral classical and non-classical monocytes on infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *RMD Open* (2016) 2(1):e000079. Epub 2016/01/29. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000079.
32. Huang QQ, Birkett R, Doyle R, Shi B, Roberts EL, Mao Q, et al. The Role of Macrophages in the Response to TNF Inhibition in Experimental Arthritis. *J Immunol* (2018) 200(1):130-8. Epub 2017/11/19. doi: 10.4049/jimmunol.1700229.
33. Vos AC, Wildenberg ME, Arijs I, Duijvestein M, Verhaar AP, de Hertogh G, et al. Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro. *Inflamm Bowel Dis* (2012) 18(3):401-8. Epub 2011/09/22. doi: 10.1002/ibd.21818.
34. Munn DH, Beall AC, Song D, Wrenn RW, Throckmorton DC. Activation-induced apoptosis in human macrophages: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J Exp Med* (1995) 181(1):127-36.
35. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood* (2000) 95(12):3823-31.
36. Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, et al. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis* (2007) 13(11):1323-32. Epub 2007/07/20. doi: 10.1002/ibd.20225.
37. Herenius MM, Thurlings RM, Wijbrandts CA, Bennink RJ, Dohmen SE, Voermans C, et al. Monocyte migration to the

synovium in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab. *Ann Rheum Dis* (2011) 70(6):1160-2. doi: 10.1136/ard.2010.141549.
38. Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* (1999) 94(3):837-44.
39. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol* (2012) 188(11):5752-65. doi: 10.4049/jimmunol.1103426.
40. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol* (2000) 68(1):144-50.
41. Clavel C, Ceccato L, Anquetil F, Serre G, Sebbag M. Among human macrophages polarised to different phenotypes, the M-CSF-oriented cells present the highest pro-inflammatory response to the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing ACPA. *Ann Rheum Dis* (2016) 75(12):2184-91. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208887.
42. Garcia S, Hartkamp LM, Malvar-Fernandez B, van Es IE, Lin H, Wong J, et al. Colony-stimulating factor (CSF) 1 receptor blockade reduces inflammation in human and murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* (2016) 18:75. doi: 10.1186/s13075-016-0973-6.
43. Hayder M, Poupot M, Baron M, Nigon D, Turrin CO, Caminade AM, et al. A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. *Sci Transl Med* (2011) 3(81):81ra35. doi: 10.1126/scitranslmed.3002212.
44. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TR, Reedquist KA, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* (2012) 375(1-2):196-206. Epub 2011/11/15. doi: 10.1016/j.jim.2011.10.013.
45. Mills EL, Ryan DG, Prag HA, Dikovskaya D, Menon D, Zaslona Z, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature* (2018) 556(7699):113-7. doi: 10.1038/nature25986.
46. Dijkgraaf EM, Heusinkveld M, Tummers B, Vogelpoel LT, Goedemans R, Jha V, et al. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res* (2013) 73(8):2480-92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3542.
47. Matsuoka Y, Nakayama H, Yoshida R, Hirosue A, Nagata M, Tanaka T, et al. IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* (2016) 115(10):1234-44. doi: 10.1038/bjc.2016.327.
48. Noack M, Ndongo-Thiam N, Miossec P. Evaluation of Anti-inflammatory Effects of Steroids and Arthritis-Related Biotherapies in an In Vitro Coculture Model with Immune Cells and Synoviocytes. *Front Immunol* (2016) 7:509. doi: 10.3389/fimmu.2016.00509.
49. Roberts CA, Durham LE, Fleskens V, Evans HG, Taams LS. TNF Blockade Maintains an IL-10(+) Phenotype in Human Effector CD4(+) and CD8(+) T Cells. *Front Immunol* (2017) 8:157. Epub 2017/03/07. doi: 10.3389/fimmu.2017.00157.
50. Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L, Avanzi GC. TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol* (2010) 87(5):869-75. Epub 2010/01/28. doi: 10.1189/jlb.0909610.

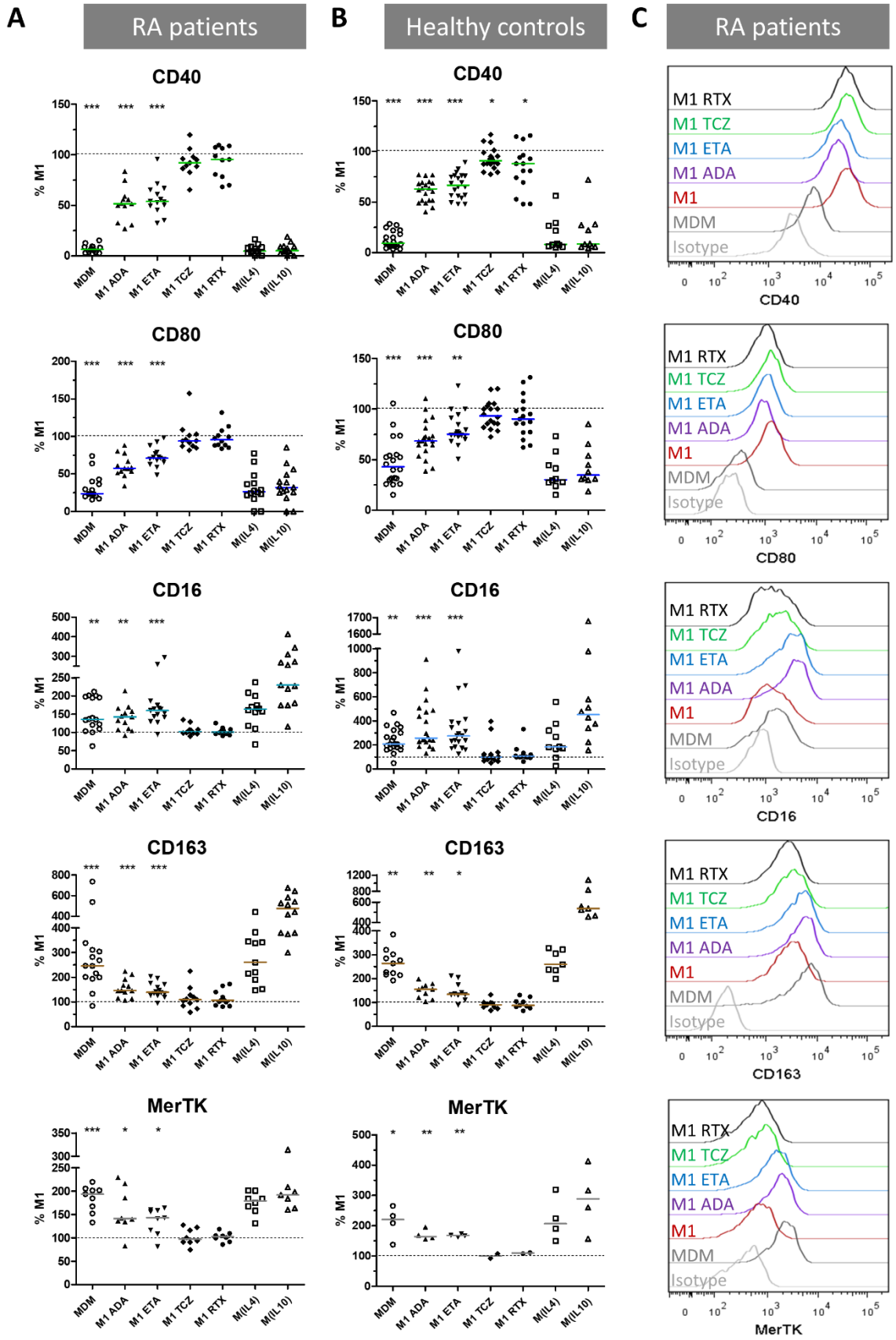
## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. Surface polarization markers on macrophages



*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. M2(IL4): alternative macrophages activated by IL-4. M2(IL10) alternative macrophages activated by IL-10. RA: rheumatoid arthritis. HC: healthy controls. DAS28: disease activity score 28. ESR: Erythrocyte sedimentation rate. CRP: C reactive protein. NS: non-significant.* ***(A)*** *Surface markers on macrophages from up to 16 RA patients (grey circles) and 20 healthy controls (open circles) were analyzed by flow cytometry, after differentiation (MDM) and subsequent 24h activation as M1, or M2(IL4), or M2(IL10).* ***(B)*** *Correlation (Pearson) between CD16 membrane expression in MDM and RA activity assessed by the DAS28 ESR and DAS28 CRP scores.* ***(C)*** *CD16 membrane expression in MDM from patients with active RA, according to disease activity (DAS28 ESR). ***: p value <0.001, **: 0.001≤p< 0.01, *: 0.01≤p< 0.05 (One-way ANOVA and Bonferroni's post-test, or Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test).*

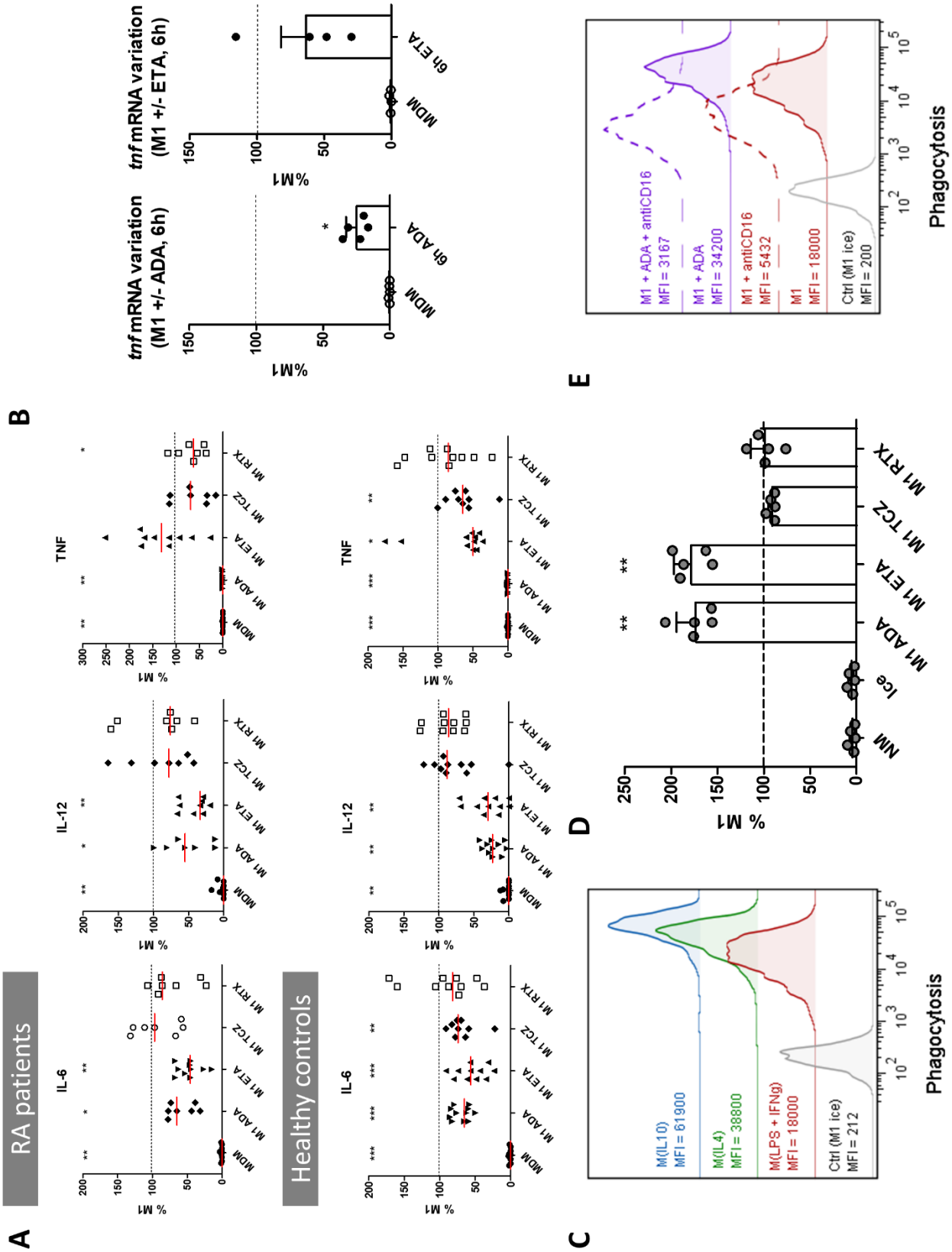
**Figure 2. Anti-TNF agents favor alternative polarization of macrophages**




*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. M2(IL4): alternative macrophages activated by IL-4. M2(IL10): alternative*

*macrophages activated by IL-10. ADA: adalimumab. ETA: etanercept. TCZ: tocilizumab. RTX: rituximab. RA: rheumatoid arthritis.* ***(A-C)*** *Monocyte-derived macrophages were activated for 24h as M1, M2(IL4), and M2(IL10) with or without the indicated bDMARD. Surface polarization markers on macrophages from up to 16 RA patients* ***(A, C)*** *and 21 healthy controls* ***(B)*** *were analyzed by flow cytometry. Results are standardized to the level of surface markers expressed in M1 untreated condition. Non-activated MDM and M1 MDM activated in the presence of the indicated bDMARD were compared to M1 MDM. ***: p value <0.001, **: 0.001≤p< 0.01, *: 0.01≤p< 0.05 (Student paired t-test or Wilcoxon matched pairs test).*

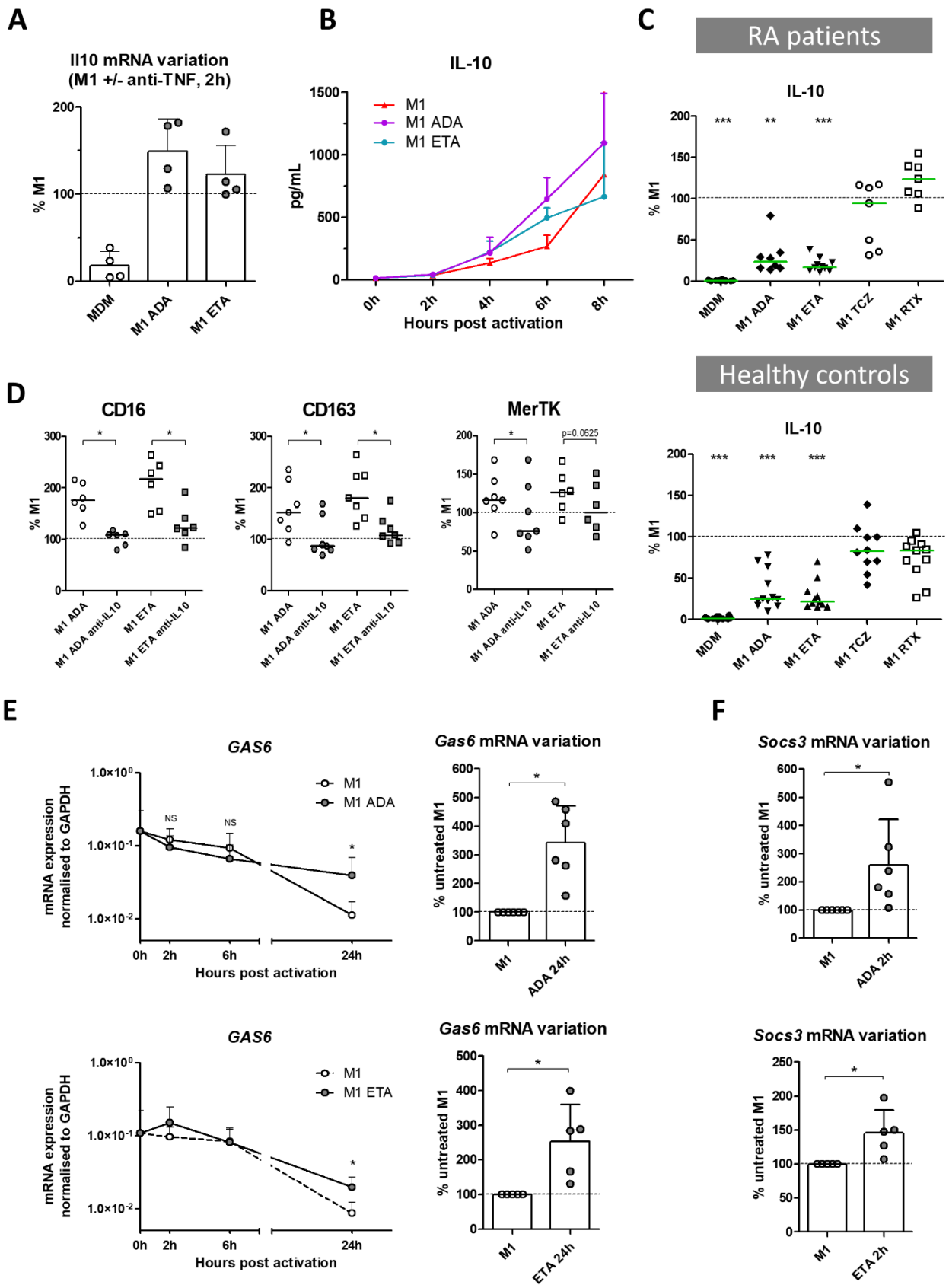
**Figure 3. Anti-TNF agents modulate macrophages functions by inhibiting pro-inflammatory cytokine production and enhancing phagocytosis**




*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. M2(IL4): alternative macrophages activated by IL-4. M2(IL10): alternative*

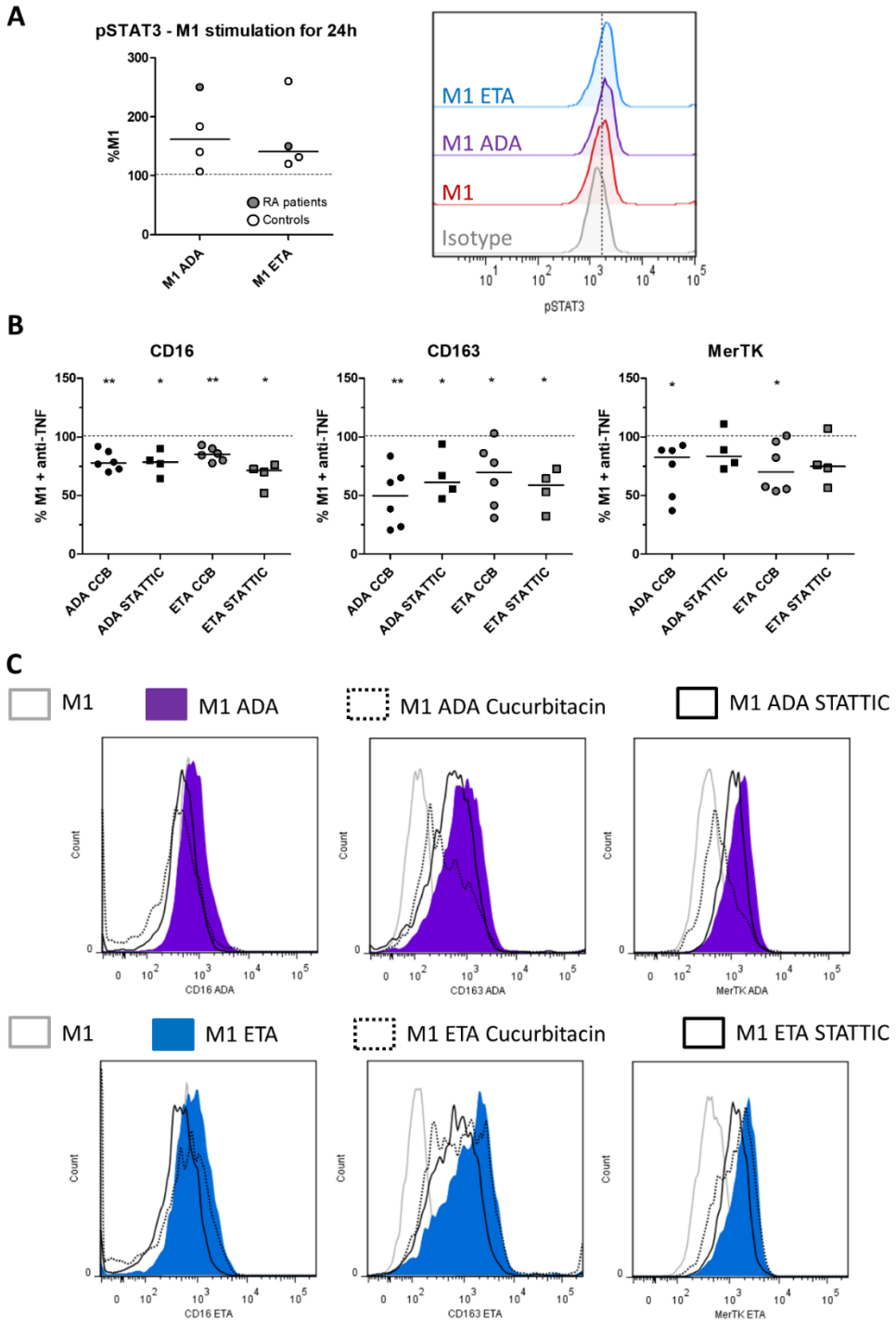
*macrophages activated by IL-10. RA: rheumatoid arthritis. ADA: adalimumab. ETA: etanercept. TCZ: tocilizumab. RTX: rituximab. RA: rheumatoid arthritis. Monocytes derived macrophages were activated for 24h as M1, M2(IL4), and M2(IL10) with or without the indicated bDMARD.* ***(A)*** *Cytokines production was measured in cell culture supernatant after 1 day of activation by cytometric bead array. Results are standardized to cytokine level in M1 untreated condition.* ***(B)*** *Tnf mRNA was analyzed in non-activated MDM (Baseline) and in M1 inflammatory macrophages activated 6h with or without anti-TNF agents. Results are normalized to mRNA level in M1 macrophages (up to 5 healthy controls).* ***(C-E)*** *Phagocytosis of green-labelled E.coli particles was assessed by flow cytometry. All experiments were performed in duplicate. Macrophages incubated on ice were used as negative control.* ***(C)*** *Phagocytosis was assessed in 24h activated M1, M2(IL4) and M2(IL10). Data representative for 3 healthy controls.* ***(D)*** *The effect of bDMARD on phagocytosis by M1 macrophages was assessed by flow cytometry (5 healthy controls).* ***(E)*** *The impact of CD16 blockade on phagocytosis was assessed by flow cytometry. MDM were activated as M1 macrophages for 24h in the presence or not of ADA and an anti-CD16 blocking antibody (10 µg/ml). Data representative for 4 healthy controls. Non-activated MDM and M1 MDM activated in the presence of bDMARDs were compared to untreated M1 MDM. ***: p value <0.001, **: 0.001≤p< 0.01, *: 0.01≤p< 0.05 (Student paired t-test or Wilcoxon matched pairs test).*

**Figure 4. The impact of anti-TNF agents on macrophage polarization involves IL10 negative feedback control of inflammation**



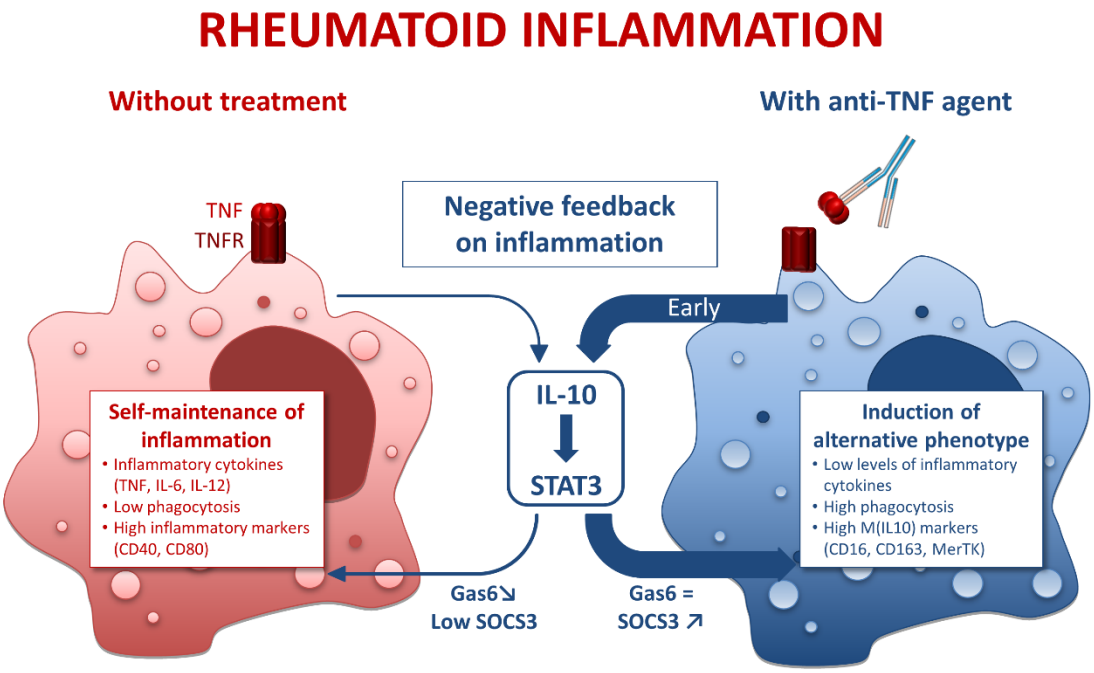
*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. ADA: adalimumab. ETA: etanercept. Anti-IL10: anti-IL-10 neutralizing antibody.* ***(A)*** *Il10 mRNA were analyzed in non-activated MDM and in M1 inflammatory macrophages activated or not in the presence of anti-TNF agents. Results are normalized to mRNA level in M1 macrophages (4 healthy donors).* ***(B)*** *Early IL-10 secretion was measured in cell culture supernatants of treated and untreated M1 macrophages by cytometric bead array (3 healthy donors).* ***(C)*** *IL-10 secretion was measured in cell culture supernatants, after 1 day of M1 activation in the presence of the indicated bDMARD, by cytometric bead array (10 RA patients and 11 healthy donors). Results are standardized to IL-10 level in M1 condition.* ***(D)*** *M1 macrophages were cultivated 24h in the presence or not of the indicated anti-TNF and neutralizing anti-IL10 monoclonal antibody (10 µg/mL). The impact on M2 polarization markers modulated by anti-TNF agents was assessed by flow cytometry.* ***(E)*** *Expression of gas6 mRNA over time, normalized to gapdh expression, and its variation at 24h time point, in M1 macrophages activated or not in the presence of anti-TNF agents (up to 6 healthy controls).* ***(F)*** *Variation of socs3 mRNA at 2h time point, in M1 macrophages activated or not in the presence of anti-TNF agents (up to 6 healthy controls). Basal MDM and M1 MDM cultivated in the presence of bDMARDs were compared to M1 MDM. *: $0.01 \leq p < 0.05$ (Student paired t-test or Wilcoxon matched pairs test).*

**Figure 5. Anti-TNF agent-driven polarization involves STAT3**




*M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. ADA: adalimumab. ETA: etanercept. pSTAT3: phospho(Tyr705)-STAT3. RA: rheumatoid arthritis.* ***(A)*** *Intracellular staining of pSTAT3 was performed after 24h of M1 activation with or without anti-TNF agent and analyzed by flow cytometry.* ***(B-C)*** *STAT3 inhibitors (Cucurbitacin (circles), CCB 50 nM, STATTIC (squares) 1 µM) were added to the culture medium during the 24h M1 activation in the presence of the indicated anti-TNF. The subsequent modulation M2 polarization markers induced by anti-TNF agents were assessed by flow cytometry. Non-activated MDM and M1 MDM cultivated in the presence of bDMARDs were compared to M1 MDM. **: 0.001≤p< 0.01, *: 0.01≤p< 0.05 (Student paired t-test or Wilcoxon matched pairs test).*

**Figure 6. Mode of action of anti-TNF agents in rheumatoid macrophages**




*IL-10: interleukin 10. STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3. Inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis (RA) induce macrophages with a pro-inflammatory phenotype. This phenomenon is counterbalanced by a negative feedback implicating IL-10. However, in RA the negative feedback on inflammation is overcame, thus leading to a self-maintained inflammation. In the presence of anti-TNF agents, we observed an early and strong negative feedback on inflammation through an IL-10/STAT3 axis resulting in a M(IL10) alternative polarization of macrophages.*

## TABLES

***Table 1. Characteristics of patients with rheumatoid arthritis at bDMARD initiation***

*bDMARD: biological disease-modifying anti-rheumatic drugs. csDMARDs: conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs. CCP: cyclic citrullinated peptides. CRP: C reactive protein. DAS28ESR: disease activity score 28 ESR. ESR: erythrocyte sedimentation rate. IQR: interquartile range. MTX: methotrexate. RA: rheumatoid arthritis. RF: rheumatoid factor. SD: standard deviation.*

| | **RA population (N=20)** |
|---|---|
| **Demographic data** | |
| **Age (year), mean (SD)** | 63.4 (13.2) |
| **Women (%)** | 12 (60) |
| **Disease duration (year), mean (SD)** | 11.3 (9.7) |
| **Clinical data** | |
| **DAS28 ESR, mean (SD)** | 4.63 (1.32) |
| **Erosive RA (%)** | 14 (73.7) |
| **Steroid use (%)** | 6 (30.0) |
| **Daily steroid dose (mg prednisone/day), median (IQR)** | 7.5 (5.0 – 10.0) |
| **csDMARDs, MTX (%)** | 9 (45.0) |
| **Biological data** | |
| **ESR (mm/h), median (IQR)** | 16.0 (12.0 – 25.0) |
| **CRP (mg/L), median (IQR)** | 6.7 (1.8 – 15.5) |
| **RF+ (%)** | 18 (94.7) |
| **Anti-CCP+ (%)** | 18 (94.7) |
| **Leucocytes/mm$^3$, mean (SD)** | 8252 (3058) |
| **Monocytes/mm$^3$, mean (SD)** | 578 (315) |

**ONLINE SUPPLEMENTAL FILE**

# Polarization of Rheumatoid Macrophages by TNF Targeting through an IL-10/STAT3 Mechanism.

Yannick Degboé, Benjamin Rauwel, Michel Baron, Jean-Frédéric Boyer, Adeline Ruyssen-Witrand, Arnaud Constantin, Jean-Luc Davignon.

**Page 2. Supplemental Figure S1.** Anti-TNF agents favor alternative polarization of macrophages

**Page 4. Supplemental Figure S2.** Effect of bDMARDs on surface markers on inflammatory macrophages.

**Page 5. Supplemental Figure S3.** Impact of treatment regimen at inclusion, on the *in vitro* modulation of polarization markers by bDMARDs.

**Page 7. Supplemental Figure S4.** The modulation of macrophage polarization markers by anti-TNF agents is Fc-independent.

**Page 8. Supplemental Table S1.** Anti-TNF agents decrease macrophage inflammatory cytokines associated with inflammatory activation.

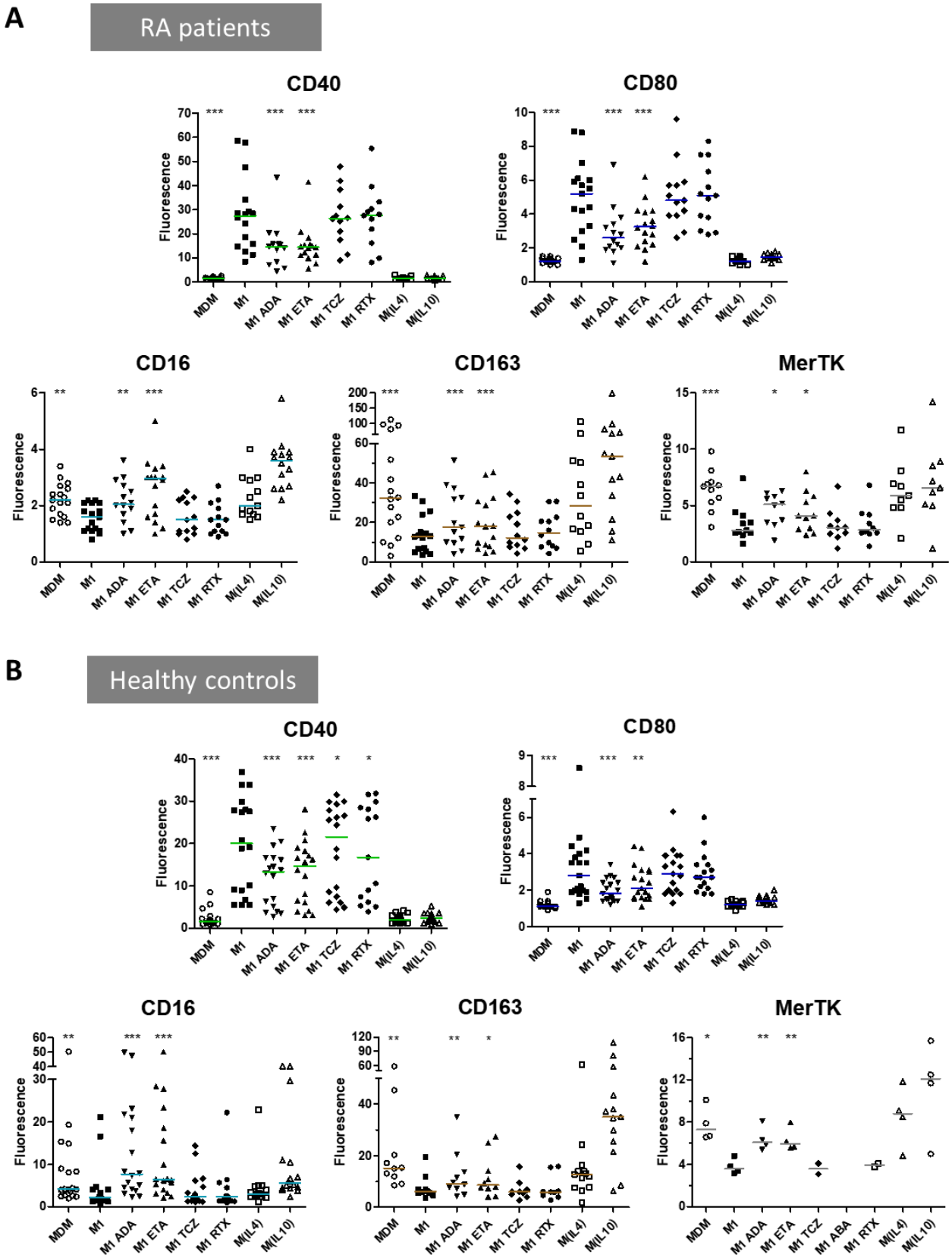
**Page 9. Supplemental Figure S5.** Effect of anti-TNF agents on TNF detection and secretion.

