



HAL
open science

Le rôle des cellules myéloïdes et microARNs dans l'arthrite juvénile

Nadege Nziza

► **To cite this version:**

Nadege Nziza. Le rôle des cellules myéloïdes et microARNs dans l'arthrite juvénile. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT014 . tel-02387347

HAL Id: tel-02387347

<https://theses.hal.science/tel-02387347v1>

Submitted on 29 Nov 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.

**THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

En Biologie-Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche INSERM U1183

**Le rôle des cellules myéloïdes et des microARNs dans
l'arthrite juvénile**

Présentée par Nadège NZIZA

Le 27 juin 2019

Sous la direction de Florence APPARAILLY et Eric JEZIORSKI

Responsable scientifique Arthritis R&D : Yosra MESSAI

Devant le jury composé de

Eric SOLARY, PU-PH, INSERM

Rozen LE PANSE, DR, CNRS

Alexandre BELOT, PU-PH, CHU

Florence APPARAILLY, DR, INSERM

Eric JEZIORSKI, MCU-PH, INSERM

Isabelle Duroux-Richard, IR, INSERM

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Invitée

Résumé

L'arthrite juvénile idiopathique (AJI) est un groupe hétérogène de rhumatismes inflammatoires chroniques d'origine inconnue affectant les enfants de moins de 16 ans. Afin de mettre en évidence des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'AJI, une inclusion de patients atteints d'une autre forme d'arthrite juvénile, à savoir l'arthrite septique, a été effectuée. Cette dernière a pour origine la prolifération intra-articulaire de bactéries qui provoquent une réaction inflammatoire responsable de lésions tissulaires.

Un intérêt particulier a été porté sur les sous-populations de monocytes et de cellules dendritiques (DCs) ainsi que les profils d'expression des microARNs (miARNs) dans le sang périphérique (SP) et le liquide synovial (LS) des patients. Ces différents marqueurs biologiques ont été choisis car ils jouent un rôle majeur à la fois dans la régulation de l'inflammation et la pathogénèse des maladies inflammatoires.

Nos résultats montrent que le LS discrimine de façon plus importante ces deux formes d'arthrite juvénile que le SP, avec une accumulation plus élevée de pDCs et cDCsCD141⁺ en cas d'AJI par rapport à l'AS, tandis que les trois sous-populations majeures de monocytes (CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺⁺CD16⁺ et CD14⁺CD16⁺⁺) sont en nombre plus élevé dans le LS des patients AS. Par ailleurs, nos études ont montré que le principal sous-type de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) localisé dans le LS des patients AJI correspond aux monocytes CD14⁺⁺CD16⁺. L'analyse de l'expression des marqueurs d'activation met en évidence de façon systématique une expression de CD64 et PDL2 plus faible chez les patients atteints d'AJI, pouvant expliquer la perte de tolérance mise en évidence dans des cas d'AJI.

L'étude du miRNome montre que le sérum ne permet pas de discriminer l'AJI et l'AS, tandis que, dans le LS, nous avons identifié 19 miARNs différemment exprimés entre ces deux pathologies avec 14 miARNs (miR-7150, miR-150-5p, miR-146a-5p, miR-6794-5p, miR-4800-5p, miR-4646-5p, miR-6782-5p, miR-4419a, miR4419b, miR-4667-5p, miR-155-5p, miR339-3p, miR-342-5p and miR-6716-5p) plus exprimés dans l'AJI que l'AS et 5 miARNs (miR-6734-3p, miR-6841-3p, miR-6764-5p, miR-8063 and miR-2909) plus exprimés en cas d'AS. Une attention particulière a été portée sur le miR-150 qui semble jouer un rôle majeur dans l'accumulation importante de monocytes CD14⁺⁺CD16⁺ au sein des articulations des patients AJI, notamment via le ciblage de CCR2. Dans l'ensemble, ce projet a permis d'identifier différents acteurs cellulaires et moléculaires pouvant être impliqués dans la physiopathologie de l'AJI.

Remerciements

Avec ces trois belles années de thèse qui s'achèvent, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont contribué aussi bien à l'aboutissement de mon travail qu'à mon épanouissement personnel au quotidien.

Je commence par adresser mes chaleureux remerciements à ma directrice de thèse, **Florence Apparilly**. Je te remercie pour ton encadrement tout au long de ma thèse. Tu as toujours été très présente et à l'écoute, et je te remercie pour tes qualités scientifiques ainsi que ton expertise que tu nous fais partager.

Je remercie également mon co-directeur **Eric Jeziorski** sans qui ces travaux n'auraient certainement pas pu se réaliser. Je te remercie pour toutes ces discussions d'ordre médical que nous avons eues et qui m'ont permis de me rapprocher d'avantage du côté clinique de la recherche. Tu es quelqu'un de très positif et c'est toujours très encourageant de parler avec toi.

Je continue en remerciant les membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner et commenter mon travail. Je remercie le Dr. **Eric Solary** d'avoir bien voulu être président de jury et mettre son expertise en immunologie au profit de ma thèse. Je remercie les Dr. **Rozen Le Panse** et **Alexandre Belot** pour tout le temps que vous avez consacré à évaluer mon travail. Merci pour chacune de vos corrections et suggestions. Je vous remercie également pour votre présence le jour de la soutenance et pour tout ce que vous avez apporté à ce travail.

Un tout grand merci aux deux encadrants que j'ai eu durant ma thèse, à savoir Isabelle et Jérôme. **Isabelle**, merci pour tout ce que tu m'as appris dans le cadre de l'étude des miARNs. Merci pour la formation que tu m'as apportée, merci pour tes conseils et pour tout le temps que tu m'as consacré durant ces trois années de thèse. **Jérôme**, je te remercie pour ton encadrement et pour ta passion pour l'immunologie que tu sais si bien transmettre. Je ne peux évidemment pas continuer sans parler de ces longues discussions très sérieuses que nous avons eues sur l'œnologie ! J'ai tant appris avec toi Jérôme et je te remercie sincèrement pour tes conseils aussi bien dans mon travail que dans ma carrière.

Je remercie le reste de l'équipe avec qui j'ai passé des moments formidables ! Merci aux stagiaires – **Léa, Stephy, Guillaume, Daniel, Sarah**, sans oublier **Cidouuuuuce** !!! Tu as lancé le mouvement de la douceur et jusqu'à présent nous nous efforçons de le perpétuer, sans pour autant prétendre pouvoir t'arriver à la cheville ! – merci à **Sylvie** et **Elodie** pour les bons moments passés avec vous, et merci à **Gabriel**. Merci à la plus douce des douces, **Déborah** ! Ton grand cœur, ton calme dans toutes les situations et ta façon de toujours être positive sont vraiment une source de motivation. Tu seras une prof formidable et tes enfants ont beaucoup de chance d'avoir une maman si forte et si douce à la fois. Merci à **Mélanie** et

Pauline, et peut-être à un de ces quatre. **Maxou** alias **Doucouce** alias **Poulouuuule** !!!!! Par où commencer pour te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi et pour tout le monde durant toutes ces années ??? Tu es toujours prêt à aider les autres et une thèse sans toi je n'imagine même pas la détresse !! Bien que tu ne sois pas stable (non mais ça il faut qu'on en reparle !!), ces années passés avec toi ont été formidables et je n'aurais pas pu rêver mieux comme voisin de bureau mon Maxou ! Merci à toi **Claire** pour ces moments qu'on a passés ensemble à se soutenir, se détendre et s'encourager. Ca a été un réel plaisir de passer du temps avec toi et on aurait aimé en avoir plus !! **Valentin** qui est parti si vite !!! Je dois l'avouer, ça a fait un petit (tout petit hein !) vide quand tu es parti ! Je n'avais plus personne pour me cacher mon téléphone et semer des post-it tout partout pour que j'aie m'embêter à le chercher ! Et ce ballon de basket, je te le lance dessus la prochaine fois que je le vois !!! Mais merci pour tout. Ma douce **Yasa**, merci pour ces fous rires à n'en plus finir, merci pour ta bonne humeur et merci pour les sketches que vous nous offrez Maxou et toi !!! Merci pour l'amie que tu es ! Ne nous oublie pas quand on sera parti ! Je finis cette partie avec toi ma **Paupidouce**. Tu as été un vrai coup de cœur pour moi ! Je ne pensais pas qu'il soit possible de s'attacher si vite et si fort à quelqu'un ! Quand tu te retrouves seule au labo le soir et que d'un coup tu as un gros coup de déprime en voyant la blouse de quelqu'un qui est parti, là tu te dis mais que passa ??? lol Ma douce, je te remercie pour tous les doux moments que nous avons passés ensemble ! Même s'il fallait insister 3000 ans pour te faire sortir et que tu avais souvent des excuses pourries, tu m'as manqué très fort quand tu es partie.

Merci à vous de la plateforme eCellFrance. Je vous remercie **Pascale** et **Maylis** pour tout ce que vous m'avez appris en ce qui concerne les analyses cytométriques. Merci à **Emilie**, **Karine** et **Anne-Laure** pour ces trois années passées avec vous, merci pour la bonne humeur que vous répandez autour de vous.

Aux actuels et anciens de l'équipe d'Edouard Tuillon, je vous dis un grand merci ! Merci à toi **Edouard**, merci aussi à **Karine**, **Amandine** and thank you **Armenda** pour cet accueil que vous m'avez fait dans votre équipe durant mon stage de master 2. Merci pour la formation que vous m'avez apportée et merci pour m'avoir aidé à me sentir rapidement à l'aise à Montpellier. Un tout grand merci à toi **Séverine** pour tout ce que tu m'as apporté ! Ca ne te suffisait pas de me recevoir chez toi quand je suis arrivée à Montpellier, il a aussi fallu que tu m'aides à trouver cette thèse ! Merci pour tous tes conseils, pour ta bonne humeur, ta gentillesse. Je te remercie également **Anne-Laure** pour les bons repas que nous avons eus ensemble dans la super cantine gastronomique !

Merci également à l'équipe John de Vos. Merci **Chloé** et **Mathieu** pour les petits moments de détente que j'ai passés avec vous, surtout ceux avec des bonbons, et merci aussi à **Axelle** ! Merci **Joffrey** pour nous avoir appris tout ce qu'il était possible de faire avec des ciseaux ! Merci pour ta bonne humeur (même si tu ne comprenais pas toujours mes blagues super drôles !!), pour toutes ces soirées passées ensemble depuis la création du quatuor fantastique. Merci pour ce trio qu'on formait avec Yaya et merci pour tout les encouragements et la motivation que vous m'avez apportés. Un tout grand merci à toi **Said**

pour tous tes conseils, pour le temps que tu es toujours prêt à donner quand on a besoin de toi ! Les étudiants de ton équipe ont beaucoup de chance de t'avoir. D'ailleurs ils devraient te dire merci tous les matins dès qu'ils te voient avant même de te dire bonjour!! Merci aussi à toi ma **Engi** d'amour pour ton grand coeur. Tu as été une sœur pour moi et ça n'a plus été pareil sans ton visage toujours si souriant au labo. Tu es une source de motivation et de force et je te remercie pour tout ce qu'on a partagé.

Aux autres membres de l'IRMB qui m'ont permis de passer de belles années durant ma thèse, je dis un grand merci. Merci à **Jean** pour ces folles soirées sur les pistes de danse, **Alexis** pour ta bonne humeur en toute circonstance, **Bertrand** et ses bons plans karaoké, merci à **Philippe** toujours si gentil et positif, merci à **Micka** pour les bons moments passés avec toi et pour ces délicieux magrets de canard que j'espère que tu nous referas un de ces quatre ! Merci à **Oriane**, pour les petites conversations très agréables dans les couloirs de l'IRMB, merci aux deux **Jérémy**, à **Candice**, **Alex**, **Sarah**, **Gauthier** à qui je fais un check par écrit, merci à toi **Marie** pour ta gentillesse et ce que tu m'as appris sur les microparticules, merci à **Audrey** qui est toujours de bonne humeur et à **Béryl** pour toute ton aide et tes conseils pour la thèse et les post-doc (ne crois pas que c'est fini, tu ne te débarrasseras pas si facilement de moi !!). Merci aussi à **Cathy** avec qui c'était toujours agréable de passer des pauses midi. Je te remercie ma douce **Florence** pour les soirées avec le quatuor. J'aurais tellement aimé passer plus de temps avec toi ! Essaie de ne plus douter de toi et tu rendras compte de tout ce que tu es capable d'accomplir.

Et mes douces des soirées pyjamas !!!! Mais non je ne vous oublie pas !! Merci à toi **Pauline** pour toutes les fois où tu nous as accueillies chez toi. Parce que non, même un 28 décembre, il ne fait pas trop froid pour aller se baigner !! Merci **Chloé** pour ces douces soirées et pauses cafés ! Merci aussi pour les séances de sport !! Heu je veux dire cinéma ! Merci **Elena** pour tous ces moments de rire ! Merci pour tes encouragements, surtout durant ces dernières semaines stressantes ! Tu es tout le temps souriante, pétillante, et ça fait toujours plaisir à voir. Même si tu es nulle avec les mots d'amour, on sait que tu le penses et c'est totalement réciproque ! **Mélanie** (hâte de voir ta ton visage quand tu vas lire les remerciement du dessus hihhi), merci pour ton soutien, ton amitié, cette façon que tu as de toujours t'investir à fond et donner de ta personne pour aider tes amis. Dès que tu avais fini de nous analyser et que tu m'avais validée (quel honneur tu m'as fait ma douce !!!), j'ai adoré tous les moments passés avec toi. Merci mes douces pour toute cette force que vous m'avez donnée durant la rédaction et la préparation de la soutenance. Vous êtes des amours et je suis contente de vous avoir parmi mes amies.

Merci **Yaya** pour tout ce que tu m'as apporté durant toutes ces années. Tu es un frère pour moi, toujours prêt à me motiver, m'aider à croire en moi, me conseiller. Toi aussi tu es une belle personne !! Avec qui j'ai pris plaisir à partager tous ces moments de rire et aussi de boulot jusque pas d'heure. Même si je t'en veux pour les quelques jours de congé que tu as pris et durant lesquels je ne te voyais pas au labo, je ne te dirai jamais assez merci pour tout ce que tu m'as apporté. Mec, rendez-vous au sommet on a dit !!!

Mon **Lobe**, même après toutes ces années tu me supportes encore ! Franchement je ne sais pas comment tu fais ! Lobe, urakoze pour ton rôle de frère, de tonton, de conseiller, merci parce que tu as toujours été là quand j'ai eu besoin de toi. Je pense que je vais devoir commencer à m'habituer au nom Roberi pour mes enfants ! Merci pour tout ce que tu représentes pour moi. Tu es foutu, je vais m'accrocher à toi jusqu'au bout !!!

Freddy, même à distance, tu as toujours été là pour moi et je te remercie infiniment pour ça. Merci pour m'avoir remonté le moral tellement de fois quand j'étais stressée et que je doutais de moi. Merci pour ta façon de toujours être positif et toujours prêt à aider les gens autour de toi.

Merci à vous mes tous petits d'amour pour toutes ces années d'amitié ! **Laetitia, Cecilia, Graciella** et **Iris**, en plus d'être mes meilleures amies, vous êtes ma famille. Même si vous n'avez pas pu venir, je sais que vous étiez de tout cœur avec moi et je vous remercie pour tout le soutien et tout l'amour que vous m'apportez depuis si longtemps ! Merci aussi à mon bébé Mica qui arrive à peine dans nos vies et qu'on aime déjà si fort !!

Mes cousines !!! Thank you so much for all these crazy years!! **Isabelle, Stella, Mamy**, could we go back to 2016 please?? Or at least let us plan a trip together and this time **Mamy, Alexia, Michèle** and **Linda** have to be in it!! Thank you all for everything, I can't wait to celebrate this with you girls!

Un tout grand merci à la famille qui est toujours là pour me soutenir, et merci à vous qui avez fait le déplacement jusqu'ici pour assister à ma soutenance. Merci à Tatie **Evelyne** et Tatie **Mylène**, merci à **Paulin** (the best parrain ever !!), à Tantine **Esther, Freddy** et la famille **Gakumba**, merci aussi à Tonton **Antoine**. Cela me touche énormément de vous avoir eu avec moi durant cette journée. Je tenais également à te remercier Tonton **Byusa** pour ton soutien durant toutes ces années. Tu n'as peut-être pas pu venir, mais tu m'as toujours encouragée même à distance et tu as été comme un père pour moi. Merci pour tout.

Je finis mes remerciements avec vous ma famille qui êtes ce qu'il y a de plus important au monde pour moi. Merci à vous qui avez été comme des mères pour moi, Tantine **Tina**, Tantine **Gisèle** et **Mamita**. Merci pour votre affection et vos encouragements constants. Merci à mes petites sœurs, **Linda** et **Khadidja**, et mon petit frère **Kany**. Merci pour tout l'amour que vous m'apportez. Et enfin **Maman**, je te l'avais dit pour dans mon mémoire, je te le dis encore ici, si je devais te remercier pour tout ce que tu représentes pour moi, il me faudrait plus de pages que ce manuscrit ! Je vais donc essayer d'être brève et te dire que tout ce que j'ai pu accomplir jusqu'à présent c'est grâce à ton soutien et tes encouragements. Tu l'as voulu pour moi, tu y as cru pour moi et, depuis tes 19 ans, tu te bas pour moi. Toute la force dont j'ai besoin pour traverser les moments difficiles, je la tiens de toi. Merci Maman pour toujours croire en moi, même quand moi je n'y crois pas, merci pour ton amour, merci pour tout. Ndagukunda.

Table des matières

A. Table des matières	7
B. Liste des abréviations	11
C. Introduction	14
1. Système articulaire	14
1.1 Classification des articulations	14
1.2 Composition des articulations synoviales	16
1.2.1 Tissu osseux	16
1.2.1.1 Composition	17
1.2.1.2 Formation	18
1.2.2 Cartilage articulaire	23
1.2.2.1 Composition	23
1.2.2.2 Organisation tissulaire	24
1.2.3 Cavité synoviale	25
2. Arthrite juvénile idiopathique	27
2.1 Définition	27
2.2 Classification	28

2.3 Physiopathologie	34
2.3.1 Perturbations tissulaires	35
2.3.2 Facteurs génétiques	35
2.3.3 Cellules du système immunitaire	36
2.3.3.1 Lymphocytes	36
2.3.3.2 Cellules dendritiques et monocytes	38
2.3.3.3 Neutrophiles	39
2.3.4 Facteurs environnementaux	39
2.4 Traitements	40
2.4.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID)	41
2.4.2 Glucocorticoïdes	41
2.4.3 Médicaments antirhumatismaux (DMARD) non biologiques	43
2.4.4 DMARD biologiques	44
3. La lignée myéloïde du système immunitaire	44
3.1 Généralités	44
3.2 Origine et différenciation	45
3.3 Les cellules myéloïdes	47
3.3.1 Les monocytes	48
3.3.1.1 Hétérogénéité phénotypique des monocytes	48
3.3.1.2 Hétérogénéité fonctionnelle des monocytes	49
3.3.2 Les cellules dendritiques	52
3.3.2.1 Les différents sous-types de DCs	53
3.3.2.2 Etude fonctionnelle des DCs	54

3.4 Implication des monocytes et cellules dendritiques dans l’AJI 56

4. MicroARNs 59

4.1 Les miARNs dans les systèmes biologiques

4.1.1 Biogenèse des miARNs

4.1.2 Mode d’action des miARNs

4.1.3 Les miARNs dans les fluides corporels

4.2 Les miARNs et le système immunitaire

4.3 Les miARNs et l’AJI

4.3.1 Les miARNs dans les fluides corporels

4.3.1.1 Les miARNs du sérum

4.3.1.2 Les miARNs du plasma

4.3.2 Les miARNs intracellulaires

4.4 Conclusion

5. Projet de recherche 71

D. Travaux personnels 73

1. Caractérisation des sous-populations de cellules myéloïdes dans l’AJI et l’AS juvénile 73

2. Analyse du profil microARN dans l’AJI et l’AS juvénile 111

3. Etude des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l’AJI 149

E. Discussion	166
1. Comparaison entre AJI et AS juvénile	166
2. Comparaison entre les contextes systémique et articulaire	174
3. Conclusions et perspectives	176
F. Références bibliographiques	178

B. Liste des abréviations

AAN :	Anticorps antinucléaires
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Ago :	Argonaute
AJI :	Arthrite juvénile idiopathique
APRIL :	« Proliferation-inducing ligand »
ARA :	« American Rheumatism Association »
BAFF :	« B-cell activating factor »
BDCA :	« Blood dendritic cell antigen 2 »
CCL :	« CC-chemokine ligand »
CCP :	Peptides cycliques citrullinés
CCR :	« CC-chemokine receptor »
cDC :	Cellule dendritique conventionnelle
CDP :	« Common DC progenitor »
CLP :	« Common lymphoid progenitor »
CMP :	« Common myeloid-erythroid progenitor »
COX :	Cyclooxygénase
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
CRP :	« C-reactive protein »
CSF1R :	« Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor »
CSH :	Cellules souches hématopoïétiques
DAMP :	« Damage-associated molecular pattern proteins »
DII1 :	« Ligand delta-like 1 »
DMARD :	Médicaments antirhumatismaux
EULAR :	« European League Against Rheumatism »
FR :	Facteurs rhumatoïdes
GMP :	« Granulocyte/macrophage progenitor »

GWAS :	« Genome Wide Association Study »
hGH :	« Human growth hormone »
HLA :	Antigène leucocytaire humain
HSP :	« Heat shock protein »
IFN :	Interféron
IG :	Immunoglobuline
IGF :	« Insulin-like growth factors »
IL :	Interleukine
ILAR :	Ligue internationale des associations de rhumatologie
InfDC :	Cellule dendritique inflammatoire
LFA-1 :	« Lymphocyte function-associated antigen-1 »
LPS :	Lipopolysaccharides
LS :	Liquide synovial
MCP-1 :	« Monocyte chemoattractant protein-1 »
MDP :	« Macrophage/DC progenitor »
MEK :	« Mitogen-activated protein kinase kinase »
MHC :	Complexe majeur d'histocompatibilité
miARN :	microARNs
MIF :	« Macrophage migration inhibitory factor »
MIP :	« Macrophage inflammatory protein »
MMP :	Métalloprotéases matricielles
MyD88 :	« Myeloid differentiation primary response 88 »
NOD :	« Nucleotide oligomerization domain »
Cellules NK :	« Natural killer cells »
NSAID :	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
PAMPs :	« Pathogen-associated molecular patterns »
PBMC :	Cellules mononuclées du sang périphérique
pDCs :	Cellules dendritiques plasmacitoïdes
PR :	Polyarthrite rhumatoïde

PRR :	« Pattern recognition receptors »
PRINTO :	« Pediatric Rheumatology International Trials Organization »
PTPN22 :	Protéine tyrosine phosphatase, type non récepteur 22
RANK :	« Receptor activator of nuclear factor kappa B »
RIG :	« Retinoic acid-inducible genes »
ROS :	Espèce réactive de l'oxygène
SEB :	« Staphylococcus enterotoxin B »
SOCS1 :	« Suppressor of cytokine signaling 1 »
SP :	Sang périphérique
Th :	« T helper »
TLR :	« Toll-like receptor »
TNF- α :	« Tumor necrosis factor- α »
Treg :	T régulateurs
UTR :	Région non traduite
VEGF :	« Vascular endothelial growth factor »
VS :	Vitesse de sédimentation
VTCN1 :	« V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 »

C. Introduction

1. Système articulaire

Le système articulaire représente l'ensemble des zones de jonction entre plusieurs pièces du squelette ainsi qu'entre les dents et les os. Les articulations dérivent du mésenchyme qui évolue pour donner des éléments fibreux, cartilagineux ainsi que les cavités synoviales. Ces différentes parties vont permettre le mouvement du squelette tout en apportant une protection aux articulations, réduisant et amortissant ainsi les contraintes de pression. Elles assurent le maintien des articulations et leur permettent d'exercer leur rôle biomécanique en évitant toute dislocation (Tortora and Derrickson, 2010).

Les articulations représentent un élément clé pour les mouvements effectués par le corps humain. Les maladies qui leur sont associées, particulièrement celles survenant durant l'enfance, ont de lourdes répercussions sur la croissance, la posture, les actions exercées par le corps et peuvent être responsables de douleurs invalidantes (Krenn et al., 2014).

1.1 Classification des articulations

La classification structurelle des articulations repose sur deux critères : d'une part le type de tissu conjonctif qui maintient les os ensemble, d'autre part la présence ou non d'un espace entre les pièces osseuses, nommé cavité synoviale. Sur la base de ces critères, trois catégories d'articulations sont identifiées : les articulations fibreuses, cartilagineuses et synoviales (Juneja and Hubbard, 2019; Krenn et al., 2014).

A) Articulations fibreuses

Ces articulations ne renferment pas de cavité synoviale et les os sont maintenus par un tissu conjonctif dense, irrégulier et contenant de nombreuses fibres de collagènes. Ces articulations permettent peu ou pas de mouvements. Elles sont retrouvées entre les os du crâne, ou encore entre les racines des dents et les alvéoles du processus alvéolaire.

B) Articulations cartilagineuses

Les articulations cartilagineuses sont dépourvues de cavité synoviale et permettent peu ou pas de mouvements. Les os y sont maintenus par du cartilage hyalin ou du fibrocartilage. Un exemple d'articulation cartilagineuse est celle entre la première côte et le manubrium du sternum. Les articulations entre les vertèbres sont également cartilagineuses.

C) Articulations synoviales

Ces articulations sont composées de pièces osseuses recouvertes de cartilage, le tout étant enchâssé dans une capsule articulaire formée de tissu conjonctif dense et irrégulier. La face interne est tapissée par une membrane synoviale qui sécrète du liquide synovial (LS) (Figure 1). L'extérieur de la capsule est maintenu par des ligaments, eux-mêmes recouverts de muscles qui s'insèrent au squelette par le biais de tendons. Les articulations synoviales sont localisées entre les os qui assurent les mouvements, notamment ceux des membres comme le genou. Ce type d'articulation va particulièrement nous intéresser dans le reste de ce manuscrit car il représente le site du développement des arthrites chroniques.

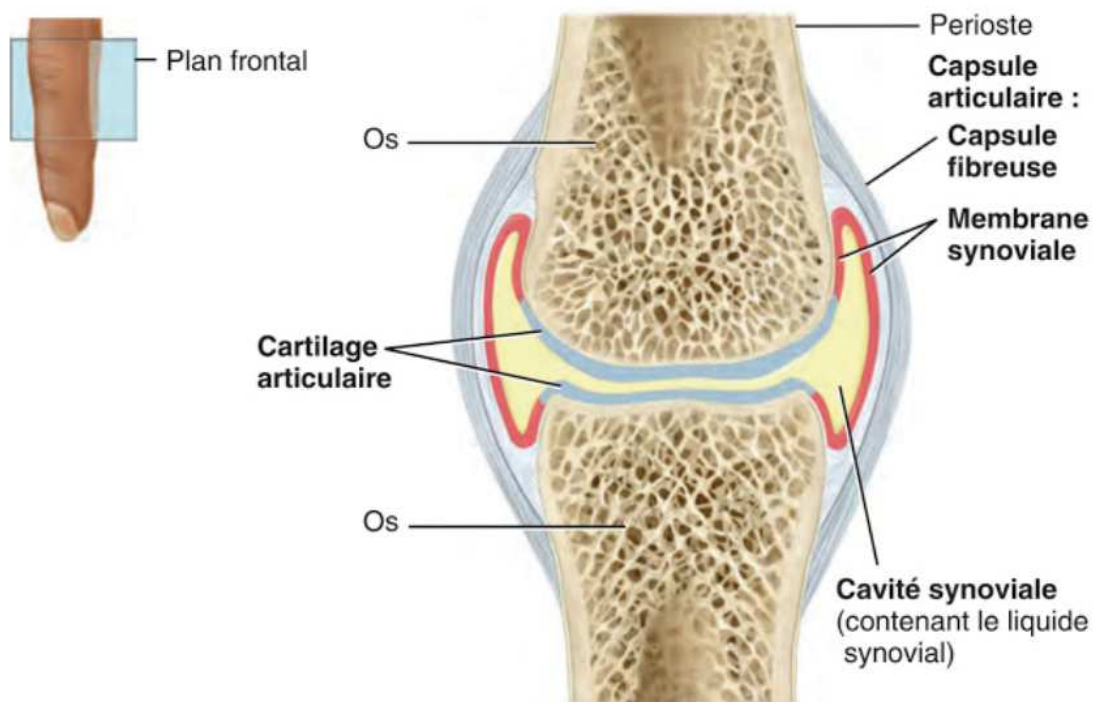


Figure 1 : Coupe frontale d'une articulation synoviale (Tortora and Derrickson, 2010).

1.2 Composition des articulations synoviales

1.2.1 Tissu osseux

Le tissu osseux est une structure complexe et dynamique subissant de nombreux remaniements tout au long de la croissance des individus. Il exerce un rôle de support pour l'ensemble de corps, apportant des points d'attaches pour les tendons et les muscles. Il va également permettre la protection des organes internes ainsi que les mouvements du corps lors de la contraction des muscles qui lui sont attachés. De plus, le tissu osseux, qui est traversé par des artères et des veines, est un lieu de stockage pour des minéraux tels que le calcium ou le phosphore qu'il libère dans le sang afin de maintenir une homéostasie minérale. Dans certains os se trouve un tissu conjonctif nommé moelle osseuse. Chez le nouveau né, la moelle osseuse est rouge. Une grande partie de celle-ci devient

progressivement jaune avec l'âge. La moelle osseuse rouge contient d'une part des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui sont les précurseurs des cellules immunitaires sanguines, d'autre part des cellules du stroma médullaire représentant un tissu de soutien créant un microenvironnement propice à la croissance et à la différenciation des CSH. En ce qui concerne la moelle osseuse jaune, elle est principalement constituée de cellules adipeuses stockant des triglycérides. Quelques cellules sanguines y sont également localisées. Cette évolution au niveau de la composition de la moelle osseuse durant la croissance des individus s'accompagne de modifications du système immunitaire (Berendsen and Olsen, 2015).

1.2.1.1 Composition

Les tissus osseux sont composés de cellules dispersées dans une matrice extracellulaire contenant environ 25% d'eau, 25% de fibres de collagène, principalement du collagène de type I, et 50% de sels minéraux. Ces sels minéraux se déposent dans la structure formée par les fibres de collagène, cristallisent et réalisent ainsi le processus de calcification qui permet de créer la texture très résistante et dure du tissu osseux.

Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocyte représentent les principales cellules du tissu osseux. Les ostéoblastes proviennent de la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses. Ils produisent des fibres de collagènes et des protéines induisant la formation de la matrice extracellulaire du tissu osseux. En se différenciant à leur tour, les ostéoblastes matures deviennent des ostéocytes qui représentent les principales cellules du tissu osseux. Ces dernières assurent le maintien du métabolisme osseux via la régulation des échanges de nutriments et de déchets avec le sang. Enfin, les ostéoclastes sont des cellules multi-nucléées provenant de macrophages qui ont fusionné et dont la fonction est d'assurer la résorption osseuse. Ces cellules sécrètent des enzymes protéolytiques qui vont dégrader la matrice osseuse et ainsi participer au maintien, à la croissance et la réparation des tissus osseux, en synergie avec l'action des ostéoblastes (Valenti et al., 2016).

1.2.1.2 Formation

Le processus d'ossification inclue trois temps majeures : (A) formation osseuse lors du développement embryonnaire et fœtal, (B) croissance osseuse de l'enfance jusqu'à l'âge adulte et (C) remodelage et renouvellement du tissu osseux tout au long de la vie. Des mécanismes de régulation interviennent à chacune de ces étapes afin d'assurer le bon développement du squelette et du corps. Ceux-ci dépendent notamment de l'apport en minéraux tels que le calcium, le phosphore, le magnésium et les vitamines D, C et A. Certaines hormones ont également un rôle important à jouer dans le développement osseux, à savoir l'hormone de croissance humaine (hGH) produite par l'hypophyse, les facteurs de croissance IGF produits par le foie et le tissu osseux (Yakar and Adamo, 2012). Les hormones thyroïdiennes, l'insuline ainsi que les hormones sexuelles comme les oestrogènes et les androgènes exercent également un rôle essentiel dans la croissance et le remodelage osseux (Karsenty, 2003).

A) Formation osseuse initiale

La première étape d'ossification se produit à partir d'un squelette embryonnaire composé de mésenchyme localisé sur les futurs sites de tissu osseux. Ces structures servent de support pour l'ossification qui commence à partir de la sixième semaine du développement embryonnaire. L'ossification, qui implique le remplacement du tissu conjonctif en tissu osseux peut se produire directement à partir du mésenchyme. Il s'agit de l'ossification membranaire, responsable de la formation des os plats du crâne, de la mandibule ou encore d'une partie des clavicules. Le deuxième type d'ossification ayant lieu au stade embryonnaire correspond à l'ossification endochondrale. Dans ce cas, le tissu osseux est formé à partir du cartilage hyalin produit à partir du mésenchyme. Cette ossification va être à l'origine des os longs des articulations synoviales (Berendsen and Olsen, 2015).

Dans le cadre de l'ossification membranaire, les cellules mésenchymateuses se regroupent au niveau du centre d'ossification et se différencient en ostéoblastes (Figure 2.1). Ces derniers sécrètent alors la matrice extracellulaire de l'os. Par la suite, les ostéoblastes se différencient en ostéocytes qui répandent leurs prolongements cytoplasmiques pour former des canalicules osseux qui vont creuser la matrice osseuse (Figure 2.2). En quelques jours, du

calcium et autres minéraux se déposent dans la matrice, entraînant la calcification et le durcissement des os. En se développant, la matrice extracellulaire forme des trabécules qui fusionnent et forment des os spongieux (Figure 2.3). Des vaisseaux sanguins peuvent alors se former au niveau des espaces entre les trabécules. En périphérie, le mésenchyme se condense et forme un os compact nommé périoste, qui va entourer l'os spongieux trabéculaire (Figure 2.4).

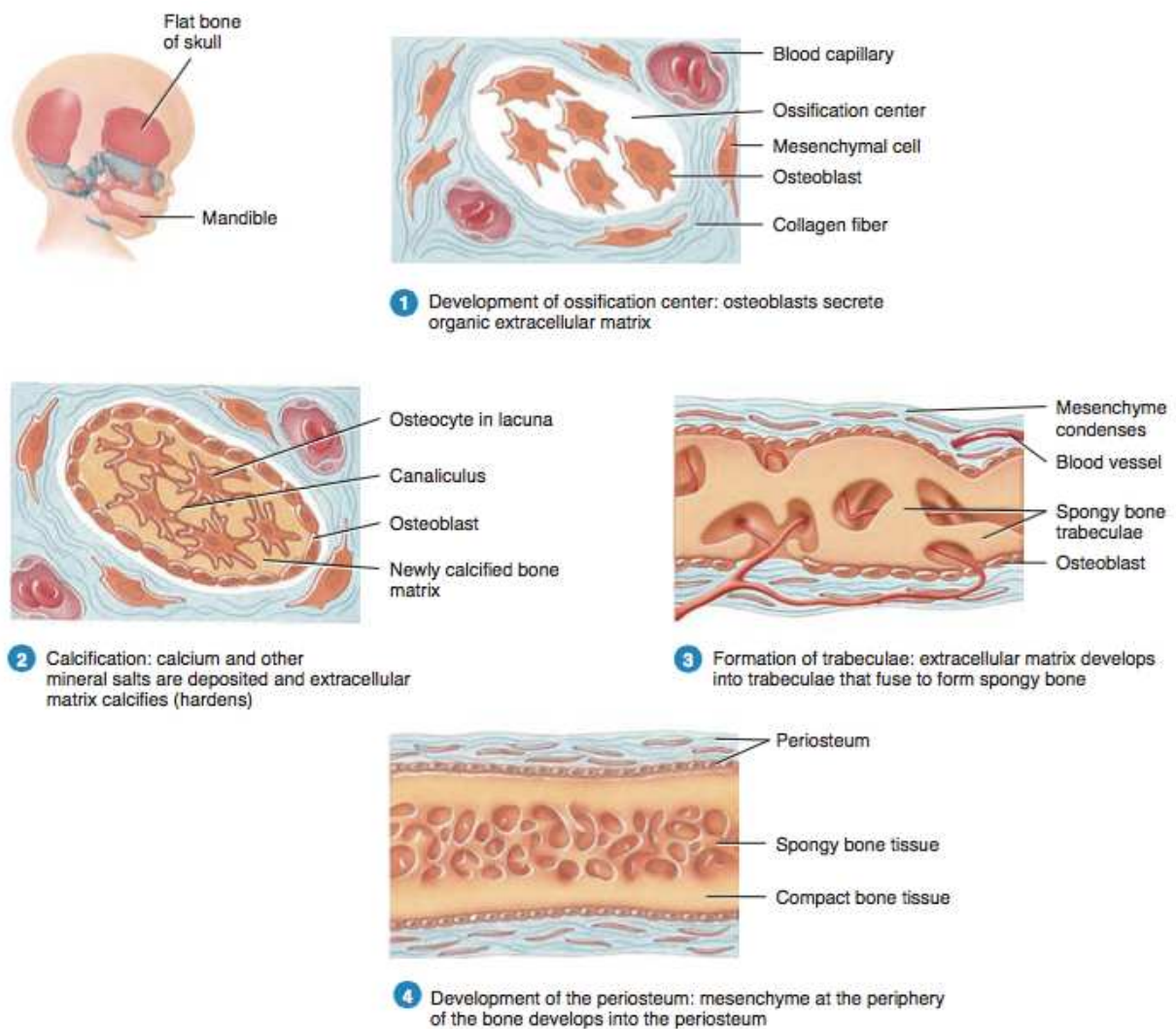
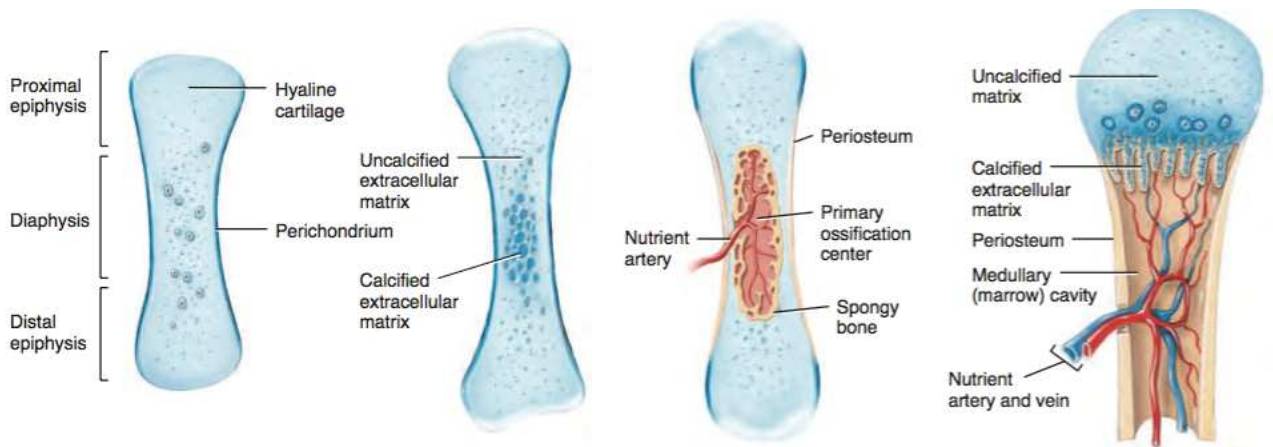


Figure 2 : Les différentes étapes de l'ossification membranaire (Tortora and Derrickson, 2010).

L'ossification endochondrale est quant à elle responsable de la formation de la majorité des os du corps (Figure 3). Lorsque les cellules mésenchymateuses se regroupent au site de formation de l'os, elles se différencient en chondroblastes, et non en ostéoblastes, comme c'est le cas pour l'ossification membranaire (Figure 3.1). Ces chondroblastes produisent une matrice extracellulaire constituée de cartilage hyalin. Cette matrice est ensuite entourée d'un périchondre, le tout formant une structure qui prend peu à peu la forme de l'os en devenir. Au fur et à mesure que la structure s'allonge, les chondroblastes enfouis dans la matrice deviennent des chondrocytes. Ces derniers grossissent et induisent la calcification de la matrice extracellulaire (Figure 3.2). Certains vont mourir à cause d'une absence de nutriments et ainsi induire la formation de lacunes qui vont fusionner et créer des cavités. L'ossification primaire débute au centre de la structure cartilagineuse où du tissu osseux remplace petit à petit le tissu cartilagineux (Figure 3.3). Une artère pénètre le périchondre dans la région centrale de la structure cartilagineuse et stimule la différenciation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes. Le périchondre devient peu à peu un périoste où des vaisseaux sanguins se développent, permettant ainsi la distribution des minéraux et des hormones de croissance. Les ostéoblastes induisent la formation d'une matrice extracellulaire osseuse qui remplace le cartilage pour former des trabécules osseuses spongieuses qui vont progressivement s'étendre aux deux extrémités du modèle cartilagineux. En parallèle, les ostéoclastes vont dégrader les trabécules pour former une cavité médullaire au niveau de la diaphyse de l'os devenu compact (Figure 3.4). Lorsque les vaisseaux sanguins arrivent dans l'épiphyse, des centres d'ossifications secondaires se développent (Figure 3.5). Ces centres secondaires se forment généralement vers la naissance. Ils ne contiennent pas de cavité médullaire et l'os reste spongieux. Les épiphyses sont recouvertes de cartilage hyalin qui devient le cartilage articulaire (Figure 3.6). Entre la diaphyse et l'épiphyse se trouve du cartilage hyalin sous forme de plaque épiphysaire qui restera présent jusqu'à l'âge adulte afin de permettre la croissance en longueur des os (Berendsen and Olsen, 2015).

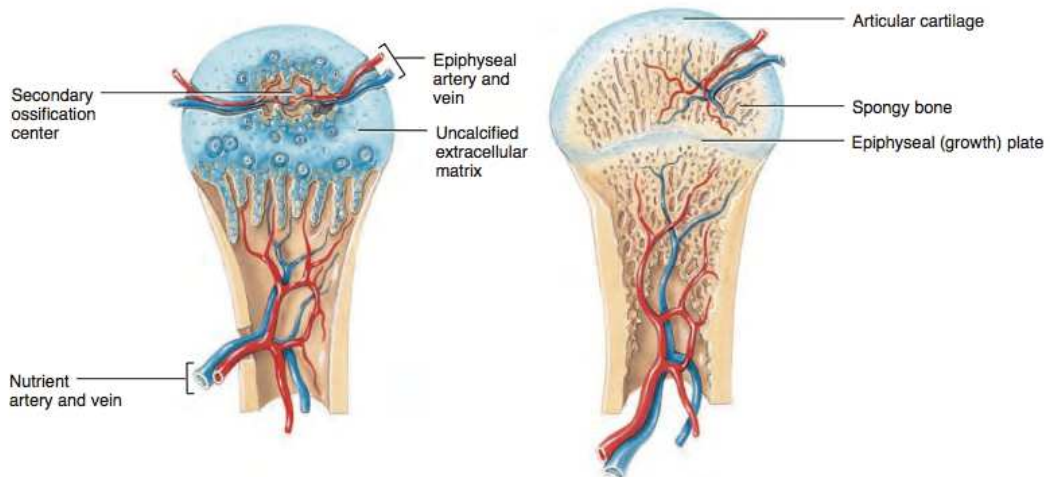


1 Development of cartilage model: mesenchymal cells develop into chondroblasts, which form the cartilage model

2 Growth of cartilage model: growth occurs by cell division of chondrocytes

3 Development of primary ossification center: in this region in the diaphysis, bone tissue replaces most of the cartilage

4 Development of the medullary (marrow) cavity: bone breakdown by osteoclasts forms the medullary cavity



5 Development of secondary ossification centers: these occur in the epiphyses of the bone

6 Formation of articular cartilage and epiphyseal plate: both structures consist of hyaline cartilage

Figure 3 : Les différentes étapes de l'ossification endochondrale (Tortora and Derrickson, 2010).

B) Croissance osseuse

Les os longs du corps croissent en longueur et en largeur de la naissance jusqu'au dernières années de l'adolescence. La croissance en longueur se produit au niveau de la plaque épiphysaire où se trouvent des chondrocytes qui subissent de nombreuses divisions. Une partie de ces chondrocytes s'accumule du côté épiphysaire de la plaque tandis qu'une autre partie, localisée du côté de la diaphyse, est remplacée par de l'os. La longueur générale de l'os augmente donc, tandis que la plaque épiphysaire reste de taille constante. Entre 18 et 25 ans, le tissu osseux a entièrement remplacé le cartilage, la multiplication cellulaire ainsi que la formation de matrice extracellulaire s'arrêtent. Toutes atteinte mécanique (fractures) ou inflammatoire (maladies rhumatismales, arthrites et ostéomyélite septique) qui endommagent la plaque épiphysaire pendant la croissance ont donc de lourdes répercussions sur développement osseux des individus.

La croissance en longueur des os longs s'accompagne d'une croissance en largeur. Les cellules à la surface du péri-chondre se différencient en ostéoblastes et sécrètent de la matrice extracellulaire osseuse. Les ostéoblastes qui deviennent des ostéocytes permettent d'ajouter de nouvelles lamelles osseuses. En parallèle, les ostéoclastes de l'endosteum qui tapisse la cavité médullaire détruisent une partie du tissu osseux. Cette destruction a lieu moins rapidement que la croissance osseuse, permettant ainsi à la cavité médullaire de s'élargir en même temps que l'os s'épaissit (Karsenty, 2003).

C) Remodelage osseux

La formation osseuse débute avant la naissance et les os subissent un renouvellement tout au long de la vie. Le remodelage osseux implique la résorption d'anciens tissus osseux avec l'élimination des minéraux et fibres de collagène par les ostéoclastes, avec en parallèle la formation de nouvelles structures osseuses par les ostéoblastes. Ce remodelage concerne l'ensemble des os du corps et se produit à des rythmes différents selon les régions du corps. Des facteurs tels que les blessures ou fractures, l'activité physique ou encore les habitudes alimentaires peuvent avoir un impact sur le remodelage osseux.

L'équilibre entre la résorption osseuse et la formation de nouveaux tissus osseux met en place des processus de régulation dans le but d'éviter des malformations osseuses. En effet,

une accumulation importante de tissu provoque la formation d'os anormalement épais et lourds. Ces anomalies osseuses sont à l'origine de l'ostéopétrose. Des éperons osseux appelés ostéophytes peuvent également se développer lorsqu'un surplus de matière minérale se concentre sous forme de bosse, gênant ainsi le mouvement des articulations. A l'inverse, une perte excessive de calcium et de matrice extracellulaire fragilise les os qui peuvent alors se briser, comme c'est le cas pour l'ostéoporose. Le risque de développer cette maladie augmente avec l'âge. Les femmes sont plus touchées que les hommes, particulièrement après la ménopause (Tortora and Derrickson, 2010).

1.2.2 Cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif localisé à l'extrémité des os longs. Etant non innervé et non vascularisé, la nutrition et l'élimination des déchets métaboliques de ce tissu s'effectuent par le biais du LS circulant au sein de l'articulation. Les stimulations mécaniques induites par les mouvements corporels sont donc indispensables afin d'assurer une circulation du LS au niveau des différentes couches du cartilage. La fonction de ce dernier est d'assurer le bon glissement entre les pièces osseuses lors des mouvements du squelette en maintenant un coefficient de friction bas tout en amortissant et répartissant les charges appliquées sur les os (Cole, 2011).

Le cartilage et l'os sous-chondral agissent de façon coordonnée pour assurer la fonction mécanique de l'articulation. Les maladies ou autres perturbations articulaires touchant à l'un de ces deux tissus ont donc des répercussions sur l'autre tissu.

1.2.2.1 Composition

Le cartilage articulaire est composé de chondrocytes localisés au sein d'une matrice extracellulaire occupant 80 à 90% du volume cartilagineux. Cette matrice cartilagineuse est produite par les chondrocytes et est composée de 65 à 80% d'eau ainsi que de protéoglycanes et de collagène, majoritairement du collagène de type II. Les protéoglycanes représentent l'assemblage entre protéines et glycosaminoglycane. Ils assurent l'élasticité du cartilage. La composition particulière du cartilage articulaire lui permet d'être à la fois souple

et résistant, et ainsi d'exercer ses propriétés bio-mécaniques visant à amortir les pressions subies par les articulations. L'absence de vascularisation a pour conséquence une réparation tissulaire lente voire inexistante en cas de lésions (Cole, 2011).

1.2.2.2 Organisation tissulaire

Le cartilage est organisé en quatre couches :

- La couche superficielle fine représente 10 à 20% du volume total du cartilage. Elle contient de nombreux chondrocytes. Ils sont de forme aplatie et sécrètent du collagène organisé en fibres compactes parallèles. Cette couche est résistante et protège ainsi les couches profondes contre les forces de cisaillement. Elle a une fonction de filtre sélectif à travers lequel passent les substances nutritives provenant du LS, substances représentant la seule source d'alimentation des chondrocytes.
- La couche intermédiaire inclut 40 à 60% de l'épaisseur du cartilage. Les chondrocytes y sont en petit nombre et ont une forme sphérique. Ils sécrètent du collagène et des protéoglycanes qui forment des fibres agencées de façon oblique par rapport à la surface de l'articulation. Ces structures apportent une résistance par rapport aux forces de compression.
- La couche profonde occupe 30% du volume du cartilage. Les chondrocytes et les fibres de collagène y sont organisés en colonnes perpendiculaires à la surface articulaire. Cette couche riche en protéoglycanes fournit une résistance supplémentaire aux forces de compression.
- La couche calcifiée représente 5 à 10% du cartilage. Cette couche est à l'interface entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral. Elle contient des chondrocytes quiescents et hypertrophiques. La matrice extracellulaire renferme du collagène de type X, peu de protéoglycanes, et une concentration importante de calcium. Entre la couche profonde et la couche calcifiée se trouve une fine ligne irrégulière nommée « tide-mark » qui contrôle l'invasion du cartilage par les vaisseaux sanguins provenant des os (Cole, 2011).

1.2.3 Cavité synoviale

La cavité synoviale contient du LS et est délimitée par une capsule articulaire composée d'une capsule fibreuse et d'une membrane synoviale (Figure 1). La capsule fibreuse contient de tissu conjonctif dense irrégulier formé en grande partie de fibres de collagène. Elle est fixée au périoste des os articulaires. La membrane synoviale également nommée synovium est composée de tissu conjonctif ordinaire lâche (aréolaire) et de fibres élastiques. Elle recouvre la face interne de la capsule articulaire et est formée par deux couches. La première est l'intima, elle est en contact direct avec la cavité articulaire. Elle contient des synoviocytes de types A (30%) et B (70%) (Figure 4). Les synoviocytes de type A sont considérés comme des macrophages résidents qui ont pour fonction de phagocyter les débris cellulaires et nettoyer la cavité articulaire. Ce sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire. Les synoviocytes de type B sont des fibroblastes. Ils sont organisés sous forme d'un réseau complexe au niveau de la surface de la membrane synoviale. Ces cellules sont impliquées dans la production d'acide hyaluronique, de collagène et de fibronectine qui vont participer à la composition du LS. Le potentiel prolifératif de ces cellules est plus important que celui des synoviocytes de type A (Iwanaga et al., 2000). La deuxième couche de la membrane synoviale est la sous-intimale. Cette dernière est riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle contient également une matrice de collagène entourant des fibroblastes et des cellules sanguines infiltrantes.

La membrane synoviale est une barrière de filtration qui permet de réguler la composition du LS. En condition physiologique, ce dernier est riche en lubriline et en acide hyaluronique qui s'ajoutent au liquide interstitiel résultant de la filtration du plasma sanguin afin de lubrifier l'articulation. Il contient également des cytokines et des facteurs de croissance qui participent au maintien de l'homéostasie de l'environnement articulaire.

Le tissu synovial est la cible principale des maladies inflammatoires chroniques touchant les articulations, telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) chez l'adulte et l'arthrite juvénile idiopathique (AJI) que nous allons décrire plus en profondeur dans la suite de ce manuscrit. Ces maladies sont associées à une inflammation du synovium pouvant aboutir à la destruction du cartilage adjacent et du tissu osseux (Orr et al., 2017). Ces atteintes

inflammatoires sont caractérisées par une néo-vascularisation et une extravasation leucocytaire (Tak and Bresnihan, 2000). La perméabilité du tissu synovial est alors modifiée, ce qui a des répercussions sur la composition du LS. En effet, des études sur du LS de patients atteints de PR ont montré que la perméabilité aux molécules de grosses tailles est augmentée, tandis que celle pour les petites molécules comme l'urée et le glucose est diminuée (Levick, 1981; Orr et al., 2017). La teneur en protéines est par conséquent plus importante dans du LS de personnes ayant une PR qu'en condition physiologique. L'étude du LS est donc cruciale dans la compréhension de la physiopathologie des maladies inflammatoires rhumatismales.

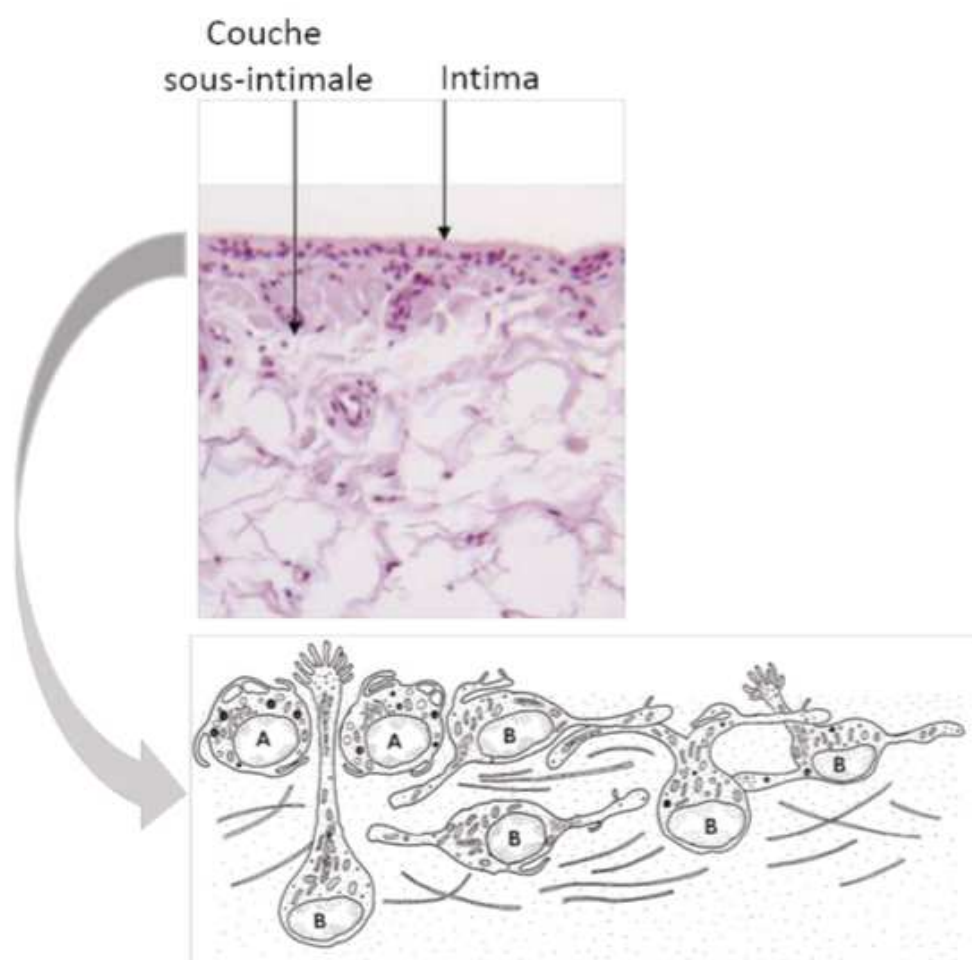


Figure 4 : Coupe histologique de la membrane synoviale et représentation schématique des synoviocytes de type A et B au sein de l'intima. Modifié d'après Iwanaga et al., 2000; Yang et al., 2013.

2. Arthrite juvénile idiopathique

2.1 Définition

L'AJI représente un groupe hétérogène de rhumatismes inflammatoires chroniques de l'enfant d'origine inconnue. Il s'agit de la forme d'arthrite la plus répandue chez les enfants de moins de 16 ans (Prakken et al., 2011). L'AJI est une maladie rare qui a une incidence annuelle de 2 à 20 cas pour 100 000 habitants dans les pays à revenus élevés et une prévalence de 16 à 150 individus pour 100 000 habitants (Prakken et al., 2011).

En 2001, la « International League of Associations for Rheumatology » (ILAR) a établi une classification qui définit 7 sous-types d'AJI en fonction de critères tels que le nombre d'articulations atteintes durant les 6 premiers mois de la maladie, des manifestations extra articulaires et des marqueurs biologiques (Petty et al., 2004). Les différents groupes ont tous en commun une inflammation chronique débutant au niveau de la membrane synoviale. Les symptômes impliquent un gonflement persistant de la (ou des) articulation(s) touchée(s) associé à des douleurs. L'atteinte articulaire est dite inflammatoire avec une présentation classique de douleurs et d'impotence matinale s'atténuant dans la journée appelée « dévrouillage ». En cas d'atteinte sévère et prolongée, la persistance de l'inflammation augmente le risque de développer des lésions ostéo-cartilagineuses.

