



HAL
open science

**Etude in vitro de l'impact de la drogue ABX sur les
macrophages primaires humains issus de monocytes du
sang périphérique dans un contexte inflammatoire :
Implication du micro-ARN 124**

Christina Begon-Pescia

► **To cite this version:**

Christina Begon-Pescia. Etude in vitro de l'impact de la drogue ABX sur les macrophages primaires humains issus de monocytes du sang périphérique dans un contexte inflammatoire : Implication du micro-ARN 124. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT020 . tel-03144089

HAL Id: tel-03144089

<https://theses.hal.science/tel-03144089>

Submitted on 17 Feb 2021

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En biologie

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)

Laboratoire collaboratif : CNRS UMR5535 / ABIVAX

**Etude *in vitro* de l'impact de la drogue ABX sur les
macrophages primaires humains issus de monocytes du
sang périphérique dans un contexte inflammatoire
Implication du micro-ARN 124**

Présentée par Christina BEGON-PESCIA

Le mardi 6 octobre 2020

Sous la direction de M. Jamal Tazi : Directeur de thèse
et de Mme Claire Daien : co-Directrice de thèse

Devant le jury composé de

Stephen Baghdiguian, Professeur, Université de Montpellier

Florence Niedergang, DR2, CNRS, Institut Cochin, Paris 14

Arnaud Jacquel, CR, Sophia Antipolis, Nice

Céline Cougoule, CR, IPBS, Toulouse

Jamal Tazi, Professeur, ABIVAX, Montpellier

Claire Daien PHU, CNRS/ABIVAX, Montpellier

Président, Examineur

Examinatrice

Rapporteur

Rapportrice

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

"Ceux qui abandonnent ne gagnent jamais,
ceux qui gagnent n'abandonnent jamais." Steve Jobs

A ma famille...
mon père, ma mère, mon mari Pierre, mon fils Ianis et ma fille Léane

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci à Arnaud Jacquet et à Céline Cougoule qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon mémoire de thèse.

Je remercie également Stephen Baghdiguian et Florence Niedergang pour avoir accepté d'être les examinateurs de mon travail de thèse.

Cher Jamal Tazi, merci pour ta confiance, merci de m'avoir donné la possibilité de mener ce projet de recherche, mais surtout merci d'avoir accepté que ce projet soit mis en valeur à travers ma thèse.

Un grand merci à tous mes collègues ainsi qu'aux différentes directions de l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (Jean-Marie Blanchard, Marc Piechaczyk et Etienne Schwob) pour m'avoir supporté et encouragé au cours de ces 18 années passées à l'Institut.

Et pour finir je remercie avec beaucoup d'émotions ma famille et tous mes amis et amies qui m'ont aidé à ne pas abandonner au cours de cette dernière année. Cette dernière année a été une remise en question permanente quant à l'alignement de mes valeurs.

Cette thèse est certes un projet scientifique d'équipe, mais elle représente pour moi tout l'investissement professionnel et personnel que j'ai pu avoir au cours de ces 18 années passées à l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier.

Un grand Merci !

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En biologie

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)

Laboratoire collaboratif : CNRS UMR5535 / ABIVAX

**Etude *in vitro* de l'impact de la drogue ABX sur les
macrophages primaires humains issus de monocytes du
sang périphérique dans un contexte inflammatoire
Implication du micro-ARN 124**

Présentée par Christina BEGON-PESCIA

Le mardi 6 octobre 2020

Sous la direction de M. Jamal Tazi : Directeur de thèse
et de Mme Claire Daien : co-Directrice de thèse

Devant le jury composé de

Stephen Baghdiguian, Professeur, Université de Montpellier

Florence Niedergang, DR2, CNRS, Institut Cochin, Paris 14

Arnaud Jacquet, CR, Sophia Antipolis, Nice

Céline Cougoule, CR, IPBS, Toulouse

Jamal Tazi, Professeur, ABIVAX, Montpellier

Claire Daien PHU, CNRS/ABIVAX, Montpellier

Président, Examineur

Examinatrice

Rapporteur

Rapporteuse

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	p.13
Partie 1 Etat de l'Art / Revue bibliographique.....	p.15
Avant – propos.....	p.17
Chapitre 1 Généralités sur l'inflammation.....	p.19
I- L'inflammation.....	p.21
1- Définition.....	p.21
2- Les médiateurs cellulaires.....	p.23
3- Les médiateurs chimiques.....	p.49
II- Les différents types d'inflammation.....	p.69
1- L'inflammation aiguë.....	p.69
2- L'inflammation chronique.....	p.70
Chapitre 2 Généralités sur l'immunité.....	p.77
I- Le système immunitaire inné.....	p.81
1- Les Récepteurs « Toll-Like » (TLR).....	p.83
2- Le TLR4 et sa voie de signalisation.....	p.91
3- Les Récepteurs « NOD Like » (NLR).....	p.95
4- L'inflammasome NLRP3.....	p.99
II- Le système immunitaire adaptatif.....	p.101
Chapitre 3 Les monocytes et les macrophages humains dans l'inflammation...p.113	
I- Les monocytes	p.115
1- Hétérogénéité des monocytes.....	p.115
2- Les monocytes dans les maladies inflammatoires chroniques.....	p.121
II- Les macrophages.....	p.123

1- Hétérogénéité et nomenclature liée au micro-environnement des macrophages.....	p.123
2- Les molécules de communication impliquées dans les polarisations.....	p.131
3- Les déterminants moléculaires de la polarisation.....	p.137
4- La polarisation des macrophages dans les inflammations chroniques....	p.138
Chapitre 4 Les micro-ARN : régulateurs des réponses inflammatoires.....	p.143
I- Généralités sur les micro-ARN.....	p.145
1- Biogenèse et mécanismes d'action des micro-ARN.....	p.145
2- Les micro-ARN dans le système immunitaire.....	p.147
II- Régulation de l'inflammation par les micro-ARN.....	p.151
1- Effets anti-inflammatoires des micro-ARN.....	p.151
2- Rôle des micro-ARN dans la polarisation des macrophages.....	p.155
3- Le micro-ARN 124.....	p.165
Partie 2 Travaux de recherche.....	p.171
1- Résumé.....	p.172
2- Introduction.....	p.175
3- Matériels et méthodes.....	p.178
4- Résultats.....	p.188
5- Discussion.....	p.216
Partie 3 Conclusion / perspectives.....	p.229
Références bibliographiques.....	p.245
Annexes	

Résumé

Les macrophages sont des médiateurs cellulaires hétérogènes, dont le rôle est crucial dans l'inflammation. Une molécule chimique ABX a été développée par la société privée ABIVAX et fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II (colite ulcéreuse, polyarthrite rhumatoïde). En collaboration avec le CNRS, il a été observé que cette drogue ABX est un puissant anti-inflammatoire capable d'induire spécifiquement la surexpression du miR-124, décrit pour ses propriétés anti-inflammatoires. L'objectif de mon projet de thèse a été de caractériser *in vitro*, les modulations phénotypiques et les mécanismes moléculaires mis en jeu par la drogue ABX, sur des macrophages humains dérivés de monocytes (Hu MDM) de donneurs sains dans un contexte inflammatoire, et prétraités par la drogue ABX versus contrôle. Les données obtenues sur 6 Hu MDM montrent d'une part, une diminution significative des récepteurs membranaires du phénotype M1 (CD86, CD274), et d'autre part, une diminution significative des facteurs impliqués dans la voie de signalisation du TLR4 (p65/RelA, I κ B ζ /NF κ BIZ, TRAF6). De plus l'analyse du profil sécrétoire montre une diminution significative d'un ensemble de protéines pro-inflammatoires, à savoir : des cytokines (IL-6, TNF α , IL-1 β), des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaires et le recrutement des leucocytes (ICAM-1, CXCL1), ainsi que la chimiokine responsable de l'infiltration des macrophages (MCP-1/ CCL2). Fait remarquable, les données obtenues avec 14 HuMDM, montrent une surexpression significative du micro-ARN 124 de 3,4 fois par rapport au contrôle. Somme toute, l'ensemble de ces données suggère que la drogue ABX, limite l'excès d'inflammation, et jouerait un rôle dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire. La surexpression du miR-124 est en concordance avec les données obtenues *in vitro* sur les lymphocytes T CD4 et les PBMC humains, mais également avec les données cliniques obtenues avec des patients atteints de colite ulcéreuse. Finalement, le laboratoire identifie, pour la première fois le potentiel immunorégulateur de la drogue ABX dans l'inflammation. En induisant la surexpression spécifique du miR-124, la drogue ABX, atténue le profil pro-inflammatoire des macrophages par un rétrocontrôle négatif de la voie TLR4/NF- κ B. Le miR-124 potentialise l'effet homéostatique de la drogue ABX. Cette nouvelle molécule chimique ABX pourrait représenter une nouvelle perspective thérapeutique, visant à rééquilibrer certains médiateurs impliqués dans l'immunité innée et adaptative.

Mots-clés : macrophages, inflammation, drogue ABX, micro-ARN 124, TLR4, NF- κ B

Partie 1

Etat de l'Art / Revue bibliographique

Avant-propos

La régulation du système immunitaire est un élément crucial dans le maintien de l'homéostasie corporelle. En effet, le système immunitaire qui nous protège contre les infections peut aussi provoquer de nombreux effets négatifs sur nos propres cellules et tissus et ainsi provoquer des inflammations par exemple. Le fonctionnement du système immunitaire dont la fonction première est de nous protéger contre les infections, implique de nombreux organes, de cellules, de molécules, et de voies de signalisation tout au long de processus interconnectés.

Les avancés en imagerie cellulaire, en génétique, en bio-informatique, de même qu'en biologie cellulaire et moléculaire, ont permis à la communauté scientifique de mieux connaître l'ensemble des facteurs mis en jeu. Le système immunitaire interagit avec tous les systèmes endocriniens, nerveux, digestif, cardio-vasculaire pour reconnaître et détruire tout ce qui n'appartient pas à l'organisme.

Je commencerai par vous présenter dans un premier chapitre l'inflammation de manière globale. Ce premier chapitre me permettra de présenter les médiateurs cellulaires et chimiques, qui sont responsables de l'inflammation. Dans ce chapitre, j'aborderai également dans les grandes lignes les inflammations chroniques à caractère auto-immuns (*maladies chroniques de l'intestin et la polyarthrite rhumatoïde*). Ces pathologies font actuellement l'objet d'études cliniques de phase II avec la drogue ABX utilisée dans mes travaux de recherche (nouvelle molécule chimique antirétroviral et anti-inflammatoire ; développée par la société privée ABIVAX). Et ce n'est qu'après avoir discuté de la complexité du système immunitaire dans le deuxième chapitre, que j'attirerai votre attention sur le rôle des monocytes avant de détailler celui des macrophages dans un troisième chapitre.

Pour finir, c'est dans un quatrième chapitre, que je discuterai de l'implication des micro-ARN qui interviennent en tant que régulateurs des réponses inflammatoires. Enfin, je clôturerai cet état de l'art en me focalisant sur le micro-ARN 124, qui semble être la clé, des puissants effets anti-inflammatoires observés en clinique et qui, d'après les études *in vitro* que j'ai pu mener sur les macrophages, le miR-124 aurait un rôle dans le maintien de l'homéostasie. Finalement, j'espère qu'à la suite de la présentation de mes travaux de recherche, je réussirai à vous convaincre que le développement de petites molécules chimiques comme la drogue ABX, pourrait représenter une nouvelle perspective thérapeutique, dont la première intention, serait de traiter les inflammations excessives en « rééquilibrant » tous les acteurs impliqués dans le système immunitaire inné et adaptatif.

Chapitre 1

Généralités sur l'inflammation

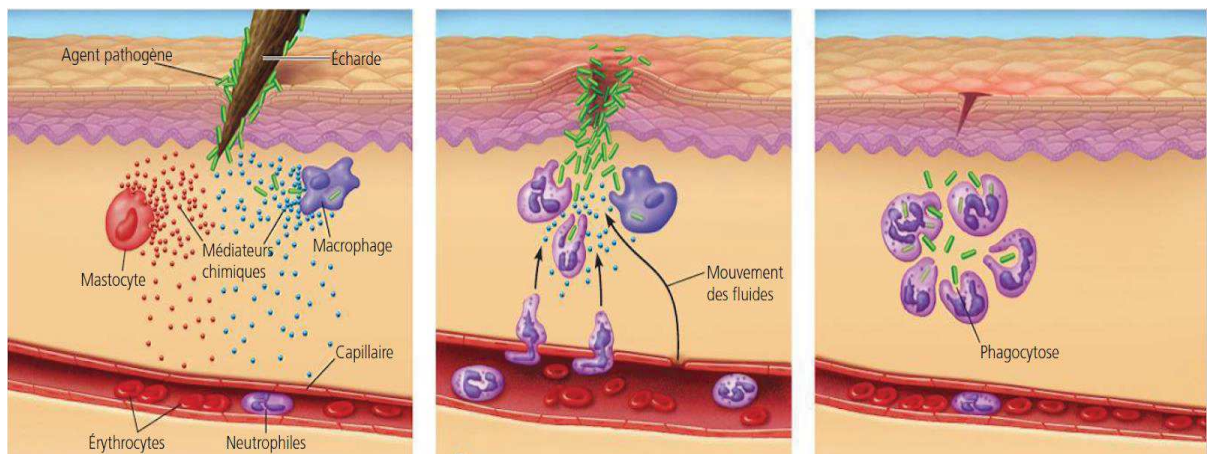


Figure 1 : Les principaux évènements de la réaction inflammatoire localisée. Les mastocytes (cellules du tissu conjonctif) libèrent de l’histamine, tandis que les macrophages sécrètent des cytokines. Ces médiateurs vont provoquer la dilatation des capillaires qui deviennent perméables. Les médiateurs chimiques libérés attirent les neutrophiles (diapédèse des neutrophiles) qui, tout comme les macrophages vont digérer les agents pathogènes.

I- L'inflammation

L'inflammation est un phénomène connu depuis l'époque des Egyptiens selon le Dr Sahar Saleem (Professeure de radiologie à l'université du Caire). Cette notion d'inflammation sera reprise de façon plus précise par Cornelius Celsius au 1^{er} siècle avant JC (Netea et al., 2017). Les aspects qu'il cite représentent « 4 cardinaux » qui restent d'actualités de nos jours: « *Tumor* » (œdème), « *Rubor* » (rougeur), « *Calor* » (chaleur) « *Dolor* » (douleur) (Alessandri et al., 2013). Cette description se trouve modulée dans le temps, car entre 1850 et 1860, Rudolph Virchow (anatomo-pathologiste), rajoute à ces signes la notion de fonctionnalité: « *Fonctio Loesa* » (perte de fonction). Cette dernière notion va alors initier l'importance du maintien de l'intégrité du « soi » (soit l'homéostasie). Plus tard entre 1876 et 1885, Robert Koch et Louis Pasteur, faisant suite à leurs études d'identification des microorganismes et de la vaccination, confirment que ces « 5 cardinaux » décrivent les événements principaux mis en jeu lors d'une inflammation.