**Page 10. Supplemental Figure S6.** Etanercept modulates macrophage function by inhibiting TNF production.

**Page 11. Supplemental Figure S7.** The impact of anti-TNF agents on macrophage polarization involves IL-10.

**RESULTS**

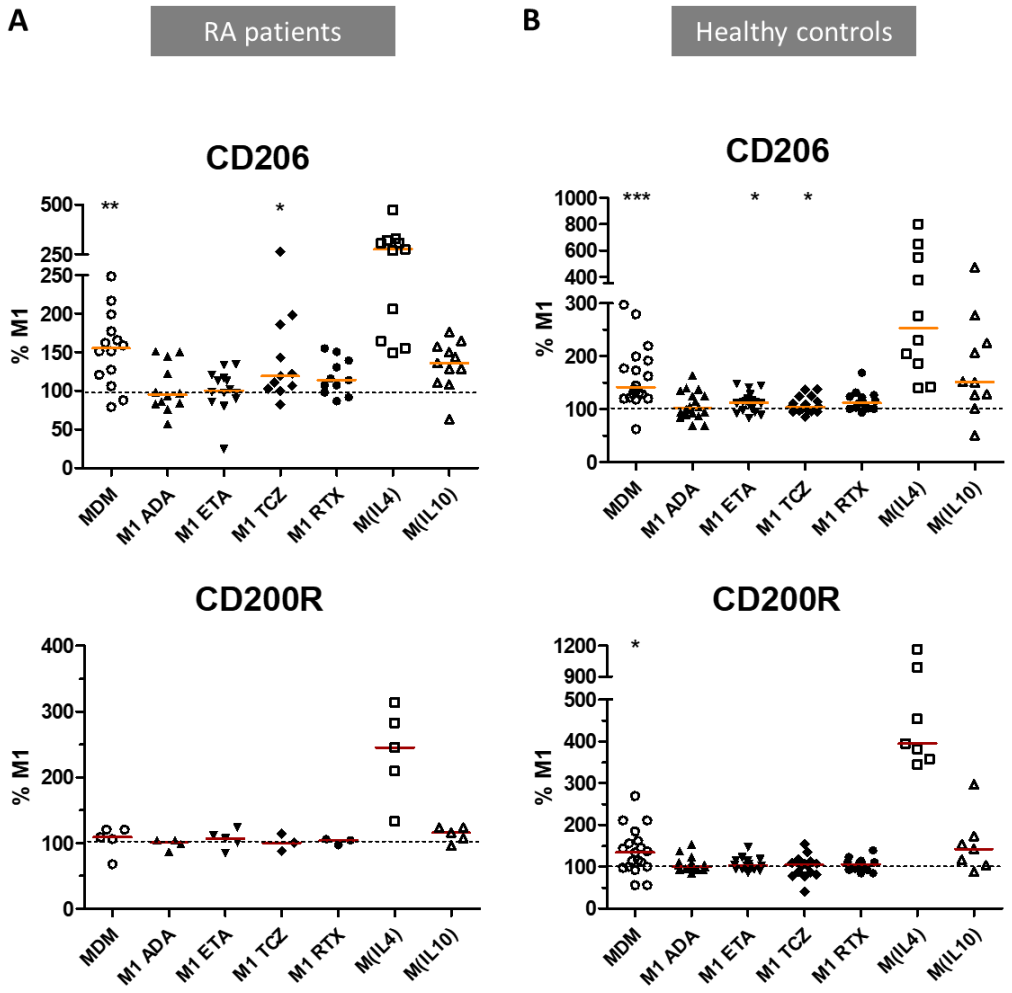
**Supplemental Figure S1.** Anti-TNF agents favor alternative polarization of macrophages



*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. M2(IL4): alternative macrophages activated by IL-4. M2(IL10): alternative macrophages activated by IL-10. ADA: adalimumab. ETA: etanercept TCZ: tocilizumab. RTX: rituximab. RA: rheumatoid arthritis.*

***(A, B)*** *Monocyte-derived macrophages were activated for 24h (as M1, M2(IL4) and M2(IL10) with or without the indicated bDMARD. Surface polarization markers on macrophages from up to 16 RA patients* ***(A)*** *and 20 healthy controls* ***(B)*** *were analyzed by flow cytometry. Non-activated MDM and M1 MDM activated in the presence of bDMARDs were compared to M1 MDM. ***: p value <0.001, **: 0.001≤p< 0.01, *: 0.01≤p< 0.05 (Student paired t-test or Wilcoxon matched pairs test).*

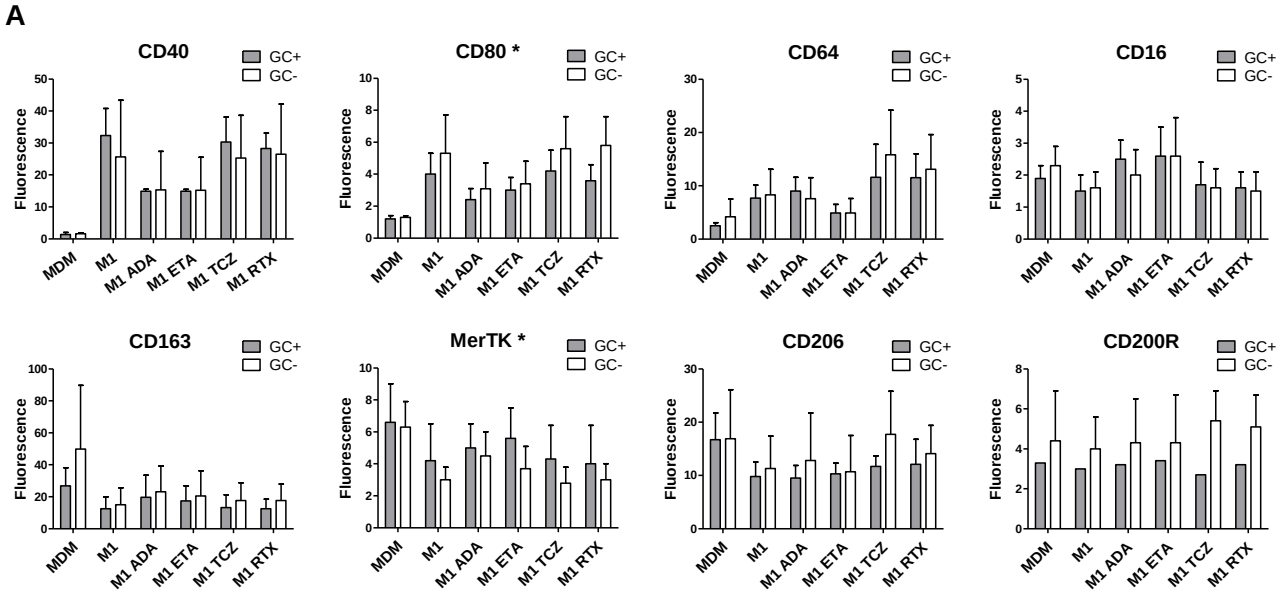
**Supplemental Figure S2.** Effect of bDMARDs on surface markers on inflammatory macrophages.



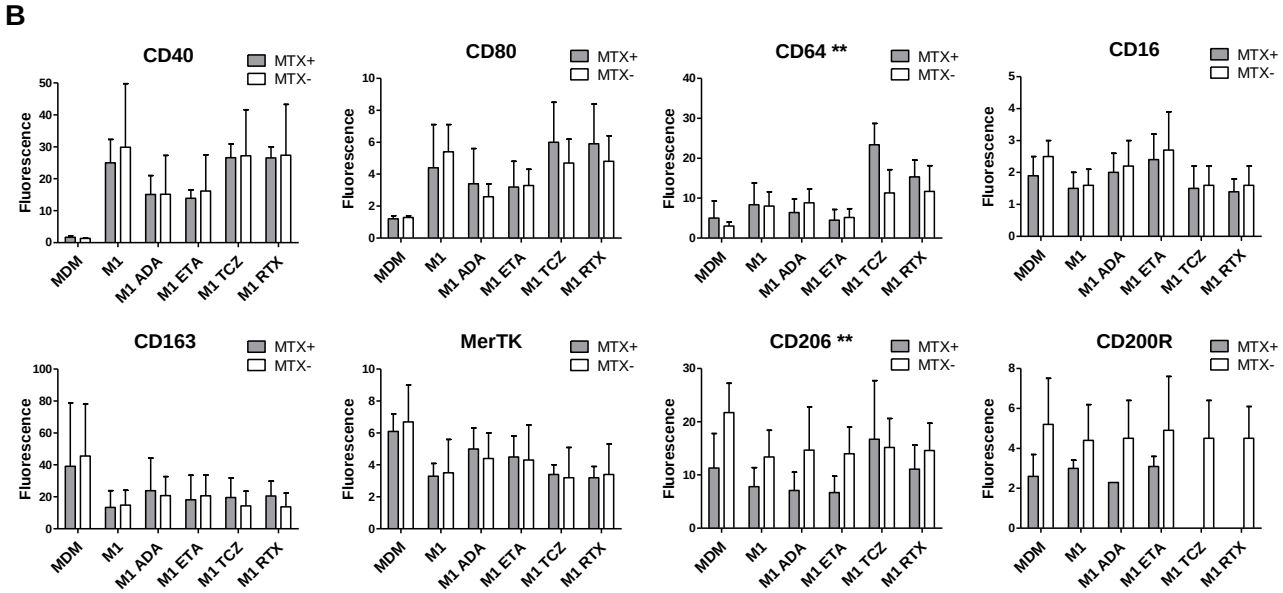

*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. M2(IL4): alternative macrophages activated by IL-4. M2(IL10): alternative macrophages activated by IL-10. ADA: adalimumab. ETA: etanercept. TCZ: tocilizumab. RTX: rituximab. RA: rheumatoid arthritis.*

***(A, B)*** *Monocyte-derived macrophages were activated for 24h (as M1, M2(IL4) and M2(IL10) with or without the indicated bDMARD. Surface polarization markers on macrophages from up to 16 RA patients* ***(A)*** *and 20 healthy controls* ***(B)*** *were analyzed by flow cytometry. Non-activated MDM and M1 MDM activated in the presence of bDMARDs were compared to M1 MDM. ***: p value <0.001, **: 0.001≤p< 0.01, *: 0.01≤p< 0.05 (Student paired t-test or Wilcoxon matched pairs test).*

**Supplemental Figure S3.** Impact of treatment regimen at inclusion on the *in vitro* modulation of polarization markers by bDMARDs.

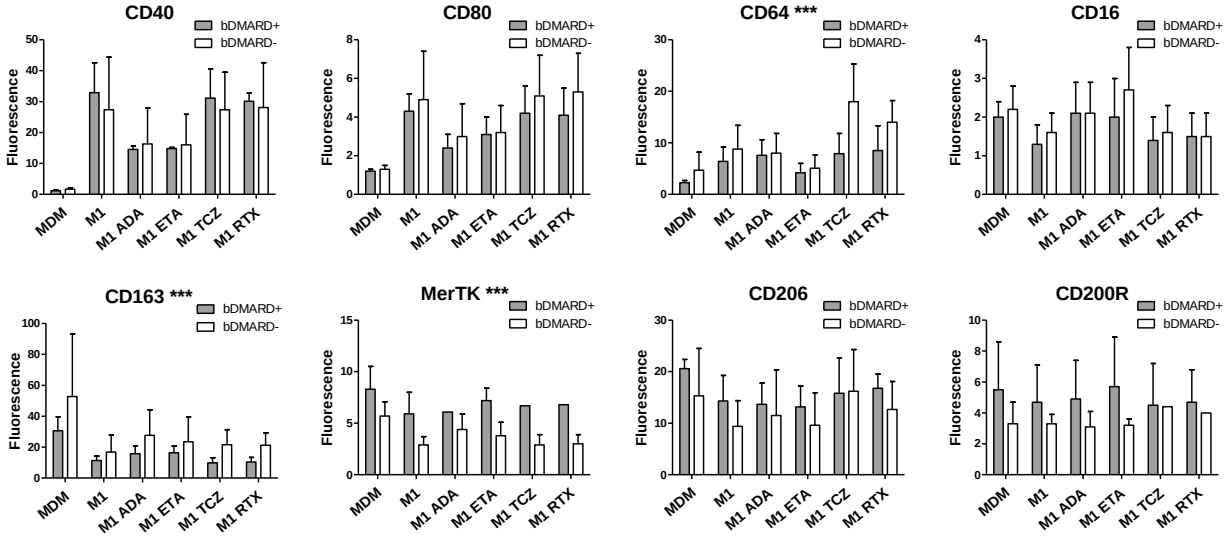



*: GC use accounts for: (i) 5.7% of the total variance of CD80 expression (p=0.0053), (ii) 7.6% of the total variance of MerTK expression (p=0.0146)




**: MTX use accounts for: (i) 16.0% of the total variance of CD206 expression (p<0.0001), (ii) 3.4% of the total variance of CD64 expression (p=0.0168)

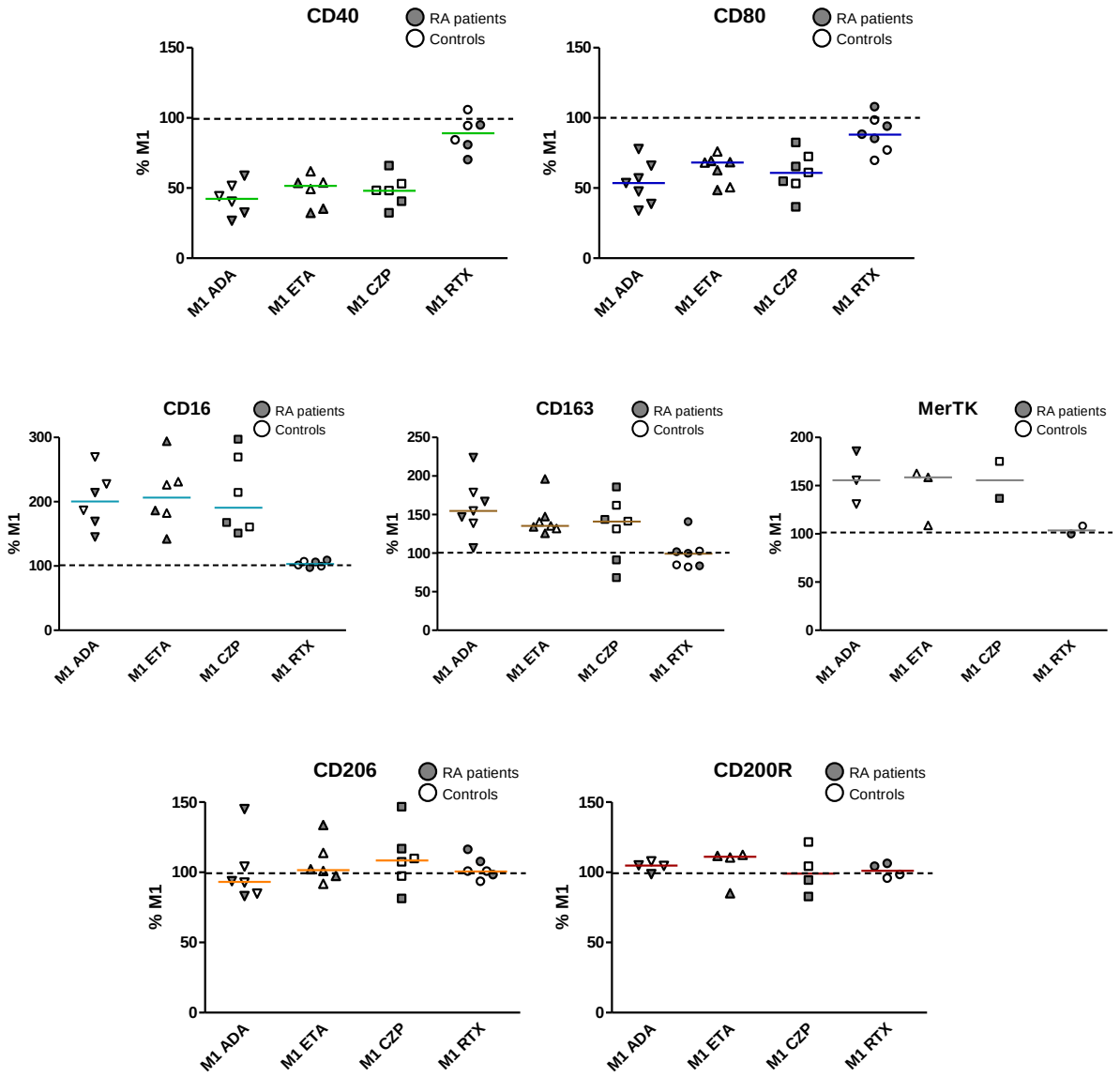
**C**




***: bDMARD use accounts for: (i) 6.7% of the total variance of CD163 expression (p=0.0225), (ii) 41.0% of the total variance of MerTK expression (p<0.0001), (iii) 9.9% of the total variance of CD64 (p=0.0015)

*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. GC: steroids use. MTX: methotrexate use. bDMARD: biologics use. ADA: adalimumab. ETA: etanercept. TCZ: tocilizumab. RTX: rituximab. RA: rheumatoid arthritis. Representation of membrane expression of polarization markers according background treatment regimen i.e. GC* ***(A)****, MTX* ***(B)****, and bDMARD* ***(C)****.The influence was assessed by a two-way ANOVA test.*

**Supplemental Figure S4.** The modulation of macrophage polarization markers by anti-TNF agents is Fc-independent.




*ADA: adalimumab. ETA: etanercept. CZP: certolizumab. RTX: rituximab. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. Macrophages from RA patients (grey symbols) and healthy controls (open symbols) were obtained after 5 days of differentiation with M-CSF and then activated for 24h as M1 (LPS + IFNγ) with or without the indicated bDMARD. Surface markers were assessed by flow cytometry.*

**Supplemental Table S1.** Anti-TNF agents decrease macrophage inflammatory cytokines associated with inflammatory activation.

**A** **RA patients**

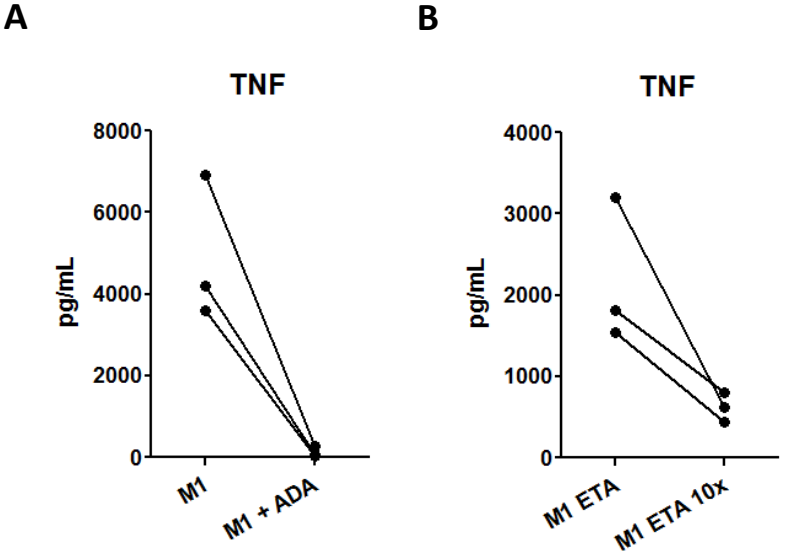
| Median (IQR) pg/mL | IL6 | IL12 | TNF |
|---|---|---|---|
| **Non activated MDM** | 17.4 (8.9 – 86.4) | 0.0 (0.0 – 1.6) | 3.4 (0.0 – 16.1) |
| **M1** | **6904.0 (2955.0 – 11337.0)** | **26.3 (9.6 – 138.9)** | **3936.0 (1715.0 – 8700.0)** |
| **M1 ADA** | 3702.0 (2122.0 – 4334.0) | 17.0 (6.1 – 30.8) | 19.9 (13.8 – 33.7) |
| **M1 ETA** | 2238.0 (1354.0 – 6168.0) | 9.9 (6.2 – 43.5) | 4668.0 (3219.0 – 8406.0) |
| **M1 TCZ** | 6309.0 (3620.0 – 8265.0) | 34.6 (15.6 – 94.6) | 4402.0 (2756.0 – 6023.0) |
| **M1 RTX** | 3592.0 (2515.0 – 7315.0) | 41.2 (14.3 – 91.9) | 4840.0 (2199.0 – 6818.0) |

**B** **Healthy controls**

| Median (IQR) pg/mL | IL6 | IL12 | TNF |
|---|---|---|---|
| **Non activated MDM** | 5.1 (1.9 – 22.2) | 0.0 (0.0 – 0.7) | 0.0 (0.0 – 9.1) |
| **M1** | **2214.0 (946.4 – 3265.0)** | **14.1 (9.1 – 28.8)** | **1318.0 (898.7 – 4684.0)** |
| **M1 ADA** | 1317.0 (574.1 – 2140.0) | 3.4 (1.0 – 4.5) | 5.6 (1.1 – 12.8) |
| **M1 ETA** | 833.8 (542.2 – 2607.0) | 4.7 (2.4 – 6.4) | 1421.0 (516.9 – 2419.0) |
| **M1 TCZ** | 713.1 (620.9 – 2244.0) | 12.6 (8.7 – 19.4) | 976.7 (656.1 – 2396.0) |
| **M1 RTX** | 1048.0 (716.2 – 2416.0) | 12.2 (6.2 – 21.6) | 1099.0 (1019.0 – 3519.0) |

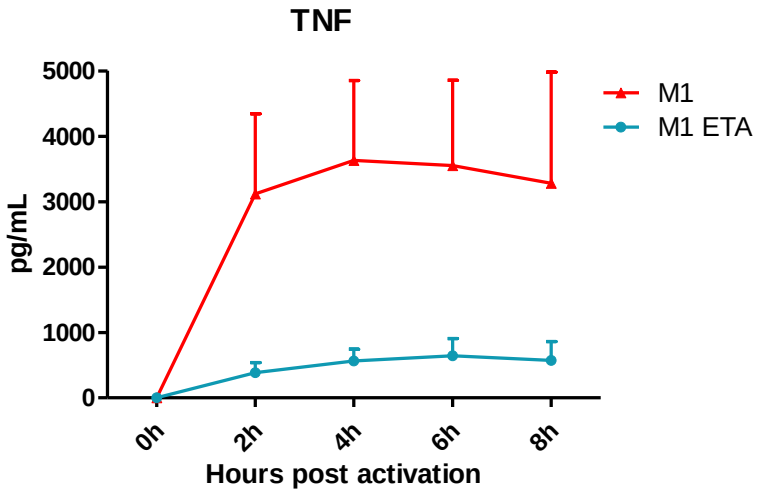
*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. M2(IL4): alternative macrophages activated by IL-4. M2(IL10): alternative macrophages activated by IL-10. RA: rheumatoid arthritis. ADA: adalimumab. ETA: etanercept. TCZ: tocilizumab. RTX: rituximab. RA: rheumatoid arthritis. Cytokine secretion was measured by cytometric bead array in cell culture supernatants, after 24h of activation of macrophages from RA patients* ***(A)*** *and healthy controls* ***(B)****.*

**Supplemental Figure S5.** Effect of anti-TNF agents on TNF detection and secretion.




***(A)*** *TNF detection by cytometric bead array in M1 macrophages supernatant was competed by ADA 100 µg/mL (3 healthy controls).* ***(B)*** *Influence of ETA on TNF secretion by inflammatory macrophages was assessed at 10 µg/mL and at a higher dose of ETA (100 µg/mL; 3 healthy controls).*

**Supplemental Figure S6.** Etanercept modulates macrophage function by inhibiting TNF production.



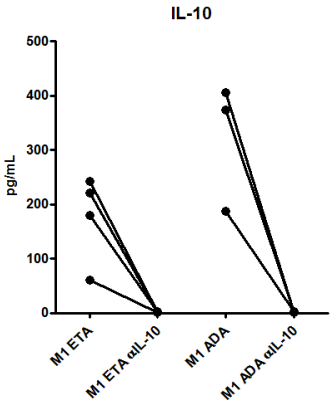

*Early TNF secretion was measured in cell culture supernatants of treated (etanercept) and untreated M1 macrophages by cytometric bead array (3 healthy controls).*

**Supplemental Figure S7.** The impact of anti-TNF agents on macrophage polarization involves IL-10.

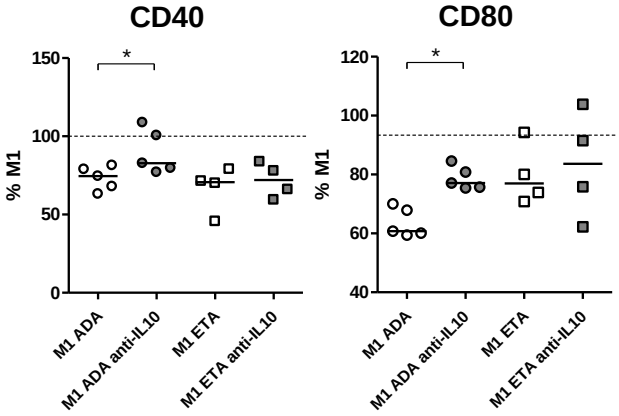
**A**

| IL-10 Median (IQR) pg/mL | Non activated MDM | M1 | M1 ADA | M1 ETA | M1 TCZ | M1 RTX |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RA patients | 12,1 (9.8 – 22.4) | **2741.0 (1322.0 – 4381.0)** | 719.3 (528.6 – 805.3) | 505.7 (354.2 – 633.7) | 1873.0 (1111.0 – 2541.0) | 4307.0 (1726.0 – 4868.0) |
| Healthy controls | 6.6 (5.7 – 10.6) | **986.7 (471.8 – 1195.0)** | 205.4 (141.3 – 242.1) | 190.7 (154.9 – 261.6) | 746.0 (673.0 – 1033.0) | 563.1 (348.0 – 850.1) |

**B**




**C**




*MDM: monocyte-derived macrophages. M1: pro-inflammatory macrophages activated by LPS + IFNγ. ETA: etanercept. ADA: adalimumab. TCZ: tocilizumab. RTX: rituximab.* ***(A)*** *IL-10 secretion was measured in cell culture supernatants, after 1 day of M1 activation in the presence of the indicated bDMARD, using cytometric bead array (10 RA patients and 11 healthy donors).* ***(B)*** *Quantification of IL-10 secretion after IL-10 neutralization (4 healthy donors).* ***(C)*** *Surface marker expression assessed by flow cytometry, in M1 MDM, treated or not with the indicated anti-TNF, in the presence or not of IL-10 neutralizing antibody. Results are standardized to M1 MDM treated by anti-TNF agent (RA patients and healthy donors). Non-activated MDM and M1 MDM cultivated in the presence of the indicated bDMARDs were compared to M1 MDM *: $0.01 \leq p < 0.05$ (Student paired t-test or Wilcoxon matched pairs test).*

Boyer *et al. Arthritis Research & Therapy* (2016) 18:56
DOI 10.1186/s13075-016-0955-8

Arthritis Research & Therapy

RESEARCH ARTICLE Open Access

# Anti-TNF certolizumab pegol induces antioxidant response in human monocytes via reverse signaling

Jean Frédéric Boyer[1,2,3], Michel Baron[1,2], Arnaud Constantin[1,2,3], Yannick Degboé[1,2,3], Alain Cantagrel[1,2,3] and Jean-Luc Davignon[1,2,3*]

**Abstract**

**Background:** Anti TNF drugs have been widely used in rheumatoid arthritis (RA) but only 70 to 80 % of patients respond to this therapy. Exploring the mode of action of anti-TNF drugs remains important in order to improve the efficiency of the treatment and enhance our knowledge of inflammation. TNF-α exists as classical soluble cytokine as well as transmembrane protein (tmTNF-α). Evidence suggests that tmTNF-α can induce reverse signaling. In the present study, we have explored consequences of reverse signaling in human monocytes using certolizumab pegol (CZP).

**Methods:** Monocytes were purified from healthy blood donors and were incubated with CZP. Nuclear translocation of Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) was evaluated by wide-field microscopy and cell fractionation. Heme oxygenase 1 (HO-1) was assessed by RT-qPCR and western blot. Monocytes were stimulated with lipopolysaccharide (LPS). IL-1β was quantitated by RT-qPCR. Reactive oxygen species (ROS) were evaluated by flow cytometry using the $H_2$DCFDA fluorescent marker.

**Results:** CZP induced rapid minimal ROS production and Nrf2 nuclear translocation. This was followed by HO-1 mRNA and protein production. IL-1β induction by LPS was inhibited at the mRNA and protein level. At a later time-point, CZP was able to counteract the strong production of ROS induced by LPS.
Reverse signaling was suggested by short kinetics of Nrf2 translocation, extensive washing of CZP and the use of anti-TNF-Rs antibodies.

**Conclusion:** Our data suggest a novel mechanism of ROS modulation by CZP. This observation sheds new light on the function of reverse signaling and on potential mechanisms of action of anti-TNF drugs.

**Keywords:** Transmembrane TNF-α, Reverse signaling, Anti-TNF, Monocytes, Nrf2, Reactive oxygen species, Inflammation, Rheumatoid arthritis

## Background

Anti-TNF drugs have been widely used in rheumatoid arthritis (RA) for more than 15 years [1]. Only 70–80 % of patients respond to this therapy. To date, there is no explanation for this lack of efficacy [2]. Further understanding of the mode of action of anti-TNF drugs is much needed to improve the efficacy of the treatment and enhance our knowledge of inflammation.

The rationale for anti-TNF therapy in RA is the inhibition of the cytokine cascade, such as IL1, IL6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [1]. In addition to neutralizing soluble TNF-α, anti-TNF may also induce signal reverse via transmembrane TNF- α (tm TNF-α) [3]. TNF-α, and most of the other members of the TNF superfamily are also transmembrane proteins. Evidence suggests that the membrane-integrated ligands can receive signals and act as receptors, which can transmit feedback signals, called reverse signaling, into the cell [4, 5]. A previous study showed that pre-treatment of monocytes with anti-TNF induces the resistance of monocytes to lipopolysaccharide (LPS) [6]. In monocytes from

* Correspondence: jean-luc.davignon@inserm.fr
[1]Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France
[2]INSERM - CNRS U1043, CPTP, CHU Purpan, 1, Place Baylac, 31300 Toulouse, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2016 Boyer et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

patients with RA, anti-TNF stimulation was shown to decrease the secretion of inflammatory cytokine and to induce apoptosis [7]. These observations were attributed to reverse signaling. The role of reverse signaling in the initiation and perpetuation of arthritis is not established.

Monocytes are attractive targets for the treatment of RA [8]. Our laboratory is interested in the characterization of the role of tm-TNF-α in monocytes as a possible cell target of anti-TNF, which is now commonly used in the treatment of RA. In a previous study, we investigated the role of TNF-α and adalimumab on CD36 expression in human monocytes. F(ab')2 fragment obtained from adalimumab induced an increase in CD36 expression due to reverse signaling depending on reactive oxygen species (ROS) [9]. As nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) is induced upon ROS production [10–14] and is involved in CD36 induction [15, 16], we hypothesized that it could be induced by anti-TNF. Nrf2 is a redox-sensitive basic leucine zipper transcription factor involved in the transcriptional regulation of many antioxidant and cell protective genes. It plays a role in the control of inflammation. For example, genetic disruption of Nrf2 in different mouse models increases the mortality of mice in response to septic shock, increases the severity of arthritis, and leads to severe allergen-driven airway inflammation and hyperresponsiveness [17, 18].

HO-1 is an enzyme regulated by Nrf2 [19]. In inflammation, heme oxygenase 1 (HO-1) protects cells from oxidative damage during stress [20]. In a model of genetic inactivation of HO-1, mice are vulnerable to mortality and hepatic necrosis when challenged with endotoxin [21]. In a human case of HO-1 deficiency the patient presented with growth retardation, anemia, iron deposition, and vulnerability to stressful injury [22]. Endothelial cells from mice with HO-1 knockout (KO) have enhanced sensitivity to complement [23]. Anti-inflammatory effects of HO-1 usually result from the degradation of pro-inflammatory free heme, and the production of the anti-inflammatory compounds as carbon monoxide (CO), biliverdin/bilirubin and free iron [24]. HO-1 could thus be a therapeutic target in RA.

In this work we thus used certolizumab pegol (CZP) to investigate the induction of Nrf2 through tmTNF-α. CZP was chosen because it is a monovalent Fab anti-TNF antibody linked with a polyethylene glycol (PEG) fragment that has no Fc fragment [7, 25]. We showed that CZP induced rapid ROS induction and nuclear translocation of Nrf2 and expression of HO-1. Moreover, LPS-induced ROS expression and IL-1 production were attenuated by CZP, suggesting an effect on toll-like receptor (TLR)4-induced inflammation. Our data point to a mechanism, which, due to reverse signaling, may regulate inflammation.

## Methods

### Reagents

LPS from *Eschericia coli* 055:B5 was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Nrf2 (H300) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP)-linked antibodies, Alexa Fluor 488 F(ab')2 anti-rabbit IgG, tatabox binding protein (TBP) and HO-1 (P249) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (ABS16) antibodies were purchased from Millipore (Temecula, CA, USA). Blocking antibodies against TNF receptor 1 (TNFR1) (clone #16805) and TNFR2 (clone #22210) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Anti-CD14 (HCD14) antibody was from Biolegend, San Diego, CA, USA. $H_2$DCFDA (C-2938) was purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). The 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA). The diphenyleneiodonium chloride (DPI) and wortmannin inhibitors were purchased from Sigma.

### Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and monocyte purification

PBMC were isolated from healthy blood donors (Etablissement Français du Sang Transfusion Center, Toulouse, France). Ethical approval was obtained from the Transfusion Center. Informed consent was obtained from blood donors. PBMC were separated by ficoll density gradient centrifugation at 700 g for 20 minutes. They were then resuspended in PBS 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and thoroughly washed (centrifugation at 350 g for 8 minutes six times). The percentage of monocytes was evaluated by flow cytometry on a FACSCalibur cytometer (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) with an anti-CD14 (HCD14) antibody (Biolegend, San Diego, CA, USA)). CD14+ monocytes were purified by negative immunomagnetic bead separation using Dynabeads Untouched Human Monocytes kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Purity of CD14+ monocytes was >90 %. Monocytes were then incubated in Macrophage SFM medium (Life Technologies) and plated one hour before applying any treatment. Cells were incubated with CZP (5 μg/ml) for the indicated times, then thoroughly washed as described [6, 25].

### Quantitative real-time PCR

Total RNA from $4 \times 10^6$ monocytes was isolated using High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and complementary DNA (cDNA) synthesized with RevertAid Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene expression was performed using LightCycler 480 SYBR

Green Master Mix and LightCycler 480 System instrument (Roche Diagnostics GmbH). All primers were designed using ProbeFinder Software (Roche Applied Science website), and synthetized by Sigma Life Science (St Quentin Fallavier, France) (Table 1).