En fonction de l'âge des patients et des manifestations cliniques, la prise en charge varie fortement. Les efforts effectués au niveau de la classification des maladies affectant les enfants sont essentiels car ces derniers ont un corps en pleine croissance avec un système immunitaire immature qui évolue. Il est donc important que les patients atteints d'AJI reçoivent rapidement les traitements adéquats car les risques d'invalidité sont élevés en raison de leur ossification encore incomplète (cfr. Chapitre 1.2.1.2). L'hétérogénéité de ces troubles signifie que différents facteurs sont impliqués dans la physiopathologie de l'AJI. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents permet également d'améliorer le diagnostic et la classification des formes d'arthrite juvénile et ainsi d'optimiser la prise en charge de ces maladies et d'élaborer des traitements ciblés.

2.2 Classification

La classification des sous-populations d'AJI a subi de nombreuses modifications ces dernières années et est encore actuellement sous révision. Dans les années 1970, deux classifications avaient été proposées : l'une par « American Rheumatism Association » (ARA) qui regroupait les atteintes juvéniles sous le nom de polyarthrite rhumatoïde juvénile, la deuxième par le « European League Against Rheumatism » (EULAR) qui a adopté le terme d'arthrite chronique juvénile. En 1993, une nouvelle classification a été établie par l'ILAR après la validation du terme « arthrite juvénile idiopathique ». Pour répondre à des questions d'ordre scientifique, l'ILAR a voulu définir des catégories homogènes d'AJI et ainsi faciliter les recherches sur les causes, la pathogenèse, l'épidémiologie (Petty et al., 1998). Avec l'amélioration des outils diagnostiques, une nouvelle classification qui s'intéresse d'avantage aux applications cliniques a été proposée en 2001 (Petty et al., 2004) (Tableau 1).

A) AJI oligoarticulaire

La forme oligoarticulaire de l'AJI est définie comme une arthrite qui touche 1 à 4 articulations pendant les 6 premiers mois de la maladie. La classification ILAR exclue de ce groupe les enfants ayant un psoriasis ou des antécédents de psoriasis chez un parent, une maladie associée à l'antigène leucocytaire humain (HLA)-B27 ou des facteurs rhumatoïdes (FR) (Petty et al., 2004).

Ce sous-type est le plus répandu dans les pays occidentaux avec une incidence moyenne de 50-60% (Oen and Cheang, 1996). La majorité des patients présentent une arthrite asymétrique touchant principalement les grosses articulations, la première cible étant le genou, suivi de la cheville. Cette pathologie débute généralement en bas âge et affecte majoritairement les personnes de sexe féminin. De plus, elle est souvent associée à la présence d'anticorps antinucléaires (AAN) et à une uvéite. Cette dernière peut provoquer de graves déficiences visuelles. Dans les deux tiers des cas, l'uvéite est bilatérale et survient généralement après les manifestations articulaires (Petty et al., 2003). Elle doit être dépistée systématiquement car peut passer inaperçues chez l'enfant. Le lien entre le développement d'une uvéite et l'atteinte articulaire n'est pas encore bien compris. Certaines cytokines inflammatoires comme l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-2, l'IL-6, l'interféron (IFN)- γ et le facteur de

nécrose tumoral (TNF)- α qui ont été détectées dans les liquides et tissus oculaires semblent être impliquées dans la présence des uvéites survenant en cas d'arthrite (Ooi et al., 2006). Une association avec certains allèles HLA, tel que HLA-DRB1*08, a été identifiée chez les patients atteints d'oligoarthrite (Ravelli and Martini, 2007).

En fonction de l'évolution de l'AJI oligoarticulaire après les 6 premiers mois de la maladie, deux sous-catégories sont identifiées : une forme dite persistante avec un maximum de 4 articulations atteintes et une forme étendue dans laquelle l'arthrite va toucher plus de 4 articulations. Des signes tels que l'atteinte des poignets, une arthrite symétrique ou encore une vitesse de sédimentation (VS) élevée sont souvent indicatifs d'une progression vers une oligoarthrite étendue (Al-Matar et al., 2002). Une augmentation du rapport de lymphocytes T CD4/CD8 parmi les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ou du liquide synovial a également été observée dans la forme étendue de la maladie, ce qui montre l'importance de ces cellules dans la physiopathologie de l'AJI oligoarticulaire (Hunter et al., 2010).

Durant les dernières années, le pronostic de l'oligoarthrite s'est considérablement amélioré, du fait des progrès thérapeutiques. Une étude effectuée sur 376 patients a montré que la moitié d'entre eux entrainé en rémission une année après le diagnostic (Bowyer et al., 2003). La présence d'AAN et un jeune âge au début de la maladie semblent être corrélés à une durée plus longue de la pathologie (Oen et al., 2003).

B) AJI polyarticulaire à facteur rhumatoïde positif

L'AJI polyarticulaire à FR positif est caractérisée par une atteinte d'au moins 5 articulations durant les 6 premiers mois de la maladie. Par ailleurs, la présence de FR doit être détectée à au moins 2 reprises à 3 mois d'intervalle au cours de ces 6 premiers mois (Petty et al., 2004). Le FR est constitué d'anticorps dirigés contre la portion Fc des immunoglobulines (Ig) G. Cette forme d'AJI est généralement la seule à également présenter des anticorps dirigés contre les peptides cycliques citrullinés (anti-CCP) (van Rossum et al., 2003) qui diagnostiquent de façon très spécifique et précoce la PR et prédisent les formes les plus agressives (Nielen et al., 2004).

En Europe, la prévalence de cette maladie est de 5% parmi les cas d'AJI, principalement des enfants de sexe féminin. Le début des manifestations cliniques survient généralement vers la fin de l'enfance, au début de l'adolescence, avec des patients qui présentent une polyarthrite symétrique affectant principalement les poignets et les petites articulations des pieds et des mains. La VS et les valeurs de protéine C réactive (CRP) sont souvent élevées et les patients peuvent présenter une anémie normochrome (van Rossum et al., 2003).

Cette atteinte juvénile est considérée comme l'équivalent pédiatrique de la PR chez les adultes. Toutes deux partagent des facteurs de risque tels que les allèles HLA-DR1, HLA-DR4 et HLA-DR14 (Gorman and Criswell, 2002).

Parmi les enfants atteints d'AJI qui sont traités, ceux ayant une forme polyarticulaire FR positif ont le taux de rémission le plus faible (5%), en excluant l'AJI systémique (Wallace et al., 2005). A cause du mauvais pronostic lié à cette maladie, un traitement agressif est souvent nécessaire.

C) AJI polyarticulaire à facteur rhumatoïde négatif

L'AJI polyarticulaire à FR négatif correspond à une arthrite touchant 5 articulations ou plus durant les 6 premiers mois de la maladie, sans qu'il n'y ait de FR (Petty et al., 2004). Ce sous-type d'AJI est hétérogène et donc difficile à caractériser (Martini, 2003; Ravelli and Martini, 2007). En effet, il est associé à de nombreuses variations au niveau des signes cliniques, de l'évolution de la maladie ainsi que de la répartition géographique. La prévalence de ce sous-type est estimée entre 10 et 25% en Europe. Dans l'ensemble, les articulations les plus touchées sont les genoux, les poignets et les chevilles.

Trois phénotypes semblent se dégager de ce sous-groupe. Le premier est caractérisé par une atteinte symétrique des articulations, une survenue à un âge scolaire, l'absence d'AAN, une VS élevée et une évolution variable de la maladie. Le deuxième phénotype est comparable à une oligoarthrite avec des AAN, une apparition en bas âge, une prédominance féminine, une arthrite asymétrique, un risque de développer une uvéite et une association avec l'allèle HLA-DRB1*08. Ces similitudes avec l'AJI oligoarticulaire font partie des arguments motivant la révision de la classification actuelle. En effet, une hypothèse a été émise pour soutenir le fait que ce deuxième phénotype de polyarthrite est probablement une forme plus agressive

de l'oligoarthrite (Martini, 2003; Ravelli et al., 2011). Dans le troisième sous-groupe nommé « synovite sèche », les signes cliniques d'hypertrophie synoviale et d'épanchement articulaire sont négligeables. Les patients présentent tout de même une raideur et des contractures articulaires, avec des valeurs de VS normales, voire légèrement élevées.

La réponse au traitement étant généralement faible pour les enfants atteints L'AJI polyarticulaire négative pour le FR, une morbidité et une diminution des capacités fonctionnelles sont souvent observées chez ces patients.

D) AJI associée au psoriasis

L'AJI psoriasique est définie comme une association entre une inflammation des articulations associées à une éruption psoriasique. Si cette dernière est absente, l'arthrite doit être associée à au moins 2 des critères suivants : une dactylite, des ongles de la couturière ou une onycholyse, ou enfin des antécédents familiaux de psoriasis (Petty et al., 2004). Dans la moitié des cas d'AJI psoriasique, les atteintes de la peau surviennent des années après les manifestations articulaires.

La fréquence de ce sous-type est de 5 à 10% par rapport à l'ensemble des formes d'AJI présentes dans les pays occidentaux (Berntson et al., 2001). Les enfants touchés par cette maladie ont pour la majorité 2-3 ans ou entrent dans l'adolescence (Stoll et al., 2006).

L'AJI psoriasique est un sous-type qui ne représente pas une entité clairement définie. Son identification est fortement controversée car elle englobe un ensemble hétérogène de manifestations arthritiques. De plus cette forme d'AJI présente de nombreux chevauchements avec les autres sous-types. L'examen des marqueurs inflammatoires comme la VS et les valeurs de CRP montrent généralement des résultats similaires à ceux des individus sains (Stoll and Nigrovic, 2006). A cause de l'hétérogénéité de cette maladie et du manque de données disponibles, le pronostic sur le long terme ne peut être correctement établi.

E) AJI liée à l'enthèse

Le diagnostic de l'AJI liée à l'enthèse repose sur le développement d'une arthrite et d'une enthésite. Ce sous-type est souvent associé à un historique familial d'arthrites, à la présence de l'allèle HLA-B27 ou d'une uvéite (Petty et al., 2004; Rubin et al., 1994). Durant les premières années, cette forme d'AJI touche principalement les membres inférieurs de façon asymétrique. Elle peut ensuite évoluer vers le squelette axial.

L'AJI liée à l'enthèse représente 8 à 16% des AJI dans les pays du nord et inclue majoritairement des enfants ayant entre 10 et 13 ans (Prutki et al., 2008). Les hommes sont plus atteints que les femmes (Weiss et al., 2012).

Cette maladie peut être à l'origine d'incapacités physiques et de douleurs, particulièrement pour les patients de sexe masculin, mais aussi pour ceux avec un nombre élevé d'articulations atteintes, ayant des antécédents familiaux pour des maladies similaires, en cas de positivité pour l'allèle HLA-B27 ou de hauts taux de VS. Un âge élevé lors du diagnostic est également lié à un mauvais pronostic (Flatø et al., 2006).

F) AJI systémique

L'AJI systémique est caractérisée par une arthrite au niveau d'une ou plusieurs articulations associée ou précédée par une fièvre durant 2 semaines ou plus, avec des épisodes d'au moins 3 jours consécutifs. Ces symptômes sont accompagnés de l'un ou plusieurs des éléments suivants : éruption érythémateuse, gonflement des ganglions lymphatiques, hépatomégalie et/ou splénomégalie et enfin sérite (Petty et al., 2004). Cette forme d'AJI présente des atteinte d'organes pouvant mettre en jeu le pronostic vital (Vannucci et al., 2013).

L'AJI systémique représente environ 5 à 15 % des cas d'AJI. Ce sous-type présente des différences importantes par rapport aux autres formes d'AJI autant au niveau de la pathogenèse, du profil clinique qu'au niveau des choix de traitement. Contrairement aux autres sous-groupes, celui-ci est considéré comme une maladie auto-inflammatoire avec des concentrations importantes en cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-6 (Prakken et al., 2011).

G) AJI non différenciée

Cette dernière catégorie représente environ 15% des enfants atteints d'arthrite chronique. Elle inclut les cas qui ne remplissent pas les critères d'inclusion des autres sous-types d'AJI ou qui répondent aux critères de plusieurs catégories (Petty et al., 2004).

De plus en plus de données cliniques et d'outils de diagnostic montrent que la classification établie en 2001 par l'ILAR nécessite des améliorations. Un des arguments avancés est que la présence de FR, souvent associée à une positivité pour les anticorps anti-CCP, devrait être un critère de sélection à part entière, non lié au nombre d'articulations touchées (Ferrell et al., 2014; Martini, 2003). En effet, ce nombre est maintenant considéré comme une distinction artificielle, qui doit être corrélé à la gravité d'une maladie et non à une forme particulière d'AJI. Un autre critère proposé est la présence d'AAN survenant tôt dans le développement de la maladie (van den Broek et al., 2015). Enfin, l'utilisation des antécédents familiaux comme critère d'inclusion ou d'exclusion est controversé car des données concernant l'historique familial peuvent être difficilement accessibles (Manners et al., 2003).

En 2018, un projet a été publié par l'organisation internationale d'essais en rhumatologie pédiatrique (PRINTO) (Martini et al., 2019). Son objectif est d'une part de récupérer un ensemble de données cliniques et résultats de laboratoire d'enfants atteints d'AJI répartis dans le monde, d'autre part de distinguer les pathologies chroniques strictement juvéniles de celles ayant des homologues adultes. Les résultats ont permis de proposer 4 sous-types : (1) AJI systémique, (2) AJI positive pour le FR, (3) AJI liée à l'enthèse, (4) AJI positive pour les AAN débutant dans le jeune âge. Le reste des cas ferait partie d'un groupe « autre ».

Tous les efforts consacrés à l'harmonisation de la classification des sous-types d'AJI sont aidés par l'amélioration des techniques actuelles. Il reste toutefois nécessaire d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques pour aider à mieux caractériser les formes d'AJI et ainsi améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. Ces efforts sont également très utiles pour la recherche scientifique et l'étude des mécanismes physiopathologiques des différentes formes d'AJI puisqu'une meilleure compréhension de l'ontogénie de ces maladies permettra d'envisager un dépistage précoce et des traitements ciblés.

Catégories ILAR	Nombre d'articulations touchées	Fréquence en Europe (%)	Manifestations extra-articulaires fréquentes	Auto-anticorps	Critères d'exclusion
AJI oligoarticulaire	1 à 4	50-60	Uvéite	AAN	a, b, c, d, e
AJI polyarticulaire FR positif	Plus de 5	5	-	FR Anti-CCP	a, b, c, e
AJI polyarticulaire FR négatif	Plus de 5	10-25	-	Anti-CCP AAN	a, b, c, d, e
AJI liée au psoriasis	-	5-10	Dactylite Ongle de la couturière Onycholyse	-	b, c, d, e
AJI liée à l'enthèse	-	8-16	Enthésite Uvéite	-	a, d, e
AJI systémique	-	5-15	Fièvre Eruption érythémateuse Gonflement des ganglions lymphatiques Hépatomégalie Splénomégalie Sérite	-	a, b, c, d
AJI non différenciée	-	15	-	-	-

Tableau 1 : Classification ILAR des sous-types d'AJI. Critères d'exclusion : (a) Psoriasis ou antécédent familiaux de psoriasis. (b) Association avec HLA-B27 chez les garçons de plus de 6 ans. (c) Spondylarthrite ankylosante, arthrite liée à une enthésite, sacro-iliite avec maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, syndrome de Reiter ou uvéite antérieure aiguë, ou antécédents d'un de ces troubles chez un parent au premier degré. (d) Facteurs rhumatoïdes détectés à au moins 2 reprises à 3 mois d'intervalle. (e) Présence d'une arthrite systémique.

2.3 Physiopathologie de l'AJI

En raison de l'hétérogénéité clinique, associée à des difficultés de classification, ainsi que du faible nombre de patients, les bases physiopathologiques de l'AJI restent encore mal comprises. Cette maladie complexe d'origine inconnue semble faire intervenir une combinaison de facteurs génétiques de susceptibilité et d'éléments environnementaux, le tout conduisant à un déséquilibre immunitaire.

2.3.1 Perturbations tissulaires

Dans tous les sous-types d'AJI, une réaction inflammatoire se développe au niveau des articulations synoviales, provoquant des lésions potentiellement irréversibles. Cette inflammation se caractérise par une augmentation de la vascularisation et de l'activation endothéliale et un épaissement de la membrane synoviale (Macaubas et al., 2009). La nouvelle vascularisation, favorisée par des éléments comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'ostéopontine, facilite l'afflux de cellules inflammatoires au niveau de l'articulation. Ces cellules activent ensuite les ostéoclastes exprimant RANK (activateur du récepteur du facteur nucléaire kappa B) et induisent la production de métalloprotéases matricielles (MMP), telles que MMP-1 et MMP-3 (Masi et al., 2004; Peake et al., 2005; Sarma et al., 2008). Il s'en suit une destruction du cartilage et des structures osseuses avec de lourdes répercussions sur le squelette des enfants qui sont en pleine croissance. Ces perturbations peuvent être accentuées en cas d'une diminution des capacités de réparation tissulaire, notamment due à une apoptose importante des ostéoblastes (Caparbo et al., 2009).

2.3.2 Facteurs génétiques

Des études effectuées sur des membres d'une même famille, notamment des jumeaux, soutiennent l'hypothèse qu'il existe une composante génétique dans l'AJI (Pralhad and Glass, 2008). Ces résultats ont permis de mettre en évidence un ensemble gènes de susceptibilité potentiels pour l'AJI.

Les marqueurs génétiques de susceptibilités peuvent être divisés en deux groupes : les gènes HLA et les gènes non-HLA. Les gènes HLA codent pour les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), protéines étant impliquées de la régulation de la réponse immunitaire (Rajaei et al., 2019). Ces gènes sont hautement polymorphes et les premières associations avec l'AJI découlent d'études d'association pangénomiques (GWAS) (Thompson et al., 2004). Le sexe semble influencer les gènes associés à cette maladie. En effet, des associations entre HLA-A et HLA-DRB1 ont été identifiées avec les filles atteintes d'AJI oligoarticulaire, mais pas avec les garçons (Zeggini et al., 2002). De plus, il semblerait que la

fréquence des allèles de susceptibilité puisse varier en fonction des groupes ethniques (Alsaeid et al., 2006; Huang et al., 2004).

Des études ont analysé de nombreux gènes non-HLA dans le but d'identifier des associations avec des sous-types d'AJI. Une limitation majeure est la difficulté de détecter des effets géniques modérés ou légers, particulièrement à cause du manque de robustesse de la classification actuelle. Malgré cela, des gènes ont été identifiés, comme *PTPN22* (protéine tyrosine phosphatase, type non récepteur 22) et *IL-2R* (Hinks et al., 2009a). Des mutations au niveau de ces gènes ont été associées à d'autres maladies auto-immunes comme le diabète de type 1, la PR ou encore la sclérose en plaques (Hinks et al., 2009a). D'autres gènes candidats non-HLA incluent *VTCN1*, un gène codant pour un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T (Hinks et al., 2009b), ou encore *MIF* (facteur inhibiteur de la migration des macrophages), une cytokine pro-inflammatoire (Macaubas et al., 2009; Prahalad and Glass, 2008). Dans l'ensemble, les associations génétiques visant à évaluer une susceptibilité à développer l'AJI ne sont pas suffisantes pour distinguer les sous-types de cette maladie et présentent même des similarités avec d'autres atteintes inflammatoires adultes.

2.3.3 Cellules du système immunitaire

Les études effectuées sur l'AJI montrent que cette maladie complexe peut s'expliquer en partie par le dérèglement de mécanismes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire. En effet, l'analyse de la physiopathologie montre un rôle des cellules de l'immunité adaptative et innée (Macaubas et al., 2009). Dans les paragraphes suivants, je m'attacherai à décrire des mécanismes qui semblent être impliqués dans la physiopathologie de l'AJI et qui font intervenir des perturbations au niveau de la distribution ou de la fonction des lymphocytes, des DCs, des monocytes ainsi que des neutrophiles.

2.3.3.1 Lymphocytes

L'association avec les allèles HLA et l'AJI montrent un rôle important des lymphocytes T dans la physiopathologie de cette maladie. Une équipe a montré un vieillissement prématuré des

lymphocytes T CD4 naïfs chez les enfants atteints d'oligoarthrite, mis en évidence par un raccourcissement des télomères, suggérant une altération de la fonction thymique (Prelog et al., 2008). De nombreuses études ont détecté une présence importante de lymphocytes T activés dans les articulations touchées, avec un rapport CD4/CD8 élevé (Macaubas et al., 2009; Murray et al., 1996). Leur nombre est également important dans la circulation de ces enfants par rapport au sang de donneurs sains (Wouters et al., 2002). Parmi les T CD4, les T helper 1 (Th1) IFN- γ ⁺ et CD45RO⁺ sont particulièrement représentés (Wedderburn et al., 2000). Des chimiokines comme CCL21 sont retrouvées concentrées dans le LS, suggérant que les Th1 exprimant CCR7, le récepteur de CCL21, sont recrutées au niveau des articulations (Gattorno et al., 2004). Les articulations sont également enrichies en Th17, cellules productrices d'IL-17 pouvant induire la synthèse d'IL-6, IL-8 et de MMP-1 et 3 qui sont des protéines exerçant une action destructrice sur les structures articulaires (Agarwal et al., 2008; Nistala et al., 2008). Concernant les T CD4 régulateurs (Treg), ils sont présents dans les articulations d'oligoAJI mais leur action ne permet de diminuer l'inflammation (Wei et al., 2008). Comme pour de nombreuses maladies autoimmunes, la question se pose de savoir si c'est leur nombre ou leur activité suppressive qui sont insuffisants, ou les deux.

Des données ont montré une auto-réactivité importante des cellules T, dirigée notamment contre des protéines articulaires comme les agréganes et la fibrilline (Kamphuis et al., 2006). Plusieurs protéines de type HSP représentent également de potentiels autoantigènes, tel que HSP60 qui induit une activation des T circulants de patients AJI et non de T contrôles (Sedlackova et al., 2006). Des lymphocytes T CD8 auto-réactifs ont également été identifiés dans la circulation et les articulations de ces patients (Murray et al., 1996; Wouters et al.). La perte de tolérance des lymphocytes T CD4 et T CD8 aux auto-antigènes pourrait être expliquée par les mécanismes impliqués dans le mimétisme moléculaire, c'est-à-dire l'hypothèse qu'une cross-réaction se produit contre des peptides du soi ressemblant à des peptides étrangers, phénomène qui serait accentué par la propagation d'épitopes libérés lors de l'inflammation (Macaubas et al., 2009).

Rappelons toutefois que les auto-anticorps les plus décrits dans les formes autoimmunes d'AJI sont les AAN, le FR et les anti-CCP. En interagissant avec des antigènes du soi, ces derniers participent à la formation de complexes immuns au sein des articulations. Ces complexes sont responsables d'un afflux de cellules immunitaires, ce qui peut contribuer au

développement d'une réaction inflammatoire associée à des lésions tissulaires et à la destruction des articulations. Les études actuelles montrent une association entre la présence d'AAN et le développement des uvéites, ainsi qu'entre les FR et/ou les anticorps anti-CCP et la gravité de la maladie (van Rossum et al., 2003).

Peu d'analyses ont été effectuées sur les lymphocytes B. Ces cellules sont souvent considérées comme inductrices de la réaction inflammatoire en raison de leur capacité à produire des auto-anticorps et leur fonction de CPA (Morbach et al., 2011). Toutefois, une étude récente a montré que les cellules B CD24^{hi}CD38^{hi} (transitionnelles) étaient en nombre moins important dans le sang des patients atteints d'AJI par rapport au donneurs sains, ce nombre étant encore plus faible dans les articulations des enfants malades (Zhao and Jung, 2018). Cette faible fréquence de cellules B régulatrices serait associée à de basses concentrations en IL-10 et ainsi à l'incapacité d'inhiber la réaction inflammatoire. Des études supplémentaires sur le rôle des lymphocytes dans la physiopathologie de l'AJI sont nécessaires.

2.3.3.2 Cellules dendritiques et monocytes

Les DCs jouent un rôle important dans la présentation antigénique aux lymphocytes T. Elles participent à l'initiation, au maintien et/ou à la régulation de la réaction inflammatoire dans l'AJI (Gattorno et al., 2007; Smolewska et al., 2008). Les DCs sont retrouvés en nombre élevé dans les articulations de ces patients, où elles vont libérer des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- α et le TNF- α (Gattorno et al., 2007). Un nombre faible de DCs dans le sang périphérique serait associé à une réponse au traitement peu efficace (Smolewska et al., 2008).

Les monocytes, autre exemple de CPA, participent également à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et IL-6 (de Jager et al., 2007; Mangge et al., 1995). Durant les phases actives de la maladie, les taux de cytokines pro-inflammatoires sont plus importants dans l'articulation que dans la circulation.

Une description plus approfondie des sous-populations de ces CPA sera effectuée ci-dessous (cfr. Chapitre 3). Nous y trouverons des informations sur leur différenciation, leur migration

et mode d'action, avec des hypothèses quant à leur implication dans la physiopathologie de l'AJI.

2.3.3.3 Neutrophiles

Les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes du LS des enfants AJI (Macaubas et al., 2009). Pourtant, peu d'études se sont intéressées à ce type cellulaire dans l'AJI. Parmi les données publiées, des études mettent en évidence la production de protéines de la famille des alarmines S100, notamment S100A8, S100A9 et S100A12, qui ont une action cytotoxique induisant des dommages tissulaires (Foell et al., 2004, 2007a). Ces molécules font partie des protéines à motifs moléculaires associées aux dommages (DAMP). Elles ont la capacité d'activer les cellules du système immunitaire ainsi que l'endothélium vasculaire en réponse à la présence de signaux de danger (Foell et al., 2007b). Leur concentration peut être corrélée à l'intensité de l'inflammation (Foell et al., 2007b), et des taux élevés de S100A12 ont été associés à la gravité de cas d'AJI oligoarticulaire (Foell et al., 2004).

2.3.4 Facteurs environnementaux

Un individu possédant des gènes de susceptibilité pour le développement d'une AJI peut subir les effets délétères d'une réaction immunitaire exacerbée ou dirigée contre les antigènes du soi après une exposition à des facteurs environnements. Il existe de nombreuses hypothèses pour mettre en évidence ces éléments déclencheurs. Jusqu'à ce jour, aucun facteur n'a clairement été identifié.

Des études ont montré que l'environnement rural versus urbain pourrait influencer la prévalence de l'AJI, avec des fréquences plus élevées en milieu rural (Kurahara et al., 2007). Il y a eu de nombreux questionnements quant au lien entre la vaccination et les maladies inflammatoires comme l'AJI. Toutefois, une étude menée en Finlande a montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la vaccination contre la rougeole, les oreillons ou la rubéole et l'incidence annuelle de l'AJI (Kaipiainen-Seppänen and Savolainen, 1996).

Le rôle des infections dans la pathogenèse de l'AJI a longtemps été investigué (Rigante et al., 2015). A ce sujet, la maladie de Lyme avait été initialement décrite comme une épidémie

d'arthrite juvénile dans la ville de Lyme aux USA. Des études sur des prélèvements de sang et de LS de patients atteints d'AJI liée à l'enthèse ont montré une réaction lymphocytaire dirigée contre les antigènes de *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri* et *Yesinia entorocolitica* (Singh et al., 2011). De plus, une équipe a détecté de l'ADN de *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Chlamydia trachomatis* dans le LS de patients ayant une AJI liée à l'enthèse (Pacheco-Tena et al., 2001). Bien que ces résultats mettent en évidence une corrélation entre infection et arthrite, ils ne sont pas suffisants pour démontrer que les bactéries ont eu un rôle à jouer dans la genèse de ces maladies juvéniles.

Un dernier exemple de piste à suivre peut-être plus pertinent est la caractérisation du microbiome des enfants avec une AJI. Une dysbiose intestinale a été associée à de nombreuses maladies du système immunitaire comme notamment les spondyloarthropathies (Giancane et al., 2017). De plus, une présence accrue de Bactéroïdes, une souche de bactérie qui dégrade la mucine, a été identifiée chez les enfants ayant une AJI liée à l'enthèse (Aggarwal et al., 2017). Des analyses taxonomiques ont permis de mettre en évidence des caractéristiques similaires du microbiome d'AJI associée à l'enthèse et d'AJI positive pour le FR, comparé à des individus sains (Di Paola et al., 2016). Un nombre croissant de données suggère que le microbiome jouerait un rôle dans le développement du système immunitaire. Il serait donc intéressant de caractériser plus en profondeur son implication dans l'apparition des maladies inflammatoires, en étudiant sa composition dès la naissance.

2.4 Traitements

Au cours de la dernière décennie, d'importants progrès ont été réalisés dans le traitement de l'AJI. En effet, la réduction de l'inflammation articulaire et ainsi le maintien des structures cartilagineuses et osseuses visant à préserver l'intégrité physique des patients permettent de prévenir les séquelles à long terme. L'AJI étant une maladie hétérogène, des différences existent au niveau des choix thérapeutiques. Afin de préserver l'intégrité physique des patients, il est important de choisir un traitement qui régule de façon optimale l'inflammation, tout en exerçant un minimum d'effets secondaires. L'efficacité d'un

traitement est définie notamment par une évaluation globale de l'activité de la maladie par le médecin, une numération des articulations touchées et la VS (Harris et al., 2013).

2.4.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID)

Certains traitements sont utilisés pour l'ensemble des formes d'AJI. C'est le cas des NSAID administrés de façon orale. Ils représentent le premier traitement que les enfants atteints d'AJI reçoivent et ont des propriétés à la fois analgésiques et anti-inflammatoires via l'inhibition de la cyclooxygénase (COX)-1 et -2, qui bloque la production des prostaglandines (Beukelman et al., 2011). Les NSAID les plus courants sont le naproxène, le méloxicam, l'ibuprofène et l'indométacine (Ruperto et al., 2005). Pour des raisons encore mal comprises à ce jour, il arrive que des patients répondent correctement à un deuxième NSAID après l'échec d'un premier (Harris et al., 2013). L'identification de biomarqueurs pour l'amélioration de la classification des formes d'AJI pourrait permettre d'éviter ce problème. Les effets secondaires impliquent souvent des complications gastrointestinales. Notons toutefois que la population pédiatrique semble mieux tolérer les NSAID que les adultes (Vora et al., 2010).

2.4.2 Glucocorticoïdes

Pour augmenter les chances de rémission, il est généralement recommandé de combiner les NSAID à des glucocorticoïdes stéroïdiens par voie locale. Des injections intra-articulaires de glucocorticoïdes sont généralement nécessaires assez tôt dans la maladie afin d'éviter les contractures musculaires et des malformations telles que le valgus du genou (Figure 5). Le triamcinolone hexacétonide est un médicament utilisé mondialement car il induit des rémissions plus longues que d'autres stéroïdes (Zulian et al., 2004). Concernant les effets secondaires, il est possible d'observer une atrophie sous-cutanée ou cutanée, ou encore une décoloration de la peau.

Les patients ne répondant pas aux injections intra-articulaires reçoivent des glucocorticoïdes de façon systémique. Ces traitements doivent alors être administrés pendant une longue période et ils sont responsables d'effets secondaires lourds. Ils ne peuvent pas être associés

aux NSAID. Si l'utilisation est trop prolongée, ils risquent de provoquer une réduction de la croissance, une ostéoporose, des troubles d'humeur, une cataracte, une hypertension et auront des effets métaboliques (Harris et al., 2013). Pour ces raisons, ils vont principalement être utilisés en cas d'AJI systémique, maladie nécessitant des traitements agressifs, ou encore pour des enfants atteints d'AJI polyarticulaire.



Figure 5 : Valgus du genou chez un patient atteint d'AJI (Zulian et al., 2004).

2.4.3 Médicaments antirhumatismaux (DMARD) non biologiques

Parmi les traitements de deuxième intention, il y a le méthotrexate qui est recommandé pour les formes d'arthrites persistantes. Il est relativement bien toléré et son efficacité est observée au bout de 1 à 3 mois (Ruperto et al., 2004). Cette molécule est un analogue de l'acide folique qui inhibe l'action de la dihydrofolate réductase, perturbant ainsi la synthèse des purine et la production d'acide désoxyribonucléique (ADN). Elle augmente également le taux d'adénosine, exerçant ainsi un mécanisme anti-inflammatoire indirect en bloquant la division cellulaire (Harris et al., 2013). Il est très utilisé en oncologie et pour le traitement des maladies autoimmunes en général. Ses effets secondaires peuvent être la nausée, des douleurs abdominales, des plaies dans la bouche ou encore une toxicité hépatique. Son action immunosuppressive peut conduire à une augmentation des risques d'infection (Ravelli et al., 1999).

Un autre exemple de DMARD non biologique est le léflunomide qui inhibe la synthèse de pyrimidine, diminuant ainsi la prolifération lymphocytaire (Giancane et al., 2016). Son utilisation chez les enfants est encore limitée. Elle est conseillée dans les cas où le méthotrexate n'a pas d'effet positif sur la maladie.

2.4.4 DMARD biologiques

Lorsque les patients ne tolèrent pas ou ne réagissent pas aux traitements antirhumatismaux conventionnels, il peut leur être proposé d'avoir recours aux biothérapies.

Les biothérapies les mieux étudiées dans l'AJI sont les inhibiteurs du récepteur du TNF, comme l'étaNERCEPT. Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire à action pléiotropique, dont l'implication est décrite dans de nombreuses maladies autoimmunes (Alonso-Ruiz et al., 2008; Shenoi and Wallace, 2010). Les inhibiteurs de cette cytokine sont généralement utilisés en deuxième ou troisième intention, après une persistance de plus de 3 mois des manifestations articulaires malgré un traitement avec le méthotrexate. Le traitement par les anti-TNF est associé à de potentiels effets secondaires dus aux propriétés immunosuppressives de ces molécules, tels que le risque d'infection, de vascularite

leucocytoclasique, de maladie démyélinisante et de lupus sont également présents (Harris et al., 2013).

D'autres biothérapies utilisées dans l'AJI incluent les inhibiteurs du récepteur de l'IL-1 telles que l'anakinra ou canakinumab considérés comme efficace en cas d'AJI systémique, ou encore le tocilizumab qui inhibe le récepteur de l'IL-6. Enfin, nous pouvons mentionner le rituximab, un anticorps monoclonal qui se lie à un récepteur de surface des cellules B (CD20) et qui induit leur élimination. Cette molécule est de plus en plus utilisée dans les cas de PR. Dans l'AJI, elle est recommandée pour les enfants ayant une AJI polyarticulaire ne répondant pas aux anti-TNF (Giancane et al., 2017).

3. La lignée myéloïde du système immunitaire

3.1 Généralités

Le système immunitaire s'est développé chez les êtres vivants dans le but de protéger l'hôte contre les corps étrangers ainsi que d'éliminer les débris cellulaires. Il est doté d'une grande plasticité et formé de deux branches interconnectées : l'une innée, l'autre adaptative. L'immunité innée inclut des mécanismes moléculaires et cellulaires intervenant dans la reconnaissance rapide des pathogènes puis leur élimination. Ces lignes de défense activent une réaction qui débute généralement dans les secondes suivant la reconnaissance de molécules associées aux pathogènes (Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) par des récepteurs spécifiques (pattern recognition receptors (PRR)) tels que les TLR (Toll-like receptor), les « C-type lectin », les récepteurs de type NOD (Nucleotide oligomerization domain) ou de type RIG (Retinoic acid-inducible genes) (Janeway and Medzhitov, 2002). En ce qui concerne l'immunité adaptative, les acteurs cellulaires et moléculaires qui interviennent vont enclencher une réponse spécifique aux antigènes présentés. Lors d'un premier contact avec un corps étranger, cette réaction met quelques jours à se mettre en place et est suivie par une résolution progressive de l'infection. Une seconde exposition à

des antigènes déclenche une réaction adaptative plus rapide. Les réponses immunitaires innées et adaptatives communiquent à la fois par des contacts entre des récepteurs membranaires et par des facteurs solubles tels que les cytokines (Bonilla and Oettgen, 2010).

En condition physiologique, une réponse immunitaire repose sur la reconnaissance des antigènes du soi et du non soi, ainsi que sur un équilibre entre les voies d'activation et de suppression des réactions inflammatoires. En cas de rupture de la tolérance du soi ou encore d'hyperstimulation des récepteurs spécifiques d'antigènes, la réponse immunitaire peut avoir des conséquences négatives sur l'hôte, telle que le développement de maladies autoimmunes.

3.2 Origine et différenciation cellulaire

L'ensemble des cellules sanguines dérive d'un même type cellulaire, à savoir les CSH qui sont identifiées par les marqueurs membranaires $CD34^+CD90^+Lin^-$, Lin incluant les marqueurs spécifiques aux cellules T, B, NK et myéloérythroïdes (Akashi et al., 2000; Kawamoto and Minato, 2004; Seita and Weissman, 2010). Ces cellules multipotentes ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en de nombreux types cellulaires. Dans des situations homéostatiques, lorsque l'organisme n'est pas face à des pathogènes, la plupart des CSH sont dormantes. Un petit nombre va se diviser pour donner des cellules filles qui vont soit conserver le caractère multipotent des cellules mères, soit se différencier en cellules progénitrices. Dans ce deuxième cas, elles perdent alors leur capacité d'auto-renouvellement et s'engagent dans une lignée précise de cellules sanguines. La capacité de prolifération des CSH augmente de façon importante durant les infections. En revanche, le vieillissement de l'organisme est associé à une diminution du nombre de CSH, ce qui montre l'existence de limites au potentiel de renouvellement de ces cellules.

Le processus par lequel les CSH se différencient correspond à l'hématopoïèse. Les organes lymphoïdes primaires, à savoir la moelle osseuse et le thymus, sont à l'origine du développement des cellules souches en cellules immunitaires matures. La réponse immunitaire adaptative qui se caractérise par la rencontre entre les antigènes et les lymphocytes qui leur sont spécifiques a lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires

incluant la rate, les ganglions lymphatiques et les sites spécialisés de l'intestin ou autres sites associés à des muqueuses.

Une CSH qui se différencie peut donner des progéniteurs myéloïdes-érythroïdes communs (CMP) ou des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Les CMP sont à l'origine des globules rouges (lignée érythroïde), des plaquettes et des GMP (granulocyte/macrophage progenitor). Les GMP peuvent se différencier en un progéniteur myéloïde de type monoblastique nommé MDP (Macrophage/DC progenitor). Des études de transplantation de MPD dans des souris irradiées montrent que ce progéniteur est dépourvu du potentiel de différenciation en granulocytes, ce qui le distingue des GMP (Akashi et al., 2000). Les CLP vont quant à eux se différencier en lymphocytes B et T ainsi qu'en cellules NK (natural killer). Les différentes étapes de l'hématopoïèse s'accompagnent d'un programme génétique finement régulé. Bien que celui-ci ne soit pas totalement élucidé, de plus en plus d'études apportent des informations sur les voies impliquées. En effet, certains facteurs de transcription clés sont connus pour participer à l'engagement vers des lignées cellulaires spécifiques. Gata-2, par exemple, intervient dans le développement de toutes les lignées hématopoïétiques (Gao et al., 2013). Chez la souris, l'absence de Gata-2 est létale car elle est associée à une interruption de l'embryogenèse. Des études effectuées sur des lignées érythroïdes montrent que la surexpression de Bmi-1 au niveau d'érythroblastes adultes cultivés *ex vivo* favorise l'auto-nouvellement de ces cellules qui, en condition normale présentent un potentiel prolifératif limité (Kim et al., 2015). Les voies de signalisation impliquant la protéine Notch ont été identifiées comme des acteurs clés de la différenciation leucocytaire. En effet, des analyses utilisant des techniques de marquage cellulaire *in vivo* ont montré que Notch2 intervient dans la conversion des monocytes Ly6C^{hi} en monocytes Ly6C^{lo} (Gamrekelashvili et al., 2016). Ce processus peut être contrôlé par le ligand de Notch Dll1 (ligand delta-like 1) exprimé par des cellules endothéliales, montrant ainsi comment les vaisseaux sanguins peuvent participer à la différenciation des monocytes. Gamrekelashvili et al. ont confirmé l'importance de Dll1 dans la conversion des monocytes avec des études *in vitro* au niveau desquelles ils ont mis des monocytes Ly6C^{hi} en culture avec des Dll1 recombinant et ont observé une différenciation en Ly6C^{lo}.

La migration des cellules immunitaires d'un tissu à l'autre s'effectue via le sang et le système lymphatique. Elle est guidée par les chimiokines qui sont sécrétées notamment par les

cellules endothéliales, les cellules stromales, les CPA, les lymphocytes et les granulocytes. Ces chimiokines forment un gradient qui attire et guide les cellules immunitaires exprimant des récepteurs spécifiques à ces protéines. Un exemple de récepteur de chimiokine est le CCR2 qui est fortement exprimé par les monocytes à la sortie de la moelle osseuse. De nombreux modèles d'infections et de lésions tissulaires montrent que les monocytes exprimant ce récepteur peuvent rapidement être mobilisés à partir de la moelle osseuse vers les sites inflammatoires via la liaison au ligand de CCR2, à savoir MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), également nommée CCL2 (França et al., 2017; Nahrendorf et al., 2007; Serbina et al., 2008). L'analyse de la réponse immunitaire dans des souris CCR2^{-/-} a montré une réduction de 50% du recrutement des macrophages par rapport aux souris contrôles (Chiu et al., 2004). De plus, en étudiant le profil d'activation des DCs avec des cellules CCR2^{+/+} et des CCR2^{-/-} localisées dans des souris chimériques, Chiu et al. ont constaté un défaut d'activation intrinsèque aux DCs CCR2^{-/-} caractérisé par une diminution de l'expression de MHC-II et CD40. Ceci suggère que les cellules CCR2^{-/-}, ne pouvant plus se lier au ligand MCP-1, présentent une activation et une maturation plus faible. En ce qui concerne les monocytes CD16⁺ qui expriment faiblement CCR2, des études ont montré que le récepteur CX3CR1 joue un rôle important dans leur migration (Lesnik et al., 2003). En effet, dans des modèles de souris CX3CR1^{-/-}, le recrutement des monocytes au niveau de la paroi des vaisseaux est plus faible que dans les souris contrôles au niveau desquelles les monocytes CD16⁺ CX3CR1⁺ migrent suivant le gradient de fractalkine (CX3CL1) (Ancuta et al., 2003).

3.3 Les cellules myéloïdes

Les cellules myéloïdes sont les premières à répondre à une infection. En plus de l'élimination des pathogènes, certaines vont jouer un rôle important dans la communication avec les cellules du système immunitaire adaptatif auxquelles elles présentent des antigènes. Dans le cadre de cette thèse, je me suis particulièrement intéressée aux monocytes et aux cellules dendritiques, deux types cellulaires provenant des MDP.

3.3.1 Les monocytes

Les monocytes représentent environ 5 à 10% de l'ensemble des leucocytes humains circulants (Gordon and Taylor, 2005). Ces cellules mononucléées possèdent divers récepteurs membranaires leur permettant de détecter les variations du microenvironnement et ainsi réagir en cas d'infection ou de perturbations tissulaires. Les monocytes sont des cellules hautement hétérogènes et possèdent une plasticité phénotypique et fonctionnelle importante.

3.3.1.1 Hétérogénéité phénotypique des monocytes

La morphologie et la fonction des monocytes matures de la circulation périphérique sont hétérogènes. La caractérisation de l'hétérogénéité de ces cellules s'est considérablement améliorée avec le développement de la cytométrie en flux. En effet, l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques des différents récepteurs membranaires a permis de mettre en évidence des variations phénotypiques reflétant la spécialisation fonctionnelle des différentes sous-populations de monocytes, d'abord chez l'homme, puis chez la souris (Gordon and Taylor, 2005).

L'identification des récepteurs membranaires CD14 et CD16 a conduit à la caractérisation des trois populations majeures de monocytes. Initialement, les monocytes étaient identifiés par l'expression du CD14, un récepteur des lipopolysaccharides (LPS) bactériens. Par la suite, avec le récepteur CD16 (récepteur IIIa et IIIb reconnaissant la partie Fc γ des IgG, également nommé Fc γ RIII), deux populations de monocytes ont été décrites : les monocytes dits « classiques » CD14^{hi}CD16⁻ et les « intermédiaires » CD14⁺CD16⁺ (Passlick et al., 1989). Cette dernière population exprime plus faiblement le CD14 que les monocytes conventionnels CD14^{hi}CD16⁻ et est capable d'adhérer au plastique et d'exercer une phagocytose. L'identification subséquente de l'expression différentielle de marqueurs au niveau de la membrane de ces cellules a apporté des informations supplémentaires sur leur hétérogénéité. Par exemple, il a été montré que l'expression des molécules MHC class II et CD32 était plus élevée au niveau des monocytes CD14⁺CD16⁺ (Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Quelques années plus tard, l'analyse des récepteurs de chimiokines montre une expression de CCR5, récepteur de CCL5, MIP(macrophage inflammatory protein)-1 α et β , plus

importante sur les monocytes $CD14^+CD16^+$, tandis que le CCR2 est plus élevé sur les $CD14^{hi}CD16^-$ (Weber et al., 2000).

Un troisième sous-type de monocytes a été identifié au début des années 2000, à savoir les monocytes « non classiques » $CD14^{dim}CD16^+$ (Ancuta et al., 2003). Celui-ci représente environ 7% des monocytes totaux circulant, tandis que les $CD14^{hi}CD16^-$ et $CD14^+CD16^+$ correspondent approximativement à 85% et 5%, respectivement. Si l'identification de la dernière sous-population de monocytes s'est effectuée ultérieurement, c'est parce que ce sous-type exprimant le CD16 et très faiblement le CD14 a longtemps été assimilé aux neutrophiles. Il est montré que les monocytes $CD14^{dim}CD16^+$ expriment le HLA-DR façon similaire aux monocytes conventionnels $CD14^{hi}CD16^-$. L'expression de CCR1, CCR2, CXCR1, CXCR2 et CD62L est plus faible au niveau des monocytes $CD14^{dim}CD16^+$, l'inverse étant observé pour les récepteurs CX3CR1 et CXCR4. En ce qui concerne les monocytes $CD14^+CD16^+$, le phénotype est intermédiaire avec des taux d'expressions de marqueurs compris entre ceux des monocytes $CD14^{hi}CD16^-$ et des $CD14^{dim}CD16^+$. Toutefois, l'expression de CCR5 est plus élevée au niveau des monocytes $CD14^+CD16^+$ que sur des les deux autres sous-types.

3.3.1.2 Hétérogénéité fonctionnelle des monocytes

Les monocytes classiques $CD14^{hi}CD16^-$ sont considérés comme des cellules inflammatoires. Ces cellules qui possèdent une expression élevée de CCR2 sont recrutées massivement à partir de la moelle osseuse et des réservoirs spléniques pour migrer vers des tissus endommagés et/ou infectés. Elles se dirigent vers les sites inflammatoires en répondant à des stimuli générés par les tissus lésés et, à la suite de l'activation des TLR2 ou TLR4, elles produisent des métabolites cytotoxiques (ROS, monoxyde d'azote) et des cytokines pro-inflammatoires, principalement de l'IL-6 et de l'IL-8 (Figure 6) (Cros et al., 2010). Enfin, ces cellules peuvent phagocyter les débris cellulaires et certains pathogènes (Yang et al., 2014).

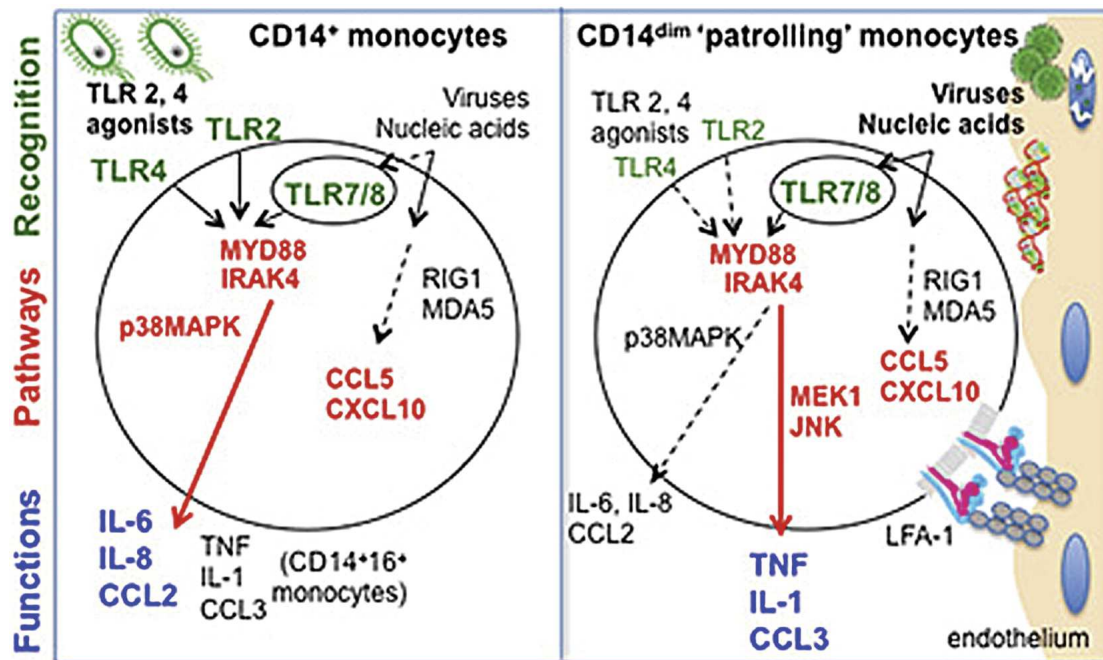


Figure 6 : Représentation schématique de la contribution des monocytes classiques et non classiques dans la production de cytokines inflammatoires en réponse à une infection bactérienne stimulant le TLR2 ou le TLR4 (gauche) ou une infection virale activant le TLR7 ou le TLR8 (droite), respectivement. (Cros et al., 2010)

En ce qui concerne les monocytes intermédiaires CD14⁺CD16⁺, le rôle important qu'ils jouent dans la phagocytose a été reporté dans de nombreuses études (França et al., 2017; Zawada et al., 2011). Ces cellules qui expriment le CCR2 légèrement moins que les monocytes classiques peuvent produire des concentrations importantes de ROS et autres médiateurs inflammatoires tels que TNF α , IL-1 et IL-6 (Merino et al., 2011). Lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* avec du LPS, les monocytes intermédiaires peuvent également sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Skrzeczyńska-Moncznik et al., 2008). De plus, des études ont montré que ces cellules possèdent une expression élevée de molécules MHC classe II telles que HLA-DR et HLA-DQ ainsi que des protéines membranaires comme CD40 et CD54 qui sont impliquées dans la présentation antigénique aux cellules T (Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011). Cette sous-population monocyttaire a été identifiée comme étant la principale inductrice de la prolifération des lymphocytes T en présence du super-antigène SEB (Staphylococcus enterotoxin B) (Wong et al., 2012; Zawada et al., 2011). Les monocytes

intermédiaires peuvent adopter un comportement pro-angiogénique en formant des clusters lorsqu'ils sont stimulés par du VEGF (Zawada et al., 2011). Plus récemment, grâce à la technique de séquençage de cellule unique, le transcriptome des monocytes du sang a été analysé et les résultats ont montré une hétérogénéité au niveau des monocytes intermédiaires (Villani et al., 2017), distinguant deux sous-groupes. Le premier exprime une combinaison spécifique de gènes pouvant affecter le cycle cellulaire, la différenciation et le tropisme (*MXD1*, *CXCR1*, *CXCR2*, *VNN2*), tandis que le second exprime une signature de gènes cytotoxiques (*PRF1*, *GNLY*, *CTSW*) qui les rapproche des cellules NK. Des études supplémentaires sont toutefois nécessaires afin de caractériser plus en profondeur ces deux groupes de monocytes intermédiaires et savoir s'ils sont distincts ou non sur le plan fonctionnel.

Enfin, les monocytes non classiques $CD14^{dim}CD16^{+}$ sont considérés comme des « patrouilleurs » de la paroi vasculaire (Wong et al., 2012). Ils sont recrutés durant des phases plus tardives de l'inflammation. Ces cellules possèdent la capacité de se déplacer en rampant à l'intérieur des vaisseaux sanguins dans le but de surveiller les cellules endothéliales et réagir en cas d'infection. Les monocytes non classiques réagissent principalement contre les particules d'ADN et d'ARN virales via les récepteurs TLR-7 et TLR8, activant les voies de signalisation MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) - MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) (Cros et al., 2010) (Figure 6). Des expériences *in vitro* montrent les cellules $CD16^{+}$ sont beaucoup plus mobiles que leurs homologues $CD16^{-}$ (Randolph et al., 2002). Cette fonction est dépendante de l'interaction entre le récepteur CX3CR1 et son ligand CCL3. Le rôle majeur de la molécule d'adhésion LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) dans cette mobilité cellulaire a également été identifié. Des études sur des souris KO pour ICAM-1, un des ligands de LFA-1, montrent que la migration ou « crawling » des monocytes est réduite de 50% par rapport aux souris contrôles (Ramos et al., 2014). De plus, il est intéressant de souligner que des gènes associés à la mobilité du cytosquelette, tels que Rho GTPases, *RHOC* et *RHOF* sont fortement exprimés par les monocytes non classiques (Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011). Ce sous-type produit principalement des cytokines anti-inflammatoires (Thomas et al., 2015). Ces cellules promeuvent la réparation tissulaire en libérant des facteurs de croissance tels que VEGF. Une partie des monocytes non classiques semble provenir de monocytes classiques qui se

sont différenciés, comme l'attestent des études qui ont observé des télomères de plus petite longueur dans les monocytes CD14^{dim}CD16⁺ (Merino et al., 2011). De plus, Yona et al. ont réalisés des études *in vivo* sur un modèle de souris pour analyser l'effet qu'un appauvrissement en monocytes sanguin Ly6C^{hi} peut avoir sur le nombre de Ly6C^{low} circulant (Yona et al., 2013). Leurs travaux ont montré qu'une déficience en CCR2 induisait une accumulation de monocytes Ly6C^{hi} au niveau de la moelle osseuse, associée à un faible nombre de monocytes Ly6C^{low} sanguin. Ceci suggère que la génération des monocytes Ly6C^{low} dépend en partie de la disponibilité, au niveau du sang, des Ly6C^{hi} CCR2⁺ qui sont considérés comme des précurseurs intermédiaires.

3.3.2 Les cellules dendritiques

Les DCs sont essentielles pour l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules sont considérées comme des CPA professionnelles et les principales activatrices des lymphocytes T. Elles tirent leur nom de leurs longues extensions membranaires similaires en apparence aux dendrites des cellules nerveuses. Ces extensions peuvent s'étendre et se rétracter de façon dynamique afin d'augmenter la surface de contact avec les lymphocytes T. Les DCs immatures agissent comme des sentinelles du système immunitaire et capturent les antigènes qu'elles rencontrent. Lorsqu'elles détectent un antigène étranger, elles entament un processus de maturation puis migrent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes au lymphocytes T via les complexes MHC-I et MHC-II, initiant ainsi la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules participent également à l'induction de la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi (Banchereau et al., 2000; Coutant and Miossec, 2016).

3.3.2.1 Les différents sous-types de DCs

Les DCs humaines correspondent à une population hétérogène incluant différents sous-types qui sont définis en fonction de leur origine, leur phénotype et leur profil transcriptomique (Figure 7). En condition physiologique, les DCs produites au niveau de la moelle osseuse peuvent se différencier en DCs plasmacytoïdes (pDCs) caractérisées par l'expression de CD123, CD303 (également nommé blood dendritic cell antigen 2 (BDCA2)), CD304 (ou BDCA4), CD11b et CD11c (Haniffa et al., 2013). Lorsqu'elles sont activées, ces cellules peuvent produire des taux d'IFN α entre 200 et 1000 fois supérieurs aux autres types cellulaires (Siegal et al., 1999). Les DCs ont également la possibilité de se différencier en DCs myéloïdes ou conventionnelles (cDCs), plus précisément en cDC1 exprimant les récepteurs CD1c (BDCA1), CD11b, CD11c et CD172, ou encore en cDC2 exprimant le CD141 (BDCA3) ainsi que de faibles taux de CD11c (Guilliams et al., 2014). En condition inflammatoire, une quatrième sous-population de DCs peut être observée, à savoir les DCs inflammatoires (InfDCs). Ce sous-type exprime le CD1c, CD11b, CD11c, CD1a, CD206, CD172a mais aussi le CD14. Il a été identifié dans du LS de patients atteints de PR et il semble être le résultat d'une différenciation de monocytes (Segura et al., 2013).