Enfin, Elie Metchnikoff, en 1884 développa la notion de « macrophages » : cellules qui réduisent les corps étrangers qui ont pénétré l'organisme, et il les qualifia de « microphages » ; celles qui sont connues aujourd'hui sous le nom de granulocytes neutrophiles. Il est ainsi le premier qui ait saisi l'importance de ces cellules dans la résolution de l'inflammation. Cependant, en 1917, Ludwig Aschoff mentionnait la difficulté de déterminer les aspects bénéfiques ou néfastes de l'inflammation. Ainsi, la notion « globale » de l'inflammation fut abandonnée. Il a fallu attendre les années 80 et la découverte d'une spécificité de la réponse inflammatoire en fonction du type d'agresseur, pour distinguer l'inflammation aiguë de l'inflammation chronique. Notez que j'aborderai ces notions un peu plus loin. Alors finalement comment définit-on l'inflammation de nos jours ?

1- Définition

L'inflammation, ou la réaction inflammatoire, est un mécanisme naturel qui se met en place quand l'organisme subit une agression : chimique, toxique, microbienne, traumatique, environnementale. Ce processus réactionnel de défense permet d'assurer le maintien de l'intégrité du « soi ». La réaction inflammatoire est essentiellement locale et elle entraîne une mobilisation de cellules qui jouent un rôle important. On distingue principalement les leucocytes, comme les neutrophiles et les macrophages **Figure 1**.

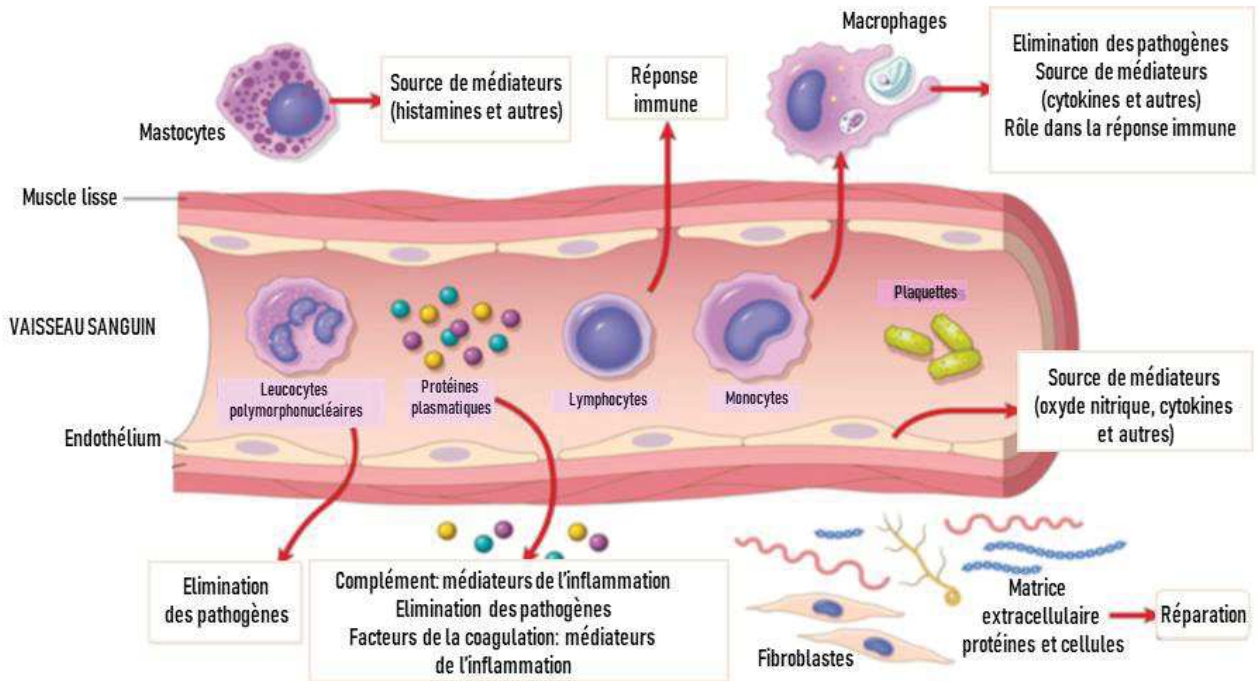


Figure 2 : Les médiateurs cellulaires et chimiques de l'inflammation. Les cellules de l'inflammation sont des cellules de la circulation sanguine. On distingue des neutrophiles, des lymphocytes, des monocytes, des macrophages et des mastocytes ; source de médiateurs moléculaires de l'inflammation (histamines, cytokines et chimiokines).

Localement ces cellules sécrètent des médiateurs chimiques, comme des cytokines et des chimiokines, qui vont induire une vasodilatation des vaisseaux. Cette dilatation des vaisseaux permet l'afflux d'autres cellules (par un phénomène de diapédèse) qui viennent aider à lutter contre l'agression. Cependant, si l'inflammation ne peut pas être contrôlée, le système de défense devient de plus en plus important, avec la mise en place d'une réponse plus complexe du système immunitaire (immunité innée et adaptative). Je décrirai ces notions dans le chapitre de l'immunité.

La réaction inflammatoire est indispensable à l'organisme : elle permet l'élimination des agresseurs et la réparation des lésions.

L'inflammation fait intervenir essentiellement des cellules comme les granulocytes (neutrophiles), les monocytes/macrophages et les lymphocytes **Figure 2**. Plus la réaction inflammatoire va durer, plus les populations de leucocytes impliquées seront nombreuses. Au début de l'inflammation, ce sont surtout les polynucléaires neutrophiles qui vont être mobilisés. Les neutrophiles sont les cellules les plus spécialisées, du système immunitaire tout comme les macrophages (Franken et al., 2016) et les lymphocytes T et B (Walzer et al., 2000). Cet ensemble de cellules pourra être mobilisé, selon l'importance de l'agression.

Le processus inflammatoire est un processus complexe qui implique une série d'événements cellulaires et biochimiques interdépendants essentiels au déclenchement de la réparation des tissus endommagés (Medzhitov et al., 2012). L'inflammation fait intervenir des médiateurs moléculaires qui interviennent dans les premiers temps de l'inflammation (histamines, cytokines, chimiokines pro-inflammatoires) **Figure 2**. Ces médiateurs sont produits localement par les tissus enflammés. Ces molécules sont nombreuses et complexes. Actuellement certaines sont la cible d'actions de traitements anti-inflammatoires (comme par exemple les cytokines : TNF ou IL-12/IL-23). Je discuterai de ces médiateurs chimiques un peu plus loin. Mais avant de décrire plus en détail les différents types d'inflammations que sont l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique, le paragraphe suivant, présente succinctement les cellules impliquées et responsables de l'inflammation.

2- Les médiateurs CELLULAIRES de l'inflammation

Les cellules qui interviennent dans les mécanismes de l'inflammation sont des cellules circulantes, des polynucléaires neutrophiles, des monocytes, des lymphocytes et des cellules résidentes du tissu conjonctif local, comme les macrophages, les mastocytes et les

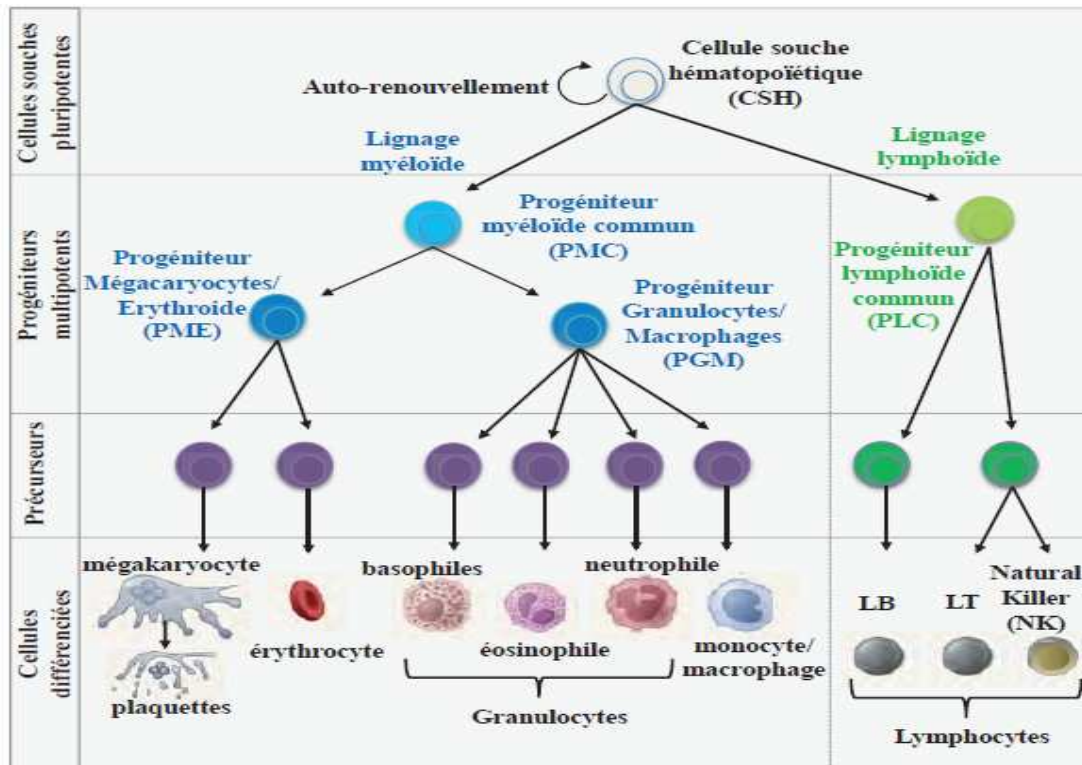


Figure 3 : Ontogénie des granulocytes, monocytes / macrophages, et des lymphocytes (d'après Orkin and Zon, 2008). Les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine de l'ensemble des cellules de la circulation sanguine. Les CSH vont se différencier pour générer (1) les progéniteurs myéloïdes communs qui se différencieront en granulocytes, monocytes et macrophages, représentant les cellules de l'immunité innée et générer (2) les progéniteurs lymphoïdes qui après différenciation vont générer les lymphocytes (B et T) mais également les cellules « Natural Killer » (NK) ; cellules de l'immunité adaptatives.

cellules dendritiques, qui représentent des cellules sentinelles (Franken et al., 2016). En effet, ces cellules expriment des récepteurs de l'immunité innée qui sera développée plus loin, et sont capables de détecter des agents infectieux dangereux pour l'organisme.

Par ailleurs, il est important de préciser ici que, les cellules de l'inflammation sont des cellules issues à la fois des progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse (cellules de l'immunité innée) (Orkin and Zon, 2008) **Figure 3** et se trouvent régulées (maturation et prolifération) par des facteurs solubles comme par exemple le « Monocyte-Colony Stimulating Factor » (M-CSF), le « Granulocyte Macrophage-CSF » (GM-CSF), et le « Fetal liver tyrosine kinase 3 Ligand » (Flt3L) (Way et al., 2009) et issues des progéniteurs lymphoïdes, comme les cellules « Natural Killer » (NK) et les lymphocytes B et T (cellules de l'immunité adaptative) **Figure 3**.

Par ailleurs, les cellules de l'immunité sont capables de faire la différence entre les cellules « du soi » et les cellules du « non soi » (Janeway et al., 1996) et cette distinction se fait, grâce à ce que l'on appelle le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), qui se trouve présent à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme s'il s'agit du CMH de la classe I, et se trouve uniquement présent sur les cellules immunitaires s'il s'agit du CMH de classe II (Olsen Saraiva Camara et al., 2012). De plus, les cellules immunitaires sont identifiées par des récepteurs membranaires que l'on appelle : « Cluster de Différenciation » (CD). Ces CD sont utilisés comme marqueur pour l'identification des cellules (Israels and Israels, 1999).

Je commencerai par décrire les neutrophiles car ce sont les granulocytes majeurs de l'immunité innée.

2-1 Les polynucléaires neutrophiles (granulocytes)

Les neutrophiles proviennent de la moelle osseuse, ils représentent les granulocytes circulants les plus abondants dans le système immunitaire humain (Welch et al., 1989). Les neutrophiles forment donc une partie essentielle du système immunitaire et répondent rapidement aux signaux inflammatoires suivant l'infection ou les lésions tissulaires et migrent vers les zones enflammées (Hyun et al., 2012). Ils font partie de la famille des cellules polymorphonucléaires (PMN) avec les basophiles et les éosinophiles. Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur un site inflammatoire (Nathan, 2006) ; (Mortaz et al., 2018). Ce sont des phagocytes capables d'ingérer des pathogènes. Ils peuvent internaliser et tuer de nombreux micro-organismes.

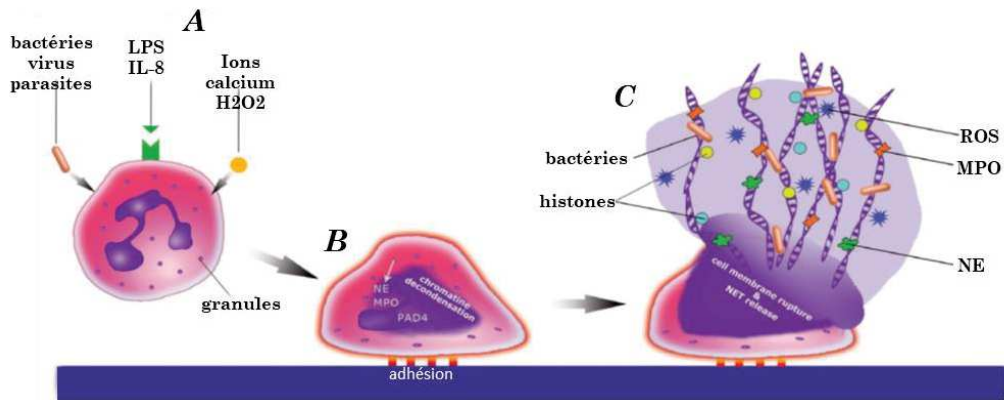


Figure 4 : Mécanisme de la formation de pièges extracellulaires des neutrophiles (NETose) d'après (Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013a). Stimulation des récepteurs (A) par les bactéries, LPS ou virus entraînant l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium et la condensation de la chromatine (médié par des enzymes : myéloperoxydase (MPO) et des élastases de neutrophiles (NE) et la citrullination des histones par peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) (B). Dans la phase finale, les NETs sont libérés et piègent les agents pathogènes (C).

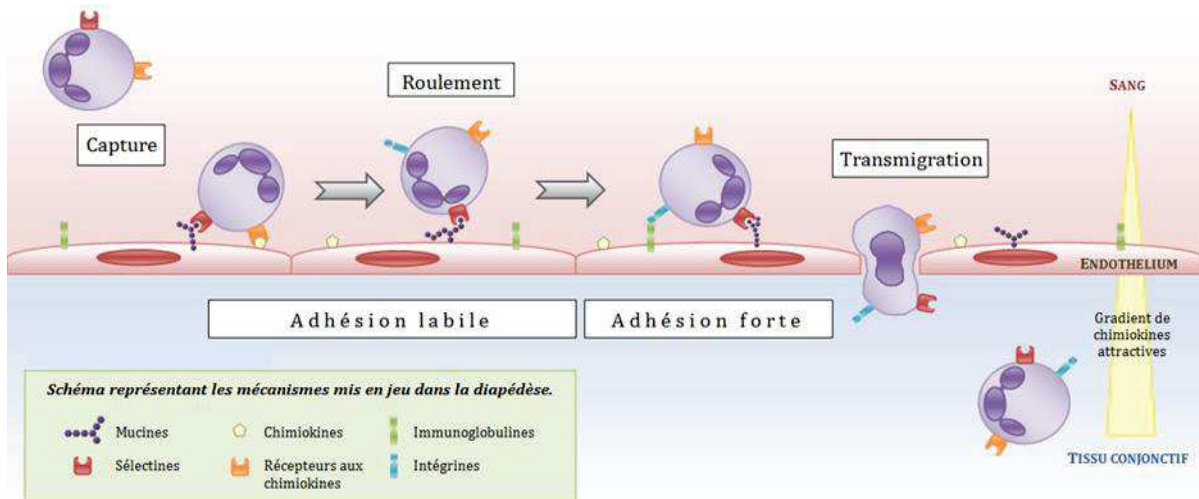


Figure 5 : Schéma récapitulatif de la diapédèse des neutrophiles. La diapédèse correspond au passage des cellules immunitaires sanguines vers les différents tissus cibles enflammés. La diapédèse se fait en plusieurs étapes : (1) la phase de capture, correspond au rapprochement des cellules vers l'endothélium, (2) La phase d'adhésion labile et de roulement ; due à des liaisons entre des sélectines exprimées par les cellules immunitaires présentées à la surface de l'endothélium, (3) la phase d'adhésion forte bloque la phase de roulement grâce aux interactions entre les intégrines (« Inter-Cellular Adhesion Molecule » (I-CAM) présentes à la surface des cellules phagocytaires ou des lymphocytes, et des immunoglobulines présentes à la surface de l'endothélium, (4) la phase de transmigration correspond au passage de la cellule immunitaire à travers deux cellules endothéliales par dissociation locale des jonctions intercellulaires.