### ROS measurements

For intracellular ROS measurement, we used the $H_2$DCFDA compound. Monocytes ($4 \times 10^5$ cells) were grown in a 24 well-plate in 0.5 ml Macrophage SFM medium. All treatment conditions were performed in duplicate. Monocytes were incubated, or not, for 5, 15 and 30 minutes with 5 μg/ml of CZP. Then, culture medium was discarded and replaced by PBS containing 2 μM $H_2$DCFDA. Monocytes were incubated for 30 minutes and then detached from the well in 300 μl of PBS 5 mM EDTA at 4 °C. The level of fluorescence (geometric mean) was measured by flow cytometry on a FACS-Calibur cytometer.

In another experiment, monocytes were incubated, or not, for 1 h with 5 μg/ml of CZP, washed three times with medium to remove unfixed CZP, and then incubated for 18 h in medium containing LPS. The ROS production was then measured. All cytometry data were analyzed by FlowJo (TreeStar Inc, Ashland, OR, USA).

### Western blot analysis

Total extracts from $4 \times 10^6$ monocytes lysed in 50 μl of Laemmli buffer were denatured at 95 °C for 10 minutes and sonicated: 15–20 μl were run on Novex NuPAGE 4–12 % Bis-Tris mini gels and transferred on nitrocellulose membrane with X-Cell blot module (Life Technologies). After incubation with primary and secondary HRP-coupled antibodies, labeled proteins were visualized by enhanced chemiluminescence with ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) on a ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). All images were analyzed with the Image Lab 5.0 software (Bio-Rad). Antibodies to GAPDH and TBP were used to normalize the loading quantities of protein in the different lanes of the gels.

### Preparation of nuclear extracts

Monocytes ($4–5 \times 10^6$) grown in 6-well plates and 2 ml of Macrophage SFM medium were scraped in 1 ml of ice-cold PBS supplemented by protease inhibitor cocktail (PIC, P8340, Sigma) at 1:100 dilution and harvested at 800 g and 4 °C for 4 minutes. Cells were resuspended in 50 μl of lysis buffer (10 mM TRIS pH 7.3, 1 mM MgCl2, 250 mM sucrose, 0.25 % NP40, 1:50 PIC) and left on ice for 10 minutes. After centrifugation at 1500 g for 4 minutes at 4 °C, the nuclear enriched pellet was lysed in 50 μl of Laemmli buffer. The lysates were denatured for 8 minutes at 95 °C and sonicated before western blot analysis.

**Table 1** Primers sequences used for qPCR

| Gene | Accession number | Forward primer | Reverse primer |
|---|---|---|---|
| *gapdh* | J04038.1 | cagcctcaagatcatcagca | gtcttctgggtggcagtgat |
| *hmox1* | NM_002133.2 | ggcagagggtgatagaagagg | agctcctgcaactcctcaaa |
| *IL1B* | NM_000576.2 | aaagcttggtgatgtctggtc | ggacatggagaacaccacttg |

### Immunofluorescence microscopy

Monocytes ($3 \times 10^5$ cells) in 0.5 ml of Macrophage SFM medium were plated for 1 h on a glass coverslip in a 24-well plate and incubated, or not, by 5 μg/ml CZP. After 30 minutes, the medium was removed by aspiration and cells were fixed and permeabilized with 250 μl methanol at 80 % over 4 minutes at −20 °C. After washing with PBS and PBS 0.25 % BSA, cells were incubated with the Nrf2 (H300) antibody at 1:250 dilution for 1 h. Cells were rinsed three times with PBS-BSA and then incubated with secondary anti-rabbit AF488 antibody for another 1 h. DAPI at a final concentration of 0.3 μM was added for 10 minutes and cells were washed another three times with PBS-BSA. The coverslip glass was mounted on a microscopic slide with Mowiol mounting medium. All observations were made on an Apotome Zeiss device equipped with a × 63 objective. Images were obtained using Zen software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

### Statistics

All experiments were performed more than three times. The values are expressed as the mean ± standard deviation (SD). The *t* test was used to assess the significance of differences between two conditions. All *p* values are two-sided, and *p* values equal to or below 0.05 were considered significant.

## Results

### Anti-TNF induces ROS production and nuclear translocation of Nrf2 translocation in human monocytes

In a previous report, we observed that the increase in CD36 expression induced by the anti-TNF agent adalimumab was dependent on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) activation [9]. We showed that CZP induces cytoplasmic ROS production shortly after incubation (within 5–30 minutes) with monocytes (Fig. 1a). As Nrf2 is involved in the response to ROS and is involved in the regulation of CD36 expression [16], we assessed its nuclear translocation in monocytes. As shown in Fig. 1b, the anti-TNF CZP induced the nuclear translocation of Nrf2. Nuclear translocation was also confirmed by western blot of cellular

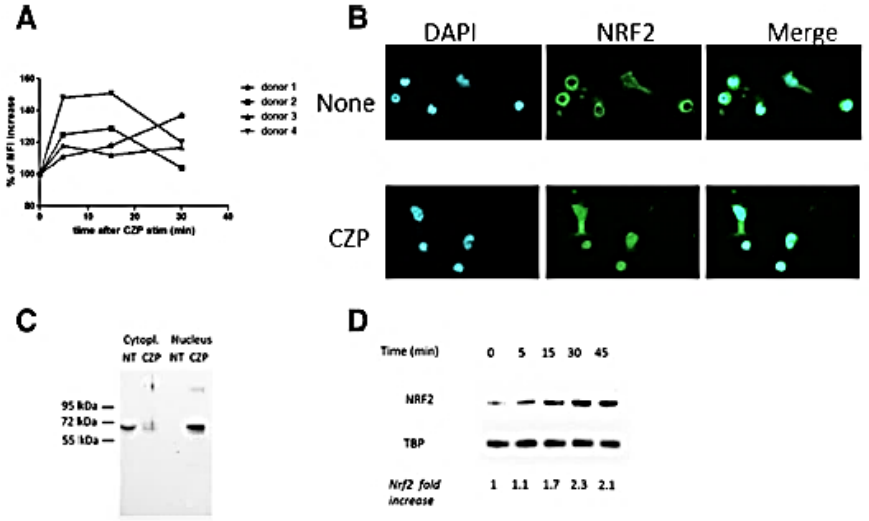



**Fig. 1** Certolizumab pegol (*CZP*) induces rapid production of reactive oxygen species (ROS) and nuclear translocation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like (*Nrf2*). Monocytes were incubated, or not, with CZP (5 μg/ml) and ROS production was assessed by H2DCFCA using flow cytometry. The time course of rapid ROS production over 30 minutes is shown in monocytes from four different healthy donors (**a**). Monocytes were incubated, or not, with CZP (5 μg/ml) for 90 minutes, and cellular localization of Nrf2 was analyzed by wide-field microscopy using an anti-Nrf2 antibody. 4',6-diamidino-2-phenylindole (*DAPI*) was used as control for nucleus staining (**b**). Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared after 90 minutes of cell culture and analyzed for Nrf2 detection (**c**). Time course analysis of Nrf2 translocation in nuclear fraction-enriched cell extracts of monocytes incubated, or not, with CZP (5 μg/ml) (**d**). TATA box binding protein (*TBP*) was used as control (**d**). Data are representative of four experiments (**b**, **c**, **d**). *MFI* geometric mean of fluorescence intensity

and nuclear extracts (Fig. 1c). Expression of Nrf2 in the nucleus increased rapidly after incubation with anti-TNF (Fig. 1d).

### Anti-TNF induces HO-1

To further illustrate the functionality of the targeting of Nrf2 by anti-TNF we assessed the messenger RNA (mRNA) production of HO-1, a key enzyme implicated in heme degradation and regulated by Nrf2 [19]. As shown in Fig. 2a, CZP induced a twofold increase of HO-1 mRNA after 4 h of cell culture. A similar increase in HO-1 protein was also observed after 6 and 16 h of cell culture (Fig. 2b-d).

### Induction of HO-1 by anti-TNF is dependent upon ROS production and PI3 kinase activity

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase [NADPH] is a major source of ROS [26] which, as a source of stress, are involved in the activation of Nrf2 [11–13]. To test if NADPH was implicated in HO-1 induced by anti-TNF, we used an inhibitor of ROS production induced by NADPH, DPI. Figure 3a and b show that DPI used alone induced ROS on its own, as already described [27]. However, DPI consistently inhibited the induction of HO-1 observed with CZP, indicating a role for NADPH in the induction of HO-1. PI3k is activated by calcium flux and has been reported to activate NADPH oxydase [28]. As shown in Fig. 3a and b, wortmannin, a PI3K inhibitor, completely blocked the induction of HO-1 observed with anti-TNF CZP. This suggests that PI3K is involved in the induction of HO-1 by CZP.

### Induction of HO-1 is not due to TNFR and results from reverse signaling

Induction of HO-1 may result from blocking the interaction of TNF-α with its receptors. To elucidate whether the induction of HO-1 by anti-TNF results from a reverse signaling phenomenon we inhibited the TNFR1 and TNFR2 by specific blocking antibodies. As shown in Fig. 4, the anti-TNF-induced increase in HO-1 expression was still observed in the presence of the anti-TNFR1 and TNFR2 blocking antibody. This suggests that the induction of HO-1 by CZP was not mediated by TNFR and thus, resulted from reverse signaling.

### CZP inhibits LPS-induced IL-1β and ROS production

Previous studies have shown that anti-TNF decreases the sensitivity of TLR signaling in monocytes [6, 29]. The mechanism has not been reported in detail. As HO-1 and Nrf2 are reported to be involved in the regulation of TLR4 signaling [30, 31], we investigated the impact of anti-TNF on TLR-4-induced ROS production. In a first step, we validated the repression of LPS-induced IL1β by anti-TNF. After short incubation of monocytes with CZP, cells were extensively washed and analyzed. As

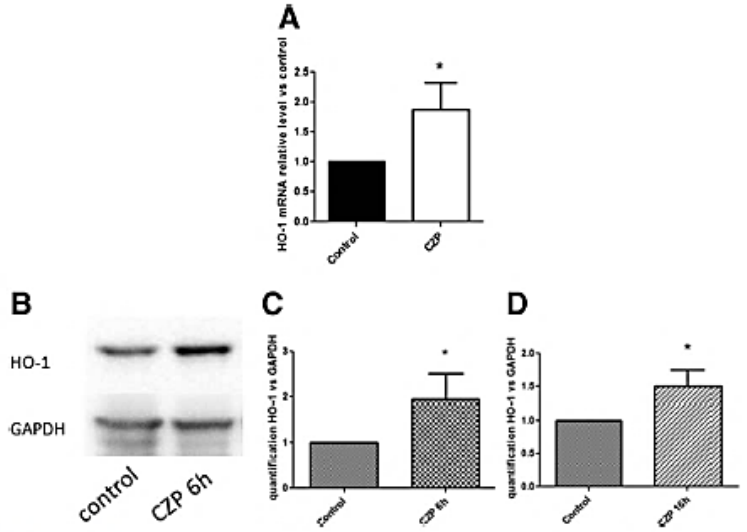



**Fig. 2** Certolizumab pegol (*CZP*) induces heme oxygenase 1 (*HO-1*) expression. Monocytes were incubated, or not, with CZP (5 μg/ml) for 4 h of culture. RNA was isolated and qRT-PCR was performed to quantify HO-1 mRNA. Quantification of five experiments. *Paired *t* test <0.05 (**a**). Monocytes were incubated, or not, with CZP (5 μg/ml) during 6 or 16 h of culture. HO-1 protein was assessed by western blot (**b**). Quantification of five experiments was performed at 6h (**c**) and at 16h (**d**). Paired *t* test <0.05. *GAPDH* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

shown in Fig. 5, CZP induced a decrease in LPS-induced IL1β production at the mRNA (Fig. 5a) and protein (Fig. 5b), levels. This suggested that CZP modulated the TLR4-mediated inflammatory signal. We then evaluated the modulation of LPS-induced ROS by CZP. We observed (Fig. 5c) that pre-treatment of monocytes with CZP, significantly inhibited the ROS production induced by TLR4 stimulation with LPS. A representative cytometry experiment is shown in Fig. 5d. This suggests that engaging tmTNF-α modified the monocyte response to LPS.

## Discussion

In this work, we showed that anti-TNF CZP induced rapid ROS production and subsequent nuclear translocation of Nrf2 in human monocytes. As a consequence, HO-1 expression was increased. Moreover, LPS-induced IL1ß and ROS production were inhibited by CZP. To our knowledge, this is the first description of Nrf2 activation and ROS modulation by anti-TNF via reverse signaling.

Reverse signaling has been characterized on the basis of several factors. First, induction of HO-1 was still observed in the presence of specific anti-TNF receptors 1

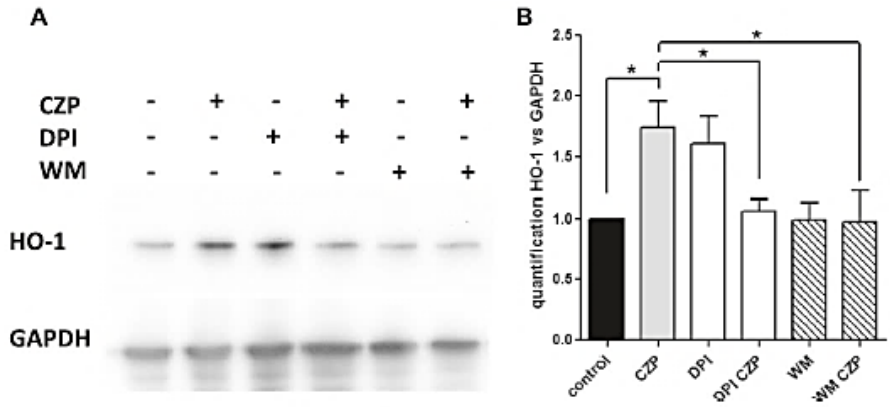



**Fig. 3** Roles of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) and Pi3 kinase in the induction of heme oxygenase 1 (*HO-1*) by certolizumab pegol (*CZP*). Monocytes were incubated, or not, with CZP 5 μg/ml in the presence or not of diphenyleneiodonium chloride (*DPI*) (10 μM) and wortmannin (0.4 μM) over 16 h. HO-1 was assessed by western blot. One representative blot is shown (**a**). Quantification of three western blot experiments was performed. *Paired *t* test <0.05 (**b**). *GAPDH* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *WM* Wortmannin

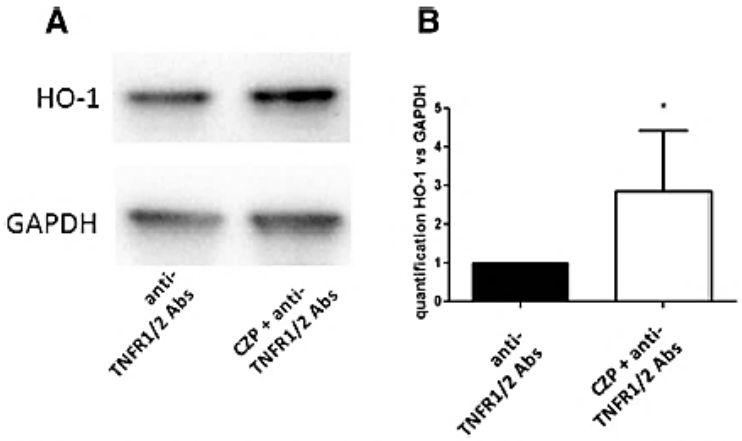



**Fig. 4** Heme oxygenase 1 (*HO-1*) induction by anti-TNF certolizumab pegol (*CZP*) is due to reverse signaling. Monocytes were incubated, or not, with CZP (5 μg/ml) for 16 h in the presence of TNF receptor 1 (*TNFR1*) and TNFR2 (5 μg/ml) blocking antibody. HO-1 protein expression was assessed by western blot (**a**). Quantification of four western blot experiments was performed. Paired t test $p = 0.05$ (**b**). *GAPDH* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Abs* antibodies

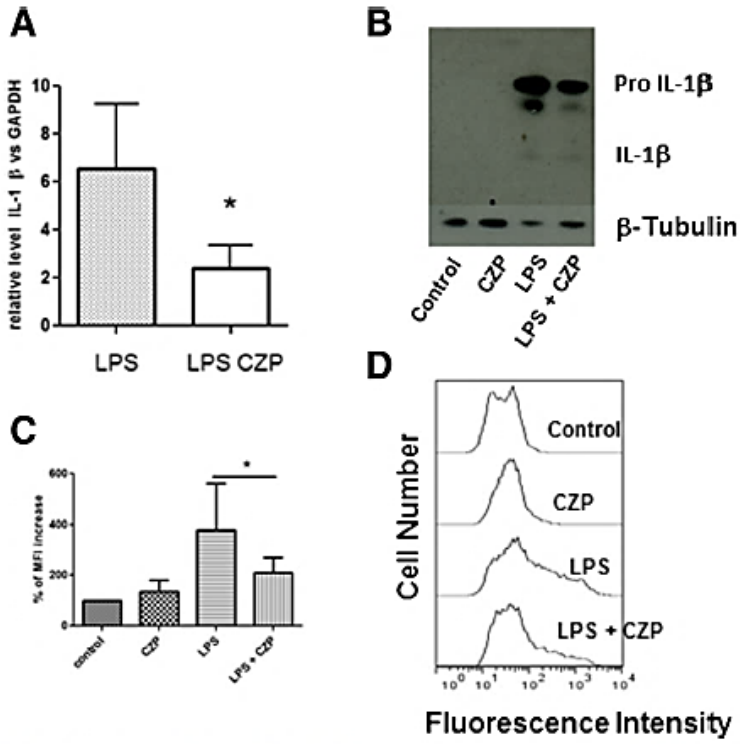



**Fig. 5** Certolizumab pegol (*CZP*) directly induces inhibition of the toll-like receptor 4 pathway. Expression of IL1β: monocytes were incubated, or not, with CZP (5 μg/ml) for 1 h, washed, then stimulated with lipopolysaccharide (*LPS*) (10 ng/ml) for 16 h. IL1β mRNA was assessed by qRT-PCR. Results are expressed as relative level of IL1β mRNA mean ± SD in three experiments (**a**). IL1β protein was assessed by western blot in monocytes stimulated as in (**a**) for 16 h (**b**). Data shown are representative of three experiments. Monocytes were incubated, or not, with CZP (5 μg/ml) for 1 h, washed and stimulated with LPS (10 ng/ml) for 16 h. The level of ROS production was expressed as the percentage of variation of the geometric mean fluorescence intensity (*MFI*) of H2DFCDA as analyzed by flow cytometry (**c**) in five experiments. *Paired *t* test <0.05 for comparison of LPS and LPS + CZP. A representative cytometry experiment in shown (**d**). *GAPDH* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

and 2 blocking antibodies and thus, did not result from TNF-α neutralization by CZP. Second, TNF-α itself is known to induce Nrf2 [32]. If our results were due to mere neutralization of soluble TNF, results opposite to ours would have rather been observed on HO-1 and Nrf2. Third, the kinetics of the induction of ROS were rapid and inhibition of TLR signaling after washing away the anti-TNF was still observed. A more direct approach would probably be to test monocytes with knocked down TNFR1/2 and with expression of non-cleavable TNF. However, we observed that these cells express high levels of Nrf2 when transfected with small interfering RNA (siRNA) or infected with viruses (our unpublished data), making this approach difficult.

The mechanism leading to Nrf2 activation is likely to be due to the relatively small amount of induced ROS as early as 5 minutes after stimulation with anti-TNF (10–50 % increase). Our data suggest that reverse signaling in monocytes is an immediate or early event that controls subsequent monocyte activation. LPS stimulation induced a much stronger increase (400 %) in ROS that was potently reduced by CZP in a 16-h timeframe. Moreover, CZP, like adalimumab [9], induced CD36 expression (see Additional file 1). Altogether, the induction of CD36, the resistance to LPS and the rapid induction of Nrf2 by anti-TNF may represent features of macrophage polarization to an anti-inflammatory activation phenotype. As a comparison, IL4 has been shown to deliver a signal that counteracts LPS-induced polarization and induces CD36 [33, 34]. Future experiments will determinethe consequences of reverse signaling induced by anti-TNF on monocyte polarization.

Besides playing a role in the removal of ROS-induced electrophiles and protection of cells from injuries, Nrf2 play a role in the control of inflammation [35]. In a mouse model of colitis, inflammation was increased in the colonic tissues of Nrf2-/- mice compared with their wild-type Nrf2+/+ counterparts [36]. Nrf2 is activated in the joints of arthritic mice and of patients with RA [18]. Data exploring the existence of a link between response to anti-TNF and induction of Nrf2 in RA are needed.

Induction of HO-1 in arthritis has been the topic of a large number of publications. A study reported that infliximab, an anti-TNF agent, increased HO-1 expression in human monocytes from patients with RA [37]. The authors suggest that it resulted from the inhibition of the downregulation of HO-1 by TNF-α. However, the persistence of HO-1 induction with anti-TNF-R blocking antibodies observed in our study suggests an active mechanism of anti-TNF in HO-1 induction [32]. At the cellular level, HO-1 decreases the secretion of metalloproteases by chondrocytes [38]. It has also been shown to inhibit phospholipase A2 induced by TNF-α in synovial fibroblasts in RA [39] and has been reported to favor protection of the endothelial cells to complement injury [23]. Thus, HO-1 may be related to the resolution of inflammation and arthritis.

An important result of this work appears to be the inhibition of the TLR pathway reverse signaling induced by anti-TNF. Such inhibition has previously been reported, but no clear mechanism was proposed [5]. Our present data on the decreased IL-1β production by CZP confirm those published by Nesbitt et al. and further show that inhibition occurs at the level of specific mRNA production [25]. A recent publication reported that IL-6 is also inhibited in mouse macrophages [40]. This needs to be explored in human macrophages.

## Conclusions

Figure 6 depicts our data and our current view of reverse signaling induced by CZP. Our current study describes antioxidant response induced by anti-TNF-induced reverse signaling in monocytes. Induction of Nrf2 and HO-1, and decrease of LPS-induced ROS and IL-1β in monocytes, may contribute to the therapeutic effects of anti-TNF agents in inflammatory conditions.

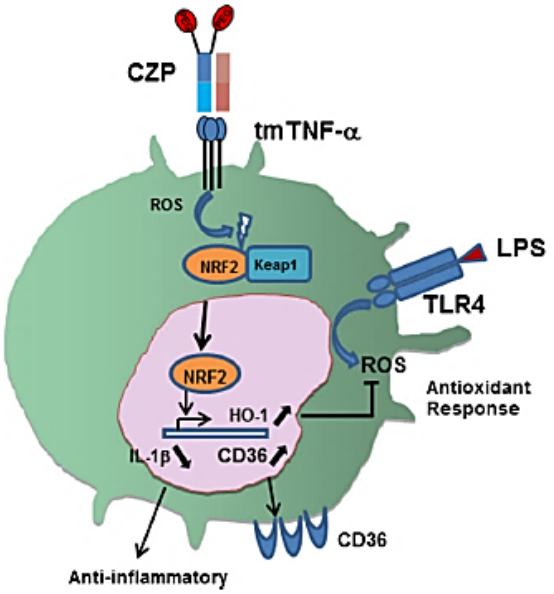



**Fig. 6** Schematic representation of certolizumab pegol (*CZP*) action on transmembrane TNF (*tmTNF*) and subsequent regulation. The Anti-TNF agent CZP induces rapid reactive oxygen species (*ROS*) production through its binding to tmTNF-α. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) is translocated to the nucleus. Heme oxygenase 1 (HO-1) and CD36 are induced. The tollLike receptor 4 (*TLR4*) ligand lipopolysaccharide (*LPS*), which mimics some of the triggers of rheumatoid arthritis (RA), induces strong production of ROS and IL-1β, which are both inhibited by pretreatment with CZP

## Additional file

**Additional file 1:** Induction of CD36 by certolizumab pegol (CZP). Human monocytes were incubated for 24 hours with 5 µg/ml CZP. CD36 expression was evaluated by flow cytometry using anti-CD36-PE antibody. Summary of five independent experiments: $p < 0.01$. *MFI* geometric mean of fluorescence intensity. (TIF 97 kb)

### Abbreviations

BSA: bovine serum albumin; cDNA: complementary DNA; CZP: certolizumab pegol; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; DPI: diphenyleneiodonium chloride; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HO-1: heme oxygenase 1; HRP: horse radish peroxidase; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IL: interleukin; LPS: lipopolysaccharide; mRNA: messenger RNA; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; Nrf2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PBS: phosphate-buffered saline; PEG: polyethylene glycol; RA: rheumatoid arthritis; ROS: reactive oxygen species; siRNA: small interfering RNA; TBP: TATA box binding protein; TLR: toll-like receptor; tmTNF-α: transmembrane tumor necrosis factor-α; TNF: tumor necrosis factor; TNFR: tumor necrosis factor receptor.

### Competing interests

Arnaud Constantin is a member of the National Communication Board of UCB Pharma France. Alain Cantagrel is a member of the National Scientific Board of UCB Pharma France. Jean-Luc Davignon was the recipient of a grant from UCB Pharma during this study (Sirius competitive grant). No non-financial conflicts of interest exist for any of the authors.

### Authors' contributions

JFB designed the study, performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. MB designed the study, performed the experiments, analyzed the data and reviewed the manuscript. ACo designed the study, analyzed the data and reviewed the manuscript. YD analyzed the data and reviewed the manuscript. ACa designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript. JLD designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors reviewed the final version of the manuscript for intellectual content and approved it.

### Acknowledgements

This work was funded by grants from UCB Pharma (Sirius Grant). We thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive and Valérie Duplan-Eche from the Plateau de Cytométrie of CPTP for assistance.

### Author details

[1]Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France. [2]INSERM - CNRS U1043, CPTP, CHU Purpan, 1, Place Baylac, 31300 Toulouse, France. [3]Centre de Rhumatologie, Hopital Pierre Paul Riquet, Toulouse, France.

Received: 17 August 2015 Accepted: 12 February 2016
Published online: 01 March 2016

### References

1. Feldmann M, Williams RO, Paleolog E. What have we learnt from targeted anti-TNF therapy? Ann Rheum Dis. 2010;69 Suppl 1:i97–9.
2. Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. Nat Rev Rheumatol. 2015;11(5):276–89.
3. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. Rheumatology (Oxford). 2010;49(7):1215–28.
4. Juhasz K, Buzas K, Duda E. Importance of reverse signaling of the TNF superfamily in immune regulation. Expert Rev Clin Immunol. 2013;9(4):335–48.
5. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. Cytokine Growth Factor Rev. 2004;15(5):353–66.
6. Eissner G, Kirchner S, Lindner H, Kolch W, Janosch P, Grell M, et al. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. J Immunol. 2000;164(12):6193–8.
7. Meusch U, Rossol M, Baerwald C, Hauschildt S, Wagner U. Outside-to-inside signaling through transmembrane tumor necrosis factor reverses pathologic interleukin-1beta production and deficient apoptosis of rheumatoid arthritis monocytes. Arthritis Rheum. 2009;60(9):2612–21.
8. Davignon JL, Hayder M, Baron M, Boyer JF, Constantin A, Apparailly F, et al. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2013;52(4):590–8.
9. Boyer JF, Balard P, Authier H, Faucon B, Bernad J, Mazieres B, et al. Tumor necrosis factor alpha and adalimumab differentially regulate CD36 expression in human monocytes. Arthritis Res Ther. 2007;9(2):R22.
10. Papaiahgari S, Kleeberger SR, Cho HY, Kalvakolanu DV, Reddy SP. NADPH oxidase and ERK signaling regulates hyperoxia-induced Nrf2-ARE transcriptional response in pulmonary epithelial cells. J Biol Chem. 2004;279(40):42302–12.
11. Burdette D, Olivarez M, Waris G. Activation of transcription factor Nrf2 by hepatitis C virus induces the cell-survival pathway. J Gen Virol. 2009;91(Pt 3):681–90.
12. Brewer AC, Murray TV, Arno M, Zhang M, Anilkumar NP, Mann GE, et al. Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes in vivo. Free Radic Biol Med. 2011;51(1):205–15.
13. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. Mol Cell Biol. 2004;24(16):7130–9.
14. Segal BH, Han W, Bushey JJ, Joo M, Bhatti Z, Feminella J, et al. NADPH oxidase limits innate immune responses in the lungs in mice. PLoS One. 2010;5(3):e9631.
15. Olagnier D, Lavergne RA, Meunier E, Lefevre L, Dardenne C, Aubouy A, et al. Nrf2, a PPARgamma alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. PLoS Pathog. 2011;7(9):e1002254.
16. Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. Circ Res. 2004;94(5):609–16.
17. Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, Reddy SP, Yamamoto M, Kensler TW, et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. J Clin Invest. 2006;116(4):984–95.
18. Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg LO, Kan YW, Chan K, et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. Ann Rheum Dis. 2011;70(5):844–50.
19. Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. J Biol Chem. 1999;274(37):26071–8.
20. Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: novel therapeutic strategies in critical care medicine. Curr Drug Targets. 2010;11(12):1485–94.
21. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(20):10925–30.
22. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. J Clin Invest. 1999;103(1):129–35.
23. Kinderlerer AR, Pombo Gregoire I, Hamdulay SS, Ali F, Steinberg R, Silva G, et al. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin. Blood. 2009;113(7):1598–607.
24. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. Biochem Pharmacol. 2010;80(12):1895–903.
25. Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, et al. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. Inflamm Bowel Dis. 2007;13(11):1323–32.
26. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007;87(1):245–313.
27. Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. J Biol Chem. 2004;279(46):47726–31.
28. Yamamori T, Inanami O, Nagahata H, Kuwabara M. Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47(phox) by controlling cPKC/PKCdelta but not Akt. Biochem Biophys Res Commun. 2004;316(3):720–30.
29. Kirchner S, Boldt S, Kolch W, Haffner S, Kazak S, Janosch P, et al. LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through

transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway. J Leukoc Biol. 2004;75(2):324–31.
30. Wang XM, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM. The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. J Immunol. 2009;182(6):3809–18.
31. Kong X, Thimmulappa R, Kombairaju P, Biswal S. NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species mediate amplified TLR4 signaling and sepsis-induced mortality in Nrf2-deficient mice. J Immunol. 2010;185(1):569–77.
32. Rushworth SA, Shah S, MacEwan DJ. TNF mediates the sustained activation of Nrf2 in human monocytes. J Immunol. 2011;187(2):702–7.
33. Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. Adv Immunol. 2013;120:163–84.
34. Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, et al. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. Nature. 1999;400(6742):378–82.
35. Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. Mutat Res. 2010;690(1-2):12–23.
36. Khor TO, Huang MT, Kwon KH, Chan JY, Reddy BS, Kong AN. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. Cancer Res. 2006;66(24):11580–4.
37. Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Kobayashi M, Kobayashi H, Miura K, et al. Tumor necrosis factor alpha acceleration of inflammatory responses by down-regulating heme oxygenase 1 in human peripheral monocytes. Arthritis Rheum. 2007;56(2):464–75.
38. Rousset F, Nguyen MV, Grange L, Morel F, Lardy B. Heme oxygenase-1 regulates matrix metalloproteinase MMP-1 secretion and chondrocyte cell death via Nox4 NADPH oxidase activity in chondrocytes. PLoS One. 2013;8(6):e66478.
39. Chi PL, Liu CJ, Lee IT, Chen YW, Hsiao LD, Yang CM. HO-1 induction by CO-RM2 attenuates TNF-alpha-induced cytosolic phospholipase A2 expression via inhibition of PKCalpha-dependent NADPH oxidase/ROS and NF-kappaB. Mediators Inflamm. 2014;2014:279171.
40. Pallai A, Kiss B, Vereb G, Armaka M, Kollias G, Szekanecz Z, et al. Transmembrane TNF-alpha Reverse Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Formation in Macrophages by Inducing TGF-beta: Therapeutic Implications. J Immunol. 2016;196(3):1146–57.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

**Article 3.**

Degboé *et al. Arthritis Research & Therapy* 2014, **16**:R98
http://arthritis-research.com/content/16/2/R98

arthritis research&therapy

RESEARCH ARTICLE Open Access

# Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent

Yannick Degboé[1,2], Séverine Fruchon[2], Michel Baron[2], Delphine Nigon[1,2], Cédric Olivier Turrin[3], Anne-Marie Caminade[3], Rémy Poupot[2], Alain Cantagrel[1,2] and Jean-Luc Davignon[1,2*]

## Abstract

**Introduction:** Our objective was to assess the capacity of dendrimer aza-bis-phosphonate (ABP) to modulate phenotype of monocytes (Mo) and monocytes derived dendritic cells (MoDC) activated in response to toll-like receptor 4 (TLR4) and interferon γ (IFN- γ) stimulation.

**Methods:** Mo ($n$ = 12) and MoDC ($n$ = 11) from peripheral blood of healthy donors were prepared. Cells were preincubated or not for 1 hour with dendrimer ABP, then incubated with lipopolysaccharide (LPS; as a TLR4 ligand) and (IFN-γ) for 38 hours. Secretion of tumor necrosis factor α (TNFα), interleukin (IL) -1, IL-6, IL-12, IL-10 and IL-23 in the culture medium was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Cytokine Bead Array. Differentiation and subsequent maturation of MoDC from nine donors in the presence of LPS were analyzed by flow cytometry using CD80, CD86, CD83 and CD1a surface expression as markers.

**Results:** Mo and MoDC were orientated to a pro-inflammatory state. In activated Mo, TNFα, IL-1β and IL-23 levels were significantly lower after prior incubation with dendrimer ABP. In activated MoDC, dendrimer ABP promoted IL-10 secretion while decreasing dramatically the level of IL-12. TNFα and IL-6 secretion were significantly lower in the presence of dendrimer ABP. LPS driven maturation of MoDC was impaired by dendrimer ABP treatment, as attested by the significantly lower expression of CD80 and CD86.

**Conclusion:** Our data indicate that dendrimer ABP possesses immunomodulatory properties on human Mo and MoDC, in TLR4 + IFN-γ stimulation model, by inducing M2 alternative activation of Mo and promoting tolerogenic MoDC.

## Introduction

Cells from the myelo-monocytic lineage are involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA) [1]. Macrophages and dendritic cells are thought to present arthritogenic peptides during the initial phase of the disease, leading to the activation of CD4+ T lymphocytes [2]. Macrophages also secrete pro-inflammatory cytokines (TNFα, IL-1 and IL-6), which are responsible for the inflammation symptoms. Macrophage-like synoviocytes (MLS) are derived from the monocytic lineage and participate in the production of cytokines and chemokines *in situ*, thus contributing to the proteolytic degradation of the cartilage [3]. In addition, osteoclasts are derived from a monocytic precursor [4].