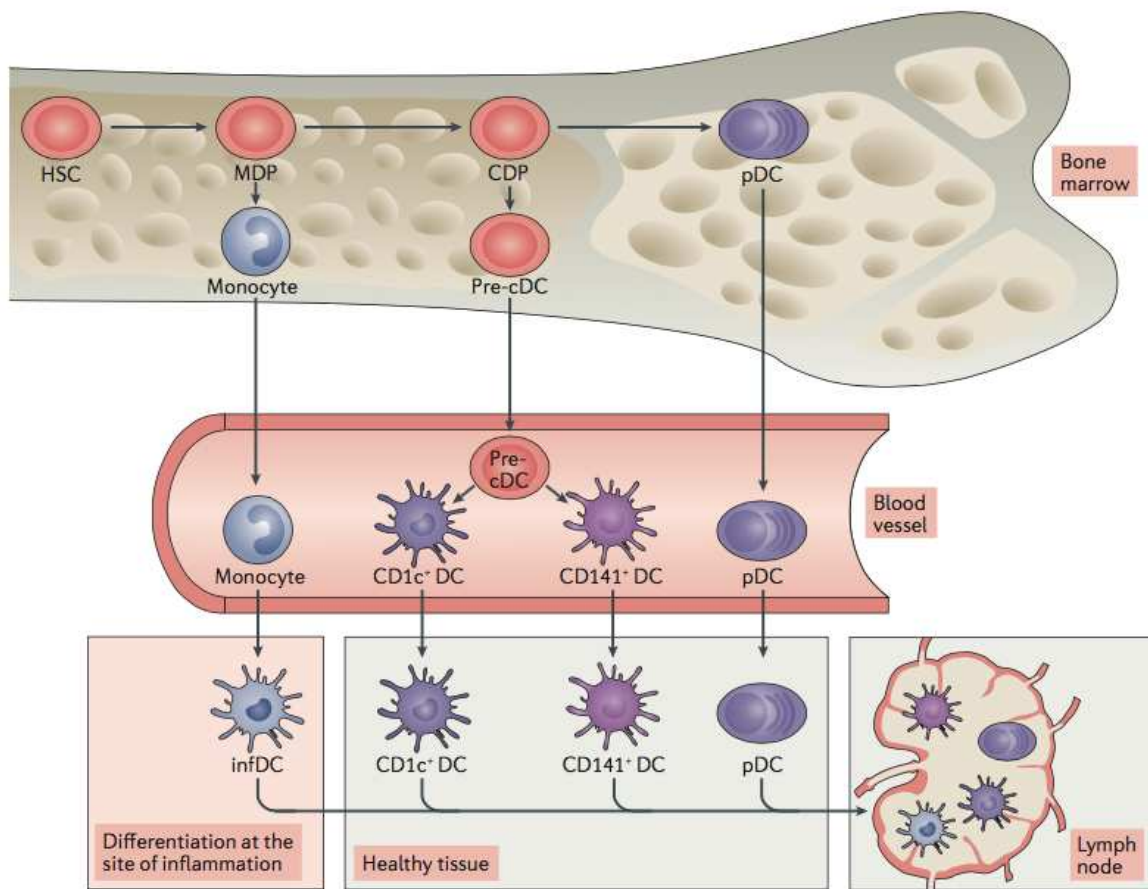


Figure 7 : Origine et distribution des sous-populations de DCs. Les progéniteurs des DCs proviennent de la moelle osseuse où ils réalisent les premières étapes de différenciation. Celles-ci se poursuivent au niveau des vaisseaux sanguins où 3 sous-populations peuvent être identifiées, à savoir les CD1c⁺ DCs, les CD141⁺ DCs et pDCs. Dans les environnements inflammatoires, des InfDCs peuvent se différencier à partir de monocytes. Après qu'elles se soient liées à des antigènes, les DCs migrent vers les ganglions lymphatiques où elles peuvent effectuer une présentation antigénique aux lymphocytes T. (Coutant and Miossec, 2016)

3.3.2.2 Etude fonctionnelle des DCs

En condition saine, les DCs immatures circulent dans le sang et infiltrent les tissus afin de capturer les antigènes libérés par les cellules apoptotiques subissant une mort naturelle. Elles vont alors présenter ces auto-antigènes aux lymphocytes T afin d'induire une tolérance.

Cette dernière est médiée par des mécanismes faisant intervenir des cytokines immunosuppressives, l'élimination des cellules T auto-réactives et l'activation des Treg (Steinman et al., 2003).

Lorsque l'organisme fait face à une infection ou que les tissus sont endommagés, des chimiokines vont attirer les DCs vers le site de l'inflammation. Ces cellules sont orientées grâce à des récepteurs tels que CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 et CX3CR1 (Coutant and Miossec, 2016). Après avoir infiltré les tissus et capturé les antigènes, elles entament un processus de maturation qui est initié par la présence de signaux d'activation. Ces derniers correspondent soit à des molécules exogènes, dérivées de pathogènes et nommées PAMPs, soit endogènes et donc désignées comme étant des DAMPs. Ces signaux d'activation vont se lier à des récepteurs PRR au niveau des DCs et ainsi optimiser la migration vers les organes lymphoïdes et la présentation antigénique aux cellules T (Janeway and Medzhitov, 2002).

La maturation des DCs s'accompagne d'une diminution des fonctions endocytaires et d'une augmentation de l'expression de marqueurs membranaires tels que les MHC-I et -II, ainsi que CD40, CD80 et CD86. Ces récepteurs sont essentiels pour la stimulation des T et l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. La polarisation des lymphocytes T induite par les DCs est dépendante des conditions du microenvironnement. Ce dernier conditionne la production par les DCs de cytokines comme IL-12, IL-23 et IL-10 qui vont être impliquées dans la polarisation des T naïfs en Th1, Th17 et Treg respectivement. Une orientation de la différenciation en Th2 peut être induite via l'augmentation de l'expression de protéines de surface telle que OX40 qui fait partie de la famille des TNF (Coutant and Miossec, 2016). Par ailleurs, des études ont montré que les cDC1 et cDC2 pouvaient libérer des cytokines inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6 ou l'IL-8 à la suite de la stimulation des TLR2 et TLR4 (MacDonald et al., 2002). Les pDCs activées expriment quant à elles principalement les TLR7 et TLR9 et produisent non seulement de l'IFN α , mais également IFN γ et du TNF α (Demedts et al., 2006).

La capacité à activer les T n'est pas la même pour toutes les sous-populations de DCs. En effet, bien que les pDCs expriment des molécules du MHC-II et qu'elles possèdent des co-stimulateur de cellules T, elles ne sont pas aussi efficaces que les cDCs pour la présentation antigénique (Villadangos and Young, 2008). Il a toutefois été démontré qu'elles jouent un rôle essentiel dans l'orientation de la polarisation des T via la production importante d'IFN α ,

ainsi que dans l'induction de la tolérance en favorisant la différenciation des T naïfs en Treg (Martín-Gayo et al., 2010; Villadangos and Young, 2008). Cette dernière fonction est partagée avec les cDCs (Martín-Gayo et al., 2010). Concernant les cDC1, des études ont montré qu'ils produisent des taux élevés d'IL-12, suggérant un rôle dans la polarisation vers des Th1 (Nizzoli et al., 2013). Les cDC2 semblent quant à elles être plus efficaces dans l'induction des réponses Th2, comme le suggèrent des résultats montrant une expression importante du ligand OX40 sur ces DCs (Yu et al., 2014). Les cDCs, principalement les cDC2, exercent un rôle important dans la cross-présentation qui est responsable de l'induction de la réponse T cytotoxique. L'expression du récepteur « C-type lectin » leur permet de se fixer aux cellules nécrotiques et les présenter aux lymphocytes T CD8 (Jongbloed et al., 2010).

Enfin, les DCs sont impliquées dans le développement de l'immunité humorale (Ueno et al., 2010). Ces cellules peuvent former des complexes avec des cellules T et B et libérer des cytokines, comme l'IL-12, qui vont stimuler les B et promouvoir la production d'anticorps. Les DCs peuvent également agir directement sur les B en sécrétant des facteurs de survie et de prolifération tel que APRIL (proliferation-inducing ligand) et BAFF (B-cell activating factor). Ces différents mécanismes sont indispensables en cas d'infection, mais ils sont toujours associés à un risque de production d'auto-anticorps responsables du développement des maladies auto-immunes (MacLennan and Vinuesa, 2002).

3.4 Implication des monocytes et cellules dendritiques dans l'AJI

Comme il a été démontré plus haut, les monocytes et les DCs jouent un rôle majeur dans le système immunitaire. En plus de s'attaquer directement aux pathogènes, ces cellules représentent un lien entre le système immunitaire inné et adaptatif. Grâce à leur plasticité, les monocytes et les DCs peuvent répondre à différents changements du microenvironnement. Des mécanismes de régulation précis sont impliqués dans la différenciation et la fonction de ces cellules. Des perturbations au niveau de leur distribution ou leur action peuvent avoir de lourdes conséquences sur la réponse immunitaire et donc sur l'organisme.

En ce qui concerne les monocytes, une augmentation du nombre de monocytes intermédiaires dans le sang de patients atteints de maladies auto-immunes telles que la PR,

le lupus, ainsi que dans des cas d'AJI liée à l'enthèse a été observée comparé au sang de donneurs sains (Gaur et al., 2017; Smiljanovic et al., 2018). Une accumulation de monocytes intermédiaires dans les articulations a été rapportée dans une seule étude chez des patients AJI par rapport au sang (Gaur et al., 2017). Dans cette étude, le nombre de CD14⁺CD16⁺ corrèle positivement au nombre d'articulations atteintes. Cette étude a également observé une surexpression de gènes appartenant au système du complément, tels que *C1Q*, *C2*, *C3* et *CDBPA*, dans les monocytes du sang des patients AJI par rapport au sang d'individus contrôles. D'autres gènes essentiels à la fonction des monocytes sont également plus exprimés dans les cellules de l'articulation par rapport au sang. C'est le cas de *CD163*, *CD1b*, *CD1d*, *MHC-II* (Myles et al., 2012). Une expression importante de gènes spécifiques des monocytes intermédiaires comme *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5* et *FCGR3A* (CD16) a également été identifiée dans le sang des enfants avec une AJI liée à l'enthèse comparé aux enfants contrôles. Il en va de même pour *GFRA2*, *TGM2* et *CD300C* qui sont des gènes liés à l'activation de ces monocytes.

Ces observations sont à rapprocher avec des études menées chez la patients adultes atteints de PR qui ont montré que les monocytes intermédiaires sont en nombre important dans le sang par rapport à des donneurs sains et expriment fortement les récepteurs HLA-DR et CCR5 (Rossol et al., 2012). Cette même étude a montré que les monocytes intermédiaires sont impliqués dans la polarisation des cellules T vers le phénotype pathogène Th17 via la production d'IL-23. L'ensemble de ces données suggère que les monocytes CD14⁺CD16⁺ ont un rôle particulier à jouer dans le développement des maladies inflammatoires.

L'analyse du profil cytokinique associé aux monocytes indique une augmentation de l'IL-1, l'IL-1Ra, l'IL-6 et l'IL-18 dans le sang de patients atteints d'AJI oligoarticulaire, polyarticulaire ou systémique par rapport à du sang d'individus contrôles (Lotito et al., 2007). Une corrélation a été observée entre les taux d'IL-18, aussi bien du sérum que du liquide synovial, et des critères définissant la gravité de ces pathologies, à savoir les valeurs de CRP et le nombre d'articulations atteintes. L'IL-6 et l'IL-18 étaient plus exprimés en cas d'AJI systémique par rapport aux autres formes d'arthrite. Des taux plus élevés de TNF α ont été détectés dans le sérum d'enfants atteints d'AJI polyarticulaire par rapport aux contrôles (Mangge et al., 1995). L'ensemble de ces cytokines libérées entretient l'inflammation en

activant les cellules immunitaires qui vont sécréter d'avantage de médiateurs de l'inflammation.

Macaubas et son équipent se sont particulièrement intéressés à la forme systémique de l'AJI (Macaubas et al., 2010). Leurs études mettent en évidence une augmentation significative des monocytes classiques et intermédiaires du sang dans la phase active de la maladie, avec une diminution lorsque la maladie est quiescente. Lorsqu'elles sont mises en culture dans un milieu pauvre en sérum, ces cellules fixent l'annexine de façon moins importante que les cellules de donneurs sains et expriment plus faiblement le Fas ligand (Srivastava et al., 2010). Ces données suggèrent une résistance de ces cellules à l'apoptose, ce qui entretiendrait la réaction inflammatoire qui est observée dans cette maladie juvénile.

Les perturbations immunitaires qui sont décrites dans l'AJI peuvent également s'expliquer par des dérèglements de la fonction ou de la distribution des DCs. En effet, des études incluant des enfants atteints d'AJI systémique, oligoarticulaire et polyarticulaire reportent une accumulation des différents sous-types de DCs au niveau des articulations de ces patients (Smolewska et al., 2008). Leur nombre dans la circulation des enfants AJI est alors inférieur à celui des enfants sains. Ces cellules semblent être recrutées depuis le sang vers les articulations par l'action de chimiokines telles que CXCL-10, CXCL-11 et CXCL-12, comme c'est le cas chez des patients atteints de PR (Lande et al., 2004). De plus, Smolewska et son équipe ont montré que les DCs du LS présentent une expression importante de marqueurs d'activation tels que CD40 et CD86. Tabarkiewicz et al. ont quant à eux identifié une expression plus élevée des récepteurs HLA-DR au sein des articulations (Tabarkiewicz et al., 2011).

L'accumulation dans le LS de ces cellules activées a été montrée comme étant associée à des concentrations de cytokines pro-inflammatoires plus importantes. C'est le cas du TNF α et de l'IFN α qui sont présents à des taux élevés dans les articulations des enfants d'AJI oligoarticulaire ou polyarticulaire et qui sont connus pour être impliqués dans l'initiation et la maintenance de réactions inflammatoires (Gattorno et al., 2006). Ces DCs articulaires expriment fortement le récepteur RANK. Une liaison avec le RANK ligand présent à la surface des cellules T activées stimule la survie des DCs (Varsani et al., 2003). L'ensemble de ces mécanismes inflammatoires liés aux DCs est corrélé à des manifestations cliniques plus

sévères en cas d'AJI polyarticulaire (Smolewska et al., 2008). Enfin, un déficit de pDCs sanguines semble être associé à une mauvaise réponse aux traitements.

4. Les microARNs

Les microARNs (miARNs) sont de petits fragments d'ARNs non codants qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Ces segments ARNs d'environ 22 nucléotides de long sont conservés entre de nombreuses espèces et sont impliqués dans la majorité des processus de développement des êtres vivants. Le premier miARN, nommé lin-4, a été identifié par Victor Ambros et Gary Ruvkun en 1993 dans *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Son rôle dans le développement du ver via la liaison au niveau de la partie 3'-UTR (région non traduite) du gène lin-14 a été mis en évidence. En 2000, un second miARN, let-7, a été détecté dans *C. elegans* puis retrouvé dans d'autres espèces, notamment chez l'homme (Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000). Depuis, 2 588 miARNs ont été identifiés chez l'homme et sont recensés dans la miRBase.

La biogenèse et la fonction des miARNs sont régulées par des mécanismes précis qui varient en fonction du type cellulaire et de stade de différenciation. Ces fragments d'ARN non-codants régulent la fonction des cellules au niveau desquelles ils sont synthétisés et peuvent également être sécrétés par celles-ci et se retrouver dans la circulation. Ces miARNs circulants sont soit dans des vésicules extracellulaires, soit associés à des protéines telles que Argonaute (Ago) 2, soit à des complexes de lipoprotéines, ce qui leur procure une stabilité importante et permet ainsi d'éviter qu'ils ne soient dégradés par des ARNases (Creemers et al., 2012) (Figure 8). Ils peuvent alors réguler l'expression des gènes des cellules avoisinantes et ainsi jouer un rôle dans la communication entre cellules. Des études ont montré qu'environ 66% des miARNs libérés par les cellules sont retrouvés dans des quantités reflétant leur niveau intracellulaire, tandis que 13% semblent être retenus par les cellules et 21% sont activement sécrétés et donc en concentrations plus élevées dans le compartiment extracellulaire (Pigati et al., 2010).

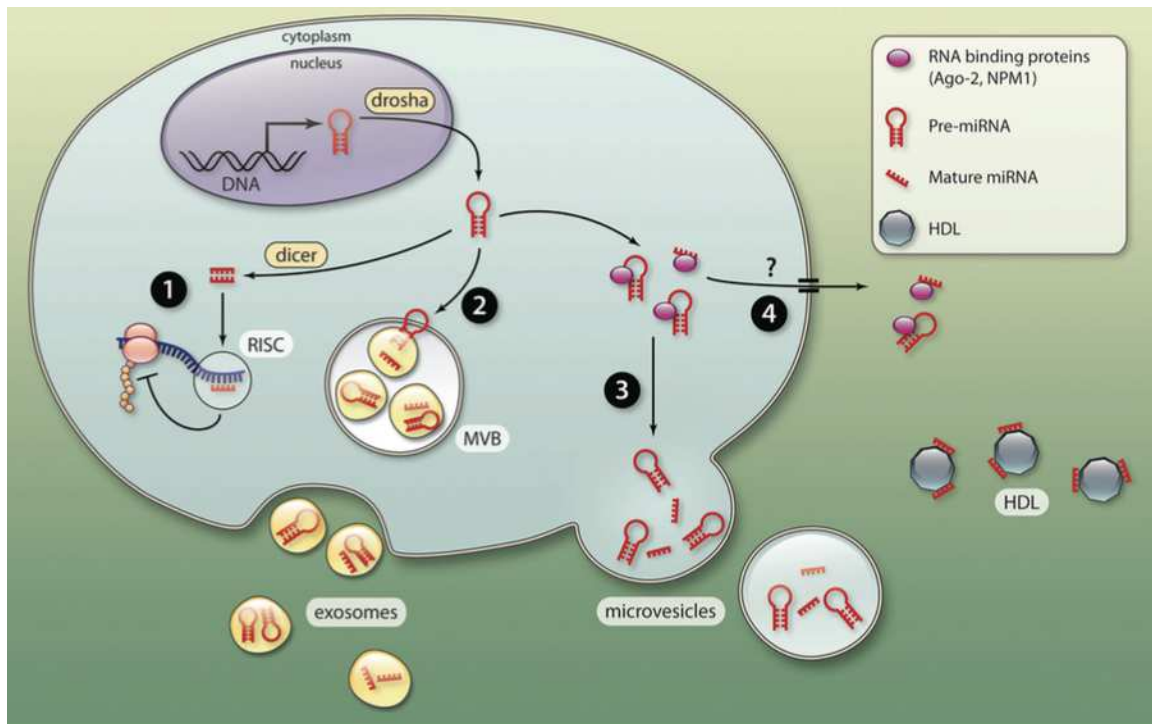


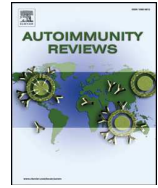
Figure 8 : Mécanismes de libération des miARNs. La synthèse des miARNs commence dans le noyau où des précurseurs de miARNs, les pri-miARNs sont transcrits à partir de l'ADN puis sont clivés et pour devenir des pré-miARNs. Ceux-ci sont ensuite transportés dans le cytoplasme où ils sont à nouveau clivés et deviennent des miARNs matures. Les brins de miARNs peuvent (1) se lier au complexe RISC (RNA-induced silencing complex), (2) être incorporés dans des exosomes ou (3) des vésicules, ou (4) se lier à des protéines avant d'être exportés. (Creemers et al., 2012)

En contrôlant des mécanismes impliqués dans la prolifération cellulaire, la production de médiateurs inflammatoires, le remodelage osseux, les miARNs jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire et la fonction des cellules articulaires (Vicente et al., 2016). L'expression aberrante de miARNs a été reportée pour la première fois dans des maladies rhumatismales il y a une dizaine d'années (Nakasa et al., 2008; Pauley et al., 2008). Depuis 2014, des études ont mis en évidence une corrélation entre des perturbations de l'expression de miARNs du sang et le développement d'arthrites juvéniles (Lashine et al., 2015). La revue ci-dessous décrit la biogenèse ainsi que les modes d'action des miARNs et détaille l'importance des miARNs dans le système immunitaire. De plus, elle rassemble les

résultats associant l'expression anormale des miARNs et le développement de l'AJI. Cette revue montre le potentiel que renferment ces miARNs en tant qu'outils pour le diagnostics et pour la caractérisation de l'activité et la progression de la maladie. L'étude des miARNs dérégulés a également pour but d'identifier des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'AJI.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

MicroRNAs in juvenile idiopathic arthritis: Can we learn more about pathophysiological mechanisms?

Nadege Nziza^{a,b}, Isabelle Duroux-Richard^a, Florence Apparailly^{a,c,*}

^a IRMB, INSERM, University of Montpellier, Montpellier, France

^b Arthritis R&D, Neuilly sur Seine, France

^c Clinical Department for Osteoarticular Diseases and Biotherapy, University Hospital, Lapeyronie, Montpellier, France

ABSTRACT

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is a heterogeneous and multifactorial group of chronic arthritis with an onset before the age of 16 years. The pathogenesis of this disease is poorly understood, which makes the distinction among subtypes unclear, delays diagnosis and optimal therapeutic management. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play a critical role in the regulation of immune responses. Their expression is tightly controlled to ensure cellular homeostasis and function of innate and adaptive immune cells. Abnormal expression of miRNAs has been associated with the development of many inflammatory and autoimmune diseases. In this review, we gather results published on miRNAs expression profiles in JIA patients with the aim to identify miRNAs that can be used as diagnostic biomarkers and provide information on disease activity and progression. We also focus on miRNAs deregulated in different forms of JIA to shed light on common pathways potentially involved in disease pathophysiology.

1. Juvenile idiopathic arthritis

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is a heterogeneous group of chronic childhood arthritis persisting for > 6 weeks. JIA represents the most common rheumatic disease with an onset before the age of 16 years. The prevalence of this autoimmune disorder of unknown origin is between 16 and 150 cases per 100,000 children [1,2]. The International League of Associations for Rheumatology (ILAR) has identified 7 subtypes of JIA based on the number of affected joints, serologic features and the presence of systemic signs and symptoms [3]. Categories of JIA include oligoarticular JIA, rheumatoid factor (RF)-negative polyarticular JIA, RF-positive polyarticular JIA, systemic JIA (sJIA), enthesitis-related arthritis (ERA), psoriatic arthritis and undifferentiated JIA. The oligoarticular subtype characterized by four or fewer joints affected during the first 6 months of symptoms represents nearly 50% of cases in Europe, while polyarticular JIA with five or more arthritic joints accounts for 25 to 40% [4]. The other forms of JIA are less common in Europe. sJIA involves a fever lasting > 2 weeks that can be associated with generalized lymphadenopathy, evanescent erythematous rash, hepatomegaly, splenomegaly or serositis. Psoriatic arthritis is defined by the presence arthritis and psoriasis or some psoriatic features like nail pitting, onycholysis, dactylitis or psoriasis in a first-degree relative. ERA corresponds to arthritis supplemented with inflammation at the ligamentous or tendinous attachments to the bone. Finally, undifferentiated arthritis includes all forms of arthritis that

does not fulfill any of the criteria mentioned above, or fits more than one category. This classification is still under revision and discussions continue on its robustness, as there is a lack of specific markers (clinical and/or biological) discriminating between JIA subtypes.

Little is known about the cause and pathophysiology of JIA. The literature describes JIA as a multifactorial disease for which some specific susceptibility genes have been identified [5]. They can be divided into two groups: HLA genes and non HLA-related genes. HLA class I (*HLA A-2* and *HLA B27*) and HLA class II (*HLADRB1* and *HLA DP*) alleles have been associated with JIA, indicative of a role of T lymphocytes in these diseases. Several non-HLA candidate genes have also been identified in JIA cases, including *MIF*, *PTPN22*, *SLC11A6*, *WISP3* and tumor necrosis factor (*TNF*)- α [6]. The autoreactive immune response in JIA is a consequence of a deregulation of innate and adaptive immunity, which is assumed to be triggered by an adaptive reaction towards self-antigens. Indeed, antigen-presenting cells like monocytes and dendritic cells (DCs) play a critical role in synovial inflammatory reaction [7–9]. Impairments in their distribution [10–12] as well as in their cytokine production [13–16] are described in cases of JIA. They are responsible for the accumulation of activated memory T cells in the joints [17], resulting in exacerbated immune response and tissue damage. While genetic specificities determine the susceptibility to develop the disease, the interaction with environmental features seems to be involved in the initiation of the autoimmune reaction. These environmental triggers are largely unknown and might include specific

* Corresponding author at: IRMB, INSERM, University of Montpellier, Montpellier, France.
E-mail address: florence.apparailly@inserm.fr (F. Apparailly).

<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.06.006>

Received 26 February 2019; Accepted 3 March 2019
1568-9972/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

infectious agents or vaccinations. For example, after vaccination with meningococcus C, some polyarticular JIA patients showed an increased proinflammatory immune response towards vaccine antigens [18]. Also, several reports show that JIA is more prevalent in rural than urban environments [19,20]. However, further work on large cohorts is needed to validate these hypotheses and to identify specific factors that contribute to the initiation and development of the pathology.

Epigenetic mechanisms are known to play a major role in the regulation of biological processes, including immune reactions. Over the past several years, a growing interest in microRNAs (miRNAs) has been shown. They regulate gene expression and it has become clear that alterations in their expression profiles can contribute to the development of pathological conditions like cancers and autoimmune diseases [21,22]. In 2007, the first evidence of a linkage between miRNAs and the pathogenesis of adult form of arthritis, rheumatoid arthritis (RA), was found [23]. Since then, the abnormal expression of multiple miRNAs has been documented in the blood and inflamed joints of RA patients, some of them reflecting the pathological state of tissues and disease activity [24–28]. Concerning juvenile arthritis, it was only in 2014 that the first report on miRNAs quantification was published [29]. The aim of the present review is to provide a state of the art of the findings on miRNAs in JIA and to document on their role in the pathogenesis of this heterogeneous group of diseases, as well as on their potential as biomarkers and therapeutic tools.

2. Overview of miRNAs in biological networks

MiRNAs are non-coding, endogenously generated and single-stranded RNAs of approximately 22 nucleotides. According to the latest miRNA database, 2588 miRNAs have been identified in humans [30]. They exhibit highly regulated patterns of expression, specific of each cell types and changing according to cellular differentiations [31]. MiRNAs predominantly act as negative regulators of the expression of target genes by translational repression or cleavage of messenger RNA (mRNA). Under certain conditions, miRNAs have been reported to up-regulate the translation of target mRNAs [32]. It is estimated that > 60% of human protein coding genes contain at least one miRNA binding site [30]. MiRNAs are essential for the maintenance of cellular homeostasis and normal function. They have a key role in many physiological systems [33,34], as they allow the rapid or transient change of gene expression profiles in response to intracellular or extracellular signals [35].

2.1. Biogenesis of miRNAs

The biogenesis of miRNAs starts in the nucleus where they are transcribed from genes, mainly by RNA polymerase II [30]. Some miRNA genes are transcribed individually, but a large fraction of them are present in the genome with expression patterns and arrangements that suggest they are transcribed as polycistronic primary transcripts [36]. The primary transcript of miRNA gene (pri-miRNA) is usually hundreds to thousands of nucleotides long and has one or more hairpin loop structures. MiRNA precursors can be processed either in a canonical or a non-canonical biogenesis pathway [37,38]. In the canonical miRNA pathway, the pri-miRNA is cleaved in the nucleus by the RNase III endonuclease Drosha, along with a double-stranded-RNA-binding protein called DiGeorge syndrome critical region protein 8 (DGCR8). The pri-miRNA then becomes a 60 to 70 nucleotides stem-loop intermediate called pre-miRNA. In the alternative pathway named non-canonical miRNA biogenesis, miRNA precursors designated as mirtrons do not contain the stem-loop structure and the flanking single stranded segments essential for the binding of the Drosha/DGCR8 microprocessor. Therefore, they bypass Drosha processing and go through a splicing of 5'cap and polyA tails after which they become pre-miRNAs and can enter the canonical miRNA processing pathway. The pre-miRNA is then exported from the nucleus into the cytoplasm by

Exportin-5 and its RAN-GTP cofactor, where it is cleaved by RNase III Dicer and becomes an unstable, asymmetric miRNA/miRNA duplex of 19–22 nucleotides [30,39]. This duplex is composed of a guide RNA sequence and a passenger RNA. After the processing by an helicase, the guide sequence also called the active strand is selectively loaded into ribonucleoprotein (RNP) complexes to generate RNA-induced silencing complexes (RISC). This active strand incorporated in RISC is therefore able to act as a mature miRNA, while the passenger miRNA is usually released and rapidly degraded [30].

2.2. MiRNAs mode of action

After being loaded on RISC, the mature miRNA can interact with its target mRNA on complementary binding sites originally thought to be located only in 3' untranslated regions (UTRs). Publications then showed that miRNAs are also able to interact with complementary sequences located on 5'UTR of mRNA, as well as on their promoter or coding sequence (CDS) regions [40–42]. These interactions involve a continuous and perfect base pairing of 2–8 nucleotides of the miRNA, representing the “seed” region. Target recognition is followed by the catalytic action of proteins forming the RISC complex. Among them, Argonaute (Ago) 2 has been found to cleave mRNA by endonuclease activity. Other proteins of the Ago family can induce mRNA deadenylation and inhibition of translation [30,43]. Alternatively, repressed mRNA may be accumulated in specific intracellular compartment called GW/P bodied, along with miRNAs and associated proteins [30].

While miRNA-mediated silencing mechanisms are well known, their actions as posttranscriptional upregulators are less documented. An emerging group of studies reveals that the degree of complementarity between miRNA and the target mRNA dictates the translation outcome [44–46]. Indeed, if perfect base pairing usually leads to mRNA cleavage or decay, partial base pairing can have a different effect on gene expression. Not only can it induce mRNA deadenylation and translation silencing, but it might also up-regulate mRNA expression in response to specific sequences, cofactors or cellular conditions. Posttranscriptional up-regulation can either be performed directly by miRNPs, or indirectly, after a regulatory effect on miRNA-mediated inhibition [47]. Vasudevan and his colleagues identified a translation activation of tumor necrosis factor- α (TNF- α) induced by miR-369-3p [32]. TNF- α is a cytokine playing an important role in immune reactions [48]. It appears that upon cell cycle arrest, the AU-rich elements (AREs) located on the 3'UTR of TNF- α mRNA become translation activation signals and recruit AGO2 and fragile X mental retardation-related protein 1 (FXR1) that are associated with miRNPs. This association is directed by miR-369-3p [32]. The versatility of miRNP function in response to specific cellular conditions has only recently begun to be characterized, and a deeper investigation of regulatory switches that dictate repression versus stimulation is required.

2.3. MiRNAs in body fluids

MiRNAs biogenesis and function is tightly regulated in every cell type. In some tissues, miRNAs show a specific and unique distribution profile. A regulation has also been observed concerning the expression of extracellular miRNAs. Circulating RNAs were identified for the first time in 1972 when intact RNAs were detected in plasma, suggesting that specific structures were preventing their degradation from ribonucleases [49]. Since then, miRNAs have been found in fluids such as serum, saliva and urine [50–52]. Weber and his team analyzed the expression of miRNAs in 12 human body fluids: plasma, urine, saliva, tears, breast milk, colostrum, amniotic fluid, bronchial lavage, pleural fluid, peritoneal fluid, cerebrospinal fluid and seminal fluid [53]. They identified similarities among several of them, like miRNA distribution in plasma and saliva, sign of existing exchanges between these two fluids. Amniotic fluid did not show resemblance with the other fluids tested, probably because of the filtration process occurring in the

placenta that limits the transport of molecules from the amniotic fluid to the rest of the body. Interestingly, the highest amounts of miRNA were found in tears. MiRNAs have also been detected in the synovial fluid (SF) of patients with arthritis [54].

Extracellular miRNAs are protected against enzymatic degradation by their inclusion in extracellular vesicles (exosomes, microparticles and apoptotic bodies), or their association with either RNA-binding proteins or lipoprotein structures [55]. Their stability allows them to be taken up by distant cells and therefore be involved in cell-to-cell communication. However, mechanisms controlling miRNA regulation and their release from cells are yet to be elucidated.

3. MiRNAs and the immune response

By the role they exert in the regulation of proliferation, maturation, differentiation and activation of immune cells, miRNAs are crucial for the function of both innate and adaptive immune systems [22,56–58]. The first evidence of miRNAs being involved in immune responses was reported in 2004, when Chen and his team identified 3 miRNAs (miR-142a, miR-181a and miR-223) expressed in specific mouse hematopoietic cells. They showed that the expression of these miRNAs is tightly regulated during hematopoiesis and lineage commitment, which allows them to efficiently participate in the control of immune system [59].

MiRNAs mode of action is highly efficient and versatile. Their capacity to induce rapid changes in gene expression makes them essential actors in the interplay between immune cells and pathogens [58,60,61]. Cells of the innate immune system, including granulocytes, monocytes and DCs, represent the first elements involved in the defense against invading microorganisms [62]. These cells express on their membrane pattern recognition receptors (PRRs) including toll-like receptors (TLRs), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), C-type lectin-like receptors (CLRs) and retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like-receptors (RLRs). PRRs can recognize and bind to a wide range of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which results in the triggering of intracellular signaling pathways that leads to the initiation of an inflammatory response [63,64]. Significant changes have been observed in the expression of various miRNAs in response to PAMPs or cytokines stimulation [65]. For example, lipopolysaccharide (LPS)-mediated inflammatory response is associated with the over-expression of miR-146a/b and miR-155, as well as miR-125b down-regulation in human monocytes. MiR-146 acts as a negative regulator of TLR4, TLR2 and TLR5 signaling pathways by inhibiting the translation of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) and IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) [66]. Antigens from bacteria and viruses can activate TLR4, TLR2, TLR3 or TLR9 on macrophages and induce an increase of miR-155 in these cells [66–68]. MiR-155 targets suppressor of cytokine signaling protein 1 (SOCS1), Fas-associated death domain protein (FADD), TNF receptor superfamily-interacting serine-threonine kinase 1 (Ripk1) and IkappaB kinase epsilon (IKKepsilon), which results in the up-regulation of TNF- α [67]. Moreover, this miRNA participates in the control of inflammatory cytokines production such as IL-1 β during DCs activation [69]. Like miR-146a, the expression of miR-155 is associated with DCs maturation [69–71]. Finally, miR-125b directly binds to TNF- α transcripts to inhibit their translation. The lower expression of this miRNA is therefore in accordance with elevated levels of TNF- α [68].

Evidence of miRNAs significance in adaptive immunity became apparent after experiments in which Dicer was conditionally inactivated in mice T and B lymphocytes, thereby disrupting miRNA synthesis [72]. In immature thymocytes, Dicer depletion results in aberrant T cells development with reduced T cells number both in thymus and peripheral lymphoid organs, followed by impaired T helper (Th) cells differentiation and cytokines production [72,73]. Dicer-deficient B cell progenitors undergo a blocking at the pro- to pre-B cell transition affecting antibody production and diversity [74]. MiR-146a

and miR-155 not only regulate innate immunity, they are also critical in the adaptive immune system. They represent two of the most studied miRNAs in autoimmune disorders like RA and illustrate the complex role of miRNAs in immune responses. Concerning miR-146a, an up-regulation of its expression has been observed in Th1, while it is down-regulated in Th2 cells [75]. MiR-146a shows high expression in regulatory T cells (Tregs) where it targets signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 and therefore regulates Tregs-mediated suppression of interferon (IFN)- γ production by Th1 [76]. Evidence shows that miR-146a knockout in mice leads to an increase of the transcription of genes regulated by NF- κ B, which in turns induces myeloid sarcomas and lymphomas development [77]. MiR-155 on the other hand targets c-maf, Pu.1 and activation-induced cytidine deaminase (AID), which are essential for lymphocyte homeostasis and normal function [78,79]. In miR-155 knockout mice, defective T- and B- mediated immunity is observed, including impaired Th1 and Th2 polarization with increased.

Th2 differentiation, lower number of Tregs cells, reduced germinal center response and decreased numbers of IgG class-switched cells [80–83].

Taken together, these data clearly illustrate the importance of miRNAs in the development of immune cells as well as in their function in innate and adaptive immune responses. Proper miRNAs expression is essential in order to avoid inappropriate inflammation or autoimmune reaction. Autoimmunity occurs when the immune system fails to recognize self antigens and trigger an immune response against them, which results in cellular and tissue damages [84]. Tolerance to auto-antigens is ensured by checkpoints in central and peripheral lymphoid organs. Under normal circumstances, these checkpoints induce the destruction or silencing of autoreactive T and B lymphocytes [85]. The persistence of self-reactive cells in peripheral lymphoid tissues can provoke the development of autoimmune diseases. Immune tolerance breakdown is in some cases the result of a deregulation of miRNAs expression [86]. For example, experiments on mice indicated that miR-146a knockout in Treg cells disrupted immune tolerance mechanisms, resulting in the development of immune disorders [76]. Depending on autoimmune diseases, distinct mechanisms can be involved with specific deregulated miRNA expression patterns.

4. JIA and miRNAs

Since 2007, the literature gathers numerous studies on miRNAs dysregulated in the blood and inflamed joints of RA patients, which is the most common form of arthritis in adulthood [26,56,87–89]. It was not until 2014 that the first studies identifying miRNAs with altered expression in patients with JIA were published [29]. Analyses were mainly performed on serum and plasma samples, as well as on mononuclear cells isolated from blood samples (Table 1). The following sections gathers data on miRNAs that are abnormally expressed in JIA, comparing them with results obtained on healthy donors and RA patients. The study of miRNAs deregulated in JIA and RA allow the identification of disturbed mechanisms shared by two different forms of rheumatic disorders, while miRNAs with impaired expression only in JIA samples reveal information on pathways specifically involved in JIA pathogenesis.

4.1. MiRNAs from body fluids

4.1.1. MiRNA markers in serum

Kamiya et al. performed a real-time RT-PCR to quantify the expression of miR-223, miR-146a, miR-155, miR-132 and miR-16 in the serum of children with sJIA, polyarticular JIA and healthy donors. Their aim was to investigate the potential of these circulating miRNAs as disease biomarkers that could replace invasive biopsy [90]. They showed that miR-223 is significantly up-regulated in sera of patients in the active phase of JIA compared to inactive phase and healthy

Table 1
List of miRNAs differentially expressed in JIA compared to healthy controls.

Localization	Up-regulation	Down-regulation
Serum Plasma	miR-223 [90] ^a miR-16 [98] miR-26a [98] ^a	miR-132 [98] ^a
	miR-146a [98] miR-145 [98]	miR-155 [98]
PBMC	miR-223 [98] miR-16 [117] ^a	miR-19a [108] miR-21 [108] ^a
	miR-99a [117] miR-100 [117] miR-125a [117]	miR-133a [117]
	miR-146a/b [108,117] ^a miR-150 [108,117] ^a miR-155 [29] ^a miR-181c [117] miR-223 [117] ^a	

^a Also abnormally expressed in rheumatoid arthritis.

controls. They also found that levels of miR-223 are correlated to erythrocyte sedimentation rate (ESR) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in polyarthritis, and associated to ESR in sJIA. As mentioned above, miR-223 has a crucial role in the regulation of the differentiation of myeloid cells. It has been reported that miR-223 is also elevated in RA sera compared to healthy donors and is involved in the differentiation of osteoclasts, therefore impacting on joint erosion [91]. Filkova and her team revealed that the high expression of miR-223 in the serum of RA patients is linked to C-reactive protein (CRP) levels [92]. Thus, in JIA as in RA, serum miR-223 levels are considered as potential biomarkers for disease activity [90,92].

Kamiya et al. also quantified miR-146a and miR-155 expression in JIA sera. As previously specified, these two miRNAs display important functions in the immune system. However, no significant difference was observed in the serum expression of these two miRNAs between JIA patients and healthy subjects [90]. MiR-155 expression levels were slightly higher in the serum of sJIA than in polyarticular serum. Moreover, a correlation was detected between serum miR-146a and MMP-3 in polyarticular JIA patients. Contrary to JIA, studies in RA sera have reported a higher expression of miR-155 in healthy controls than in RA patients [92,93]. MiR-155 as well as miR-146a concentrations in RA serum increase during disease progression and become significantly different in established RA compared to early cases of RA [92].

The quantification of miR-132 expression in JIA sera showed an increase in sJIA compared to polyarticular JIA. No significant changes were observed compared with healthy controls [90]. MiR-132 is known for its anti-inflammatory effect as it targets p300 transcriptional co-activator and inhibits the expression of IFN- β , Interferon-stimulated gene 15 (ISG15), Interleukin (IL)-1 β and IL-6 [94]. Kamiya et al. did not find any correlation between miR-132 and MMP-3 or ESR. Similar results were obtained in RA studies, with the same levels of miR-132 between patients and healthy individuals, as well as an absence of association between the expression of this miRNA and disease activity [92].

Finally, Kamiya et al. could not evidence differences in miR-16 expression between sJIA, polyarticular JIA and healthy donors [90]. However, they reported a mild correlation of miR-16 with MMP-3 in both forms of JIA. Among other functions, this miRNA is involved in apoptosis by targeting B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) [95]. It has also been studied in RA patients, where reports show that it targets TNF- α [96]. Serum levels of miR-16 in early RA are low and increase with the progression of disease [92]. Like miR-223 expression in serum, miR-16

level might be a predictor for disease outcome in case of RA [97].

4.1.2. MiRNA markers in plasma

Ma et al. quantified the expression of the five same miRNAs (miR-223, miR-146a, miR-155, miR-132 and miR-16) in the plasma of children suffering from oligoarticular JIA, polyarticular JIA, juvenile ankylosing spondylitis (JAS) as compared with healthy subjects [98]. Using a microarray analysis, they selected these miRNAs because of their differential expression between groups and performed a validation study using quantification by RT-qPCR. Their aim was to identify novel biomarkers for JIA that are correlated with specific disease characteristics. Analyses revealed an up-regulation of miR-16, miR-146a and miR-223 levels in oligo- and poly-arthritis compared to JAS and healthy donors. Moreover, miR-16 was more elevated in polyarticular JIA than in the oligoarticular subtype. Concerning miR-132 and miR-155, they were down-regulated in polyarthritis compared to JAS and healthy individuals. Results with oligoarthritis showed that miR-132 was under-expressed in JIA compared with controls and JAS, while miR-155 is higher in healthy donors and equally expressed in JAS and oligoarthritis.

Ma et al. also considered clinical variables and cytokine concentrations in order to evaluate the potential of plasma miRNAs as markers of JIA progression. They found that miR-16 expression levels correlate with Juvenile Arthritis Magnetic Resonance Imaging Score (JAMRIS) on the hip (JAMRIS-hip) and with the 27-joints Juvenile Arthritis Activity Score (JADAS-27). MiR-146a was correlated with JAMRIS-hip, the limited joint count (LTC) and the 10-joints/27-joints/71-joints JADAS (JADAS-10/27/71). Cytokines analysis indicated a positive correlation of plasma miR-16 and IL-6 concentration, while a negative correlation was observed between miR-146a and TNF- α . Down-regulation of TNF- α by miR-146a is well described, as this miRNA targets TRAF6 [66]. MiR-16 has been reported to modulate LPS-induced production of IL-6, IL-1 α and IL-8 via the targeting of silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor (SMRT) [96,99]. These results suggested that expression levels of miR-146a and miR-16 in JIA plasma might be considered as potential markers for disease activity. Ma et al. could not find any relevant correlation between biological or clinical parameters of patients and miR-155, miR-132 or miR-223 expression in plasma.

Studies in RA plasma did not show any difference between miR-16, miR-223 and miR-155 expression between RA patients and healthy subjects, while miR-132 has been reported to be down-regulated in RA plasma compared to controls [54]. There are some conflicting results concerning miR-146a expression in RA plasma. Murata et al. identified an equal expression between RA and controls [54], while Wang et al. demonstrated that miR-146a is more expressed in plasma samples of healthy subjects as compared to established RA [93]. This discrepancy can be explained by variations in type of samples, patients medical history, disease progression, as well as differences in the sensitivity of methods used for miRNAs quantification. Murata et al. also analyzed miRNAs expression profile in SF and they found similar levels of miR-155 in plasma and SF of RA patients, while miR-16, miR-223, miR-132 and miR-146a were up-regulated in their plasma. Concerning clinical variables, they identified an inverse correlation between tender joint counts (TJC) and plasma miR-16, miR-223, miR-146a and miR-155. Plasma miR-16 was also inversely correlated to disease activity score of 28 joints (DAS28) index. Contrary to their expectation, no correlation was observed between SF miRNAs expression and disease activity [54]. Like in JIA, the usefulness of plasma miR-16 as a biomarker for disease activity in RA is highlighted [87,98].

Using a microarray profiling followed by a RT-qPCR, Sun and his team selected 4 miRNAs (miR-26a, miR-145, miR-181a and miR-1237) differentially expressed between sJIA plasma and healthy controls [100]. They compared their expression levels to those from other rheumatic diseases in order to identify miRNAs specific of sJIA. Their results indicated that miR-26a and miR-145 were up-regulated in sJIA

plasma in comparison to healthy subjects as well as patients with JAS, systemic lupus erythematosus (SLE), Kawasaki disease (KD) and Henoch-Schönlein purpura (HSP). The two other miRNAs (miR-181a and miR-1237) had irregular expressions in the four rheumatic disorders and were not JIA-specific. Sun et al. were particularly interested in miR-26a expression as this miRNA was specifically up-regulated in sJIA plasma and less expressed in oligo- and poly-arthritis. MiR-26a is involved in the regulation of cell proliferation and differentiation [101]. It has an anti-inflammatory action as it inhibits osteoclast formation and it has been reported to reduce arthritis severity in rats by targeting TLR-3 on their macrophages [102,103]. High expression of this miRNA is also observed in RA plasma compared to controls [87]. Sun et al. hypothesized that miR-26a in the plasma could be a marker for inflammatory severity in sJIA patients as there is a positive correlation between its expression and IL-6 plasma levels. This cytokine is highly produced during peaks of fever that occur often in sJIA [104]. Concerning other clinical variables like ESR, CRP, TJC or swollen joint count (SJC), no correlation was observed in sJIA or RA patients [100,105].

Although miR-145 expression in JIA plasma was not studied in depth by Sun et al., their team showed that this miRNA is up-regulated in oligoarticular JIA compared to polyarticular JIA, sJIA and healthy controls [100]. A study on RA synovial fibroblasts showed that miR-145 targets semaphorin 3A (SEMA3A) and therefore promotes the positive action of VEGF on survival, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes [106]. Another report highlights the role of miR-145 in chondrocyte homeostasis regulation and describes the potential involvement of this miRNA in cartilage destruction in osteoarthritis (OA) [107]. These functions have not been however studied so far in the context of JIA.

4.2. Intracellular miRNAs

Studies have been conducted on miRNAs isolated from all peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in JIA patients. RT-qPCR analyses revealed that miR-21 and miR-19a levels are down-regulated in sJIA PBMC compared to healthy controls [108]. MiR-21 plays a key role in the triggering of inflammation and participates in the maturation and differentiation of T lymphocytes [109,110]. This miRNA down-regulates Bcl16 and promotes the activation of STAT3, which is a transcription factor involved in Th17 cells differentiation [111]. Studies in RA patients showed that miR-21 gene expression levels are also low [111]. They further indicated that the expression of STAT5 and phosphorylated STAT5 proteins decreased when STAT3 expression was activated. MiR-19a negatively regulates TNF- α and SOCS3 expression and increases IFN- α and STAT3 transduction [108,112]. The reduced expression of miR-19a in sJIA PBMC seems to be responsible for the high expression levels of SOCS3, TNF- α and IL-6 observed by Li et al. (2016). A report shows that miR-19a is down-regulated in RA synovial cells where it regulates TLR2 expression [112]. Altogether, Li et al. (2016) results indicate that miR-19a and miR-21 are involved in JAK/STAT signaling pathway and might participate in its activation [108].

Lashine et al. (2014) characterized miR-155 expression in PBMC of juvenile SLE, juvenile familial Mediterranean fever (FMF) and RF-positive polyarticular JIA patients. They observed an increase of miR-155 expression in JIA PBMC compared to healthy controls, while a down-regulation of this miRNA was identified in SLE and FMF patients in comparison to controls. It has previously been reported that miR-155 is a regulator of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) regulatory element binding protein (CREB) mRNA expression [113]. The activation of CREB increases protein phosphatase 2A (PP2Ac) levels. This protein is involved in several immune pathogenesis via the regulation of IL-2 and IL-17 levels [114,115]. However, Lashine et al. could not detect any significant difference between PP2Ac expression in JIA PBMC compared to healthy PBMC. MiR-155 expression level in JIA PBMC is comparable to the level in RA PBMC. Indeed, increased

concentrations are observed in both diseases compared to PBMC of healthy donors [116].

A study on miRNAs expression in blood monocytes revealed that miR-125a-5p and miR-181c are elevated in the active phase of sJIA compared to inactive sJIA and healthy controls [117]. Authors also analyzed miR-125a-5p in monocytes of polyarticular JIA patients and identified a low expression level, similar to the one in the inactive phase of sJIA. MiR-125a-5p and miR-181c are involved in monocytes polarization and regulate the expression of cytokine genes in macrophages [118,119]. Do and his team studied the effect of these two miRNAs on CD163, a scavenger receptor with anti-inflammatory function, which is expressed on myeloid cells [120,121]. Their results indicate that miR-181 family directly targets CD163 mRNA for degradation, while miR-125a-5p acts indirectly, by down-regulating IL-10 receptor subunit alpha (IL-10RA), which is necessary for IL-10-mediated expression of CD163. To our knowledge, these miRNAs have never been characterized in RA blood monocytes. However, a report shows that miR-125a-5p levels are increased in RA plasma and can activate NF- κ B signaling pathway in B cells [105,122]. MiR-181 has been studied in other autoimmune disorders like primary Sjögren syndrome, where an up-regulation is observed in patients PBMC [123], as well as in psoriasis cases, where a down-regulation of its expression in PBMC is identified [124].

Levels of miR-146a/b and miR-150 were quantified in sJIA monocytes [108,117]. Results indicate that their expressions are more elevated in sJIA than in controls PBMC. These microRNAs are well characterized in RA PBMC where they are up-regulated compared to healthy donors [125,126]. A study on CD14⁺ primary monocytes and human THP-1 cell line revealed that miR-146a induces a decrease in M1-type macrophage markers including IL-12, IL-6, CD86, TNF- α and iNOS, while it increases the expression of M2-type macrophage markers such as CCL12, CCL22, Arg1 and CD206 [108]. MiR-150 plays an important role in hematopoietic cell differentiation and regulates macrophages inflammatory response [127,128]. This non-coding gene has been shown to promote endothelial cells and monocytes migration by targeting CXCR4 [129,130]. Elevated levels of miR-146b and miR-150 in RA have been associated with infiltration of IL-17 cells, which exerts their pro-inflammatory role in the synovium [126].

Mir-16 and miR-223 are up-regulated in sJIA monocytes compared to controls [117]. MiR-16 has been reported to be associated with high levels of ferritin in sJIA patients. This miRNA is also over-expressed in RA PBMC where it is correlated to CRP values, ESR and TJC [92,116]. Concerning miR-223 expression in RA PBMC, it seemed to be moderately elevated [54]. This miRNA is often located in sites of inflammation as well as in peripheral circulation of RA patients [87].

Schulert and his team highlighted a difference of the expression of miR-99a, miR-100 and miR-133a between monocytes from patients with new-onset of sJIA and children with established sJIA, with a higher expression of miR-99 and miR-100 in active established arthritis and a down-regulation of miR-133a compared to controls [117]. They hypothesized that these miRNAs are involved in the immune dysregulation observed in sJIA. The literature shows that miR-99a and miR-99b target mTOR, which is involved in cell proliferation and differentiation [131]. By targeting bone morphogenetic protein receptor type II (BMPRII), miR-100 has been suggested to exert a negative effect on osteogenic differentiation [132]. MiR-99a and miR-100, both from the same miRNA family, have been reported to promote a Treg differentiation and to down-regulate Th17 polarization [133]. A study on RA and OA macrophages showed that the expression of miR-99a and miR-100 is higher in OA patients [134]. In the blood, miR-99 expression is slightly higher in RA patients than in healthy controls, while miR-100 reaches statistical difference and is over-expressed in RA blood [135]. Concerning miR-133a, an involvement in the regulation of inflammatory activation has been described [136]. Indeed, this work showed that the over-expression of miR-133a increases the cleavage of Caspase-1 p10 and IL-1 β p17. This cleavage is followed by the suppression of mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2). Moreover, this miRNA

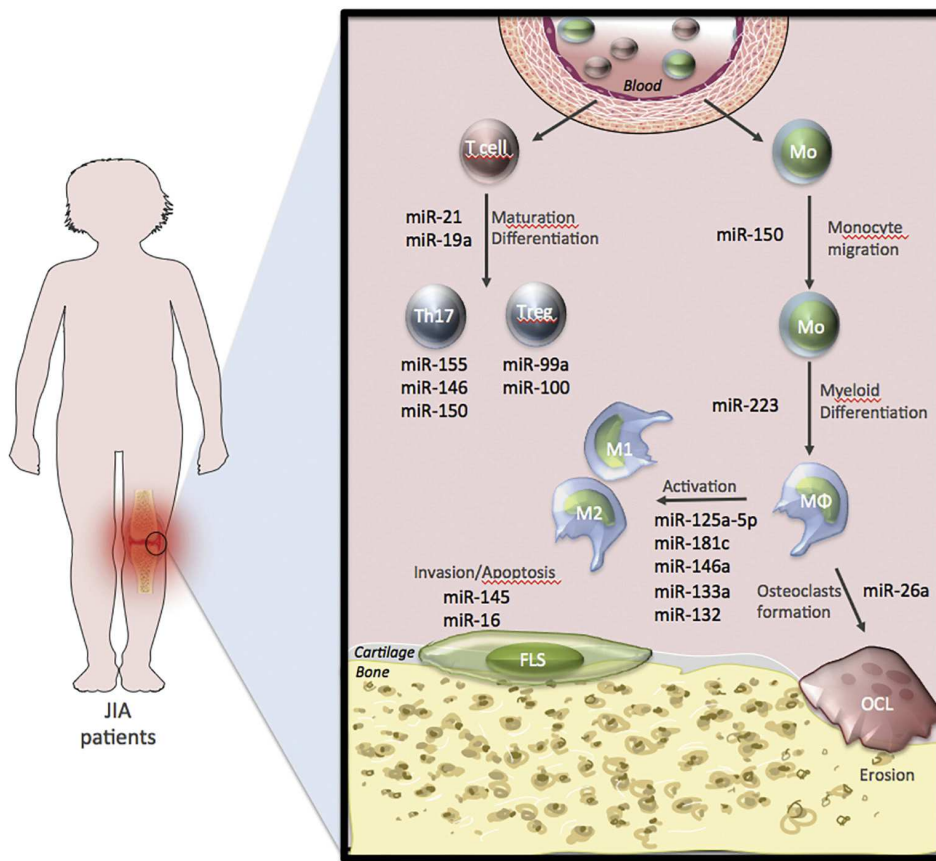


Fig. 1. Mechanisms targeted by miRNAs deregulated in JIA that might be involved in disease pathophysiology. Myeloid, lymphoid cells and fibroblast-like synoviocytes (FLS) are known to have a prominent role in JIA pathophysiology. Aberrant expression of miRNAs has an impact not only on the cells containing these non-coding genes, but also on surrounding cells. They can affect their functions and lead to imbalanced immune responses. MiR-21 and miR-19a participate in the maturation and differentiation of T lymphocytes. The down-regulation of their expression observed in JIA might lead to Th17 accumulation and thus to inflammatory reaction. Th17 polarization may be further promoted by the up-regulation of miR-155, miR-146 and miR-150, as their expression has been correlated to IL-17 levels. MiR-99a and miR-100 positively regulate Treg differentiation. Therefore, over expression of these miRNAs might impact Treg frequencies in JIA joints. Concerning monocytes, miR-150 and miR-223 target genes involved in their migration and differentiation. Their up-regulation in JIA might promote monocyte migration to the joints. The abnormal expression of miR-125a-5p, miR-181c, miR-146a, miR-133a and miR-132 might disturb the polarization of macrophages infiltrating JIA joints towards pro- versus anti-inflammatory activation, or apoptosis response. Up-regulation of miR-26a might reduce inflammation and osteoclast formation to counteract local pathogenic events. Finally, the over-expression of miR-145 and miR-16 may be involved in the survival, migration and invasion of FLS, as well as in their apoptosis.

targets Runt-related transcription factor 2 (Runx2), a protein essential for osteoblast differentiation and therefore bone formation [137]. MiR-133a is also down-regulated in fibroblasts isolated from OA than in RA [138]. Further studies aiming to determine the role of miR-99a, miR-100 and miR-133a in JIA and RA pathogenesis are required.

5. Conclusions

JIA includes a complex and heterogeneous group of childhood rheumatism involving immune impairments, many remaining to be elucidated. Studies have tried to characterize the pathophysiological mechanisms responsible for JIA. Over the past few years, reports on miRNAs in the immune system regulation have brought to light several pathways deregulated in autoimmune disorders. So far, JIA studies have investigated miRNAs levels in blood and shown that they represent potential indicators of early disease events. They might therefore be used as diagnosis biomarkers. Since modulation of miRNAs expression also reveals information concerning mechanisms responsible for disease development and progression, we have used miRNAs described in JIA blood to highlight pathways that might be involved in disease pathophysiology (Fig. 1).