Il faut savoir, que chaque évènement phagocytaire entraîne la formation d'un phagosome dans lequel sont sécrétées des espèces réactives de l'oxygène « Reactive Oxygen Species » (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène.

Les neutrophiles libèrent de nombreuses molécules antimicrobiennes (leur libération s'appelle le processus de dégranulation) comme par exemple : des lactoferrines, des myéloperoxydase ou encore des cathepsines (Nathan, 2006). J'ajouterai également que, quand bien même les ROS peuvent provoquer des dommages dans les tissus environnants et provoquer une inflammation, la production contrôlée de ces ROS apparaît aussi comme un mécanisme essentiel de la signalisation cellulaire qui participe au maintien de l'homéostasie de la cellule (Poret et al., 2017).

Par ailleurs, une autre activité antimicrobienne a été décrite chez les neutrophiles sous le nom de NETose (Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013b) **Figure 4**. Ce phénomène permet aux neutrophiles de limiter et d'éviter la dispersion des infections bactériennes. La formation de pièges extracellulaires appelé NET pour « Neutrophiles Extra cellulaire Trap » (Drouet, 2018) est classée comme un processus immunitaire inné.

Pour finir, il faut savoir que les polynucléaires neutrophiles subissent un processus appelé : chimiotaxie. En effet, le chimiotactisme va permettre aux neutrophiles de migrer vers les sites d'infection ou d'inflammation. Dotés de récepteurs de surface cellulaire, les neutrophiles sont capables de détecter des gradients chimiques de molécules telles que : l'interleukine-8 (IL-8) appelé également CXCL8 ou encore le « Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1 appelé CCL2). En fait, les neutrophiles utilisent ces médiateurs chimiques pour diriger leur migration. C'est ainsi que, les neutrophiles et les monocytes suite à une infection, vont passer du sang circulant vers les tissus cibles enflammés (par un phénomène appelé diapédèse) provoquant l'infiltration des neutrophiles **Figure 5**.

2-2 Les autres granulocytes (basophiles, éosinophiles)

Quant aux autres granulocytes, comme les basophiles et les éosinophiles, seront décrits de manière succincts, bien que les basophiles sont des cellules circulantes, et les mastocytes des cellules tissulaires (globules blancs des tissus conjonctifs). Ces deux types cellulaires ont à leur surface des récepteurs de haute affinité pour le Fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines E. Par conséquent, ces cellules sont capables de libérer plusieurs médiateurs chimiques importants de la réaction immuno-allergique et inflammatoire comme par exemple : l'histamine, la sérotonine et les leucotriènes.

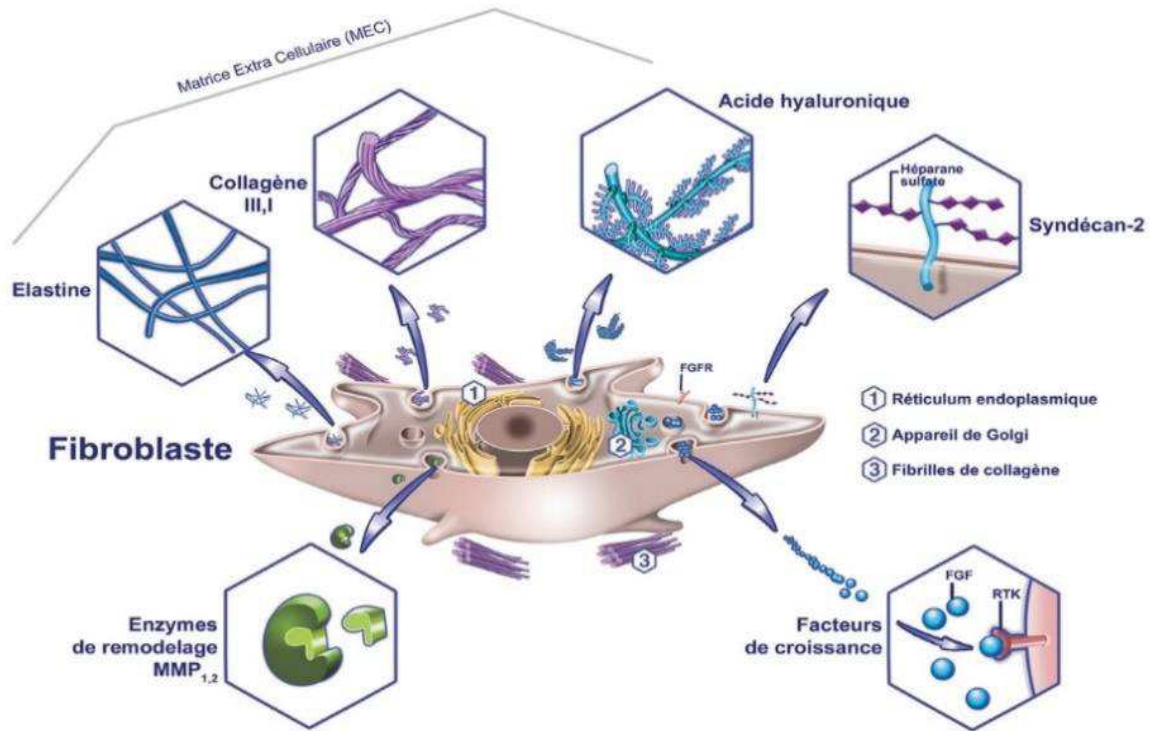


Figure 6 : Les différentes molécules sécrétées par le fibroblaste (d'après André JM et al., 2008). Les fibroblastes sécrètent au cours du processus de réparation tissulaire, principalement du collagène, des fibronectines et des protéoglycanes comme : l'acide hyaluronique, des héparanes sulfate. Ils participent au remodelage matriciel en produisant des enzymes protéolytiques dont les métalloproteinases (MMP-1 ou MMP-2), favorisant aussi la migration cellulaire dans la matrice et ainsi la réparation tissulaire.

Notons que ces médiateurs participent aux phénomènes de vasodilatation, d'augmentation de la perméabilité capillaire et sont donc à l'origine de l'œdème. Les éosinophiles, quant à eux, agissent au cours des phénomènes allergiques et de parasitisme, mais ils jouent également un rôle au cours de la réponse innée (Driss et al., 2010) ; activés par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de médiateurs de l'inflammation, ils produisent à leur tour différentes molécules, favorisant l'inflammation comme par exemple : des médiateurs lipidiques (les leucotriènes), des enzymes (les phospholipases), des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α , IL-6), mais également des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Blanchard and Rothenberg, 2009).

2-3 Les Fibroblastes

Les fibroblastes de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif (tissu solide dont le rôle est de protéger les tissus et organes qu'il entoure comme par exemple les tendons et le cartilage) produisent au cours de la réaction inflammatoire des enzymes de destruction de la matrice comme par exemple : les collagénases, les sérines protéases, entretenant ainsi la réaction inflammatoire. En fait, les neutrophiles stimulés par contact avec le collagène, sécrètent des radicaux libres et des protéases capables de dégrader le collagène. Les radicaux libres sont capables de dégrader les fibres de collagène, d'attirer les neutrophiles dans les foyers inflammatoires (directement ou par l'intermédiaire des peptides détachés du collagène), d'activer les fibroblastes en les amenant à reconstituer les fibres de collagène (Borel et al., 1988). En revanche, les fibroblastes participent aussi aux phénomènes de cicatrisation par la production de différents constituants de la matrice comme par exemple : les collagènes, les fibronectines et élastines ; participant ainsi au processus de la réparation tissulaire (André JM et al., 2008) **Figure 6**.

Ainsi, la fonction principale des fibroblastes est de produire ou de dégrader, et donc, d'organiser les composants de la matrice extracellulaire avec laquelle, ils interagissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de type intégrine. Outre leur fonction principale, les fibroblastes jouent également divers rôles supplémentaires au-delà de la production de la matrice extracellulaire. Par exemple, les fibroblastes jouent un rôle essentiel dans l'inflammation, l'angiogenèse, la progression du cancer (Albregues et al., 2014) et dans la fibrose tissulaire physiologique et pathologique (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). J'ajouterai que dans le cas de l'inflammation chronique, le tissu conjonctif est détruit localement, remplacé par un tissu

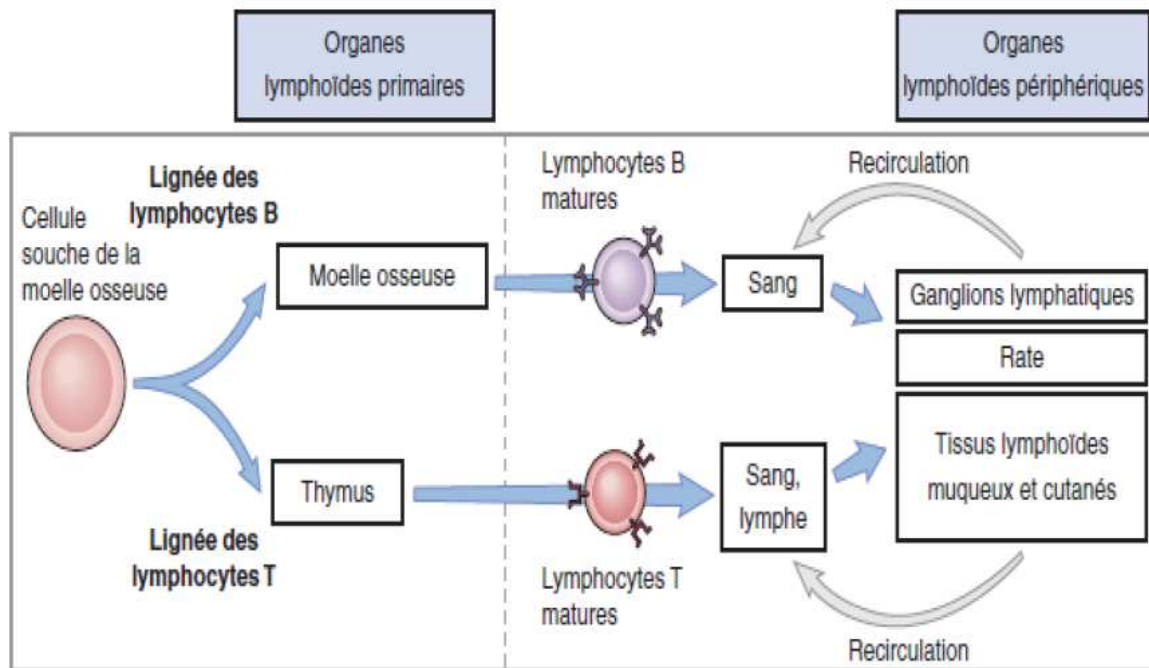


Figure 7 : La maturation des lymphocytes et leur recirculation. La maturation et la compétence fonctionnelle des lymphocytes sont acquises au cours de leur passage dans un organe lymphoïde primaire. Les lymphocytes B sont maturés dans la moelle osseuse, tandis que les lymphocytes T sont maturés dans le thymus. Chaque lymphocyte une fois mûr, devient immunologiquement compétent et se répartissent via la circulation dans l'organisme : dans les organes lymphoïdes périphériques (secondaires) comme les ganglions lymphatiques, la rate, les tissus lymphoïdes muqueux et cutanés.

Fibro-inflammatoire riche en collagène. Ainsi, la phase de réparation fait intervenir des fibroblastes à l'origine d'un tissu cicatriciel fibreux n'ayant pas les propriétés du tissu initial.

Voyons à présent succinctement les lymphocytes, et les cellules « Natural Killer » (NK).

2-4 Les lymphocytes et les cellules « Natural Killer » (NK)

Il existe trois types de lymphocytes qui circulent dans le sang périphérique : les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK (Pavelka and Roth, 2010). Ces lymphocytes sont des cellules effectrices du système immunitaire, leur maturation et leur compétence fonctionnelle (reconnaissance des cellules du « soi » et du « non soi ») sont acquises au cours de leur passage dans un organe lymphoïde central (dit également primaire) comme par exemple : le thymus (qui assure la maturation des lymphocytes T ; **T** pour « **T**hymus ») et la moelle osseuse (qui assure la maturation des lymphocytes B ; **B** pour « **B**ône marron ») (Alberts et al., 2002) **Figure 7**.

Parmi les lymphocytes T, responsables de l'immunité cellulaire, on distingue les lymphocytes T CD4 ou lymphocytes auxiliaires, qui favorisent la réponse humorale en stimulant les lymphocytes B. Il y a également les lymphocytes T CD8 ou lymphocytes cytotoxiques, qui tuent les cellules infectées. Parmi les lymphocytes T CD8, on distingue des lymphocytes T suppresseurs, qui, inhibent la réponse humorale. Ces lymphocytes T sécrètent des cytotoxines et expriment des récepteurs de surface aux antigènes.

Quant aux lymphocytes B, ils sont responsables de l'immunité humorale (je fais une parenthèse concernant le terme humoral, qui désigne tout ce qui a pour origine les humeurs, soit les liquides comme le sang, le plasma, sérum et autres). Les lymphocytes B sécrètent donc, des anticorps dits Immunoglobulines (Ig). Le développement des lymphocytes B est dépendant de plusieurs cytokines spécifiques et leur régulation dépend de leur micro-environnement (Dorshkind, 1990 ; Hentges, 1994).