Polarization of monocytes is a current concept derived from that of T cell polarization. Classically, the prototypical pro-inflammatory M1 polarization is obtained by activation mediated by LPS + IFN-γ or TNFα. Conversely, M2 polarization corresponds to a series of phenotypes obtained after a so-called "alternative" activation by IL-4 or IL-13 [5,6]. Although M1 produces IL-12, the different

* Correspondence: jean-luc.davignon@inserm.fr
[1]Centre de Rhumatologie, CHU PURPAN, 1 Place Baylac, 31300 Toulouse, France
[2]INSERM U1043 - CNRS UMR 5282, CPTP, Université Paul Sabatier, Toulouse, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Degboé et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

M2 phenotypes share high levels of IL-10 production. On a functional point of view, M2 macrophages are involved in immunoregulation and tissue reparation. Considering the characteristics of M1 and M2 phenotypes with regard to cytokine production, the IL-12:IL-10 balance has been proposed to evaluate the polarization of macrophages in inflammatory conditions [5].

Although their precise role in RA is not completely understood, dendritic cells (DCs) are most important in the initiation of the immune response. They are professional antigen presenting cells and also secrete pro-inflammatory cytokines, depending on the stimulation [7]. Besides their role in inflammation, tolerogenic DCs participate in immunoregulation through the production of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), the production of IL-10, and the regulated expression of their co-stimulatory molecules, such as CD80 and CD86 [8]. Their role in RA could thus be different according to the pattern of stimulation in their environment.

Toll-like receptors (TLR) expressed at the surface of Mo and DC are responsible for early, powerful and non-specific immune reaction in response to danger signals. They are capable of initiating adaptive immune response as well as regulating co-stimulation, cytokine and chemokine secretion [9]. A central role of TLR in the initiation and/or maintenance of RA has been proposed. On the one hand, TLR2 and 4 are capable of recognizing endogenous proteins among which some are of synovial origin (Hsp60, fibrinogen, hyaluronic acid) [10-16]. On the other hand, TLR2 and 4 recognize infectious targets either latent or persistent in the organism [17-22]. TLRs have the capacity to initiate and maintain an inflammatory reaction in response to endogenous danger signals and thus represent good candidates for the long-term inflammation of RA [23]. The induction of co-stimulation molecules on APC by TLR may contribute to the initiation phase of the disease as well as to the vicious circle of inflammation following the as yet unidentified triggering phenomenon [23].

Dendrimer ABP (aza-bis-phosphonate) is a synthetic hyper-branched nanomolecule which belongs to the family of phosphorus-containing dendrimers (Figure 1) [24]. Dendrimer ABP has shown promising results in the treatment of experimental arthritis [25]. We have demonstrated in two murine models that this dendrimer inhibits arthritis and bone erosion by decreasing pro-inflammatory cytokines, increasing anti-inflammatorycytokines as well as inhibiting osteoclastogenesis [25]. Moreover, in human cultures, dendrimer ABP has shown immunomodulatory properties targeted to Mo leading to M2 activation [26], amplification of IL-10 producing CD4 T cells [26]. However, this has not been previously tested in pro-inflammatory conditions.

IFN-γ has been shown to prime cells for TLR4 induction of pro-inflammatory cytokines [27]. In this current study, we have analyzed the potential mechanism through which dendrimer ABP may act to modulate inflammation. We thus have chosen to orientate Mo as well as DC towards an anti-inflammatory state using dendrimer ABP before applying a classical pro-inflammatory protocol using TLR4 ligand LPS in the presence of IFN-γ. Pro-inflammatory cytokines supposed to be involved in RA, such as TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12 and IL-23, were studied. Anti-inflammatory cytokine IL-10 involved in regulation of the immune response and in tolerogenic phenotype of DC was also examined.

## Materials and methods

### Isolation of monocytes

Peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) were obtained from normal blood donors of the Etablissement Français du Sang (EFS), Toulouse, France. Informed written consent was obtained from all blood donors, and the study protocol was approved by the INSERM-EFS ethical committee. Briefly, CD14+ monocytes were purified from PBMC isolated on Pancoll (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) by negative sorting using Dynabeads (Dynabeads Untouched Human Monocytes, Invitrogen, Oslo, Norway). Purity was measured by flow cytometry (FC-500 Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using a CD14-FITC antibody (clone HCD14, Bio Legend, San Diego, CA, USA). Data were analyzed using FlowJo (Tree Star). Purity was >90%.

### Culture and activation of monocytes

Monocytes were cultured at 37°C, 5% $CO_2$, 100% humidity in RPMI-1640-Glutamax (Gibco; Paisley, UK) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco), penicillin (100 U/ml; Gibco), streptomycin (100 μg/ml; Gibco), non-essential amino acids (1%; PAA, Pasching, Austria), and sodium pyruvate (1%; Sigma-Aldrich).

Monocytes were first incubated with dendrimer ABP (10 μM) for one hour. They were then activated in the presence of LPS from *E. coli* (20 ng/ml; Sigma-Aldrich) and IFN-γ (250 U/ml) [28] for 38 hours for optimal cytokine production. No cell death was observed in the presence of dendrimer ABP, as expected from the study by Poupot *et al.* [24], using flow cytometry Forward Scatter and Side Scatter.

### Generation and activation of monocyte-derived dendritic cells (MoDC)

Immature MoDC were generated according to Sallusto and Lanzavecchia [29]. Briefly, monocytes ($0.8 \times 10^6$/ml) were cultured in the presence of rIL-4 (50 ng/ml; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and rGM-CSF (100 ng/ml; PeproTech) for six days. Culture media was complete 10% FCS RPMI-1640. The phenotype was analyzed on FC-500 Coulter flow cytometer using the following antibodies anti CD14-FITC (clone HCD14, BD Biosciences), CD11c-APC

(clone 3.9, Bio Legend), CD1a-APC (clone HI149, BD Biosciences), CD80-PE (clone 2D10, Bio Legend), CD83-PerCP Cy5.5 (clone HB15e, Bio Legend), CD86-Alexa Fluor 488 (clone IT2.2, Bio Legend) and corresponding isotype controls. Data were analyzed using FlowJo (Tree Star).

MoDC were cultured at the final concentration of $0.2 \times 10^6$/ml in complete 10% FCS RPMI-1640 media and treated as Mo with regard to activation.

### Production of cytokines

Cultured supernatants were collected and kept at -80°C until analysis. Concentrations of IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 and TNFα were determined simultaneously using Cytometric Bead Array (Human Inflammatory Cytokine Kit, BD Biosciences). Data acquisition was performed on a FACSCalibur (BD Biosciences) and analysis was performed using FCAP Array v3 (Soft Flow). IL-23 was quantitated by ELISA (Ready-SET-Go, eBioscience, San Diego, CA, USA) on a Varioskan Flash (Thermo Scientific) spectrophotometer and analyzed using the SkanIt™ (Thermo Scientific) program.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Stata 12 (Statacorp LP). A bilateral paired Student's *t* test was performed when variables followed a Gaussian distribution (Shapiro-Wilk test). A paired rank Wilcoxon test was used when applicable. Statistically, $P < 0.05$ was considered as significant with 95% interval confidence.

Box plots (Figures 2 and 3) represent the 25th and 75th percentiles (interquartile range, IQR). The ends of the whiskers are the lowest and highest values, respectively.

When data did not follow normal distribution (Figure 4C) SD or SEM could not be calculated. Bars represent the 75th percentile.

## Results

### Actions of dendrimer ABP on pro-inflammatory cytokine production by activated monocytes

The structure of dendrimer ABP (mw = 5,820 Da) is shown in Figure 1 [24-26]. We evaluated the secretion of TNFα, IL-1β, IL-6, IL-23 and IL-12 by monocytes from 12 healthy blood donors in 12 independent experiments. Monocytes were pre-incubated in the presence or the absence of dendrimer ABP, and then activated by IFN-γ, LPS and the association of LPS + IFN-γ, which is known to induce a typical M1 phenotype [5]. Data are presented as box plots in Figure 2 and in Table 1.

IFN-γ alone was not able to induce any studied cytokine. Dendrimer ABP alone induced only a modest and

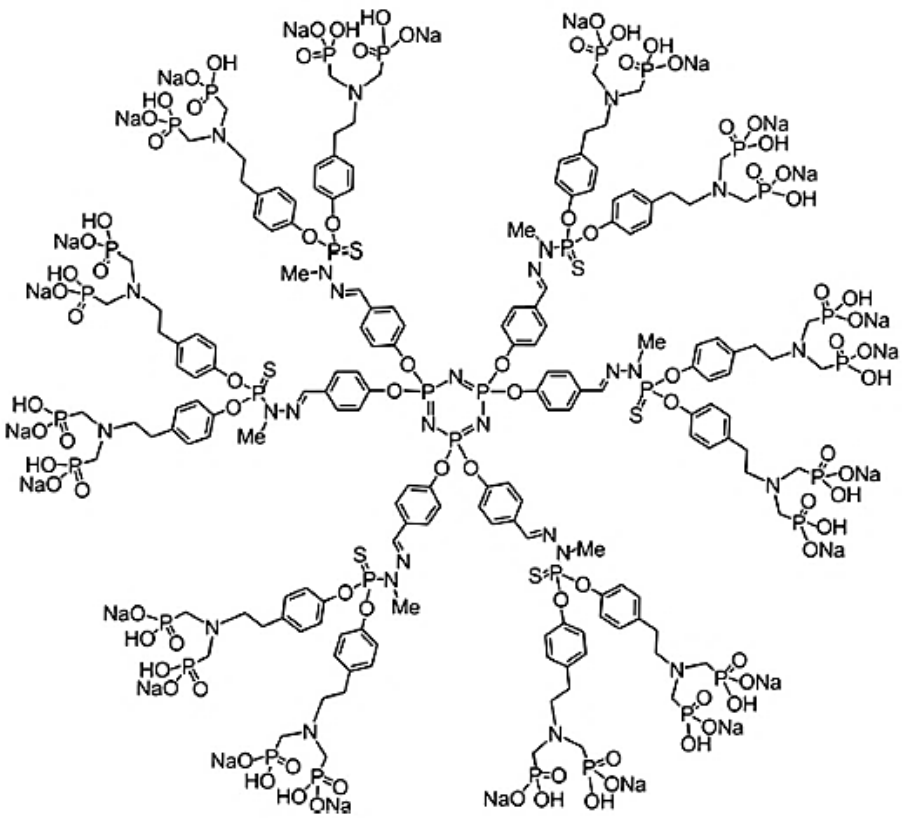


**Figure 1 Structure of dendrimer azabisphosphonate (mw = 5,820 da).**

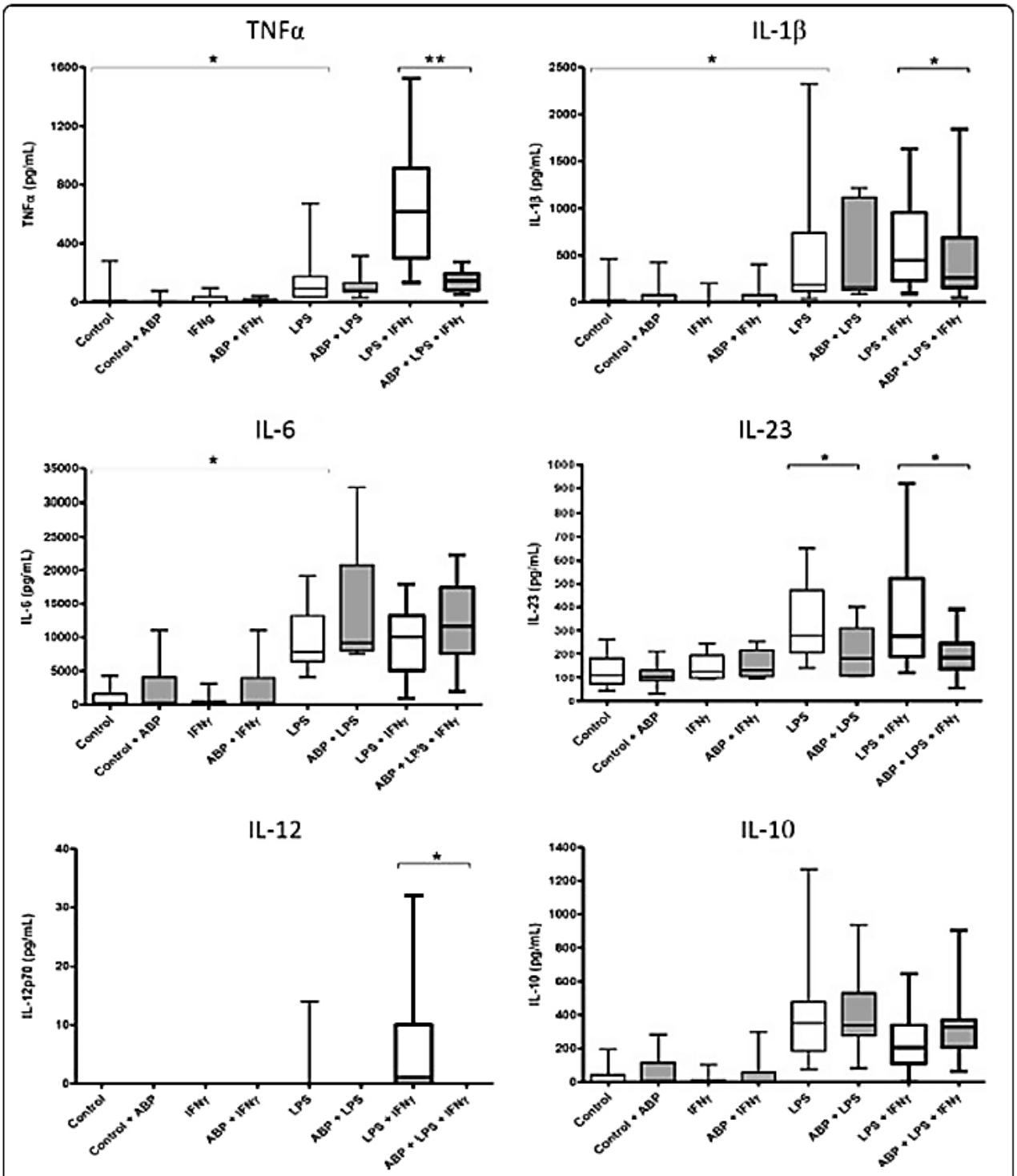



**Figure 2 Actions of dendrimer ABP on cytokine production by monocytes.** TNFα, IL-1β, IL-6, IL-23, IL-12 and IL-10 were measured in the culture supernatant of activated Mo from 12 donors. Data are presented as box plots. Activation was performed, as indicated, in the presence or in the absence of dendrimer ABP. *$P < 0.05$; **$P = 0.0005$. ABP, aza-bis-phosphonate; IL, interleukin; Mo, monocytes; TNF, tumor necrosis factor.

non-statistically significant production of IL-6. LPS alone was sufficient to induce significant secretion of TNFα , IL-1β and IL-6 by monocytes, but the association LPS + IFN-γ was required to obtain higher production of TNFα. IL-12 secretion was obtained only with the combination of LPS + IFNγ, as expected from references

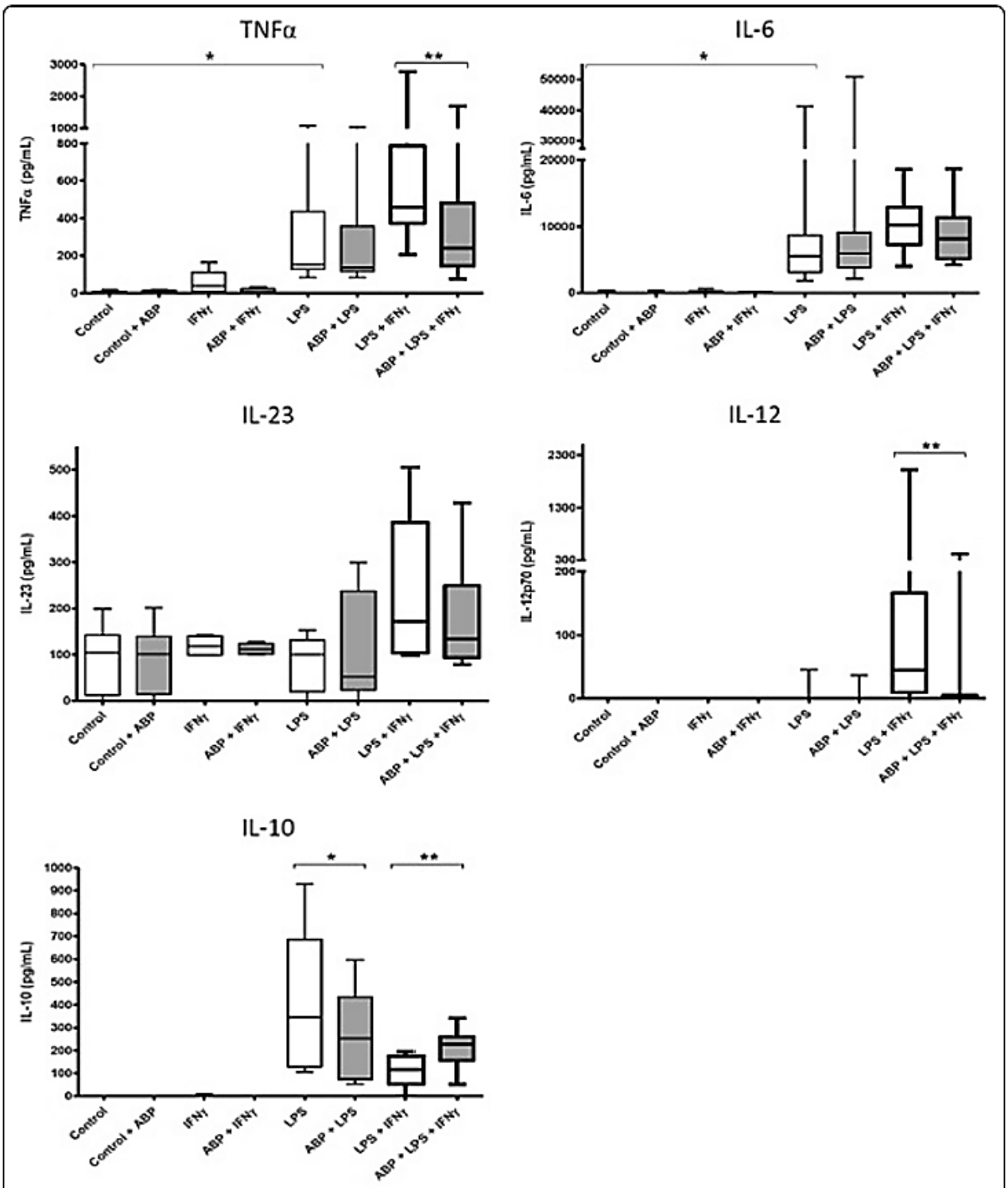



**Figure 3 Actions of dendrimer ABP on cytokine production by MoDC.** TNFα, IL-6, IL-23, IL-12 and IL-10 were measured in the culture supernatant of activated MoDC from 11 donors. Data are presented as box plots. Activation was performed, as indicated, in the presence or in the absence of dendrimer ABP. *$P$ <0.05; **$P$ <0.005. ABP, aza-bis-phosphonate; IL, interleukin; MoDC, monocyte derived dendritic cells; TNF, tumor necrosis factor.

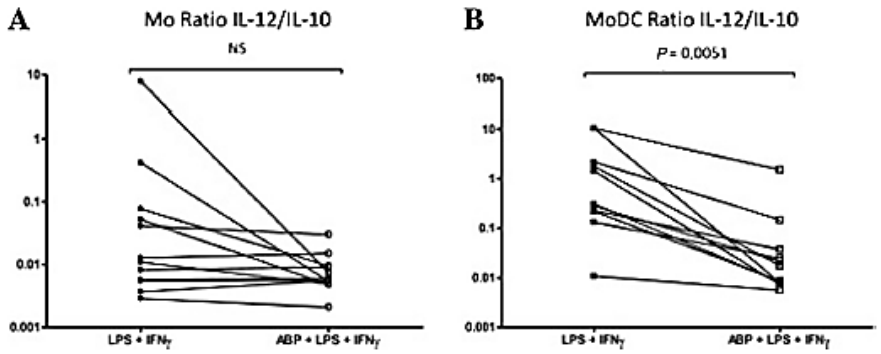



**Figure 4 Dendrimer ABP favors the IL-10 over IL-12 production in MoDC.** The ratio of IL-12 to IL-10 production in the presence or in the absence of ABP and LPS + IFN-γ +/− dendrimer ABP was calculated for Mo **(A)** and MoDC **(B)**. When IL-10 levels were not detectable, detection limit (5 pg/mL) was chosen as the denominator of the ratio. ABP, aza-bis-phosphonate; IFN-γ, interferon-gamma; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharides; Mo, monocytes; MoDC, monocyte derived dendritic cells.

[30,31], with a very heterogeneous response among the different samples.

Dendrimer ABP at 10 μM induced a profound inhibition of the production of TNFα ($P$ = 0.0005) but also a significant decrease of the secretion of IL-1β ($P$ = 0.0186). On the opposite side, we observed a slight but non-significant increase of IL-6 under the action of dendrimer ABP after stimulation of monocytes by LPS and by LPS + IFN-γ. IL-12 production was completely inhibited by dendrimer ABP ($P$ = 0.0159).

IL-23 production is mostly due to monocytes and DC activated by danger signals, such as those provided by TLRs [32]. Due to the importance of Th17 in arthritis, IL-23 production was investigated. Secretion of IL-23 by monocytes was induced in eight independent experiments (Figure 2 and Table 1). Stimulation with LPS and with LPS + IFN-γ induced IL-23 secretion. In both cases, pre-incubation with dendrimer ABP induced a significantly lower production (respectively, $P$ = 0.0431 and $P$ = 0.0360). Stimulation by IFN-γ alone did not induce IL-23 production above control. Dendrimer alone did not induce IL-23 secretion.

### Actions of dendrimer ABP on pro-inflammatory cytokine production by MoDC

Cytokine production by activated MoDC in 11 donors was measured in the same conditions as with monocytes (Figure 3) but IL-1β production was never observed, whatever the conditions (Table 1). LPS alone induced significant production of TNFα and IL-6. Dendrimer alone was never able to induce the secretion of the different cytokines. Again, dendrimer ABP has a clear-cut effect on TNFα, decreasing the production induced by LPS + IFN-γ ($P$ = 0.0033).

**Table 1 Summary of cytokine secretion by Mo and MoDC**

| Cytokines (pg/ml) | Control; median (IQR) | LPS + IFN-γ; median (IQR) | LPS + IFN-γ + ABP; median (IQR) | P |
|---|---|---|---|---|
| **Mo IL-12** | 0 (0; 0) | 1 (0; 10) | 0 (0; 0) | 0.0159 |
| **Mo IL-10** | 0 (0; 5) | 205 (110; 340) | 328 (206; 369) | ns |
| **Mo TNFα** | 0 (0; 6) | 617 (302; 912) | 147 (82: 195) | 0.0005 |
| **Mo IL-1β** | 0 (0; 4) | 448 (232; 953) | 261 (155; 688) | 0.0186 |
| **Mo IL-6** | 175 (57; 403) | 10,059 (5,074; 13,251) | 11,682 (7,537; 17,425) | ns |
| **Mo IL-23** | 115 (99; 181) | 277 (188; 521) | 184 (137; 244) | 0.036 |
| **MoDC IL-12** | 0 (0; 0) | 45 (9; 166) | 0 (0; 5) | 0.0038 |
| **MoDC IL-10** | 0 (0; 0) | 117 (53; 176) | 228 (157; 260) | 0.001 |
| **MoDC TNFα** | 0 (0; 5) | 458 (374; 786) | 241 (145, 481) | 0.0033 |
| **MoDC IL-1β** | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0, 8) | ns |
| **MoDC IL-6** | 13 (0; 29) | 10,255 (7,262, 12,864) | 8,131 (5,160; 11,310) | ns |
| **MoDC IL-23** | 130 (41; 152) | 172 (104; 386) | 134 (93; 249) | ns |

Cytokines were measured in the supernatant of Mo and MoDC cultures. Concentrations were measured in the absence of stimulation (control) and after activation with LPS + IFN-γ with or without prior incubation with dendrimer ABP. Results are from 12 (Mo) and 11 (MoDC) blood donors, respectively. ABP, aza-bis-phosphonate; IFN-γ, interferon-gamma; IL, interleukin; IQR, interquartile range; LPS, lipopolysaccharide; Mo, monocytes; MoDC, monocyte derived dendritic cells.

Only the LPS + IFN-γ stimulation was able to induce IL-23 production. However, this production was not significantly diminished by dendrimer ABP. As we observed with monocytes, MoDC produced IL-12 after stimulation with LPS and IFN-γ, with a heterogeneous response, and this production was totally inhibited by dendrimer ABP.

Stimulation by LPS or LPS + IFN-γ induced a significant IL-6 production. However, no significant decrease of IL-6 was observed in the presence of dendrimer ABP.

### Dendrimer ABP favors IL-10 over IL-12 production in MoDC

In DC, the production of IL-10 is characteristic of tolerogenic DC which possess an immunomodulatory anti-inflammatory activity. We have analyzed the secretion of both cytokines in MoDC from 11 blood donors, in 11 independent experiments (Figure 5 and Table 1). In accordance with the literature, the level of IL-10 production by MoDC was weakest in the presence of IFN-γ, which is known to inhibit IL-10 [33]. The effect of dendrimer was different according to the mode of cell activation. In the absence of IFN-γ (LPS alone) the production of IL-10 by MoDC was significantly diminished ($P = 0.0135$). However, in the LPS + IFN-γ stimulation, IL-10 production was down-regulated by IFN-γ compared to LPS alone. Dendrimer ABP prevented down-regulation of IL-10 induced in the presence of IFN-γ during TLR4 stimulation ($P = 0.001$).

Similar to Mo, IL-12 production was obtained only in the presence of LPS + IFNγ; the level of IL-12 was significantly lower in the presence of dendrimer ABP.

The resulting IL-12:IL-10 ratio was significantly decreased in MoDC stimulated by LPS + IFN-γ and pretreated by dendrimer ABP ($P = 0.0051$) (Figure 4B). This is strongly in favor of an anti-inflammatory activity.

In monocytes, a decrease of the IL-12:IL-10 ratio in the presence of dendrimer was observed but did not reach statistical significance although donors with the highest initial IL-12:IL-10 ratios were the ones which were the most affected by dendrimer ABP (Figure 4A).

### Dendrimer ABP affects the phenotype of TLR4-activated MoDC

In addition to the TCR stimulation, two other signals are indispensable for the activation of T lymphocytes: engagement of co-stimulation molecules and cytokine signaling. We thus have looked at the expression of CD80 and CD86 by MoDC in flow cytometry experiments. A decrease of CD1a and an increase of CD83 were also examined as markers of maturation. Phenotype of MoDC was controlled and found to be CD14-, CD11c+, CD1a+, CD80low and CD86low (Figure 5A). The maturation phenotype of MoDC in the presence of LPS + IFN-γ was assessed. Figure 5 shows the classical maturation phenotype obtained from nine donors in nine independent experiments (decrease of CD1a, induction of CD83, CD80, CD86). CD80 and CD86 expression was significantly lower in the presence of dendrimer ABP ($P < 0.05$) (Figure 5B, C). The expression of CD83 and CD1a was not altered by dendrimer ABP. Thus, co-stimulation may be diminished in DC in the presence of the immunomodulatory agent dendrimer ABP.

## Discussion

In this current work, we have studied how ABP dendrimer can orientate Mo and MoDC toward phenotypes capable of fighting classical pro-inflammatory stimulus mediated by LPS and IFN-γ. We showed that dendrimer ABP displays an anti-inflammatory activity by favoring the M2 phenotype and by preventing TNFα and IL-23 production by Mo in the context of pro-inflammatory stimulus. In MoDC, dendrimer ABP induced a tolerogenic phenotype by favoring the secretion of IL-10 and decreasing that of IL-12 and TNFα. Reduced expression of CD80 and CD86 was also observed. Our data suggest an immunomodulatory role of dendrimer ABP on both Mo and MoDC. This may be of importance in breaking the vicious circle of inflammation in the treatment of arthritis.

Activated monocytes/macrophages are the main producers of TNFα and IL-1β in the rheumatoid synovium. The decrease of TNFα production by Mo and MoDC is of importance with regard to RA treatment. On the one hand, TNFα is a key mediator of synovial inflammation and bone erosion [4,34]. On the other hand, it induces the production of IL-1β, which is also responsible of bone loss [35]. Whatever the mechanism, by a direct effect on IL-1β production or an indirect action through the inhibition of TNFα, dendrimer ABP induced a decrease of IL-1β production in Mo.

In Mo and MoDC put in the presence of LPS + IFN-γ, dendrimer ABP also decreased the production of IL-12 and increased IL-10, although the IL-12:IL-10 ratio was significantly decreased only in MoDC. The decrease of the IL-12:IL-10 ratio may also be in part responsible for the decrease of CD80 and CD86 expression in MoDC. In Mo, IL-12:IL-10 ratios were much lower than in MoDC and may have been difficult to modulate. Indeed, only blood donors with the highest IL-12:IL-10 ratio in Mo showed a decrease after ABP treatment. Thus, an alternative activation of Mo and MoDC is induced by dendrimer ABP. This is in accordance with previous publications on mRNA expression in Mo [26].

IL-10 is an anti-inflammatory cytokine which induces, among others, regulatory T cells Tr1 [36] and, in DC,

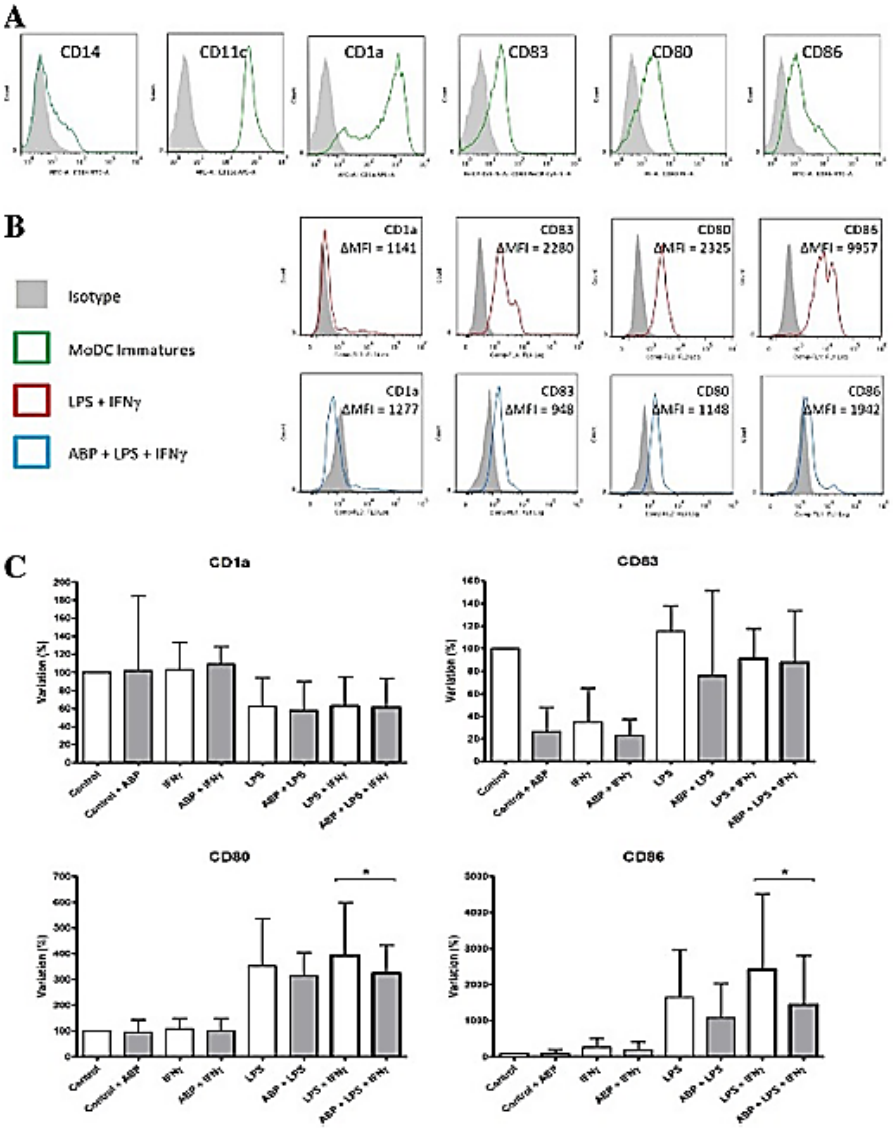



**Figure 5 Modulation of MoDC maturation by dendrimer ABP. A**. the phenotype of immature MoDC was determined by flow cytometry. Expression of CD14, CD1a, CD11c, CD83, CD80 and CD86 was evaluated after six days of differentiation in the presence of IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). These results are representative of nine donors. **B**. Phenotype of mature MoDC was determined by flow cytometry. Markers of MoDC were evaluated after incubation for 38 hours in the presence or in the absence of dendrimer ABP and LPS + IFN-γ. The phenotype of non-manipulated, immature MoDC is shown as the control. These results are representative of nine donors. Mean Fluorescence Intensity (MFI) differences between staining and isotype control are shown. **C**. Variation of expression of MoDC maturation markers CD1a, CD83, CD80 and CD86. MFI was used to measure the level of expression of markers. Data are presented as the relative percentage of expression, as compared to controls obtained in the absence of stimulation (100%). Bars correspond to the 75$^{th}$ percentile (IQR). Data are from nine donors. *$P$ <0.05. ABP, aza-bis-phosphonate; IFN-γ, interferon-gamma; IQR, interquartile range; LPS, lipopolysaccharides; MoDC, monocyte derived dendritic cells.

the decrease of co-stimulatory molecules, the inhibition of maturation, of antigen presentation and of pro-inflammatory cytokines production [33]. There is a competition between intracellular signaling of IL-10 and IFN-γ. IL-10 has been shown to inhibit STAT1 signaling and the transcription of genes of the "IFN-γ signature". On the opposite side, IFN-γ inhibits the ERK- and p38-dependent production of IL-10 by blocking the STAT3 signaling [27,37]. IL-10 production by MoDC was increased by dendrimer ABP in the context of LPS + IFN-γ signaling. We may thus hypothesize that dendrimer ABP decreases the inhibitory action of IFN-γ on IL-10 production. This is particularly illustrated by the fact that, in MoDC, ABP alone (or in the presence of LPS)

did not induce significant production of IL-10 in the absence of IFN-γ. If the orientation of dendrimer ABP-treated MoDC is tolerogenic, this should have a beneficial effect with regard to anti-RA therapeutic objectives. Thus, our current data are more informative with regard to MoDC, which are highly relevant cells in RA [38]. This trend towards IL-10 production has already been observed in arthritic mice treated with dendrimer ABP [25] and in a rat model of uveitis [39]. We make the hypothesis that dendrimer ABP possesses stronger immunomodulatory properties when IFN-γ stimulation is engaged. This is supported by the observation of dendrimer ABP effect on IL-1β in Mo and IL-6 in MoDC in the LPS + IFN-γ, but not in the context of LPS alone. The mechanism of action of dendrimer ABP on the JAK-STAT pathway remains to be investigated.