This review highlights mechanisms shared by JIA and RA, with miRNAs commonly deregulated in these two rheumatic disorders. With miR-223 highly expressed in the serum of patients, impairing the differentiation of myeloid cells and leading to immune system deregulation, as well as miR-26a, which is up-regulated in plasma and regulates osteoclasts formation, two pathways responsible for the bone erosion observed in these diseases are potentially identified. The down-regulation of an anti-inflammatory miRNA such as miR-132 in JIA and RA

plasma participates to the exacerbated inflammation in the joints. T lymphocytes have been reported to play a key role in the pathogenesis of autoimmune disorders like JIA [139]. It is therefore not surprising to detect abnormal expression of miR-21 in JIA and RA PBMC, as it is a miRNA involved in the regulation of T cells maturation and differentiation. In the same manner, miR-155, miR-146 and miR-150, which are deregulated in JIA and RA PBMC, have been associated to IL-17 accumulation, a cytokine produced by Th17 cells. Impairments in monocyte functions are highlighted with the aberrant expression of miR-150 expression that deregulates their migration. Some miRNAs are correlated to disease activity and can thus be used as predictors of disease outcome. It is the case for miR-16 expression in the plasma and PBMC of patients, as well as miR-223 levels in serum and PBMC.

Interestingly, several miRNAs are only deregulated in JIA, while having similar expression in RA and healthy controls. Indeed, miR-16, miR-223 and miR-155 expression is the same in RA and healthy plasma, when miR-16 and miR-223 are increased in JIA, and miR-155 is down-regulated in comparison to controls. These miRNAs differentially expressed between two rheumatic diseases represent potential diagnosis biomarkers. Moreover, the identification of miRNAs with aberrant expression specifically in JIA patients will help to understand JIA pathophysiology. Indeed, this disorder involves mechanisms and consequences that are different from the adult form of arthritis as JIA patients have a maturing skeleton with incomplete ossification, as well as an immune system that is still undergoing modifications. Levels of miR-145 in JIA plasma, as well as miR-19a, miR-125a-5p, miR-181c, miR-99a, miR-100 and miR-133a in PBMC from JIA patients are deregulated. To our knowledge, the expression of these miRNAs has not been characterized in the same biological compartments for RA

patients. Therefore, data are insufficient to perform a comparison with JIA patients.

Not only are miRNAs essential for the understanding of the immune deregulation occurring in JIA and the diagnosis of this disease, they can also be useful for the prediction of the response to treatments and the development of therapies. However, further studies are needed to characterize miRNAs expression in JIA joints and elucidate their role in the pathogenesis of this disease. Moreover, before considering a therapeutic application, it is necessary to decipher molecular mechanisms and pathways regulated by these non-coding genes.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), the University of Montpellier, Arthritis R&D, and the university hospital of Montpellier.

References

- Prakken B, Albani S, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 2011;377:2138–49. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60244-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60244-4).
- Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. 369. London, England: *Lancet*; 2007. p. 767–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60363-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60363-8).
- Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, et al. International league of associations for rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004;31:390–2.
- Manners PJ, Bower C. Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? *J Rheumatol* 2002;29:1520–30.
- Prahalad S, Glass DN. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J* 2008;6:11. <https://doi.org/10.1186/1546-0096-6-11>.
- Rosen P, Thompson S, Glass D. Non-HLA gene polymorphisms in juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:650–6.
- Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 2011;32:470–7. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.001>.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:669–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953–64. <https://doi.org/10.1038/nri1733>.
- Gaur P, Myles A, Misra R, Aggarwal A. Intermediate monocytes are increased in enthesitis-related arthritis, a category of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Immunol* 2017;187:234–41. <https://doi.org/10.1111/cei.12880>.
- Macaubas C, Nguyen K, Deshpande C, Phillips C, Peck A, Lee T, et al. Distribution of circulating cells in systemic juvenile idiopathic arthritis across disease activity states. *Clin Immunol* 2010;134:206–16. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.09.010>.
- Smolewska E, Stańczyk J, Brózik H, Biernacka-Zielińska M, Cebula B, Robak T, et al. Distribution and clinical significance of blood dendritic cells in children with juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:762–8. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.077669>.
- Lotito APN, Campa A, Silva CAA, Kiss MHB, Mello SBV. Interleukin 18 as a marker of disease activity and severity in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2007;34:823–30.
- Gattorno M, Chicha L, Gregorio A, Ferlito F, Jarrossay D, et al. Distinct expression pattern of IFN-alpha and TNF-alpha in juvenile idiopathic arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:657–65. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ke1346>.
- Saxena N, Aggarwal A, Misra R. Elevated concentrations of monocyte derived cytokines in synovial fluid of children with enthesitis related arthritis and poly-articular types of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:1349–53.
- Varsani H, Patel A, van Kooyk Y, Woo P, Wedderburn LR. Synovial dendritic cells in juvenile idiopathic arthritis (JIA) express receptor activator of NF-kappaB (RANK). *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:583–90.
- Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:765–74. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200004\)43:4 < 765::AID-ANR7 > 3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200004)43:4 < 765::AID-ANR7 > 3.0.CO;2-B).
- Ronaghy A, de Jager W, Zonneveld-Huijssoon E, Klein MR, van Wijk F, Rijkers GT, et al. Vaccination leads to an aberrant FOXP3 T-cell response in non-remitting juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:2037–43. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.145151>.
- Kurahara DK, Grandinetti A, Fujii LLA, Tokuda AA, Galario JA, Han MJ, et al. Visiting consultant clinics to study prevalence rates of juvenile rheumatoid arthritis and childhood systemic lupus erythematosus across dispersed geographic areas. *J Rheumatol* 2007;34:425–9.
- Mauldin J, Cameron HD, Jeanotte D, Solomon G, Jarvis JN. Chronic arthritis in children and adolescents in two Indian health service user populations. *BMC Musculoskelet Disord* 2004;5:30. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-5-30>.
- Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012;4:143–59. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100209>.
- O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2012;30:295–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075013>.
- Bhanji RA, Eystathiou T, Chan EKL, Bloch DB, Fritzler MJ. Clinical and serological features of patients with autoantibodies to GW/P bodies. *Clin Immunol* 2007;125:247–56. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.07.016>.
- Vicente R, Noël D, Pers YM, Apparailly F, Jorgensen C. Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:211–20. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.162>.
- Ono S, Lam S, Nagahara M, Hoon DSB. Circulating microRNA biomarkers as liquid biopsy for cancer patients: Pros and cons of current assays. *J Clin Med* 2015;4:1890–907. <https://doi.org/10.3390/jcm4101890>.
- Duroux Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2012;64:11–20. <https://doi.org/10.1002/art.30651>.
- Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2008;58:1284–92. <https://doi.org/10.1002/art.23429>.
- Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1001–9. <https://doi.org/10.1002/art.23386>.
- Lashine YA, Salah S, Aboelenin HR, Abdelaziz AI. Correcting the expression of miRNA-155 represses PP2Ac and enhances the release of IL-2 in PBMCs of juvenile SLE patients. *Lupus* 2015;24:240–7. <https://doi.org/10.1177/0961203314552117>.
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:509–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- Neilson JR, Zheng GXY, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev* 2007;21:578–89. <https://doi.org/10.1101/gad.1522907>.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931–4. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>.
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 2008;9:839–45. <https://doi.org/10.1038/ni.f.209>.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003;35:215–7. <https://doi.org/10.1038/ng1253>.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:113–26. <https://doi.org/10.1038/nrm2104>.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007;448:83–6. <https://doi.org/10.1038/nature05983>.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415–9. <https://doi.org/10.1038/nature01957>.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17:3011–6. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>.
- Zhou X, Duan X, Qian J, Li F. Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* 2009;137:159–64. <https://doi.org/10.1007/s10709-009-9378-7>.
- Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 2008;30:460–71. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:9667–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703820104>.
- Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 2009;460:479–86. <https://doi.org/10.1038/nature08170>.
- Lin C-C, Liu L-Z, Addison JB, Wonderlin WF, Ivanov AV, Ruppert JM. A KLF4-miRNA-206 autoregulatory feedback loop can promote or inhibit protein translation depending upon cell context. *Mol Cell Biol* 2011;31:2513–27. <https://doi.org/10.1128/MCB.01189-10>.
- Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3193–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012464108>.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 2008;7:1545–9. <https://doi.org/10.4161/cc.7.11.6018>.
- Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2012;3:311–30. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>.
- Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:49–62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>.
- Kamm RC, Smith AG. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* 1972;18:519–22.

- [50] Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 2010;28:655–61. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2009.01.027>.
- [51] Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:703–11. <https://doi.org/10.1517/14712590902932889>.
- [52] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2009;15:5473–7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0736>.
- [53] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733–41. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>.
- [54] Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R86. <https://doi.org/10.1186/ar3013>.
- [55] Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating MicroRNAs. *Circ Res* 2012;110:483–95. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247452>.
- [56] Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* 2011;157:163–79. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.007>.
- [57] Tsioutsou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:514–20. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.05.003>.
- [58] Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009;136:26–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.027>.
- [59] Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83–6. <https://doi.org/10.1126/science.1091903>.
- [60] Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 2007;8:93–103. <https://doi.org/10.1038/nrg1990>.
- [61] Niwa R, Slack FJ. The evolution of animal microRNA function. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:145–50. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.02.004>.
- [62] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
- [63] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006;13:816–25. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>.
- [64] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1–14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>.
- [65] Gantier MP, Sadler AJ, Williams BRG. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol* 2007;85:458–62. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100091>.
- [66] Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12481–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>.
- [67] O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1604–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610731104>.
- [68] Tili E, Michaille J-J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007;179:5082–9.
- [69] Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2735–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811073106>.
- [70] Turner ML, Schnorfeil FM, Brocker T. MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function. *J Immunol* 2011;187:3911–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101137>.
- [71] Jin P, Han TH, Ren J, Saunders S, Wang E, Marincola FM, et al. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J Transl Med* 2010;8:4. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-4>.
- [72] Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, et al. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med* 2005;201:1367–73. <https://doi.org/10.1084/jem.20050572>.
- [73] Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, Livingston DM, Rao A, Rajewsky K. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* 2005;202:261–9. <https://doi.org/10.1084/jem.20050678>.
- [74] Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, Krek A, Chakraborty T, Kanellopoulou C, et al. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 2008;132:860–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.020>.
- [75] Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, Socci ND, Krichevsky AM, Thai T-H, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 2005;6:R71. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-r71>.
- [76] Lu L-F, Boldin MP, Chaudhry A, Lin L-L, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 2010;142:914–29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.012>.
- [77] Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D. NF- κ B dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:9184–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105398108>.
- [78] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007;316:608–11. <https://doi.org/10.1126/science.1139253>.
- [79] Thai T-H, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007;316:604–8. <https://doi.org/10.1126/science.1141229>.
- [80] Kohlhaas S, Garden OA, Scudamore C, Turner M, Okkenhaug K, Vigorito E. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J Immunol* 2009;182:2578–82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803162>.
- [81] Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, Gazumyan A, Thai T-H, Robbiani DF, et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 2008;28:630–8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.002>.
- [82] Calame K. MicroRNA-155 function in B cells. *Immunity* 2007;27:825–7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.010>.
- [83] Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 2007;27:847–59. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.009>.
- [84] Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* 2007;130:25–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.033>.
- [85] Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2001;1:147–53. <https://doi.org/10.1038/35100573>.
- [86] Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, et al. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 2008;205:1983–91. <https://doi.org/10.1084/jem.20080707>.
- [87] Churov AV, Oleinik EK, Knip M. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential. *Autoimmun Rev* 2015;14:1029–37. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.07.005>.
- [88] Singh RP, Massachi I, Manickavel S, Singh S, Rao NP, Hasan S, et al. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2013;12:1160–5. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.07.003>.
- [89] Chen JQ, Papp G, Szodoray P, Zeher M. The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2016;15:1171–80. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.003>.
- [90] Kamiya Y, Kawada J, Kawano Y, Torii Y, Kawabe S, Iwata N, et al. Serum microRNAs as Potential Biomarkers of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Rheumatol* 2015;34:1705–12. <https://doi.org/10.1007/s10067-015-2922-1>.
- [91] Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, Nagata Y, Ishikawa M, Deie M, et al. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. *Mod Rheumatol* 2013;23:674–85. <https://doi.org/10.1007/s10165-012-0710-1>.
- [92] Filková M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, et al. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1898–904. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202815>.
- [93] Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res* 2012;160:198–206. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.04.002>.
- [94] Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratix F, Fabiani M, Milne RSB, et al. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol* 2010;12:513–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2054>.
- [95] Jia X, Ouyang H, Abdalla BA, Xu H, Nie Q, Zhang X. miR-16 controls myoblast proliferation and apoptosis through directly suppressing Bcl2 and FOXO1 activities. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 2017;1860:674–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbaggm.2017.02.010>.
- [96] Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 2005;120:623–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.038>.
- [97] Dunaeva M, Blom J, Thurlings R, Pruijn GJM. Circulating serum miR-223-3p and miR-16-5p as possible biomarkers of early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2018;193:376–85. <https://doi.org/10.1111/cei.13156>.
- [98] Ma X, Wu F, Xin L, Su G, He F, Yang Y, et al. Differential plasma microRNAs expression in juvenile idiopathic arthritis. *Mod Rheumatol* 2015;26:1–9. <https://doi.org/10.3109/14397595.2015.1060663>.
- [99] Zhou R, Li X, Hu G, Gong A-Y, Drescher KM, Chen X-M, et al. PLoS One 2012;7:e30772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030772>.
- [100] Sun J, Feng M, Wu F, Ma X, Lu J, Kang M, et al. Plasma miR-26a as a diagnostic biomarker regulates cytokine expression in systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2016;43:1607–14. <https://doi.org/10.3899/jrheum.150593>.
- [101] Lee DH, Amanat S, Goff C, Weiss LM, Said JW, Doan NB, et al. Overexpression of miR-26a-2 in human liposarcoma is correlated with poor patient survival. *Oncogenesis* 2013;2:e47. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.10>.
- [102] Kim K, Kim JH, Kim I, Lee J, Seong S, Park Y-W, et al. MicroRNA-26a regulates RANKL-induced osteoclast formation. *Mol Cell* 2015;58:75–80. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.2241>.
- [103] Jiang C, Zhu W, Xu J, Wang B, Hou W, Zhang R, et al. MicroRNA-26a negatively regulates toll-like receptor 3 expression of rat macrophages and ameliorates pristane induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R9. <https://doi.org/10.1186/ar4435>.
- [104] Lin Y-T, Wang C-T, Gershwin ME, Chiang B-L. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev* 2011;10:482–9. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.02.001>.
- [105] Murata K, Furu M, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Hashimoto M, et al. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2013;8:e69118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069118>.
- [106] Hong B-K, You S, Yoo S-A, Park D, Hwang D, Cho C-S, et al. MicroRNA-143 and

- 145 modulate the phenotype of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med* 2017;49:e363 <https://doi.org/10.1038/emm.2017.108>.
- [107] Yang B, Kang X, Xing Y, Dou C, Kang F, Li J, et al. Effect of microRNA-145 on IL-1 β -induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett* 2014;588:2344–52. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.033>.
- [108] Li H-W, Xie Y, Li F, Sun G-C, Chen Z, Zeng H-S. Effect of miR-19a and miR-21 on the JAK/STAT signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Exp Ther Med* 2016;11:2531–6. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3188>.
- [109] Lu TX, Hartner J, Lim E-J, Fabry V, Mingler MK, Cole ET, et al. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 2011;187:3362–73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101235>.
- [110] Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell* 2010;39:493–506. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.023>.
- [111] Dong L, Wang X, Tan J, Li H, Qian W, Chen J, et al. Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Cell Mol Med* 2014;18:2213–24. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12353>.
- [112] Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibilia J, et al. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synovocytes. *J Immunol* 2012;188:454–61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102348>.
- [113] Christen V, Treves S, Duong FHT, Heim MH. Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis viruses up-regulates protein phosphatase 2A. *Hepatology* 2007;46:558–65. <https://doi.org/10.1002/hep.21611>.
- [114] Crispin JC, Apostolidis SA, Rosetti F, Keszsei M, Wang N, Terhorst C, et al. Cutting edge: protein phosphatase 2A confers susceptibility to autoimmune disease through an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 2012;188:3567–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200143>.
- [115] Katsiari CG, Kyttaris VC, Juang Y-T, Tsokos GC. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 2005;115:3193–204. <https://doi.org/10.1172/JCI24895>.
- [116] Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R101. <https://doi.org/10.1186/ar2493>.
- [117] Schuler G, Fall N, Harley JB, Shen N, Lovell DJ, Thornton S, et al. Monocyte MicroRNA expression in active systemic juvenile idiopathic arthritis implicates MicroRNA-125a-5p in polarized monocyte phenotypes. *Arthritis Rheum* 2016;68:2300–13. <https://doi.org/10.1002/art.39694>.
- [118] Banerjee S, Cui H, Xie N, Tan Z, Yang S, Icyuz M, et al. miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *J Biol Chem* 2013;288:35428–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426866>.
- [119] Xie W, Li M, Xu N, Lv Q, Huang N, He J, et al. MiR-181a regulates inflammation responses in monocytes and macrophages. *PLoS One* 2013;8:e58639 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058639>.
- [120] Do T, Tan R, Bennett M, Medvedovic M, Grom AA, Shen N, et al. MicroRNA networks associated with active systemic juvenile idiopathic arthritis regulate CD163 expression and anti-inflammatory functions in macrophages through two distinct mechanisms. *J Leukoc Biol* 2018;103:71–85. <https://doi.org/10.1002/JLB.2A0317-107R>.
- [121] Van Gorp H, Delpitte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* 2010;47:1650–60. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.02.008>.
- [122] Kim S-W, Ramasamy K, Bouamar H, Lin A-P, Jiang D, RCT Aguiar. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:7865–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200081109>.
- [123] Peng L, Ma W, Yi F, Yang Y-J, Lin W, Chen H, et al. MicroRNA profiling in Chinese patients with primary Sjögren syndrome reveals elevated miRNA-181a in peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol* 2014;41:2208–13. <https://doi.org/10.3899/jrheum.131154>.
- [124] Lövendorf MB, Mitsui H, Zibert JR, Røpke MA, Hafner M, Dyring-Andersen B, et al. Laser capture microdissection followed by next-generation sequencing identifies disease-related microRNAs in psoriatic skin that reflect systemic microRNA changes in psoriasis. *Exp Dermatol* 2015;24:187–93. <https://doi.org/10.1111/exd.12604>.
- [125] Abou-Zeid A, Saad M, Soliman E. MicroRNA 146a expression in rheumatoid arthritis: association with tumor necrosis factor-alpha and disease activity. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15:807–12. <https://doi.org/10.1089/gmb.2011.0026>.
- [126] Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:209. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-209>.
- [127] Manoharan P, Basford JE, Pilcher-Roberts R, Neumann J, Hui DY, Lingrel JB. Reduced levels of microRNAs miR-124a and miR-150 are associated with increased proinflammatory mediator expression in Krüppel-like factor 2 (KLF2)-deficient macrophages. *J Biol Chem* 2014;289:31638–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.579763>.
- [128] Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol* 2010;84:1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01348.x>.
- [129] Liu C-H, Sun Y, Li J, Gong Y, Tian KT, Evans LP, et al. Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:12163–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508426112>.
- [130] Tano N, Kim HW, Ashraf M. microRNA-150 regulates mobilization and migration of bone marrow-derived mononuclear cells by targeting Cxcr4. *PLoS One* 2011;6:e23114 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023114>.
- [131] Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, Warburton D. MIR-99a and MIR-99b modulate TGF- β induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. *PLoS One* 2012;7:e31032 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031032>.
- [132] Zeng Y, Qu X, Li H, Huang S, Wang S, Xu Q, et al. MicroRNA-100 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMPR2. *FEBS Lett* 2012;586:2375–81. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.049>.
- [133] Warth SC, Hoefig KP, Hiekel A, Schallenberg S, Jovanovic K, Klein L, et al. Induced miR-99a expression represses Mtor cooperatively with miR-150 to promote regulatory T-cell differentiation. *EMBO J* 2015;34:1195–213. <https://doi.org/10.15252/embj.201489589>.
- [134] Ogando J, Tardáguila M, Díaz-Alderete A, Usategui A, Miranda-Ramos V, Martínez-Herrera DJ, et al. Notch-regulated miR-223 targets the aryl hydrocarbon receptor pathway and increases cytokine production in macrophages from rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep* 2016;6:20223. <https://doi.org/10.1038/srep20223>.
- [135] Duroux-Richard I, Pers Y-M, Fabre S, Ammari M, Baeten D, Cartron G, et al. Circulating miRNA-125b is a potential biomarker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Mediat Inflamm* 2014;2014:342524. <https://doi.org/10.1155/2014/342524>.
- [136] Bandyopadhyay S, Lane T, Venugopal R, Parthasarathy PT, Cho Y, Galam L, et al. MicroRNA-133a-1 regulates inflammasome activation through uncoupling protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;439:407–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.056>.
- [137] Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13906–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804438105>.
- [138] Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, et al. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synovocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1294–304. <https://doi.org/10.1002/art.24475>.
- [139] Maggi L, Cosmi L, Simonini G, Annunziato F, Cimaz R. T cell subpopulations in juvenile idiopathic arthritis and their modifications after biotherapies. *Autoimmun Rev* 2016;15:1141–4. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.012>.

5. Projet de recherche

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à la forme la plus fréquente d'arthrite chez les enfants, à savoir l'AJI. Cette maladie représente un groupe hétérogène de rhumatismes inflammatoires chroniques qui touche 16 à 150 individus sur 100 000 en Europe. Cette pathologie est complexe et d'origine inconnue, ce qui ouvre tout un champ de recherche pour l'étude des mécanismes impliqués dans sa physiopathologie. Pour mieux comprendre les processus associés au développement et à l'évolution de cette maladie, j'ai cherché à caractériser les sous-populations de monocytes et de DCs ainsi que les profils d'expression des miARNs dans le sang périphérique et le LS des enfants atteints d'AJI. Ces différents marqueurs biologiques ont été choisis car ils jouent un rôle majeur à la fois dans la régulation de l'inflammation et la pathogénèse des maladies inflammatoires.

Les monocytes et DCs sont des cellules du système immunitaire inné et modulent la réponse inflammatoire via la production de différents médiateurs (type cytokines, chimiokines) et leur capacité à présenter les antigènes aux cellules de l'immunité adaptative. Tandis que de nombreuses études réalisées chez des patients adultes atteints de PR montrent l'implication de ces cellules, de leur distribution et de leur fonction (Coutant and Miossec, 2016; Smiljanovic et al., 2018), la littérature contient très peu de données chez les patients atteints d'AJI. Je me suis également intéressée aux miARNs pour l'impact qu'ils ont sur la régulation des gènes ainsi que sur le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ces petits fragments d'ARN non codants agissent de façon spécifique et peuvent induire des changements rapides de l'expression des gènes, ce qui fait d'eux des acteurs essentiels dans l'interaction entre les cellules immunitaires. Les premières études sur l'implication des miARNs dans l'AJI datent de 2014 et mettent en évidence des perturbations de leur expression dans le sang de patients comparé au sang de donneurs sains. Toutefois, aucune étude n'est publiée à ce jour sur la caractérisation de l'expression des miARNs au niveau du LS de patients AJI, les articulations étant pourtant le principal lieu de développement de la pathologie. Par ailleurs, les études de transcriptomique classique et miRNome réalisées chez les adultes montrent bien que le sang ne reflète pas toujours les événements qui se produisent au sein des articulations (Vicente et al., 2016).

Afin de mettre en évidence des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'AJI, et plus particulièrement d'adresser les mécanismes cellulaires et moléculaires au niveau des articulations, j'ai dans un premier temps inclus des patients atteints d'une autre forme d'arthrite juvénile, à savoir l'arthrite septique (AS). La ponction articulaire faisant partie intégrante de la prise en charge de ces deux pathologies pédiatriques, je me suis intéressée à l'AS en temps que contrôle pour l'étude de l'AJI afin de comparer les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans ces maladies qui ont des physiopathologies bien distinctes. En effet, tandis que l'AJI est un rhumatisme inflammatoire chronique d'origine inconnu, l'AS est définie par une prolifération intra-articulaire de bactéries libérant des enzymes protéolitiques et entraînant une inflammation des articulations suivie d'une destruction du cartilage. La contamination se fait principalement par voie hématogène avec deux germes majoritaires, à savoir *Staphylococcus aureus* et *Kingella kingae* (Lorrot et al. 2008). Cette dernière est responsable d'environ 75% des arthrites infectieuses touchant les enfants de moins de 2 ans. L'AS est une véritable urgence orthopédique car un retard dans le diagnostic peut entraîner des dommages articulaires irréversibles. L'incidence de cette maladie en France n'est pas connue, toutefois, une étude en Norvège a estimé qu'il existe environ 5 nouveaux cas sur 100 000 habitants par an (Riise et al., 2008).

Dans un second temps, j'ai effectué des études comparatives entre le sang et le LS des patients atteints d'AJI afin de rechercher des mécanismes spécifiques aux perturbations articulaires pouvant jouer un rôle dans le développement de la maladie.

D. Travaux personnels

1. Caractérisation des sous-populations de cellules myéloïdes dans l'AJI et l'AS juvénile

L'arthrite juvénile idiopathique (AJI) et l'arthrite septique (AS) sont les deux formes d'arthrite les plus fréquentes chez les enfants de moins de 16 ans. Tandis que l'AS est déclenchée par une infection bactérienne, l'AJI est d'origine inconnue et peu d'éléments sont décrits au sujet des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de cette maladie. Toutefois, dans les deux cas, l'immunité innée joue un rôle majeur dans le développement et l'évolution de la maladie. Mon intérêt s'est donc porté sur les monocytes et les cellules dendritiques (DCs) qui sont des acteurs majeurs du système immunitaire inné et ont un rôle important à jouer dans le dialogue avec les acteurs cellulaires de l'immunité adaptative. Mon objectif a été de caractériser finement les sous-populations de monocytes et DCs dans le sang et le liquide synovial de patients atteints d'AJI et de comparer avec des patients atteints d'AS pour rechercher des marqueurs spécifiques du contexte inflammatoire versus infectieux de ces 2 types de rhumatismes juvéniles. L'identification de différences au niveau du nombre de cellules et de leur profil d'activation avait pour objectif non seulement d'apporter des pistes utiles pour l'amélioration du diagnostic de ces maladies, mais également de comprendre les mécanismes physiopathologiques associés.

Une caractérisation phénotypique poussée des sous-populations de monocytes et de DCs a été effectuée par cytométrie de flux (Fortessa, 5 lasers, 15 couleurs, BD) sur du sang périphérique et du liquide synovial (LS) de patients AS (n = 8) et AJI (oligoarticulaire (n = 7) et liée à l'enthèse (n = 1)). L'analyse de la distribution et des profils d'activation des 3 sous-populations majeures de monocytes a porté sur les monocytes classiques (CD14⁺⁺CD16⁻), intermédiaires (CD14⁺⁺CD16⁺) et non classiques (CD14⁺CD16⁺⁺). Pour les DCs, 4 sous-populations ont été caractérisées : les 2 types de DCs conventionnels (cDCs) CD1c⁺ et CD141⁺, les DCs plasmacytoïdes CD123⁺ (pDCs) et les DCs inflammatoires CD14⁺ (InfDCs).

Enfin, une analyse plus globale de la distribution des granulocytes, des lymphocytes T et B ainsi que des NK a été réalisée au niveau des fluides biologiques des patients AS et AJI.

Mes résultats montrent d'une part que le LS discrimine mieux les deux pathologies que le sang périphérique, d'autre part que la majorité des sous-types cellulaires analysés sont en nombre plus important en cas d'AS. En effet, seuls les lymphocytes T, les pDCs et les cDCs CD141⁺ présentent une accumulation plus élevée au niveau du LS des enfants atteints d'AJI que d'AS, tandis que les trois sous-populations de monocytes et les granulocytes sont majoritairement présents au niveau des patients AS. Par ailleurs, l'étude des marqueurs d'activation a montré, dans le sang, une expression de HLA-DR plus importante au niveau des monocytes intermédiaires et non classiques des patients AJI, ainsi qu'à la surface des cDCs et des InfiDCs de ces enfants comparé aux AS. L'expression de CD64 ainsi que de PDL2 présentaient des taux plus élevés en cas d'AS.

Cette étude montre pour la première fois les résultats d'analyses comparant le profil de sous-populations de cellules immunitaires dans le LS d'enfants atteints d'AJI avec ceux ayant une AS. En effet, tous les résultats publiés à ce jour comparaient soit le sang de patients AJI avec le sang de donneurs sains, soit le LS de patients AJI avec le sang de ces mêmes patients. Les données obtenues mettent en évidence des différences au niveau de l'accumulation et de l'activation des cellules, apportant ainsi des pistes de biomarqueurs pour renforcer le diagnostic de ces deux formes d'arthrite. Enfin, les résultats soulignent l'implication des monocytes dans l'AS comme première ligne de défense contre les agents pathogènes, et montrent l'importance des cellules présentatrices d'antigènes comme les DCs dans l'AJI.

Differential accumulation of monocyte and dendritic cell subsets in inflamed synovial fluid discriminates between juvenile idiopathic arthritis and septic arthritis

Maïlys Cren^a, Nadège Nziza^{a,b}, Aurélia Carbasse^c, Perrine Mahe^c, Marion Delpont^d, Hugues Chevassus^e, Mirna Khalil^e, Thibault Mura^f, Isabelle Duroux-Richard^a, Florence Apparailly^{a,g*}, Eric Jeziorski^{c,1}, Pascale Louis-Plence^{a,1}

^a IRMB, INSERM, Université Montpellier, Montpellier, France.

^b Arthritis R&D, Neuilly sur Seine, France

^c CHU Montpellier, Pediatric Department, Université Montpellier, France.

^d CHU Montpellier, Pediatric Orthopedic Surgery Unit, Université Montpellier, France

^e CHU Montpellier, Centre d'Investigation Clinique, Université Montpellier, Montpellier, France.

^f CHU Montpellier, Department of Biostatistics, Université Montpellier, Montpellier, France

^g CHU Montpellier, Clinical department for osteoarticular diseases, Université Montpellier, Montpellier, France

*Corresponding author. Inserm U1183, IRMB, 80 rue Augustin Fliche, 34295 Montpellier cedex 05, France.

E-mail address: florence.apparailly@inserm.fr

¹These authors contributed equally to this work

Abbreviations

AAN anti-nuclear antibodies; AUC area under the curve; CCP cyclic citrullinated peptide; CRP C-reactive protein; DC dendritic cells; cDC conventional DC; InflDCs inflammatory DC; pDC plasmacytoid DC; FDR false discovery rate; JIA juvenile idiopathic arthritis; HLA human leucocyte antigen; MFI mean fluorescence intensities; NK natural killer; PB peripheral blood; PE phycoerythrin; SA septic arthritis; SF synovial fluid; RA rheumatoid arthritis; SLE systemic lupus erythematosus; ROC receiver operating curves; WBC white blood cells.

Abstract

Despite their distinct etiology, several lines of evidence suggest that innate immunity plays a pivotal role in both juvenile idiopathic arthritis (JIA) and septic arthritis (SA) pathophysiology. Indeed, monocytes and dendritic cells (DC) are involved in the first line of defense against pathogens and have a critical role in initiating and orchestrating the immune response.

The aim of this study was to compare the number and phenotype of monocytes and DCs in peripheral blood and synovial fluid samples from patients with JIA and SA to identify specific cell subsets and activation pathways associated with pathophysiology mechanisms that could be used as biomarkers to discriminate between these diseases.

The number of classical, intermediate and non-classical monocytes in the synovial fluid and the number of classical monocytes in peripheral blood tended to be higher in patients with SA than in those with JIA, although this difference was not significant. Moreover, whereas the number of conventional (cDC), plasmacytoid (pDC) and inflammatory (inflDC) DCs in blood was comparable between groups, the number of CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs in the synovial fluid was significant higher in patients with JIA than with SA. CD14⁺ inflDCs represented the major DC subset in the synovial fluid of both groups without significant difference. Finally, analysis of the activation of the different DC subsets showed higher expression of HLA-DR on CD1c⁺ cDCs and CD14⁺ inflDCs in blood of patients with JIA. Conversely, PDL2 expression in CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs from blood and in CD1c⁺ and CD141⁺ cDCs from synovial fluid was higher in patients with SA. Our results suggest that monitoring CD141⁺ cDC and CD123⁺ pDC numbers in synovial fluid and HLA-DR and/or PDL2 expression in DC subsets might help to discriminate between SA and JIA.

Keywords: Juvenile Idiopathic Arthritis, Septic Arthritis, Dendritic cells, CD141 cDC,
CD123 pDC,

1. Introduction

Septic arthritis (SA) and juvenile idiopathic arthritis (JIA) are the two most frequent arthritis types in childhood [1]. SA is a bacterial infection of a joint space, mostly caused by bacteremia in pediatric cases [2]. The main causative agent is *Staphylococcus aureus* in childhood, and *Kingella kingae* in infants and toddlers [3]; however, in most cases the infectious agent remains unknown. SA is an orthopedic emergency, and delay in diagnosis and treatment may result in irreversible joint damage. JIA is the most common chronic rheumatic disorder in childhood, and is classified in seven subtypes, depending on the number of affected joints, serological features, and systemic symptoms. Oligoarticular JIA is the most common subtype [4]. The exact etiology and pathophysiology of JIA remain unknown, but several genetic and environmental factors have been associated with this disorder [5].

Despite their distinct etiology, several lines of evidence suggest that the innate immunity plays a pivotal role in JIA and also SA pathophysiology. Dendritic cells (DCs) and monocytes are the main immune cells implicated in the innate immune response. They are involved in the first line of defense against pathogens and have a critical role in initiating and orchestrating the inflammatory response through the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. DCs are key players in initiating the immune response and maintaining tolerance. They sample antigens from the environment and present them as peptide-MHC complexes to effector T cells in lymphoid organs. In peripheral blood (PB), DCs are divided in three main subsets: two myeloid or conventional DCs (cDCs; BDCA1/CD1c⁺ cDCs and BDCA3/CD141⁺ cDCs), and plasmacytoid DCs (pDC) characterized by CD123 (IL-3R) expression. BDCA3/CD141⁺ cDCs predominantly respond to TLR3 ligands (including poly I:C) that trigger the production of CXCL-10/IP-10, CCL5, IFN- β and IFN- λ , and type III IFN with anti-viral properties. They also produce IL-12 upon co-stimulation by inflammatory cytokines. BDCA1/CD1c⁺ cDCs secrete a broader repertoire of proteins, including IL-1 β , IL-12, IL-6, TNF- α , CXCL8/IL-8, CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL-10 upon TLR3 stimulation [6-8]. On the other hand, pDCs selectively express endosomal TLR7 and TLR9 that detect nucleic acids from viruses, bacteria, and dead cells. TLR7 or TLR9 binding triggers a downstream signaling cascade that results in the

secretion of IFN- α , IFN- β [9] and IFN- λ [10, 11]. These three DC populations are found also in all lymphoid organs, and represent resident DCs. Previous studies showed a deficiency of blood DCs, particularly myeloid DCs and pDCs, in patients with JIA compared with healthy controls [12, 13]. Furthermore, low levels of blood pDCs in JIA are associated with poor treatment response [13]. Synovial fluid (SF) of inflamed joints also is enriched in myeloid DCs that strongly express maturation markers, suggesting that they might participate in the initiation and maintenance of inflammation [13]. A population of synovial inflammatory DCs (infDCs; CD1c⁺CD14⁺CD16⁻) has been identified in inflamed SF samples of patients with rheumatoid arthritis (RA) [14]. This subset differentiates from circulating monocytes recruited to the inflammation site, and plays a role in RA pathogenesis by inducing GM-CSF, IL-17 and IFN- γ production by CD4⁺ T cells [15].

Human PB monocytes are a heterogeneous cell population that includes classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺), and non-classical (CD14^{+/-}CD16⁺⁺) monocytes. They represent approximately 85%, 5%, and 7% of all blood monocytes, respectively [16]. Classical monocytes display high phagocytic activity, while non-classical cells are poorly phagocytic in vitro, and patrol healthy tissues through long-range crawling on the resting endothelium. This patrolling behavior is dependent on the integrins LFA-1 and ICAM1 and is required for rapid tissue invasion at the infection site in a CX3CR1-dependent manner [17]. After extravasation, non-classical patrolling monocytes rapidly differentiate into macrophages, and acquire tissue repair functions [18]. Classical monocytes are recruited to inflamed tissues in a CCR2-dependent manner, where they initiate the immune response and differentiate into infDCs [19]. This heterogeneity suggests specialized functions. Indeed, in vitro activation of highly purified non-classical monocytes by stimulation with TLR-7/8 results in increased release of IL-1 β and TNF- α cytokines. Conversely, purified classical monocytes respond more readily to TLR-2/4 activation by producing cytotoxic metabolites (ROS, NO) and pro-inflammatory cytokines, particularly IL-6 and IL-8 [20, 21]. CD14⁺⁺CD16⁺ intermediate monocytes exhibit an intermediate phenotype between classical and non-classical monocytes and play a major role in antigen presentation. In response to lipopolysaccharides, they mainly produce TNF- α and IL-1 β . Both intermediate and non-classical monocytes are increased in PB of children with sepsis

compared with healthy donors [22], and high numbers of intermediate monocytes are often observed in PB and SF of patients with autoimmune arthritis [23-26]. In active arthritis, the levels of pro-inflammatory cytokines are generally higher in SF than in PB [27].

Depending on their localization and the nature of stimuli, DCs and monocytes can undergo distinct modifications of their phenotype and function. As SA and JIA have different etiology (infectious condition and auto-reactive immune response, respectively), we hypothesized that variations in the number and/or activation status of myeloid cell subtypes could help to differentiate between these conditions. Indeed, some biological parameters (e.g., synovial leukocyte count and platelet numbers) differ significantly in SA and JIA, but there is a large overlap zone and none of them allows discriminating between these conditions [28]. As previous studies investigated the heterogeneity of PB and/or SF DC or monocyte subsets in JIA or SA always by comparing with healthy controls or patients with RA, but never between these rheumatic diseases, we performed an in-depth phenotypic characterization of DC and monocyte subsets in PB and SF samples of patients with SA and JIA to identify cell subsets that are associated with a pathophysiology mechanism and that could be used as disease-specific biomarkers.

2. Materials and methods

2.1 Patients

Children, aged from 6 months to 15 years, presenting with acute arthritis requiring arthrocentesis were included if they met the diagnostic criteria for JIA or SA. Patients with JIA fulfilled the International League of Associations for Rheumatology classification criteria and were prospectively recruited from the Pediatric Department at Montpellier University Hospital. Patients with systemic JIA, or who took steroids, biological therapy or disease-modifying anti-rheumatic drugs in the month preceding the arthrocentesis, and patients treated with antibiotics for more than 24h before arthrocentesis were excluded. Children with arthrocentesis contraindication (platelet count below 50 000/mm³, reduced prothrombin, prolonged activated partial thromboplastin time) were excluded. For patients with SA, disease was confirmed either bacteriologically after culture according to the French national guidelines, or using a specific PCR assay for *K. kingae*. Informed consent was obtained by all patients (their parents or guardians) in accordance with the procedures approved by the local human ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée I) (2014-A01561-46).

2.2 Laboratory assays

Total white blood cells (WBC) and platelets counts, C-reactive protein (CRP) dosage, antibody analyses, and medical records were collected as part of the routine diagnostic evaluation of JIA/SA at the Department of Immunology (CHU Montpellier).

2.3 Reagents

The V450-conjugated anti-CD3, Alexa Fluor[®]700-conjugated anti-CD3, BV650-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD4, BV605-conjugated anti-CD11b, BV421-conjugated anti-CD11c, BV650-conjugated anti-CD14, PE-CyTM7-conjugated anti-CD14, Alexa Fluor[®]700-conjugated anti-CD16, BV421-conjugated anti-CD16, PE-CF594-conjugated anti-CD16, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-

CD19, Alexa Fluor[®]700-conjugated anti-CD19, Alexa Fluor[®]700-conjugated anti-CD20, V500-conjugated anti-CD45, BV786-conjugated anti-NKp46, Alexa Fluor[®]700-conjugated anti-CD56, PE-conjugated anti-CD64, PE-CyTM7-conjugated anti-CD86, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD123, BV711-conjugated anti-CD141, BV786-conjugated anti-PDL2, and PECF594-conjugated anti-CD163 antibodies were from BD Biosciences. The APC-Cy7-conjugated anti-HLA-DR antibody was purchased from Beckman Coulter. The PE-conjugated anti-CD1c, APC-conjugated anti-CD303, and APC-conjugated anti-SLAN antibodies were from Miltenyi Biotech. The FITC-conjugated anti-CD192 antibody was purchased from R&D Systems. All antibodies were used according to their manufacturer's recommendations.

2.4 Flow cytometric immunophenotyping

Granulocytes, T and B lymphocytes and natural killer (NK) cells staining was performed using 50µl of fresh, heparin-treated whole blood and antibodies against CD4, CD45, CD3, CD19, CD16, and CD56. DCs (PDL2, CD141, CD14, CD11b, CD45, CD11c, CD4, CD123, CD86, CD16, CD3, CD19, CD20, CD56, HLA-DR, CD1c, CD303) and monocytes (NKp46, CD11b, CD45, CD16, CD14, CD163, CD64, HLA-DR, CD3, CD19, CD56, CD192, SLAN) were characterized using 300 µl of fresh, heparin-treated whole blood. After labeling with the relevant antibodies, erythrocytes were gently lysed by adding the EasyLyseTM solution (Dako). Synovial cell fractions were recovered by centrifugation (300g, 10min) of heparin-treated SF samples. One million cells from SF were stained using the same antibodies as for the whole blood samples after Fc receptor blocking with Fc Block (BD Biosciences).

For monocyte characterization, debris and doublets were excluded by SSC/FSC gating followed by selection of DAPI-negative CD45⁺ viable leucocytes. Contaminating granulocytes (HLA-DR^{neg}CD16^{high}) and lineage-positive cells (CD3, CD19 and CD56) were excluded from the monocyte gate. The three monocyte populations were gated within HLA-DR-positive cells. The percentage of classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical (CD14^{dim}CD16⁺) monocytes

are given within the gated monocytes, after exclusion of double negative cells. For DC characterization, cells were plotted according to their size and granularity followed by doublet exclusion. Lineage-negative cells were first selected, and then CD4 and HLA-DR double-positive cells were gated to delineate the two major DC subsets: cDCs (CD11c⁺⁺HLA-DR⁺⁺CD123^{low}CD1c⁺CD303⁻) and pDCs (CD11c^{low}HLA-DR⁺⁺CD123^{high}CD303⁺). Cell numeration was performed by addition of known numbers of fluorescent beads (Flow-CountTM Fluorosphere, Beckman Coulter) before cell acquisition. This allowed calculating the absolute cell number for each cell subsets. All data were acquired using a BD-LSR Fortessa Cell Analyzer (BD Biosciences). Color compensation analyses were performed using the DIVA software, and all data were analyzed with FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

2.5 Hierarchical Clustering Analyses

Cell counts and expression level of markers (mean fluorescence intensity, MFI) were analyzed using the Perseus software to perform non-supervised hierarchical clustering analysis [29]. The two-sided unpaired *t*-test was performed with a false discovery rate (FDR) cut-off of 5%. The selected markers were used to build the heatmaps.

2.6 Statistics

For each cell subset, data are presented as the mean \pm SEM of the total cell counts per milliliter of blood/SF and were compared using the Student's *t* or Mann Whitney test, according to their distribution. In parallel, data were compared using multivariate linear regression models to consider the age difference between groups. The capacity of markers to discriminate between JIA and SA was assessed using the receiver operating curve (ROC) analysis with estimation of the area under the curve (AUC) values [30]. As age was significantly different between patients with JIA and SA, the AUC value estimates were calculated only for parameters that remained significant after adjusted for age.

Analyses were performed with a bilateral alpha level of 0.05 using the SAS software, version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. Results

3.1 Clinical and biological parameters of children with arthritis

In total, we included 16 children (n= 7 with oligoarticular JIA, n=1 with enthesitis-related arthritis, and n=8 with SA caused by *K. kingae* infection) (Table 1). Children with SA were significantly younger than patients with JIA (1.1 ± 0.1 versus 8.9 ± 1.3). Therefore, when variables were significantly different between SA and JIA, we performed linear regression analyses with age-adjusted data. The age-adjusted analysis did not confirm the significant difference in WBC and platelet counts between groups (SA vs JIA), and only the age-adjusted CRP mean value remained different (Table 1).

3.2 Differential accumulation of T cells in patients with JIA compared with patients with SA

As previous works showed that WBC counts in PB or SF samples do not discriminate between JIA and SA [28], we quantified the main immune cell types in both body fluids by flow cytometry (Table 2). Our results revealed that B and NK cell numbers in PB were significantly higher in SA than in JIA samples, but not the age-adjusted values. In SF, T cell numbers were significantly higher (3-fold) in JIA than SA, while NK cell and granulocyte numbers were significantly higher (10-fold) in SA than in JIA. However, only the age-adjusted T cell counts in SF remained significantly different between groups.

3.3 Differences in monocyte and DC subsets discriminate between JIA and SA

To determine whether innate immune cells could better discriminate between patients with JIA and SA, we immunophenotyped the monocyte and DC subsets using multi-parametric flow cytometry. All

three main monocyte subsets (CD14⁺⁺CD16⁻ classical, CD14⁺⁺CD16⁺ intermediate, and CD14⁺CD16⁺⁺ non-classical) were present in PB samples, whereas non-classical monocytes were barely detectable in SF samples (Fig. S1). We could quantify CD1c⁺ and CD141⁺ cDCs, CD123⁺ pDCs, and CD14⁺ inflDCs in both fluids (Fig. S2).

Analysis of all cytometric data by non-supervised hierarchical clustering (Fig. 1A) clearly differentiated samples in two major clades that stratified patients in two groups (JIA and SA). Then, analysis using an FDR cut-off of 5% to include only cell counts that were differentially expressed between JIA and SA samples (Fig. 1B) showed a clear separation between SA and JIA using nine SF (black) and four PB (red) parameters, suggesting a pattern of disease-related changes mainly within joints. The counts of the majority of the immune cell subsets that discriminated between diseases (10/13) were higher in SA than in JIA samples. Indeed, only the counts of total T cells, CD123⁺ pDCs and CD141⁺ cDCs were higher in JIA than in SA SF samples. Overall, these data suggest that monocytes and granulocytes are over-represented in SA, while T cells and DCs are predominant in JIA.

Comparison of the data on the different monocyte subsets showed that in PB samples, only classical monocytes were significantly higher in SA than in JIA (Fig. 1C). In SF samples, all three monocyte subtypes were significantly higher in SA than JIA, suggesting their accumulation in this condition (Fig. 1D); however, the difference was not significant after age-adjusted analysis. The total count of monocytes (sum of all subsets) also was significantly higher in SA than in JIA (in PB samples: 231 ± 44 in JIA versus 431 ± 267 in SA, p=0.05; in SF samples: 225 ± 195 in JIA versus 3187 ± 4776 in SA, p<0.004); however, comparison of the age-adjusted values did not confirm this difference.

Although CD141⁺ cDCs were barely detectable in PB samples from both groups (Fig. S2), we could easily quantify them in SF samples from patients with JIA and their number was significantly higher than in patients with SA (Fig. 1E). Similarly, pDCs were significantly higher in SF samples from patients with JIA than with SA. As previously reported in adult forms of arthritis, CD14⁺ inflDCs were

barely detectable in PB samples from both groups, but represent the major DC subset in SF (Fig. S2). However, CD14⁺ inflDCs cell count was not different between groups. Altogether, these data demonstrated a significant accumulation of CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs in the SF of patients with JIA that was confirmed by comparison of the age-adjusted values (Table 3).

3.4 Specific activation markers on monocyte and DC subsets discriminate between SA and JIA

As monocytes and DCs regulate the T-cell responses against foreign and self-antigens, we analyzed their activation status by monitoring the expression levels of the co-stimulatory HLA-DR and CD86 and of the inhibitory PDL2 receptor in the four DC subsets, and of HLA-DR, CD163, SLAN, CD64 and CCR2 in the three monocyte subsets in PB and SF samples. Non-supervised hierarchical clustering analysis of the MFI data grouped samples in two major clades that stratified patients in JIA and SA (Fig. 2A). Analysis only of the MFI values that were significantly different between groups using an FDR cut-off of 5% (Fig. 2B) showed a clear separation between SA and JIA using 12 SF and 17 PB parameters. The majority of the activation markers that discriminated between diseases (19/29) was more strongly expressed in SA than in JIA, and included both monocyte and DC markers in both PB and SF. The ten markers with higher expression in JIA than SA were mostly activation markers expressed by circulating monocytes (SLAN and HLA-DR) and DCs (HLA-DR and CD86). Analysis of the differences (with FDR correction) in expression levels of activation markers in the monocyte subsets showed that CD64 expression in the three subsets was higher in SA than in JIA in both fluids (Fig. 2C). Conversely, SLAN expression was significantly increased in the three subsets in JIA compared with SA, but only in PB samples (Fig. 2D). However, the analysis with age-adjusted values did not confirm these differences. CCR2 and CD163 were similarly expressed in both JIA and SA groups (data not shown). The expression level of HLA-DR was significantly higher in intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes from PB and SF and in non-classical monocytes from PB samples of patients with JIA compared with those with SA. Conversely, HLA-DR expression was higher in non-classical monocytes from SF samples of patients with SA (Fig. 2E). Overall, expression of HLA-DR, SLAN and CD64 in monocyte subsets was different between JIA and SA; however, after age-

adjustment, only CD64 MFI in classical monocytes from SF samples remained significantly higher in SA than in JIA.

HLA-DR expression level in PB was significantly higher in CD1c⁺ and CD141⁺ cDCs, and in CD14⁺ infDCs in patients with JIA, whereas in SF it was significantly higher in CD1c⁺ cDCs and CD123⁺pDCs in patients with SA (Fig. 2F). The age-adjusted value confirmed the significant differences between groups for CD1c⁺ and CD14⁺ infDCs in blood (Table 3). CD86 expression was significantly increased in CD1c⁺, CD141⁺ cDCs and CD14⁺ infDCs from PB samples of patients with SA and in CD14⁺ infDCs from SF samples of patients with JIA (Fig. 2G). Analysis with age-adjusted values confirmed the significant difference of CD86 expression in CD141⁺ cDCs (Table 3). PDL2 expression level was significantly increased in all four DC subsets from SF and PB samples of patients with SA compared with JIA. The age-adjusted values confirmed the significant increased expression of PDL2 in CD141⁺ cDCs and CD123 pDCs in the PB and in CD1c⁺ and CD141⁺ cDCs in SF.

Overall, these data suggest that DC activation markers are increased in PB and SF, whereas the inhibitory PDL2 is decreased in patients with JIA compared with patients with SA.

3.5 pDC numbers and HLA-DR or PDL2 expression in DCs discriminate between JIA and SA

Among all the parameters (cell counts and MFI) that were significantly different between diseases after age-adjustment, seven biomarkers displayed an AUC value >0.95 in the ROC curve analysis (data not shown), suggesting that they could be used to discriminate between JIA and SA. In PB, they were: i) HLA-DR expression in CD14⁺ infDCs; and ii) PDL2 expression in CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs. In the SF, they were: i) PDL2 expression on CD1c⁺ and CD141⁺ cDCs; and ii) the number of CD123⁺ pDCs and T cells. These data suggest that monitoring DC subsets in SF samples and/or HLA-DR or PDL2 expression in DCs from PB or SF samples may be a convenient and rapid strategy to discriminate between diseases at diagnosis.

4. Discussion

Many different biomarkers can be used for the diagnosis of JIA subtypes, particularly the systemic forms [31]. Conversely, studies that compared the clinical and biological characteristics of JIA and SA are scarce, and they did not identify any reliable marker to discriminate between these diseases [28, 32]. The present study is the first through comparison of various immune cell subsets in two different body fluids from patients with these two juvenile arthritic forms. Our results show that monitoring the phenotype and activation status of DC and monocyte subsets allows discriminating between SA and JIA.

As WBC counts in PB and SF are not sufficient to discriminate between SA and JIA [28], we first quantified T, B, NK cells and granulocytes in these body fluids. Our results showed that in SF samples, the mean number of granulocytes was 10-fold higher in patients with SA than with JIA, and the mean count of T cells was 3-fold higher in patients with JIA than with SA. Massive granulocytes recruitment in the inflammatory site was previously reported in patients with sepsis [33]; however, in our study, the multivariate linear regression model analysis with age-adjusted values confirmed only the T cell increase in JIA. It was previously reported that in JIA, activated T cells accumulate in the synovial membrane, forming clusters around antigen-presenting cells (e.g., DCs) [34, 35], and might trigger the autoreactive immune response. However, the large overlap between values in SA and JIA does not allow using them as diagnostic markers. Therefore, we immunophenotyped the main monocyte and DC subsets. We found that all three monocyte subsets were increased in SF, but only classical monocytes in PB samples of patients with SA compared with JIA. These results were not confirmed by the age-adjusted analyses. Conversely, the accumulation of CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs in the SF of patients with JIA was confirmed also after adjustment for age.

The expansion of both intermediate and non-classical monocytes was previously observed in PB of patients with juvenile sepsis [22]. Moreover, CD16⁺ monocytes are increased in various infectious and

inflammatory diseases (e.g., AIDS, asthma, chronic infections, notably sepsis) [36], as well as in metabolic and autoimmune disorders (e.g., obesity, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis) [21]. Our study did not find any difference in the number of intermediate and non-classical monocytes in PB samples. Conversely, they accumulated in the SF of patients with SA compared with JIA. Moreover, in PB, HLA-DR expression in these CD16⁺ subsets was reduced in SA, as previously described in sepsis [37, 22], and was associated with higher CD64⁺ expression. Higher HLA-DR expression in synovial intermediate monocytes was also observed in patients with enthesitis-related JIA [24], in agreement with our results. CD64 is a high-affinity Fc γ RI receptor with restricted isotype-specificity that is expressed on macrophages, monocytes, neutrophils, and eosinophils. A previous study suggested that CD64 expression on monocytes could be used to assess the IFN type I status in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) [38], and could be included in the diagnostic work-up of sepsis and infection in adults [39-41], and in children [42-44]. Consistent with the study by Hofer et al that described SLAN as a marker of CD16⁺ monocyte subsets in PB [45], we found that SLAN was mainly expressed in blood CD16⁺ monocytes, particularly in JIA. Interestingly, in SF samples, SLAN expression was comparable in all monocyte subsets and between diseases. The analysis after adjustment for age, confirmed the higher expression of CD64 in blood monocytes in SA, but not of HLA-DR and SLAN in JIA.

In blood, we did not observe any significant difference in the count of the three main DC subsets between forms of juvenile arthritis. This is consistent with the recent study by Thom et al. showing no PBMC difference in treatment-naïve patients with JIA and matched controls using mass cytometry [46]. Conversely, in SF, we observed a significant accumulation of CD141⁺ cDCs and pDCs in JIA compared with SA, as previously reported when comparing with PB [13]. Maturation of blood DCs was demonstrated by the significant upregulation of HLA-class II molecules in the two conventional myeloid subsets and in CD14⁺ inflDCs in JIA compared with SA. Moreover, CD86 co-stimulatory molecules were upregulated in CD141⁺ cDCs in SA PB and in CD14⁺ inflDCs in SF samples of patients with JIA. These results highlight the potent activation of CD14⁺ inflDCs in SF of patients with JIA and their potential role in sustaining the autoimmune response. They also suggest that DC

maturation might be different in SA and JIA, leading to substantial functional heterogeneity in the T-cell response polarization. Blood CD141⁺ DCs excel at cross-presentation of cellular antigens, immune complexes and antigens specifically targeted to late endosomes. This DC subset can polarize CD4⁺ T cells towards the Th1 phenotype, particularly after TLR3 binding, and induces Th2 polarization more potently than CD1c⁺ cDCs. A recent study reported that in the inflamed synovial joint of patients with RA, CD141⁺ cDCs are significantly enriched, can activate CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and contribute to the synovial joint inflammation [47]. Conversely, pDCs, in which MHC class II and co-stimulatory molecules are expressed at lower level, are less efficient at priming T cells [48]. In addition, pDCs can induce tolerogenic immune responses by inducing regulatory T cells [49- 52], and their increase is associated with RA remission [53]. Tissue infiltration by pDCs has been described in skin lesions of patients with SLE, psoriasis, and systemic sclerosis [54, 55], in the salivary glands of patients with Sjögren's disease [56], and in muscle and skin of patients with juvenile dermatomyositis [57]. In these autoimmune diseases, CD123⁺ pDCs are the major source of type I IFN and are implicated in inflammation initiation and in the transition to chronic disease [58, 59].