Par ailleurs, ce sont dans les organes lymphoïdes centraux qu'une fois maturé, chaque lymphocyte devient « immunologiquement compétent » **Figure 7**. C'est-à-dire que les lymphocytes vont subir une maturation en se dotant de récepteurs au cours de leur passage dans la moelle osseuse ou dans le thymus ; ils se répartissent ensuite via la circulation dans l'organisme, soit, en direction des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques et plaques de Peyer) soit dans les tissus conjonctifs. Enfin, sous l'effet d'une stimulation antigénique, les lymphocytes

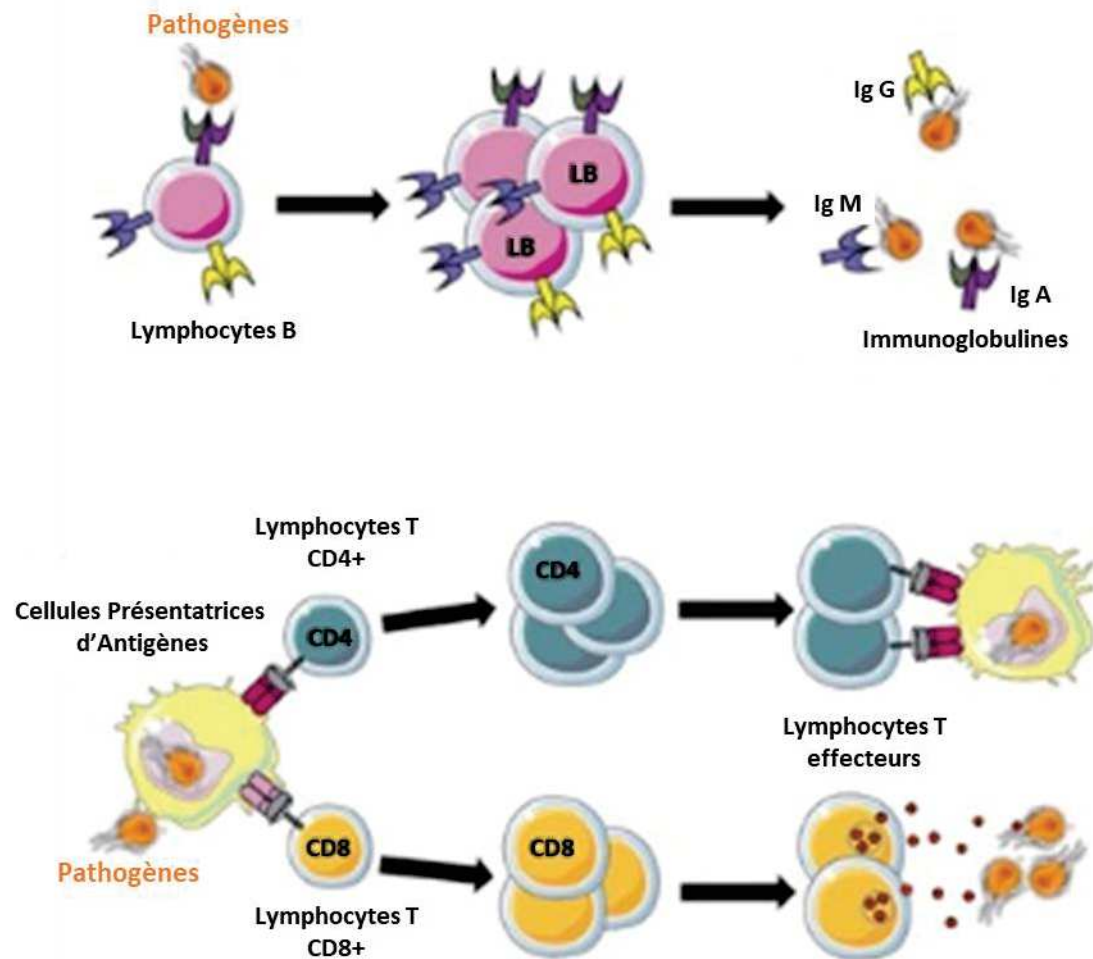


Figure 8 : Rôle des lymphocytes. Les lymphocytes B expriment à leur surface des Immunoglobulines (Ig) capables d'interagir directement avec les antigènes. Après stimulation antigénique, ils se transforment en plasmocytes pour sécréter des Immunoglobulines (anticorps circulants) comme des IgG, IgA, IgM. Parmi les lymphocytes T, responsables de l'immunité cellulaires, on distingue les lymphocytes T CD4 qui reconnaissent les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Et l'on distingue également les lymphocytes T CD8 ou lymphocytes cytotoxiques, qui tuent les cellules infectées.

Compétents vont s'activer pour devenir des cellules effectrices (André JM et al., 2008). La maturation fonctionnelle des lymphocytes se traduit par l'apparition d'antigènes membranaires spécifiques appelés « Cluster de Différenciation » (CD) (Israels and Israels, 1999). Ces antigènes sont utilisés comme des marqueurs, pouvant être identifiés par immuno-marquage avec des anticorps. Certains antigènes sont présents sur tous les lymphocytes comme par exemple le CD45 qui permet de discriminer les cellules leucocytaires saines des cellules leucocytaires malignes (Saint-Paul et al., 2016). D'autres antigènes sont spécifiques de chaque famille lymphocytaire et caractérisent leur maturation fonctionnelle, comme par exemple le CD19 pour les lymphocytes B et le CD3 pour les lymphocytes T.

Les lymphocytes B, sont responsables de l'immunité humorale et expriment à leur surface des immunoglobulines capables d'interagir directement avec les antigènes. Ils sont identifiés par les anticorps anti-CD19 ou anti-CD20 (LeBien and Tedder, 2008). Après stimulation antigénique, ils se transforment en plasmocytes capables de sécréter les Immunoglobulines dit anticorps circulants comme par exemple : IgG, IgA, IgM, IgE **Figure 8**.

Les lymphocytes T, quant à eux, sont impliqués dans l'immunité cellulaire. Ils sont identifiés par des anticorps anti-CD2 et anti-CD3. De plus, au terme de la maturation intra-thymique, les lymphocytes T expriment sur leur membrane un récepteur pour les antigènes appelé « T-Cella Réception » (TCR) (Charles A Janeway et al., 2001). Les différents TCR reconnaissent des peptides antigéniques présentés à la surface d'une cellule associée à des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Le CMH de type I est porté par toutes les cellules nucléées d'un même organisme, alors que le CMH de type II est exprimé sur les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) (Olsen Saraiva Camara et al., 2012). En fait, cela permet de distinguer les antigènes portés par les cellules du « soi » et du « non soi ». D'ailleurs, les CPA sont principalement les macrophages activés, les lymphocytes B présentant les antigènes aux lymphocytes T et les cellules endothéliales. Les peptides présentés par les molécules de classe I du CMH sont en général issus de la dégradation des protéines endogènes, synthétisées par la cellule présentatrice.

De plus, les cellules dendritiques elles-mêmes jouent un rôle central dans l'initiation des réponses cytotoxiques, car elles possèdent un système cellulaire d'apprêtement des antigènes et peuvent présenter aussi des antigènes internalisés (Wilson and Villadangos, 2005).

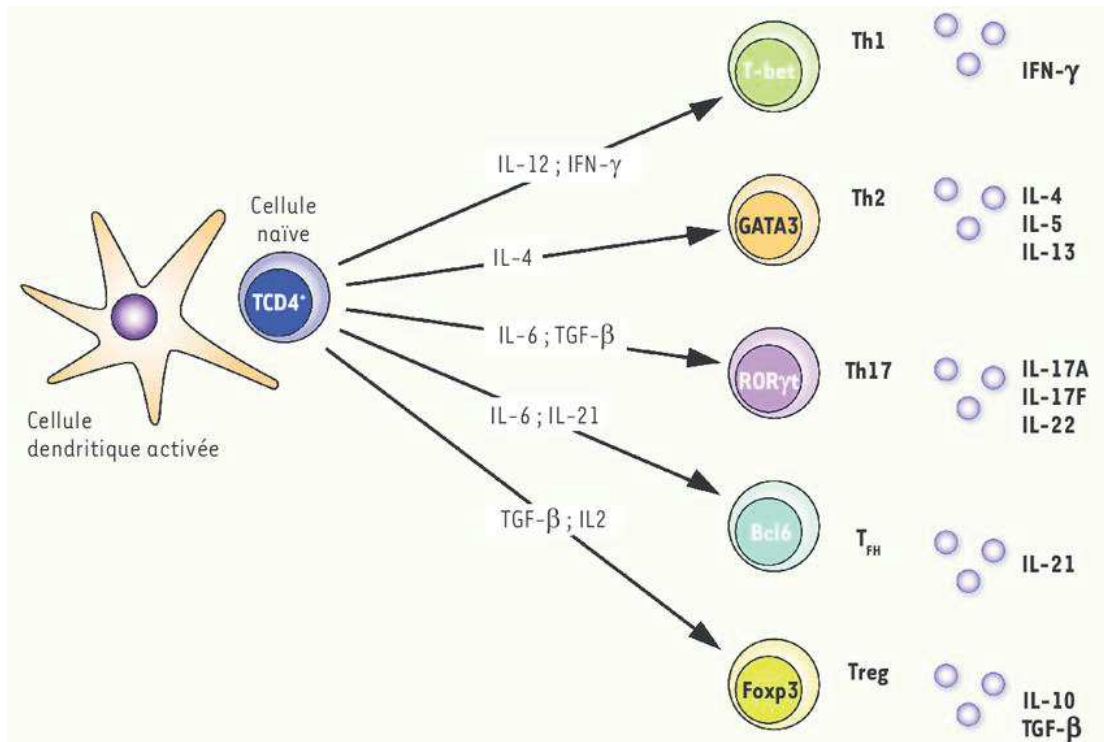


Figure 9 : Les sous-populations de lymphocytes T CD4 (d'après Flamand, 2014). En fonction de l'antigène rencontré, les lymphocytes T CD4 peuvent se différencier, soit en lymphocytes Th1 en réponse à l'Interleukine 12 (IL-12) et à l'Interféron - γ (IFN- γ) et produire de l'IFN γ grâce au facteur de transcription Tibet ; soit en lymphocytes Th2 en réponse à l'IL-4 et produire de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 grâce au facteur de transcription Gata3 ; soit en lymphocytes Th17 en réponse à l'IL-6 et au TGF- β et produire de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22 grâce au facteur « Retinoid-related Orphan Receptor γ t » (ROR γ t) ; soit en lymphocytes T Follicular Helper en réponse à l'IL-6 et l'IL-21 et produire de l'IL-21 grâce au facteur de transcription « B-cell lymphoma 6 » (Bcl6) ; soit en lymphocytes T **regulatory** en réponse au « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β) et à l'IL-2 et produire de l'IL-10 et du TGF- β . Les lymphocytes Th1 permettent l'élimination des virus et bactéries intracellulaires. Les lymphocytes Th2 participent à l'élimination des parasites. Quant aux Th17, ils favorisent la destruction de bactéries extracellulaires et des champignons.

Les lymphocytes, après maturation thymique, expriment (1) les CD4 (dans ce cas, on parle de lymphocytes T auxiliaires ou Lymphocytes T helper (lymphocytes Th)), qui reconnaissent un antigène associé au CMH de classe II (Bouillon and Mourad, 2003), ces Th-CD4 reconnaissent les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), (2) les CD8 (dans ce cas, on parle de lymphocytes T cytotoxiques), qui, quant à eux, reconnaissent un antigène associé au CMH de type I (Mesquita Júnior et al., 2010). Les antigènes exogènes (comme les antigènes microbiens), activent les lymphocytes auxiliaires CD4, alors que les antigènes endogènes (comme les antigènes cancéreux ou les antigènes viraux) activent les lymphocytes cytotoxiques CD8 (acteurs de l'immunité adaptative).

De plus, les lymphocytes Th-CD4 interagissent directement avec d'autres cellules en sécrétant des cytokines pour contrôler le développement de la réponse immune. Il y a principalement deux types de lymphocytes T helper : les Th1 qui activent les macrophages pour détruire le matériel phagocyté. De ce fait, les lymphocytes Th1 permettent l'élimination de virus et de bactéries intracellulaires (immunité à médiation cellulaire). Quant aux Th2, ils aident les cellules B à produire des anticorps et participent à l'élimination de parasites (Immunité à médiation humorale). Cependant il existe d'autres sous-types de lymphocytes Th-CD4 que je ne développerai pas dans ce paragraphe (comme les Th 17, les T régulateurs (T_{reg}), les T folliculaires helper (T_{FH})) **Figure 9**, je mentionnerai juste que les sous-types de lymphocytes Th-CD4 sont fonction de l'antigène rencontré et de la réponse aux cytokines sécrétées (Flamand, 2014).

Les cellules « Natural Killer » (ou cellules NK) sont des lymphocytes du système immunitaire inné, mais ces cellules ne sont, ni des lymphocytes T ni des lymphocytes B. En effet, malgré leur activité cytotoxique spontanée sur des cibles tumorales (Dunn et al., 2002) ou infectées par des virus, leur mécanisme d'action diffère de celui des lymphocytes T CD8. En fait, les cellules NK reconnaissent à la surface des autres cellules, un double signal : activateur (glycoconjugué membranaire) et inhibiteur (peptide du « soi ») de la cytotoxicité. Les cellules NK activées exercent donc, des effets antiviraux (Muntasell et al., 2013), anti-tumoraux (Krzywinska et al., 2015) tout en épargnant les cellules saines du « soi ». Les cellules NK produisent des immunorégulateurs (Bryceson et al., 2011) tels que l'Interleukine immunosuppressive (IL-10), des facteurs de croissance ainsi que des chimiokines comme le CCL2 (MCP-1), CXCL8 (IL-8) par exemple (Vivier et al., 2011), et se caractérisent par le « Cluster de Différenciation 56 » (CD56).

Tableau 1 : Principaux phagocytes mononucléaires intra-tissulaires

Localisation	Dénomination
Foie	Cellules de Kupffer
Os	Ostéoclastes
Système nerveux	Cellules microgliales
Poumons	Macrophages alvéolaires
Organes lymphoïdes	Macrophages, Cellules dendritiques
Séreuses	Macrophages pleuraux, péritonéaux...
Foyers inflammatoires	Macrophages mobiles, cellules géantes, cellules épithélioïdes
Membrane synoviale	Synoviocytes ou cellules bordantes A
Tissu conjonctif	Histiocytes

Enfin, lors d'une infection, les cellules NK favorisent l'activation des cellules dendritiques et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T (LT) grâce à la lyse des cellules infectées et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Toutefois, la sécrétion de cytokines immunosuppressives peut aussi agir directement sur les LT et diminuer leur état d'activation, mais les cellules NK peuvent également lyser les LT activés. Par conséquent, la réduction du nombre de LT activés ainsi qu'une charge microbienne élevée conduisent à la persistance des cellules infectées ce qui peut contribuer à l'épuisement des LT, à la persistance du virus, et *in fine*, à la participation de la chronicité de l'infection (Vivier et al., 2011).

A présent qu'en est-il des autres cellules du système immunitaire inné que sont, les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages.

Dans le paragraphe qui suit, j'ai regroupé ces cellules pour discuter de ce que l'on appelle le « Système Phagocytaire Mononucléaire » (MPS) car les cellules concernées sont tout justement des monocytes (cellules mononuclées et phagocytaires présentes dans le sang), des macrophages (cellules associées aux cellules endothéliales présentes en bordure des capillaires dans la rate, moelle osseuse...) et des cellules dendritiques. Dans ce paragraphe je discuterai globalement des MPS et de leurs fonctions dans l'endocytose. J'aborderai également le rôle des cellules dendritiques dans l'apprêtement de l'antigène. Les monocytes et les macrophages seront spécifiquement discutés dans un troisième chapitre.