DC are most important in antigen presentation and orientation of the T cell immune response. Dendrimer ABP may participate in the immunomodulation as well, by acting on co-stimulation (decrease of CD80 and CD86) and decrease of cytokine secretion. Future experiments will determine whether the decrease of CD80 and CD86 and the decrease of IL-12 production have an impact on the T helper cell compartment.

The role of IFN-γ in RA is controversial. On the one hand, IFN-γ activates Mo/macrophages in the synovium [1]. On the other hand, mice deficient in IFN-γ receptors have accelerated collagen-induced arthritis [40] and IFN-γ inhibits the development of osteoclasts [4] and of Th17 cells [41], which are major players in arthritis. In this current study, we have used IFN-γ along with the TLR4 agonist LPS as classical tools to activate Mo to M1 polarization and induce cytokine production. Whether this reflects precisely the activation *in vivo* in RA is beyond the scope of our study.

Most of the current treatments for RA are aimed at neutralizing inflammatory cytokines. Blocking TNFα was shown in early publications to result in the inhibition of IL-1β, IL-6 and IL-8 production, thus putting TNFα at the center stage of inflammatory cytokine regulation and providing a rationale for the use of anti-TNF reagents. It is thus of interest that inhibition of TNFα production was a prominent feature of the effect of dendrimer ABP on both Mo and MoDC, although it was not followed by inhibition of IL-1β in MoDC and by inhibition of IL-6. It is of note that our setting allows for the analysis of isolated populations. However, in our previous study, the resulting effect of dendrimer ABP action in arthritic mice was a dramatic decrease of both IL-1β and IL-6 [25], suggesting a strong *in vivo* capability to decrease inflammatory cytokines involved in arthritis. In addition, our current work shows that IL-12 production was decreased in Mo and MoDC. However, IL-23 was significantly decreased only in Mo.

## Conclusion

We have added to the understanding of mechanisms of action of a potential therapeutic agent dendrimer ABP. We have confirmed that dendrimer ABP orientates Mo towards an M2 phenotype and shown that orientation of MoDC is towards a tolerogenic phenotype. Our data are in accordance with previous observations from our laboratory showing immunomodulatory and anti-osteoclastic effects [25,26]. Our data add further arguments for dendrimer ABP as a potential therapeutic agent ofor RA.

### Abbreviations

ABP: Aza-bis-phosphonate; DC: Dendritic cells; FCS: Fetal calf serum; IFN-γ: Interferon gamma; IL: Interleukin; IQR: Interquartile range; LPS: Lipopolysaccharide; MFI: Mean Fluorescence Intensity; Mo: Monocytes; MoDC: Monocytes-derived dendritic cells; PBMCs: Peripheral blood mononucleated cells; RA: Rheumatoid arthritis; TLR4: Toll-like receptor 4; TNFα: Tumor necrosis factor alpha.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

YD contributed to the study conception and design, data collection and analysis, manuscript writing and final approval of the manuscript. SF, MB and DN were responsible for data collection and analysis, critical revision and final approval of the manuscript. COT and AMC contributed to conception and design, critical revision and final approval of manuscript. RP, AC and JLD contributed to conception and design, data analysis, manuscript writing and final approval of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. All authors have given final approval of the version to be published. They agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

### Acknowledgements

We thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive and Valérie Duplan-Eche from the Flow Cytometry Facilities of CPTP.

### Funding support

This work was supported by Grants from INSERM-CNRS and Pfizer Passerelle grant to JLD. YD was supported by a fellowship from Société Française de Rhumatologie for his Master Research work.

### Author details

[1]Centre de Rhumatologie, CHU PURPAN, 1 Place Baylac, 31300 Toulouse, France. [2]INSERM U1043 - CNRS UMR 5282, CPTP, Université Paul Sabatier, Toulouse, France. [3]Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, Toulouse, France.

Received: 8 October 2013 Accepted: 1 April 2014
Published: 18 April 2014

### References

1. Firestein GS: Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003, 423:356–361.
2. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA: Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* 2007, 9:202.
3. Bartok B, Firestein GS: Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010, 233:233–255.
4. Takayanagi H: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007, 7:292–304.
5. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004, 25:677–686.

6. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM: Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006, **80**:1298–1307.
7. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, **392**:245–252.
8. Manicassamy S, Pulendran B: Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev* 2011, **241**:206–227.
9. Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004, **5**:987–995.
10. Huang QQ, Sobkoviak R, Jockheck-Clark AR, Shi B, Mandelin AM 2nd, Tak PP, Haines GK 3rd, Nicchitta CV, Pope RM: Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. *J Immunol* 2009, **182**:4965–4973.
11. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H: Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000, **164**:558–561.
12. Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR: Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2006, **176**:7021–7027.
13. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Götte M, Malle E, Schaefer RM, Gröne HJ: The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 2005, **115**:2223–2233.
14. Smiley ST, King JA, Hancock WW: Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001, **167**:2887–2894.
15. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC: Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002, **195**:99–111.
16. Tsan MF, Gao B: Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004, **76**:514–519.
17. Musiani M, Zerbini M, Ferri S, Plazzi M, Gentilomi G, La Placa M: Comparison of the immune response to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1987, **46**:837–842.
18. Gaudreault E, Fiola S, Olivier M, Gosselin J: Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J Virol* 2007, **81**:8016–8024.
19. Murawski MR, Bowen GN, Cerny AM, Anderson LJ, Haynes LM, Tripp RA, Kurt-Jones EA, Finberg RW: Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J Virol* 2009, **83**:1492–1500.
20. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW: Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003, **77**:4588–4596.
21. Lotz M, Roudier J: Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: cellular and molecular aspects. *Rheumatol Int* 1989, **9**:147–152.
22. Toussirot E, Roudier J: Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008, **22**:883–896.
23. Akira S, Takeda K, Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001, **2**:675–680.
24. Poupot M, Griffe L, Marchand P, Maraval A, Rolland O, Martinet L, L'Faqihi-Olive FE, Turrin CO, Caminade AM, Fournie JJ, Majoral JP, Poupot R: Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation. *FASEB J* 2006, **20**:2339–2351.
25. Hayder M, Poupot M, Baron M, Nigon D, Turrin CO, Caminade AM, Majoral JP, Eisenberg RA, Fournie JJ, Cantagrel A, Poupot R, Davignon JL: A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. *Sci Transl Med* 2011, **3**:81ra35.
26. Fruchon S, Poupot M, Martinet L, Turrin CO, Majoral JP, Fournie JJ, Caminade AM, Poupot R: Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer. *J Leukoc Biol* 2009, **85**:553–562.
27. Hu X, Chakravarty SD, Ivashkiv LB: Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev* 2008, **226**:41–56.
28. Wittmann M, Zwirner J, Larsson VA, Kirchhoff K, Begemann G, Kapp A, Gotze O, Werfel T: C5a suppresses the production of IL-12 by IFN-gamma-primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes. *J Immunol* 1999, **162**:6763–6769.
29. Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994, **179**:1109–1118.
30. Hayes MP, Wang J, Norcross MA: Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* 1995, **86**:646–650.
31. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML: High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998, **10**:1593–1598.
32. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ: Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006, **27**:17–23.
33. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001, **19**:683–765.
34. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL: TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000, **106**:1481–1488.
35. Wei S, Teitelbaum SL, Wang MW, Ross FP: Receptor activator of nuclear factor-kappa b ligand activates nuclear factor-kappa b in osteoclast precursors. *Endocrinology* 2001, **142**:1290–1295.
36. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK: Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001, **182**:68–79.
37. Saraiva M, O'Garra A: The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010, **10**:170–181.
38. Lutzky V, Hannawi S, Thomas R: Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. *Arthritis Res Ther* 2007, **9**:219.
39. Fruchon S, Caminade AM, Abadie C, Davignon JL, Combette JM, Turrin CO, Poupot R: An azabisphosphonate-capped poly(phosphorhydrazone) dendrimer for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Molecules* 2013, **18**:9305–9316.
40. Manoury-Schwartz B, Chiocchia G, Bessis N, Abehsira-Amar O, Batteux F, Muller S, Huang S, Boissier MC, Fournier C: High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* 1997, **158**:5501–5506.
41. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT: Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005, **6**:1123–1132.

doi:10.1186/ar4546
**Cite this article as:** Degboé et al.: Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent. *Arthritis Research & Therapy* 2014 16:R98.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

# Résultats supplémentaires

## 4. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Le tri des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) à partir de sang de patients atteints de PR et buffy coats de sujets sains, la sélection positive des monocytes, la génération des macrophages dérivés de monocytes, l'activation des macrophages, le dosage des cytokines et le marquage membranaire pour la cytométrie de flux sont détaillés dans le ***Chapitre Résultats - Article 1***.

Le schéma général expérimental est le suivant ***(Figure 27)***.

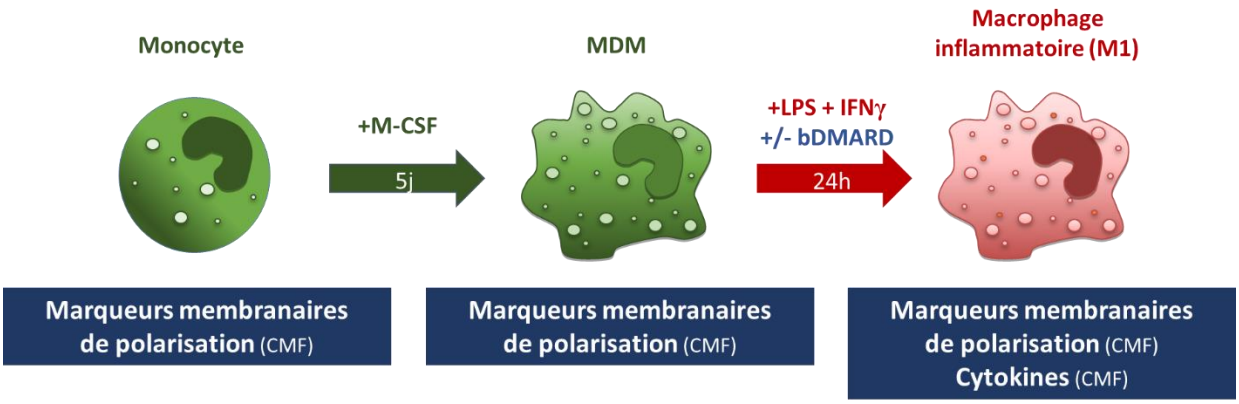



***Figure 27. Schéma expérimental.*** *MDM : Macrophage dérivé de monocytes. bDMARD : biothérapie (ADA, ETA, TCZ, RTX, ABA) utilisée à 10 µg/mL. CMF : Cytométrie de flux.*

### 4.1. Viabilité des macrophages en présence de bDMARDs

#### 4.1.1. Objectif

Evaluer la mortalité cellulaire induite en présence des différents bDMARDs utilisés au cours de la différenciation ou de l'activation inflammatoire des macrophages.

#### 4.1.2. Matériels et méthodes

Les macrophages (MDM) ont été générés à partir de monocytes de 20 patients atteints de PR et de 30 sujets sains. Ces MDM ont été exposés aux différents bDMARDs (ADA, ETA, TCZ, abatacept/ABA, RTX) utilisés à 10 µg/mL durant : (i) les 5 jours de la phase de différenciation, (ii) ou les 24h d'activation inflammatoire ultérieure par LPS et IFNγ.

La viabilité a été évaluée :

- Morphologiquement sur les paramètres cytométriques FSC et SSC (tous les PR et sujets sains).

- Par marquage annexine V + iodure de propidium (Apoptosis detection kit, BD Pharmigen), selon les recommandations du fournisseur (n = 3 sujets sains).

### 4.1.3. Résultats

Evaluation de la viabilité des macrophages *(Figure 28).*

L'évaluation concomitante morphologique et par marquage fonctionnel (annexine V/iodure de propidium) a été réalisée chez 3 donneurs sains, en conditions de différenciation et d'activation inflammatoire.

L'évaluation morphologique des macrophages en cytométrie de flux a révélé 2 sous populations :

- Une sous-population avec FSC (taille) élevée et SSC (granulosité) élevée
- Une sous-population avec FSC faible (lo) et SSC élevée (hi).

La sous population $FSC^{hi}$ $SSC^{hi}$ correspondait majoritairement aux cellules viables doubles négatives pour le marquage annexine V/iodure de propidium.

La sous-population $FSC^{lo}$ $SSC^{hi}$ correspondait majoritairement aux cellules non viables positives pour le marquage annexine V/iodure de propidium.

Il existait donc une bonne corrélation entre la viabilité des macrophages évaluée par l'aspect morphologique en cytométrie de flux et la viabilité évaluée par double marquage annexine V/iodure de propidium en cytométrie de flux.

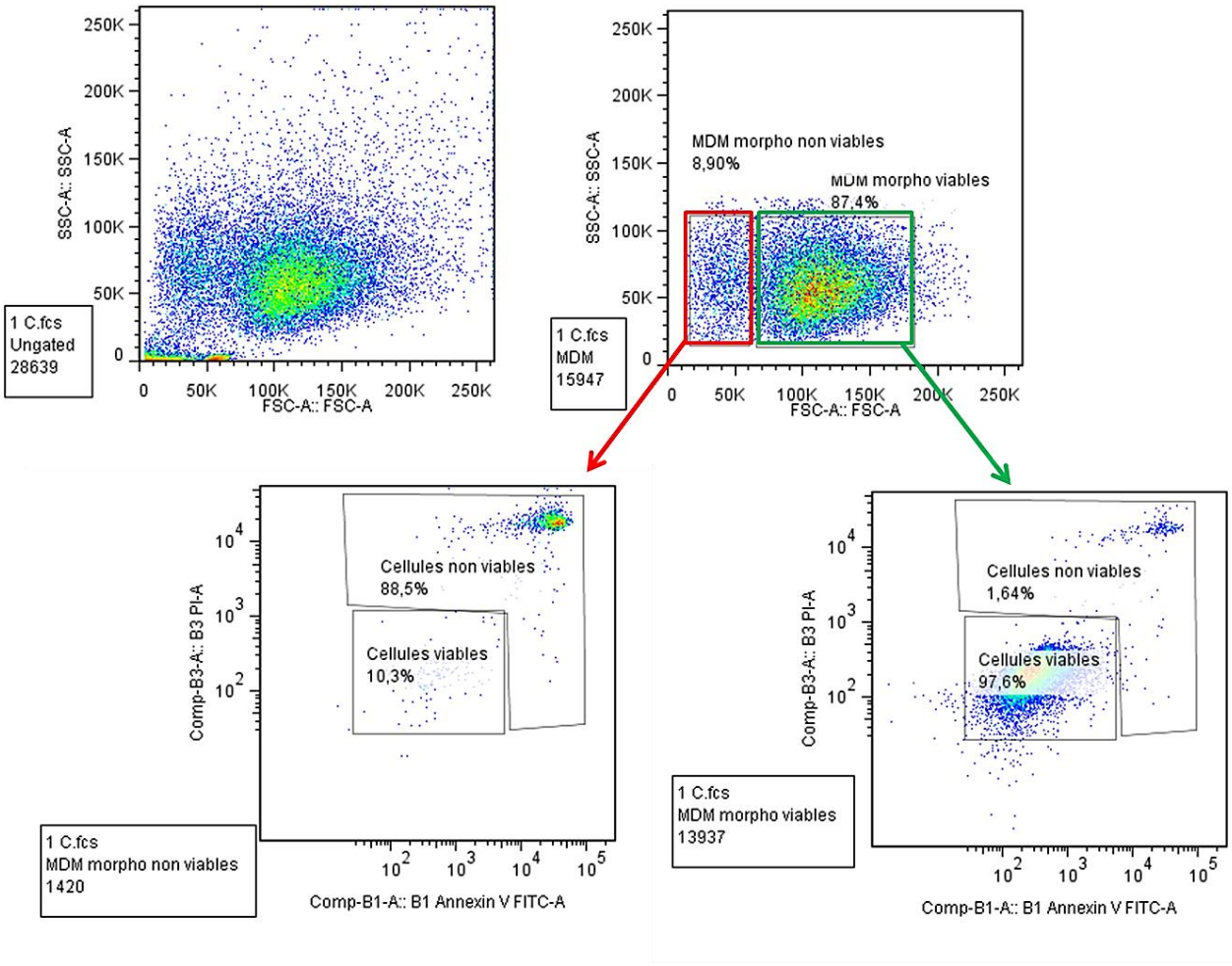



*Figure 28. Evaluation de la viabilité des macrophages. Expérience représentative (n=3 expériences).*

Viabilité des macrophages différenciés en présence de bDMARDs *(Figure 29)*

Le processus de différenciation en présence ce M-CSF induit une mortalité cellulaire modérée de l'ordre de 10%.

La présence de bDMARDs ne modulait pas cette mortalité faible.

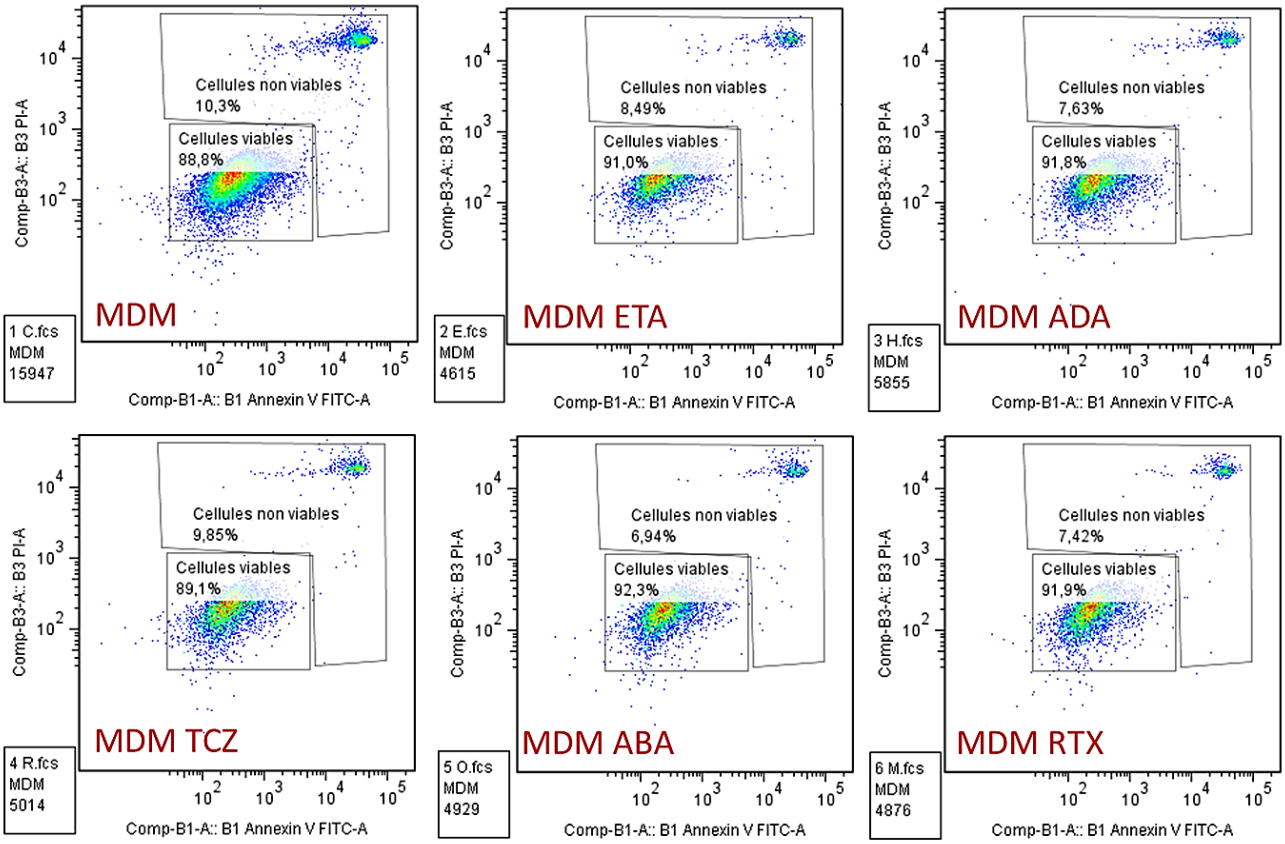



***Figure 29. Evaluation de la viabilité des macrophages différenciés en présence de bDMARDs.*** *Expérience représentative (n=3 expériences).*

Viabilité des macrophages inflammatoires activés en présence de bDMARDs *(Figure 30)*

Contrairement au processus de différenciation, le processus d'activation inflammatoires (M1) induisait une mortalité importante de l'ordre de 50%.

Lors de l'évaluation au terme des 24h d'activation, les cellules susceptibles à l'apoptose étaient en phase d'apoptose tardive (annexine $V^+$ iodure de propidium$^+$)

Les anti-TNF diminuaient de manière importante (facteur 3) le niveau d'apoptose.

Les autres bDMARDs n'avaient pas d'impact majeur sur l'apoptose induite par l'activation inflammatoire des macrophages.

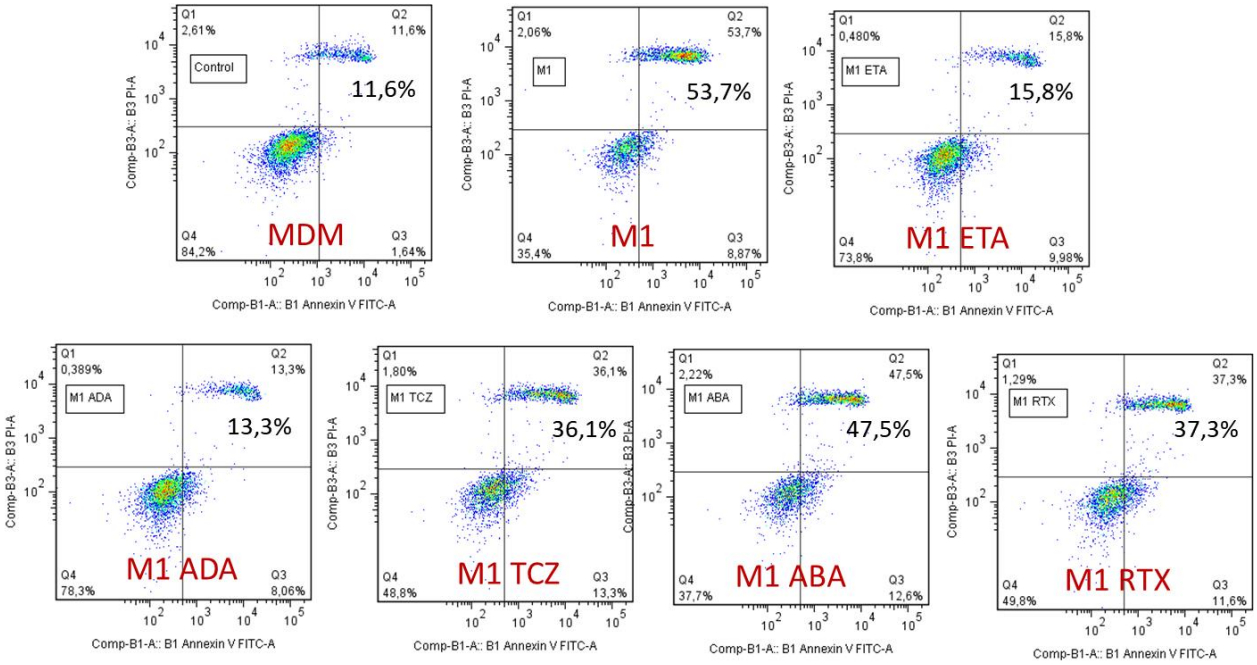



*Figure 30. Evaluation de la viabilité des macrophages inflammatoires activés en présence de bDMARDs. Expérience représentative (n=3 expériences).*

### 4.1.4. Discussion

À 10 µg/mL, les bDMARDs de la PR n'induisaient pas d'apoptose directe des MDM, que ce soit lors d'une exposition longue (5j de différenciation) ou plus courte (24h d'activation). Il semblait exister un effet protecteur des anti-TNF qui limitaient l'apoptose des macrophages inflammatoires. Ce phénomène peut être expliqué par une protection contre l'AICD. En effet, les macrophages inflammatoires produisent du TNF et la liaison de celui-ci au TNFR1, exprimé en abondance sur les macrophages, permet une signalisation par son domaine de mort, aboutissant à la mort cellulaire [23, 24]. La neutralisation du TNF limiterait cette signalisation. L'on ne peut toutefois pas exclure la possibilité d'une apoptose induite par ADCC ou CDC qui nécessiterait un système incluant respectivement des cellules NK et du complément [300].

## 4.2. Effet des bDMARDs sur les marqueurs membranaires de polarisation exprimés au décours de la différenciation de macrophages issus de patients atteints de PR *(Figure 31)*

### 4.2.1. Objectif

Evaluer l'effet des bDMARDs sur la polarisation des macrophages obtenus au terme de la différenciation *in vitro* en présence de M-CSF.

### 4.2.2. Matériels et méthodes

Les MDM ont été différenciés à partir de monocytes de 13 patients atteints de PR. Ces MDM ont été exposés aux différents bDMARDs (ADA, ETA, TCZ, RTX) utilisés à 10 µg/mL durant les 5 jours de la phase de différenciation.

La polarisation obtenue au terme des 5j de différenciation a été évaluée par cytométrie de flux en analysant les marqueurs membranaires CD40, CD80, CD64, CD16, CD163, MerTK, CD206, CD200R.

### 4.2.3. Résultats

Les MDM obtenus en présence de M-CSF présentaient des caractéristiques de macrophages alternatifs : $CD40^{lo}$ $CD80^{lo}$ $CD64^{+}$ $CD16^{+}$ $CD163^{hi}$ $MerTK^{hi}$ $CD206^{hi}$ $CD200R^{+}$.

L'ADA et le RTX diminuaient significativement la faible expression de CD40. Il n'y avait pas d'impact des traitements sur l'expression extrêmement faible de CD80.

Les anti-TNF ne modulaient pas de manière similaire les FcR. L'ADA augmentait l'expression membranaire de CD64 et diminuait celle de CD16 alors que l'ETA diminuait significativement le CD64 et n'avait pas d'impact significatif sur CD16. Le TCZ et le RTX augmentaient significativement l'expression de CD64.

Nous n'avons pas observé de modulation franche de l'expression de CD163 et MerTK en présence des différents traitements.

Nous avons par contre observé une augmentation des marqueurs M2 associés à l'IL-4 (CD206 et CD200R), en présence d'anti-TNF.

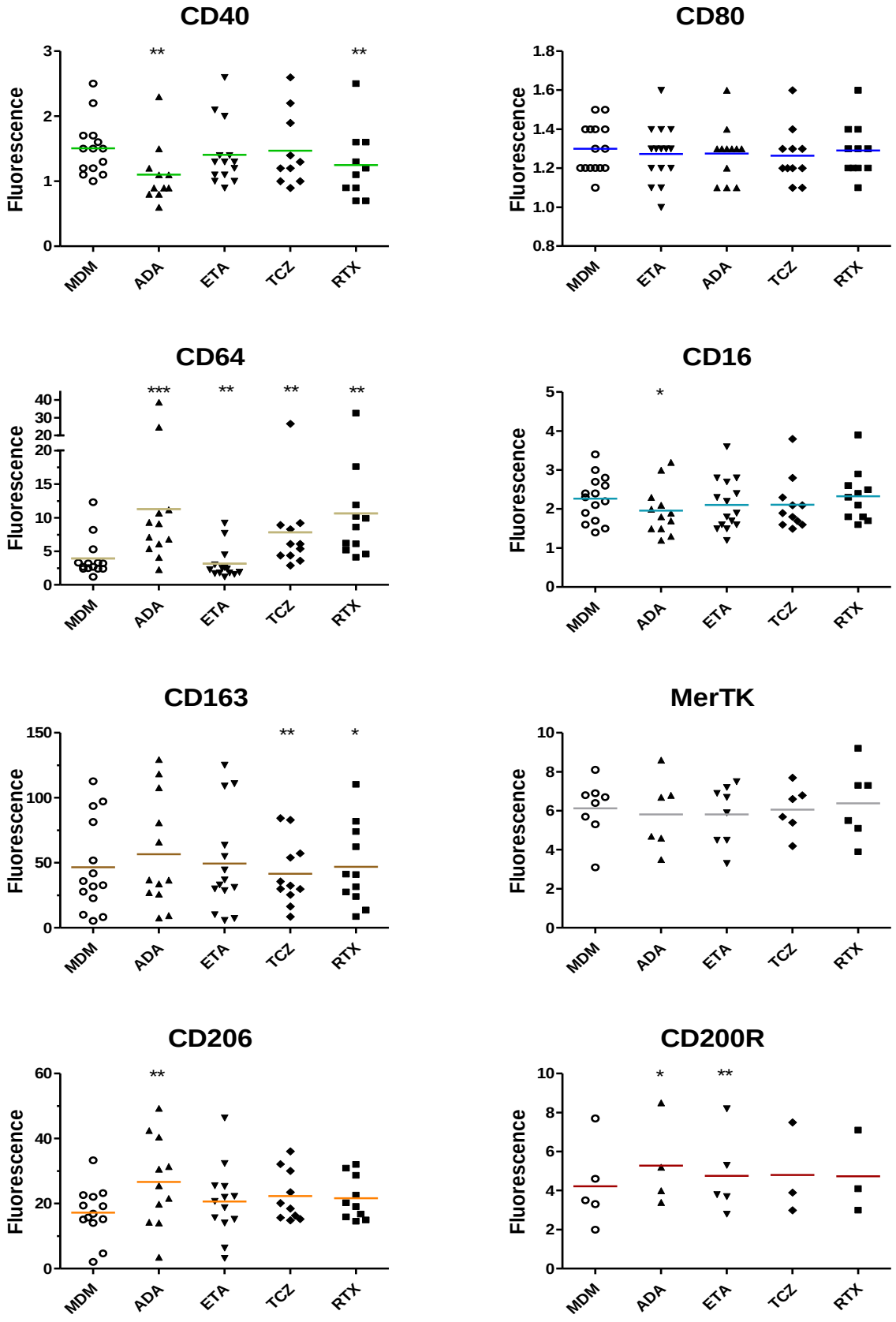



*Figure 31. Effet des bDMARDs sur les marqueurs membranaires de polarisation exprimés au décours de la différenciation de macrophages de patients atteints de PR.*

### 4.2.4. Discussion

En l'absence de contexte inflammatoire, les anti-TNF semblaient favoriser une polarisation alternative des macrophages en augmentant l'expression des marqueurs membranaires associés à l'IL-4. Il n'y avait pas d'effet franc sur les marqueurs M2 associés à l'IL-10 (CD16, CD163, MerTK) comme cela a été observé en contexte inflammatoire M1 ***(Chapitre Résultats)***. Cette discordance suggère que :

- L'observation faite en contexte inflammatoire était la résultante de la modulation du rétrocontrôle négatif de l'inflammation par les anti-TNF, dépendant de l'axe IL-10/STAT3 et de SOCS3 ***(Chapitre Résultats)***, qui théoriquement ne sont pas mis en jeu dans la situation de différenciation.
- L'induction de marqueurs alternatifs liés à l'IL-4 n'était pas observée en situation inflammatoire potentiellement du fait d'une stimulation inflammatoire *in vitro* intense (> 50% mortalité cellulaire) et de l'orientation vers un autre phénotype (lié à l'IL-10) dont les caractéristiques et programmes transcriptionnels sont *in vitro* théoriquement mutuellement exclusifs.

## 4.3. Effet des bDMARDs sur les marqueurs membranaires de polarisation exprimés au décours de la différenciation de macrophages issus de sujets sains *(Figure 32)*

### 4.3.1. Objectif

Evaluer l'effet des bDMARDs sur la polarisation des macrophages obtenus au terme de la différenciation in vitro en présence de M-CSF.

### 4.3.2. Matériels et méthodes

Les MDM ont été différenciés à partir de monocytes de 19 sujets sains. Ces MDM ont été exposés aux différents bDMARDs (ADA, ETA, TCZ, RTX) utilisés à 10 µg/mL durant les 5 jours de la phase de différenciation.

La polarisation obtenue au terme des 5j de différenciation a été évaluée par cytométrie de flux en analysant les marqueurs membranaires CD40, CD80, CD64, CD16, CD163, MerTK, CD206, CD200R.

### 4.3.3. Résultats

Les MDM obtenus en présence de M-CSF présentaient des caractéristiques de macrophages alternatifs : $CD40^{lo}$ $CD80^{-}$ $CD64^{+}$ $CD16^{+}$ $CD163^{hi}$ $MerTK^{hi}$ $CD206^{hi}$ $CD200R^{+}$.

L'ADA, l'ETA et le RTX diminuaient significativement la faible expression de CD40. Il n'y avait pas d'impact des traitements sur l'expression extrêmement faible de CD80.

Les anti-TNF ne modulaient pas de manière similaire les FcR. L'ADA augmentait l'expression membranaire de CD64 et de CD16 alors que l'ETA diminuait significativement le CD64 et n'avait pas d'impact significatif sur CD16. L'ADA avait un effet opposé sur l'expression de CD16 chez les patients et les sujets sains. Le TCZ et le RTX augmentaient significativement l'expression de CD64.

Nous n'avons pas observé de modulation significative de l'expression de CD163 en présence des différents traitements. Toutefois l'absence de significativité de l'augmentation avec les anti-TNF semblait lié à un manque de puissance statistique.

Comme pour les patients, nous avons observé une augmentation des marqueurs M2 associés à l'IL-4 (CD206 et CD200R), en présence d'anti-TNF.