Finally, we found that PDL2 expression was significantly increased in all four DC subsets isolated from SF and PB samples of patients with SA compared with JIA. As all enrolled patients with SA had *K. kingae* infection, we cannot exclude that our results may be pathogen-specific. Therefore, the analysis of new patients with infection by other bacteria, for instance *S. aureus*, will be necessary to extend our results. Although it was initially thought that PDL2 expression was restricted to antigen-presenting cells, such as macrophages and DCs [60], recent findings have shown that its expression can be induced in many immune and non-immune cell types, depending on the micro-environmental stimuli [61-64]. Particularly, PDL2 expression is increased in circulating monocytes and CD4⁺ T lymphocytes in patients with septic shock [65]. PDL2 expression is regulated mainly through the NF- κ B and signal transducer and activator of transcription-6 (STAT-6) pathways [66, 67]. The most potent PDL2 inducers are Th2 cytokines, particularly IL-4. The increased PDL2 expression on all DC subsets in SA suggests a feed-back mechanism of T-cell activation because PDL2/PD-1 interaction results in the suppression of TCR-induced PI3K/AKT activation and the subsequent reduction of T-

cell survival, cytokine production, and proliferation. Overall, these data show that in PB and SF samples of patients with JIA, the expression of DC activation markers is differentially modulated, while that of the inhibitory PDL2 molecule is decreased, compared with patients with SA.

In summary, infectious and autoimmune diseases have often been associated with altered monocyte or DC numbers, suggesting their pathogenic role in these pathologies. Our results indicate the involvement of monocytes as the first line of defense against pathogens in *K. kingae* SA, and suggest a DC role in the polarization of the T-cell immune response in JIA. The functional consequences of the differential activation of monocytes and DCs in these diseases need to be further investigated.

5. Conclusion

Overall, our study shows that, independently of patients age, both monocyte and DC (particularly, CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs) numbers might be used to discriminate SA and JIA, but only in SF. Conversely, activation markers could be monitored in both PB (HLA-DR expression on CD14⁺ infDCs, CD86 expression on CD141 cDCs, and PDL2 expression on CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs) and SF (PDL2 expression on CD1c⁺ and CD141⁺ cDCs). In conclusion, our study contributes to the identification of new markers to discriminate between JIA and SA that may help clinical decision-making.

Declarations of interest

none

Authors contributions

M.C. performed the phenotypic experiments and analyses, discussed results and contributed to the study design. A.C., P.M., M.D. and E.J. recruited patients and discussed the results. H.C. and M.K. procured samples and discussed the results. N.N., F.A., P.L-P. discussed the results and contributed to the study design. T.M. performed the statistical analyses and discussed the results. I.D-R performed the HC analyses and discussed the results. P.L-P, F.A. and E.J. conceived the study, discussed the results, and wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by institutional funding from Inserm and University of Montpellier, by funding from Fondation de l'Avenir (N°AP-RMA-16-033), CHU Montpellier (AOI ARTEMIS UF9361-2 to EJ). N.N. received a fellowship from Arthritis R&D (convention Cifre N° 2015/1454) and ANRT (Association Nationale Recherche Technologie).

Acknowledgments

We thank the EcellFrance national infrastructure (N° 11-INBS-0005) for expertise in flow cytometry and for providing the LSR Fortessa cytometer. We thank P. Portales from the Department of Immunology for providing biological routine data and for helpful discussion, and we also thank all the nurses and clinical staff for technical help. We extend special thanks to the patients who participated in this study.

References

- [1] C. Aupiais, B. Ilharreborde, C. Doit, A. Blachier, M. Desmarest, C. Job-Deslandre, K. Mazda, A. Faye, S. Bonacorsi, C. Alberti, M. Lorrot, Aetiology of arthritis in hospitalised children: an observational study, *Arch. Dis. Child.* 100 (2015) 742–747. doi:10.1136/archdischild-2014-307490.
- [2] C. Wall, L. Donnan, Septic arthritis in children, *Aust. Fam. Physician.* 44 (2015) 213–215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25901405> (accessed June 28, 2018).
- [3] M. Al-Qwbani, N. Jiang, B. Yu, *Kingella kingae*-Associated Pediatric Osteoarticular Infections: An Overview of 566 Reported Cases, *Clin. Pediatr. (Phila).* 55 (2016) 1328–1337. doi:10.1177/0009922816629620.
- [4] R.E. Petty, T.R. Southwood, P. Manners, J. Baum, D.N. Glass, J. Goldenberg, X. He, J. Maldonado-Cocco, J. Orozco-Alcala, A.-M. Prieur, M.E. Suarez-Almazor, P. Woo, I.L. of A. for International League of Associations for Rheumatology, International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001, *J. Rheumatol.* 31 (2004) 390–392. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760812> (accessed June 22, 2018).
- [5] B. Prakken, S. Albani, A. Martini, Juvenile idiopathic arthritis, *Lancet.* 377 (2011) 2138–2149. doi:10.1016/S0140-6736(11)60244-4.
- [6] C. Hémond, A. Neel, M. Heslan, C. Braudeau, R. Josien, Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness, *J. Leukoc. Biol.* 93 (2013) 599–609. doi:10.1189/jlb.0912452.
- [7] S.L. Jongbloed, A.J. Kassianos, K.J. McDonald, G.J. Clark, X. Ju, C.E. Angel, C.-J.J. Chen, P.R. Dunbar, R.B. Wadley, V. Jeet, A.J.E. Vulink, D.N.J. Hart, K.J. Radford, Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 1247–1260. doi:10.1084/jem.20092140.
- [8] H. Lauterbach, B. Bathke, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, C.A. Lubber, G. Fejer, M.A. Freudenberg, G.M. Davey, D. Vremec, A. Kallies, L. Wu, K. Shortman, P. Chaplin, M. Suter, M. O’Keeffe, H. Hochrein, Mouse CD8 α + DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN- λ in response to poly IC., *J. Exp. Med.* 207 (2010) 2703–17. doi:10.1084/jem.20092720.
- [9] T.S.M.M. Mathan, C.G. Figdor, S.I. Buschow, Human Plasmacytoid Dendritic Cells: From Molecules to Intercellular Communication Network, *Front. Immunol.* 4 (2013) 372.

doi:10.3389/fimmu.2013.00372.

- [10] Z. Yin, J. Dai, J. Deng, F. Sheikh, M. Natalia, T. Shih, A. Lewis-Antes, S.B. Amrute, U. Garrigues, S. Doyle, R.P. Donnelly, S. V Kotenko, P. Fitzgerald-Bocarsly, Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells, *J. Immunol.* 189 (2012) 2735–2745. doi:10.4049/jimmunol.1102038.
- [11] E.M. Coccia, M. Severa, E. Giacomini, D. Monneron, M.E. Remoli, I. Julkunen, M. Cella, R. Lande, G. Uzé, Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and λ interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 34 (2004) 796–805. doi:10.1002/eji.200324610.
- [12] C. Macaubas, K. Nguyen, C. Deshpande, C. Phillips, A. Peck, T. Lee, J.L. Park, C. Sandborg, E.D. Mellins, Distribution of circulating cells in systemic juvenile idiopathic arthritis across disease activity states, *Clin. Immunol.* 134 (2010) 206–16. doi:10.1016/j.clim.2009.09.010.
- [13] E. Smolewska, J. Stańczyk, H. Brózik, M. Biernacka-Zielińska, B. Cebula, T. Robak, P. Smolewski, Distribution and clinical significance of blood dendritic cells in children with juvenile idiopathic arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 67 (2008) 762–8. doi:10.1136/ard.2007.077669.
- [14] E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiocchia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, S. Amigorena, Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation, *Immunity.* 38 (2013) 336–348. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.018.
- [15] G. Reynolds, J.R. Gibbon, A.G. Pratt, M.J. Wood, D. Coady, G. Raftery, A.R. Lorenzi, A. Gray, A. Filer, C.D. Buckley, M.A. Haniffa, J.D. Isaacs, C.M.U. Hilkens, Synovial CD4+ T-cell-derived GM-CSF supports the differentiation of an inflammatory dendritic cell population in rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 75 (2016) 899–907. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206578.
- [16] K.L. Wong, J.J.-Y. Tai, W.-C. Wong, H. Han, X. Sem, W.-H. Yeap, P. Kourilsky, S.-C. Wong, Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets, *Blood.* 118 (2011) e16-31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355.
- [17] L.M. Carlin, E.G. Stamatides, C. Auffray, R.N. Hanna, L. Glover, G. Vizcay-Barrena, C.C. Hedrick, H.T. Cook, S. Diebold, F. Geissmann, Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal, *Cell.* 153 (2013) 362–75. doi:10.1016/j.cell.2013.03.010.
- [18] C. Auffray, D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, F. Geissmann, Monitoring of blood vessels and tissues by a population of

monocytes with patrolling behavior., *Science*. 317 (2007) 666–70.
doi:10.1126/science.1142883.

- [19] F. Geissmann, S. Jung, D.R. Littman, Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties, *Immunity*. 19 (2003) 71–82.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871640> (accessed June 28, 2018).
- [20] J. Cros, N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.-Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S.K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.-P. Jais, D. D’Cruz, J.-L. Casanova, C. Trouillet, F. Geissmann, Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors, *Immunity*. 33 (2010) 375–86. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012.
- [21] K.L. Wong, W.H. Yeap, J.J.Y. Tai, S.M. Ong, T.M. Dang, S.C. Wong, The three human monocyte subsets: implications for health and disease, *Immunol. Res.* 53 (2012) 41–57.
doi:10.1007/s12026-012-8297-3.
- [22] J. Skrzeczynska, K. Kobylarz, Z. Hartwich, M. Zembala, J. Pryjma, CD14⁺CD16⁺ Monocytes in the Course of Sepsis in Neonates and Small Children: Monitoring and Functional Studies, *Scand. J. Immunol.* 55 (2002) 629–638. doi:10.1046/j.1365-3083.2002.01092.x.
- [23] B. Smiljanovic, A. Radzikowska, E. Kuca-Warnawin, W. Kurowska, J.R. Grün, B. Stuhlmüller, M. Bonin, U. Schulte-Wrede, T. Sörensen, C. Kyogoku, A. Bruns, S. Hermann, S. Ohrndorf, K. Aupperle, M. Backhaus, G.R. Burmester, A. Radbruch, A. Grützkau, W. Maslinski, T. Häupl, Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint, *Ann. Rheum. Dis.* 77 (2018) 300–308. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211649.
- [24] P. Gaur, A. Myles, R. Misra, A. Aggarwal, Intermediate monocytes are increased in enthesitis-related arthritis, a category of juvenile idiopathic arthritis, *Clin. Exp. Immunol.* 187 (2017) 234–241. doi:10.1111/cei.12880.
- [25] B.R. Yoon, S.-J. Yoo, Y. ho Choi, Y.-H. Chung, J. Kim, I.S. Yoo, S.W. Kang, W.-W. Lee, Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA), *PLoS One*. 9 (2014) e109775. doi:10.1371/journal.pone.0109775.
- [26] M. Rossol, S. Kraus, M. Pierer, C. Baerwald, U. Wagner, The CD14^{bright} CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 671–677. doi:10.1002/art.33418.
- [27] W. de Jager, E.P.A.H. Hoppenreijns, N.M. Wulffraat, L.R. Wedderburn, W. Kuis, B.J. Prakken, Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study, *Ann. Rheum. Dis.* 66 (2007) 589–98. doi:10.1136/ard.2006.061853.

- [28] C. Aupiais, R. Basmaci, B. Ilharreborde, A. Blachier, M. Desmarest, C. Job-Deslandre, A. Faye, S. Bonacorsi, C. Alberti, M. Lorrot, Arthritis in children: comparison of clinical and biological characteristics of septic arthritis and juvenile idiopathic arthritis., *Arch. Dis. Child.* 102 (2017) 316–322. doi:10.1136/archdischild-2016-310594.
- [29] S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M.Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, J. Cox, The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data, *Nat. Methods.* 13 (2016) 731–740. doi:10.1038/nmeth.3901.
- [30] J.A. Hanley, B.J. McNeil, The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve, *Radiology.* 143 (1982) 29–36. doi:10.1148/radiology.143.1.7063747.
- [31] F. Gohar, C. Kessel, M. Lavric, D. Holzinger, D. Foell, Review of biomarkers in systemic juvenile idiopathic arthritis: helpful tools or just playing tricks?, *Arthritis Res. Ther.* 18 (2016) 163. doi:10.1186/s13075-016-1069-z.
- [32] J.C. Nguyen, K.S. Lee, M.M. Thapa, H.G. Rosas, US Evaluation of Juvenile Idiopathic Arthritis and Osteoarticular Infection, *RadioGraphics.* 37 (2017) 1181–1201. doi:10.1148/rg.2017160137.
- [33] J.C. Alves-Filho, F. Spiller, F.Q. Cunha, Neutrophil paralysis in sepsis, *Shock.* 34 (2010) 15–21. doi:10.1097/SHK.0b013e3181e7e61b.
- [34] A. Gregorio, C. Gambini, V. Gerloni, A. Parafioriti, M.P. Sormani, S. Gregorio, G. De Marco, F. Rossi, A. Martini, M. Gattorno, Lymphoid neogenesis in juvenile idiopathic arthritis correlates with ANA positivity and plasma cells infiltration, *Rheumatology.* 46 (2006) 308–313. doi:10.1093/rheumatology/kel225.
- [35] L.R. Wedderburn, N. Robinson, A. Patel, H. Varsani, P. Woo, Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 765. doi:10.1002/1529-0131(200004)43:4<765::AID-ANR7>3.0.CO;2-B.
- [36] M.B. Ka, D. Olive, J.-L. Mege, Modulation of monocyte subsets in infectious diseases, *World J. Immunol.* 4 (2014) 185. doi:10.5411/wji.v4.i3.185.
- [37] O. Kim, A. Monsel, M. Bertrand, P. Coriat, J.-M. Cavillon, M. Adib-Conquy, Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation, *Crit. Care.* 14 (2010) R61. doi:10.1186/cc8959.
- [38] Y. Li, P.Y. Lee, E.S. Kellner, M. Paulus, J. Switanek, Y. Xu, H. Zhuang, E.S. Sobel, M.S. Segal, M. Satoh, W.H. Reeves, Monocyte surface expression of Fcγ receptor RI (CD64),

- a biomarker reflecting type-I interferon levels in systemic lupus erythematosus., *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R90. doi:10.1186/ar3017.
- [39] S. Tanaka, J. Nishino, T. Matsui, A. Komiya, K. Nishimura, S. Tohma, Neutrophil CD64 expression in the diagnosis of local musculoskeletal infection and the impact of antibiotics, *J. Bone Joint Surg. Br.* 91–B (2009) 1237–1242. doi:10.1302/0301-620X.91B9.22051.
- [40] S. Li, Y. Yu, Y. Yue, Z. Zhang, K. Su, Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis., *J. Clin. Cell. Immunol.* 4 (2013). doi:10.4172/2155-9899.1000174.
- [41] O. Oppegaard, B. Skodvin, A.-K. Halse, N. Langeland, CD64 as a potential biomarker in septic arthritis, *BMC Infect. Dis.* 13 (2013) 278. doi:10.1186/1471-2334-13-278.
- [42] G. Fjaertoft, L. Håkansson, U. Ewald, T. Foucard, P. Venge, Neutrophils from Term and Preterm Newborn Infants Express the High Affinity Fc γ -Receptor I (CD64) During Bacterial Infections, *Pediatr. Res.* 45 (1999) 871–876. doi:10.1203/00006450-199906000-00016.
- [43] G. Fjaertoft, L. Douhan Håkansson, K. Pauksens, G. Sisask, P. Venge, Neutrophil CD64 (Fc γ RI) expression is a specific marker of bacterial infection: A study on the kinetics and the impact of major surgery, *Scand. J. Infect. Dis.* 39 (2007) 525–535. doi:10.1080/00365540601113693.
- [44] M. Groselj-Grenc, A. Ihan, M. Pavcnik-Arnol, A.N. Kopitar, T. Gmeiner-Stopar, M. Derganc, Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children, *Intensive Care Med.* 35 (2009) 1950–1958. doi:10.1007/s00134-009-1637-7.
- [45] T.P. Hofer, A.M. Zawada, M. Frankenberger, K. Skokann, A.A. Satz, W. Gesierich, M. Schuberth, J. Levin, A. Danek, B. Rotter, G.H. Heine, L. Ziegler-Heitbrock, slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation., *Blood.* 126 (2015) 2601–2610. doi:10.1182/blood-2015-06-651331.
- [46] A.A. Throm, H. Moncrieffe, A.B. Orandi, J.T. Pingel, T.L. Geurs, H.L. Miller, A.L. Daugherty, O.N. Malkova, D.J. Lovell, S.D. Thompson, A.A. Grom, M.A. Cooper, S.T. Oh, A.R. French, Identification of enhanced IFN- γ signaling in polyarticular juvenile idiopathic arthritis with mass cytometry, *JCI Insight.* 3 (2018). doi:10.1172/JCI.INSIGHT.121544.
- [47] M. Canavan, A.M. Walsh, V. Bhargava, S.M. Wade, T. McGarry, V. Marzaioli, B. Moran, M. Biniecka, H. Convery, S. Wade, C. Orr, R. Mullan, J.M. Fletcher, S. Nagpal, D.J. Veale, U. Fearon, Enriched CD141+ DCs in the joint are transcriptionally distinct, activated, and contribute to joint pathogenesis, *JCI Insight.* 3 (2018). doi:10.1172/JCI.INSIGHT.95228.
- [48] J.A. Villadangos, L. Young, Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells,

Immunity. 29 (2008) 352–361. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.002.

- [49] M. Swiecki, M. Colonna, The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 471–485. doi:10.1038/nri3865.
- [50] S. Hanabuchi, T. Ito, W.-R. Park, N. Watanabe, J.L. Shaw, E. Roman, K. Arima, Y.-H. Wang, K.S. Voo, W. Cao, Y.-J. Liu, Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus., *J. Immunol.* 184 (2010) 2999–3007. doi:10.4049/jimmunol.0804106.
- [51] E. Martín-Gayo, E. Sierra-Filardi, A.L. Corbí, M.L. Toribio, Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development., *Blood.* 115 (2010) 5366–75. doi:10.1182/blood-2009-10-248260.
- [52] E.A. Moseman, X. Liang, A.J. Dawson, A. Panoskaltis-Mortari, A.M. Krieg, Y.-J. Liu, B.R. Blazar, W. Chen, Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells., *J. Immunol.* 173 (2004) 4433–4442. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383574> (accessed June 28, 2018).
- [53] M. Kavousanaki, A. Makrigiannakis, D. Boumpas, P. Verginis, Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: Induction of interleukin-10⁺ producing treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 53–63. doi:10.1002/art.25037.
- [54] L. van Bon, A.J. Affandi, J. Broen, R.B. Christmann, R.J. Marijnissen, L. Stawski, G.A. Farina, G. Stifano, A.L. Mathes, M. Cossu, M. York, C. Collins, M. Wenink, R. Huijbens, R. Hesselstrand, T. Saxne, M. DiMarzio, D. Wuttge, S.K. Agarwal, J.D. Reveille, S. Assassi, M. Mayes, Y. Deng, J.P.H. Drenth, J. de Graaf, M. den Heijer, C.G.M. Kallenberg, M. Bijl, A. Loof, W.B. van den Berg, L.A.B. Joosten, V. Smith, F. de Keyser, R. Scorza, C. Lunardi, P.L.C.M. van Riel, M. Vonk, W. van Heerde, S. Meller, B. Homey, L. Beretta, M. Roest, M. Trojanowska, R. Lafyatis, T.R.D.J. Radstake, Proteome-wide Analysis and CXCL4 as a Biomarker in Systemic Sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 433–443. doi:10.1056/NEJMoa1114576.
- [55] M. Gilliet, W. Cao, Y.-J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 594–606. doi:10.1038/nri2358.
- [56] J.-E. Gottenberg, N. Cagnard, C. Lucchesi, F. Letourneur, S. Mistou, T. Lazure, S. Jacques, N. Ba, M. Ittah, C. Lepajolec, M. Labetoulle, M. Ardizzone, J. Sibilia, C. Fournier, G. Chiocchia, X. Mariette, Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target

organs of primary Sjögren's syndrome., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 2770–2775. doi:10.1073/pnas.0510837103.

- [57] C.M. López de Padilla, A.N. Vallejo, K.T. McNallan, R. Vehe, S.A. Smith, A.B. Dietz, S. Vuk-Pavlovic, A.M. Reed, Plasmacytoid dendritic cells in inflamed muscle of patients with juvenile dermatomyositis, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 1658–1668. doi:10.1002/art.22558.
- [58] A. Boltjes, F. van Wijk, Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation, *Front. Immunol.* 5 (2014) 131. doi:10.3389/fimmu.2014.00131.
- [59] D. Ganguly, S. Haak, V. Sisirak, B. Reizis, The role of dendritic cells in autoimmunity, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 566–577. doi:10.1038/nri3477.
- [60] Y. Latchman, C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A.J. Long, J.A. Brown, R. Nunes, E.A. Greenfield, K. Bourque, V.A. Boussiotis, L.L. Carter, B.M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation., *Nat. Immunol.* 2 (2001) 261–268. doi:10.1038/85330.
- [61] W.J. Lesterhuis, H. Steer, R.A. Lake, PD-L2 is predominantly expressed by Th2 cells, *Mol. Immunol.* 49 (2011) 1–3. doi:10.1016/j.molimm.2011.09.014.
- [62] N. Messal, N.-E. Serriari, S. Pastor, J.A. Nunès, D. Olive, PD-L2 is expressed on activated human T cells and regulates their function., *Mol. Immunol.* 48 (2011) 2214–2219. doi:10.1016/j.molimm.2011.06.436.
- [63] A.L. Kinter, E.J. Godbout, J.P. McNally, I. Sereti, G.A. Roby, M.A. O'Shea, A.S. Fauci, The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands., *J. Immunol.* 181 (2008) 6738–6746. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981091> (accessed June 28, 2018).
- [64] X. Zhong, J.R. Tumang, W. Gao, C. Bai, T.L. Rothstein, PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for VH11/VH12 and phosphatidylcholine binding, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 2405–2410. doi:10.1002/eji.200737461.
- [65] C. Guignant, A. Lepape, X. Huang, H. Kherouf, L. Denis, F. Poitevin, C. Malcus, A. Chéron, B. Allaouchiche, F. Gueyffier, A. Ayala, G. Monneret, F. Venet, Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients, *Crit. Care.* 15 (2011) R99. doi:10.1186/cc10112.
- [66] S. Huber, R. Hoffmann, F. Muskens, D. Voehringer, Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2, *Blood.* 116 (2010) 3311–20. doi:10.1182/blood-2010-02-271981.

- [67] P. Loke, J.P. Allison, PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 100 (2003) 5336–5341. doi:10.1073/pnas.0931259100.

Table 1

Characteristics of the enrolled patients

	JIA	SA						
Sex (F-M)	6-2	5-3						
AAN (positive-negative)	5-2							
Anti-CCP (positive/negative)	2-3							
RF (positive/negative)	0-5							
	Mean ± SEM/ μ l (Min-Max)		<i>p</i>	Adjusted Mean ± SEM/ μ l		<i>p</i>	Correlation with age	
	JIA	SA		JIA	SA		r2	<i>p</i>
Age (year)	8.9 ± 1.3 (4.5-14.4)	1.1 ± 0.1 (0.7-1.4)	<0.001	NA	NA	NA	NA	NA
CRP (mg/ml)	15.9 ± 13.7 (0.3-70.3)	27.0 ± 4.5 (14.6-47.4)	0.09	0.24 ± 1.82	134 ± 1.49	<0.01	0.01	0.99
Platelets (x10 ³ /ml)	331.9 ± 19.3 (270.0-413.0)	411.1 ± 20.8 (342.0-503.0)	0.02	368.6 ± 25.9	374.4 ± 25.9	0.90	-0.47	0.02
WBC (x10 ⁶ /ml)	7.4 ± 0.7 (5.5-10.9)	14.0 ± 1.6 (7.6-19.6)	< 0.01	7.4 ± 1.9	13.9 ± 1.9	0.07	-0.43	0.03

F=female; M=male; JIA=juvenile idiopathic arthritis; SA= septic arthritis; SEM = Standard error; AAN = Anti-nuclear antibodies; CCP = cyclic citrullinated peptide; RF= Rheumatoid factor; CRP= C-reactive protein; WBC = white blood cells; r2= coefficient correlation; p = p value

Table 2

Immune cell counts in peripheral blood and synovial fluid samples

	Mean ± SEM/ μ l (Min-Max)			Adjusted Mean ± SEM/ μ l			Correlation with age	
Peripheral Blood								
	JIA	SA	<i>p value</i>	JIA	SA	<i>p value</i>	r2	<i>p-value</i>
T cells	1508 ± 199 (614-2304)	2361 ± 421 (886-4445)	0.09	1720 ± 499	2150 ± 499	0.63	-0.36	0.09
B cells	429 ± 80 (196-891)	844 ± 140 (310-1376)	0.02	577 ± 166	696 ± 166	0.69	-0.42	0.06
NK cells	197 ± 26 (80-321)	396 ± 55 (214-619)	< 0.01	204 ± 66	388 ± 66	0.14	-0.41	0.06
Granulocytes	2321 ± 221 (1676-3446)	3240 ± 577 (1438-6694)	0.16	2529 ± 666	3031 ± 666	0.67	-0.02	0.92
Synovial Fluid								
T cells	1521 ± 262 (630-2866)	539 ± 104 (217-1125)	< 0.01	1886 ± 273	174 ± 273	< .001	-0.32	0.15
B cells	56 ± 18 (9-131)	69 ± 14 (20-140)	0.37	87 ± 22	39 ± 22	0.23	-0.23	0.31
NK cells	110 ± 22 (22-188)	584 ± 162 (87-1352)	0.01	136 ± 177	558 ± 177	0.20	-0.58	< 0.01
Granulocytes	2571 ± 1815 (274-15231)	26981 ± 6240 (2453-47324)	< 0.01	3836 ± 7037	25716 ± 7037	0.10	-0.39	0.08

Table 3

Mean fluorescence intensities of activation markers in monocytes and DC subsets and cell count for DC subsets that discriminate between JIA and SA.

Peripheral Blood									
	Mean ± SEM (Min-Max)			Adjusted Mean ± SEM			Correlation with age		
	JIA	SA	<i>p value</i>	JIA	SA	<i>p value</i>	r2	<i>p value</i>	
CD1c⁺ cDC (counts)	44839 ± 1961 (39438-54470)	31206 ± 1931 (23817-37915)	< 0.001	47393 ± 2611	28288 ± 2891	< 0.01	0.04	0.87	
FI HLA-DR CD14⁺ InfDC	49126 ± 2469 (41076-58990)	30024 ± 1829 (23554-37088)	< 0.001	48668 ± 3162	30644 ± 3501	0.01	0.43	0.05	
MFI CD86 CD141⁺ cDC	5885 ± 872 (3180-9149)	8742 ± 975 (4397-12108)	0.05	4706 ± 1234	10088 ± 1366	0.04	-0.06	0.78	
MFI PDL2 CD141⁺ cDC	2919 ± 646 (978-5959)	10335 ± 1057 (8114-16097)	< 0.001	3157 ± 1217	10063 ± 1348	0.01	< 0.001	0.99	
MFI PDL2 CD123⁺ pDC	221 ± 44 (78-436)	998 ± 91 (839-1513)	< 0.001	243 ± 98	973 ± 109	< 0.01	0.32	0.16	
Synovial Fluid									
	Mean ± SEM (Min-Max)			Adjusted Mean ± SEM			Correlation with age		
	JIA	SA	<i>p value</i>	JIA	SA	<i>p value</i>	r2	<i>p value</i>	
CD141⁺ cDC (counts)	15 ± 5 (1-41)	2 ± 1 (0-8)	0.02	24 ± 4	-7 ± 4	< 0.01	-0.36	0.10	
CD123⁺ pDC (counts)	26 ± 6 (6-52)	3 ± 1 (0-7)	< 0.01	31 ± 6	-2 ± 6	0.01	-0.27	0.23	
MFI PDL2 CD1c⁺ cDC	1493 ± 171 (1016-2543)	3560 ± 520 (1793-5908)	< 0.01	1218 ± 586	3835 ± 586	0.02	-0.24	0.29	
MFI PDL2 CD141⁺ cDC	3464 ± 706 (1780-7675)	23845 ± 2106 (17308-36390)	< 0.001	3222 ± 2408	24087 ± 2408	< 0.01	-0.09	0.69	
MFI CD64 CD14⁺⁺CD16⁻	10951 ± 1380 (6095-15314)	19799 ± 2604 (12849-35004)	< 0.01	8178 ± 3023	22572 ± 3023	0.02	-0.06	0.79	

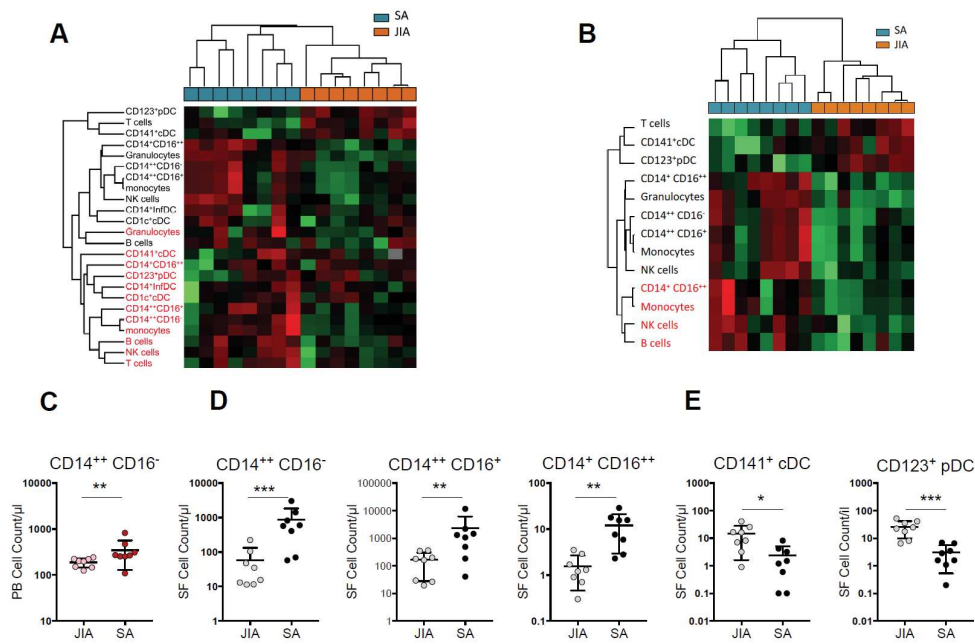


Fig. 1 Stratification of patients with JIA and SA and differences in monocyte and DC counts **A)** Heatmap of log₂ transformed cell counts in peripheral blood (red names) and synovial fluid (black names) by multi-parametric flow cytometry. In the color scale, red indicates relative higher and green relative lower cell numbers. The dendrogram shows the results of the non-supervised hierarchical clustering analysis; in the heatmap: rows, cell subsets; and columns, individual patients with SA (blue) and JIA (orange). **B)** Heatmap showing markers that were significantly differentially expressed between patients with SA and JIA. The dendrogram shows the results of the non-supervised hierarchical clustering analysis using an FDR cut-off of 5%. Direct comparison of the counts of **C)** classical monocytes in blood (PB), **D)** classical, intermediate and non-classical monocytes in synovial fluid (SF), and **E)** CD141⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs in synovial fluid (SF) samples of patients with JIA (n=8) and SA (n=8); * p < 0.05 ** p < 0.01; *** p < 0.001 (two-sided *t* or Mann-Whitney test, according to data distribution. Data not adjusted to the age of patients).

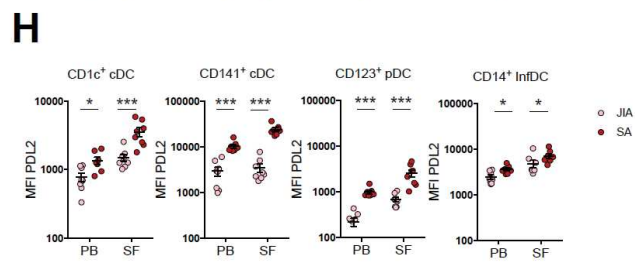
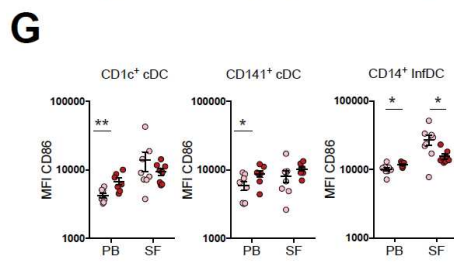
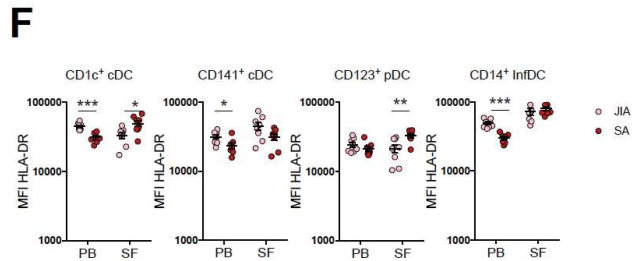
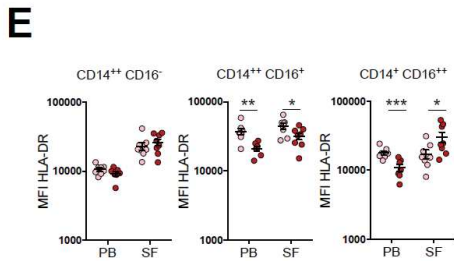
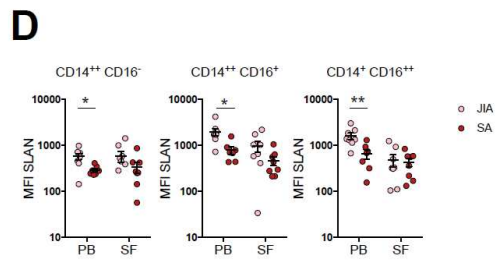
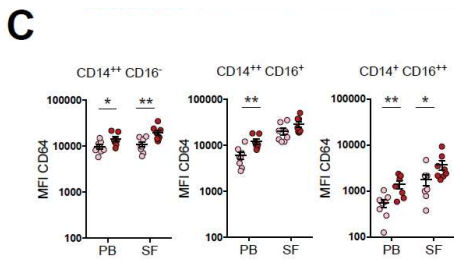
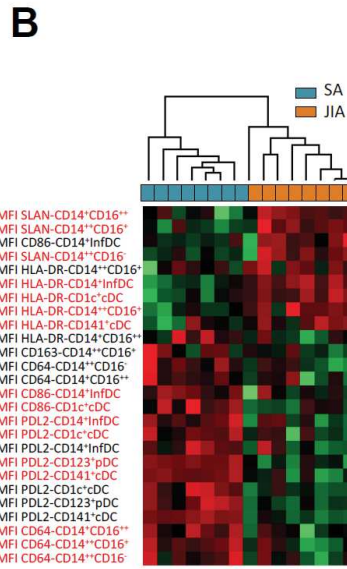
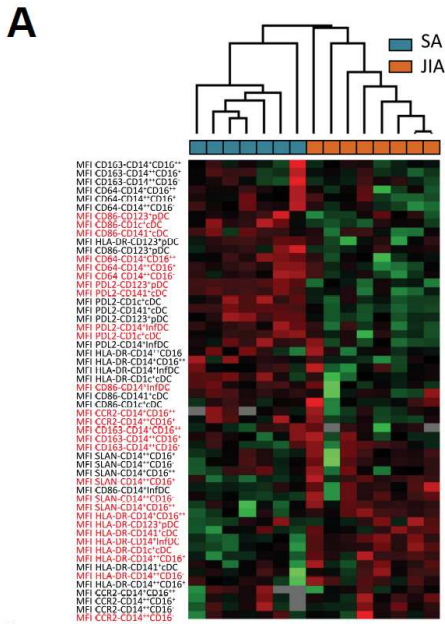
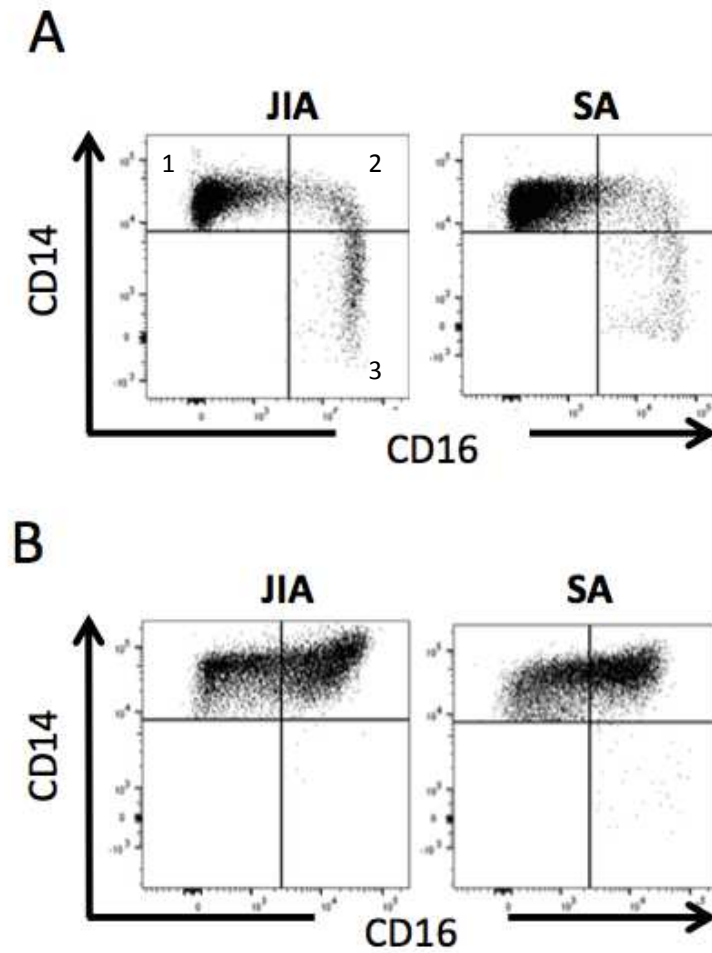
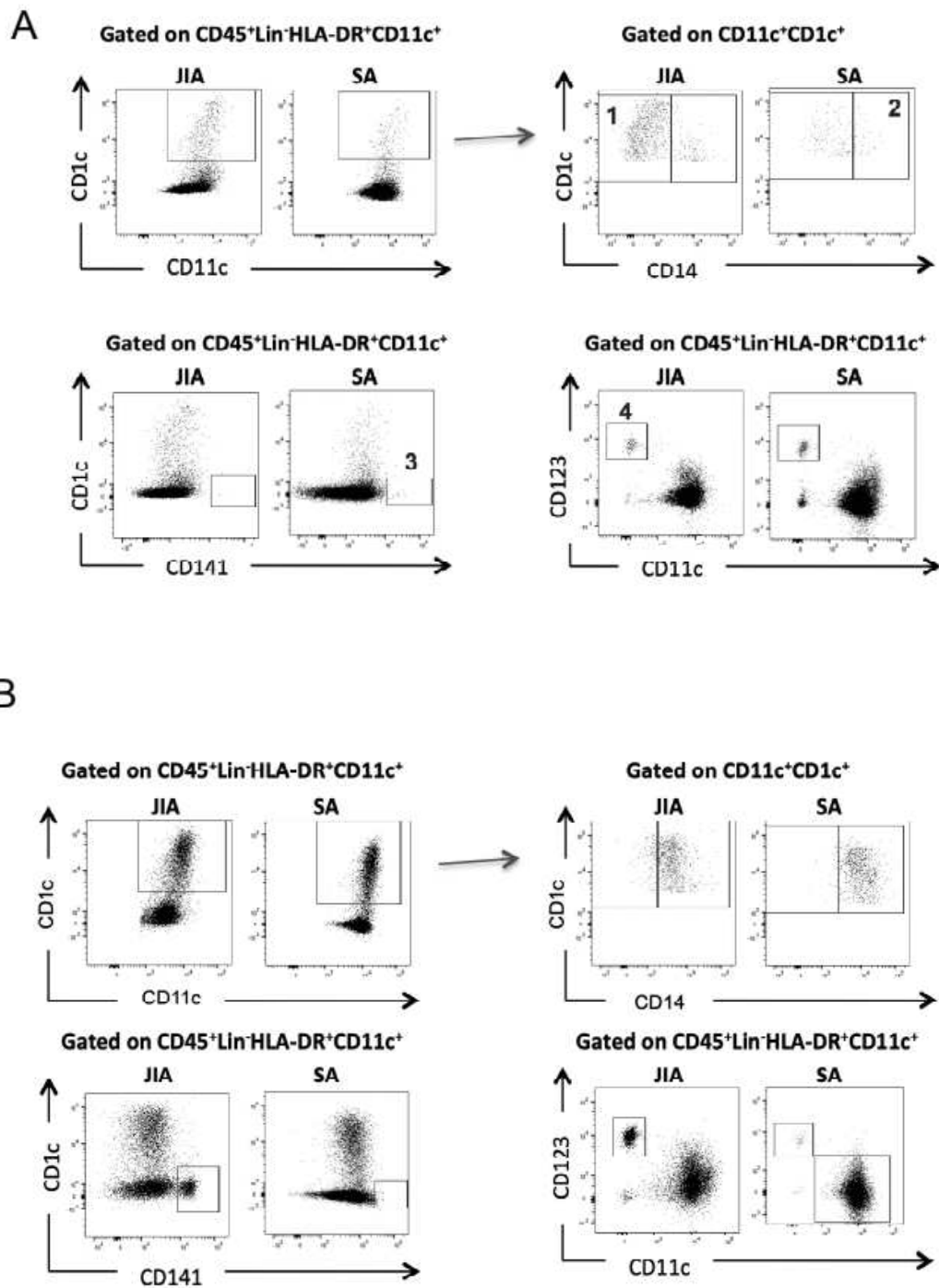


Fig. 2 Stratification of patients with JIA and SA and differences in the mean fluorescence intensities (MFI) of activation markers in each cell subsets **A)** Heatmap of log₂ transformed MFI obtained by multi-parametric flow cytometry analysis. Red indicates relative higher expression and green relative lower expression of the markers found in circulating (red names) and synovial (black names) cell subsets. The dendrogram shows the results of the non-supervised hierarchical clustering analysis; in the heatmap: rows, cell subsets; and columns, individual patients with SA (blue) and JIA (orange). **B)** Heatmap showing the activation markers that were differentially expressed in patients with SA and JIA. The dendrogram shows the results of the non-supervised hierarchical clustering analysis using an FDR cut-off of 5%. Direct comparison of the expression of **C)** CD64, **D)** SLAN, and **E)** HLA-DR in classical, intermediate and non-classical monocytes in the blood (PB) and synovial fluid (SF) of patients with JIA (n=8) and SA (n=7). Direct comparison of the expression of **F)** HLA-DR, **G)** CD86, and **H)** PDL-2 in CD1c⁺ and CD141⁺ cDCs, CD123⁺ pDCs, and CD14⁺ infDCs in blood (PB) and synovial fluid (SF) samples of patients with JIA (n=8) and SA (n=7); * p <0.05 ** p <0.01; *** p <0.001 (two-sided *t* or Mann-Whitney test, according to data distribution. Data not adjusted to the age of patients).

Gated on $CD45^+Lin^-HLA-DR^+$



FigS1: Representative staining of the classical ($CD14^{++}CD16^-$) (1), intermediate ($CD14^{++}CD16^+$) (2) and non-classical monocytes ($CD14^+CD16^{++}$) (3) in (A) peripheral blood and (B) Synovial fluid of patients with JIA or SA.



FigS2: Representative staining of CD1c⁺cDC (1), CD14⁺InfDC (2), CD141⁺cDC and CD123⁺pDC in the peripheral blood (A) or synovial fluid (B) from JIA and SA patients.

2. Analyse du profil microARN dans l'AJI et l'AS juvénile

Les deux formes d'arthrite juvéniles que l'on retrouve le plus en Europe chez les enfants de moins de 16 ans sont l'arthrite juvénile idiopathique (AJI) et l'arthrite septique (AS). Ces deux entités de rhumatismes juvéniles ont des étiologies bien distinctes et nécessitent des traitements différents. Il peut tout de même arriver qu'elles présentent des signes cliniques et des symptômes similaires. Ceci complique alors le diagnostic, particulièrement lorsque l'agent pathogène responsable de l'AS est indétectable. En raison de leur spécificité et de leur stabilité dans les fluides biologiques, les microARNs (miARNs) pourraient être utilisés comme biomarqueurs pour discriminer l'AJI et l'AS et ainsi permettre d'avoir un diagnostic rapide après qu'un patient soit arrivé à l'hôpital. Par ailleurs, l'identification d'un miRNome spécifique des articulations AJI permet d'éclairer notre compréhension des mécanismes responsables de la pathogénèse de l'AJI.

Avec une approche de séquençage à haut débit, j'ai quantifié l'expression de 2083 miARNs dans le sang périphérique et le liquide synovial (LS) d'une première cohorte d'enfants atteints d'AS et d'AJI. J'ai ensuite validé les résultats avec une RT-qPCR sur une plus grande cohorte. Des analyses de courbes ROC ont été réalisées afin de déterminer les combinaisons de miARNs permettant une discrimination optimale entre AS et AJI. Pour finir, le logiciel de prédiction miRWalk a permis d'identifier des voies de signalisation ciblées par les miARNs identifiés.

Le traitement des données par analyse en composante principale et clustering hiérarchique a montré que le miRNome du sérum ne permet pas de discriminer les deux pathologies. En revanche, le miRNome du LS a permis d'identifier une signature de 19 miARNs différemment exprimés entre ces deux pathologies, avec 14 miARNs (miR-7150, miR-150-5p, miR-146a-5p, miR-6794-5p, miR-4800-5p, miR-4646-5p, miR-6782-5p, miR-4419a, miR4419b, miR-4667-5p, miR-155-5p, miR339-3p, miR-342-5p and miR-6716-5p) plus exprimés dans l'AJI que l'AS et 5 miARNs (miR-6734-3p, miR-6841-3p, miR-6764-5p, miR-8063 and miR-2909) plus exprimés dans l'AS que dans l'AJI. Les analyses des courbes ROC ont montré que la combinaison de miR-6764-5p, miR-155 et miR-146a-5p permet de différencier AJI et AS avec une aire sous la courbe de 1 (Intervalle de confiance : 95% ; 0,978 à 1).

Cette étude apporte pour la première fois une caractérisation des miARNs au niveau du LS d'enfants atteints d'arthrite. La comparaison entre l'expression des miARNs de patients atteints d'AJI et ceux ayant une AS a permis d'identifier 3 miARNs pouvant être utilisés en clinique afin d'améliorer le diagnostic de ces deux maladies.

Synovial fluid miRNA signature diagnoses and discriminates juvenile idiopathic arthritis from septic arthritis

Nadège NZIZA^{1,2*}, Eric JEZIORSKI^{3,4*}, Marion DELPONT⁵, Maïlys CREN¹, Hugues CHEVASSUS^{7,8}, Aurélia CARBASSE³, Perrine MAHE³, Hamouda ABASSI³, Pauline JOLY MONTRIGAL⁵, Eric SCHORDAN⁶, Alain MANGE⁹, Christian JORGENSEN^{1,10}, Florence APPARAILLY^{1,10*}, Isabelle DUROUX-RICHARD^{1*}✉

1. IRMB, INSERM, Univ Montpellier, Montpellier, France
2. Arthritis R&D, Neuilly sur Seine, France
3. CHU Montpellier, Pediatric Department, Univ Montpellier, France
4. CHU Montpellier, Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier, France
5. CHU Montpellier, Pediatric Orthopedic Surgery Unit, Univ Montpellier, France.
6. FIRALIS SAS, Huningue, France
7. CHU Montpellier, Centre d'Investigation Clinique, Montpellier, France
8. Centre d'Investigation Clinique 411, INSERM, Montpellier, France
9. IRCM, INSERM, Univ Montpellier, ICM, Montpellier, France
10. CHU Montpellier, Clinical department for osteoarticular diseases, Univ Montpellier, Montpellier, France

*Equally contributed to the study

✉ Corresponding author

Address correspondence to:

Dr Isabelle Duroux-Richard, Inserm U1183, IRMB, 80 rue Augustin Fliche, 34295

Montpellier cedex 05, France. Phone: (+33) 467 335 697/ Fax: (+33) 467 330 113 Email:

isabelle.richard@inserm.fr

SHORT TITLE: Synovial fluid miRNAs discriminate juvenile rheumatism

ABSTRACT

Objective: Septic arthritis (SA) and juvenile idiopathic arthritis (JIA) are the most frequent causes of arthritis among children under the age of 16 years. Although these diseases have different etiology, they share clinical similarities upon initial presentation. There are currently no reliable markers to distinguish them at disease onset. The present study aimed at identifying a miRNA-based signature with high diagnostic performance.

Methods: We studied 26 children with JIA (n=13) and SA (n=13). Using the next-generation high-throughput sequencing technique, we measured the absolute concentrations of 2083 miRNAs in synovial fluid and serum samples of an exploratory cohort. These results were then validated in a replication study and using RT-qPCR technique. A ROC analysis was performed to determine the optimal combination of miRNAs for diagnosis.

Results: While serum miRNAs did not discriminate between SA and JIA, synovial fluid miRNAs did. We identified a 19 miRNA-based signature with 14 (miR-7150, miR-150-5p, miR-146a-5p, miR-6794-5p, miR-4800-5p, miR-4646-5p, miR-6782-5p, miR-4419a, miR4419b, miR-4667-5p, miR-155-5p, miR339-3p, miR-342-5p and miR-6716-5p) and 5 (miR-6734-3p, miR-6841-3p, miR-6764-5p, miR-8063 and miR-2909) miRNAs significantly up- and down-regulated in JIA compared with SA, respectively. The combination of miR-6764-5p, miR-155 and miR-146a-5p in synovial fluid yielded an area under the curve of 1 (95% CI 0.978 to 1), discriminating JIA from SA children (p=0.0017).

Conclusions: We propose for the first time a combined quantification of 3 miRNAs in the synovial fluid for diagnosing JIA and SA at the onset of the disease, which may then allow proper care.

Keywords: miRNA, juvenile arthritis, biomarker, synovial fluid

INTRODUCTION

The diagnostic of acute arthritis among children is challenging because of the risk of joint damage and the absence of reliable diagnostic markers that could discriminate between different forms of juvenile arthritis at onset, leaving joint aspiration a requirement in case of initial arthritis lasting less than 6 weeks. Septic arthritis (SA) is the most frequent cause of acute arthritis among children under the age of 16 years, and most commonly results from hematogenous spread of bacteria following a bacteremia. The main bacteria responsible for acute arthritis is *Staphylococcus aureus* [1], but *Kingella Kingae* predominates below the age of 4 years [2]. During SA, host inflammatory cells and bacteria release proteolytic enzymes that induce cartilage destruction. Isolation of the causative agent is the gold standard for SA diagnosis but remains in 60% of cases either inconclusive or impossible to perform [3].

The second most common etiology encountered in children hospitalized for arthritis is juvenile idiopathic arthritis (JIA). JIA is a multifactorial inflammatory and rare disease of unknown etiology that persists for more than 6 weeks [4,5]. Treatment options for JIA include non-steroidal anti-inflammatory drugs, intra-articular injections of glucocorticoids, disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) and biological therapeutics like tumor necrosis factor inhibitors [6,7].

Although SA and JIA have different etiologies and involve different treatments and prognoses, they might share clinical similarities at disease onset. In case of non-conclusive identification of the causative agent in SA, the diagnosis can be challenging at initial presentation. Indeed, conventional infectious biomarkers are controversial when used for SA diagnosis. Serum level of PCT (procalcitonin) level is not sensitive for young patients with SA and CRP (c-reactive protein) might not be reliable for *Kingella Kingae* infection, the most frequent etiological agents before 4 years [8,9]. Finally, morphology analysis and count of the polynuclear neutrophils, such as the observation of cytoplasmic vacuolation and toxic granulation formation, have been proposed as an early marker of infection. Nevertheless, the sensitivity of these analyses is still debatable and availability of expert

cytologist in clinical routine is often lacking [10]. Therefore, current unmet medical need in pediatric arthritis is the identification of specific diagnostic biomarkers.

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNA and involved in the regulation of multiple biological pathways by post-transcriptionally repressing the expression of protein-encoding genes. They have key functions in the regulation of almost every cellular processes investigated so far. Altered expression of miRNAs has been described in diseases, including cancer and immune disorders such as rheumatoid arthritis (RA) [11–15]. Because of their specificity and stability, as well as their detectable presence in body fluids, miRNAs are proposed as diagnostic biomarkers for diseases.

In juvenile arthritis, the implication of miRNAs remains however poorly explored. Recently, few studies have identified miRNAs with abnormal expression either in the plasma or serum, or in circulating monocytes isolated from JIA patients [16–21]. None of the studies have explored miRNAs expression directly into the inflamed joints, nor compared with SA to identify early diagnosis markers. The present study aims at identifying a miRNA-based signature for the differential diagnosis of the two forms of juvenile arthritis most encountered in clinical practice.

Methods

Human subjects and sample preparation.

Synovial fluid and serum samples were obtained from patients with JIA (n=13) and SA (n=13). The children characteristics are summarized in Table 1 and [online supplementary materials](#). We studied one exploratory cohort (JIA: n=9; SA: n=7) and a validation cohort (JIA: n=9; SA: n=9) ([online supplementary materials](#) Figure S1). In the exploratory cohort, we included 2 different synovial fluid samples processing (centrifugation or not 15 minutes at 300g) to evaluate the robustness of the identified miRNA biomarkers ([online supplementary](#) Figure S1)

miRNA profiling

Using a miRNA Whole Transcriptome Assay (WTA) associated with a next-generation sequencing technology, the miRNome was performed by the biotechnology company FIRALIS SAS (Huningue, France). Data reconstruction, analysis and normalization were performed using directly FASTQ files from the Illumina NextSeq platform and processed by the HTG Parser software (see [online supplementary materials](#)).

miRNA extraction and quantification

Total RNAs, including small RNAs, were extracted from 100 µl of SF using a miRNeasy Serum/Plasma kit with a Qiacube (QIAGEN) according to the manufacturer's instruction. For each sample eluent 2 µl were used to perform miRNA quantification by RT-qPCR using the Taqman microRNA assay approach (Applied LifeTechnologies). A detailed description of RT-qPCR, preamplification and normalization is available in [online supplementary materials](#) and Figure S3.

Statistical analysis

The differentially expressed miRNA probe-sets were filtered with query parameters using a signal threshold, the detection p-value, and the present call rate to detect the present miRNAs (Perseus software). The GraphPad prism software was used to perform ROC curve and statistical analysis (see [online supplementary materials](#)).

Results

Synovial fluid miRNAs discriminate better JIA and SA patients than serum miRNAs.

To identify miRNAs that are differentially expressed in JIA and SA patients, we analyzed the miRNome in SE and SF obtained at disease onset from the exploratory cohort (JIA: n=5; SA: n=3). Clinical and biological characteristics of the patients are summarized in table 1 and [online supplementary figure S1](#). Of the 2083 miRNAs analyzed, more than 50% were detectable in SF and SE samples with a count per million (CPM) greater or equal to 20. To address differences of SE and SF miRNA levels between SA and JIA patients, data were analyzed using principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering methods (Figure 1). PCA of all detectable miRNAs showed a clear separation between septic and inflammatory juvenile arthritis in SF (figure 1A), suggestive of specific disease-related changes in miRNA expression within inflamed joints. SA and JIA overall patterns were however less clearly separated in the PCA of SE. To identify miRNAs differently expressed between SA and JIA with statistical significance, we carried out 2 different volcano plots for SF and SE ([online supplementary figure S2A and B](#)). The threshold we used to screen up- or down-regulated miRNAs was fold change ≥ 2.0 and p-value < 0.05 . Hierarchical clustering (figure 1B and C) showed that the miRNA signature in both body fluids distinguished the 2 groups of patients, nevertheless with a much more discriminating profile in the SF than in the SE. In SF, 419 miRNAs are differentially expressed between SA and JIA, against 198 miRNAs in SE. When the p-value threshold was lowered ($p < 0.01$), 141 miRNAs were identified in SF samples ([online supplementary table S1](#)) and none in SE samples.

A 21 miRNA-based signature in synovial fluid distinguishes JIA from SA.

To reduce the list of 141 miRNAs differently expressed in the SF of patients with JIA and SA to potential biomarkers useful in clinic, new filter criteria were used. We established a list of miRNAs that were only detected in one of the 2 groups of disease with a threshold of at least 100 CPMs, and

showing a fold change >4 or <-2 between JIA vs SA. We identified 21 miRNAs differentially expressed in the SF of patients with JIA compared with SA, 16 miRNAs were upregulated and 5 miRNAs were down-expressed (table 3). Hierarchical clustering was performed and showed a perfect discrimination of the two disease groups (figure 2A). Among the miRNAs down-expressed in JIA compared to SA samples, the most significantly reduced were miR-6841-3p, miR-2909 and miR-8063 with CPM numbers less than or equal to 50 in JIA samples, which is the detection limit for miRNAs when using RT-qPCR methods (figure 2B). The most over-expressed miRNAs in the JIA samples compared to SA were miR-150-5p, miR-7150 and miR-4417 with difference CPMs greater than 1000 (figure 2C).