2-5 Le Système Phagocytaire Mononucléaire (MPS)

Le système des phagocytes mononuclées joue un rôle majeur dans le développement, l'élimination, l'inflammation et les défenses contre les pathogènes (van Furth and Cohn, 1968). En effet, les cellules de ce système sont les premières à être activées en cas d'intrusion d'un pathogène dans les tissus ; la réponse doit-être rapide pour « neutraliser » le pathogène avant qu'il ne se propage. Il faut savoir que les MPS comprennent trois types de cellules : les monocytes circulants, les macrophages résidents (cellules sentinelles) **Tableau 1**, et les Cellules Dendritiques (cellules sentinelles). Notons qu'en situation non-inflammatoire, les macrophages présents dans les tissus sont appelés macrophages résidents. En outre, chez l'homme, les cellules souches hématopoïétiques constituent le principal réservoir de précurseurs des macrophages résidents aux stades embryonnaires et adultes. La majorité des macrophages résidents sont différenciés avant la naissance. Plusieurs études ont révélé que la contribution homéostatique des monocytes en circulation vers les macrophages semble se limiter à quelques tissus spécifiques (intestin, derme, cœur) avec un taux de renouvellement unique à chaque tissu à l'état stable (Ginhoux and Guilliams, 2016). Au lieu de cela, de nombreux macrophages résidents sont issus de précurseurs embryonnaires résidants dans ces tissus avant la naissance et se maintiennent localement eux-mêmes tout au long de leur vie adulte, indépendamment d'une contribution des précurseurs dérivés de la moelle osseuse (Ginhoux and Guilliams, 2016) ; (Blériot et al., 2020).

Collectivement, ces cellules ont des fonctions clés dans le maintien de l'homéostasie tissulaire ainsi que dans l'orchestration de la réponse immunitaire (Patel et al., 2017). Le développement, le maintien homéostatique, la prolifération, la différenciation et la fonction des MPS sont régulés par les facteurs de croissance suivants : le « Colony-Stimulating Factor-1 » (CSF-1) (Hume and MacDonald, 2012) et l'Interleukine-34 (IL-34) qui représente un second ligand du récepteur CSF-1 (Lin et al., 2008) (Boulakirba et al., 2018).

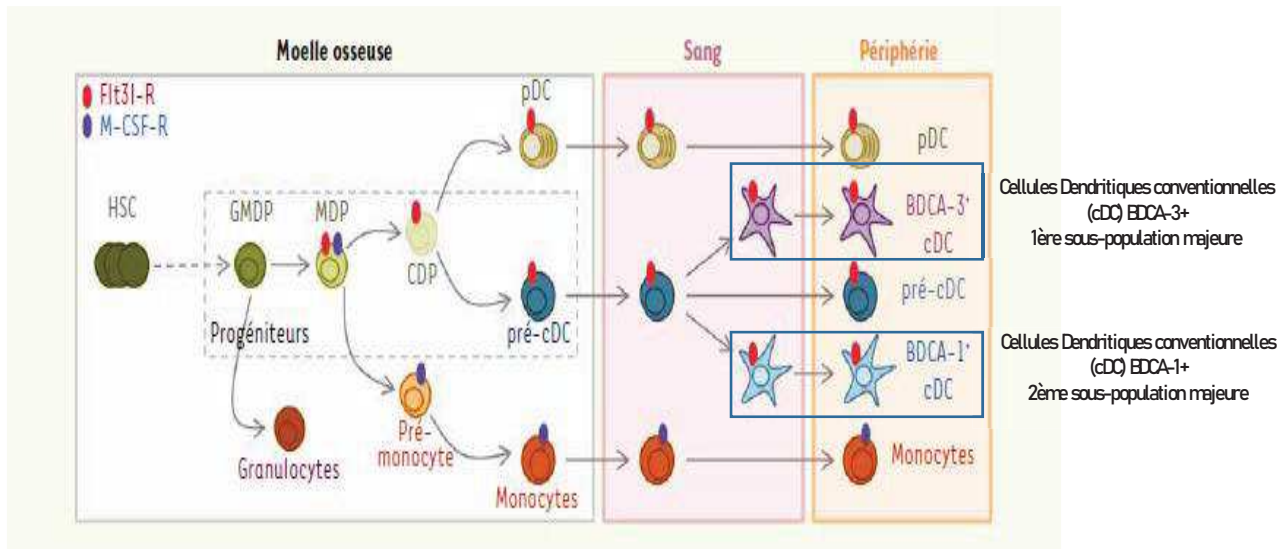


Figure 10 : Développement des cellules dendritiques (d'après Breton, 2015). Le développement des cellules dendritiques commence dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques « **Hématopoïetic Stem Cell** » (HSC). Le progéniteur **Granulocyte, Monocyte et Progéniteurs des cellules Dendritiques (GMDP)** se développent en granulocytes et en progéniteur commun aux cellules dendritiques et aux monocytes « **Monocyte and Dendritique cell Pogenitor** » (MDP). Le progéniteur MDP produit les monocytes ainsi qu'un progéniteur commun aux cellules dendritiques « **Common DC Progenitor** » (CDP). Le progéniteur CDP produit les **Cellules Dendritiques plasmocytoïdes (pDC)**, ainsi qu'un précurseur immédiat des cellules dendritiques conventionnelles appelé (pré-cDC) pour « **conventional Dendritic Cell pogenitor** ». Le précurseur pré-cDC est capable de migrer de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires (périphérie) via la circulation sanguine pour produire les deux sous-populations majeures de cellules dendritiques conventionnelles ayant des marqueurs de surface spécifiques par exemple : **BDCA-1+cDC** et les **BDCA-3+ cDC**. Le développement des cellules dendritiques se fait sous le contrôle du récepteur ligand Flt3. Le développement des monocytes se fait sous le contrôle du récepteur M-CSF et se trouve finalisé dans la moelle osseuse où un précurseur immédiat des monocytes appelé pré-monocyte produit les monocytes.

En outre, le CSF-1 est ainsi nommé, parce qu'il a été le premier des facteurs de croissance hématopoïétique à être isolé sous forme de protéine pure. Le CSF-1 favorise la croissance des colonies pures de macrophages à partir des progéniteurs de la moelle osseuse en milieu semi-solide *in vitro* (Stanley et al., 1976). C'est en 1969, qu'un groupe d'auteurs a proposé une classification de tous les mononucléaires doués d'une activité phagocytaire intense et de leurs cellules souches dans le cadre de ce qu'ils ont appelé le « système phagocytaire mononucléaire » (Furth et al.).

En effet, cette classification se base sur des analogies dans la morphologie (un seul noyau), les fonctions biologiques (phagocytose), l'origine et la mobilité des phagocytes. Les phagocytes jouent un rôle important dans les mécanismes de défense de l'hôte, comme vu précédemment avec les phagocytes polynucléaires (granulocytes). D'ailleurs, les MPS sont reconnus pour être des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) (Lugo-Villarino et al., 2019). Outre leur rôle primordial dans la présentation des antigènes, les MPS sont également connus pour jouer un rôle dans les interactions avec le microbiote et la thermogénèse (Jenkins and Hume, 2014). De plus, il est admis que la majorité des macrophages tissulaires sont maintenus par auto prolifération tout au long de l'âge adulte avec un apport minimal de monocytes (Soucie et al., 2016) contrairement aux cellules dendritiques (DC) et aux monocytes qui, quant à eux, proviennent de progéniteurs résidents dans le sang de cordon et la moelle osseuse (Lee et al., 2015). Par ailleurs, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques ne sont pas des populations homogènes (Chow et al., 2011).

Mais avant d'aborder la fonction biologique des MPS dans l'élimination de l'antigène par endocytose, il me semble important de décrire succinctement les cellules dendritiques (DC).

▣ *Généralités sur les cellules dendritiques (du grec « dendreon » : arbre)*

Tout d'abord, les cellules dendritiques doivent leur nom à leur forme constellée de longs prolongements arborescents appelés dendrites. Ces cellules ont été découvertes par R. Steinman et Z. Cohn, ces auteurs ont désigné ces cellules : cellules dendritiques du grec « *dendreon* » qui signifie arbre (Breton, 2015). Cette morphologie particulière a permis leur identification, et ces cellules agissent comme des sentinelles. Elles font partie des cellules du système immunitaire et sont impliquées dans le déclenchement des réponses immunitaires. Les cellules dendritiques sont capables de reconnaître les pathogènes et d'induire des réponses immunitaires en activant les lymphocytes T spécifiques de pathogènes.

Les cellules dendritiques (DC) ont été classées en sous-populations majeures selon leur fonction et l'expression de marqueurs de surface (Breton, 2015) **Figure 10**.

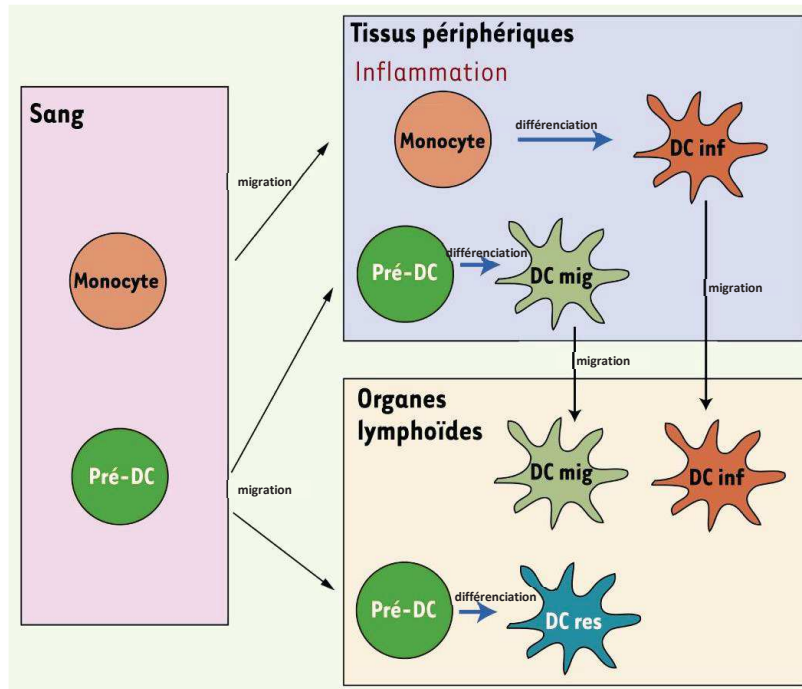


Figure 11 : Ontogénie des cellules dendritiques (d'après Segura and Amigorena, 2014). Les cellules dendritiques résidentes (**DC res**) et migratoires (**DC mig**) se différencient à partir des précurseurs hématopoïétiques communs, les pré-DC, qui circulent dans le sang. Au cours d'une inflammation, les monocytes sont recrutés sur le site de l'inflammation (tissus périphériques ou organes lymphoïdes) où ils se différencient en cellules dendritiques inflammatoires (**DC inf**). Le schéma illustre le cas d'une inflammation dans les tissus périphériques ; les cellules dendritiques inflammatoires peuvent ensuite migrer vers les organes lymphoïdes. Flèche bleue : différenciation ; flèche noire : migration.

Segura et son collègue nomment deux catégories de DC : (i) les DC résidentes et (ii) les DC migratoires **Figure 11**. Ainsi, dans le sang, la rate et les ganglions lymphatiques on observe des DC résidentes (Segura and Amigorena, 2014). De plus, des DC plasmocytoïdes (pDC) ont été identifiées dans le sang périphérique mais également au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Le nom plasmocytoïde provient du fait qu'elles ressemblent à la fois aux lymphocytes T mais également aux plasmocytes par leur morphologie (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Par extension, les DC restantes dans le sang ont été appelées DC myéloïdes ou conventionnelles (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Par ailleurs, dans la peau, il existe d'autres populations de cellules dendritiques migratoires : les cellules dendritiques dermiques et les cellules de Langerhans épidermiques (Borgne et al., 2007).

Il existe des cellules dendritiques appelées cellules dendritiques inflammatoires et qui se distinguent des macrophages par leurs propriétés fonctionnelles. Outre leur capacité de stimuler efficacement les lymphocytes T, contrairement aux macrophages, les cellules dendritiques inflammatoires peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques, alors que les macrophages demeurent dans les tissus (León et al., 2007).

D'après Elodie Segura et son collègue, plusieurs études ont mis en évidence une population de DC qui n'est présente que dans des conditions d'inflammation, d'où le nom de DC inflammatoires (Segura and Amigorena, 2014). L'ensemble de ces cellules dendritiques expriment des molécules de surface différentes, permettant leur distinction [comme le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II (CMH II), le « Cluster de Differentiation-11 » (CD11c pour les cellules dendritiques de la peau) (Segura and Amigorena, 2014), le CD303 (pour les cellules dendritiques plasmocytoïdes) et le CD1c+ (pour les cellules dendritiques myéloïdes) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010)].

Quant à leur rôle dans la réponse immunitaire, les cellules dendritiques lors d'une inflammation causée par un pathogène, capturent l'antigène et migrent vers les ganglions lymphatiques où elles peuvent activer des lymphocytes T naïfs comme les LT CD4 naïfs (lymphocytes T CD4 matures qui n'ont pas encore été en contact avec un antigène ; situés dans les ganglions lymphatiques par exemple) spécifiques du pathogène. En cas de forte inflammation, les cellules dendritiques inflammatoires peuvent également migrer vers les ganglions où elles transfèrent l'antigène capturé en périphérie à des cellules dendritiques résidentes.

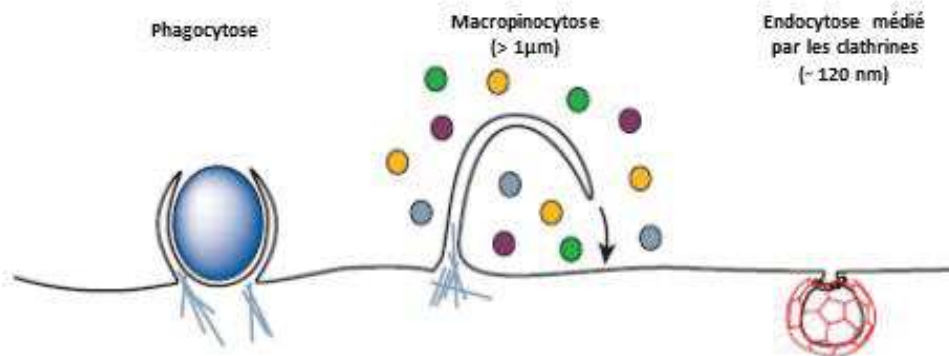


Figure 12 : Endocytose - les multiples voies d'entrée dans les cellules (d'après Conner and Schmid, 2003).
 Les voies d'endocytose diffèrent en fonction de la taille de la particule à internaliser (ligands, récepteurs et lipides) mais également du mécanisme de formation de la vésicule.

Les DC peuvent aussi présenter l'antigène directement aux lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T se différencient ensuite en cellules T effectrices (lymphocytes capables de sécréter des cytokines et substances cytotoxiques pour détruire le pathogène) qui peuvent être stimulées à nouveau dans les tissus par des cellules dendritiques inflammatoires. Lors d'une seconde infection par le même pathogène, les cellules dendritiques inflammatoires peuvent activer directement des lymphocytes T mémoires (lymphocyte spécifiques et plus réactif vis-à-vis du pathogène résidant dans les tissus).

Quant à leur fonction biologique dans un contexte inflammatoire, les cellules dendritiques sont capables de capturer l'antigène par endocytose comme l'ensemble des cellules composant le Système Phagocytaire Mononucléaire (MPS), et de présenter les antigènes aux lymphocytes T sous forme de peptides associés aux molécules du CMH, déclenchant ainsi la réponse immunitaire.

La dénomination du Système Phagocytaire Mononucléaire (MPS), comme je l'ai précisé précédemment, réside dans le fait que, les cellules qui compose ce système sont capables d'éliminer l'agent pathogène par endocytose. Voyons à présent les mécanismes qui permettent aux MPS de capturer l'antigène, de l'éliminer et de déclencher la réponse immunitaire.