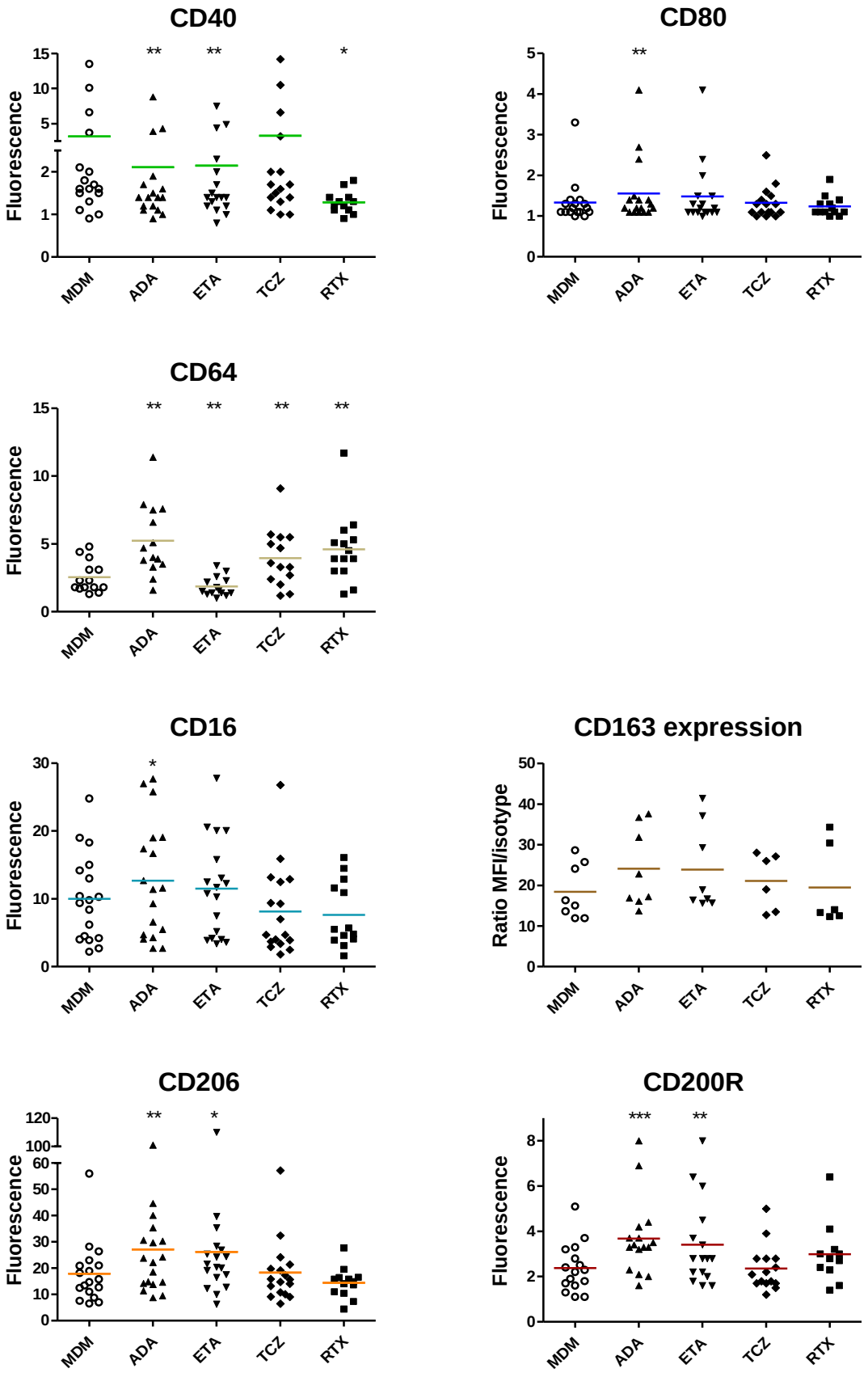



*Figure 32. Effet des bDMARDs sur les marqueurs membranaires de polarisation exprimés au décours de la différenciation de macrophages de sujets sains.*

### 4.3.4. Discussion

En l'absence de contexte inflammatoire, les anti-TNF semblaient favoriser une polarisation alternative des macrophages en augmentant l'expression des marqueurs membranaires associés à l'IL-4. De manière intéressante, la modulation du CD16 par l'ADA n'était pas similaire entre patients et sujets sains, laissant suggérer que l'expression de ce marqueur n'a pas les mêmes significations et conséquences biologiques dans les 2 populations. Nos expériences n'ont pas été élaborées pour répondre à cette question.

## 4.4. Effet de l'abatacept sur les marqueurs membranaires de polarisation des macrophages issus de monocytes de sujets sains *(Figure 33, Tableau 4)*

### 4.4.1. Objectifs

Evaluer l'effet de l'ABA sur les marqueurs membranaires et cytokiniques de polarisation des macrophages différenciés et activés (M1) en présence de ce traitement.

### 4.4.2. Matériels et méthodes

Les MDM ont été différenciés à partir de monocytes de 19 sujets sains. Ces MDM ont été exposés à ABA utilisé à 10 µg/mL, durant les 5 jours de la phase de différenciation ou les 24h de la phase d'activation inflammatoire (LPS + IFNγ) subséquente.

La polarisation a été évaluée par cytométrie de flux en analysant les marqueurs membranaires CD40, CD80, CD64, CD16, CD163, MerTK, CD206, CD200R.

La concentration des cytokines (TNF, IL-6, IL-12, IL-10) des surnageants de culture de MDM ayant eu une activation inflammatoire durant 24h, a été évaluée en cytométrie (Cytometric Bead Array), selon les recommandations du fournisseur.

### 4.4.3. Résultats

En condition de différenciation ***(Figure 33A)***, l'ABA n'avait pas d'impact sur l'expression virtuellement nulle de CD80, mais diminuait significativement l'expression modérée de CD64. Il n'y avait aucune modulation des autres marqueurs étudiés. En condition inflammatoire ***(Figure 33B)***, l'ABA diminuait drastiquement l'expression des marqueurs CD80 et CD64. Il n'y avait aucune modulation des autres marqueurs membranaires étudiés.

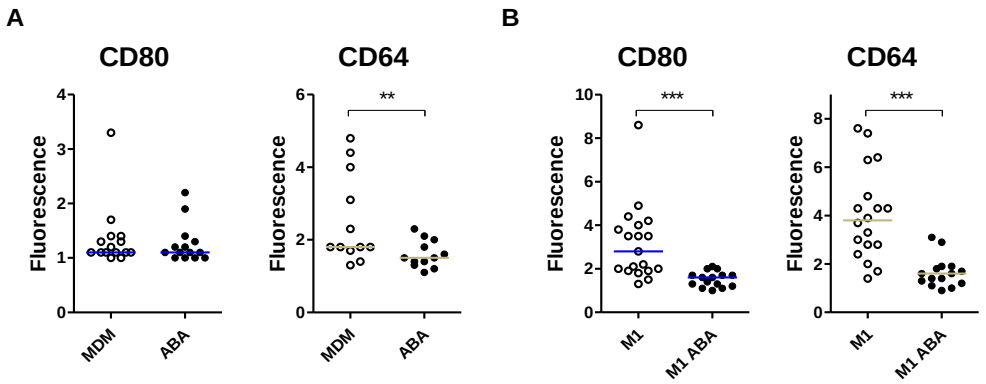


*Figure 33. Effet de l'abatacept sur les marqueurs de polarisation exprimés par les macrophages différenciés (A) et activés (B) en présence du traitement.*

L'ABA diminuait significativement l'expression des cytokines de l'inflammation TNF, IL-6 et IL-10 (rétrocontrôle négatif) ***(Tableau 4)***. Il n'avait pas d'impact significatif sur la faible production d'IL-12 en condition inflammatoire.

| (N=11) | TNF | IL-6 | IL-12 | IL-10 |
|---|---|---|---|---|
| MDM | 3.4 (5.4) | 17.5 (25.4) | 0.4 (0.7) | 8.7 (5.4) |
| M1 | 3237 (3019) | 2228 (1526) | 18.1 (11.3) | 875.2 (453.4) |
| M1 ABA | 2042 (2130) | 1595 (1177) | 16.0 (11.3) | 741.2 (367.1) |
| P-value | 0.0186 | 0.0049 | NS | 0.0312 |

***Tableau 4. Sécrétion de cytokines par les macrophages en présence d'abatacept.*** *ABA : abatacept ; MDM : macrophages dérivés de monocytes. M1 : macrophages inflammatoires activés par LPS + IFNγ. IL : interleukine. Les concentrations sont exprimées en pg/mL (moyenne et écart type). N= 11 sujets sains. P value de la comparaison par un test de Wilcoxon apparié, des concentrations obtenues avec les macrophages inflammatoires (M1) et les macrophages inflammatoires traités par abatacept (M1 ABA).*

### 4.4.4. Discussion

La diminution de l'expression de CD80 et CD64, marqueurs augmentés en situation inflammatoire suggère une réduction de la polarisation inflammatoire du macrophage par l'ABA avec donc un effet direct du CTLA4-Ig sur la CPA exprimant CD80/86. Nos résultats concernant l'expression de CD80 sont concordants avec les observations de Cutolo *et al.* obtenues sur des macrophages synoviaux, des cellules THP-1, ainsi qu'en coculture THP-1/Jurkat [342, 343]. Toutefois, la réduction du marquage de CD80 peut aussi être interprétée comme une compétition entre le CTLA4-Ig et l'anticorps anti-CD80 utilisé. Une analyse de l'expression de l'ARNm de CD80 permettra de répondre à cette question.

L'induction d'une polarisation moins inflammatoire en présence d'ABA est confirmée fonctionnellement par la réduction significative de la production des cytokines inflammatoires (TNF, IL-6). Ces résultats concordent avec ceux du groupe de Cutolo qui a montré que des concentrations élevées d'ABA (100 et 500 µg/mL) permettait (i) une diminution des ARNm du TNF et de l'IL-6, (ii) et une réduction de ces cytokines visualisées en immunohistochimie [342, 343].

### 4.5. Sous-populations monocytaires de patients atteints de PR et de sujets sains *(Figure 34)*

#### 4.5.1. Objectif

Quantifier les différentes sous-populations monocytes de patients atteints de PR et de sujets sains.

#### 4.5.2. Matériels et méthodes

Les PBMC de patients atteints de 16 PR et 21 sujets sains ont été marqués par un anticorps anti-CD16 et un anticorps anti-CD14 afin d'identifier les différentes sous-populations monocytaires en cytométrie de flux.

#### 4.5.3. Résultats

Les patients atteints de PR présentent une augmentation de la sous-population de monocytes intermédiaires $CD14^{+}$ $CD16^{+}$, aux dépens des monocytes classiques $CD14^{++}$ $CD16^{-}$ *(Figure 34)*.

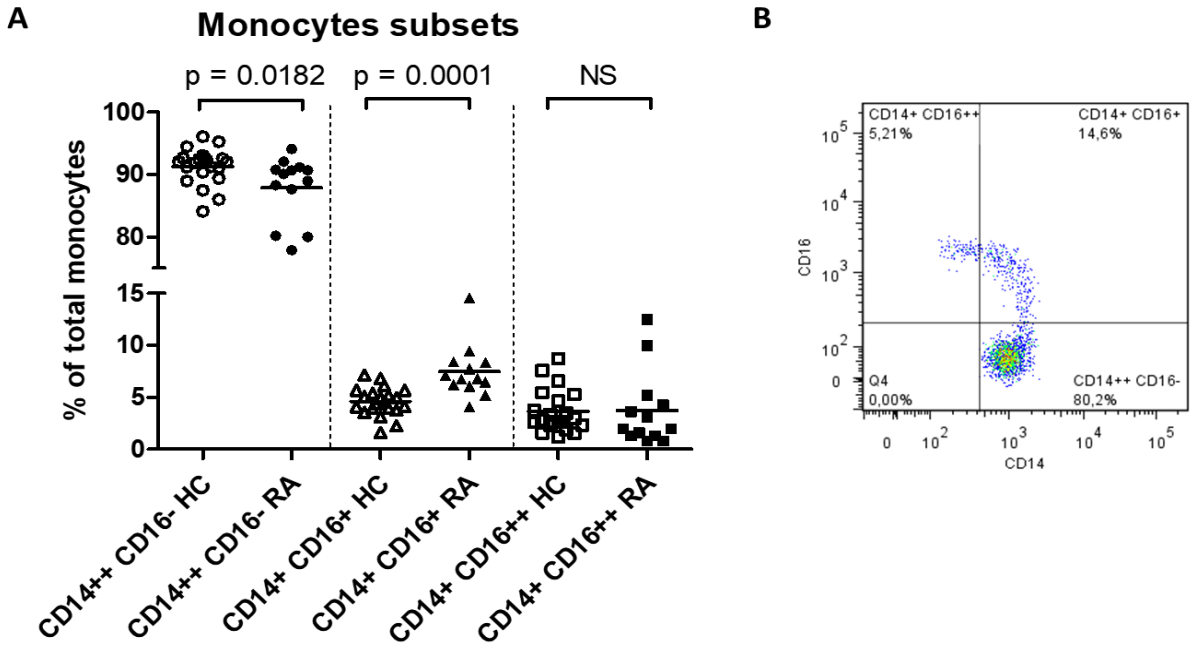



*Figure 33. Sous-populations monocytaires circulantes des patients atteints de PR et de sujets sains. HC : sujets sains. RA : patients atteints de PR. CD : Cluster of differentiation.*

#### 4.5.4. Discussion

Notre observation d'une augmentation de la population de monocytes intermédiaires au cours de la PR est concordante avec les données de la littérature [94, 95].

### 4.6. Corrélation activité clinique /marqueurs membranaires des monocytes/macrophages *(Figure 34)*

#### 4.6.1. Objectifs

Evaluer la corrélation entre les marqueurs membranaires des monocytes/macrophages et l'activité clinique de la PR au moment du prélèvement.

#### 4.6.2. Matériels et méthodes

Pour cette analyse, nous avons aussi inclus les patients avec un DAS28 <3.2.

Nous avons évalué par cytométrie de flux :

- Au sein des monocytes (PBMC) de patients atteints de PR : les 3 sous-populations monocytaires discriminées par le CD14 et le CD16, le pourcentage de cellules CD16+, l'intensité de fluorescence de CD16.
- Le niveau d'expression des marqueurs membranaires CD40, CD80, CD64, CD16, CD163, MerTK, CD206, CD200R de macrophages non activés (MDM) et de macrophages inflammatoires (M1) ou alternatifs (M2(IL4) et M2(IL10)) de patients atteints de PR

Les patients inclus ont bénéficié d'une évaluation de l'activité de la PR (Disease Activity Score : DAS28 ESR et DAS28 CRP) le jour du prélèvement (v1). Le DAS28 est un score composite d'activité de la PR incluant un paramètre inflammatoire biologique courant : la vitesse de sédimentation (ESR) ou la C Reactive Protein (CRP). Le détail des critères d'inclusion/exclusion est fourni au ***Chapitre Résultats – Article 1***. *Nota bene* : pour cette analyse, nous avons aussi inclus des patients avec un DAS28 à l'inclusion <3.2 (activité faible de la maladie).

La corrélation entre le niveau d'expression des marqueurs membranaires et du DAS28 à l'inclusion a été évaluée par le coefficient de corrélation R de Pearson en cas de variables de distribution gaussienne, et par le coefficient de corrélation R de Spearman en cas de variables à distribution non gaussienne.

#### 4.6.3. Résultats

Dix-sept patients étaient éligibles pour une évaluation de la corrélation entre l'activité clinique à l'inclusion et l'expression des marqueurs monocytaires (3 sous-populations discriminées par le CD14 et le CD16, pourcentage de cellules $CD16^{+}$, intensité de fluorescence de CD16). Aucun des paramètres cytométriques des monocytes n'était significativement corrélé à l'activité clinique à l'inclusion. Le

coefficient R de Pearson de l'association avec le pourcentage de cellules CD16+ était de 0.3972 avec le DAS28 ESR (p=0.1426) et 0.3798 avec le DAS28 CRP (p=0.1327). Le coefficient de R de Spearman de l'association avec le pourcentage de monocytes intermédiaires était de 0.0945 pour le DAS28 ESR (p=0.7479) et de 0.2384 pour le DAS28 CRP (p=0.3739).

Seize patients étaient éligibles pour une évaluation de la corrélation entre l'activité clinique à l'inclusion et l'expression des marqueurs macrophagiques. Parmi les marqueurs de polarisation étudiés dans les 4 conditions (MDM, M1, M2(IL4), M2(IL10)), seul le niveau d'expression membranaire de CD16 était significativement corrélé à l'activité clinique de la PR ***(Figure 34A)***. Le niveau d'expression de CD16 était significativement plus faible lors de l'activation inflammatoire M1 et augmenté après activation alternative M2(IL10).

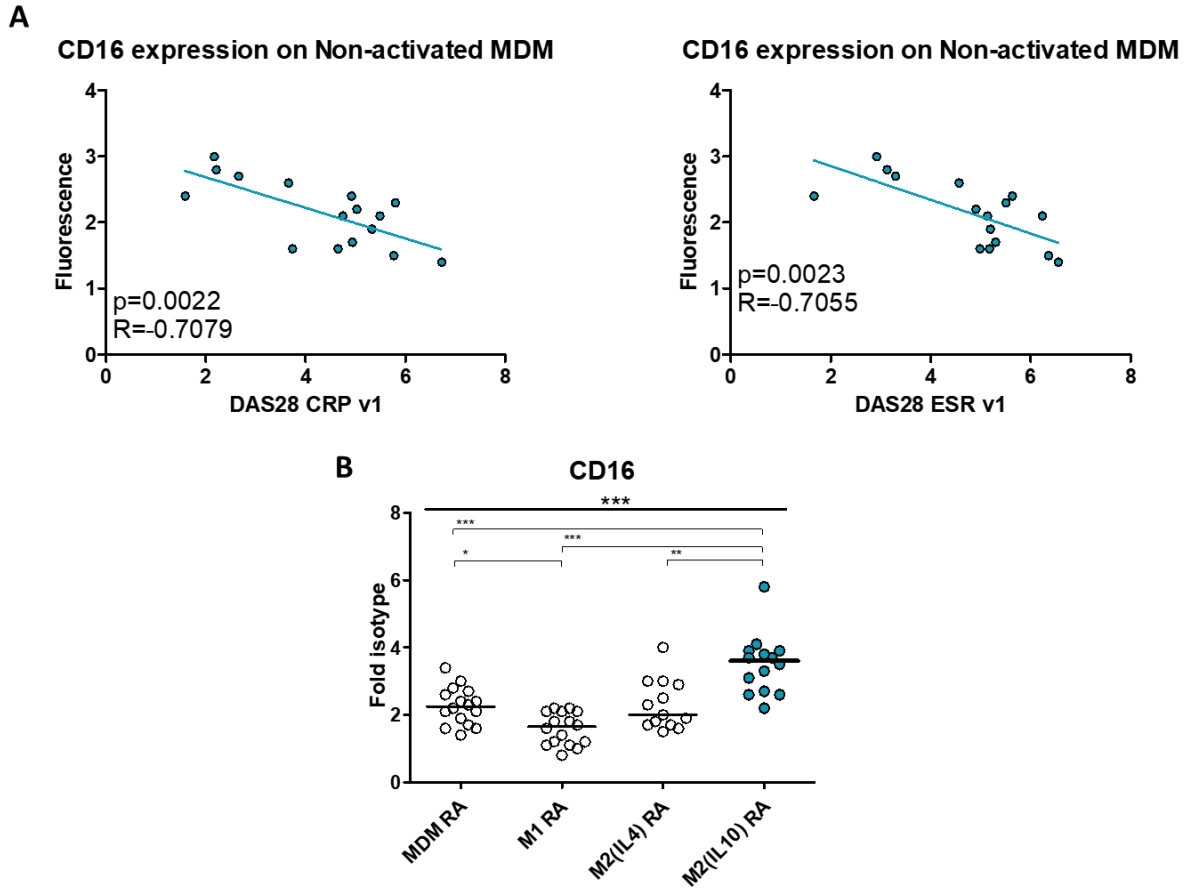



***Figure 34. Corrélation entre les marqueurs de polarisation des macrophages et l'activité de la maladie à l'inclusion.*** *RA : patients atteints de PR. CD : Cluster of differentiation. v1 : visite d'inclusion. R : coefficient de corrélation de Pearson. (A) Niveau d'expression de CD16 sur les macrophages non activés et activés. (B) Corrélation entre l'expression de CD16 des macrophages non activés et l'activité de la maladie à l'inclusion (score DAS28 ESR et DAS28 CRP).*

### 4.6.4. Discussion

Contrairement aux travaux de certains auteurs [95, 97, 217, 218], nous n'avons pas observé de corrélation entre la fréquence des monocytes intermédiaires et l'activité de la maladie à l'inclusion (données non présentées). Cette discordance pourrait être expliquée par un manque de puissance (effectifs plus élevés certaines de ces études), par des méthodologies d'analyse différentes (positionnement des fenêtres de cytométrie, analyse dichotomique actif vs non actif plutôt que régression linéaire, corrélation avec la CRP et non le DAS28) et par des populations différentes (critères ACR 1987, sous prednisone, ancienneté de la PR, ligne thérapeutique).

Nous considérons que la corrélation négative entre l'expression du CD16 sur les macrophages et l'activité de la PR est cohérente la modulation de ce marqueur en fonction de l'environnement cytokinique. L'expression de CD16 sur le macrophage est spécifiquement induite en condition alternative en présence d'IL-10 et réduite en condition inflammatoire M1. Un niveau faible serait donc représentatif d'un environnement plus inflammatoire, compatible avec une PR plus active.

### 4.7. Corrélation pronostic clinique/marqueurs membranaires *(Figure 34)*

#### 4.7.1. Objectifs

Evaluer la corrélation entre marqueurs membranaires et cytokiniques de polarisation des monocytes/macrophages et l'activité clinique après 3 mois de traitement.

#### 4.7.2. Matériels et méthodes

Nous avons évalué par cytométrie de flux :

- Au sein des monocytes (PBMC) les 3 sous-populations monocytaires discriminées par le CD14 et le CD16, le pourcentage de cellules $CD16^+$, l'intensité de fluorescence de CD16 de patients atteints de PR.
- Le niveau d'expression des marqueurs membranaires CD40, CD80, CD64, CD16, CD163, MerTK, CD206, CD200R de macrophages non activés (MDM) et de macrophages inflammatoires (M1) ou alternatifs (M2(IL4) et M2(IL10)) de patients atteints de PR.

Les patients inclus ont bénéficié d'une évaluation de l'activité de la PR (score DAS28 ESR et DAS28 CRP) le jour du prélèvement et après 3 mois de traitement. Le détail des critères d'inclusion/exclusion est fourni au ***Chapitre Résultats – Article 1***. Nota bene : seuls les patients avec un DAS28 initial > 3.2 ont été retenus pour cette analyse.

La corrélation entre le niveau d'expression des marqueurs membranaires et du DAS28 après 3 mois de traitement a été évaluée par le coefficient de corrélation R de Pearson en cas de variables de distribution gaussienne, et par le coefficient de corrélation R de Spearman en cas de variables à distribution non gaussienne.

#### 4.7.3. Résultats

Douze patients étaient éligibles pour une évaluation de la corrélation entre l'activité clinique à l'inclusion et l'expression des marqueurs membranaires : 8 ont été analysés pour la corrélation avec les marqueurs membranaires monocytaires et 11 ont été analysés pour la corrélation avec les marqueurs macrophagiques.

Les traitements introduits ont été l'ETA pour 8 patients, l'ADA pour 2 patients, le GOL (golimumab) pour 1 patient, le CZP pour 1 patient.

Les caractéristiques des patients sont rappelées dans le ***tableau 5***. La population de l'étude est majoritairement féminine, avec une maladie sévère (érosive) et active, de durée d'évolution prolongée, pour laquelle il a été introduit un anti-TNF en première ligne dans 75% des cas et en seconde ligne dans 25% des cas. Quatre des 12 patients analysés bénéficiaient d'une corticothérapie concomitante ≤10 mg/j d'équivalent prednisone.

| Caractéristiques à l'inclusion (n = 12 patients) | |
|---|---|
| Âge moyen (SD ; min-max) | 66.3 (12.6 ; 41.7 – 85.0) |
| Femmes (%) | 7 (58.3) |
| Durée d'évolution moyenne en années (SD ; min-max) | 11.5 (10.3 ; 1-33) |
| Ligne thérapeutique : 1ère (%)/2e (%) | 9 (75.0) / 3 (25.0) |
| Nombre de patients avec PR érosive (%) | 9 (75.0) |
| Nombre de patients sous cortisone (%) | 4 (33.3) |
| DAS28 ESR | 5.1 (0.9) |
| DAS28 CRP | 4.7 (1.0) |
| ESR (mm/h) | 29.4 (22.1) |
| CRP (mg/L) | 13.8 (16.8) |
| Nombre moyen de leucocytes/mm$^3$ (SD) | 8153 (3028) |
| Nombre moyen de monocytes /mm$^3$ (SD) | 575 (260) |
| Nombre de patients ACPA+ (%) | 10 (83.3) |
| Nombre de patients FR+ (%) | 10 (83.3) |
| **Caractéristiques à 3 mois de traitement** | |
| DAS28 ESR | 3.5 (1.8) |
| DAS28 CRP | 3.2 (1.5) |
| ESR (mm/h) | 22.3 (34.8) |
| CRP (mg/L) | 8.5 (11.3) |

| | |
|---|---|
| Patients avec diminution DAS28ESR ou DAS28 CRP ≥ 1.2 point (%) | 7 (58.3) |
| Patients avec DAS28ESR ou DAS28 CRP < 3.2 (%) | 7 (58.3) |

*Tableau 5. Caractéristiques des patients à l'inclusion et à 3 mois de traitement par anti-TNF. SD : écart type. PR : polyarthrite rhumatoïde. ESR : vitesse de sédimentation. CRP : C Reactive Protein. DAS28 : Disease Activity Score 28.*

Cinquante-huit % des patients ont eu sous anti-TNF une évolution favorable, définie par une diminution du DAS28 ESR ou du DAS28 CRP ≥1.2 point, ou un DAS28 à 3 mois <3.2 correspondant à une activité faible de la maladie *(Tableau 5, Figure 35)*.

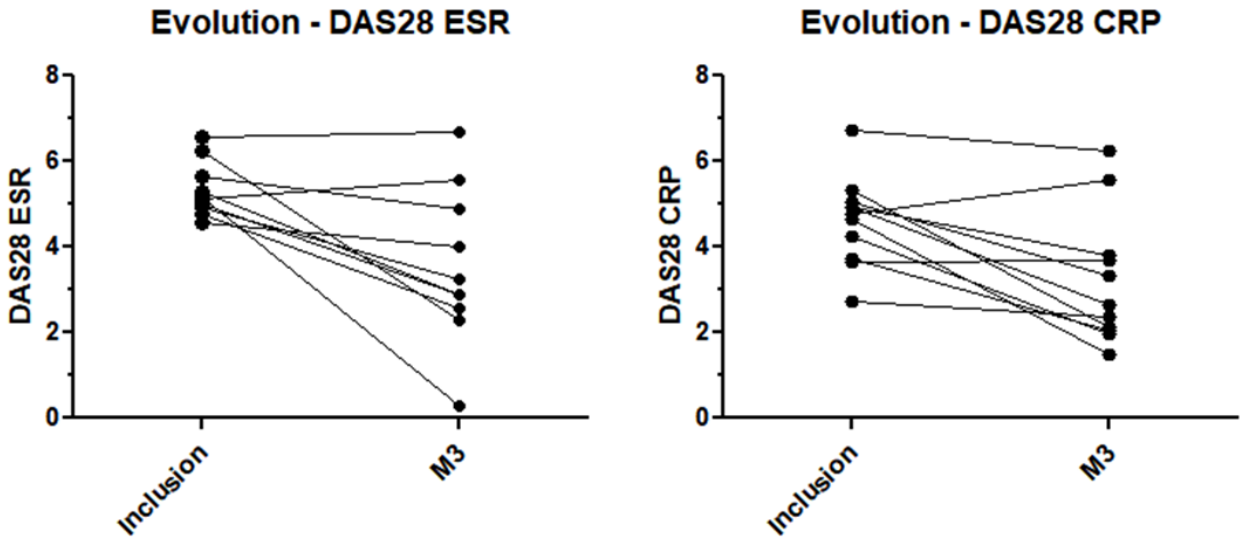



*Figure 35. Evolution de l'activité de la PR par patient. DAS28 : Disease Activity Score. ESR : Vitesse de sédimentation. CRP : C Reactive Protein. M3 : évaluation à 3 mois de traitement.*

Aucun des marqueurs monocytaires (3 sous-populations discriminées par le CD14 et le CD16, pourcentage de cellules CD16$^{+}$, intensité de fluorescence de CD16) des 8 patients éligibles n'a été retrouvé corrélé significativement l'activité clinique à 3 mois de traitement (données non présentées).

Aucun des marqueurs de polarisation macrophagiques évalués dans les différentes conditions d'activation chez les 11 patients éligibles n'a été retrouvé corrélé significativement à l'activité clinique à 3 mois (données non présentées). Nous noterons uniquement une tendance non significative à une corrélation positive entre l'expression de CD206 des macrophages M1 et le DAS28 CRP à 3 mois (R = 0.6500; p = 0.0581).

### 4.7.4. Discussion

Dans cette analyse, les patients ont présenté des taux de réponse thérapeutique similaires aux niveaux attendus. Nous avons pris le parti d'évaluer le DAS28 ESR et le DAS28 CRP. Il n'y avait pas de discordance entre les deux scores. De plus il n'y avait pas non plus de discordance entre la réponse clinique définie par une diminution du DAS28 ≥ 1.2 point, et celle définie par un DAS28 à 3 mois < 3.2.

Nous n'avons pas retrouvé d'association entre les différents marqueurs monocytaires ou macrophagiques évalués à l'inclusion et la réponse clinique ultérieure à 3 mois. Nos résultats restent toutefois limités par un manque de puissance notable lié aux faibles effectifs. Le recrutement de patients pour cette étude transversale est en cours. De même, l'étude de la corrélation entre la réponse clinique et l'expression des différents marqueurs de polarisation exprimés *in vitro* en présence de bDMARD (majoritairement anti-TNF) est en cours. Ces résultats sont trop préliminaires pour être présentés ici.

# Discussion générale et perspectives

## 5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu montrer que :

- Les agents anti-TNF induisaient *in vitro* une modification fonctionnelle des macrophages inflammatoires de patients atteints de PR, en favorisant une polarisation alternative de manière IL-10/STAT3 dépendante.
- L'expression du marqueur membranaire de polarisation alternative M2(IL10) CD16, était inversement corrélé à l'activité de la PR à l'inclusion.
- Le certolizumab pégol, un agent anti-TNF, induisait un phénotype non inflammatoire, alternatif, chez les monocytes, mettant en jeu le mécanisme Nrf2-dépendant de protection contre le stress oxydatif.
- Le dendrimère aza-bisphosphonate, un potentiel agent thérapeutique ciblant le monocyte ayant fait la preuve de son efficacité dans l'arthrite murine, induisait une polarisation alternative chez des monocytes et des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC) activés de manière inflammatoires.

### 5.1. Etude de l'influence des bDMARDs de la PR sur la polarisation du macrophage

Dans ce travail, pour des raisons de facilité d'accès au matériel d'étude, nous avons privilégié un modèle de génération *ex vivo* de macrophages (MDM) plutôt que l'étude directe de macrophages synoviaux. Notre modèle réductionniste nous a cependant semblé pertinent pour l'étude de la contribution des macrophages infiltrants inflammatoires différenciés à partir de monocytes.

En présence d'agents anti-TNF, nous avons observé l'induction d'une polarisation alternative de nature différente en fonction du contexte. En contexte inflammatoire : les anti-TNF majoraient le rétrocontrôle négatif de l'inflammation faisant intervenir l'IL-10 avec un phénotype « M2(IL10) like ». Hors contexte inflammatoire, il existait une augmentation des marqueurs membranaires retrouvés habituellement dans la polarisation M2(IL4). Il nous faudra définir les mécanismes mis en jeu dans cette dernière observation, en analysant la signature transcriptomique mise en jeu (PPARγ-dépendante et indépendante (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)) et en confirmant fonctionnellement ce résultat (majoration de la phagocytose CD206 dépendante, interaction CD200/CD200R).

Nous avons décrit *ex vivo* un mécanisme IL-10/STAT3-dépendant de polarisation alternative des macrophages inflammatoires en présence d'anti-TNF. Son existence *ex vivo* ne démontre pas sa mise

en jeu *in vivo*. Il nous faudra donc en démontrer la réalité in vivo. Une des approches possibles est l'analyse directe de la signalisation IL-10 chez des patients atteints de PR avant et après mise en route traitement. De plus, nous supposons que l'effet bénéfique des anti-TNF passe par une modulation de la plasticité des macrophages sous anti-TNF, favorisant la polarisation M2(IL10). Une analyse de leur polarisation (sans stimulation et avec polarisation induite *ex vivo*) avant et après mise en route du traitement, montrant une plus forte polarisation M2(IL10) sous traitement efficace confirmerait notre hypothèse.

La signalisation IL-10/STAT3 est semble-t-il critique dans la permissivité du monocyte à la tuberculose [344]. En effet, *Mycobacterium tuberculosis* induit une expansion des monocytes non classiques $CD14^{+}CD16^{+}$, augmentation corrélée à la sévérité de la tuberculose stratifiée sur l'atteinte thoracique radiographique [345]. Ces monocytes atypiques ont la particularité fonctionnelle d'être réfractaires à la différenciation en cellule dendritique [346] et déficients pour l'activation des lymphocytes T [347]. Le biais de la niche monocytaire, lors de l'infection par *M. tuberculosis*, s'exprime aussi au sein des macrophages. Le sécrétome de *M. tuberculosis* favorise la différenciation des monocytes humains vers un phénotype alternatif $CD16^{+}CD163^{+}MerTK^{+}pSTAT3^{+}$ [344]. Ce phénomène est principalement (mais pas exclusivement) dépendant de la production d'IL-10 par les macrophages infectés et utilise l'axe de signalisation IL-10/STAT3. Au cours de notre travail sur l'effet des bDMARDs sur la polarisation des macrophages inflammatoires, nous avons pu observer un biais similaire vers un phénotype M(IL10). Nos résultats, s'ils sont confirmés fonctionnellement chez des patients atteints de PR développant une tuberculose sous anti-TNF, permettraient de mettre en évidence un nouveau mécanisme expliquant la susceptibilité des patients sous anti-TNF à la tuberculose.

Nous n'avons pas observé d'effet majeur du TCZ sur la polarisation des macrophages issus de patients atteints de PR, alors que la molécule a un effet sur la production d'IL-6, de TNF voire l'expression de CD206 chez les macrophages inflammatoires issus de sujets contrôles. Un des éléments de réponse à cette discordante pourrait être pharmacologique. Il est possible qu'à la concentration utilisée (10 µg/ml) l'anti-IL-6 récepteur (TCZ) ne parvienne pas à antagoniser l'action du niveau trois fois plus élevé de d'IL-6 observé chez les PR comparativement aux sujets sains. Par ailleurs, les patients traités par TCZ présentent dans les premiers jours suivant l'injection du traitement, une boucle de rétrocontrôle positif de l'IL-6 et de son récepteur soluble [348]. Ce phénomène a été observé chez les patients traités pour PR ou pour une maladie de Castleman et dans une moindre mesure chez les sujets sains. Dans cette population contrôle, la concentration initiale d'IL-6 était 20 fois plus basse et son accroissement nettement moins important. L'augmentation subséquente du taux sérique d'IL-6 ne se traduit pas par une aggravation clinique du fait de la concentration saturante de traitement. Notre observation est

potentiellement le reflet de la contribution plus importante des macrophages rhumatoïdes à ce rétrocontrôle positif de l'IL-6, comparativement aux cellules de sujets contrôles.