An independent cohort validates the diagnostic potential of 19 miRNAs.

In order to validate the clinical robustness of the candidate signature of 21 miRNAs differentially expressed between both pathologies, we performed HTG EdgeSeq analysis on an independent set of SF samples that were not centrifuged before storage (2nd exploratory cohort, see online supplementary figure S1). Hierarchical clustering showed a perfect discrimination between JIA and SA samples (figure 2D) for the novel cohort, suggesting that differences in SF treatment before miRNA analysis did not affect the potential of our candidate miRNA signature to discriminate between JIA and SA (table 3). Among the 21 miRNAs, two miRNAs (miR-3687 and miR-4417) however displayed different expression profile between both cohorts. Fold changes found in the SF from cohort 1 and 2 were 4.42 and -1.13 for miR-3687, and 5.34 and 0.42 for miR-4417, respectively. Overall, this replication study validated 19 out of the 21 miRNAs.

A synovial fluid combination of 3 miRNAs distinguishes JIA from SA at initial presentation.

To further validate our results with another detection technique, easily operable in the clinic, we measured the expression level of the 19 miRNAs identified in SF using RT-qPCR analysis of a validation cohort (n=9/group). Four SF miRNAs were significantly upregulated (miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-155 and miR-342-5p with a p-value<0.01) and 1 significantly downregulated (miR-6764-5p, p-value<0.01) in JIA compared to SA (figure 3A). Then, we used miRNA expression levels in SF as biological indicators for JIA and SA and performed ROC analysis to determine the AUC values. Our analysis showed AUC were > 0.9 for miR-155, miR-150-5p, miR-146a-5p, miR-6764-5p and miR-342-5p, suggesting high diagnostic performances. To optimize the classification performance of miRNA expression levels in SF, we determined a new threshold using the mROC software. The combination of miR-6764-5p, miR-155 and miR-146a-5p in SF helped to discriminate JIA from SA patients with an AUC=1 (95% CI 0.978 to 1) (figure 3B). Overall, combining the detection of 3 miRNAs in the SF was an efficient biological indicator for JIA and SA diagnosis.

Comparative pathway analysis reveals key pathophysiological mechanisms

To examine which pathways were affected in JIA and SA biological fluids, we applied a miRWalk pathway analysis to the 19 miRNAs-based signature identified. Nineteen WIKI biological processes were significantly enriched (p-value <0.05, FDR corrected) with at least two miRNAs involved in each pathway. The insulin signaling pathway involving 18 miRNAs of the signature (range p-value 3,4e-02 to 1,3e-07), as well as B cell receptor and EGF/EGFR signaling pathways including 16 miRNAs of the signature (range p-value 4.8e-02 to 6.5e-06 and range p-value 4.5e-02 to 2.4e-06, respectively) were the 3 prominent pathways, with more than 80% of miRNAs putatively implicated (table 3). This analysis suggests that these 3 biological pathways are highly involved in disease events.

Discussion

Even though the differential diagnostic between children SA and JIA is critical for proper care and prevention of joint integrity loss, there are no reliable biomarkers to distinguish between these two forms of arthritis at the onset of symptoms. Previously, Aupiais *et al* retrospectively compared clinical and biological features of SA and JIA but did not find any specific blood markers differentiating both conditions [22]. They concluded that, even if according to standard guidelines, children with joint effusion associated with fever, high levels of CRP and WBC counts are suspected of having SA and are submitted for joint aspiration and antibiotic treatments, it does not ensure that arthritis is associated with bacteria and is thus insufficient to discriminate JIA and SA. Although the CRP has been described as a predictor of SA [23], our cohorts showed inconsistent significances that might be related to the infectious agent (*Kingella Kingae*) as previously suggested [8]. We also observed a significant difference between WBC counts in JIA and SA, but 4 out of 9 children with SA display comparable WBC counts as JIA (table 2). To our knowledge, our study is the first prospective study that compares synovial fluid (SF) in both diseases and successfully identified a combination of 3 miRNAs (miR-6764-5p, miR-155 and miR-146a-5p) for high specific and sensitive diagnostic (AUC=1 and p=0.0017).

MiRNAs have emerged as an important class of new biomarkers for detecting and monitoring various pathophysiological conditions that are present in all types of body fluids. We found that miRNAs detection in the circulation did not discriminate well both diseases. Indeed, about 80% have comparable expression levels in SA and JIA, and only 10% of the detected miRNAs can significantly discriminate both diseases. In contrast, in the SF, over 20% of miRNAs significantly discriminate JIA and SA, and almost half of them display differences of at least 2-fold.

Signature of circulating miRNAs has been reported in the SF of adult patients with rheumatoid arthritis (RA) and evidenced that SF miRNAs have distinct patterns from plasma and joint miRNAs [24]. Interestingly, Murata *et al.* showed that plasma miRNAs differentiate healthy donors from

different types of adult rheumatism, while SF miRNAs differentiate between types of rheumatism. Our study showed that, depending on the biological fluid used, miRNA expression profiles are different, highlighting different miRNA-mediated biological functions and cellular contexts. Critical issues are non-uniform sample choice, handling, and processing, as well as cell contamination in sample preparation. Blood cells indeed contribute to the presence of miRNAs in the circulation, markedly altering specific miRNA levels such as miR-451, miR-16, miR-92a and miR-486 [25]. Authors also showed that perturbations in blood cell counts and hemolysis can alter plasma miRNA levels by up to 50-fold. Here, we identified a 19-miRNA signature in the SF that discriminates between JIA and SA independently of the sample centrifugation, therefore not significantly influenced by contamination of circulating cells, and validated in two independent cohorts.

However, only 10 miRNAs were detectable in SF when using RT-qPCR. This difference can be explained by various factors. First, HTG EdgeSeq is based on an extraction free chemistry and RNA extraction for qPCR experiment is known to induce biases and especially miRNAs with low GC content can be lost during extraction step [26,27]. In addition, depending on the extraction protocol, it has been shown that miRNA profile is different [28]. Second, due to high sensitivity of the HTG EdgeSeq, detection level is enhanced compared to the other technologies including qPCR as reported in miRQC report [28,29]. Thus, it is not surprising that some selected miRNAs are not detectable by qPCR. Moreover, since samples used for the discovery and validations are independent, both technical and biological variation can explain the non-confirmation of miRNAs, but also show the robustness of the validated miRNAs biomarker candidates.

Among the 19 miRNAs that distinguish both pathologies, more than 70% are new miRNAs listed in miRBase v20 database, and more than 50% have been previously described involved in the inflammatory response. Six miRNAs are implicated in **auto-immune disorders** such as miR-342-5p in systemic lupus erythematosus (SLE) or Type 1 diabetes (T1D) [30,31], or miR-150-5p [32], miR-146a-5p [33], miR-155-5p [34], miR-6716-5p [35] and miR-2909 [36,37] in RA. We found miR-146a and miR-155 significantly overexpressed in the SF of JIA compared to SA. MiR-146a is one of the most

studied miRNA in RA and negatively regulates inflammation [38]. Its expression is increased in different cell types or tissues including SF and synovial tissue of RA patients [34]. MiR-155, which is probably the second most described miRNA in RA, was also found overexpressed in SF in RA patients [34]. It is mainly expressed by hematopoietic cells and positively regulates inflammation [39]. Recently, studies have identified several miRNAs abnormally expressed in the plasma or SE of patients with JIA, as compared with healthy donors, including miR-146a and miR-155 [19,20]. Here, we showed for the first time that these two miRNAs are, and are found in the combination of the 3 miRNAs identified as an efficient biological indicator for JIA and SA diagnosis. Our data suggest a common inflammatory component between juvenile and adult arthritis. To our knowledge, no functional analysis has been done on miR-6764-5p. Further studies are therefore required in order to understand the implication of this miRNA in inflammatory processes.

Interestingly, 7 out of the 19 miRNAs identified were described in **viral or bacterial infection** responses. Among them, miR-342-5p suppresses the coxsackievirus B3 biosynthesis, which is one of the major pathogens associated with human heart disease [40], miR-150 is deregulated in PBMC of sepsis-patients compared to healthy controls, with lower SE levels of miR-150 correlated with elevated Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores and severity of sepsis [41], and miR-4667-5p is upregulated in response to *Burkholderia pseudomallei* infection in human lung epithelial cells [42].

The analysis of pathways regulated by the 19 miRNAs revealed key biological processes such as insulin, B cell receptor, EGF/EGFR signaling and pathway involved in cardiomyocytes. Systemic abnormalities in growth hormone (GH)/ insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and B cell receptor signaling pathway are known to be involved in JIA [43][44]. Among the JIA subtype-specific blood gene expression profiles identified by Barnes *et al*, IL-2, B cell receptor and JAK/STAT signaling pathways were over-represented in persistent oligoarthritis [45]. Surprisingly, two pathways involving heart cells such as calcium regulation in cardiac cells and cardiomyocyte hypertrophy are

found in our analysis, which is in accordance with previous publications showing cardiac involvement in JIA [46]. Although not described yet in JIA, prevalence of insulin resistance is higher in RA patients than in healthy individuals [47]. Overall, data from the literature suggest that the 19 miRNAs discriminating JIA and SA patients are associated with the autoimmune versus infectious mechanisms, which is relevant to the respective etiology of both diseases.

In conclusion, the present study allows us to propose for the first time a 19-miRNA signature in the synovial fluid of pediatric arthritis for the diagnosis of JIA and SA at the onset of the disease, and in particular a highly sensitive and specific 3-miRNAs signature (miR-146a-5p, miR-155 and miR-6764-5p) that displays good diagnostic potential. Since joint puncture is an integral part of the management of SA, it is very easy and rapid to measure the expression of these 3 miRNAs upon initial presentation and thus to rapidly initiate the optimal treatment and care management. Although encouraging, future prospective studies with a larger recruitment need to be conducted. Overall, our present report suggests that a comparative and prospective study between inflammatory and infectious arthritis could be effective for the screening of inflammatory biomarkers and the identification of specific pathophysiological pathways.

Declarations

Authors' contributions

NN performed the experiments, analyzed data, and contributed to the writing. EJ designed the project, performed patients' inclusions, provided human samples, and contributed to the writing. CJ, PM, AC, MD, PJM, HA participated to patients' inclusions.

MC and HC carried out the collection of samples. ES performed miRNA Whole Transcriptome Assay and contributed to the writing. AM performed statistical analyses. IDR and FA supervised the work,

designed the study, analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. All authors have been involved in reading and editing the manuscript, and approved the final version.

Acknowledgements and Funding:

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), the University of Montpellier, the Arthritis Fondation Courtin, Arthritis R&D, the SPILF grant, the Montpellier University Hospital Centre (AOI Artemis) and the Fondation Avenir. We thank the ECELLFRANCE national infrastructure, and CIC.

Ethics approval and consent to participate:

Ethics committees namely CPP (Comité de Protection des Personnes sud méditerranée I) approval has been obtained (214 R24). **Informed consents were provided in accordance with procedures approved by the local human ethics committee (2014-A01561-46).**

Consent for publication:

Not applicable

Availability of data and material:

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

Competing interests:

The authors declare that they have no competing interests

References

- 1 Montgomery NI, Epps HR. Pediatric Septic Arthritis. *Orthopedic Clinics of North America* 2017;**48**:209–216.
- 2 Dubnov-Raz G, Scheuerman O, Chodick G, *et al.* Invasive *Kingella kingae* infections in children: clinical and laboratory characteristics. *Pediatrics* 2008;**122**:1305–9. doi:10.1542/peds.2007-3070
- 3 Ferroni A, Al Khoury H, Dana C, *et al.* Prospective survey of acute osteoarticular infections in a French paediatric orthopedic surgery unit. *Clinical Microbiology and Infection* 2013;**19**:822–8. doi:10.1111/CLM.12031
- 4 Kalinina Ayuso V, Makhotkina N, van Tent-Hoeve M, *et al.* Pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis associated uveitis: the known and unknown. *Survey of Ophthalmology* 2014;**59**:517–31. doi:10.1016/J.SURVOPHTHAL.2014.03.002
- 5 Prakken B, Albani S, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet* 2011;**377**:2138–49. doi:10.1016/S0140-6736(11)60244-4
- 6 Giancane G, Alongi A, Ravelli A. Update on the pathogenesis and treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Current opinion in rheumatology* 2017;**29**:523–9. doi:10.1097/BOR.0000000000000417
- 7 Harris JG, Kessler EA, Verbsky JW. Update on the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Current Allergy and Asthma Reports* 2013;**13**:337–46. doi:10.1007/s11882-013-0351-2
- 8 Dubnov-Raz G, Scheuerman O, Chodick G, *et al.* Invasive *Kingella kingae* infections in children: clinical and laboratory characteristics. *Pediatrics* 2008;**122**:1305–1309.
- 9 Martinot M, Sordet C, Soubrier M, *et al.* Diagnostic value of serum and synovial procalcitonin in acute arthritis: a prospective study of 42 patients. *Clin Exp Rheumatol* 2005;**23**:303–10.
- 10 Honda T, Uehara T, Matsumoto G, *et al.* Sugano M: Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta* 2016;**457**:46–53.
- 11 Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis & Rheumatism* 2012;**64**:11–20. doi:10.1002/art.30651
- 12 Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, *et al.* Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis & Rheumatism* 2008;**58**:1284–92. doi:10.1002/art.23429
- 13 Ono S, Lam S, Nagahara M, *et al.* Circulating microRNA Biomarkers as Liquid Biopsy for Cancer Patients: Pros and Cons of Current Assays. *Journal of clinical medicine* 2015;**4**:1890–907. doi:10.3390/jcm4101890
- 14 Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, *et al.* Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2008;**58**:1001–9. doi:10.1002/art.23386

- 15 Vicente R, Noël D, Pers Y-M, *et al.* Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 2016;**12**:211–20. doi:10.1038/nrrheum.2015.162
- 16 Li D, Duan M, Feng Y, *et al.* MiR-146a modulates macrophage polarization in systemic juvenile idiopathic arthritis by targeting INHBA. *Molecular Immunology* 2016;**77**:205–12. doi:10.1016/J.MOLIMM.2016.08.007
- 17 Schulert GS, Fall N, Harley JB, *et al.* Monocyte MicroRNA Expression in Active Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis Implicates MicroRNA-125a-5p in Polarized Monocyte Phenotypes. *Arthritis & Rheumatology* 2016;**68**:2300–13. doi:10.1002/art.39694
- 18 Sun J, Feng M, Wu F, *et al.* Plasma miR-26a as a Diagnostic Biomarker Regulates Cytokine Expression in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *The Journal of rheumatology* 2016;**43**:1607–14. doi:10.3899/jrheum.150593
- 19 Kamiya Y, Kawada J, Kawano Y, *et al.* Serum microRNAs as Potential Biomarkers of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clinical Rheumatology* 2015;**34**:1705–12. doi:10.1007/s10067-015-2922-1
- 20 Ma X, Wu F, Xin L, *et al.* Differential plasma microRNAs expression in juvenile idiopathic arthritis. *Modern Rheumatology* 2015;**26**:1–9. doi:10.3109/14397595.2015.1060663
- 21 Singh S, Rai G, Aggarwal A. Association of microRNA-146a and its target gene IRAK1 polymorphism with enthesitis related arthritis category of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology International* 2014;**34**:1395–400. doi:10.1007/s00296-014-3001-7
- 22 Aupiais C, Basmaci R, Ilharreborde B, *et al.* Arthritis in children: comparison of clinical and biological characteristics of septic arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Archives of disease in childhood* 2017;**102**:316–22. doi:10.1136/archdischild-2016-310594
- 23 Basmaci R, Ilharreborde B, Bonacorsi S, *et al.* [Septic arthritis in children with normal initial C-reactive protein: clinical and biological features]. *Arch Pediatr* 2014;**21**:1195–9. doi:10.1016/j.arcped.2014.08.032
- 24 Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, *et al.* Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2010;**12**:R86. doi:10.1186/ar3013
- 25 Pritchard CC, Kroh E, Wood B, *et al.* Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)* 2012;**5**:492–7. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370
- 26 Monleau M, Bonnel S, Gostan T, *et al.* Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics* 2014;**15**:395. doi:10.1186/1471-2164-15-395
- 27 Kim Y-K, Yeo J, Kim B, *et al.* Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells. *Mol Cell* 2012;**46**:893–5. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.036

- 28 Rice J, Roberts H, Burton J, *et al.* Assay reproducibility in clinical studies of plasma miRNA. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0121948. doi:10.1371/journal.pone.0121948
- 29 Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, *et al.* Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 2014;**11**:809–15. doi:10.1038/nmeth.3014
- 30 Chen J-Q, Papp G, Póliska S, *et al.* MicroRNA expression profiles identify disease-specific alterations in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren’s syndrome. *PLOS ONE* 2017;**12**:e0174585. doi:10.1371/journal.pone.0174585
- 31 Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, *et al.* microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cellular Immunology* 2010;**260**:70–4. doi:10.1016/J.CELLIMM.2009.10.012
- 32 Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, *et al.* MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2010;**11**:209. doi:10.1186/1471-2474-11-209
- 33 Pauley KM, Cha S. miRNA-146a in rheumatoid arthritis: a new therapeutic strategy. *Immunotherapy* 2011;**3**:829–31. doi:10.2217/imt.11.70
- 34 Churov A V., Oleinik EK, Knip M. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: Altered expression and diagnostic potential. *Autoimmunity Reviews* 2015;**14**:1029–37. doi:10.1016/J.AUTREV.2015.07.005
- 35 Lenert A, Fardo DW. Detecting novel micro RNAs in rheumatoid arthritis with gene-based association testing. *Clinical and experimental rheumatology* 2017;**35**:586–92.
- 36 Malik D, Sharma A, Raina A, *et al.* Deregulated Blood Cellular miR-2909 RNomics Observed in Rheumatoid Arthritis Subjects. *Archives of Medicine* 2015;**7**:1–6.
- 37 Kaul D, Sasikala M, Raina A. Regulatory role of miR-2909 in cell-mediated immune response. *Cell Biochemistry and Function* 2012;**30**:500–4. doi:10.1002/cbf.2828
- 38 Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, *et al.* NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:12481–6. doi:10.1073/pnas.0605298103
- 39 Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, *et al.* miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* 2009;**1792**:497–505. doi:10.1016/j.bbadis.2009.02.013
- 40 Wang L, Qin Y, Tong L, *et al.* MiR-342-5p suppresses coxsackievirus B3 biosynthesis by targeting the 2C-coding region. *Antiviral Research* 2012;**93**:270–9. doi:10.1016/J.ANTIVIRAL.2011.12.004
- 41 Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, *et al.* MicroRNA Fingerprints Identify miR-150 as a Plasma Prognostic Marker in Patients with Sepsis. *PLoS ONE* 2009;**4**:e7405. doi:10.1371/journal.pone.0007405

- 42 Li Q, Fang Y, Zhu P, *et al.* Burkholderia pseudomallei survival in lung epithelial cells benefits from miRNA-mediated suppression of ATG10. *Autophagy* 2015;**11**:1293–307. doi:10.1080/15548627.2015.1058474
- 43 Wong SC, Dobie R, Altowati MA, *et al.* Growth and the Growth Hormone-Insulin Like Growth Factor 1 Axis in Children With Chronic Inflammation: Current Evidence, Gaps in Knowledge, and Future Directions. *Endocrine Reviews* 2016;**37**:62–110. doi:10.1210/er.2015-1026
- 44 Wiegering V, Girschick HJ, Morbach H. B-cell pathology in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis* 2010;**2010**:1–6. doi:10.1155/2010/759868
- 45 Barnes MG, Grom AA, Thompson SD, *et al.* Subtype-specific peripheral blood gene expression profiles in recent-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2009;**60**:2102–12. doi:10.1002/art.24601
- 46 Koca B, Sahin S, Adrovic A, *et al.* Cardiac involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology International* 2017;**37**:137–42. doi:10.1007/s00296-016-3534-z
- 47 Nicolau J, Lequerré T, Bacquet H, *et al.* Rheumatoid arthritis, insulin resistance, and diabetes. *Joint Bone Spine* 2017;**84**:411–6. doi:10.1016/J.JBSPIN.2016.09.001

Key messages:

What is already known about this subject?

- Diagnostic of acute arthritis among children is challenging because of the risk of joint damage and absence of reliable biological markers that could discriminate between different forms of juvenile arthritis at presentation.
- miRNAs have been proposed to serve as diagnostic biomarkers.

What does this study add?

- Synovial fluid miRNAs discriminate better children with JIA and SA than serum miRNAs.
- A combination of 3 miRNAs in synovial fluid is able to distinguish between JIA and SA patients at presentation

How might this impact on clinical practice or future developments?

- For the first time, new biomarkers for diagnosing inflammatory and septic arthritis provide a valuable option for optimal therapy management by clinicians.

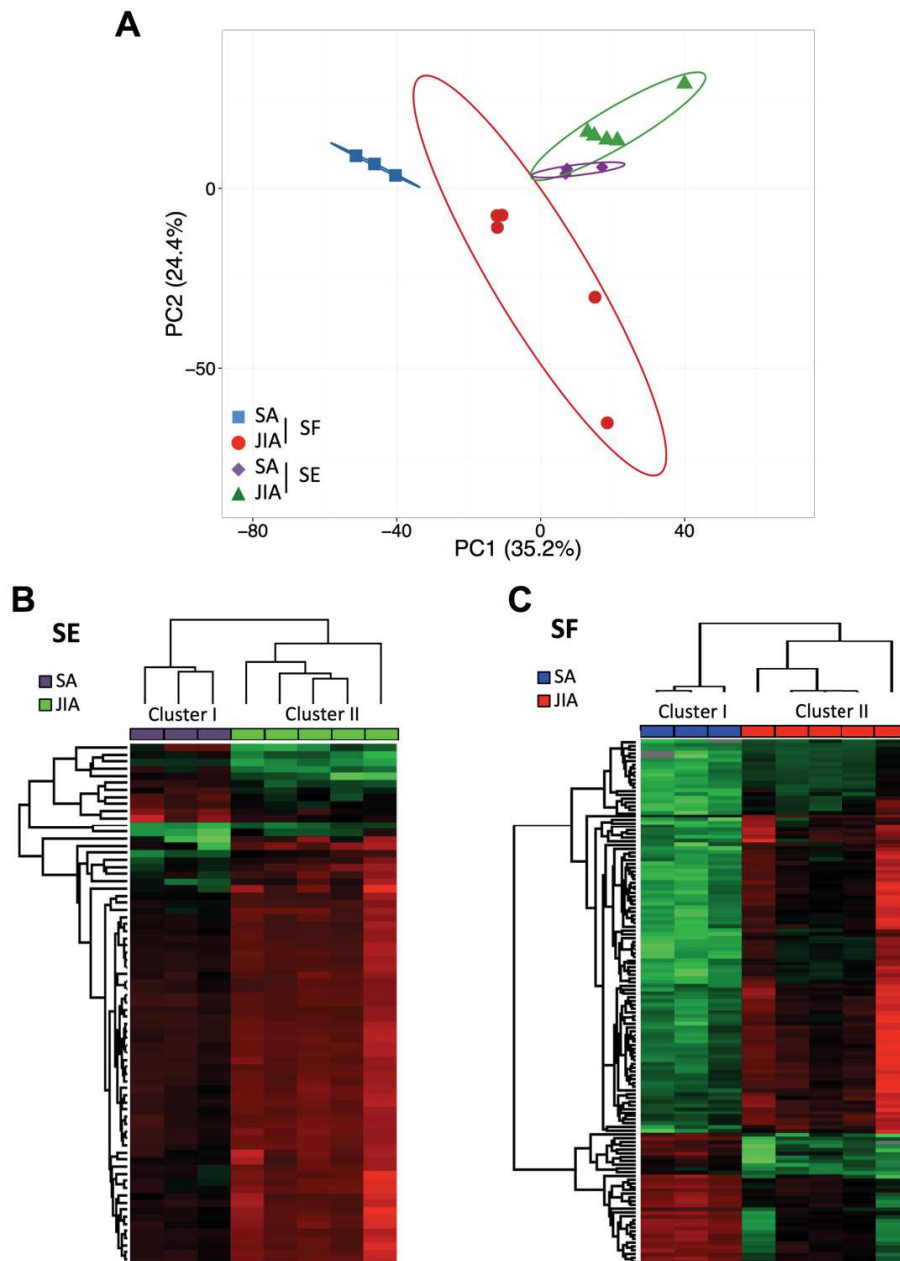


Fig. 1: Principal component analysis (PCA) and cluster analysis of miRNA expression in articular synovial fluid (SF) and serum (SE) of children with inflammatory and septic arthritis.

A) Global views of miRNAs expression using the Principal Component Analysis (PCA) between SF (red and blue), and SE (violet and green) samples from septic (SA) or Juvenile idiopathic arthritis (JIA). **B)** Hierarchical clustering analysis of miRNAs expression profile in SE for JIA (n=5; green) and SA (n=3; violet) patients. **C)** Hierarchical clustering analysis of miRNAs expression profile in SF of JIA (n=5; red) and SA (n=3; blue) patients. Columns represent type sample and rows miRNAs. Color map is used to distinguish the difference of expression, Green indicates low expression levels; red indicates high expression levels. JIA: Juvenile idiopathic arthritis; SA: septic arthritis

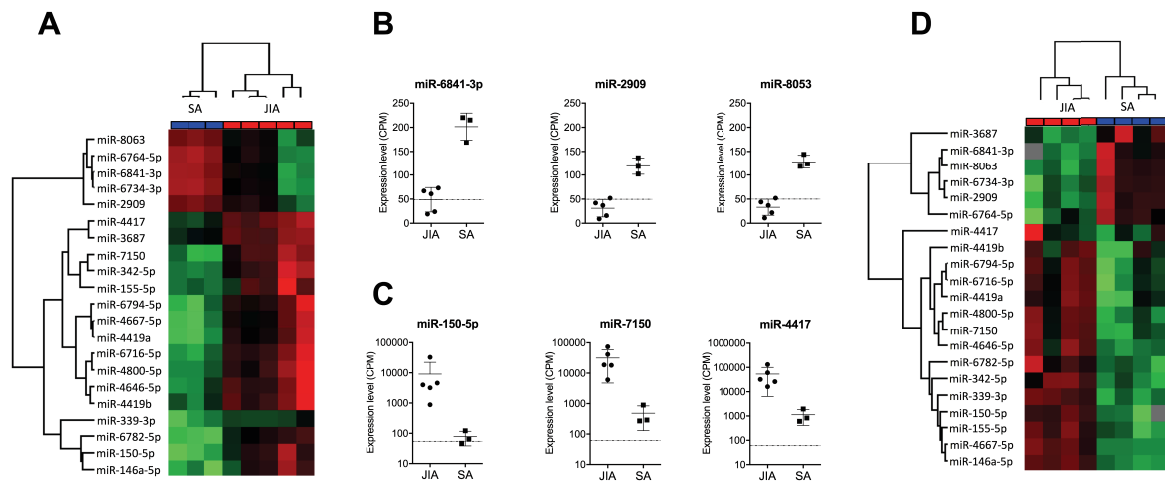


Fig. 2: Identification of a miRNA-based signature in the synovial fluid of juvenile arthritis that discriminates between inflammatory and septic arthritis

A) Hierarchical clustering of the 21 miRNAs deregulated in synovial fluid, selected with a p-value threshold <0.01, fold change >4 or <-2 between juvenile idiopathic arthritis (JIA) and septic arthritis (SA), and expression levels >100 CPMs. Color map is used to distinguish the difference of expression, Green indicates low expression levels; red indicates high expression levels. B) Expression levels of the 3 most down-regulated miRNAs in the synovial fluid of JIA versus SA. C) Expression levels of the 3 most up-regulated miRNAs in the synovial fluid of JIA versus SA. D) Hierarchical clustering of the 21 synovial fluid miRNAs detected in a second exploratory cohort of non-centrifuged samples. JIA: Juvenile idiopathic arthritis; SA: septic arthritis

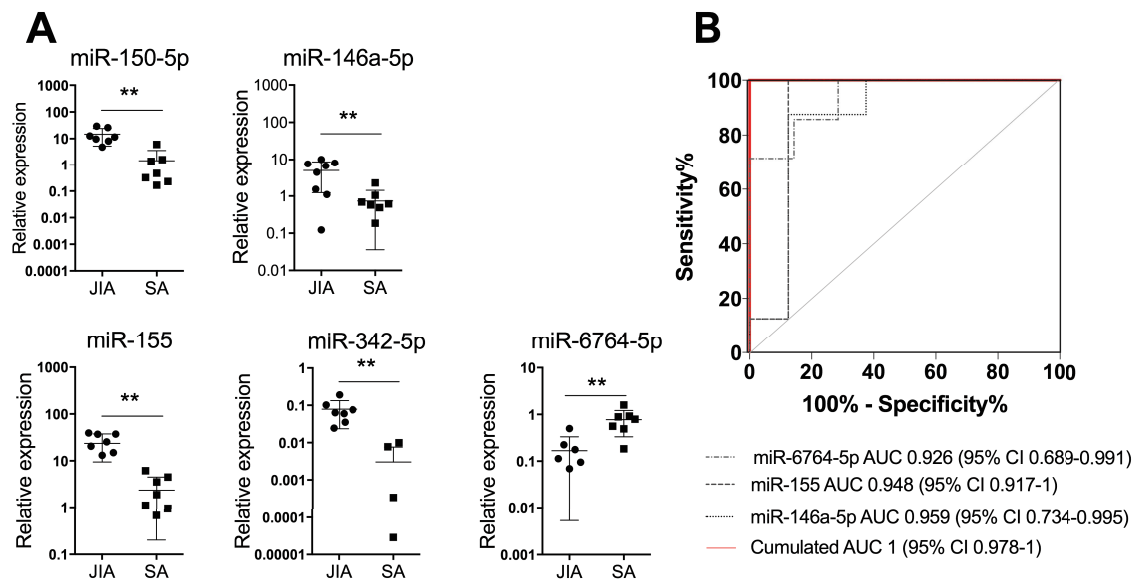


Fig. 3: A synovial fluid combination of 3 miRNAs distinguishes JIA from SA at initial presentation.

A) Scatterplots show relative expression levels of miR-150-5p, miR-146a-5p, miR-155, miR-342-5p and miR-6764-5p in synovial fluid of JIA (n=9) and SA (n=9) samples patients. Differences between groups were compared using non-parametric Mann-Whitney test ** p<0.01. B) The Receive operating characteristic (ROC) curve and the area under the ROC curve (AUC) AUC values were estimated using mROC software. ROC curves for miRNA with statistically significant results and their references line are provided. The best linear combination (virtual marker) of miRNA expression is maximized to discriminate JIA and SA (red line), with AUC 1 and p=0.0017. JIA: Juvenile idiopathic arthritis; SA: septic arthritis

	Exploration cohort						Validated cohort		
	Centrifuged			Non-centrifuged			Centrifuged		
	JIA (n=5)	SA (n=3)	<i>p Value</i>	JIA (n=4)	SA (n=4)	<i>p Value</i>	JIA (n=9)	SA (n=9)	<i>p Value</i>
Age at sampling (years)	10.3 ± 3.7	1.2 ± 0.1	0.036	7.5 ± 3.9	1.7 ± 0.6	0.057	8.9 ± 3.7	1.2 ± 0.2	0.0002
	Number of affected joints % (n)								
Monoarthritis	40 (2)	100 (3)	/	50 (2)	100 (4)	/	55.5 (5)	100 (9)	/
Oligoarthritis	60 (3)	0 (0)	/	50 (2)	0 (0)	/	45.5 (4)	0 (0)	/
	% of affected joints (n)								
Knee	100 (5)	100 (3)	/	4	1	/	100 (9)	100 (9)	/
Hip	0 (0)		/	0	2	/	0 (0)	0 (0)	/
Ankle	40 (2)		/	0	0	/	22.2 (2)	0 (0)	/
Shoulder	20 (1)		/	0	1	/	0 (0)	0 (0)	/
	% of bacterial contamination (n)								
Kingella Kingae	NA	100 (3)	/	NA	100 (4)	/	NA	100 (9)	/
Staphylococcus aureus	NA	0(0)	/	NA	0(0)	/	NA	11.1 (1)	/
C- Reactive Protein (CRP)	20.3 ± 33.5	23.9 ± 4.4	<i>ns</i>	5.3	48.0 ± 24.6	<i>NA</i>	13.6 ± 23.0	28.6 ± 15.6	0.042
blood WBC (x10 ⁹ /L)	6.8 ± 1.1	12.7 ± 1.8	0.018	4.4	10.1 ± 4.3	<i>NA</i>	7.1 ± 2.9	12.3 ± 3.6	0.002
Neutrophil (x10 ⁹ /L)	3.8 ± 1.0	7.5 ± 1.6	<i>ns</i>	NA	5.5 ± 3.6	<i>NA</i>	4.0 ± 2.1	4.4 ± 3.0	<i>ns</i>
Haemoglobin (g/dL)	11.9 ± 1.0	11.4 ± 0.9	<i>ns</i>	NA	11.1 ± 1	<i>NA</i>	11.9 ± 4.0	11.4 ± 4.0	<i>ns</i>
Platelets (x10 ⁹ /L)	310 ± 65	368 ± 29	<i>ns</i>	NA	501 ± 176	<i>NA</i>	320 ± 119	385 ± 144	<i>ns</i>

Table 1: Clinical and biological characteristics of children with juvenile idiopathic arthritis and septic arthritis

JIA: Juvenile idiopathic arthritis; SA: septic arthritis; NA: not applicable; CRP: C reactive protein; WBC: whole blood cell; NA: not applicable; NS: not significant

Synovial fluid				
miRNA name	Centifuged		Non-Centrifuged	
	log ₂ (FC)	<i>p-values</i>	log ₂ (FC)	<i>p-values</i>
miR-146a-5p	5,08	0.010	6.90	8.8E-06
miR-150-5p	5,95	0.002	6.08	0.0008
miR-155-5p	4,00	0.022	5.22	0.0007
miR-2909	-2,19	0.01	-2.12	0.002
miR-339-3p	4,32	0.006	7.54	0.00008
miR-342-5p	4,57	0.004	2.25	0.001
miR-3687	4,42	0.0007	-1.13	0.012
miR-4417	5,34	0.0005	0.42	0.395
miR-4419a	4,21	0.002	4.20	0.020
miR-4419b	4,19	0.005	1.68	0.105
miR-4646-5p	4,21	0.004	1.75	0.004
miR-4667-5p	4,01	0.005	3.29	0.00003
miR-4800-5p	4,83	0.005	2.83	0.003
miR-6716-5p	4,89	0.002	4.86	0.009
miR-6734-3p	-2,09	0.005	-1.58	0.003
miR-6764-5p	-2,12	0.006	-1.75	0.022
miR-6782-5p	4,76	0.0003	4.18	0.005
miR-6794-5p	4,16	0.004	3.37	0.010
miR-6841-3p	-2,24	0.007	-1.38	0.022
miR-7150	5,79	0.0007	4.90	0.004
miR-8063	-2,14	0.009	-2.37	0.002

Table 2: Selected miRNAs differentially regulated in JIA synovial fluid samples.

Expression of miRNAs is plotted as fold change (FC) from JIA (n=5) versus Septic (n=3) patients in synovial fluid (SF). SF samples were centrifuged (or not) before miRNA quantification. JIA: Juvenile idiopathic arthritis; SA: septic arthritis

PathName	miRNA number	miRNAs	P value, FDR corrected (range)
Insulin Signaling	18	miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-6716-5p, miR-6734-3p, miR-6764-5p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-6841-5p, miR-8063	3.4e-02 to 1.3e-07
B Cell Receptor Signaling Pathway	16	miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-4800-5p, miR-6734-3p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-8063	4.8e-02 to 6.5e-06
EGF EGFR Signaling Pathway	16	miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4667-5p, miR-4800-5p, miR-6716-5p, miR-6734-3p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-8063	4.5e-02 to 2.4e-06
Calcium Regulation in the Cardiac Cell	15	miR-150-5p, miR-2909, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-4800-5p, miR-6716-5p, miR-6734-3p, miR-6764-5p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-8063	4.5e-02 to 7.97e-08
DNA damage response only ATM dependent	15	miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-6716-5p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-8063	4.9e-02 to 8.15e-05
MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy	15	miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-4800-5p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-6841-5p, miR-8063	3.2e-02 to 7.91e-07
Adipogenesis	13	miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-2909, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4800-5p, miR-6734-3p, miR-6764-5p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-8063	4.6e-02 to 5.575e-05
G Protein Signaling Pathways	13	miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-2909, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4667-5p, miR-4800-5p, miR-6734-3p, miR-6764-5p, miR-6782-5p, miR-7150, miR-8063	4.7e-02 to 1e-04
Regulation of Actin Cytoskeleton	12	miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-6841-5p, miR-8063	4.1e-02 to 8.3e-06
MAPK signaling pathway	12	miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-6734-3p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-6841-5p, miR-8063	4.8e-02 to 5.0e-05
Myometrial Relaxation and Contraction Pathways	12	miR-150-5p, miR-2909, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4667-5p, miR-4800-5p, miR-6716-5p, miR-6734-3p, miR-6764-5p, miR-6782-5p, miR-7150	4.7e-02 to 6e-04
TGF beta Signaling Pathway1	12	miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-6734-3p, miR-7150, miR-6841-5p, miR-8063	4.8e-02 to 7.6e-09
AMPK signaling	11	miR-2909, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-6716-5p, miR-6734-3p, miR-6764-5p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-8063	4e-02 to 8e-04
Leptin signaling pathway	11	miR-146a-5p, miR-2909, miR-342-5p, miR-4419b, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-6734-3p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150, miR-8063	4.8e-02 to 2e-04
Apoptosis	9	miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-4419b, miR-6794-5p, miR-8063	2.7e-02 to 4e-04

RANKL RANK Signaling Pathway	9	miR-150-5p, miR-155-5p, miR-2909, miR-339-3p, miR-342-5p, miR-3687, miR-4667-5p, miR-6794-5p, miR-6841-5p	4.8e-02 to 5e-04
ErbB signaling pathway	8	miR-150-5p, miR-2909, miR-342-5p, miR-4667-5p, miR-6734-3p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150	4.8e-02 to 4e-04
Nuclear Receptors	8	miR-150-5p, miR-155-5p, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4667-5p, miR-6734-3p, miR-6782-5p, miR-6794-5p, miR-7150	4.8e-02 to 3.5e-05
Prolactin Signaling Pathway	8	miR-2909, miR-342-5p, miR-4419a, miR-4646-5p, miR-4667-5p, miR-6716-5p, miR-6734-3p	4.6e-02 to 1e-04

Table 3: Biologic pathways enriched by differentially expressed miRNAs in JIA and SA patients

Abbreviations: FDR, false discovery rate; EGF, Epidermal Growth Factor, EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; ATM, Ataxia Telangiectasia Mutated; MAPK, mitogen-activated protein kinase; TGF, transforming growth factor; AMPK, 5' AMP-activated protein kinase ; RANKL, Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; ErbB, Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase.

Synovial fluid miRNA signature diagnoses and discriminates juvenile idiopathic arthritis and septic arthritis

Nadege NZIZA^{1,2*}, Eric JEZIORSKI^{3,4*}, Marion DELPONT⁵, Mailys CREN¹, Hugues CHEVASSUS^{7,8}, Aurélie CARBASSE³, Perrine MAHE³, Hamouda ABASSI³, Pauline JOLY MONTRIGAL⁵, Eric SCHORDAN⁶, Alain MANGE⁹, Christian JORGENSEN^{1,10}, Florence APPARAILLY^{1,10*}, Isabelle DUROUX-RICHARD^{1*}✉

Study population, collection and preparation of synovial fluid and serum samples for miRNA studies.

The patient benefit from a standard exploration ie : blood cell count, CRP dosage, synovial liquid direct examination and bacteriological analysis were systematic for SA and made on demand for JIA. Direct examination consists cell identification and count without cytological analysis. Children presenting an acute arthritis requiring a puncture were included if there were between 6 months and 15 years old and complete the diagnosis criteria for JIA and SA. JIA patients have to complete the International League of Associations for Rheumatology (ILAR) criteria. Patients with systemic JIA, or having steroids, biological therapy or DMARDS in the month preceding the puncture were excluded. SA patients were included when a bacteriological identification was validated in the synovial fluid using culture according to national guidelines, or using specific PCR for *Kingella Kingae*.

SE samples were collected using BD Vacutainer tubes (BD Diagnostics, France) according to standard procedure. Using centrifugation at 1500g during 10 min, whole blood was separated into SE and cellular fractions within 2h following collection. Sera were stored at -80°C . SF were collected using clinical recommendation and performed by experienced orthopaedic surgeons with local anesthesia and aseptic condition, and were collected using BD Vacutainer tubes (BD Diagnostics, France) heparin-treated, centrifuged or not (300g, 10min), aliquoted and frozen at -80°C .

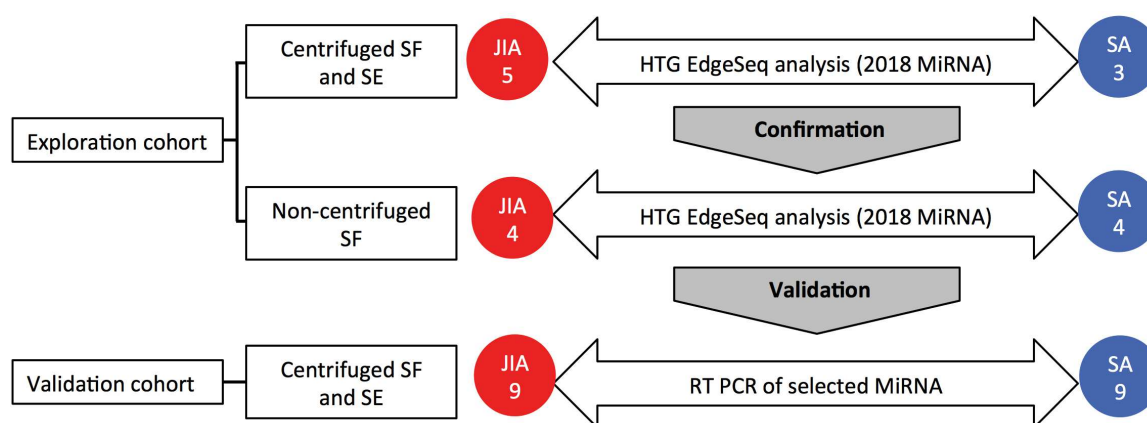


Figure S1. Cohort of synovial fluid and serum samples for miRNA studies. Figure S2. Volcano plot of miRNAs differentially expressed in juvenile rheumatoid arthritis in comparison with septic arthritis identified by WTA.

HTG EdgeSeq miRNA whole transcriptome

To identify miRNA in plasma of patient samples, miRNA profiling of 2084 miRNA was performed using HTG EdgeSeq miRNA whole transcriptome targeted sequencing assay (HTG WTA, HTG Molecular, Tuscon, United States). This technology is based on nuclease protection targeted RNA sequencing assay that uses an extraction free lysis process followed by a nuclease protection assay (NPA) to prepare a stoichiometric library of nuclease protection probes (NPP) for measurement.

HTG EdgeSeq run : HTG whole transcriptome miRNA (WTA) kit was used (HTG WTA, HTG Molecular, Tuscon, United States). Samples were prepared accordingly to the following protocol: 15 µl of plasma lysis buffer and 15 µl of synovial fluid sample and 3 µl of Proteinase K are mixed and incubated at 50°C for 3h with orbital shaking. 25 µl of the mix is transferred to the HTG sample plate and loaded into the HTG processor to perform the nuclease protection assay and prepare the stoichiometric NPP.

Molecular Barcoding and Adapter Addition : For synovial fluid samples, barcoding is performed using Hemo KlenTaq (MO332S, NEB, Evry, France) enzyme. For each sample, we mix 2.4 µl of Hemo KlenTaq, 0.6 µl of dNTPs (10 nM) (NEB, N0447S), 6 µl of OneTaq PCR GC Buffer 5X (B9023S, NEB, Evry, France), 3 µl of Forward and Reverse Primers (HTG WTA, HTG Molecular, Tuscon, United States), 3 µl of sample preparation and 12 µl of H₂O. PCR step was performed on ABI 2720 Thermocycler using the following cycling profile: 95°C for 4 min followed by 16 cycles of 95°C for 15 sec, 55°C for 45 sec and 68°C for 45 sec. Protocol is ended with 68°C for 10 min.

PCR clean up: In order to remove excess of primer from the library, Agencour AMPure XP beads (A63880, Beckmancoulter, Villepinte, France) were used. For each sample, 37.5 µl of AMPure XP beads are used in combination with 15 µl of the PCR product. After mixing 10 times with pipette, the solution is incubated for 5 min at room temperature and then placed on the magnetic stand. After 2 minutes to separate beads, the cleared solution is carefully removed without disturbing the beads. Beads are washed 2 times with 200 µl of Ethanol 80%. Elution of PCR product link to the beads is performed with 25 µl of H₂O. The purified solution of PCR product is place in a new tube while the plate is on the magnetic stand to separate PCR products and beads.

Determination of library concentration: To determine concentration of library for each samples, Kapa Biosystems qPCR Kit (KK4824, Cliniscience, Nanterre, France) is used. For each reaction, the mix is composed of 12 µl of Mastermix, 0.4 µl of ROX dye, 3.6 µl of H₂O and 4 µl of template (standards or library diluted at 1/10000). The samples were run on a ABI PRISM 7900HT (High ROX) will the

following cycles: 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 30 sec and 65°C for 45°C with data collection followed by a dissociation curve. Standards are corresponding to an amplicon of 452 bp whereas the amplicon of NPP with barcode correspond to 115 bp. The ratio is applied to determine the concentration of each library.

Sample pooling and sequencing: Each sample is pooled in order to generate a pooled library at 4 nM. From this pooled library, 5 µl were mixed with 0.2N NaOH freshly prepared and incubated for 2 min. The solution was vortexed briefly and centrifuged at 280g for 1 minute and mixed with 990 µl of pre-chiller HT1 buffer (Illumina NextSeq Reagent v2 kit, Illumina, Paris, France). 5% PhiX (PhiX control v3, Illumina, Paris, France) at 20 pM was prepared and 570 µl of prepared denatured library at 20 pM was mixed with 30 µl of 20 pM PhiX and loaded into NextSeq High output v2 75 cycles kit and sequenced.

Sequence Analysis: Sequencing data were first analysed and checked by the use of Q30 metric. NGS run must fulfil Illumina recommendation. Data reconstruction and analysis was performed using directly FASTQ files from the Illumina NextSeq platform and processed by the HTG Parser software.

Normalization: Before the normalization of the data, a negative control (ANT) QC is performed on parsed raw data. For samples with high number of reads in negative control (over 150 CPM), samples are flagged as QC failure and are removed from the analysis. The normalization is constructed on 9 steps: 1) Removal of the background of the sample (mean of the negative control) which is subtracted to all miRNAs. 2) All negative values are set to 0. 3) Data transformation in CPM for all samples (CPM: Count Per Million). 4) Logarithmic (base 10) transformation. 5) Mean of each miRNA. 6) Mean of the miRNAs is subtracted to each miRNA. 7) Re-transformation of the data with exponential function. 8) Computation of the median of each sample. 9) Data before logarithm transformation (data of the step 3) is divided by the median of each sample (step 8).

miRNA extraction and quantification

Reverse transcription of the miRNAs and preamplification were performed with 2 µl of RNA sample eluent using TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit and TaqMan® PreAmp Master Mix, respectively. Due to the small amounts of SF, it was necessary to adapt the taqman miRNA quantification method by performing two times preamplification of the cDNAs. Specificity, linearity and efficacy of miRNA quantification have been validated (online supplementary Figure S3). Although it would have been preferable to use EDTA tubes, SF samples were collected in heparinized tubes for constraints related to the study. Nevertheless, since we compared samples from the same processing source in the present study, we are in accordance with the MIQE guidelines for minimum information for the publication of RT-qPCR experiments [1]. The TaqMan reactions were performed using the Taqman miRNA assays (ThermoFisher Scientific) for the following miRNAs (hsa-miR-4417, hsa-miR-7150, hsa-miR-3687, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-6794-5p, hsa-miR-4800-5p, hsa-miR-4646-5p, hsa-miR-6782-5p, hsa-miR-4419a/b, hsa-miR-4667-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-6716-5p, hsa-miR-6734-3p, hsa-miR-6841-3p, hsa-miR-6764-5p, hsa-miR-8063, hsa-miR-2909, miR-648 and miR-4519), and qPCR was performed on a ViiA 7™ system using TaqMan® Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific). For each sample of SE and SF, a normalization of the Ct values was performed. To do so, the mean of the Ct values was calculated and a normalization factor was applied based on this formula: normalization factor = $2^{-(\text{Mean Ct} - \text{sample Ct})}$.

Statistical analysis

Data were analyzed using Perseus software [2]. The differentially expressed probe-sets were filtered with query parameters using a signal threshold, the detection p-value, and the present call rate to detect the present miRNAs. False Discovery Rate (FDR) was determined with a threshold of 0.01 and \log_2 (fold change (FC) <-2 and > +2), or \log_2 (FC <-2 and > +4) to identify differences of miRNA

expression. Heatmaps and hierarchical clustering were performed using z-scores transformed from the original normalized values.

GraphPad prism software was used to perform ROC curve and the area under the ROC curve (AUC) determination. The generalized ROC criterion [3] finds the best linear combination (virtual marker) of miRNA expression such that the area under the ROC curve (AUC) is maximized [4].

References

- 1 Bustin SA, Benes V, Garson JA, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;**55**:611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- 2 Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods* 2016;**13**:731–40. doi:10.1038/nmeth.3901
- 3 Faraggi D, Kramar A. Methodological issues associated with tumor marker development: Biostatistical aspects. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2000;**5**:211–3. doi:10.1016/S1078-1439(00)00075-2
- 4 Kramar A, Faraggi D, Fortuné A, *et al.* mROC: a computer program for combining tumour markers in predicting disease states. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 2001;**66**:199–207. doi:10.1016/S0169-2607(00)00129-2

Additional files

Additional file 1:

Fig. S2: Volcano plot of differentially miRNAs expressed in juvenile rheumatoid arthritis in comparison with septic arthritis identified by WTA.

Figure S3. Double preamplification validation.

Table S1. List of 141 miRNAs deregulated in synovial fluid.

Table S2. ROC curve analysis of miRNAs in synovial fluid and serum.

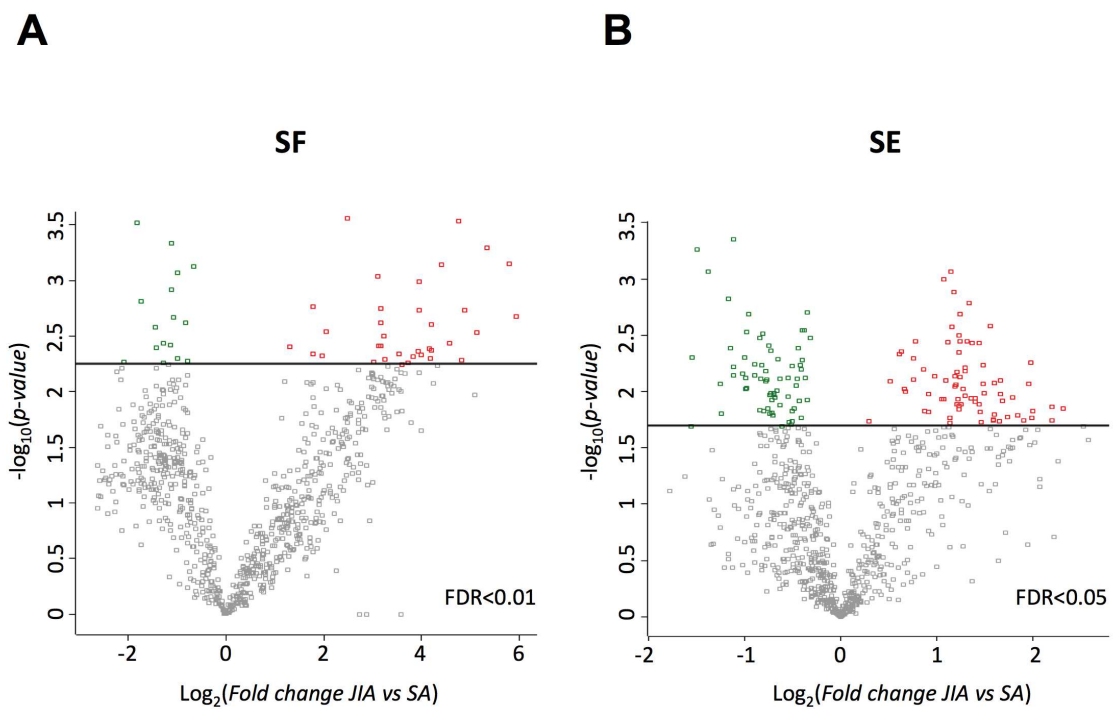


Fig. S2: Volcano plot of differentially miRNAs expressed in juvenile rheumatoid arthritis in comparison with septic arthritis identified by WTA.

miRNA with a FDR corrected $p\text{-value} < 0.01$ or 0.05 are depicted for synovial fluid (**A**) or serum (**B**) sample, respectively. Data points represent individual miRNA plotted as $-\log(\text{FDR})$ versus \log_2 fold change. Red or green points in the plot represent the differentially expressed miRNA with statistical significance with up- or down-deregulated in inflammatory arthritis comparing with septic disease.