▣ *Capture de l'antigène par les différents mécanismes de l'endocytose*

D'une manière générale, il existe plusieurs mécanismes distincts qui permettent aux cellules de capturer l'antigène par endocytose. Ces mécanismes sont fonction de la taille de la particule à endocyter et de l'engagement ou non d'un récepteur de surface. On distingue donc, *la phagocytose*, et la *pinocytose* qui regroupe : la *macropinocytose* et *l'endocytose dépendante des clathrines* (Conner and Schmid, 2003) **Figure 12**. Mais la pinocytose regroupe également la voie d'endocytose dépendante des cavéolines ainsi que la voie indépendante des cavéolines et clathrines. Cependant, je n'aborderai pas ces deux dernières voies d'endocytose.

Brièvement, tout d'abord la *macropinocytose*, est un mécanisme qui n'engage aucun récepteur spécifique de surface et permet l'endocytose très généralement de particules de grandes tailles. Les particules se fixent à la surface de la cellule et par invagination de la membrane plasmique entraîne la formation d'une vésicule (macropinosome) qui enrobe la particule. Plusieurs voies sont alors possibles, une partie de ces macropinosomes peuvent être recyclés vers la surface cellulaire et leur contenu libéré dans le milieu extra cellulaire. Ou alors les macropinosomes fusionnent avec les endosomes (vésicules d'endocytose) et rejoignent des compartiments riches

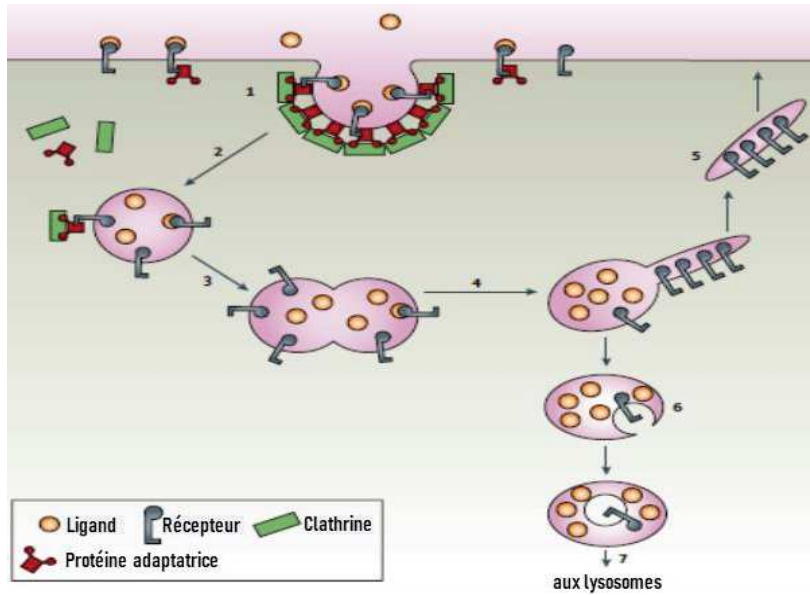


Figure 13 : Endocytose dépendante de la clathrine (d'après Roth, 2006) : (1) Les ligands lient les récepteurs (mannose récepteur ou lectines) cellulaires qui sont concentrés dans de petits domaines membranaires, grâce à l'association de leur queue cytoplasmique avec des protéines endocytiques qui constituent un réseau. Ces protéines adaptatrices (AP-2, les trimères de clathrine : triskèles) sont liées à la clathrine. (2) Après internalisation, la clathrine se sépare et (3) la vésicule fusionne avec d'autres vésicules endocytées pour former des endosomes précoces. (4) Une partie des récepteurs sont séparés et (5) recyclés vers la membrane cellulaire. (6,7) Les ligands sont dirigés vers les lysosomes.

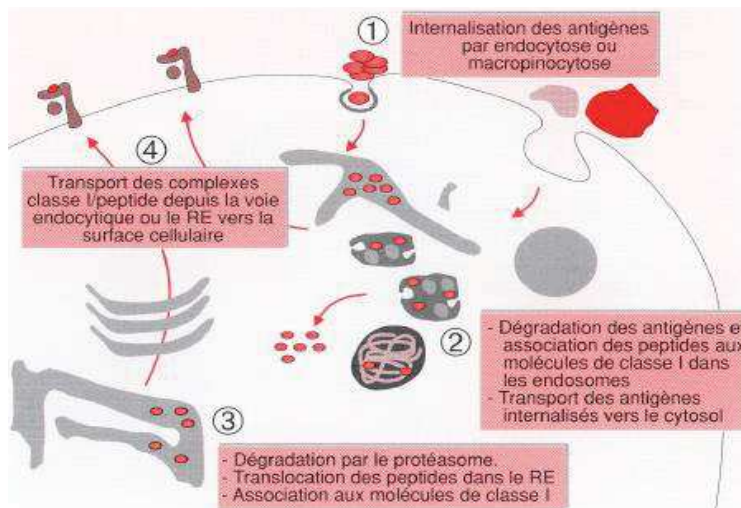


Figure 14 : Voies de présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I (exemple des cellules dendritiques). Les antigènes internalisés peuvent être dégradés dans les endosomes et les peptides chargés sur les molécules du CMH de classe I, avant transport vers la surface cellulaire. Alternativement, les antigènes sont exportés vers le cytosol, où les antigènes sont dégradés par le protéasome, les peptides sont transloqués vers le réticulum endoplasmique par des transporteurs et se trouvent chargés sur les molécules du CMH de classe I néo synthétisées.

en molécules du CMH de classe II (Falcone et al., 2006). Enfin, le contenu des macropinosomes peut être libéré directement dans le cytosol où il est dégradé par le protéasome (complexe enzymatique qui dégrade les protéines). Les peptides résultants peuvent alors rejoindre le réticulum endoplasmique puis s'associer aux molécules du CMH de classe I. Finalement, la macropinocytose correspond donc à la formation de vésicules hétérogènes de grande taille (0,5-5 µm) ou macropinosomes. Ce processus très dynamique est présent dans certaines lignées tumorales mais est le plus souvent induit par les facteurs de croissance ou les agents mitogènes (Benmerah and Lamaze, 2002). La macropinocytose participe à la présentation antigénique par les cellules dendritiques (Watts, 1997) et à l'entrée de bactéries et de virus dans les macrophages (Maréchal et al., 2001).

Ensuite, on distingue *la voie de l'endocytose dépendante de la clathrine* **Figure 13**. En effet, la clathrine représente le constituant majeur des structures membranaires spécialisées : les « Clathrin-Coated Pits » (CCP), responsables de l'internalisation des molécules dans cette voie de transport (Doherty and McMahon, 2009). Cette voie possède un mécanisme qui n'engage aucun récepteur spécifique de surface (Benmerah and Lamaze, 2002) et permet l'endocytose de molécules d'une taille inférieure à 150 nm. Bien que cette voie contrôle l'entrée sélective de nombreux facteurs de croissance (hormones) et nutriments (Scita and Fiore, 2010), elle est aussi détournée par certains virus et bactéries qui infectent les cellules de cette façon. Les « Clathrin-Coated Pits » (CCP), concentrent les récepteurs transmembranaires en cours d'internalisation **Figure 13** et s'invaginent jusqu'à obtention d'une vésicule « Clathrin-Coated Vesicles » (CCV) (Brodsky et al., 2001). Les principales protéines impliquées lors de ces étapes sont l'adaptateur « Adapter Protein 2 » (AP2) (Schmid and McMahon, 2007) et les trimères de clathrine (triskels) (Doherty and McMahon, 2009).

Plusieurs vésicules peuvent fusionner ensemble, internalisées dans la cellule, elles forment ce que l'on appelle les endosomes précoces. Les vacuoles ou les vésicules endosomales de transport se détachent de l'endosome précoce pour acquérir des vésicules membranaires internes. Ces éléments sont appelés corps multivésiculaires qui évoluent pour donner des endosomes tardifs. La lumière de l'endosome tardif s'acidifie (pH 6,5 à 5) entraînant ainsi la libération du ligand. Le ligand est ensuite dirigé et concentré dans des vésicules riches en molécules du CMH I (Amigorena, 1999) **Figure 14**.

Parmi les récepteurs spécifiques qui induisent une endocytose dépendante de la clathrine sont trouvées les lectines et notamment le Récepteur du Mannose (MR ou CD206) (East and Isacke, 2002).

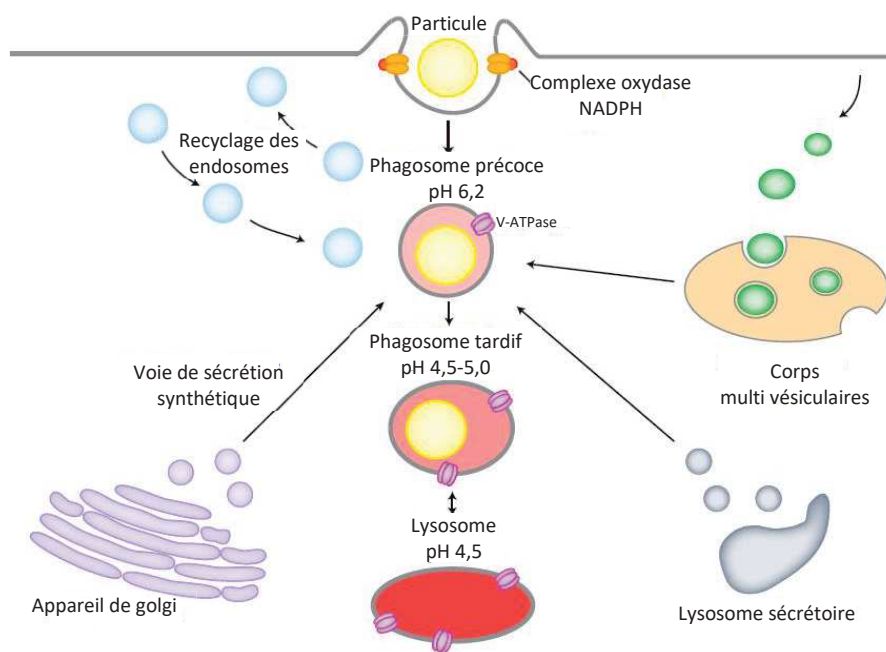


Figure 15 : Les différents éléments mis en jeu lors de la phagocytose (d'après Russell, 2011 ; Gordon, 2016). L'absorption des particules exogènes résulte d'une dynamique où la membrane plasmique du phagocyte fusionne avec la membrane plasmique des vésicules intracellulaires ; la maturation des phagosomes et l'acidification progressive aboutit à une fusion des lysosomes avec la membrane du phagosome (phagolysosome) et à la digestion par les phagolysosomes.

Pour finir, *la phagocytose*, ce mécanisme d'endocytose consiste à reconnaître et à ingérer des particules de plus de 0,5 μm (Melendez and Tay, 2008) dans une vésicule dérivée de la membrane plasmique, appelée phagosome (Gordon, 2016) **Figure 15**. Le phagosome peut également être formé à partir du réticulum endoplasmique dans le cas du macrophage (Gagnon et al., 2002). Les phagocytes peuvent ingérer des agents pathogènes microbiens comme les bactéries, les levures, les débris cellulaires mais aussi et c'est important, des cellules apoptotiques (Rosales and Uribe-Querol, 2017). D'un point de vue de la sémantique, l'endocytose des cellules apoptotiques est connue sous le nom d'efferocytose, et l'endocytose des cellules nécrotiques suite à une infection ou une inflammation se nomme necroptosis et pyroptosis (Gordon, 2016).

Contrairement aux autres mécanismes d'endocytose vus précédemment, il faut retenir que la phagocytose est un processus médié par des récepteurs (Freeman and Grinstein, 2014). En effet, la phagocytose s'enclenche uniquement s'il y a un appariement d'un ou plusieurs récepteurs phagocytaires (portés par le phagocyte) et d'un ou plusieurs ligands (portés par la cible), c'est une phagocytose active impliquant un processus d'opsonisation (Braun et al., 2004). En effet, l'opsonisation la plus décrite est liée aux immunoglobulines G (anticorps IgG) : lorsque les IgG (opsonine) se fixent sur leur cible, les Récepteurs du **F**ragment **C**ristallisable gamma des IgG (Fc γ R : récepteur de l'opsonine IgG) à la surface des phagocytes peuvent s'y fixer et initier le processus de phagocytose (Niedergang and Grinstein, 2018). De plus, il existe d'autres opsonines capables de se fixer sur les structures microbiennes, tel que le facteur C3b (opsonine) du système du complément. L'opsonine C3b participe à un complexe substance microbienne activatrice-opsonine-récepteur (CR3 récepteur de l'opsonine C3b) (Brown, 1991 ; Sahu and Lambris, 2001). De plus, les ligands peuvent être également des composants endogènes comme le LipoPolySaccharide des parois des bactéries (LPS) et la PhosphatidylSérine (PS) des membranes des cellules apoptotiques (Kwiatkowska and Sobota, 1999 ; Ofek et al., 1995).

Par ailleurs, bien que le mécanisme de phagocytose soit principalement un mécanisme lié aux phagocytes professionnels que sont les monocytes, les macrophages ou encore les cellules dendritiques, les phagocytes professionnels peuvent également inclure : les neutrophiles, les ostéoclastes et les éosinophiles (Rabinovitch, 1995). Ces cellules sont chargées d'éliminer les microorganismes et de les présenter aux cellules du système immunitaire adaptatif, c'est-à-dire aux lymphocytes T. Mais le mécanisme de phagocytose peut également être réalisé par des cellules non professionnelles tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Cependant, leur différence réside dans le fait que ces cellules ne peuvent pas ingérer les microorganismes ; mais elles sont importantes dans l'élimination des corps apoptotiques (fragments cellulaires) (Flannagan et al., 2012 ; Gordon, 2016).

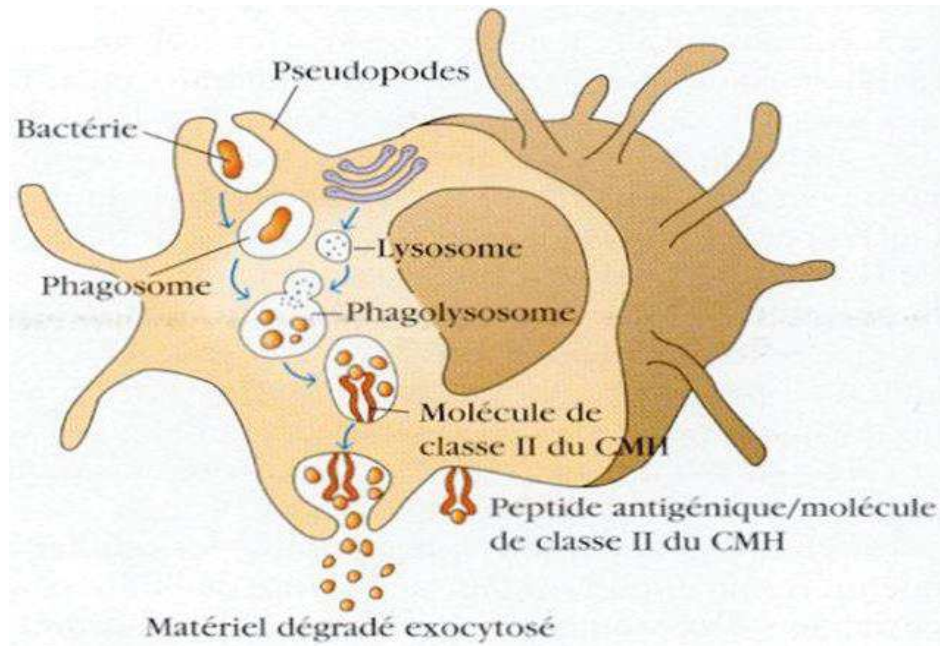


Figure 16 : Processus de la phagocytose. Le processus de la phagocytose se déroule tout d'abord par l'étape de reconnaissance / adhésion / internalisation ; le phagocyte reconnaît l'agent pathogène ici, par le ligand LipoPolySaccharide (LPS) de la paroi des bactéries à gram négatif. Par extension de la membrane plasmique (pseudopodes), le phagocyte internalise l'agent pathogène en formant un phagosome (vacuole intracellulaire). S'ensuit, l'étape de maturation du phagosome le long de la voie d'endocytose. Pour la dernière étape, le phagosome fusionne avec le lysosome pour former un phagolysosome qui va digérer et dégrader l'agent pathogène ingéré par des enzymes. Les particules antigéniques dégradées seront libérées par exocytose et présentées par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité II (CMH II).