Nos observations demandent à être étendus. Plusieurs axes de développement sont possibles :

- Evaluer l'effet des traitements dans un modèle de stimulation plus physiopathologique incluant du sérum de patient (ACPA+ et ACPA-) ou du liquide synovial de patient. Ce type de système permettrait de mieux refléter les stimuli auxquels sont respectivement exposés les monocytes sanguins et macrophages synoviaux au cours de la PR.
- Evaluer le comportement de monocytes/macrophages synoviaux cultivés en présence de bDMARD. Une possibilité envisageable est l'utilisation de cellules monocytaires du liquide synovial. Ces cellules $CD14^{+}MMP12^{+}EGLN3^{+}CCR2^{+}IGF1^{-}HTR2B^{-}$ présentent un phénotype inflammatoire [349]. Toutefois, elles s'apparentent plus à des monocytes inflammatoires qu'à des macrophages et leur rôle précis dans la synovite rhumatoïde reste à définir.
- Recourir à un système de coculture de type PBMC pour évaluer l'impact sur le compartiment sanguin ou macrophages + synoviocytes + lymphocytes pour évaluer le compartiment synovial. Nous avons souhaité éviter ce type d'approche en première intention afin de faciliter l'identification d'effets spécifiques sur les macrophages. Au stade actuel d'avancée de notre travail, ce système est envisageable et permettrait (i) d'intégrer les différents effecteurs de la PR, (ii) et potentiellement de mettre en évidence des effets inopérants en l'absence d'interaction cellule-cellule (macrophage – non macrophage).

### 5.2. Etude du lien entre les marqueurs de polarisation du macrophage et l'activité de la PR

L'objectif ultime de notre travail était d'évaluer si le paradigme de la polarisation du macrophage pouvait être utilisé dans une perspective théranostique. Nous avons évalué la performance d'un modèle réductionniste de génération de MDM. Ce modèle est discutable, plusieurs alternatives étaient possibles (PBMC, stimulation par liquide synovial ou sérum, cocultures, travail sur cellules synoviales etc), mais il nous est rapidement apparu qu'aucun modèle ne serait totalement satisfaisant et qu'un modèle simple serait plus facile à mettre en œuvre pour un test théranostique.

Notre modèle nous a permis de montrer une bonne corrélation entre l'expression de CD16 des MDM non activés et l'activité de la maladie à l'inclusion. CD16 est un marqueur de macrophage polarisé M(IL10) et en tant que tel, son expression est diminuée dans un environnement inflammatoire (M1). La corrélation négative observée est donc cohérente avec l'expression préférentielle de ce marqueur dans un environnement favorisant la résolution de l'inflammation, tel qu'attendu chez les patients

présentant une PR moins/peu active. Les autres marqueurs modulés ex vivo par les agents anti-TNF (M1 : CD40, CD80 ; M(IL10) : CD163, MerTK) n'étaient pas corrélés à l'activité de la maladie. Compte tenu de la cinétique d'expression variable selon les marqueurs membranaires envisagés [350], il n'est pas exclu qu'une analyse à un autre temps eut permis de mettre en évidence une corrélation significative.

Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression des marqueurs de surface des macrophages et le pronostic thérapeutique à 3 mois. Pour cette analyse, les effectifs pris en compte étaient moins importants (données non présentées). Un manque de puissance statistique peu expliquer l'absence de résultat significatif. Comme pour la corrélation des marqueurs avec l'activité de la maladie à l'inclusion, nous ne pouvons exclure une influence de la cinétique d'apparition des marqueurs sur nos résultats. Enfin, il est possible que notre modèle, où les cellules analysées ne sont plus natives car modifiées par des apports cytokiniques *in vitro*, atténue une partie de l'empreinte de la maladie sur le phénotype des macrophages. Quoi qu'il en soit, bien que ce phénomène d'atténuation soit probable, nous avons tout de même observé des différences significatives dans la plasticité des macrophages et dans le niveau de production de cytokines en fonction de leur origine (sang frais de PR *vs* buffy coat contrôles), laissant supposer que l'atténuation n'est pas complète malgré une semaine de manipulation *in vitro*.

Nous avons choisi d'optimiser le modèle en intégrant la présence de l'anti-TNF du patient, *in vitro* (données non présentées). Nos observations suggèrent une corrélation possible entre l'expression membranaire de CD16 (corrélation négative) et CD206 (corrélation positive) à la surface de macrophages MDM et M1 cultivés en présence de l'anti-TNF utilisé en vie réelle par le patient, et son pronostic thérapeutique à 3 mois (DAS28). Nous ne pouvons toutefois pour l'instant pas tirer de conclusion. En effet, les effectifs sont trop faibles (n=7-8 patients homogènes selon le marqueur). Le recrutement est en cours. Nos résultats, s'ils se confirment après augmentation des effectifs, seraient cohérents avec l'effet *in vitro* des anti-TNF sur la polarisation du macrophage :

- Les anti-TNF augmentant l'expression membranaire de CD16, ce marqueur serait plus faiblement induit *in vitro* chez les patients ne répondant pas à la biothérapie à 3 mois.
- Les anti-TNF ne modulant pas l'expression de CD206 en condition inflammatoire, ni son expression en condition d'activation M(IL4) (données non présentées, n=6 sujets sains), les patients pour lesquels ce profil phénotypique serait le plus marqué répondraient moins aux anti-TNF.

Par ailleurs, il est prévu d'analyser aussi la corrélation de la concentration des cytokines (TNF, IL-6, IL-12, IL-10) du surnageant de culture de macrophages M1 traités *in vitro*, avec l'activité de la maladie à 3

mois. Une des limites de notre travail est que cette analyse, telle qu'elle est engagée, sera uniquement réalisée au temps 24 heures.

Nous avons identifié que l'effet *in vitro* des anti-TNF sur les macrophages, passait par l'induction d'une signalisation précoce IL-10/STAT3 dépendante. Nous supposons que la mise en jeu de ce mécanisme de rétrocontrôle négatif de l'inflammation est fondamentale pour l'effet du traitement et potentiellement inopérante chez les patients non répondeurs. Auquel cas, il serait probable que l'analyse de cette signalisation précoce de l'IL-10 soit l'élément le plus discriminant, dans notre modèle, en termes théranostiques.

### Etude du reverse signalling induit par le certolizumab pégol, un agent anti-TNF

Ce travail a mis en évidence un effet anti-inflammatoire (diminution de l'ARNm et de la protéine IL-1β, diminution de la production de ROS induite par le LPS) du CZP, passant par une modulation de la production de ROS *via* Nrf2. Cette observation fait écho aux différentes publications montrant un effet anti-inflammatoire de la signalisation Nrf2 [351]. Nous avons montré que l'anti-TNF induisait un pic précoce de ROS. Nous supposons que cette production de ROS a un rôle de second messager induisant la mise en place d'une protection contre le stress oxydatif et des effets anti-inflammatoires. En termes de mécanisme, notre hypothèse est que l'anti-TNF agit par reverse signalling via sa fixation sur le mTNF. Plusieurs études sont en cours au sein du laboratoire pour faire la preuve de concept de l'existence du reverse signalling et caractériser ses conséquences fonctionnelles. Nous souhaitons démontrer que :

- Le reverse signalling est mis en jeu *in vitro* et *in vivo* dans l'arthrite murine, en présence d'anti-TNF.
- Evaluer son impact sur la polarisation du macrophage.
- Evaluer la pertinence de Nrf2 en tant que marqueur du reverse signalling.
- Evaluer l'intérêt théranostique de Nrf2 et plus largement du reverse signalling.

### Etude de l'effet du dendrimère ABP sur la polarisation des cellules de la lignée monocytaire

Le dendrimère ABP est une molécule d'intérêt thérapeutique dans la PR [352]. Nous avons pu montrer sa capacité à inhiber l'activation inflammatoire des monocytes et des MoDC et à induire un phénotype alternatif. Ces résultats sont complémentaires des données du laboratoire montrant une la sélectivité du dendrimère ABP pour les monocytes [353], sa capacité à induire une activation « M2-like » hors

contexte inflammatoire [354] et sa capacité à inhiber l'arthrite murine (IL-1ra$^{-/-}$ et transfert de sérum K/BxN) [128].

Cette molécule d'intérêt thérapeutique a aussi démontré une efficacité majeure (comparable au Fingolimob) dans l'encéphalomyélite expérimentale auto-immune. Le dendrimère ABP réoriente les lymphocytes T CD4$^{+}$ pathogènes myéline-spécifiques d'un phénotype IFNγ$^{+}$ IL-17$^{+}$ vers un phénotype producteur d'IL-10, de manière dépendante des cellules présentatrices d'antigènes [355]. Suite à ces résultats, le développement de la molécule a, pour des raisons stratégiques, été tourné vers la prise en charge des maladies neuro-inflammatoires impliquant une activation inflammatoire de la microglie. En conséquence, le traitement ne sera a priori pas développé dans la PR.

### 5.5. Conclusion

Ce travail concourt à démontrer :

- D'une part, l'existence d'un mécanisme d'action jusque-là non décrit des agents anti-TNF : la modulation de la polarisation des cellules de la lignée monocytaires.
- D'autre part, qu'un ciblage thérapeutique sélectif des cellules inflammatoires de la lignée monocytaire, induisant une polarisation alternative, serait bénéfique dans la prise en charge de la PR.

# Références bibliographiques

## 6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


1. Underhill DM, Gordon S, Imhof BA, Nunez G, Bousso P. Elie Metchnikoff (1845-1916): celebrating 100 years of cellular immunology and beyond. *Nat Rev Immunol* 2016;16(10):651-6.
2. Derecki NC, Quinnies KM, Kipnis J. Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. *Brain Behav Immun* 2011;25(3):379-85.
3. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 2011;480(7375):104-8.
4. Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 2007;26(47):6715-23.
5. Renauld JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 2003;3(8):667-76.
6. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):745-56.
7. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;10(2):89-102.
8. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425(6958):577-84.
9. Kufareva I, Salanga CL, Handel TM. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol Cell Biol* 2015;93(4):372-83.
10. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11(5):373-84.
11. Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 2012;13(4):333-42.
12. Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011;34(5):680-92.
13. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13(9):621-34.
14. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9(7):465-79.
15. Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fcgamma receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2014;14(2):94-108.
16. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010;330(6005):841-5.
17. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F, Choy SH, Grisotto M, Renia L, Conway SJ, Stanley ER, Chan JK, Ng LG, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 2012;209(6):1167-81.
18. Hoeffel G, Ginhoux F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol* 2018.
19. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 2016;44(3):439-49.
20. Ambarus CA, Noordenbos T, de Hair MJ, Tak PP, Baeten DL. Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res Ther* 2012;14(2):R74.
21. Balsa A, Dixey J, Sansom DM, Maddison PJ, Hall ND. Differential expression of the costimulatory molecules B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in rheumatoid synovial tissue. *Br J Rheumatol* 1996;35(1):33-7.

22. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;233(1):233-55.
23. Munn DH, Beall AC, Song D, Wrenn RW, Throckmorton DC. Activation-induced apoptosis in human macrophages: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J Exp Med* 1995;181(1):127-36.
24. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, Bogdan C, Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood* 2000;95(12):3823-31.
25. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol* 2017;17(6):349-62.
26. van de Sande MG, Gerlag DM, Lodde BM, van Baarsen LG, Alivernini S, Codullo V, Felea I, Vieira-Sousa E, Fearon U, Reece R, Montecucco C, Veale DJ, Pitzalis C, Emery P, Klareskog L, McInnes IB, Tak PP. Evaluating antirheumatic treatments using synovial biopsy: a recommendation for standardisation to be used in clinical trials. *Ann Rheum Dis* 2011;70(3):423-7.
27. Mandelin AM, 2nd, Homan PJ, Shaffer AM, Cuda CM, Dominguez ST, Bacalao E, Carns M, Hinchcliff M, Lee J, Aren K, Thakrar A, Montgomery AB, Louis Bridges S, Jr., Bathon JM, Atkinson JP, Fox DA, Matteson EL, Buckley CD, Pitzalis C, Parks D, Hughes LB, Geraldino-Pardilla L, Ike R, Phillips K, Wright K, Filer A, Kelly S, Ruderman EM, Morgan V, Abdala-Valencia H, Misharin AV, Budinger GS, Bartom ET, Pope RM, Perlman H, Winter DR. Transcriptional Profiling of Synovial Macrophages using Minimally Invasive Ultrasound-Guided Synovial Biopsies in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2018.
28. Orr C, Vieira-Sousa E, Boyle DL, Buch MH, Buckley CD, Canete JD, Catrina AI, Choy EHS, Emery P, Fearon U, Filer A, Gerlag D, Humby F, Isaacs JD, Just SA, Lauwerys BR, Le Goff B, Manzo A, McGarry T, McInnes IB, Najm A, Pitzalis C, Pratt A, Smith M, Tak PP, Thurlings R, Fonseca JE, Veale DJ, Tas SW. Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13(8):463-75.
29. Youssef PP, Kraan M, Breedveld F, Bresnihan B, Cassidy N, Cunnane G, Emery P, Fitzgerald O, Kane D, Lindblad S, Reece R, Veale D, Tak PP. Quantitative microscopic analysis of inflammation in rheumatoid arthritis synovial membrane samples selected at arthroscopy compared with samples obtained blindly by needle biopsy. *Arthritis Rheum* 1998;41(4):663-9.
30. Mackaness GB. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 1962;116:381-406.
31. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;158(3):670-89.
32. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176(1):287-92.
33. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000;164(12):6166-73.
34. Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol* 2014;5:603.
35. Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol* 2002;72(1):101-6.
36. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006;80(6):1298-307.
37. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25(12):677-86.
38. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005;175(1):342-9.
39. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev* 2014;262(1):153-66.

40. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014;41(1):49-61.
41. Joshi S, Singh AR, Zulcic M, Bao L, Messer K, Ideker T, Dutkowski J, Durden DL. Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation in vivo. *PLoS One* 2014;9(4):e95893.
42. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol* 2009;86(2):411-21.
43. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 2007;178(8):5245-52.
44. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014;6:13.
45. Schroder K, Irvine KM, Taylor MS, Bokil NJ, Le Cao KA, Masterman KA, Labzin LI, Semple CA, Kapetanovic R, Fairbairn L, Akalin A, Faulkner GJ, Baillie JK, Gongora M, Daub CO, Kawaji H, McLachlan GJ, Goldman N, Grimmond SM, Carninci P, Suzuki H, Hayashizaki Y, Lenhard B, Hume DA, Sweet MJ. Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(16):E944-53.
46. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 2006;177(10):7303-11.
47. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyer M, Latz E, Freeman TC, Ulas T, Schultze JL. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014;40(2):274-88.
48. Sander J, Schmidt SV, Cirovic B, McGovern N, Papantonopoulou O, Hardt AL, Aschenbrenner AC, Kreer C, Quast T, Xu AM, Schmidleithner LM, Theis H, Thi Huong LD, Sumatoh HRB, Lauterbach MAR, Schulte-Schrepping J, Gunther P, Xue J, Bassler K, Ulas T, Klee K, Katzmarski N, Herresthal S, Krebs W, Martin B, Latz E, Handler K, Kraut M, Kolanus W, Beyer M, Falk CS, Wiegmann B, Burgdorf S, Melosh NA, Newell EW, Ginhoux F, Schlitzer A, Schultze JL. Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity* 2017;47(6):1051-66 e12.
49. Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 2013;14(9):618-30.
50. Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren H, Vogel I, Kruger U, Becker T, Ebsen M, Rocken C, Kabelitz D, Schafer H, Sebens S. Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer* 2014;135(4):843-61.
51. Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, Iki M, Mukaida N, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity* 2013;38(3):570-80.
52. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* 2016;17(1):34-40.
53. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 2014;157(4):832-44.
54. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41(1):14-20.

55. Anquetil F, Clavel C, Offer G, Serre G, Sebbag M. IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. *J Immunol* 2015;194(8):3664-74.
56. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessiere C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999;162(1):585-94.
57. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998;101(1):273-81.
58. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* 2017;46(2):183-96.
59. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010;35(1):10-4.
60. Jin S, Hsieh E, Peng L, Yu C, Wang Y, Wu C, Wang Q, Li M, Zeng X. Incidence of fractures among patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2018.
61. Lopez-Mejias R, Castaneda S, Gonzalez-Juanatey C, Corrales A, Ferraz-Amaro I, Genre F, Remuzgo-Martinez S, Rodriguez-Rodriguez L, Blanco R, Llorca J, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Cardiovascular risk assessment in patients with rheumatoid arthritis: The relevance of clinical, genetic and serological markers. *Autoimmun Rev* 2016;15(11):1013-30.
62. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000;43(1):30-7.
63. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30(11):1205-13.
64. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, Reinius L, Acevedo N, Taub M, Ronninger M, Shchetynsky K, Scheynius A, Kere J, Alfredsson L, Klareskog L, Ekstrom TJ, Feinberg AP. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol* 2013;31(2):142-7.
65. Trynka G, Sandor C, Han B, Xu H, Stranger BE, Liu XS, Raychaudhuri S. Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. *Nat Genet* 2013;45(2):124-30.
66. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, van Venrooij WJ. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2004;63(4):373-81.
67. Arnoux F, Mariot C, Peen E, Lambert NC, Balandraud N, Roudier J, Auger I. Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(47):E10169-E77.
68. Chang HH, Dwivedi N, Nicholas AP, Ho IC. The W620 Polymorphism in PTPN22 Disrupts Its Interaction With Peptidylarginine Deiminase Type 4 and Enhances Citrullination and NETosis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67(9):2323-34.
69. Pickens SR, Chamberlain ND, Volin MV, Pope RM, Mandelin AM, 2nd, Shahrara S. Characterization of CCL19 and CCL21 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63(4):914-22.
70. Xuan W, Qu Q, Zheng B, Xiong S, Fan GH. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J Leukoc Biol* 2015;97(1):61-9.
71. Corsiero E, Bombardieri M, Manzo A, Bugatti S, Uguccioni M, Pitzalis C. Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2012;145(1-2):62-7.
72. Tang Q, Jiang D, Harfuddin Z, Cheng K, Moh MC, Schwarz H. Regulation of myelopoiesis by CD137L signaling. *Int Rev Immunol* 2014;33(6):454-69.
73. Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol* 2009;30(8):383-91.

74. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015;16(5):448-57.
75. Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* 2004;202:139-56.
76. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 2011;12(3):231-8.
77. Suttles J, Stout RD. Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin Immunol* 2009;21(5):257-64.
78. Yamamoto K, Okada Y, Suzuki A, Kochi Y. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia--present and future. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11(6):375-9.
79. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, Kumagai S. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis* 2010;69(1):70-81.
80. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* 2014;35(3):347-69.
81. Kharlamova N, Jiang X, Sherina N, Potempa B, Israelsson L, Quirke AM, Eriksson K, Yucel-Lindberg T, Venables PJ, Potempa J, Alfredsson L, Lundberg K. Antibodies to Porphyromonas gingivalis Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis Rheumatol* 2016;68(3):604-13.
82. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, Rosen A, Nigrovic PA, Sokolove J, Giles JT, Moutsopoulos NM, Andrade F. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2016;8(369):369ra176.
83. Ljung L, Rantapaa-Dahlqvist S. Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis - a nested case-control study. *Arthritis Res Ther* 2016;18(1):277.
84. Kumar LD, Karthik R, Gayathri N, Sivasudha T. Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother* 2016;79:52-61.
85. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Mechin MC, Vincent C, Nachat R, Yamada M, Takahara H, Simon M, Guerrin M, Serre G. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum* 2007;56(11):3541-53.
86. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GM, van Veelen PA, Levarht NE, van der Helm-van Mil AH, Cerami A, Huizinga TW, Toes RE, Trouw LA. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(42):17372-7.
87. Thiele GM, Duryee MJ, Anderson DR, Klassen LW, Mohring SM, Young KA, Benissan-Messan D, Sayles H, Dusad A, Hunter CD, Sokolove J, Robinson WH, O'Dell JR, Nicholas AP, Tuma DJ, Mikuls TR. Malondialdehyde-acetaldehyde adducts and anti-malondialdehyde-acetaldehyde antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67(3):645-55.
88. Aho K, Palusuo T, Kurki P. Marker antibodies of rheumatoid arthritis: diagnostic and pathogenetic implications. *Semin Arthritis Rheum* 1994;23(6):379-87.
89. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010;69(9):1580-8.
90. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M,

Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116(16):e74-80.
91. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5(12):953-64.
92. Ziegler-Heitbrock L. Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol* 2014;291(1-2):11-5.
93. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S, Jardine L, Dixon D, Stephenson E, Nilsson E, Grundberg I, McDonald D, Filby A, Li W, De Jager PL, Rozenblatt-Rosen O, Lane AA, Haniffa M, Regev A, Hacohen N. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 2017;356(6335).
94. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Makino H. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(5):1457-67.
95. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(10):2578-86.
96. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 2012;64(3):671-7.
97. Yoon BR, Yoo SJ, Choi Y, Chung YH, Kim J, Yoo IS, Kang SW, Lee WW. Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA). *PLoS One* 2014;9(10):e109775.
98. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168(7):3536-42.
99. Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'Neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12(6):344-57.
100. Perlman H, Pagliari LJ, Liu H, Koch AE, Haines GK, 3rd, Pope RM. Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum* 2001;44(1):21-30.
101. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, Reilly J, Ierna M, Fraser AR, Stolarski B, McSharry C, Hueber AJ, Baxter D, Hunter J, Gay S, Liew FY, McInnes IB. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(27):11193-8.
102. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2008;58(5):1284-92.
103. Misharin AV, Cuda CM, Saber R, Turner JD, Gierut AK, Haines GK, 3rd, Berdnikovs S, Filer A, Clark AR, Buckley CD, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H. Nonclassical Ly6C(-) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell Rep* 2014;9(2):591-604.
104. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, Geissmann F, Hedrick CC. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat Immunol* 2011;12(8):778-85.
105. Brunet A, LeBel M, Egarnes B, Paquet-Bouchard C, Lessard AJ, Brown JP, Gosselin J. NR4A1-dependent Ly6C(low) monocytes contribute to reducing joint inflammation in arthritic mice through Treg cells. *Eur J Immunol* 2016;46(12):2789-800.
106. Seeling M, Hillenhoff U, David JP, Schett G, Tuckermann J, Lux A, Nimmerjahn F. Inflammatory monocytes and Fcgamma receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(26):10729-34.
107. Komano Y, Nanki T, Hayashida K, Taniguchi K, Miyasaka N. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Res Ther* 2006;8(5):R152.

108. Charles JF, Hsu LY, Niemi EC, Weiss A, Aliprantis AO, Nakamura MC. Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. *J Clin Invest* 2012;122(12):4592-605.
109. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 2014;41(1):21-35.
110. Cauli A, Yanni G, Panayi GS. Interleukin-1, interleukin-1 receptor antagonist and macrophage populations in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Br J Rheumatol* 1997;36(9):935-40.
111. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6(11):823-35.
112. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med* 2010;14(11):2592-603.
113. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, Heuvelmans-Jacobs M, Akira S, Nicklin MJ, Ribeiro-Dias F, van den Berg WB. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest* 2008;118(1):205-16.
114. Nativel B, Couret D, Giraud P, Meilhac O, d'Hellencourt CL, Viranaicken W, Da Silva CR. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides act exclusively through TLR4 with a resilience between mouse and human. *Sci Rep* 2017;7(1):15789.
115. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62(9):2662-72.
116. Lima HR, Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Torres SA, Santos CF, Garlet GP, da Silva JS, Campanelli AP. The essential role of toll like receptor-4 in the control of Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection in mice. *J Clin Periodontol* 2010;37(3):248-54.
117. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine* 2002;195(1):99-111.
118. Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH. Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcgamma receptor. *Arthritis Rheum* 2011;63(1):53-62.
119. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Roelofs MF, Radstake TR, Matera G, Popa C, van der Meer JW, Netea MG, van den Berg WB. Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56(9):2957-67.
120. Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* 1999;94(3):837-44.
121. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, Chang MW, Beckman SK, Cook AD, Hamilton JA. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol* 2012;188(11):5752-65.
122. Hamilton JA, Achuthan A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol* 2013;34(2):81-9.
123. Kitaura H, Zhou P, Kim HJ, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J Clin Invest* 2005;115(12):3418-27.
124. Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanikawa R, Sawamukai N, Sasaguri Y, Kohro T, Wada Y, Kodama T, Tanaka Y. Rheumatoid synovial endothelial cells produce macrophage colony-stimulating factor leading to osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(4):597-603.
125. Clavel C, Ceccato L, Anquetil F, Serre G, Sebbag M. Among human macrophages polarised to different phenotypes, the M-CSF-oriented cells present the highest pro-inflammatory response to the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing ACPA. *Ann Rheum Dis* 2016;75(12):2184-91.

126. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol* 2000;68(1):144-50.
127. Garcia S, Hartkamp LM, Malvar-Fernandez B, van Es IE, Lin H, Wong J, Long L, Zanghi JA, Rankin AL, Masteller EL, Wong BR, Radstake TR, Tak PP, Reedquist KA. Colony-stimulating factor (CSF) 1 receptor blockade reduces inflammation in human and murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2016;18:75.
128. Hayder M, Poupot M, Baron M, Nigon D, Turrin CO, Caminade AM, Majoral JP, Eisenberg RA, Fournie JJ, Cantagrel A, Poupot R, Davignon JL. A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. *Sci Transl Med* 2011;3(81):81ra35.
129. Ohno H, Uemura Y, Murooka H, Takanashi H, Tokieda T, Ohzeki Y, Kubo K, Serizawa I. The orally-active and selective c-Fms tyrosine kinase inhibitor Ki20227 inhibits disease progression in a collagen-induced arthritis mouse model. *Eur J Immunol* 2008;38(1):283-91.
130. Paniagua RT, Chang A, Mariano MM, Stein EA, Wang Q, Lindstrom TM, Sharpe O, Roscow C, Ho PP, Lee DM, Robinson WH. c-Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12(1):R32.
131. Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, Serre G. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2008;58(3):678-88.
132. Laurent L, Clavel C, Lemaire O, Anquetil F, Cornillet M, Zabraniecki L, Nogueira L, Fournie B, Serre G, Sebbag M. Fcgamma receptor profile of monocytes and macrophages from rheumatoid arthritis patients and their response to immune complexes formed with autoantibodies to citrullinated proteins. *Ann Rheum Dis* 2011;70(6):1052-9.
133. Laurent L, Anquetil F, Clavel C, Ndongo-Thiam N, Offer G, Miossec P, Pasquali JL, Sebbag M, Serre G. IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis* 2015;74(7):1425-31.
134. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34(9):1125-32.
135. Lettesjo H, Nordstrom E, Strom H, Nilsson B, Glinghammar B, Dahlstedt L, Moller E. Synovial fluid cytokines in patients with rheumatoid arthritis or other arthritic lesions. *Scand J Immunol* 1998;48(3):286-92.
136. Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka-Benke A, Gal A, Kunaver M, Zenz P, Smolen JS. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38(3):202-13.
137. McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, Kinninmonth A, Weidner J, Mumford R, Liew FY. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996;184(4):1519-24.
138. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2007;40(3-4):167-71.
139. Comstock GW, Burke AE, Hoffman SC, Helzlsouer KJ, Bendich A, Masi AT, Norkus EP, Malamet RL, Gershwin ME. Serum concentrations of alpha tocopherol, beta carotene, and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1997;56(5):323-5.
140. Miesel R, Murphy MP, Kroger H. Enhanced mitochondrial radical production in patients which rheumatoid arthritis correlates with elevated levels of tumor necrosis factor alpha in plasma. *Free Radic Res* 1996;25(2):161-9.
141. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2002;21(5):200-4.

142. Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 1993;52(9):659-66.
143. Grootveld M, Henderson EB, Farrell A, Blake DR, Parkes HG, Haycock P. Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. *Biochem J* 1991;273(Pt 2):459-67.
144. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2008;152(3):415-22.
145. Kraaij MD, Savage ND, van der Kooij SW, Koekkoek K, Wang J, van den Berg JM, Ottenhoff TH, Kuijpers TW, Holmdahl R, van Kooten C, Gelderman KA. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(41):17686-91.
146. Bogdan C. The multiplex function of nitric oxide in (auto)immunity. *J Exp Med* 1998;187(9):1361-5.
147. Maruotti N, Annese T, Cantatore FP, Ribatti D. Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases. *Vasc Cell* 2013;5(1):11.
148. Ng CT, Biniecka M, Kennedy A, McCormick J, Fitzgerald O, Bresnihan B, Buggy D, Taylor CT, O'Sullivan J, Fearon U, Veale DJ. Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. *Ann Rheum Dis* 2010;69(7):1389-95.
149. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis* 2015;18(4):433-48.
150. Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Kadiombo AT, Sakairi T, Matsumoto T, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y. Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(9):1571-9.
151. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 1987;329(6140):630-2.
152. Szekanecz Z, Koch AE. Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13(3):202-8.
153. Fassbender HG, Simmling-Annefeld M. The potential aggressiveness of synovial tissue in rheumatoid arthritis. *J Pathol* 1983;139(3):399-406.
154. Darrieutort-Laffite C, Boutet MA, Chatelais M, Brion R, Blanchard F, Heymann D, Le Goff B. IL-1beta and TNFalpha promote monocyte viability through the induction of GM-CSF expression by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mediators Inflamm* 2014;2014:241840.
155. Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest* 1989;83(2):585-92.
156. Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 1991;21(10):2575-9.
157. Kumkumian GK, Lafyatis R, Remmers EF, Case JP, Kim SJ, Wilder RL. Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol* 1989;143(3):833-7.
158. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, Takeichi M, Brenner MB. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 2007;315(5814):1006-10.
159. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9(1):24-33.
160. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7(4):292-304.
161. Danks L, Sabokbar A, Gundle R, Athanasou NA. Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61(10):916-21.
162. Wakkach A, Mansour A, Dacquin R, Coste E, Jurdic P, Carle GF, Blin-Wakkach C. Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood* 2008;112(13):5074-83.

163. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* 2006;281(48):36846-55.
164. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Jr., Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(12):4828-32.
165. Sucur A, Katavic V, Kelava T, Jajic Z, Kovacic N, Grcevic D. Induction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: key to bone destruction in arthritis. *Int Orthop* 2014;38(9):1893-903.
166. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(10):593-601.
167. Raza K, Scheel-Toellner D, Lee CY, Pilling D, Curnow SJ, Falciani F, Trevino V, Kumar K, Assi LK, Lord JM, Gordon C, Buckley CD, Salmon M. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8(4):R120.
168. Cedergren J, Forslund T, Sundqvist T, Skogh T. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *J Rheumatol* 2007;34(11):2162-70.
169. Eggleton P, Wang L, Penhallow J, Crawford N, Brown KA. Differences in oxidative response of subpopulations of neutrophils from healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54(11):916-23.
170. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunol Cell Biol* 2001;79(5):502-6.
171. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V, Thompson P, Chen P, Fox DA, Pennathur S, Kaplan MJ. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2013;5(178):178ra40.
172. Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2015;6:571.
173. Stamp LK, Easson A, Pettersson L, Highton J, Hessian PA. Monocyte derived interleukin (IL)-23 is an important determinant of synovial IL-17A expression in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2009;36(11):2403-8.
174. Evans HG, Gullick NJ, Kelly S, Pitzalis C, Lord GM, Kirkham BW, Taams LS. In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(15):6232-7.
175. McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1997;3(2):189-95.
176. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei XQ, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999;104(10):1393-401.
177. van der Voort R, van Lieshout AW, Toonen LW, Sloetjes AW, van den Berg WB, Figdor CG, Radstake TR, Adema GJ. Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1381-91.
178. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998;160(7):3513-21.
179. Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265(1):144-50.
180. Jagger AL, Evans HG, Walter GJ, Gullick NJ, Menon B, Ballantine LE, Gracie A, Magerus-Chatinet A, Tiemessen MM, Geissmann F, Rieux-Laucat F, Taams LS. FAS/FAS-L dependent killing of activated human monocytes and macrophages by CD4+CD25- responder T cells, but not CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Autoimmun* 2012;38(1):29-38.

181. Kaplan MJ, Ray D, Mo RR, Yung RL, Richardson BC. TRAIL (Apo2 ligand) and TWEAK (Apo3 ligand) mediate CD4+ T cell killing of antigen-presenting macrophages. *J Immunol* 2000;164(6):2897-904.
182. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 2006;177(1):40-4.
183. Catrina AI, Svensson CI, Malmstrom V, Schett G, Klareskog L. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13(2):79-86.
184. Barbarroja N, Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Castro-Villegas C, Aguirre MA, Carretero R, Segui P, Jimenez-Gomez Y, Sanna M, Rodriguez-Ariza A, Collantes-Estevez E, Escudero A, Lopez-Pedrera C. Anticyclic citrullinated protein antibodies are implicated in the development of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(12):2706-16.
185. Meednu N, Zhang H, Owen T, Sun W, Wang V, Cistrone C, Rangel-Moreno J, Xing L, Anolik JH. Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2016;68(4):805-16.
186. Daien CI, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, Morel J. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(8):2037-46.
187. Klinker MW, Lundy SK. Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Mol Med* 2012;18:123-37.
188. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 2003;197(4):489-501.
189. Perretti M, Cooper D, Dalli J, Norling LV. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13(2):87-99.
190. Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 2013;5(5):661-74.
191. Dean RA, Cox JH, Bellac CL, Doucet A, Starr AE, Overall CM. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 2008;112(8):3455-64.
192. Jamieson T, Cook DN, Nibbs RJ, Rot A, Nixon C, McLean P, Alcami A, Lira SA, Wiekowski M, Graham GJ. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nat Immunol* 2005;6(4):403-11.
193. Dawson TC, Lentsch AB, Wang Z, Cowhig JE, Rot A, Maeda N, Peiper SC. Exaggerated response to endotoxin in mice lacking the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). *Blood* 2000;96(5):1681-4.
194. Brancaleone V, Mitidieri E, Flower RJ, Cirino G, Perretti M. Annexin A1 mediates hydrogen sulfide properties in the control of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;351(1):96-104.
195. van den Berg JM, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2001;69(3):467-73.
196. Walmsley SR, Chilvers ER, Thompson AA, Vaughan K, Marriott HM, Parker LC, Shaw G, Parmar S, Schneider M, Sabroe I, Dockrell DH, Milo M, Taylor CT, Johnson RS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Carmeliet P, Whyte MK. Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) is essential for hypoxic regulation of neutrophilic inflammation in humans and mice. *J Clin Invest* 2011;121(3):1053-63.
197. Montero-Melendez T, Dalli J, Perretti M. Gene expression signature-based approach identifies a pro-resolving mechanism of action for histone deacetylase inhibitors. *Cell Death Differ* 2013;20(4):567-75.
198. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 2012;120(15):e60-72.
199. Dias-Baruffi M, Zhu H, Cho M, Karmakar S, McEver RP, Cummings RD. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278(42):41282-93.

200. Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995;80(4):661-70.
201. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 2001;293(5528):306-11.
202. van den Brand BT, Abdollahi-Roodsaz S, Vermeij EA, Bennink MB, Arntz OJ, Rothlin CV, van den Berg WB, van de Loo FA. Therapeutic efficacy of Tyro3, Axl, and Mer tyrosine kinase agonists in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65(3):671-80.
203. Locatelli I, Sutti S, Jindal A, Vacchiano M, Bozzola C, Reutelingsperger C, Kusters D, Bena S, Parola M, Paternostro C, Bugianesi E, McArthur S, Albano E, Perretti M. Endogenous annexin A1 is a novel protective determinant in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2014;60(2):531-44.
204. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101(4):890-8.
205. Bystrom J, Evans I, Newson J, Stables M, Toor I, van Rooijen N, Crawford M, Colville-Nash P, Farrow S, Gilroy DW. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* 2008;112(10):4117-27.
206. Stables MJ, Shah S, Camon EB, Lovering RC, Newson J, Bystrom J, Farrow S, Gilroy DW. Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood* 2011;118(26):e192-208.
207. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 1999;190(3):385-98.
208. Seki M, Oomizu S, Sakata KM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, Ito K, Takeshita K, Niki T, Saita N, Nishi N, Yamauchi A, Katoh S, Matsukawa A, Kuchroo V, Hirashima M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 2008;127(1):78-88.
209. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009;10(9):981-91.
210. Giera M, Ioan-Facsinay A, Toes R, Gao F, Dalli J, Deelder AM, Serhan CN, Mayboroda OA. Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821(11):1415-24.
211. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, Ji RR, Zhu M, Petasis NA. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J* 2012;26(4):1755-65.
212. Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, Iizuka N, Urabe K, Itoman M, Hirohata S, Endo H. Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2007;34(11):2144-53.
213. Dasuri K, Antonovici M, Chen K, Wong K, Standing K, Ens W, El-Gabalawy H, Wilkins JA. The synovial proteome: analysis of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2004;6(2):R161-8.
214. Neidhart M, Zaucke F, von Knoch R, Jungel A, Michel BA, Gay RE, Gay S. Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. *Ann Rheum Dis* 2005;64(3):419-24.
215. Seki M, Sakata KM, Oomizu S, Arikawa T, Sakata A, Ueno M, Nobumoto A, Niki T, Saita N, Ito K, Dai SY, Katoh S, Nishi N, Tsukano M, Ishikawa K, Yamauchi A, Kuchroo V, Hirashima M. Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2007;56(12):3968-76.
216. Varani K, Padovan M, Vincenzi F, Targa M, Trotta F, Govoni M, Borea PA. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arthritis Res Ther* 2011;13(6):R197.

217. Amoruso A, Sola D, Rossi L, Obeng JA, Fresu LG, Sainaghi PP, Pirisi M, Brunelleschi S. Relation among anti-rheumatic drug therapy, CD14(+)CD16(+) blood monocytes and disease activity markers (DAS28 and US7 scores) in rheumatoid arthritis: A pilot study. *Pharmacol Res* 2016;107:308-14.
218. Tsukamoto M, Seta N, Yoshimoto K, Suzuki K, Yamaoka K, Takeuchi T. CD14(bright)CD16+ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017;19(1):28.
219. Kurtul A, Duran M. The correlation between lymphocyte/monocyte ratio and coronary collateral circulation in stable coronary artery disease patients. *Biomark Med* 2017;11(1):43-52.
220. Guo YH, Sun HF, Zhang YB, Liao ZJ, Zhao L, Cui J, Wu T, Lu JR, Nan KJ, Wang SH. The clinical use of the platelet/lymphocyte ratio and lymphocyte/monocyte ratio as prognostic predictors in colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(12):20011-24.
221. Du J, Chen S, Shi J, Zhu X, Ying H, Zhang Y, Chen S, Shen B, Li J. The association between the lymphocyte-monocyte ratio and disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2017;36(12):2689-95.
222. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, Baeten D, McInnes IB, Bresnihan B, Tak PP. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64(6):834-8.
223. Wijbrandts CA, Vergunst CE, Haringman JJ, Gerlag DM, Smeets TJ, Tak PP. Absence of changes in the number of synovial sublining macrophages after ineffective treatment for rheumatoid arthritis: Implications for use of synovial sublining macrophages as a biomarker. *Arthritis Rheum* 2007;56(11):3869-71.
224. Bresnihan B, Pontifex E, Thurlings RM, Vinkenoog M, El-Gabalawy H, Fearon U, Fitzgerald O, Gerlag DM, Rooney T, van de Sande MG, Veale D, Vos K, Tak PP. Synovial tissue sublining CD68 expression is a biomarker of therapeutic response in rheumatoid arthritis clinical trials: consistency across centers. *J Rheumatol* 2009;36(8):1800-2.
225. van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996;39(1):34-40.
226. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39(1):115-24.
227. Heftdal LD, Stengaard-Pedersen K, Ornbjerg LM, Hetland ML, Horslev-Petersen K, Junker P, Ostergaard M, Hvid M, Deleuran B, Moller HJ, Greisen SR. Soluble CD206 plasma levels in rheumatoid arthritis reflect decrease in disease activity. *Scand J Clin Lab Invest* 2017;77(5):385-9.
228. Greisen SR, Moller HJ, Stengaard-Pedersen K, Hetland ML, Horslev-Petersen K, Junker P, Ostergaard M, Hvid M, Deleuran B. Macrophage activity assessed by soluble CD163 in early rheumatoid arthritis: association with disease activity but different response patterns to synthetic and biologic DMARDs. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33(4):498-502.
229. Etzerodt A, Maniecki MB, Moller K, Moller HJ, Moestrup SK. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2010;88(6):1201-5.
230. Mikuls TR, LeVan TD, Sayles H, Yu F, Caplan L, Cannon GW, Kerr GS, Reimold AM, Johnson DS, Thiele GM. Soluble CD14 and CD14 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38(12):2509-16.
231. Shive CL, Jiang W, Anthony DD, Lederman MM. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS* 2015;29(10):1263-5.
232. Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *J Immunol* 2004;172(7):4470-9.
233. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, Sharp J, Perez JL, Spencer-Green GT. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or

adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2006;54(1):26-37.
234. Grigor C, Capell H, Stirling A, McMahon AD, Lock P, Vallance R, Porter D, Kincaid W. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): a single-blind randomised controlled trial. *The Lancet* 2004;364(9430):263-9.
235. Schipper LG, Vermeer M, Kuper HH, Hoekstra MO, Haagsma CJ, Den Broeder AA, van Riel P, Fransen J, van de Laar MA. A tight control treatment strategy aiming for remission in early rheumatoid arthritis is more effective than usual care treatment in daily clinical practice: a study of two cohorts in the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring registry. *Ann Rheum Dis* 2012;71(6):845-50.
236. Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11(5):276-89.
237. Wijbrandts CA, Tak PP. Prediction of Response to Targeted Treatment in Rheumatoid Arthritis. *Mayo Clin Proc* 2017;92(7):1129-43.
238. Curtis JR, van der Helm-van Mil AH, Knevel R, Huizinga TW, Haney DJ, Shen Y, Ramanujan S, Cavet G, Centola M, Hesterberg LK, Chernoff D, Ford K, Shadick NA, Hamburger M, Fleischmann R, Keystone E, Weinblatt ME. Validation of a novel multibiomarker test to assess rheumatoid arthritis disease activity. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64(12):1794-803.
239. Rech J, Hueber AJ, Finzel S, Englbrecht M, Haschka J, Manger B, Kleyer A, Reiser M, Cobra JF, Figueiredo C, Tony HP, Kleinert S, Wendler J, Schuch F, Ronneberger M, Feuchtenberger M, Fleck M, Manger K, Ochs W, Schmitt-Haendle M, Lorenz HM, Nuesslein H, Alten R, Henes J, Krueger K, Schett G. Prediction of disease relapses by multibiomarker disease activity and autoantibody status in patients with rheumatoid arthritis on tapering DMARD treatment. *Ann Rheum Dis* 2016;75(9):1637-44.
240. Choi IY, Gerlag DM, Herenius MJ, Thurlings RM, Wijbrandts CA, Foell D, Vogl T, Roth J, Tak PP, Holzinger D. MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015;74(3):499-505.
241. Cuppen BV, Welsing PM, Sprengers JJ, Bijlsma JW, Marijnissen AC, van Laar JM, Lafeber FP, Nair SC. Personalized biological treatment for rheumatoid arthritis: a systematic review with a focus on clinical applicability. *Rheumatology (Oxford)* 2016;55(5):826-39.
242. Prajapati R, Plant D, Barton A. Genetic and genomic predictors of anti-TNF response. *Pharmacogenomics* 2011;12(11):1571-85.
243. Krintel SB, Dehlendorff C, Hetland ML, Horslev-Petersen K, Andersen KK, Junker P, Podenphant J, Ellingsen T, Ahlquist P, Lindegaard HM, Linauskas A, Schlemmer A, Dam MY, Hansen I, Horn HC, Jorgensen A, Raun J, Ammitzboll CG, Ostergaard M, Stengaard-Pedersen K, Johansen JS. Prediction of treatment response to adalimumab: a double-blind placebo-controlled study of circulating microRNA in patients with early rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J* 2016;16(2):141-6.
244. Duroux-Richard I, Pers YM, Fabre S, Ammari M, Baeten D, Cartron G, Touitou I, Jorgensen C, Apparailly F. Circulating miRNA-125b is a potential biomarker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2014;2014:342524.
245. Hruskova V, Jandova R, Vernerova L, Mann H, Pecha O, Prajzlerova K, Pavelka K, Vencovsky J, Filkova M, Senolt L. MicroRNA-125b: association with disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2016;18(1):124.
246. Filkova M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, Filer A, Raza K, Buckley CD, Snow M, Vencovsky J, Pavelka K, Michel BA, Gay RE, Gay S, Jungel A. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73(10):1898-904.
247. Smith SL, Plant D, Eyre S, Barton A. The potential use of expression profiling: implications for predicting treatment response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72(7):1118-24.
248. Trocme C, Marotte H, Baillet A, Pallot-Prades B, Garin J, Grange L, Miossec P, Tebib J, Berger F, Nissen MJ, Juvin R, Morel F, Gaudin P. Apolipoprotein A-I and platelet factor 4 are biomarkers for infliximab response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(8):1328-33.

249. Obry A, Hardouin J, Lequerre T, Jarnier F, Boyer O, Fardellone P, Philippe P, Marcelli C, Loet XL, Vittecoq O, Cosette P. Identification of 7 Proteins in Sera of RA Patients with Potential to Predict ETA/MTX Treatment Response. *Theranostics* 2015;5(11):1214-24.
250. Tatar Z, Migne C, Petera M, Gaudin P, Lequerre T, Marotte H, Tebib J, Pujos Guillot E, Soubrier M. Variations in the metabolome in response to disease activity of rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2016;17(1):353.
251. Cooper DL, Martin SG, Robinson JI, Mackie SL, Charles CJ, Nam J, Consortium Y, Isaacs JD, Emery P, Morgan AW. FcgammaRIIIa expression on monocytes in rheumatoid arthritis: role in immune-complex stimulated TNF production and non-response to methotrexate therapy. *PLoS One* 2012;7(1):e28918.
252. Chara L, Sanchez-Atrio A, Perez A, Cuende E, Albarran F, Turrion A, Chevarria J, Sanchez MA, Monserrat J, de la Hera A, Prieto A, Sanz I, Diaz D, Alvarez-Mon M. Monocyte populations as markers of response to adalimumab plus MTX in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14(4):R175.
253. Nguyen DX, Cotton A, Attipoe L, Ciurtin C, Dore CJ, Ehrenstein MR. Regulatory T cells as a biomarker for response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *J Allergy Clin Immunol* 2018.
254. Orr C, Najm A, Biniecka M, McGarry T, Ng CT, Young F, Fearon U, Veale DJ. Synovial Immunophenotype and Anti-Citrullinated Peptide Antibodies in Rheumatoid Arthritis Patients: Relationship to Treatment Response and Radiologic Prognosis. *Arthritis Rheumatol* 2017;69(11):2114-23.
255. Baker KF, Isaacs JD. Novel therapies for immune-mediated inflammatory diseases: What can we learn from their use in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis? *Ann Rheum Dis* 2018;77(2):175-87.
256. Jesus AA, Goldbach-Mansky R. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. *Annu Rev Med* 2014;65:223-44.
257. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, Kavanaugh A, McInnes IB, Solomon DH, Strand V, Yamamoto K. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:18001.
258. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002;2(5):364-71.
259. Helson L, Green S, Carswell E, Old LJ. Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature* 1975;258(5537):731-2.
260. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72(9):3666-70.
261. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985;316(6028):552-4.
262. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984;312(5996):724-9.
263. Klareskog L, Forsum U, Malmnas Tjernlund UK, Kabelitz D, Wigren A. Appearance of anti-HLA-DR-reactive cells in normal and rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* 1981;14(2):183-92.
264. Londei M, Bottazzo GF, Feldmann M. Human T-cell clones from autoimmune thyroid glands: specific recognition of autologous thyroid cells. *Science* 1985;228(4695):85-9.
265. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldmann M. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 1987;326(6110):304-6.
266. Londei M, Lamb JR, Bottazzo GF, Feldmann M. Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells. *Nature* 1984;312(5995):639-41.
267. Buchan G, Barrett K, Turner M, Chantry D, Maini RN, Feldmann M. Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha. *Clin Exp Immunol* 1988;73(3):449-55.

268. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989;2(8657):244-7.
269. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85(3):307-10.
270. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397-440.
271. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, et al. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 1989;170(5):1627-33.
272. Deleuran BW, Chu CQ, Field M, Brennan FM, Mitchell T, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1992;35(10):1170-8.
273. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(20):9784-8.
274. Delavallee 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.
275. 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.
276. Taylor PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(3):308-15.
277. Choy E, McKenna F, Vencovsky J, Valente R, Goel N, Vanlunen B, Davies O, Stahl HD, Alten R. Certolizumab pegol plus MTX administered every 4 weeks is effective in patients with RA who are partial responders to MTX. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(7):1226-34.
278. Chinol M, Casalini P, Maggiolo M, Canevari S, Omodeo ES, Caliceti P, Veronese FM, Cremonesi M, Chiolerio F, Nardone E, Siccardi AG, Paganelli G. Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *Br J Cancer* 1998;78(2):189-97.
279. Li L, Gardner I, Dostalek M, Jamei M. Simulation of monoclonal antibody pharmacokinetics in humans using a minimal physiologically based model. *AAPS J* 2014;16(5):1097-109.
280. Fujimoto K, Ida H, Hirota Y, Ishigai M, Amano J, Tanaka Y. Intracellular Dynamics and Fate of a Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody, Tocilizumab. *Mol Pharmacol* 2015;88(4):660-75.
281. Ng CM, Loyet KM, Iyer S, Fielder PJ, Deng R. Modeling approach to investigate the effect of neonatal Fc receptor binding affinity and anti-therapeutic antibody on the pharmacokinetic of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor-alpha IgG antibody in cynomolgus monkey. *Eur J Pharm Sci* 2014;51:51-8.
282. Furst DE, Wallis R, Broder M, Beenhouwer DO. Tumor necrosis factor antagonists: different kinetics and/or mechanisms of action may explain differences in the risk for developing granulomatous infection. *Semin Arthritis Rheum* 2006;36(3):159-67.
283. Santora LC, Kaymakcalan Z, Sakorafas P, Krull IS, Grant K. Characterization of noncovalent complexes of recombinant human monoclonal antibody and antigen using cation exchange, size exclusion chromatography, and BIAcore. *Anal Biochem* 2001;299(2):119-29.
284. 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.
285. Billmeier U, Dieterich W, Neurath MF, Atreya R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2016;22(42):9300-13.

286. Neregard P, Krishnamurthy A, Revu S, Engstrom M, af Klint E, Catrina AI. Etanercept decreases synovial expression of tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2014;43(2):85-90.
287. Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, Dijkmans BA, Aarden L, Wolbink GJ. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* 2011;305(14):1460-8.
288. Wolbink GJ, Vis M, Lems W, Voskuyl AE, de Groot E, Nurmohamed MT, Stapel S, Tak PP, Aarden L, Dijkmans B. Development of antiinfliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54(3):711-5.
289. Krintel SB, Grunert VP, Hetland ML, Johansen JS, Rothfuss M, Palermo G, Essioux L, Klause U. The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52(7):1245-53.
290. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak PP, Wolbink GJ. Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-tumour necrosis factor naive patients: a cohort study. *Ann Rheum Dis* 2010;69(5):817-21.
291. Krieckaert CL, Nurmohamed MT, Wolbink GJ. Methotrexate reduces immunogenicity in adalimumab treated rheumatoid arthritis patients in a dose dependent manner. *Ann Rheum Dis* 2012;71(11):1914-5.
292. Kim MS, Lee SH, Song MY, Yoo TH, Lee BK, Kim YS. Comparative analyses of complex formation and binding sites between human tumor necrosis factor-alpha and its three antagonists elucidate their different neutralizing mechanisms. *J Mol Biol* 2007;374(5):1374-88.
293. Bartelds GM, de Groot E, Nurmohamed MT, Hart MH, van Eede PH, Wijbrandts CA, Crusius JB, Dijkmans BA, Tak PP, Aarden L, Wolbink GJ. Surprising negative association between IgG1 allotype disparity and anti-adalimumab formation: a cohort study. *Arthritis Res Ther* 2010;12(6):R221.
294. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Wolbink GJ, de Vries N, Tak PP, Dijkmans BA, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE. Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis Rheum* 2009;60(8):2541-2.
295. van Schouwenburg PA, Rispens T, Wolbink GJ. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9(3):164-72.
296. Singh JA, Wells GA, Christensen R, Tanjong Ghogomu E, Maxwell L, Macdonald JK, Filippini G, Skoetz N, Francis D, Lopes LC, Guyatt GH, Schmitt J, La Mantia L, Weberschock T, Roos JF, Siebert H, Hershan S, Lunn MP, Tugwell P, Buchbinder R. Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(2):CD008794.
297. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001;345(15):1098-104.
298. 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, Group RS. Inhibition of anti-tuberculosis T-lymphocyte function with tumour necrosis factor antagonists. *Arthritis Res Ther* 2006;8(4):R114.
299. 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.
300. Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, Brown D, Robinson M, Bourne T. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(11):1323-32.
301. Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, Imbert C, Gilhodes J, Filleron T, Rochaix P, Andrieu-Abadie N, Levade T, Meyer N, Colacios C, Segui B. TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* 2017;8(1):2256.

302. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995;377(6547):348-51.
303. Lim SO, Li CW, Xia W, Cha JH, Chan LC, Wu Y, Chang SS, Lin WC, Hsu JM, Hsu YH, Kim T, Chang WC, Hsu JL, Yamaguchi H, Ding Q, Wang Y, Yang Y, Chen CH, Sahin AA, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC. Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell* 2016;30(6):925-39.
304. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribas A, investigators K-. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2015;372(26):2521-32.
305. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprie GS, Buczkowski KA, Richards WG, Gandhi L, Redig AJ, Rodig SJ, Asahina H, Jones RE, Kulkarni MM, Kuraguchi M, Palakurthi S, Fecci PE, Johnson BE, Janne PA, Engelman JA, Gangadharan SP, Costa DB, Freeman GJ, Bueno R, Hodi FS, Dranoff G, Wong KK, Hammerman PS. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* 2016;7:10501.
306. Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, Dikranian A, Alten R, Pavelka K, Klearman M, Musselman D, Agarwal S, Green J, Kavanaugh A, Investigators AS. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet* 2013;381(9877):1541-50.
307. Singh JA, Christensen R, Wells GA, Suarez-Almazor ME, Buchbinder R, Lopez-Olivo MA, Tanjong Ghogomu E, Tugwell P. Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(4):CD007848.
308. Smolen JS, Burmester GR, Combe B, Curtis JR, Hall S, Haraoui B, van Vollenhoven R, Cioffi C, Ecoffet C, Gervitz L, Ionescu L, Peterson L, Fleischmann R. Head-to-head comparison of certolizumab pegol versus adalimumab in rheumatoid arthritis: 2-year efficacy and safety results from the randomised EXXELERATE study. *Lancet* 2016;388(10061):2763-74.
309. Weinblatt ME, Schiff M, Valente R, van der Heijde D, Citera G, Zhao C, Maldonado M, Fleischmann R. Head-to-head comparison of subcutaneous abatacept versus adalimumab for rheumatoid arthritis: findings of a phase IIIb, multinational, prospective, randomized study. *Arthritis Rheum* 2013;65(1):28-38.
310. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N, Breedveld FC, Burmester G, Dorner T, Ferraccioli G, Gottenberg JE, Isaacs J, Kvien TK, Mariette X, Martin-Mola E, Pavelka K, Tak PP, van der Heijde D, van Vollenhoven RF, Emery P, Rituximab Consensus Expert C. Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(6):909-20.
311. Gottenberg JE, Brocq O, Perdriger A, Lassoued S, Berthelot JM, Wendling D, Euller-Ziegler L, Soubrier M, Richez C, Fautrel B, Constantin AL, Mariette X, Morel J, Gilson M, Cormier G, Salmon JH, Rist S, Liote F, Marotte H, Bonnet C, Marcelli C, Sellam J, Meyer O, Solau-Gervais E, Guis S, Ziza JM, Zarnitsky C, Chary-Valckenaere I, Vittecoq O, Saraux A, Pers YM, Gayraud M, Bolla G, Claudepierre P, Ardizzone M, Dernis E, Breban MA, Fain O, Balblanc JC, Aberkane O, Vazel M, Back C, Candon S, Chatenoud L, Perrodeau E, Sibilia J, Ravaud P. Non-TNF-Targeted Biologic vs a Second Anti-TNF Drug to Treat Rheumatoid Arthritis in Patients With Insufficient Response to a First Anti-TNF Drug: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;316(11):1172-80.
312. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12(1):49-62.
313. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25(4):453-72.
314. 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-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200(3):277-85.
315. Kirchner S, Boldt S, Kolch W, Haffner S, Kazak S, Janosch P, Holler E, Andreesen R, Eissner G. LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway. *J Leukoc Biol* 2004;75(2):324-31.

316. Meusch U, Rossol M, Baerwald C, Hauschildt S, Wagner U. Outside-to-inside signaling through transmembrane tumor necrosis factor reverses pathologic interleukin-1beta production and deficient apoptosis of rheumatoid arthritis monocytes. *Arthritis Rheum* 2009;60(9):2612-21.
317. Boyer JF, Baron M, Constantin A, Degboe Y, Cantagrel A, Davignon JL. Anti-TNF certolizumab pegol induces antioxidant response in human monocytes via reverse signaling. *Arthritis Res Ther* 2016;18:56.
318. Pallai A, Kiss B, Vereb G, Armaka M, Kollias G, Szekanecz Z, Szondy Z. Transmembrane TNF-alpha Reverse Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Formation in Macrophages by Inducing TGF-beta: Therapeutic Implications. *J Immunol* 2016;196(3):1146-57.
319. Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C, Breedveld FC, Smolen JS, Eberl G, deWoody K, Feldmann M, Maini RN. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999;163(3):1521-8.
320. Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meinders AE, Maini RN. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39(7):1077-81.
321. Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(1):38-47.
322. Eriksson C, Rantapaa-Dahlqvist S, Sundqvist KG. Changes in chemokines and their receptors in blood during treatment with the TNF inhibitor infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2013;42(4):260-5.
323. Xia L, Lu J, Xiao W. Blockage of TNF-alpha by infliximab reduces CCL2 and CCR2 levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Investig Med* 2011;59(6):961-3.
324. Paleolog EM, Hunt M, Elliott MJ, Feldmann M, Maini RN, Woody JN. Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39(7):1082-91.
325. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1258-65.
326. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006;108(1):253-61.
327. Chen X, Baumel M, Mannel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2007;179(1):154-61.
328. Nguyen DX, Ehrenstein MR. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2016;213(7):1241-53.
329. Pattacini L, Boiardi L, Casali B, Salvarani C. Differential effects of anti-TNF-alpha drugs on fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(3):480-9.
330. Canete JD, Celis R, Moll C, Izquierdo E, Marsal S, Sanmarti R, Palacin A, Lora D, de la Cruz J, Pablos JL. Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(5):751-6.
331. Leandro MJ. Anti-tumour necrosis factor therapy and B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11(5):128.
332. Baldwin HM, Ito-Ihara T, Isaacs JD, Hilkens CM. Tumour necrosis factor alpha blockade impairs dendritic cell survival and function in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69(6):1200-7.
333. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8(11):656-64.
334. Kemanetzoglou E, Andreadou E. CNS Demyelination with TNF-alpha Blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017;17(4):36.

335. Gao H, Danzi MC, Choi CS, Taherian M, Dalby-Hansen C, Ellman DG, Madsen PM, Bixby JL, Lemmon VP, Lambertsen KL, Brambilla R. Opposing Functions of Microglial and Macrophagic TNFR2 in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell Rep* 2017;18(1):198-212.
336. Wijbrandts CA, Remans PH, Klarenbeek PL, Wouters D, van den Bergh Weerman MA, Smeets TJ, Vervoordeldonk MJ, Baeten D, Tak PP. Analysis of apoptosis in peripheral blood and synovial tissue very early after initiation of infliximab treatment in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2008;58(11):3330-9.
337. Smeets TJ, Kraan MC, van Loon ME, Tak PP. Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2003;48(8):2155-62.
338. Huang QQ, Birkett R, Doyle R, Shi B, Roberts EL, Mao Q, Pope RM. The Role of Macrophages in the Response to TNF Inhibition in Experimental Arthritis. *J Immunol* 2018;200(1):130-8.
339. Catrina AI, Trollmo C, af Klint E, Engstrom M, Lampa J, Hermansson Y, Klareskog L, Ulfgren AK. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum* 2005;52(1):61-72.
340. Herenius MM, Thurlings RM, Wijbrandts CA, Bennink RJ, Dohmen SE, Voermans C, Wouters D, Izmailova ES, Gerlag DM, van Eck-Smit BL, Tak PP. Monocyte migration to the synovium in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab. *Ann Rheum Dis* 2011;70(6):1160-2.
341. Nissinen R, Leirisalo-Repo M, Peltomaa R, Palosuo T, Vaarala O. Cytokine and chemokine receptor profile of peripheral blood mononuclear cells during treatment with infliximab in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63(6):681-7.
342. Brizzolara R, Montagna P, Soldano S, Cutolo M. Rapid interaction between CTLA4-Ig (abatacept) and synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2013;40(5):738-40.
343. Cutolo M, Soldano S, Montagna P, Sulli A, Seriolo B, Villaggio B, Triolo P, Clerico P, Felli L, Brizzolara R. CTLA4-Ig interacts with cultured synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients and downregulates cytokine production. *Arthritis Res Ther* 2009;11(6):R176.
344. Lastrucci C, Benard A, Balboa L, Pingris K, Souriant S, Poincloux R, Al Saati T, Rasolofo V, Gonzalez-Montaner P, Inwentarz S, Morana EJ, Kondova I, Verreck FA, Sasiain Mdel C, Neyrolles O, Maridonneau-Parini I, Lugo-Villarino G, Cougoule C. Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16(+) monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Res* 2015;25(12):1333-51.
345. Balboa L, Romero MM, Basile JI, Sabio y Garcia CA, Schierloh P, Yokobori N, Geffner L, Musella RM, Castagnino J, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Aleman M. Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood. *J Leukoc Biol* 2011;90(1):69-75.
346. Balboa L, Romero MM, Laborde E, Sabio YGCA, Basile JI, Schierloh P, Yokobori N, Musella RM, Castagnino J, de la Barrera S, Sasiain MC, Aleman M. Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAPK. *Eur J Immunol* 2013;43(2):335-47.
347. Tung YC, Ou TT, Tsai WC. Defective Mycobacterium tuberculosis antigen presentation by monocytes from tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013;17(9):1229-34.
348. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 2008;112(10):3959-64.
349. Soler Palacios B, Estrada-Capetillo L, Izquierdo E, Criado G, Nieto C, Municio C, Gonzalez-Alvaro I, Sanchez-Mateos P, Pablos JL, Corbi AL, Puig-Kroger A. Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile. *J Pathol* 2015;235(3):515-26.

350. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TR, Reedquist KA, Tak PP, Baeten DL. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 2012;375(1-2):196-206.
351. Mills EL, Ryan DG, Prag HA, Dikovskaya D, Menon D, Zaslona Z, Jedrychowski MP, Costa ASH, Higgins M, Hams E, Szpyt J, Runtsch MC, King MS, McGouran JF, Fischer R, Kessler BM, McGettrick AF, Hughes MM, Carroll RG, Booty LM, Knatko EV, Meakin PJ, Ashford MLJ, Modis LK, Brunori G, Sevin DC, Fallon PG, Caldwell ST, Kunji ERS, Chouchani ET, Frezza C, Dinkova-Kostova AT, Hartley RC, Murphy MP, O'Neill LA. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature* 2018;556(7699):113-7.
352. Fruchon S, Poupot R. The ABP Dendrimer, a Drug-Candidate against Inflammatory Diseases That Triggers the Activation of Interleukin-10 Producing Immune Cells. *Molecules* 2018;23(6).
353. Poupot M, Griffe L, Marchand P, Maraval A, Rolland O, Martinet L, L'Faqihi-Olive FE, Turrin CO, Caminade AM, Fournie JJ, Majoral JP, Poupot R. Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation. *FASEB J* 2006;20(13):2339-51.
354. Fruchon S, Poupot M, Martinet L, Turrin CO, Majoral JP, Fournie JJ, Caminade AM, Poupot R. Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer. *J Leukoc Biol* 2009;85(3):553-62.
355. Hayder M, Varilh M, Turrin CO, Saoudi A, Caminade AM, Poupot R, Liblau RS. Phosphorus-Based Dendrimer ABP Treats Neuroinflammation by Promoting IL-10-Producing CD4(+) T Cells. *Biomacromolecules* 2015;16(11):3425-33.

# 7. RÉSUMÉS

## Résumé en langue anglaise

Rheumatoid arthritis (RA) is the most frequent chronic inflammatory rheumatism. This disease is characterized by an auto-immunity and a hyperplasic synovitis, both responsible for peripheral joints destruction. Macrophages contribute to inflammatory aspects of RA. This cell type can present various states of activation or "polarization", reversible and dependent on its environment, notably cytokines. Biologics (bDMARDs) represented a revolution in severe RA treatment. However, data regarding their specific action on macrophage are scarce.

The aims of our translational work were: (i) to assess the *in vitro* effect of RA bDMARDs (anti-TNF: etanercept, adalimumab, certolizumab; anti-IL-6R: tocilizumab; CTLA4-Ig: abatacept) and of a potential drug candidate, dendrimer ABP, on the phenotype of monocytes-derived-macrophages from RA patients and healthy volunteers, during differentiation and activation phases, (ii) to identify polarization markers correlated with disease activity (DAS28).

Among bDMARDs, only anti-TNF modulated macrophage polarization. During differentiation, anti-TNF bDMARDs induced a bias toward the so-called alternative non-inflammatory polarization. In inflammatory context, anti-TNF bDMARDs induced a selective preservation of markers associated with IL-10 (CD16, CD163, MerTK) and an inhibition of inflammatory markers (CD40, CD80). We showed that these changes in phenotype were associated: (i) with changes in functions consistent with a polarization induced by IL10, (ii) a decrease in inflammatory cytokines production (TNF, IL-6, IL-12), (iii) and an increase in phagocytosis. We showed that this modulation was mechanistically related to an early IL-10 production and to STAT3 signaling.

We have showed that certolizumab, an anti-TNF agent, induced an anti-inflammatory response, implicating the transcription factor NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2), a central regulator of the response to oxidative stress.

Moreover, we observed that dendrimer ABP, which demonstrated its efficacy in murine arthritis, induced alternative macrophages.

We observed that CD16 expression on non-activated macrophages, was negatively correlated with RA activity.

This work contributes to demonstrate the relevance of macrophage targeting in RA and enabled us to identify theranostic targets for RA treatment with anti-TNF bDMARDs.

Résumé en langue française

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent. Cette maladie est caractérisée par une auto-immunité et une synovite hypertrophique, responsables d'une destruction des articulations périphériques. Les macrophages contribuent aux phénomènes inflammatoires de la PR. Ces cellules peuvent présenter différents états d'activation ou « polarisation », réversibles, dépendant de leur environnement, notamment cytokinique. Les biothérapies (bDMARDs) ont représenté une avancée majeure dans la prise en charge des manifestations inflammatoires des formes sévères de PR. Toutefois, peu d'études ont évalué si ce bénéfice était lié à une action spécifique sur le macrophage.

L'objectif de ce travail de transversal était : (i) d'évaluer *in vitro* l'effet des principales biothérapies de la PR (anti-TNF : etanercept, adalimumab, certolizumab ; anti-IL-6R : tocilizumab ; CTLA4-Ig : abatacept) et d'un agent thérapeutique potentiel, le dendrimère ABP, sur la différenciation et l'activation de macrophages dérivés de monocytes issus de patients atteints de PR et de sujets sains, (ii) d'identifier des marqueurs de polarisation du macrophage, corrélés à l'activité de la maladie (DAS28).

Parmi les bDMARDs évalués, seuls les anti-TNF ont montré une action sur la polarisation des macrophages. En contexte de différenciation avec M-CSF, les bDMARDs anti-TNF ont induit un biais vers une polarisation non inflammatoire dite alternative. En contexte d'activation inflammatoire, les bDMARDs anti-TNF ont induit une préservation sélective des marqueurs de polarisation liés à l'IL-10 (CD16, CD163, MerTK) et une inhibition des marqueurs inflammatoires (CD40, CD80). Nous avons montré que ce changement phénotypique s'accompagnait : (i) d'un changement fonctionnel concordant avec une polarisation induite par l'IL-10, (ii) d'une inhibition de la production des cytokines de l'inflammation (TNF, IL-6, IL-12), (iii) et d'une majoration de la phagocytose. Cette modulation de phénotype était due à une production précoce d'IL-10 et dépendante de STAT3.

Nous avons pu montrer que le certolizumab, un anti-TNF, induisait une réponse anti-inflammatoire, impliquant le facteur de transcription NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2), un régulateur central dans la réponse au stress oxydatif.

De plus, nous avons pu observer que le dendrimère ABP, qui a fait la preuve de concept de son efficacité dans l'arthrite murine, agissait par le biais de l'induction d'un phénotype alternatif des macrophages.

Enfin, nous avons observé que l'expression de CD16, à la surface des macrophages non activés, était corrélée négativement à l'activité de la PR.

Ces travaux concourent à montrer l'intérêt du ciblage du macrophage dans la PR et nous ont permis d'identifier de potentielles cibles théranostiques dans le traitement de la PR par anti-TNF.