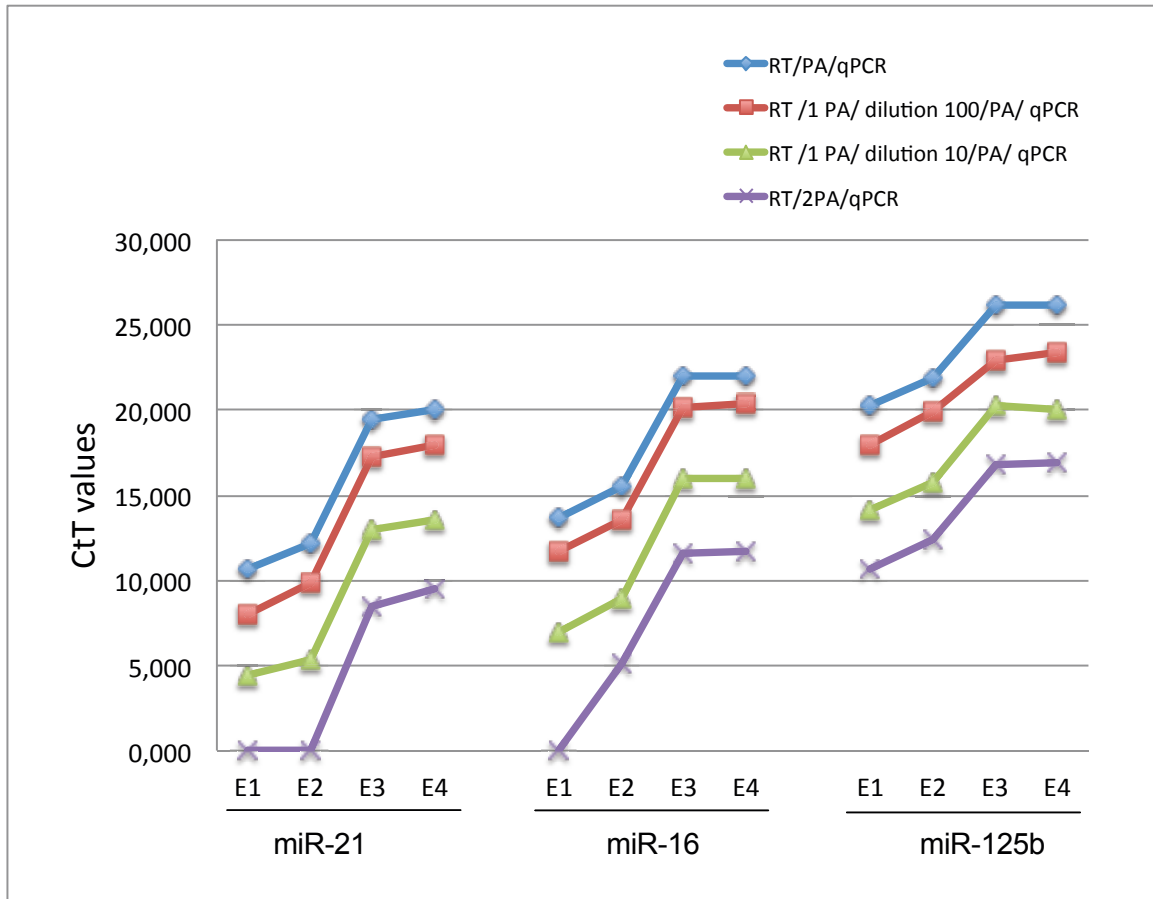


Fig. S3: Double preamplification validation

Total RNAs, including small RNAs, were extracted from 100 μ l of 4 independent biological fluids (E1, E2, E3 and E4) using a miRNeasy Serum/Plasma kit with a Qiacube (QIAGEN) according to the manufacturer's instruction. For each sample eluent (from the sample isolation procedure) 2 μ l was used to perform reverse transcription, following preamplification. In blue, CT values obtained after preamplification and qPCR (classical protocol from life technology) are represented. In red or green, first pre-amplification products diluted 100 or 10 times, before preamplification and qPCR are showed. Finally, first preamplification products that were used directly for second preamplification before qPCR are represented in violet.

miRNA name	Log ₂ (FC)	miRNA name	Log ₂ (FC)	miRNA name	Log ₂ (FC)	miRNA name	Log ₂ (FC)
hsa-miR-6841-3p	-2,24	hsa-miR-150-5p	5,95	hsa-miR-5196-5p	3,39	hsa-miR-3648	2,92
hsa-miR-2909	-2,19	hsa-miR-7150	5,79	hsa-miR-6127	3,37	hsa-miR-4530	2,92
hsa-miR-8063	-2,14	hsa-miR-4417	5,34	hsa-miR-149-3p	3,34	hsa-miR-7109-5p	2,84
hsa-miR-6764-5p	-2,12	HK_SNORA66	5,12	hsa-miR-6778-5p	3,33	hsa-miR-7846-3p	2,79
hsa-miR-6734-3p	-2,09	hsa-miR-146a-5p	5,08	hsa-miR-6865-5p	3,32	hsa-miR-6894-5p	2,78
hsa-miR-3690	-1,90	hsa-miR-6716-5p	4,89	hsa-miR-671-5p	3,31	hsa-miR-6756-5p	2,74
hsa-miR-15b-3p	-1,82	hsa-miR-4800-5p	4,83	hsa-miR-6852-3p	3,31	hsa-miR-7106-5p	2,72
hsa-miR-6782-3p	-1,73	hsa-miR-6782-5p	4,76	hsa-miR-2861	3,27	hsa-miR-663b	2,72
hsa-miR-6748-3p	-1,73	hsa-miR-342-5p	4,57	hsa-miR-6877-5p	3,25	hsa-miR-3131	2,71
let.7a.2-3p	-1,65	hsa-miR-3687	4,42	hsa-miR-6821-3p	3,24	hsa-miR-6132	2,70
HK_RPS12	-1,63	hsa-miR-339-3p	4,32	hsa-miR-2392	3,24	hsa-miR-4487	2,57
hsa-miR-3926	-1,54	hsa-miR-648	4,24	hsa-miR-1908-5p	3,23	hsa-miR-1914-3p	2,55
hsa-miR-2116-3p	-1,45	hsa-miR-4646-5p	4,21	hsa-miR-4309	3,22	hsa-miR-4253	2,55
hsa-miR-4269	-1,43	hsa-miR-4419a	4,21	hsa-miR-1343-5p	3,22	hsa-miR-1275	2,54
hsa-miR-1244	-1,43	hsa-miR-4419b	4,19	hsa-miR-6769a-5p	3,21	hsa-miR-4461	2,49
hsa-miR-5589-5p	-1,42	hsa-miR-6794-5p	4,16	hsa-miR-766-5p	3,18	hsa-miR-4728-5p	2,49
hsa-miR-3619-3p	-1,37	hsa-miR-4667-5p	4,01	hsa-miR-6789-5p	3,17	hsa-miR-920	2,48
HK_PPIA	-1,30	hsa-miR-155-5p	4,00	hsa-miR-4484	3,17	hsa-miR-4688	2,45
hsa-miR-7156-3p	-1,29	hsa-miR-4442	3,96	hsa-miR-6875-5p	3,16	hsa-miR-501-5p	2,34
hsa-miR-18a-3p	-1,28	hsa-miR-1291	3,95	hsa-miR-1237-5p	3,16	hsa-miR-6870-3p	2,28
hsa-miR-6801-5p	-1,27	hsa-miR-4291	3,95	hsa-miR-33b-5p	3,16	hsa-miR-1307-5p	2,26
hsa-miR-1322	-1,27	hsa-miR-5703	3,92	hsa-miR-4257	3,13	hsa-miR-1307-3p	2,05
hsa-miR-885-5p	-1,18	hsa-miR-4463	3,83	hsa-miR-3141	3,12	hsa-miR-3180	2,05
hsa-miR-1976	-1,16	hsa-miR-6088	3,78	hsa-miR-1225-5p	3,11	hsa-miR-320a	1,96
hsa-miR-6729-3p	-1,15	hsa-miR-765	3,72	hsa-miR-6741-5p	3,10	hsa-miR-3140-3p	1,95
hsa-miR-1270	-1,14	hsa-miR-6797-5p	3,66	hsa-miR-4270	3,06	hsa-miR-3180-3p	1,79
hsa-miR-6731-3p	-1,12	hsa-miR-3912-3p	3,60	hsa-miR-7845-5p	3,04	hsa-miR-6780b-5p	1,78
hsa-miR-761	-1,11	hsa-miR-711	3,60	hsa-miR-6880-5p	3,03	hsa-miR-320d	1,78

hsa-miR-128.1-5p	-1,09	hsa-miR-4644	3,59	hsa-miR-6133	3,03	hsa-miR-4429	1,78
hsa-miR-146a-3p	-1,07	hsa-miR-8085	3,59	hsa-miR-23a-5p	3,02	hsa-miR-6723-5p	1,78
hsa-miR-1200	-1,07	hsa-miR-4478	3,55	hsa-miR-4505	3,00	hsa-miR-320c	1,74
hsa-miR-1306-5p	-1,00	hsa-miR-6870-5p	3,54	hsa-miR-625-5p	3,00	hsa-miR-320b	1,66
hsa-miR-1183	-0,99	hsa-miR-4665-5p	3,50	hsa-miR-6085	2,99	hsa-miR-5008-5p	1,31
hsa-miR-1202	-0,83	hsa-miR-4430	3,50	hsa-miR-4534	2,99	hsa-miR-1299	1,20
hsa-miR-130b-5p	-0,67	hsa-miR-6776-5p	3,46	hsa-miR-4784	2,97		
		hsa-miR-4481	3,44	hsa-miR-7108-5p	2,97		

Table S1: Liste of 141 miRNAs deregulated in synovial fluid

Fold change (FC) of miRNA expression in JIA versus SA.

Synovial Fluid	
AUC 95% CI	
miR-155-5p	0.997 95% CI [0.917-1]
miR-150-5p	0.959 95% CI [0.76-0.997]
miR-146a-5p	0.948 95% CI [0.734-0.995]
miR-6764-5p	0.926 95% CI [0.689-0.991]
miR-342-5p	0.915 95% CI [0.669-0.989]
miR-339-3p	0.634 95% CI [0.5-0.862]
miR-223-5p	0.593 95% CI [0.5-0.835]
miR-6841-5p	0.563 95% CI [0.5-0.81]
miR-648	0.518 95% CI [0.5-0.732]
miR-4519	ND

Table S2: ROC curve analysis of miRNAs in synovial fluid and serum.

Abbreviations: AUC, area under the curve; CI, confidence interval; ROC, receiver operating characteristic; ND: not determined.

3. Etude des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l’AJI

Introduction

L’arthrite juvénile idiopathique (AJI) est un groupe hétérogène de rhumatismes inflammatoires chroniques affectant les enfants de moins de 16 ans (Petty et al., 2004). Cette atteinte inflammatoire d’origine inconnue touche 2 à 20 individus sur 100 000 par an et est caractérisée par une arthrite persistant plus de 6 semaines en l’absence de traitements (Prakken et al., 2011). Sept sous-types sont identifiés en fonction du nombre d’articulations atteintes et la présence de certaines manifestations extra-articulaires durant les 6 premiers mois de la maladie. Le sous-type le plus courant en Europe est l’AJI oligoarticulaire qui représente 50% des cas. Ce dernier est caractérisé par une atteinte d’une à 4 articulations au cours des 6 premiers mois de la maladie et présente comme complication majeure le développement d’une uvéite (Prakken et al., 2011). En raison de l’hétérogénéité clinique et du faible nombre de patients touchés, les bases physiopathologiques de l’AJI restent encore mal comprises. Par conséquent, la classification actuelle manque de robustesse, ce qui complique le diagnostic de cette pathologie.

Un fonctionnement anormal de l’immunité innée et adaptative est observé dans l’AJI (de Jager et al., 2007; Macaubas et al., 2009; Murray et al., 1996). Les monocytes jouent un rôle majeur dans la réaction inflammatoire périphérique et synoviale. Trois sous-populations de monocytes ont été identifiées sur base de l’expression des marqueurs membranaires CD14 et CD16, à savoir les monocytes classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$), les intermédiaires ($CD14^{++}CD16^{+}$) et les non classiques ($CD14^{+}CD16^{++}$) (Wong et al., 2012). Chez l’homme, les monocytes classiques représentent environ 85% des monocytes circulants. Ils expriment de façon importante CCR2, le récepteur membranaire de la chimiokine MCP1, sont spécialisés dans la réponse anti-bactérienne et très efficaces pour la phagocytose (Yang et al., 2014). Les monocytes non classiques sont quant à eux considérés comme des « patrouilleurs » de la paroi vasculaire (Wong et al., 2012). Leur mobilité est dépendante de l’expression de la molécule d’adhésion LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) et de son ligand ICAM-1, ainsi que de celle du récepteur de chimiokine CX3CR1 (Ramos et al., 2014; Wong et al., 2012). Ces cellules représentent 7% des monocytes sanguins, elles sont spécialisées dans la défense antivirale et sont généralement recrutées en phases tardives de l’inflammation. Enfin, les

monocytes CD14⁺⁺CD16⁺ qui correspondent à 5% des monocytes du sang possèdent un phénotype intermédiaire entre celui des monocytes classiques et des non classiques. Ils jouent un rôle majeur dans la présentation antigénique et produisent des quantités importantes de ROS et autres médiateurs inflammatoires tels que TNF α , IL-1 et IL-6 lorsqu'ils sont stimulés avec du LPS (Merino et al., 2011).

Une augmentation de la fréquence des monocytes intermédiaires a été décrite dans des cas de polyarthrite rhumatoïde (PR), de lupus érythémateux systémique, et plus récemment chez des enfants atteints d'AJI liée à l'enthèse (Gaur et al., 2017; Henriques et al., 2012; Kawanaka et al., 2002). Ces données suggèrent que les monocytes intermédiaires jouent un rôle dans la physiopathologie des maladies inflammatoires.

Par ailleurs, de nombreuses études montrent que l'expression des microARNs (miARNs) est associée au développement de pathologies articulaires (Duroux-Richard et al., 2012; Nakasa et al., 2008; Pauley et al., 2008). En effet, ces petits fragments d'ARN non codant régulent l'expression de nombreux gènes et des perturbations au niveau de leur expression ont un impact significatif sur la réponse inflammatoire. Dans l'AJI, l'implication des miARNs reste peu explorée, particulièrement dans le liquide synovial (LS) où la réaction inflammatoire est exacerbée. Des résultats obtenus dans notre laboratoire indiquent que l'expression de miR-150 dans le LS d'enfants atteints d'AJI oligoarticulaire est supérieure à celle retrouvée dans un LS contrôle d'enfants atteints d'arthrite septique. Par ailleurs, des études montrent qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression élevé de miR-150 et la destruction des articulations dans des cas de PR (Niimoto et al., 2010). Ce miARN joue un rôle dans la génération des monocytes intermédiaires et non classiques en ciblant le gène *TET3* (ten-eleven-translocation-3) qui code pour une dioxygénase liant et déméthylant l'ADN (Selimoglu-Buet et al., 2018). De plus, il a été montré dans un modèle murin d'infarctus du myocarde que miR-150 régule la migration des monocytes en ciblant le gène *CXCR4* (Liu et al., 2015). L'implication de miR-150 dans la physiopathologie de l'AJI reste à ce jour inexplorée. L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle de miR-150 dans l'AJI en se concentrant sur les monocytes.

Matériels et méthodes

Patients et donneurs sains

Des enfants de 4 à 15 ans ont été inclus dans cette étude grâce à un recrutement au niveau du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier. Ces patients répondaient aux critères d'inclusion établis par l'ILAR pour le diagnostic de l'AJI. Les enfants atteints d'AJI systémique ainsi que ceux ayant pris des traitements (stéroïdes, biothérapies, médicaments antirhumatismaux) au cours du mois précédant la ponction articulaire étaient exclus de l'étude. Un consentement venant des parents ou tuteurs a été obtenu pour tous les patients, conformément aux procédures approuvées par le Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée I (2014-A01561-46). Les prélèvements de sang et de LS étaient collectés dans des tubes BD Vacutainer traités à l'héparine.

Des prélèvements de sang de donneurs sains ont été récupérés au niveau de l'Etablissement Français de Sang (EFS) de Montpellier et collectés dans des poches contenant de l'acide éthylène diaminetétracétique (EDTA).

Isolement cellulaire

Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) des donneurs sains ont été isolées par les techniques de séparation utilisant un gradient de densité Ficoll-Paque (GE Healthcare). Les monocytes CD14⁺ ont ensuite été séparés des autres types cellulaires à l'aide d'un kit d'isolement magnétique avec des billes anti-CD14 permettant un tri positif (Miltenyi Biotec) (pureté > 90%, confirmée par cytométrie de flux).

Culture cellulaire

Pour l'étude de l'effet du LS sur les cellules de donneurs sains, la mise en culture des monocytes CD14⁺ (1×10^6 cellules/mL) était effectuée au niveau de plaques 48 puits avec 500 μ L de milieu composé de RPMI-1640 avec 1% de pénicilline/streptomycine, 10% de sérum de veau fœtal et 1% de glutamine (Gibco). Les prélèvements de LS avaient été centrifugés 10 minutes à 2000 g puis conservés à -80°C. Une fois décongelés, ils étaient dilués 1 : 30 dans le milieu de culture puis incubés pendant 24 heures à 37°C avec les monocytes.

Les manipulations de transfection étaient effectuées avec des monocytes CD14⁺ (1 x 10⁶ cellules/mL) mis en culture sur des plaques 24 puits, dans 400 µL de milieu Opti-MEM (Gibco) contenant 1% de sérum de veau fœtal. Après 2 heures de culture à 37°C dans le milieu, 100 µL de solution contenant du Fugene HD (Promega) ainsi qu'un inhibiteur de hsa-miR-150-5p ou un contrôle négatif à 40 µM (MirVana™ miRNA inhibitor Negative Control) (Thermo Fisher Scientific) ont été ajoutés à la culture cellulaire pour une incubation de 6 à 12 heures. Par la suite, 500 µL de milieu RPMI-1640 avec 1% de pénicilline/streptomycine, 20% de sérum de veau fœtal et 1% de glutamine ont été ajoutés pour une incubation de 24 heures à 37°C.

Cytométrie de flux

Pour l'analyse des monocytes du sang et du LS des patients atteints d'AJI, une sélection des cellules DAPI⁻ CD45⁺ a été effectuée. Les granulocytes (HLA-DR^{neg}CD16^{high}) et les cellules à lignées positives (lin) (CD3, CD19 et CD56) ont été marqués et exclus lors des analyses informatiques. Les trois sous-populations de monocytes ont ensuite été identifiées en fonction des marquages CD14 et CD16. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-HLA-DR-APC-Cy7 (Beckman Coulter), anti-CD45-V500, anti-CD16-BV421, anti-CD3-V450, anti-CD19-PE, anti-CD56-Alexa Fluor700, anti-CD14-BV650 (BD Biosciences). L'acquisition de ces cellules a été effectuée au niveau d'un BD-LSR Fortessa (BD Biosciences) et les analyses ont été réalisées avec les logiciels DIVA et FlowJo.

La caractérisation phénotypique des monocytes CD14⁺ transfectés et ceux mis en culture avec du LS de patients a été réalisée à la suite d'une exclusion des cellules positives pour le marquage Zombie (Zombie Violet™ Fixable Viability Kit, BioLegend). Le marquage des récepteurs CD14 et CD16 a été effectué avec les anticorps suivants : anti-CD14-FITC et anti-CD16-APC (BD Biosciences). L'acquisition a été réalisée avec un BD FACSCanto™ II et les analyses avec le logiciel DIVA.

Extraction d'ARN et RT-qPCR

La totalité des ARNs des monocytes CD14⁺ a été extraite à l'aide du kit miRNeasy utilisé avec un Qiacube (QIAGEN). Les taux d'expression des miARNs et ARN messagers (ARNm) ont été quantifiés à la suite d'une transcription inverse avec un kit « TaqMan microRNA Reverse Transcriptase » ou « High Capacity cDNA Reverse Transcription » (Applied Biosystems) respectivement (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad). Une qPCR a ensuite été réalisée avec l'ADNC complémentaire (ADNc) associé à un mix contenant du « TaqMan Universal Master mix » ainsi que des amorces spécifiques au miR-150-5p et au gène *CCR2* (Applied Biosystems) (Rotor-Gene-Q, QIAGEN). L'expression du RNU6B et celle de la

GAPDH ont été utilisées comme contrôle endogène pour la normalisation des résultats obtenus pour l'expression du miR-150-5p et de *CCR2* respectivement.

Analyses *In silico*

Afin d'identifier les cibles putatives de miR-150-5p, le logiciel miRWalk a été utilisé. Celui-ci a permis de rassembler les données obtenues par différents logiciels, à savoir RNA22, miRanda et Targetscan. Une sélection des gènes ciblés en région 3'UTR et retrouvés dans chacun de ces trois logiciels a été effectuée (score ≥ 3 , p value : 0,05).

Analyses statistiques

Des tests de Student ont été effectués en utilisant le logiciel GraphPad prism. Pour certains résultats, les moyennes sont représentées avec l'erreur standard (SEM).

Résultats

Accumulation de monocytes intermédiaires dans l'articulation d'enfants atteints d'AJI oligoarticulaire.

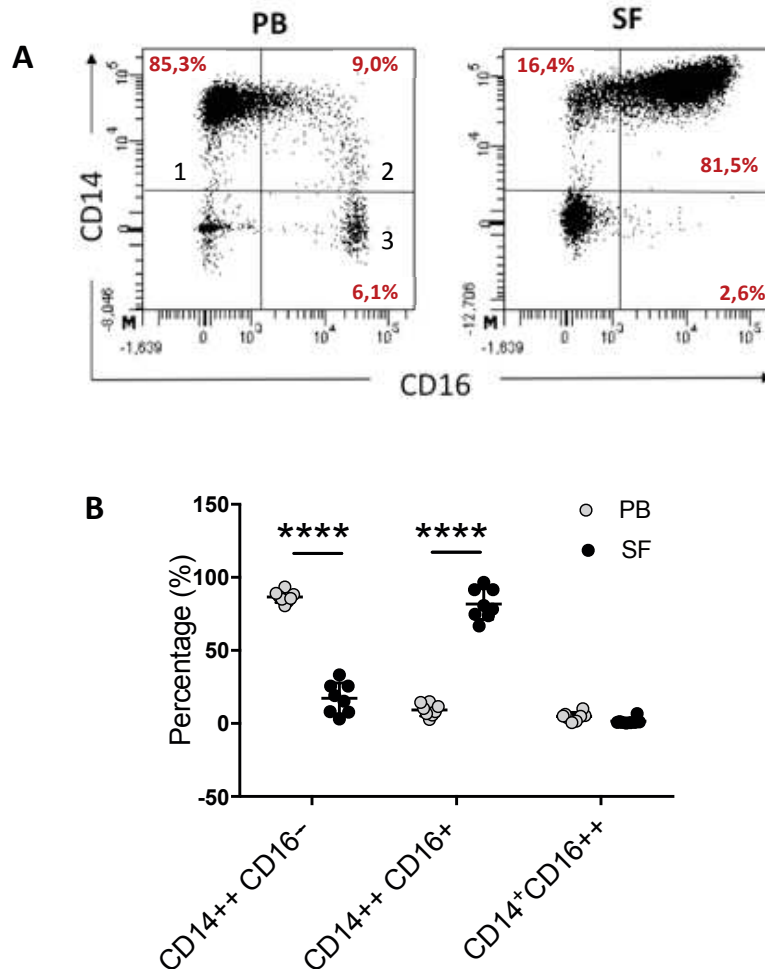


Figure 1 : Analyse par cytométrie de flux des pourcentages de monocytes classiques (CD14⁺⁺CD16⁻) (1), intermédiaires (CD14⁺⁺CD16⁺) (2) et non classiques (CD14⁺CD16⁺⁺) (3) dans le sang périphérique (PB) et le liquide synovial (SF) d'enfants atteints d'AJI oligoarticulaire (n=8) (A, B). Les résultats sont exprimés par des moyennes \pm SEM (B). ****p < 0,0001.

Afin d'étudier les acteurs cellulaires impliqués dans la réaction inflammatoire qui est observée chez les enfants atteints d'AJI oligoarticulaire, nous avons quantifié le pourcentage relatif de chaque sous-types de monocytes par rapport à la somme des pourcentages des trois sous-populations dans des échantillons de sang et de liquide synovial de 8 patients. La figure 1 montre que le pourcentage de

monocytes classiques est significativement plus faible dans les articulations des enfants AJI comparé au sang ($p < 0,0001$). Le phénomène inverse est observé pour les monocytes intermédiaires qui sont accumulés en quantité importante dans le liquide synovial ($p < 0,0001$). Aucune différence significative n'est observée entre les pourcentages de monocytes non classiques du sang et du liquide synovial. Dans les deux fluides corporels, cette population cellulaire reste la plus faiblement représentée.

Une collaboration avec l'équipe du Pr. Edouard Tuillon (INSERM U1058) nous a permis de réaliser une étude du profil cytokinique du sérum et du liquide synovial chez ces mêmes patients (Figure supplémentaire). Les résultats qu'ils ont obtenus montrent des concentrations importantes de cytokines pro-inflammatoires au niveau des articulations, telles que l'IL-1 β , l'IL-18, l'IL-6 et l'IFN α , des protéines en partie produites par les monocytes qui s'accumulent dans les articulations. Des concentrations élevées de chimiokines comme MCP-1, IP-10 et IL-8, ainsi que des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ont également été trouvées dans les articulations.

Le liquide synovial des patients AJI induit la différenciation des monocytes classiques de donneurs sains vers un phénotype intermédiaire.

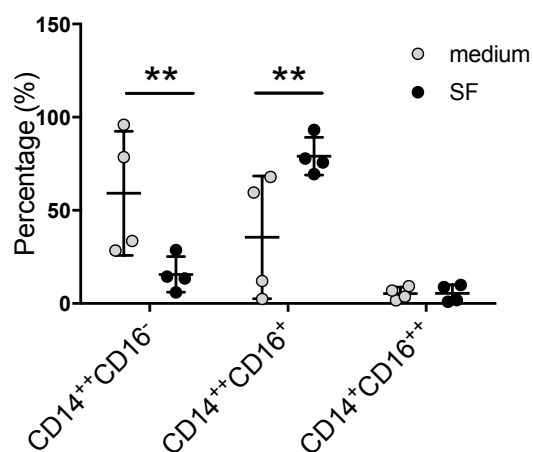


Figure 2 : Analyses par cytométrie de flux du pourcentage des trois sous-populations de monocytes obtenues à partir de monocytes classiques incubés 24 heures dans du milieu de culture ou dans du liquide synovial (SF) de patients AJI dilué 1 : 30 (n=4). Les résultats sont exprimés par des moyennes \pm SEM. **p < 0,01.

Pour étudier l'impact du liquide synovial sur les monocytes, des monocytes CD14⁺ isolés à partir du sang de donneurs sains ont été mis en culture avec du liquide synovial d'enfants atteints d'AJI oligoarticulaire pendant 24 heures. Nos résultats montrent qu'en présence de liquide synovial, le pourcentage de monocytes classiques diminue fortement alors que celui des monocytes intermédiaires est significativement augmenté par rapport à la condition contrôle ($p < 0,01$) (Figure 2). Le pourcentage de monocytes non classique reste inchangé quelque soit la condition de culture. Le liquide synovial de patients AJI semble récapituler in vitro le phénotype des monocytes isolés dans les articulations AJI.

La neutralisation du miR-150 diminue le pourcentage des monocytes intermédiaires.

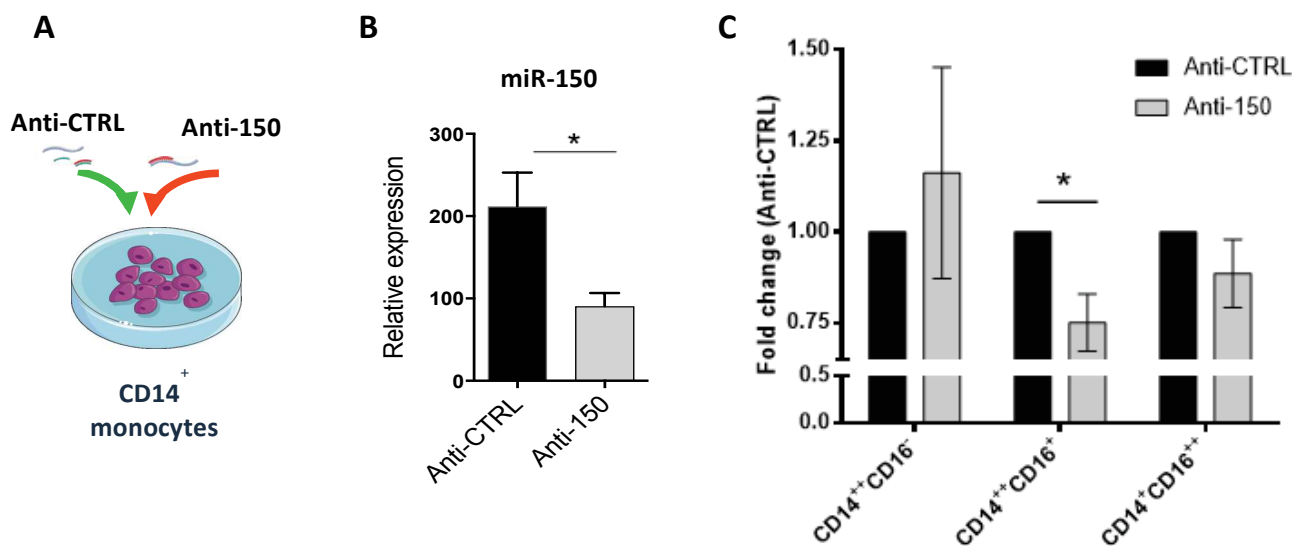


Figure 3 : Effet de miR-150 sur la génération des trois sous-populations de monocytes. (A) Schéma représentant la transfection des monocytes CD14⁺ de donneurs sains avec une séquence contrôle d'ARN (Anti-CTRL) ou avec de l'ARN dirigée contre le hsa-miR-150 (Anti-150). (B) Analyse par RT-qPCR de l'expression de miR-150 dans les monocytes transfectés. Les résultats sont représentés en expression relative de miR-150 par rapport à RNU6B et exprimés sous la forme de moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$ (n=4). (C) Analyses par cytométrie de flux des pourcentages des trois sous-populations de monocytes après 2 jours de transfection. Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport entre les pourcentages de monocytes en condition de neutralisation de miR-150 et la condition contrôle. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$ (n=4).

Des résultats générés par notre équipe montrent que le liquide synovial des enfants atteints d'AII possède des concentrations importantes de miR-150 circulant, en comparaison au liquide synovial de patients contrôles, à savoir des enfants ayant une arthrite septique. Afin de caractériser l'effet du miR-150 sur le phénotype des monocytes, un isolement de monocytes CD14⁺ de donneurs sains a été effectué, suivi d'une transfection avec soit une séquence d'ARN contrôle (Anti-CTRL), soit une séquence d'ARN neutralisant miR-150 (Anti-150) (Figure 3A). Après avoir validé par RT-qPCR que la neutralisation de miR-150 dans les monocytes CD14⁺ est associée à une diminution de 2 fois de son expression par rapport à la condition contrôle ($p < 0,05$ Anti-CTRL vs Anti-150) (Figure 3B), des analyses de cytométrie de flux des sous-populations monocytaires ont été réalisées. Nos résultats indiquent que la neutralisation de miR-150 diminue le pourcentage de monocytes intermédiaires

comparé aux conditions contrôles ($p < 0,05$) (Figure 3C). Bien que la neutralisation du miR-150 semble augmenter le pourcentage de monocytes classiques, les différences ne sont pas significatives en raison d'une variabilité importante entre les échantillons biologiques. En ce qui concerne les monocytes ayant un phénotype ressemblant à celui des non classiques, aucune différence n'a été observée en fonction des conditions de transfection. L'ensemble de ces données suggère que miR-150 jouerait un rôle dans la génération des monocytes intermédiaires.

L'expression de *CCR2* est modulée par miR-150.

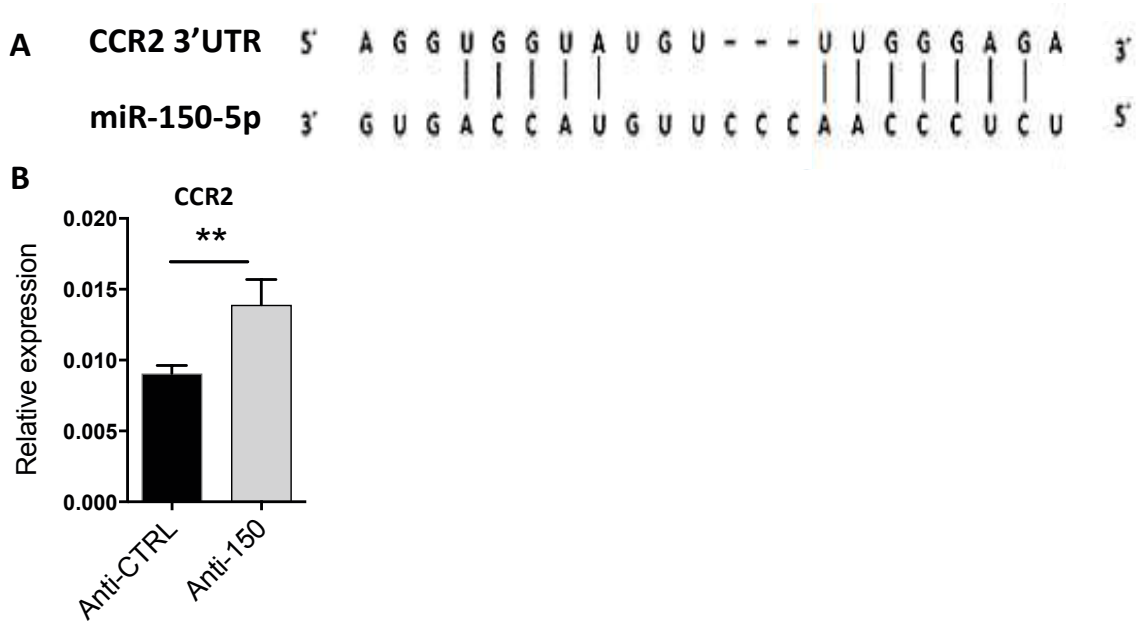


Figure 4 : Régulation de l'expression de *CCR2* par miR-150. (A) Homologie de séquence entre la région 3'UTR de l'ARNm de *CCR2* et miR-150 identifiée par le logiciel de prédiction TargetScan. (B) Analyse par RT-qPCR de l'expression du gène *CCR2* dans les monocytes transfectés par une séquence neutralisant miR-150. Les résultats sont représentés en expression relative de *CCR2* par rapport à la GAPDH et expriment des moyennes \pm SEM. ** $p < 0,01$ (n=3).

Dans le but d'identifier des cibles de miR-150 dans les monocytes classiques pouvant expliquer l'effet observé sur leur phénotype, une analyse transcriptomique a été réalisée après transfection de monocytes CD14⁺ de donneurs sains en se concentrant sur des gènes connus pour jouer un rôle dans la fonction et la migration des monocytes. Des analyses *in silico* ont été effectuées avec le logiciel miRWalk afin d'identifier des cibles putatives de miR-150 parmi la liste de gènes dont l'expression a été significativement modulée par miR-150. Nous avons ainsi identifié le gène *CCR2* (Figure 4A) qui est un récepteur membranaire fortement exprimé par les monocytes classiques jouant un rôle important dans le recrutement et la migration des monocytes. La figure 4B montre que la neutralisation de miR-150 dans les monocytes CD14⁺ augmente l'expression de *CCR2* comparé au contrôle ($p < 0,01$). Cette expression élevée de *CCR2* associée à la neutralisation du miR-150 suggère qu'à l'inverse, dans les articulations d'enfants atteints d'AJI oligoarticulaire où miR-150 est en concentration élevée dans le liquide synovial, l'expression de ce gène serait diminuée à la surface des monocytes articulaires.

Analyse cytokinique du sérum et du liquide synovial d'enfants atteints d'AJI oligoarticulaire.

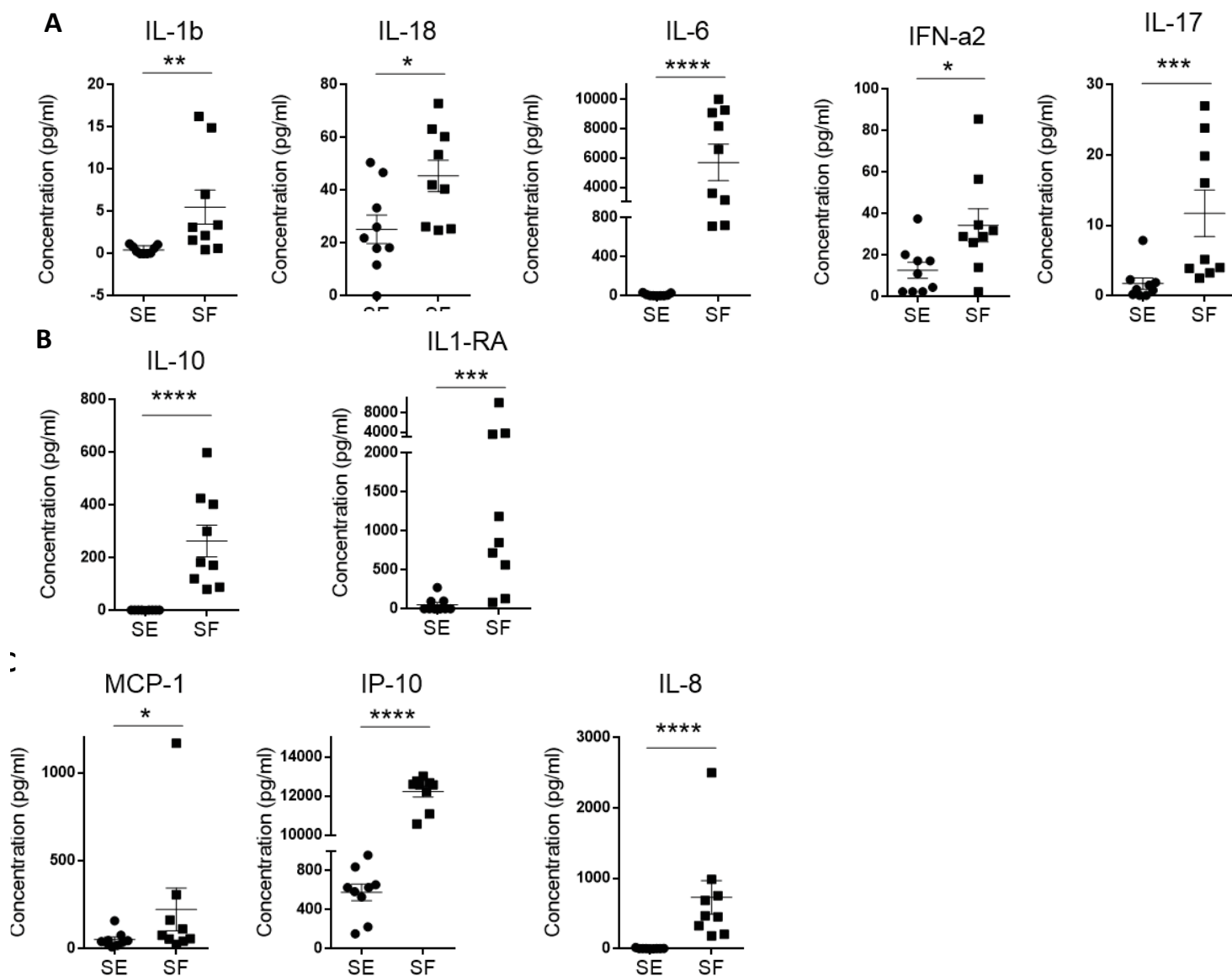


Figure supplémentaire 1 : Analyse des concentrations de cytokines (A) pro-inflammatoires et (B) anti-inflammatoires, ainsi que (C) des chimiokines du sérum (SE) et du liquide synovial (SF) d'enfants atteints d'AJI oligoarticulaire (n=9). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Discussion

La forme oligoarticulaire de l'AJI est le sous-type le plus répandu en Europe (Prakken et al., 2011). Il s'agit d'une maladie complexe et hétérogène, pour laquelle la physiopathologie est à ce jour peu connue. Des études ont montré que les cellules de l'immunité innée comme les monocytes pouvaient jouer un rôle majeur dans cette pathologie (de Jager et al., 2007; Macaubas et al., 2009). En effet, en plus d'être impliqués dans la présentation antigénique, les monocytes peuvent réguler les réponses inflammatoires via les cytokines qu'ils produisent. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'implication des monocytes dans la physiopathologie de l'AJI et à la régulation de leur fonction.

Parmi les trois sous-populations principales de monocytes décrites dans la littérature, nos résultats montrent pour la première fois une accumulation significative de monocytes intermédiaires au sein des articulations d'enfants atteints d'AJI oligoarticulaire. Ces données sont en accord avec celles obtenues au niveau du liquide synovial de patients ayant une AJI liée à l'enthèse (Gaur et al., 2017), ce qui renforce l'hypothèse que ce sous-type de monocytes joue un rôle particulier dans l'AJI en général. Grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Edouard Tuailon (INSERM U1058), nous avons pu étudier des concentrations en cytokines du sérum et du liquide synovial d'enfants ayant une AJI oligoarticulaire. Les résultats ont mis en évidence des concentrations élevées de MCP-1, IP-10 et IL-8 dans le liquide synovial pouvant expliquer le recrutement des monocytes au sein des articulations. Des cytokines pro-inflammatoires sont également présentes en quantités importantes dans le liquide synovial comparé au sang périphérique, notamment l'IL-1 β , l'IL-18, l'IL-6 et l'IFN α . Ces cytokines peuvent être produites par les monocytes comme le montre les études de Saxena réalisées chez des patients AJI (Saxena et al., 2005). Ces cytokines contribuent au développement d'un environnement inflammatoire au sein de l'articulation de ces patients arthritiques. Avec la mise en culture de monocytes CD14⁺ de donneurs sains avec du liquide synovial de patients AJI, nous avons observé que le liquide synovial contient des éléments qui stimulent la différenciation de ces cellules. Nos résultats sont à mettre en lien avec des études qui montrent que les monocytes intermédiaires sont impliqués dans la présentation antigénique, l'activation et la prolifération des lymphocytes T (Wong et al., 2012; Zawada et al., 2011). Ces fonctions pouvant être associées au développement de l'AJI.

Afin d'identifier un élément du liquide synovial pouvant expliquer cet effet sur le phénotype des monocytes, nous nous sommes intéressés à miR-150. En effet, de précédents résultats obtenus dans notre équipe montrent que miR-150 est fortement exprimé dans les articulations d'enfants atteints

d'AJI oligoarticulaire comparé à ceux ayant une arthrite septique. Ce miARNs est impliqué dans le développement des lignées lymphoïdes et myéloïdes et a été récemment montré comme jouant un rôle dans la conversion des monocytes classiques en monocytes intermédiaires et non classiques via le ciblage du gène *TET3* (Selimoglu-Buet et al., 2018). Ces données sont cohérentes avec nos observations qui montrent une expression importante de miR-150 associée à une accumulation de monocytes intermédiaires. Tout comme cette étude récemment publiée, nous avons observé une diminution du nombre de monocytes intermédiaires suite à la neutralisation de l'expression de miR-150. Toutefois, contrairement aux résultats de Selimoglu-Buet et al., nous n'avons pas observé d'impact de miR-150 sur la génération de monocytes non classiques. Ceci peut s'expliquer par les différences qui existent entre notre étude et la leur au niveau des durées et des techniques de transfection appliquées. De plus, l'équipe de Selimoglu-Buet transfecte les cellules au niveau des précurseurs hématopoïétiques CD34⁺, tandis que nos transfections ont été effectuées à la suite d'un tri de monocytes déjà différenciés CD14⁺.

Nos études ont permis d'identifier un gène dont l'expression est potentiellement régulée par miR-150, à savoir *CCR2*. A notre connaissance, aucune donnée n'est publiée dans la littérature étudiant l'effet de la transfection du miR-150 sur l'expression de *CCR2* au niveau des monocytes. *CCR2* est connu pour être impliqué dans le recrutement des monocytes sur le site inflammatoire (Weber et al., 2000). Ce récepteur présente une expression forte au niveau des monocytes classiques sortis de la moelle osseuse et diminue au niveau des monocytes intermédiaires et des non classiques (Wong et al., 2012). Il régule la migration des monocytes via la liaison à la chimiokine MCP-1, pour laquelle des taux élevés ont été détectés dans le liquide synovial des enfants ayant une AJI oligoarthritis. Les concentrations importantes de miR-150 au niveau des articulations d'enfants AJI pourraient diminuer significativement l'expression de *CCR2* au niveau des monocytes présents dans le liquide synovial et ainsi réduire leur migration. Une faible expression de *CCR2* pourrait ainsi accentuer l'accumulation des monocytes au sein de l'articulation des enfants atteints d'AJI oligoarticulaire où ces cellules entretiennent l'inflammation en produisant des quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires.

En conclusion, les données générées par notre équipe montrent une accumulation de monocytes intermédiaires dans les articulations des patients ayant une AJI oligoarticulaire qui peut s'expliquer en partie par l'expression importante de miR-150 dans le liquide synovial. En plus d'être impliqué dans la génération de monocytes intermédiaires, ce miARN ciblerait le récepteur à chimiokine *CCR2* et limiterait ainsi la migration des monocytes vers les organes lymphoïdes. Afin de poursuivre l'étude sur l'implication du miR-150 dans la physiopathologie de l'AJI, il est nécessaire de valider la liaison

directe de ce miARN au niveau de la séquence cible de l'ARNm de *CCR2* et d'analyser l'expression génique et protéique de *CCR2* au niveau des monocytes isolés des articulations de patients atteints d'AJI oligoarticulaire. De plus, il serait intéressant d'effectuer une caractérisation fonctionnelle des monocytes transfectés afin d'étudier l'implication du miR-150 dans la présentation antigénique et dans la capacité des monocytes à induire une activation et une prolifération des lymphocytes T.

Références bibliographiques

Duroux-Richard, I., Jorgensen, C., and Apparailly, F. (2012). What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 64, 11–20.

Gaur, P., Myles, A., Misra, R., and Aggarwal, A. (2017). Intermediate monocytes are increased in enthesitis-related arthritis, a category of juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 187, 234–241.

Henriques, A., Inês, L., Carneiro, T., Couto, M., Andrade, Â., Pedreiro, S., Laranjeira, P., Morgado, J.M., Pais, M.L., da Silva, J.A.P., et al. (2012). Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* 32, 863–869.

de Jager, W., Hoppenreijs, E.P.A.H., Wulffraat, N.M., Wedderburn, L.R., Kuis, W., and Prakken, B.J. (2007). Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 589–598.

Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y., and Makino, H. (2002). CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 2578–2586.

Liu, C.-H., Sun, Y., Li, J., Gong, Y., Tian, K.T., Evans, L.P., Morss, P.C., Fredrick, T.W., Saba, N.J., and Chen, J. (2015). Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 12163–12168.

Macaubas, C., Nguyen, K., Milojevic, D., Park, J.L., and Mellins, E.D. (2009). Oligoarticular and polyarticular JIA: epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 616–626.

Merino, A., Buendia, P., Martin-Malo, A., Aljama, P., Ramirez, R., and Carracedo, J. (2011). Senescent

CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J. Immunol.* **186**, 1809–1815.

Murray, K.J., Luyrink, L., Grom, A.A., Passo, M.H., Emery, H., Witte, D., and Glass, D.N. (1996). Immunohistological characteristics of T cell infiltrates in different forms of childhood onset chronic arthritis. *J. Rheumatol.* **23**, 2116–2124.

Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., and Asahara, H. (2008). Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* **58**, 1284–1292.

Niimoto, T., Nakasa, T., Ishikawa, M., Okuhara, A., Izumi, B., Deie, M., Suzuki, O., Adachi, N., and Ochi, M. (2010). MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet. Disord.* **11**, 209.

Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., and Chan, E.K. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* **10**, R101.

Petty, R.E., Southwood, T.R., Manners, P., Baum, J., Glass, D.N., Goldenberg, J., He, X., Maldonado-Cocco, J., Orozco-Alcala, J., Prieur, A.-M., et al. (2004). International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J. Rheumatol.* **31**, 390–392.

Prakken, B., Albani, S., and Martini, A. (2011). Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet (London, England)* **377**, 2138–2149.

Ramos, T.N., Bullard, D.C., and Barnum, S.R. (2014). ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. *J. Immunol.* **192**, 4469–4474.

Saxena, N., Aggarwal, A., and Misra, R. (2005). Elevated concentrations of monocyte derived cytokines in synovial fluid of children with enthesitis related arthritis and polyarticular types of juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* **32**, 1349–1353.

Selimoglu-Buet, D., Rivière, J., Ghamlouch, H., Bencheikh, L., Lacout, C., Morabito, M., Diop, M., Meurice, G., Breckler, M., Chauveau, A., et al. (2018). A miR-150/TET3 pathway regulates the generation of mouse and human non-classical monocyte subset. *Nat. Commun.* **9**, 5455.

Weber, C., Belge, K.-U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S.C., and Ziegler-Heitbrock, H.W.L. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 699–704.

Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57.

Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., and Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2, 1.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50–e61.

E. Discussion

L'arthrite juvénile idiopathique (AJI) est un groupe hétérogène de rhumatismes inflammatoires chroniques affectant les enfants de moins de 16 ans. La physiopathologie de maladie complexe et d'origine inconnue est à ce jour peu connue. Dans le cadre de ma thèse, j'ai cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de cette pathologie en m'intéressant aux sous-populations de monocytes et de DCs ainsi qu'aux profils d'expression des miARNs du sang périphérique et du LS des enfants atteints d'AJI. Ces différents marqueurs cellulaires et moléculaires jouent un rôle majeur dans la régulation de l'inflammation et le développement des maladies qui lui sont associées.

1. Comparaison entre AJI et AS juvénile

Caractérisation phénotypique des sous-populations de monocytes et de DCs

Pour cette première partie de mon projet de thèse, j'ai travaillé sur une cohorte prospective de patients atteints d'AJI et d'AS. Les enfants du groupe AS avaient tous à posteriori une infection causée par *Kingella kingae* confirmée par culture bactérienne ou PCR. La caractérisation phénotypique de différentes cellules du système immunitaire inné a permis d'identifier pour la première fois des sous-populations présentant des profils d'accumulation et d'activation qui varient entre l'AJI et l'AS (Figure 11).

De façon générale, lorsque l'on intègre tous les marqueurs de surface analysés pour une classification non supervisée, le LS est le fluide biologique qui discrimine le mieux l'AJI de l'AS. Dans le sérum, il existe de nombreuses ressemblances entre AJI et AS. Seule l'AS montre un enrichissement du nombre total de monocytes dans le LS par rapport au sang. Lorsque les 3 sous-populations de monocytes sont analysées, leur nombre est plus élevé dans le LS des patients AS que dans celui des AJI. Dans le sang, seuls les monocytes classiques sont en nombre plus important en cas d'AS par rapport aux AJI. Dans de nombreuses maladies, aussi bien d'origine infectieuse qu'inflammatoire et auto-immune, le

nombre de monocytes CD16⁺ est augmenté dans le sang. C'est le cas pour le choc septique (Skrzeczynska et al., 2002), l'obésité, la PR (Wong et al., 2012) ou même l'AJI (Gaur et al., 2017). Les études réalisées chez des nouveau-nés ayant un choc septique ont montré une augmentation du nombre de monocytes intermédiaires et non classiques dans le sang de ces patients comparé au sang d'enfants sains (Skrzeczynska et al., 2002). Ces résultats indiquent également que l'augmentation des monocytes non classiques est plus importante chez les enfants présentant tous les signes cliniques (critères selon la liste de Samson et al. (Samson et al., 1997)), mais pour lesquels la mise en culture du sang ne montrait pas de prolifération bactérienne. Les monocytes intermédiaires étaient quant à eux plus présents au niveau des patients avec une culture bactérienne positive. Ces données suggèrent donc que le nombre important de monocytes intermédiaires en cas de choc septique est associé à une élimination peu efficace des bactéries alors que les non classiques permettent un contrôle plus optimal de l'infection. Dans le cas de l'AJI, Gaur et al. ont observé une augmentation des pourcentages de monocytes intermédiaires et non classiques dans le sang des patients atteints d'AJI liée à l'enthèse comparé à des donneurs sains, avec des résultats opposés pour les monocytes classiques (Gaur et al., 2017). L'ensemble des données de la littérature suggère donc que la quantification des monocytes dans le sang peut servir à renforcer le diagnostic des arthrites septiques et inflammatoires de l'enfant, et notamment les CD16⁺ si les données des enfants sains sont prises comme contrôle. Nos résultats quant à eux suggèrent que ce sont les CD14⁺ circulants qui permettent de diagnostiquer les AJI quand ce sont les AS qui sont prises en contrôle. Par ailleurs, la numération des sous-populations monocytaires dans le LS semble plus robuste pour discriminer les arthrites juvéniles inflammatoires des infectieuses.

Nous avons également analysé des marqueurs d'activation des monocytes sanguins et articulaires. Mes résultats mettent en évidence une faible expression de HLA-DR au niveau des monocytes intermédiaires et non classiques sanguins des patients AS comparé aux enfants atteints d'AJI. Ces observations sont à mettre en relation avec 2 études qui effectuent des comparaisons avec des donneurs sains. Nous avons dans un premier temps les données de Skrzeczyńska et al. qui ont observé des taux d'expression faibles de HLA-DR au niveau des monocytes sanguins de nouveaux nés atteints de choc septique. Dans cette étude, l'expression de CD86 était également faible et les monocytes possédaient une

capacité réduite à phagocyter *Escherichia coli* (Skrzeczynska et al., 2002). Dans un second temps, l'étude de Gaur et al. a montré une expression élevée de HLA-DR au niveau des monocytes intermédiaires sanguins AJI (Gaur et al., 2017). L'activation de ces cellules peut aboutir à une présentation antigénique importante pouvant favoriser le développement de l'inflammation en cas d'AJI. Nos analyses dans le LS des patients AJI et AS montrent une expression de HLA-DR plus élevée au niveau des monocytes intermédiaires des patients AJI par rapport aux AS, alors que, de façon étonnante, elle est plus importante sur les monocytes non classiques des patients AS. Par ailleurs, nous avons détecté des taux d'expression importants de CD64 au niveau des 3 sous-populations de monocytes sanguins des enfants atteints d'une AS ainsi que sur les monocytes classiques de leur LS. Ce récepteur FcγR de type 1 est important pour la phagocytose de composants bactériens et son expression a été démontrée comme pouvant rapidement augmenter suite à la reconnaissance du motif bactérien LPS ou en présence de certaines cytokines (Oppegaard et al., 2013). Nos résultats sont en accord avec des études menées chez les adultes qui ont comparé l'expression de CD64 entre des échantillons sanguins de patients atteints de PR et d'AS et qui ont observé une expression élevée de CD64 dans le contexte infectieux (Oppegaard et al., 2013). Enfin, notre analyse de SLAN a montré des taux d'expression plus importants au niveau des 3 sous-populations de monocytes d'enfants AJI par rapport aux AS. A notre connaissance, il n'existe pas de données publiées dans la littérature étudiant l'expression de SLAN dans un contexte d'arthrite juvénile. Toutefois, des études sur des donneurs sains montrent que l'expression de SLAN est plus élevée au niveau des monocytes CD16⁺, ce qui est similaire aux résultats que nous avons obtenus (Hofer et al., 2015). Dans l'ensemble, l'analyse des marqueurs d'activation exprimés à la surface des monocytes des patients AJI et AS montrent des différences plus importantes au niveau du sang de ces patients, avec l'intensité de HLA-DR et de SLAN qui sont majoritairement plus élevées en cas d'AJI tandis que CD64 est plus exprimé dans le contexte infectieux.

Je me suis également intéressée à la caractérisation phénotypique des DCs qui sont les principaux acteurs cellulaires dans la présentation antigénique. Mes résultats montrent que, à l'instar des monocytes, la quantification des sous-populations de DCs dans le sang n'est pas informative puisqu'aucune différence n'est significative, alors que des différences significatives sont observées dans le LS, lieu de développement principal de ces pathologies.

Plus précisément, une accumulation plus importante de CD141⁺ cDCs et CD123⁺ pDCs est observée dans le LS des patients atteints d'AJI comparé aux enfants ayant une AS. Ces résultats viennent en complément de précédentes études qui ont montré que le nombre de DCs est significativement supérieur dans les articulations AJI comparé au sang périphérique des mêmes patients (Smolewska et al., 2008). En cas de choc septique, le nombre de cDCs et pDCs dans le sang est diminué par rapport à des donneurs sains (Poehlmann et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère que l'AJI se caractérise par une accumulation importante de certains sous-types de DCs sur le site inflammatoire.

Les études de Poehlmann et al. ont également montré que cet appauvrissement en DCs sanguin est associé à des modifications des marqueurs d'activation membranaires (Poehlmann et al., 2009). Une diminution de l'expression de HLA-DR par les DCs des patients atteints de choc septique a été rapportée, associée à une perturbation de l'activation et de la fonction des DCs. En effet, suite à une stimulation par du LPS, les DCs des patients AS produisent moins de cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IFN α) et plus de cytokines anti-inflammatoires (type IL-10) que les DCs de donneurs sains. Un tel dysfonctionnement des DCs altérerait la défense antimicrobienne en cas de choc septique. Ces données sont accord avec nos résultats qui montrent dans le sang une sous-expression du HLA-DR au niveau des deux sous-populations de cDCs et des InfDCs en cas d'AS comparé à l'AJI. De plus, bien que l'expression de CD86 soit plus élevée au niveau des CD1c⁺ cDCs et InfDCs du sang des patients AS par rapport aux AJI, elle est plus importante à la surface des InfDCs du LS des enfants atteints d'AJI. L'expression importante des marqueurs d'activation en cas d'AJI a déjà été rapportée dans la littérature, particulièrement au niveau des DCs du LS des patients (Smolewska et al., 2008). Ces DCs activées expriment des molécules de co-stimulation des cellules T et peuvent ainsi orienter la polarisation lymphocytaire et participer à la physiopathologie de l'AJI. En effet, les CD141⁺ cDCs sont des inducteurs de Th2, tandis que les CD1c⁺ cDCs favorisent la polarisation Th1 (Coutant and Miossec, 2016). Chez les patients PR, il a été montré que les CD141⁺ cDCs non seulement activent les lymphocytes T CD4⁺, mais également les T CD8⁺, notamment via l'expression du récepteur « C-type lectin » (Jongbloed et al., 2010). Enfin, de façon intéressante, mes résultats montrent que l'expression de PDL2 est systématiquement plus forte en cas d'AS, et ce sur tous les sous-types de DCs, aussi bien au niveau du sang que du LS. En se liant à PD-1 au niveau des

lymphocytes T, PDL2 a la capacité de réguler la fonction de ces cellules (Latchman et al., 2001). Nos résultats sont en accord avec les données de Guignant et al. qui montrent une augmentation de l'expression de PDL2 après un choc septique, associé à un risque plus important de développer des infections nosocomiales (Guignant et al., 2011). Des études réalisées sur des souris PDL2^{-/-} montrent que les CPA présentent une plus grande capacité à activer les lymphocytes T comparé aux cellules des souris contrôles (Zhang et al., 2006). PDL2 est donc un régulateur négatif de l'activation des T, nécessaire pour l'induction de tolérance. La plus faible expression de PDL2 au niveau de toutes les sous-populations de DCs des patients AJI en local et en périphérie témoigne donc de perturbations au niveau des mécanismes endogènes impliqués dans la mise en place de la tolérance cellulaire.

En conclusion de cette première partie de mon projet de thèse, j'ai pu observer une accumulation importante de monocytes au niveau des articulations des enfants atteints d'AS, ce qui est cohérent avec le rôle essentiel que jouent ces cellules dans la défense contre les pathogènes. Pour les enfants atteints d'AJI, l'essentiel des perturbations observées se produit dans les articulations, notamment avec un nombre plus élevé de CD141⁺ cDC et CD123⁺ pDC détecté dans le LS. Une accumulation de ces CPA au sein des articulations de patients AJI s'accompagne donc d'une activation non régulée des lymphocytes T (à cause de la faible expression de PDL2 à leur surface) et expliquerait la rupture de tolérance.