Pour finir, d'un point de vue mécanistique, la phagocytose se déroule en trois grandes étapes **Figure 16** : (1) la reconnaissance par les récepteurs du phagocyte et l'internalisation des agents pathogènes dans un phagosome (2) la maturation du phagosome le long de la voie d'endocytose pour former une vacuole intracytoplasmique dont l'intérieur s'acidifie (pH 6,2 dans le phagosome précoce puis pH 4,5-5 dans le phagosome tardif) et enfin (3) la dégradation de l'agent pathogène par les enzymes protéolytiques des lysosomes (hydrolases, phosphatases, élastases, collagénases, etc...) et la présentation antigénique via le CMH II. Parallèlement, l'activation des récepteurs du phagocyte et de ses corécepteurs conduit à la synthèse de cytokines et de chimiokines à l'origine de la réponse inflammatoire (cytokines pro-inflammatoires : TNF α , Il-1, IL-6). Ces messagers solubles vont contribuer à perméabiliser les vaisseaux, et permettre ainsi de faire passer des cellules circulantes du sang (neutrophiles, monocytes) vers le tissu infecté, ce qui assure un renfort dans le processus d'élimination des pathogènes.

Finalement, l'inflammation fait intervenir un certain nombre de cellules qui, secrètent elles-mêmes au cours de la réaction inflammatoire un ensemble de médiateurs chimiques, qui leur permettront par exemple d'avoir des propriétés d'adhésion et de chimiotactisme. En effet, l'efficacité du système immunitaire est dépendante de la mobilité des différents types cellulaires. Cette transition m'amène à présenter la nature de ces médiateurs chimiques et leur rôle dans l'inflammation.

3- Les médiateurs CHIMIQUES de l'inflammation

Les principaux événements de la réaction inflammatoire, à savoir (i) le recrutement des cellules suite à l'introduction d'un agent pathogène (recrutement des granulocytes, infiltration cellulaire par diapédèse...), (ii) les mécanismes d'endocytose pour l'élimination du pathogène (la reconnaissance de l'agent infectieux par le phagocyte, qui engendre une cascade d'événements intracellulaires qui aboutit à la synthèse de médiateurs chimiques) et (iii) la mise en place de la réaction immunitaire, génèrent et utilisent des molécules de communication intercellulaire et de migration appelées : cytokines et chimiokines. L'ensemble de ces médiateurs chimiques sont de nature pro-inflammatoire et / ou anti-inflammatoire.

Il est important de mentionner ici que l'équilibre entre les médiateurs chimiques pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, une dérégulation de la sécrétion des cytokines est impliquée dans plusieurs maladies allant de l'inflammation chronique à l'allergie (Arango Duque and Descoteaux, 2014a),

Tableau 2 : Classement et fonction des cytokines (d'après Donatello, 2007)

Classe fonctionnelle	Propriétés	Effets	Exemples de cytokines impliquées
facteurs de croissance	expansion clonale des lymphocytes	Th1 / Th2/ Th17 polarisation	IL-2,IL-4, IL-7, IL-17, IL-15
cytokines Th1	↑ réponse Th1	Expansion clonal des lymphocytes T cytotoxiques	IFN-γ, IL-2, IL-12, IL-18
cytokines Th2	↑ réponse Th2	↑ production d'anticorps	IL-4, IL-5, IL-18, IL-25, IL-33
cytokines Th17	↑ réponse Th17, IFN-γ	Réponses auto-immunes	IL-17, IL-23, IFN-γ
cytokines pro-inflammatoires	↑ médiateurs inflammatoires	↑ réponse immune innée	IL-1α, IL-1β, TNFα, IL-12, IL-18, IL-23, MIF, IL-33
cytokines anti-inflammatoires	↓ gènes inflammatoires	↓ cytokines médiateurs de la létalité	IL-10, IL-13, TGFβ,IL-22, IL-1RA, IFNα/β
adipokines	Pro-inflammatoires	maladie auto-immune atherogénique	IL-1α, TNFα, IL-6, leptine, adiponectine, resistine
cytokines dépendantes du récepteur gp130	facteurs de croissances	activation des lymphocytes B, inflammation aigüe	IL-6, IL-11, LIF
facteurs de stimulation des colonies	hématopoïèse	pro et anti-inflammatoires	IL-3, IL-7, G-CSF, GM-CSF, M-CSF
cytokines angiogéniques	néo-vascularisation	pro-métastatique	IL-1, IL-6, IL-8, VEGF
Facteurs de croissance mésenchymal	fibrose	pro-métastatique	FGF, TGFβ
Interferon de Type II	Activation des macrophages	↑ du CMH de classe II	IFN-γ
Interferon de type I	Antiviral, ↑ du CMH de classe I	anti-inflammatoire, anti-angiogénique	IFNα, IFNβ
Chimiokines	↑ de la migration cellulaire	↑ de l'activation cellulaire	IL-8, MCP-1, MIP-1α

jusqu'aux maladies auto-immunes (Dinarello, 2007). Par ailleurs, Irène Maeva Réa et ses collaborateurs démontrent, que la dérégulation des cytokines joue un rôle clé dans le remodelage du système immunitaire au cours du vieillissement (Rea et al., 2018). Faits intéressants, il semblerait qu'avec le vieillissement cellulaire, le remodelage du pattern d'expression des cytokines tend progressivement vers un phénotype pro-inflammatoire appelé : « vieillissement inflammatoire », responsable de la plupart des maladies liées à l'âge (l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde ou le vieillissement lui-même). Enfin, dans le cas des inflammations chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les cytokines pro-inflammatoires sont largement impliquées dans ces pathologies (Noack and Kolopp-Sarda, 2018).

Notons également qu'environ 20% des cancers sont induits par les inflammations chroniques (Galdiero et al., 2018). Les médiateurs inflammatoires solubles et cellulaires sont responsables de l'initiation et de la progression des cancers (par exemple : les cancers de l'estomac, du colon, de la peau, du foie, du sein, des poumons) (Al Murri et al., 2006 ; Barash et al., 2010 ; Capece et al., 2018). Cet ensemble de publications montre que les stimuli inflammatoires provoqués par l'inflammation augmentent le risque de cancer, en favorisant la progression des tumeurs et la propagation des métastases. En fait, les cellules inflammatoires et les cytokines agissent comme des promoteurs de tumeurs qui affectent la survie des cellules, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et la résistance à la chimiothérapie (Tanaka, 2013).

A présent voyons quelles sont la nature et les propriétés de ces cytokines.

3-1 Les Cytokines (du grec « cyno » : cellules et « kinois » : mouvement)

Les cytokines sont de petites protéines ou des glycoprotéines extracellulaires solubles, qui confèrent des instructions et assurent la communication entre les cellules immunitaires et les cellules non immunes. Ce sont des mobilisateurs intercellulaires essentiels des cellules engagées dans les défenses inflammatoires, la croissance, la différenciation cellulaire, la mort cellulaire, l'angiogenèse et les processus de développement et de réparation visant à rétablir l'homéostasie (Oppenheim, 2001 ; Arango Duque and Descoteaux, 2014a).

Les cytokines ont été attribuées à divers groupes familiaux (Interleukines, TNF, IFN, CSF) et sont classées sur les bases de leurs propriétés d'homologies structurales et de leurs récepteurs (Dinarello, 2007 ; Turner et al., 2014). Les cytokines sont classées par fonction, et qui plus est, ont des propriétés et des effets spécifiques **Tableau 2**.

Tableau 3 : Sources et cibles des cytokines (d'après Turner, 2014)

	cytokines	Sources principales	Cellules ciblées	Fonctions principales
Interleukines	IL-1	macrophages, cellules B, cellules dendritiques,	cellules B, cellules NK,	pro-inflammatoire, prolifération et différenciation
	IL-2	cellules T	cellules T et B activées, les cellules NK	prolifération et activation
	IL-3	cellules T, cellules NK	cellules souches	prolifération et différenciation des précurseurs hématopoïétiques
	IL-4	Cellules T helper (Th)	cellules B, cellules T, macrophages	prolifération des cellules B et des cellules T cytotoxiques, renforcement de l'expression du CMH de classe II
	IL-5	cellules Th	éosinophiles, cellules B	prolifération et maturation, stimulation de la production des IgA et IgM
	IL-6	cellules Th, macrophages, fibroblastes	active les cellules B, et les plasmocytes	différenciation en plasmocyte et production IgG
	IL-7	cellules stromales, cellules épithéliales, macrophages	cellules souches	facteur de croissance des cellules B et T
	IL-8	macrophages	neutrophiles	pro-inflammatoire, chimiotactisme
	IL-10	cellules T	cellules B et macrophages	inhibe la production des cytokines et la fonction des cellules mononucléaires, anti-inflammatoire
	IL-12	cellules T	cellules NK	active les cellules NK
Facteur de Nécrose Tumoral (TNF)	TNFα	Macrophages monocytes	Macrophages cellules tumorales	activation de la phagocytose, choc endotoxique, cytotoxicité tumorale
	TNF β	cellules T	phagocytes et cellules tumorales	chimiotactisme, phagocytose, inducteur d'autres cytokines

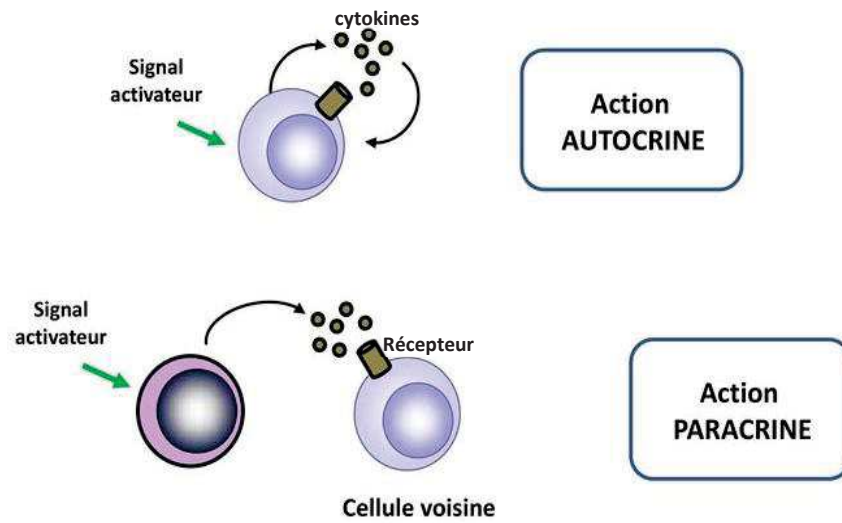
Tableau 3 (suite) : Sources et cibles des cytokines (d'après Turner, 2014)

	Cytokines	Sources principales	Cellules ciblées	Fonctions principales
Interferon (IFN)	IFN α	leucocytes	divers	Antiviral
	IFN β	fibroblastes	divers	Antiviral, anti-prolifératif
	IFN- γ	cellules T	divers	Anti-viral, activation des macrophages, augmentation de la fonction des neutrophiles et des monocytes
Facteur de Stimulation des Colonies (CSF)	G-CSF	fibroblastes, endothélium	cellules souches moelle osseuse	production de granulocytes
	GM-CSF	cellules T, macrophages, fibroblastes	cellules souches	production des granulocytes, monocytes, éosinophiles
	M-CSF	fibroblastes, endothélium	cellules souches	production et activation des monocytes
Autres	TGF β	cellules T et cellules B	cellules T et B activées	inhibe la prolifération des cellules T et B, inhibe l'hématopoïèse

Un ensemble de cytokines est au cœur du rôle des macrophages en tant que cellules sentinelles du système immunitaire inné assurant la transition entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Arango Duque and Descoteaux, 2014a). Cela sera plus amplement décrit dans le chapitre consacré aux macrophages.

Les cytokines sont des protéines de trafic, et pour la plupart, elles ont été découvertes chez la levure dans les années 60-70, il en existe plus d'une centaine (Dinarello, 2007). L'existence des cytokines pro-inflammatoires principales comme le « Tumor Nécrosais Factor α » (TNF α), les Interleukines (IL-1, IL-6 et IL-17) (Noack and Kolopp-Sarda, 2018) et les cytokines anti-inflammatoires comme l'InterLeukine-1 Récepteur Antagoniste (IL-1 RA), l'IL-4, l'IL-10 ou encore l'IL-13 (Opal and DePalo, 2000) **Tableau 2 et 3**, déterminent la fonction première des cytokines dans la régulation de l'inflammation.

A



B

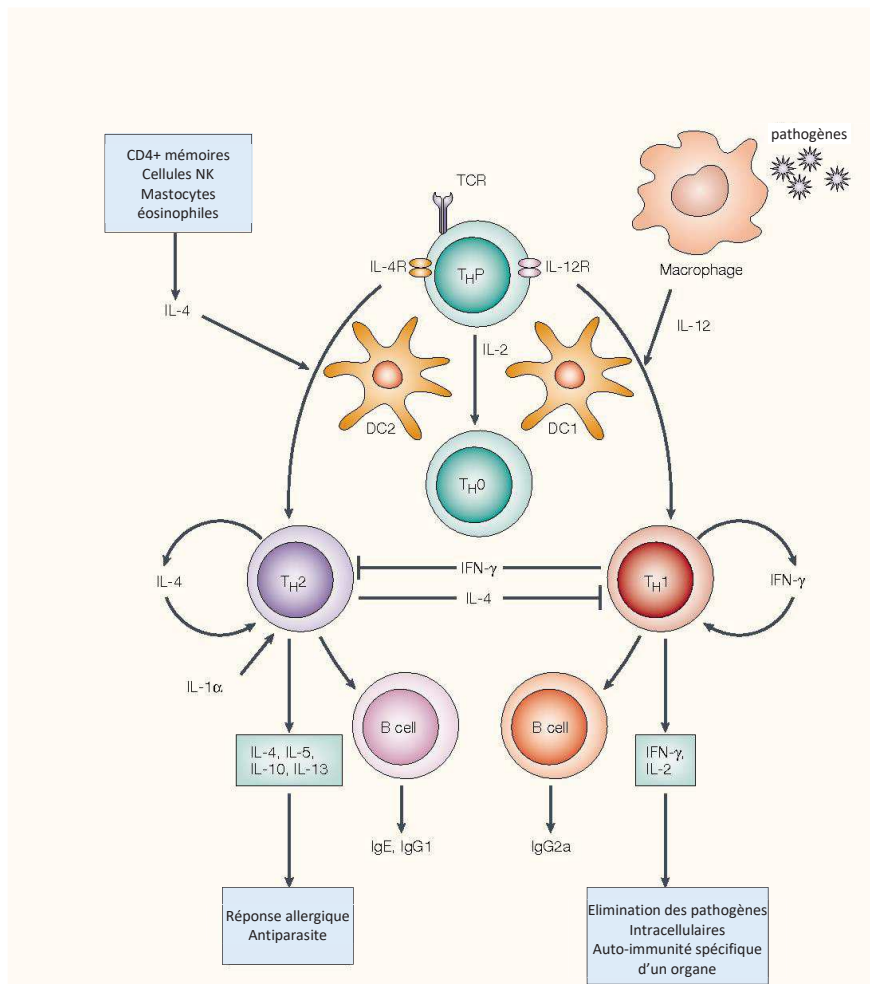


Figure 17 : Action des cytokines (A) Les cytokines sont des messagers intercellulaires permettant la coordination de la réponse cellulaire, elles agissent en autocrine ou paracrine. **(B)** Le développement et la différenciation des lymphocytes T Helper-Précurseur (T_HP) et leurs interactions cellulaires (cellules dendritiques (DC) et macrophages) dans la régulation de l'inflammation sont représentés ici à titre d'exemple (d'après Liew, 2002).