Il est toutefois important de noter que, bien que les monocytes soient présents en nombre plus faible en cas d'AJI par rapport aux AS, cela n'enlève en rien le rôle pathogène qu'ils peuvent jouer dans ce rhumatisme chronique. En effet, des études réalisées sur des patients AJI montrent que ces cellules résistent à l'apoptose et libèrent des cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-12p40, l'IL-6 ou le TNF- α qui entretiennent l'inflammation au niveau des articulations (Saxena et al., 2005; Srivastava et al., 2010). De plus, les monocytes, tout comme les DCs, expriment fortement des marqueurs d'activation tels que HLA-DR, ce qui peut favoriser la présentation antigénique et ainsi l'exacerbation de la réaction inflammatoire chez les enfants atteints d'AJI. Un tel phénomène peut être accentué par le fait que le nombre de lymphocytes T articulaire est plus important en cas d'AJI comparé à l'AS, comme l'attestent nos résultats.

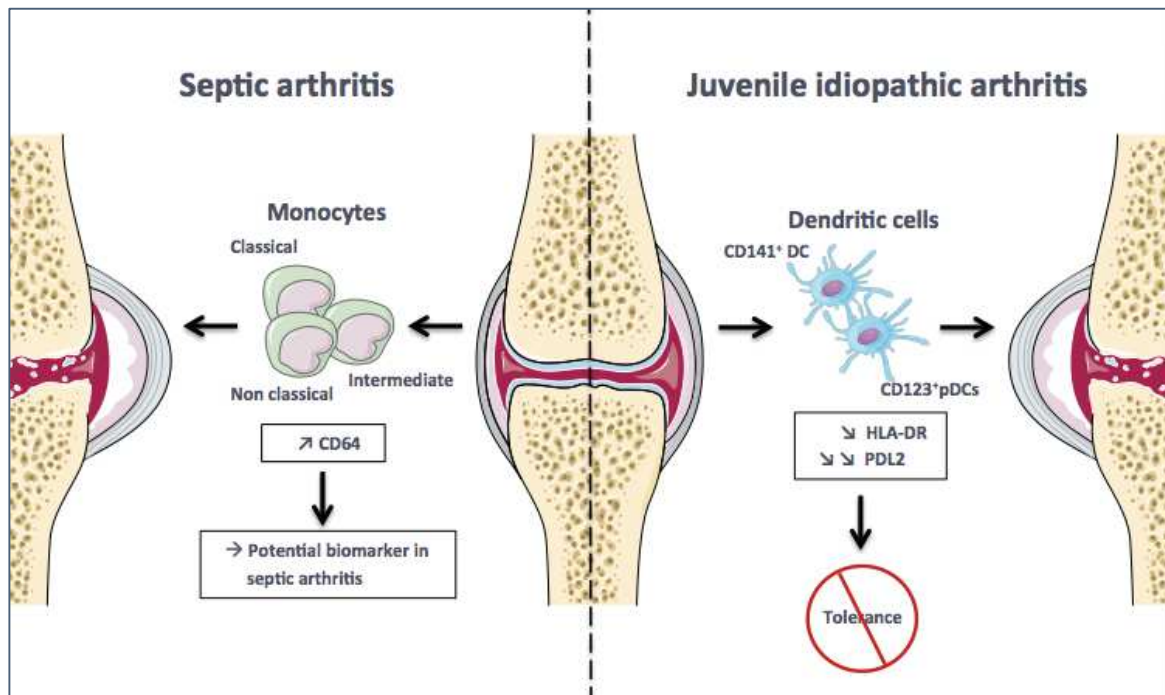


Figure 11 : Variation au niveau de l'accumulation et de l'activation des sous-populations de monocytes et de DCs du liquide synovial entre les patients atteints d'arthrite septique et ceux avec une arthrite juvénile idiopathique. Smart Servier Medical ART.

Analyses de l'expression des miARNs

Comme indiqué plus haut, je me suis également intéressée au profil d'expression des miARNs au niveau du sang périphérique et du LS des enfants atteints d'AJI. Dans le cadre de ma thèse, des comparaisons ont été réalisées, pour la première fois, avec l'expression des miARNs des patients AS afin d'identifier des signatures propres à l'AJI. Les miARNs étant connus pour leur spécificité et leur stabilité dans les fluides corporels, leur analyse avait pour objectif d'identifier des biomarqueurs potentiels permettant de discriminer AJI et AS et ainsi d'améliorer le diagnostic de ces deux formes d'arthrites juvéniles.

Similairement à la caractérisation des profils cellulaires, l'analyse de l'expression des miARNs circulants a montré des différences significatives entre AJI et AS au niveau du LS plutôt qu'au niveau du sang circulant. Une première étude avec une approche de séquençage à haut débit a permis d'identifier 19 miARNs présentant des différences d'expression entre ces

deux pathologies, avec 14 miARNs (miR-7150, miR-150-5p, miR-146a-5p, miR-6794-5p, miR-4800-5p, miR-4646-5p, miR-6782-5p, miR-4419a, miR4419b, miR-4667-5p, miR-155-5p, miR339-3p, miR-342-5p and miR-6716-5p) plus exprimés en cas d’AJI et 5 (miR-6734-3p, miR-6841-3p, miR-6764-5p, miR-8063 and miR-2909) surexprimés dans le LS des patients atteints d’AS. Afin de valider cette liste de miARNs, j’ai effectué des RT-qPCR sur une nouvelle cohorte de patients et identifié 5 miARNs du LS différemment exprimés entre AJI et AS : miR-150-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p et miR-342-5p sont plus fortement exprimés dans l’AJI alors que miR-6764-5p est plus exprimé dans l’AS.

Ces différences peuvent s’expliquer d’une part par des variabilités dépendant des échantillons biologiques. En effet, deux cohortes différentes ont été étudiées, ce qui nous a permis de s’affranchir des différences dues aux individus. De plus, le séquençage à haut débit est une technique plus sensible que la RT-qPCR. Pour cette raison, seuls 10 miARNs sur les 19 retenus à la suite du séquençage ont pu être détectés dans le LS avec les RT-qPCR. Par conséquent, pour remplir un cahier des charges relatif à l’identification de biomarqueurs diagnostiques utilisables en clinique, il est plus pertinent de s’intéresser aux 5 miARNs détectés en RT-qPCR et présentant des différences significatives entre AJI et AS. Une analyse de courbes de ROC associant spécificité et sensibilité m’a permis de retenir 3 miARNs avec une aire sous la courbe de 1 et un intervalle de confiance de 95% : miR-6764-5p, miR-155 et miR-146a-5p. Mes résultats montrent donc que la quantification par RT-qPCR de ces 3 miARNs au sein du LS des patients AJI et AS représente un outil pouvant considérablement améliorer le diagnostic de ces maladies. Notons toutefois qu’il est important de reproduire ces analyses avec du LS d’enfants atteints d’une AS provoquée par un autre pathogène que *Kingella kingae* car tous les patients AS inclus dans mon études étaient positifs pour ce seul pathogène. Ceci permettrait de s’assurer que les miARNs identifiés ne sont pas associés à cette bactérie. Enfin, il serait intéressant de tester cette signature de miARNs sur une nouvelle cohorte prospective d’arthrites juvéniles au moment de la première consultation pour les AJI et des AS non confirmées par exemple pour valider (ou non) ces marqueurs diagnostiques.

Pour étudier plus en profondeur les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l’AJI, il est intéressant de considérer l’ensemble des 19 miARNs identifiés à la suite du séquençage à haut débit. Les majorité de ces miARNs sont des miARNs nouvellement décrits dans la

miRBase v20 et il y a donc peu d'informations disponibles à leur sujet dans la littérature. Certains sont cependant décrits dans des maladies auto-immunes. C'est le cas de miR-342-5p qui est dérégulé dans le lupus érythémateux systémique et le diabète de type 1 (Chen et al., 2017; Hezova et al., 2010), ainsi que miR-6716-5p et miR-2909 décrits dans la PR (Lenert and Fardo, 2017; Malik et al., 2015). Pour ce qui est de miR-146a et miR-155, il s'agit de miARNs décrits dans de nombreux articles de la littérature pour le rôle qu'ils jouent dans la régulation de l'inflammation. MiR-146a est un régulateur négatif de la voie NFκB et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, l'ostéoclastogenèse, la maturation des DCs ou encore la présentation antigénique (Taganov et al., 2006; Vicente et al., 2016). A l'inverse, miR-155 est considéré comme un miARN pro-inflammatoire qui stimule notamment la différenciation des monocytes en macrophages en ciblant des gènes tels que *SOCS1* («Suppressor of cytokine signaling 1»), *CSF1R* (Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor) (O'Connell et al., 2007) et *MITF* (Mann et al., 2010). Des études comparant l'expression de ces deux miARNs dans le plasma ont montré des niveaux d'expression aberrants chez les patients AJI comparé à des enfants sains (Ma et al., 2016). Parmi les miARNs que j'ai identifié, certains sont également décrits dans des contextes infectieux. C'est le cas de miR-342-5p qui inhibe la biosynthèse du coxsackievirus B3, un pathogène associé à des maladies cardiaques (Wang et al., 2012), ou encore le miR-4667-5p pour lequel l'expression augmente en réponse à une infection à *Burkholderia pseudomallei* dans les cellules épithéliales pulmonaires (Li et al., 2015). Pour ce qui est de miR-150-5p, il est surexprimé dans des PBMC d'enfants AJI par rapport à des contrôles sains (Li et al., 2016), et, à l'inverse, faiblement exprimé dans le sérum de patients atteints de choc septique par rapport à des donneurs sains (Vasilescu et al., 2009), ce qui est en accord avec mes résultats.

De façon intéressante, les analyses effectuées avec le logiciel miRWalk ont montré l'implication de ces 19 miARNs dans la régulation de gènes appartenant à des voies de signalisation liées à l'insuline. Bien que ces voies ne soient pas encore étudiées en cas d'AJI, des analyses ont montré que la prévalence de la résistance à l'insuline est plus élevée chez les patients atteints de PR par rapport aux individus sains (Nicolau et al., 2017). D'autres études ont constaté que les enfants atteints de maladies inflammatoires comme le diabète de type 2 lié à une résistance à l'insuline présentaient un retard de croissance important (Child et al., 2011; Cirillo et al., 2018). Ce dernier peut s'expliquer en partie par les

concentrations importantes de cytokines pro-inflammatoires. En effet, De Benedetti et al. ont montré que les concentrations élevées d'IL-6 chez des souris arthritiques étaient associées à de faibles taux sériques d'IGF-1 et à un retard de croissance (De Benedetti et al., 1997). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication des miARNs dans la régulation des gènes liés à la résistance à l'insuline. Ceci permettrait d'identifier des mécanismes potentiellement associés aux retards de croissance dont peuvent souffrir les enfants atteints d'AJI.

L'ensemble de ces analyses avec les miARNs apporte des pistes qu'il serait intéressant d'explorer d'une part pour l'amélioration du diagnostic des enfants atteints d'arthrite, d'autre part pour étudier et comprendre des voies de signalisations impliquées dans la physiopathologie de l'AJI.

2. Comparaison entre les contextes systémique et articulaire

La deuxième partie de mon projet de thèse a eu pour objectif d'étudier l'implication des sous-populations de monocytes dans la physiopathologie de l'AJI oligoarticulaire en effectuant des comparaisons entre leur profil au niveau du sang et celui dans les articulations où se développe une inflammation chronique. Mes résultats montrent pour la première fois une accumulation de monocytes intermédiaires au niveau du LS des enfants atteints d'oligoarthrite, ce qui est en accord avec des données publiées sur des cas d'AJI liée à l'enthèse (Gaur et al., 2017). Comme expliqué ci-dessus, une augmentation de monocytes CD16⁺ a été identifiée dans de nombreuses pathologies, notamment des maladies infectieuses et inflammatoires. Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de l'environnement articulaire chez les patients atteints d'AJI, j'ai collaboré avec l'équipe du Pr. Edouard Tuaille (INSERM U1058) pour analyser le profil cytokinique du LS et le comparer à celui du sérum. Les résultats ont révélé des concentrations élevées en MCP-1, IP-10 et IL-8 au niveau du LS par rapport au sang, pouvant suggérer un recrutement de monocytes au niveau des articulations des patients. Des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-18, l'IL-6 et l'IFN α ont également été détectées en concentrations élevées dans le LS. Ces

résultats sont en accord avec les données de Saxena et al. qui montrent que IL-1 β et IL-6 peuvent être produites par les monocytes de patients atteints d’AJI et contribuer au développement d’un environnement inflammatoire dans les articulations de ces patients (Saxena et al., 2005). Par ailleurs, la production locale de taux élevés d’IL-1 β et IL-18 évoque l’activation de l’inflammasome dans les monocytes/macrophages de l’articulation. Enfin, la présence de IFN α est une cytokine signature des CD123⁺ pDCs que j’ai retrouvées en quantités importantes dans le LS des AJI.

J’ai cherché à caractériser l’effet du LS de patients atteints d’AJI sur des monocytes classiques de donneurs sains. Les analyses phénotypiques des monocytes CD14⁺ suite à la culture en présence de LS ont montré une modification des marqueurs membranaires de ces cellules qui acquièrent un phénotype similaire à celui des monocytes intermédiaires. Afin de comprendre l’effet du LS des patients AJI sur la modification phénotypique des monocytes sains, je me suis intéressée aux miARNs que j’avais identifiés dans le LS des AJI, et plus précisément à miR-150-5p. Comme indiqué plus haut, mes résultats de séquençage à haut débit, validés en RT-qPCR, montrent que miR-150-5p est plus exprimé dans le LS des patients AJI que celui des patients AS. Ce miARN joue un rôle important dans le développement des cellules myéloïdes et lymphoïdes (He et al., 2014). De plus, des études récentes ont montré qu’il intervient dans la différenciation terminale des monocytes via le ciblage du gène *TET3* (Selimoglu-Buet et al., 2018). Selimoglu-Buet et al. ont montré que la neutralisation du miR-150 diminue la génération de monocytes intermédiaires, ce qui est en accord avec mes résultats. J’ai cherché des gènes potentiellement ciblés par miR-150-5p qui pourraient être modulés au niveau des monocytes et qui joueraient un rôle dans la physiopathologie de l’AJI. Grâce à une analyse *in silico*, j’ai identifié une liste de gènes et mon intérêt s’est porté sur *CCR2*. Ce gène code pour un récepteur situé au niveau de la membrane des monocytes. De façon intéressante, son expression est forte à la surface des monocytes classiques et faible pour les non classiques. Il est impliqué dans leur recrutement au niveau des sites inflammatoires en réponse aux concentrations de MCP-1, chimiokine pour laquelle j’ai détecté des concentrations importantes dans le LS des patients atteints d’AJI (Weber et al., 2000). Ce récepteur a également été montré comme jouant un rôle dans la migration des cellules du site de l’inflammation vers les organes lymphoïdes où a lieu la présentation antigénique (Zhang et al., 2009). Mes résultats indiquent pour la première fois qu’une

neutralisation de l'expression de miR-150-5p dans les CD14⁺ est associée à une augmentation de l'expression de *CCR2*. Par conséquent, les taux importants de miR-150-5p au sein des articulations des enfants ayant une AJI pourraient induire une diminution de l'expression de *CCR2*, suivie d'une réduction de la migration des monocytes. Ceci pourrait alors favoriser l'accumulation de cellules CD14⁺⁺CD16⁺CCR2^{low} au niveau du LS des patients atteints d'AJI, entretenant ainsi la réaction inflammatoire locale.

En conclusion, j'ai constaté qu'il existe une accumulation de monocytes intermédiaires au sein du LS des patients atteints d'AJI. Les études que j'ai effectuées sur miR-150-5p suggèrent qu'il pourrait jouer un rôle clé dans la physiopathologie de l'AJI via l'impact qu'il a sur la génération des monocytes intermédiaires et l'inhibition de leur migration en ciblant *CCR2*.

3. Conclusions et perspectives

Mon projet de thèse m'a permis de mettre en évidence différents acteurs cellulaires et moléculaires pouvant être impliqués dans la physiopathologie de l'AJI. En comparant les sous-populations de cellules myéloïdes entre AJI et AS, j'ai identifié au niveau du LS des sous-types de DCs en nombre plus importants dans le rhumatisme chronique (CD141⁺ cDCs et CD123⁺ pDCs). Ces DCs expriment des taux faibles de PDL2 comparé aux patients atteints d'AS, suggérant qu'ils possèdent une capacité réduite à induire une tolérance via les lymphocytes T. De plus, l'analyse des profils cellulaires entre le sang et le LS des patients atteints d'AJI montre une accumulation importante de monocytes intermédiaires dans les articulations touchées par la maladie. Notons toutefois que, pour valider ces résultats, il est important d'effectuer de nouvelles inclusions de patients AJI et AS ayant des âges similaires afin de s'affranchir des variations cellulaires et moléculaires dues à l'âge.

Avec la caractérisation des profils d'expression des miARNs, j'ai identifié une liste de marqueurs du LS différemment exprimés entre le contexte infectieux et inflammatoire. Je me suis particulièrement intéressée à miR-150-5p et mes résultats suggèrent que ce miARN

qui est fortement exprimé en cas d'AJI serait impliqué dans l'accumulation des monocytes intermédiaires au sein des articulations des patients. En effet, en plus de jouer un rôle dans la génération de monocytes intermédiaires à partir de monocytes classiques en ciblant *TET3* comme démontré dans la littérature (Selimoglu-Buet et al., 2018), mes résultats montrent que miR-150-5p inhibe l'expression de *CCR2*. Ceci pourrait avoir pour conséquence de réduire la mobilité des monocytes et ainsi limiter leur migration vers les organes lymphoïdes.

Afin de valider la liaison directe du miR-150-5p au niveau de la séquence cible de l'ARNm du gène *CCR2*, il est nécessaire d'effectuer des analyses avec un système rapporteur (dual luciferase assay). Pour démontrer l'existence d'un axe de régulation miR-150/*CCR2* dans les monocytes, il sera nécessaire d'effectuer des expériences de perte et gain de fonction du miARN associées à la surexpression/inhibition de *CCR2* dans des CD14⁺. Par la suite, des analyses de l'expression génique et protéique de *CCR2* au niveau de monocytes isolés à partir du LS de patients atteints d'AJI devront être effectuées. De plus, les études que j'ai réalisées sur les monocytes de patients ainsi que ceux transfectés se limitaient à une caractérisation phénotypique. Il serait intéressant de les poursuivre avec des analyses fonctionnelles, c'est-à-dire caractériser les cytokines produites par ces cellules, étudier l'état d'activation de ces dernières, leur capacité à effectuer de la présentation antigénique et l'effet qu'elles ont sur la prolifération/polarisation des lymphocytes T.

De plus, les souris miR-150^{-/-} existant, il serait intéressant d'induire une arthrite chez ces animaux et d'étudier l'évolution de la maladie en l'absence du miR-150-5p. Si mon hypothèse est vraie, l'absence de miR-150 devrait protéger les animaux de la pathologie. Ces études *in vivo* seront à approfondir ensuite avec des études fonctionnelles sur les monocytes, leur migration et la polarisation des lymphocytes T chez les souris miR-150^{-/-} versus souris miR-150^{+/+}.

Enfin, bien que je me sois intéressée dans un premier temps à l'implication des monocytes dans l'AJI et le rôle de miR-150-5p sur leur phénotype, la caractérisation des DCs et l'effet de miR-150-5p sur leur fonction ont également leur intérêt pour comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'AJI.

F. Références bibliographiques

Agarwal, S., Misra, R., and Aggarwal, A. (2008). Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *J. Rheumatol.* *35*, 515–519.

Aggarwal, A., Sarangi, A.N., Gaur, P., Shukla, A., and Aggarwal, R. (2017). Gut microbiome in children with enthesitis-related arthritis in a developing country and the effect of probiotic administration. *Clin. Exp. Immunol.* *187*, 480–489.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193–197.

Al-Matar, M.J., Petty, R.E., Tucker, L.B., Malleson, P.N., Schroeder, M.-L., and Cabral, D.A. (2002). The early pattern of joint involvement predicts disease progression in children with oligoarticular (pauciarticular) juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *46*, 2708–2715.

Alonso-Ruiz, A., Pijoan, J.I., Ansuategui, E., Urkaregi, A., Calabozo, M., and Quintana, A. (2008). Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety. *BMC Musculoskelet. Disord.* *9*, 52.

Alsaeid, K., Haider, M.Z., Sharma, P.N., and Ayoub, E.M. (2006). The prevalence of human leukocyte antigen (HLA) DR/DQ/DP alleles in Kuwaiti children with oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol. Int.* *26*, 224–228.

Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S.K., Luscinskas, F.W., and Gabuzda, D. (2003). Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes. *J. Exp. Med.* *197*, 1701–1707.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 767–811.

De Benedetti, F., Alonzi, T., Moretta, A., Lazzaro, D., Costa, P., Poli, V., Martini, A., Ciliberto, G., and Fattori, E. (1997). Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with

chronic inflammation. *J. Clin. Invest.* *99*, 643–650.

Berendsen, A.D., and Olsen, B.R. (2015). Bone development. *Bone* *80*, 14–18.

Berntson, L., Fasth, A., Andersson-Gäre, B., Kristinsson, J., Lahdenne, P., Marhaug, G., Nielsen, S., Pelkonen, P., Svensson, E., and Nordic Study Group, N.S. (2001). Construct validity of ILAR and EULAR criteria in juvenile idiopathic arthritis: a population based incidence study from the Nordic countries. *International League of Associations for Rheumatology. European League Against Rheumatism. J. Rheumatol.* *28*, 2737–2743.

Beukelman, T., Patkar, N.M., Saag, K.G., Tolleson-Rinehart, S., Cron, R.Q., DeWitt, E.M., Ilowite, N.T., Kimura, Y., Laxer, R.M., Lovell, D.J., et al. (2011). 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: Initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. *63*, 465–482.

Bonilla, F.A., and Oettgen, H.C. (2010). Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S33–S40.

Bowyer, S.L., Roettcher, P.A., Higgins, G.C., Adams, B., Myers, L.K., Wallace, C., Rennebohm, R., Moore, T.L., Pepmueller, P.H., Spencer, C., et al. (2003). Health status of patients with juvenile rheumatoid arthritis at 1 and 5 years after diagnosis. *J. Rheumatol.* *30*, 394–400.

van den Broek, T., Hoppenreijns, E., Meerding, J., Scholman, R., Otten, H.G., Swart, J.F., Martini, A., Prakken, B., and de Jager, W. (2015). Cytokine profiling at disease onset: support for classification of young antinuclear antibody-positive patients as a separate category of juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 470–472.

Caparbo, V.F., Prada, F., Silva, C.A.A., Regio, P.L., and Pereira, R.M.R. (2009). Serum from children with polyarticular juvenile idiopathic arthritis (pJIA) inhibits differentiation, mineralization and may increase apoptosis of human osteoblasts “in vitro.” *Clin. Rheumatol.* *28*, 71–77.

Chen, J.-Q., Papp, G., Póliska, S., Szabó, K., Tarr, T., Bálint, B.L., Szodoray, P., and Zeher, M. (2017). MicroRNA expression profiles identify disease-specific alterations in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren’s syndrome. *PLoS One* *12*, e0174585.

Child, C.J., Zimmermann, A.G., Scott, R.S., Cutler, G.B., Battelino, T., and Blum, W.F. (2011). Prevalence and Incidence of Diabetes Mellitus in GH-Treated Children and Adolescents: Analysis from the GeNeSIS Observational Research Program. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E1025–E1034.

Chiu, B.-C., Freeman, C.M., Stolberg, V.R., Hu, J.S., Zeibecoglou, K., Lu, B., Gerard, C., Charo, I.F., Lira, S.A., and Chensue, S.W. (2004). Impaired lung dendritic cell activation in CCR2 knockout mice. *Am. J. Pathol.* *165*, 1199–1209.

Chow, A., Brown, B.D., and Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 788–798.

Cirillo, F., Lazzeroni, P., Catellani, C., Sartori, C., Amarri, S., and Street, M.E. (2018). MicroRNAs link chronic inflammation in childhood to growth impairment and insulin-resistance. *Cytokine Growth Factor Rev.* *39*, 1–18.

Cole, A.G. (2011). A review of diversity in the evolution and development of cartilage: the search for the origin of the chondrocyte. *Eur. Cell. Mater.* *21*, 122–129.

Coutant, F., and Miossec, P. (2016). Altered dendritic cell functions in autoimmune diseases: distinct and overlapping profiles. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 703–715.

Creemers, E.E., Tijssen, A.J., and Pinto, Y.M. (2012). Circulating MicroRNAs. *Circ. Res.* *110*, 483–495.

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., et al. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* *33*, 375–386.

Demedts, I.K., Bracke, K.R., Maes, T., Joos, G.F., and Brusselle, G.G. (2006). Different Roles for Human Lung Dendritic Cell Subsets in Pulmonary Immune Defense Mechanisms. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *35*, 387–393.

Ferrell, E.G., Ponder, L.A., Minor, L.S., Angeles-Han, S.T., Kennedy, C.W., Rouster-Stevens, K.A., Rohani-Pichavant, M., Vogler, L.B., and Prahalad, S. (2014). Limitations in the classification of childhood-onset rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* *41*, 547–553.

Flatø, B., Hoffmann-Vold, A.-M., Reiff, A., Førre, Øy., Lien, G., and Vinje, O. (2006). Long-term

outcome and prognostic factors in enthesitis-related arthritis: A case–control study. *Arthritis Rheum.* *54*, 3573–3582.

Foell, D., Wittkowski, H., Hammerschmidt, I., Wulffraat, N., Schmeling, H., Frosch, M., Horneff, G., Kuis, W., Sorg, C., and Roth, J. (2004). Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum.* *50*, 1286–1295.

Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., and Roth, J. (2007a). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 28–37.

Foell, D., Wittkowski, H., and Roth, J. (2007b). Mechanisms of Disease: a “DAMP” view of inflammatory arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* *3*, 382–390.

França, C.N., Izar, M.C.O., Hortêncio, M.N.S., do Amaral, J.B., Ferreira, C.E.S., Tuleta, I.D., and Fonseca, F.A.H. (2017). Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. *Clin. Sci. (Lond).* *131*, 1215–1224.

Gamrekelashvili, J., Giagnorio, R., Jussofie, J., Soehnlein, O., Duchene, J., Briseño, C.G., Ramasamy, S.K., Krishnasamy, K., Limbourg, A., Häger, C., et al. (2016). Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nat. Commun.* *7*, 12597.

Gao, X., Johnson, K.D., Chang, Y.-I., Boyer, M.E., Dewey, C.N., Zhang, J., and Bresnick, E.H. (2013). Gata2 cis-element is required for hematopoietic stem cell generation in the mammalian embryo. *J. Exp. Med.* *210*, 2833–2842.

Gattorno, M., Prigione, I., Morandi, F., Gregorio, A., Chiesa, S., Ferlito, F., Favre, A., Uccelli, A., Gambini, C., Martini, A., et al. (2004). Phenotypic and functional characterisation of CCR7 + and CCR7 - CD4 + memory T cells homing to the joints in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *7*, R256.

Gattorno, M., Chicha, L., Gregorio, A., Ferlito, F., Rossi, F., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Martini, A., and Manz, M.G. (2006). Distinct expression pattern of IFN- and TNF- in juvenile idiopathic arthritis synovial tissue. *Rheumatology* *46*, 657–665.

Gattorno, M., Chicha, L., Gregorio, A., Ferlito, F., Rossi, F., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A.,

Martini, A., and Manz, M.G. (2007). Distinct expression pattern of IFN-alpha and TNF-alpha in juvenile idiopathic arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)*. *46*, 657–665.

Gaur, P., Myles, A., Misra, R., and Aggarwal, A. (2017). Intermediate monocytes are increased in enthesitis-related arthritis, a category of juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* *187*, 234–241.

Giancane, G., Consolaro, A., Lanni, S., Davì, S., Schiappapietra, B., and Ravelli, A. (2016). Juvenile Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Treatment. *Rheumatol. Ther.* *3*, 187–207.

Giancane, G., Alongi, A., and Ravelli, A. (2017). Update on the pathogenesis and treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *29*, 523–529.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 953–964.

Gorman, J.D., and Criswell, L.A. (2002). The shared epitope and severity of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *28*, 59–78.

Guignant, C., Lepape, A., Huang, X., Kherouf, H., Denis, L., Poitevin, F., Malcus, C., Chéron, A., Allaouchiche, B., Gueyffier, F., et al. (2011). Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* *15*, R99.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578.

Haniffa, M., Collin, M., and Ginhoux, F. (2013). Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv. Immunol.* *120*, 1–49.

Harris, J.G., Kessler, E.A., and Verbsky, J.W. (2013). Update on the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *13*, 337–346.

He, Y., Jiang, X., and Chen, J. (2014). The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* *33*, 3887–3893.

Hezova, R., Slaby, O., Faltejskova, P., Mikulkova, Z., Buresova, I., Raja, K.R.M., Hodek, J., Ovesna, J., and Michalek, J. (2010). microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are

differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell. Immunol.* *260*, 70–74.

Hinks, A., Ke, X., Barton, A., Eyre, S., Bowes, J., Worthington, J., Thompson, S.D., Langefeld, C.D., Glass, D.N., Thomson, W., et al. (2009a). Association of the IL2RA/CD25 gene with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 251–257.

Hinks, A., Barton, A., Shephard, N., Eyre, S., Bowes, J., Cargill, M., Wang, E., Ke, X., Kennedy, G.C., John, S., et al. (2009b). Identification of a novel susceptibility locus for juvenile idiopathic arthritis by genome-wide association analysis. *Arthritis Rheum.* *60*, 258–263.

Hofer, T.P., Zawada, A.M., Frankenberger, M., Skokann, K., Satz, A.A., Gesierich, W., Schuberth, M., Levin, J., Danek, A., Rotter, B., et al. (2015). slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation. *Blood* *126*, 2601–2610.

Huang, J.-L., Yeh, C.-C., Shaw, C.-K., Yao, T.-C., Chen, L.-C., Lee, T.-D., and Kuo, M.-L. (2004). HLA-DRB1 genotyping in patients with juvenile idiopathic arthritis in Taiwan. *Eur. J. Immunogenet.* *31*, 185–188.

Hunter, P.J., Nistala, K., Jina, N., Eddaoudi, A., Thomson, W., Hubank, M., and Wedderburn, L.R. (2010). Biologic predictors of extension of oligoarticular juvenile idiopathic arthritis as determined from synovial fluid cellular composition and gene expression. *Arthritis Rheum.* *62*, 896–907.

Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H., and Nozawa-Inoue, K. (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.* *63*, 17–31.

de Jager, W., Hoppenreijns, E.P.A.H., Wulffraat, N.M., Wedderburn, L.R., Kuis, W., and Prakken, B.J. (2007). Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 589–598.

Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197–216.

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells

(DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* *207*, 1247–1260.

Juneja, P., and Hubbard, J.B. (2019). *Anatomy, Joints* (StatPearls Publishing).

Kaipainen-Seppänen, O., and Savolainen, A. (1996). Incidence of chronic juvenile rheumatic diseases in Finland during 1980-1990. *Clin. Exp. Rheumatol.* *14*, 441–444.

Kamphuis, S., Hrafnkelsdóttir, K., Klein, M.R., de Jager, W., Haverkamp, M.H., van Bilsen, J.H., Albani, S., Kuis, W., Wauben, M.H., and Prakken, B.J. (2006). Novel self-epitopes derived from aggrecan, fibrillin, and matrix metalloproteinase-3 drive distinct autoreactive T-cell responses in juvenile idiopathic arthritis and in health. *Arthritis Res. Ther.* *8*, R178.

Karsenty, G. (2003). The complexities of skeletal biology. *Nature* *423*, 316–318.

Kawamoto, H., and Minato, N. (2004). Myeloid cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 1374–1379.

Kim, A.R., Olsen, J.L., England, S.J., Huang, Y.-S., Fegan, K.H., Delgadillo, L.F., McGrath, K.E., Kingsley, P.D., Waugh, R.E., and Palis, J. (2015). Bmi-1 Regulates Extensive Erythroid Self-Renewal. *Stem Cell Reports* *4*, 995–1003.

Krenn, V., Morawietz, L., Perino, G., Kienapfel, H., Ascherl, R., Hassenpflug, G.J., Thomsen, M., Thomas, P., Huber, M., Kendoff, D., et al. (2014). Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol. - Res. Pract.* *210*, 779–786.

Kurahara, D.K., Grandinetti, A., Fujii, L.L.A., Tokuda, A.A., Galario, J.A., Han, M.J., Terrell, M.J., Yamamoto, K.S., Yamaga, K.M., and Person, D.A. (2007). Visiting consultant clinics to study prevalence rates of juvenile rheumatoid arthritis and childhood systemic lupus erythematosus across dispersed geographic areas. *J. Rheumatol.* *34*, 425–429.

Lande, R., Giacomini, E., Serafini, B., Rosicarelli, B., Sebastiani, G.D., Minisola, G., Tarantino, U., Riccieri, V., Valesini, G., and Coccia, E.M. (2004). Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J. Immunol.* *173*, 2815–2824.

Lashine, Y.A., Salah, S., Aboelenein, H.R., and Abdelaziz, A.I. (2015). Correcting the expression of miRNA-155 represses PP2Ac and enhances the release of IL-2 in PBMCs of

juvenile SLE patients. *Lupus* 24, 240–247.

Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261–268.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Lenert, A., and Fardo, D.W. (2017). Detecting novel micro RNAs in rheumatoid arthritis with gene-based association testing. *Clin. Exp. Rheumatol.* 35, 586–592.

Lesnik, P., Haskell, C.A., and Charo, I.F. (2003). Decreased atherosclerosis in *CX3CR1*^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 111, 333–340.

Levick, J.R. (1981). Permeability of Rheumatoid and Normal Human Synovium to Specific Plasma Proteins. *Arthritis Rheum.* 24, 1550–1560.

Li, H.-W., Xie, Y., Li, F., Sun, G.-C., Chen, Z., and Zeng, H.-S. (2016). Effect of miR-19a and miR-21 on the JAK/STAT signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Exp. Ther. Med.* 11, 2531–2536.

Li, Q., Fang, Y., Zhu, P., Ren, C.-Y., Chen, H., Gu, J., Jia, Y.-P., Wang, K., Tong, W., Zhang, W.-J., et al. (2015). *Burkholderia pseudomallei* survival in lung epithelial cells benefits from miRNA-mediated suppression of ATG10. *Autophagy* 11, 1293–1307.

Lorrot, M., Ilharreborde, B. (2008). Infections ostéo-articulaires de l'enfant. *Rev Prat Med Gen.* 22, 804.

Lotito, A.P.N., Campa, A., Silva, C.A.A., Kiss, M.H.B., and Mello, S.B. V (2007). Interleukin 18 as a marker of disease activity and severity in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 34, 823–830.

Ma, X., Wu, F., Xin, L., Su, G., He, F., Yang, Y., Sun, J., and Liu, Z. (2016). Differential plasma microRNAs expression in juvenile idiopathic arthritis. *Mod. Rheumatol.* 26, 224–232.

Macaubas, C., Nguyen, K., Milojevic, D., Park, J.L., and Mellins, E.D. (2009). Oligoarticular and polyarticular JIA: epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 616–626.

Macaubas, C., Nguyen, K., Deshpande, C., Phillips, C., Peck, A., Lee, T., Park, J.L., Sandborg, C., and Mellins, E.D. (2010). Distribution of circulating cells in systemic juvenile idiopathic arthritis across disease activity states. *Clin. Immunol.* *134*, 206–216.

MacDonald, K.P.A., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N.J. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* *100*, 4512–4520.

MacLennan, I., and Vinuesa, C. (2002). Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* *17*, 235–238.

Malik, D., Sharma, A., Raina, A., and Kaul, D. (2015). Deregulated Blood Cellular miR-2909 RNomics Observed in Rheumatoid Arthritis Subjects. *Arch. Med.* *7*, 1–6.

Mangge, H., Kenzian, H., Gallistl, S., Neuwirth, G., Liebmann, P., Kaulfersch, W., Beaufort, F., Muntean, W., and Schauenstein, K. (1995). Serum cytokines in juvenile rheumatoid arthritis: correlation with conventional inflammation parameters and clinical subtypes. *Arthritis Rheum.* *38*, 211–220.

Mann, M., Barad, O., Agami, R., Geiger, B., and Hornstein, E. (2010). miRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 15804–15809.

Manners, P., Lesslie, J., Speldewinde, D., and Tunbridge, D. (2003). Classification of juvenile idiopathic arthritis: should family history be included in the criteria? *J. Rheumatol.* *30*, 1857–1863.

Martín-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbí, A.L., and Toribio, M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* *115*, 5366–5375.

Martini, A. (2003). Are the number of joints involved or the presence of psoriasis still useful tools to identify homogeneous disease entities in juvenile idiopathic arthritis? *J. Rheumatol.* *30*, 1900–1903.

Martini, A., Ravelli, A., Avcin, T., Beresford, M.W., Burgos-Vargas, R., Cuttica, R., Ilowite, N.T., Khubchandani, R., Laxer, R.M., Lovell, D.J., et al. (2019). Toward New Classification Criteria for Juvenile Idiopathic Arthritis: First Steps, *Pediatric Rheumatology International Trials*

Organization International Consensus. *J. Rheumatol.* *46*, 190–197.

Masi, L., Simonini, G., Piscitelli, E., Del Monte, F., Giani, T., Cimaz, R., Vierucci, S., Brandi, M.L., and Falcini, F. (2004). Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J. Rheumatol.* *31*, 986–991.

Merino, A., Buendia, P., Martin-Malo, A., Aljama, P., Ramirez, R., and Carracedo, J. (2011). Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J. Immunol.* *186*, 1809–1815.

Morbach, H., Wiegering, V., Richl, P., Schwarz, T., Suffa, N., Eichhorn, E.-M., Eyrich, M., and Girschick, H.J. (2011). Activated memory B cells may function as antigen-presenting cells in the joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* *63*, 3458–3466.

Murray, K.J., Luyrink, L., Grom, A.A., Passo, M.H., Emery, H., Witte, D., and Glass, D.N. (1996). Immunohistological characteristics of T cell infiltrates in different forms of childhood onset chronic arthritis. *J. Rheumatol.* *23*, 2116–2124.

Myles, A., Tuteja, A., and Aggarwal, A. (2012). Synovial fluid mononuclear cell gene expression profiling suggests dysregulation of innate immune genes in enthesitis-related arthritis patients. *Rheumatology* *51*, 1785–1789.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* *204*, 3037–3047.

Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., and Asahara, H. (2008). Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* *58*, 1284–1292.

Nicolau, J., Lequerré, T., Bacquet, H., and Vittecoq, O. (2017). Rheumatoid arthritis, insulin resistance, and diabetes. *Jt. Bone Spine* *84*, 411–416.

Nielen, M.M.J., van Schaardenburg, D., Reesink, H.W., van de Stadt, R.J., van der Horst-Bruinsma, I.E., de Koning, M.H.M.T., Habibuw, M.R., Vandenbroucke, J.P., and Dijkmans,

- B.A.C. (2004). Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* *50*, 380–386.
- Nistala, K., Moncrieffe, H., Newton, K.R., Varsani, H., Hunter, P., and Wedderburn, L.R. (2008). Interleukin-17–producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum.* *58*, 875–887.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeldler, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* *122*, 932–942.
- O’Connell, R.M., Taganov, K.D., Boldin, M.P., Cheng, G., and Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1604–1609.
- Oen, K.G., and Cheang, M. (1996). Epidemiology of chronic arthritis in childhood. *Semin. Arthritis Rheum.* *26*, 575–591.
- Oen, K., Malleson, P.N., Cabral, D.A., Rosenberg, A.M., Petty, R.E., Reed, M., Schroeder, M.L., and Cheang, M. (2003). Early predictors of longterm outcome in patients with juvenile rheumatoid arthritis: subset-specific correlations. *J. Rheumatol.* *30*, 585–593.
- Ooi, K.G.-J., Galatowicz, G., Towler, H.M.A., Lightman, S.L., and Calder, V.L. (2006). Multiplex Cytokine Detection versus ELISA for Aqueous Humor: IL-5, IL-10, and IFN γ Profiles in Uveitis. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* *47*, 272.
- Oppegaard, O., Skodvin, B., Halse, A.-K., and Langeland, N. (2013). CD64 as a potential biomarker in septic arthritis. *BMC Infect. Dis.* *13*, 278.
- Orr, C., Sousa, E., Boyle, D.L., Buch, M.H., Buckley, C.D., Cañete, J.D., Catrina, A.I., Choy, E.H.S., Emery, P., Fearon, U., et al. (2017). Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nat. Rev. Rheumatol.* *13*, 463–475.
- Pacheco-Tena, C., Alvarado De La Barrera, C., López-Vidal, Y., Vázquez-Mellado, J., Richaud-Patin, Y., Amieva, R.I., Llorente, L., Martínez, A., Zúñiga, J., Cifuentes-Alvarado, M., et al. (2001). Bacterial DNA in synovial fluid cells of patients with juvenile onset

spondyloarthropathies. *Rheumatology (Oxford)*. *40*, 920–927.

Di Paola, M., Cavalieri, D., Albanese, D., Sordo, M., Pindo, M., Donati, C., Pagnini, I., Giani, T., Simonini, G., Paladini, A., et al. (2016). Alteration of Fecal Microbiota Profiles in Juvenile Idiopathic Arthritis. Associations with HLA-B27 Allele and Disease Status. *Front. Microbiol.* *7*, 1703.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* *408*, 86–89.

Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*.

Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., and Chan, E.K. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* *10*, R101.

Peake, N.J., Khawaja, K., Myers, A., Jones, D., Cawston, T.E., Rowan, A.D., and Foster, H.E. (2005). Levels of matrix metalloproteinase (MMP)-1 in paired sera and synovial fluids of juvenile idiopathic arthritis patients: relationship to inflammatory activity, MMP-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in a longitudinal study. *Rheumatology* *44*, 1383–1389.

Petty, R.E., Southwood, T.R., Baum, J., Bhattay, E., Glass, D.N., Manners, P., Maldonado-Cocco, J., Suarez-Almazor, M., Orozco-Alcala, J., and Prieur, A.M. (1998). Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J. Rheumatol.* *25*, 1991–1994.

Petty, R.E., Smith, J.R., and Rosenbaum, J.T. (2003). Arthritis and uveitis in children. *Am. J. Ophthalmol.* *135*, 879–884.

Petty, R.E., Southwood, T.R., Manners, P., Baum, J., Glass, D.N., Goldenberg, J., He, X., Maldonado-Cocco, J., Orozco-Alcala, J., Prieur, A.-M., et al. (2004). International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J. Rheumatol.* *31*, 390–392.

Pigati, L., Yaddanapudi, S.C.S., Iyengar, R., Kim, D.-J., Hearn, S.A., Danforth, D., Hastings, M.L.,

and Duelli, D.M. (2010). Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *PLoS One* 5, e13515.

Poehlmann, H., Schefold, J.C., Zuckermann-Becker, H., Volk, H.-D., and Meisel, C. (2009). Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit. Care* 13, R119.

Prahalad, S., and Glass, D.N. (2008). A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr. Rheumatol.* 6, 11.

Prakken, B., Albani, S., and Martini, A. (2011). Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet (London, England)* 377, 2138–2149.

Prelog, M., Schwarzenbrunner, N., Sailer-Höck, M., Kern, H., Klein-Franke, A., Ausserlechner, M.J., Koppelstaetter, C., Brunner, A., Duftner, C., Dejaco, C., et al. (2008). Premature aging of the immune system in children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 2153–2162.

Prutki, M., Tambic Bukovac, L., Jelusic, M., Potocki, K., Kralik, M., and Malcic, I. (2008). Retrospective study of juvenile spondylarthropathies in Croatia over the last 11 years. *Clin. Exp. Rheumatol.* 26, 693–699.

Rajaei, E., Jalali, M.T., Shahrabi, S., Asnafi, A.A., and Pezeshki, S.M.S. (2019). Association between Human Leukocyte Antigens with Autoimmune Diseases: Diagnostic Approach. *Curr. Rheumatol. Rev.* 15.

Ramos, T.N., Bullard, D.C., and Barnum, S.R. (2014). ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. *J. Immunol.* 192, 4469–4474.

Randolph, G.J., Sanchez-Schmitz, G., Liebman, R.M., and Schäkel, K. (2002). The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J. Exp. Med.* 196, 517–527.

Ravelli, A., and Martini, A. (2007). Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet (London, England)* 369, 767–778.

Ravelli, A., Migliavacca, D., Viola, S., Ruperto, N., Pistorio, A., and Martini, A. (1999). Efficacy of folinic acid in reducing methotrexate toxicity in juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Exp.*

Rheumatol. 17, 625–627.

Ravelli, A., Varnier, G.C., Oliveira, S., Castell, E., Arguedas, O., Magnani, A., Pistorio, A., Ruperto, N., Magni-Manzoni, S., Galasso, R., et al. (2011). Antinuclear antibody-positive patients should be grouped as a separate category in the classification of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 267–275.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.

Rigante, D., Bosco, A., and Esposito, S. (2015). The Etiology of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 49, 253–261.

Riise, O.R., Handeland, K.S., Cvancarova, M., Wathne, K.O., Nakstad, B., et al. (2008). Incidence and characteristics of arthritis in Norwegian children: a population-based study. *Pediatrics.* 121: e299-306

Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., and Wagner, U. (2012). The CD14^{bright} CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* 64, 671–677.

van Rossum, M., van Soesbergen, R., de Kort, S., ten Cate, R., Zwinderman, A.H., de Jong, B., Dijkmans, B., and van Venrooij, W.J. (2003). Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies in children with juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 30, 825–828.

Rubin, L.A., Amos, C.I., Wade, J.A., Martin, J.R., Bale, S.J., Little, A.H., Gladman, D.D., Bonney, G.E., Rubenstein, J.D., and Siminovitch, K.A. (1994). Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Linkage studies with the major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum.* 37, 1212–1220.

Ruperto, N., Murray, K.J., Gerloni, V., Wulffraat, N., Feitosa De Oliveira, S.K., Falcini, F., Dolezalova, P., Alessio, M., Burgos-Vargas, R., Corona, F., et al. (2004). A randomized trial of parenteral methotrexate comparing an intermediate dose with a higher dose in children with juvenile idiopathic arthritis who failed to respond to standard doses of methotrexate. *Arthritis Rheum.* 50, 2191–2201.

Ruperto, N., Nikishina, I., Pachanov, E.D., Shachbazian, Y., Prieur, A.M., Mouy, R., Joos, R., Zulian, F., Schwarz, R., Artamonova, V., et al. (2005). A randomized, double-blind clinical trial of two doses of meloxicam compared with naproxen in children with juvenile idiopathic arthritis: Short- and long-term efficacy and safety results. *Arthritis Rheum.* 52, 563–572.

Samson, L.M., Allen, U.D., Creery, W.D., Diaz-Mitoma, F., and Singh, R.N. (1997). Elevated interleukin-1 receptor antagonist levels in pediatric sepsis syndrome. *J. Pediatr.* 131, 587–591.

Sarma, P.K., Misra, R., and Aggarwal, A. (2008). Elevated serum receptor activator of NFκB ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), matrix metalloproteinase (MMP)3, and ProMMP1 in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Rheumatol.* 27, 289–294.

Saxena, N., Aggarwal, A., and Misra, R. (2005). Elevated concentrations of monocyte derived cytokines in synovial fluid of children with enthesitis related arthritis and polyarticular types of juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 32, 1349–1353.

Sedlackova, L., Velek, J., Vavrincova, P., and Hromadnikova, I. (2006). Peripheral blood mononuclear cell responses to heat shock proteins and their derived synthetic peptides in juvenile idiopathic arthritis patients. *Inflamm. Res.* 55, 153–159.

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* 38, 336–348.

Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 640–653.

Selimoglu-Buet, D., Rivière, J., Ghamlouch, H., Bencheikh, L., Lacout, C., Morabito, M., Diop, M., Meurice, G., Breckler, M., Chauveau, A., et al. (2018). A miR-150/TET3 pathway regulates the generation of mouse and human non-classical monocyte subset. *Nat. Commun.* 9, 5455.

Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 421–452.

Shenoi, S., and Wallace, C.A. (2010). Tumor Necrosis Factor Inhibitors in the Management of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Pediatr. Drugs* 12, 367–377.

- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–1837.
- Singh, Y.P., Singh, A.K., Aggarwal, A., Misra, R., Glass, D.N., Goldenberg, J., He, X., Maldonado-Cocco, J., Orozco-Alcala, J., Prieur, A.-M., et al. (2011). Evidence of cellular immune response to outer membrane protein of *Salmonella typhimurium* in patients with enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 38, 161–166.
- Skrzeczyńska-Moncznik, J., Bzowska, M., Lośseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., and Pryjma, J. (2008). Peripheral Blood CD14^{high} CD16⁺ Monocytes are Main Producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* 67, 152–159.
- Skrzeczynska, J., Kobylarz, K., Hartwich, Z., Zembala, M., and Pryjma, J. (2002). CD14+CD16+ Monocytes in the Course of Sepsis in Neonates and Small Children: Monitoring and Functional Studies. *Scand. J. Immunol.* 55, 629–638.
- Smiljanovic, B., Radzikowska, A., Kuca-Warnawin, E., Kurowska, W., Grün, J.R., Stuhlmüller, B., Bonin, M., Schulte-Wrede, U., Sörensen, T., Kyogoku, C., et al. (2018). Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann. Rheum. Dis.* 77, 300–308.
- Smolewska, E., Stańczyk, J., Brózik, H., Biernacka-Zielińska, M., Cebula, B., Robak, T., and Smolewski, P. (2008). Distribution and clinical significance of blood dendritic cells in children with juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 762–768.
- Srivastava, S., Macaubas, C., Deshpande, C., Alexander, H.C., Chang, S.-Y., Sun, Y., Park, J.L., Lee, T., Begovich, A., and Mellins, E.D. (2010). Monocytes are resistant to apoptosis in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Immunol.* 136, 257–268.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., et al. (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987, 15–25.
- Stoll, M.L., and Nigrovic, P.A. (2006). Subpopulations within juvenile psoriatic arthritis: a review of the literature. *Clin. Dev. Immunol.* 13, 377–380.

- Stoll, M.L., Zurakowski, D., Nigrovic, L.E., Nichols, D.P., Sundel, R.P., and Nigrovic, P.A. (2006). Patients with juvenile psoriatic arthritis comprise two distinct populations. *Arthritis Rheum.* *54*, 3564–3572.
- Tabarkiewicz, J., Postępski, J., Olesińska, E., Roliński, J., and Tuskiewicz-Misztal, E. (2011). Identification of dendritic cells in the blood and synovial fluid of children with Juvenile Idiopathic Arthritis. *Folia Histochem. Cytobiol.* *49*, 188–199.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12481–12486.
- Tak, P.P., and Bresnihan, B. (2000). The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: Advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum.* *43*, 2619–2633.
- Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C.C., and Hanna, R.N. (2015). Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *35*, 1306–1316.
- Thompson, S.D., Moroldo, M.B., Guyer, L., Ryan, M., Tombragel, E.M., Shear, E.S., Prahalad, S., Sudman, M., Keddache, M.A., Brown, W.M., et al. (2004). A genome-wide scan for juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage. *Arthritis Rheum.* *50*, 2920–2930.
- Tortora, G.J., and Derrickson, B. (2010). *Introduction to the human body : the essentials of anatomy and physiology* (John Wiley & Sons).
- Ueno, H., Schmitt, N., Palucka, A.K., and Banchereau, J. (2010). Dendritic cells and humoral immunity in humans. *Immunol. Cell Biol.* *88*, 376–380.
- Valenti, M.T., Dalle Carbonare, L., and Mottes, M. (2016). Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Vannucci, G., Cantarini, L., Giani, T., Marrani, E., Moretti, D., Pagnini, I., Simonini, G., and Cimaz, R. (2013). Glucocorticoids in the Management of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Pediatr. Drugs* *15*, 343–349.
- Varsani, H., Patel, A., van Kooyk, Y., Woo, P., and Wedderburn, L.R. (2003). Synovial dendritic

cells in juvenile idiopathic arthritis (JIA) express receptor activator of NF-kappaB (RANK). *Rheumatology (Oxford)*. 42, 583–590.

Vasilescu, C., Rossi, S., Shimizu, M., Tudor, S., Veronese, A., Ferracin, M., Nicoloso, M.S., Barbarotto, E., Popa, M., Stanciulea, O., et al. (2009). MicroRNA Fingerprints Identify miR-150 as a Plasma Prognostic Marker in Patients with Sepsis. *PLoS One* 4, e7405.

Vicente, R., Noël, D., Pers, Y.-M., Apparailly, F., and Jorgensen, C. (2016). Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 211–220.

Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 29, 352–361.

Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356, eaah4573.

Vora, S.S., Bengtson, C.E., Syverson, G.D., and Nocton, J.J. (2010). An evaluation of the utility of routine laboratory monitoring of juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients using non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): a retrospective review. *Pediatr. Rheumatol.* 8, 11.

Wallace, C.A., Huang, B., Bandeira, M., Ravelli, A., and Giannini, E.H. (2005). Patterns of clinical remission in select categories of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 3554–3562.

Wang, L., Qin, Y., Tong, L., Wu, S., Wang, Q., Jiao, Q., Guo, Z., Lin, L., Wang, R., Zhao, W., et al. (2012). MiR-342-5p suppresses coxsackievirus B3 biosynthesis by targeting the 2C-coding region. *Antiviral Res.* 93, 270–279.

Weber, C., Belge, K.-U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S.C., and Ziegler-Heitbrock, H.W.L. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* 67, 699–704.

Wedderburn, L.R., Robinson, N., Patel, A., Varsani, H., and Woo, P. (2000). Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children

with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* *43*, 765.

Wei, C.-M., Lee, J.-H., Wang, L.-C., Yang, Y.-H., Chang, L.-Y., and Chiang, B.-L. (2008). Frequency and phenotypic analysis of CD4+CD25+ regulatory T cells in children with juvenile idiopathic arthritis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* *41*, 78–87.

Weiss, P.F., Beukelman, T., Schanberg, L.E., Kimura, Y., Colbert, R.A., CARRA Registry Investigators, J., He, X., Maldonado-Cocco, J., Orozco-Alcala, J., Prieur, A.-M., et al. (2012). Enthesitis-related arthritis is associated with higher pain intensity and poorer health status in comparison with other categories of juvenile idiopathic arthritis: the Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance Registry. *J. Rheumatol.* *39*, 2341–2351.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855–862.

Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., and Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* *118*, e16-31.

Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* *53*, 41–57.

Wouters, C.H.P., Ceuppens, J.L., and Stevens, E.A.M. Different circulating lymphocyte profiles in patients with different subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *20*, 239–248.

Wouters, C.H.P., Ceuppens, J.L., and Stevens, E.A.M. (2002). Different circulating lymphocyte profiles in patients with different subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *20*, 239–248.

Yakar, S., and Adamo, M.L. (2012). Insulin-like growth factor 1 physiology: lessons from mouse models. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *41*, 231–247, v.

Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., and Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* *2*, 1.

Yang, S., Hollister, A.M., Orchard, E.A., Chaudhery, S.I., Ostanin, D. V, Lokitz, S.J., and Mathis, J. (2013). Quantification of bone changes in a collagen-induced arthritis mouse model by reconstructed three dimensional micro-CT. *Biol. Proced. Online* 15, 8.

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.

Yu, C.I., Becker, C., Metang, P., Marches, F., Wang, Y., Toshiyuki, H., Banchereau, J., Merad, M., and Palucka, A.K. (2014). Human CD141+ dendritic cells induce CD4+ T cells to produce type 2 cytokines. *J. Immunol.* 193, 4335–4343.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50–e61.

Zeggini, E., Donn, R.P., Ollier, W.E.R., and Thomson, W. (2002). Evidence for linkage of HLA loci in juvenile idiopathic oligoarthritis: Independent effects of HLA-A and HLA-DRB1. *Arthritis Rheum.* 46, 2716–2720.

Zhang, N., Schröppel, B., Lal, G., Jakubzick, C., Mao, X., Chen, D., Yin, N., Jessberger, R., Ochando, J.C., Ding, Y., et al. (2009). Regulatory T Cells Sequentially Migrate from Inflamed Tissues to Draining Lymph Nodes to Suppress the Alloimmune Response. *Immunity* 30, 458–469.

Zhang, Y., Chung, Y., Bishop, C., Daugherty, B., Chute, H., Holst, P., Kurahara, C., Lott, F., Sun, N., Welcher, A.A., et al. (2006). Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11695–11700.

Zhao, Q., and Jung, L.K. (2018). Frequency of CD19+CD24hiCD38hi regulatory B cells is decreased in peripheral blood and synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis: a preliminary study. *Pediatr. Rheumatol.* 16, 44.

Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Fingerle, G., Ströbel, M., Schraut, W., Stelzer, F., Schütt, C., Passlick, B., and Pforte, A. (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 23, 2053–2058.

Zulian, F., Martini, G., Gobber, D., Plebani, M., Zacchello, F., and Manners, P. (2004).
Triamcinolone acetonide and hexacetonide intra-articular treatment of symmetrical joints in
juvenile idiopathic arthritis: a double-blind trial. *Rheumatology* 43, 1288–1291.