En outre, les cytokines sont pléiotropes car elles agissent sur de nombreux types de cellules différentes, les cellules peuvent exprimer plusieurs récepteurs pour une cytokine donnée (Mantovani et al., 2004a). Elles sont classées comme paracrines si l'action est à proximité du lieu de libération, autocrines si la cytokine agit sur la cellule qui la sécrète (Altan-Bonnet and Mukherjee, 2019) **Figure 17 A**. Et comme exemple concret, je cite ici le développement et la différenciation des lymphocytes T helper, qui sont dépendants de la réponse aux cytokines pour réguler l'inflammation **Figure 17 B** (Liew, 2002).

Il faut noter cependant que la plupart des cytokines ont une durée de vie courte et agissent localement, principalement de manière autocrine et paracrine. L'action des cytokines se fait généralement en cascade, avec des interdépendances pouvant aller dans le sens d'un antagonisme ou d'une synergie. Seulement quelques cytokines présentes dans le sang comme: le « Macrophage Colon Stimulation Factor » (M-CSF) ou le « Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor » (GM-CSF) sont capables d'agir à distance (Jaguin et al., 2013 ; Arango Duque and Descoteaux, 2014a).

Bien souvent par abus de langage, lorsque l'on parle de cytokines, on a tendance à englober toutes les familles : les chimiokines, les Interférons (IFN), les Interleukines (IL), la famille des « Tumor Nécrosais Factor » (TNF) et les adipokines (cytokines du tissu adipeux) (Clément and Vignes, 2009).

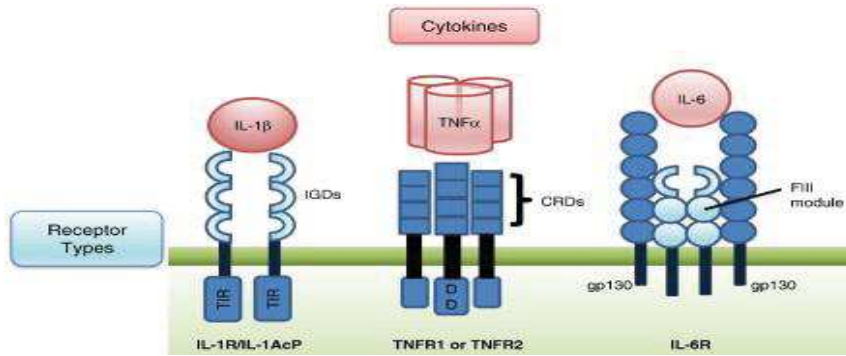


Figure 18: Les cytokines et leurs récepteurs (d'après Turner et al., 2014). Les cytokines émettent un signal par l'intermédiaire d'oligomères de récepteurs transmembranaires à passage unique avec des domaines extracellulaires distincts pour la liaison des ligands et les domaines intracellulaires, qui permettent la transduction du signal. Le récepteur de l'InterLeukine-1(IL-1) est un complexe entre l'IL-1R1 et l'IL-1RAcP (protéine accessoire) formé à la suite de la liaison du ligand à l'Immunoglobuline extracellulaire (IGD). La signalisation intracellulaire est assurée par le domaine Toll/IL-1R (TIR). Le TNF α trimérique se lie aux Domaines Riches en Cystéines (CDR) des trimères préassemblés du TNF (TNFR) et la signalisation est transmise via le domaine de mort du récepteur (DD). Enfin, l'IL-6 récepteur (IL-6R) est une structure multimérique avec des chaînes IL-6R complexées par la gp130. La liaison au ligand se trouve dans les modules de fibronectine III (FIII) des chaînes de l'IL-6R mais la transduction du signal se fait par les gp130 associées.

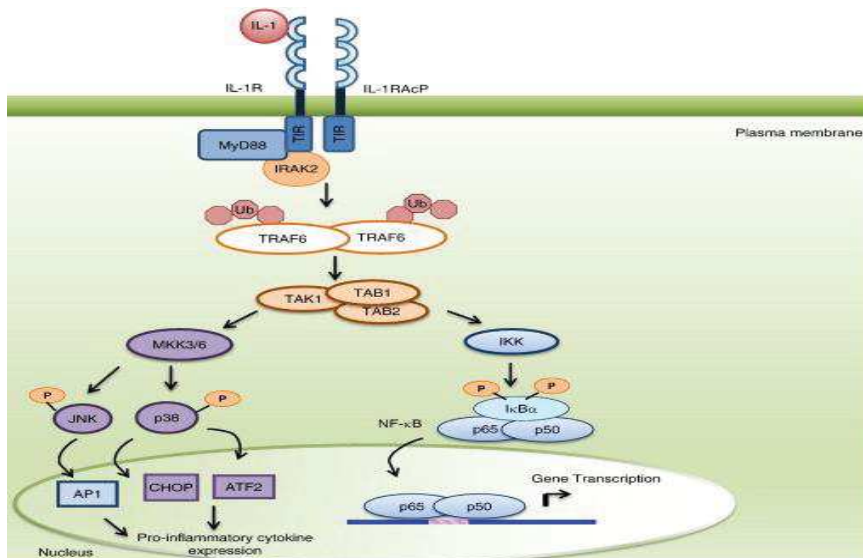


Figure 19 : Exemple de l'IL-1 et de sa cascade de signalisation intracellulaire (d'après Turner et al., 2014). L'IL-1 se lie au complexe IL-1R / IL-1RAcP (protéine accessoire) à la surface cellulaire, transmet un signal de transduction via le l'adaptateur Toll/IL-1R (TIR), « Myéloïde Différenciation factor 88 » (MyD88). Ensuite, les kinases associées à l'IL-1R (IRAK) sont recrutées au complexe récepteur / MyD88. Les IRAK activées favorisent la polyubiquitination du facteur 6 associé au récepteur du TNF (TRAF6), puis ce dernier interagit avec une protéine de liaison 1 (TAK1) complexé aux protéines de liaison (TAB), conduisant finalement à la phosphorylation de l'inhibiteur du NF- κ B (I κ B α) et la dissociation des sous-unités NF- κ B. L'hétérodimère p65/p50 phosphorylé se transloque vers le noyau, induisant l'expression des gènes pro-inflammatoires. De plus, l'activation de TAK1 et des TAB entraînent la phosphorylation et l'activation des protéines kinases (MAPK : JNK et p38). Ensuite, ces kinases phosphorylent et activent les facteurs de transcription pour induire l'expression de gènes pro-inflammatoires (cytokines /chimiokines).

Cependant, chaque cytokine se lie à un récepteur de surface cellulaire spécifique **Figure 18** (Cameron and Kelvin, 2013; Turner et al., 2014) pour générer une cascade de signalisation intracellulaire qui détermine dès lors le fonctionnement des cellules **Figure 19**. C'est d'ailleurs sur les propriétés d'homologies structurelles et leurs récepteurs, que les cytokines ont été attribuées à divers groupes familiaux (Dinarello, 2007 ; Turner et al., 2014).

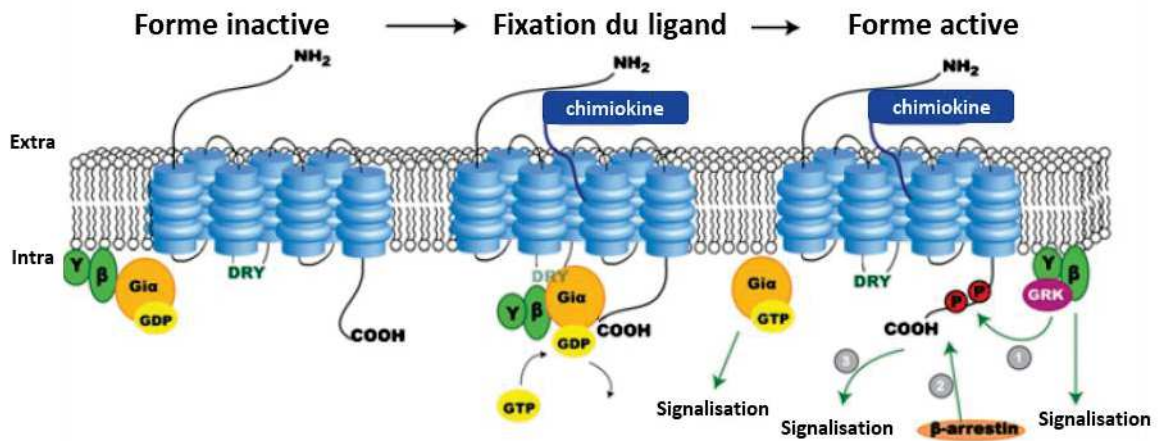
Notons également qu'il existe des récepteurs leurres dit récepteurs « atypiques » sans propriétés de transduction de signal appelés aussi « déco » et « SCA venger » récepteurs. Je cite ici deux exemples : (i) le récepteur soluble IL-1R2 (inhibiteur naturel et puissant de l'IL-1 α et de l'IL-1 β) (Khoufache and Akoum, 2013 ; Bonecchi et al., 2016a) et (ii) le récepteur IL-1R8 appelé encore « Toll/IL-1R8 » (TIR8) (inhibiteur de l'activation des voies de signalisation dépendante des TLR qui conduisent à l'activation des « Mitogène Activâtes Protein Kinase » (MAPK) et du « Nucléal Factor-kappa B » (NF-kB) (Garlanda et al., 2013 ; Bonecchi et al., 2016b). Ces récepteurs représentent également des éléments régulateurs, ce sont des régulateurs négatifs clés de l'immunité et de l'inflammation.

Par ailleurs, grâce aux progrès des biotechnologies, le réseau de cytokines se trouve ciblé à des fins thérapeutiques. En effet, certaines cytokines, ont été synthétisées sous forme de cytokines recombinantes et peuvent être mimées ou antagonisées (Emilie and Galanaud, 2000). Par exemple, les cytokines utilisées en thérapeutiques sont immunostimulantes comme par exemple : les facteurs de croissances hématopoïétiques de la lignée granulocytaire et / ou macrophages GM-CSF, G-CSF.

Ces CSF ont montré un effet positif sur la cicatrisation des plaies chroniques (Brem et al., 2018). De plus, le GM-CSF et le G-CSF sont par exemple stratégiquement utilisés en clinique pour traiter la suppression de la lignée myéloïde (myélosuppression) induite par la toxicité de la chimiothérapie et de la radiothérapie des patients atteints de cancer (Viret et al., 2006). Le GM-CSF est également utilisé pour développer l'immunothérapie des cancers, il contribuerait à la régulation de l'immunosuppression dans le micro-environnement de la tumeur (Yan et al., 2017). Autre exemple, l'IFN- γ peut être utilisé comme potentialisateur de la fonction macrophagique (Miller et al., 2009) ou encore l'utilisation de l'IL-2 (produite par les lymphocytes T helper de type1) qui permet de restaurer l'immunité cellulaire par l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD4 dans le cas des patients porteurs du VIH par exemple (Sereti et al., 2002 ; Natarajan et al., 2002).

Pour finir, les cytokines et / ou leurs récepteurs peuvent également être utilisés pour être des immunomodulateurs comme par exemple : IFN- β vis-à-vis de la sclérose en plaque (Rudick and Goelz, 2011 ; Marziniak and Meuth, 2014).

A



B

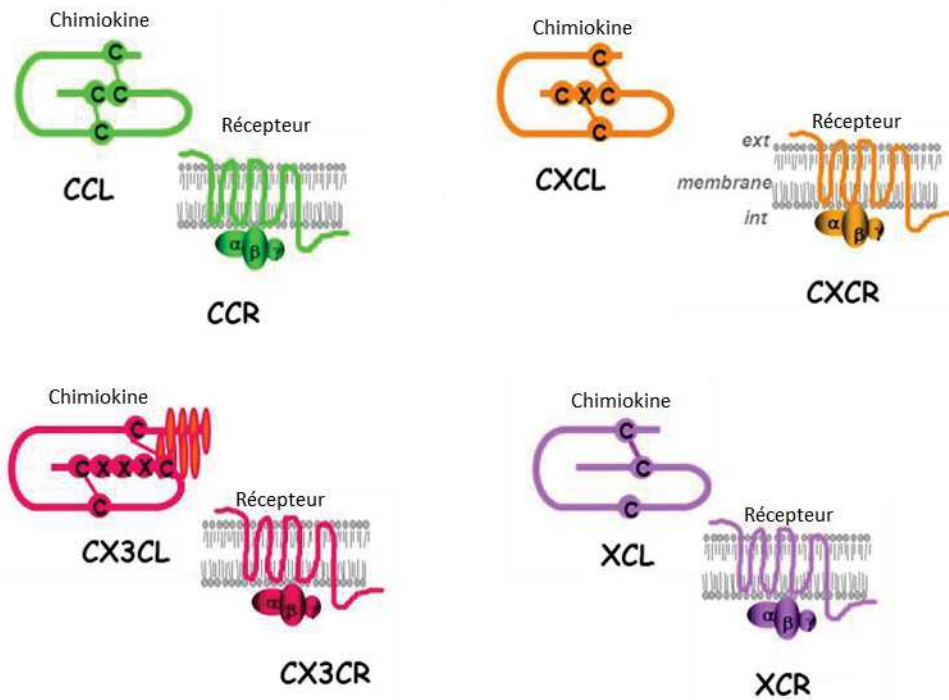


Figure 20 : Les chimiokines et leurs récepteurs d'après O'Hayre et al., 2008. (A) Les récepteurs des chimiokines sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G ou à des β arrestines. Lorsque la chimiokine se lie à son récepteur, il stabilise le complexe ligand-récepteur dans une conformation qui active les protéines G hétérotrimériques (α, β, γ) à l'intérieur de la cellule. **(B)** Les récepteurs sont nommés en fonction de la sous-famille qu'ils reconnaissent. On distingue les formes majeures des chimiokines (CCL, CXCL) et des formes mineures (CX3CL ou XCL), où « C » représente les résidus cystéines, « L » représente le ligand et « X » représente les aminoacides. Par conséquent, la dénomination de leurs récepteurs respectifs à la même dénomination mais où « R » représente le récepteur.

Les antagonistes des cytokines quant à eux, peuvent être utilisés comme des immunosuppresseurs permettant de prévenir ou de traiter le rejet du greffon contre l'hôte, par exemple, lorsque l'anticorps dirigé contre le Récepteur de l'IL-2 (Anti-IL-2R) est administré (Emilie and Galanaud, 2000). Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, l'anti-TNF α est utilisé pour ralentir la progression des dommages structuraux articulaires (Weinblatt et al., 1999 ; Sany, 2006), la finalité étant de diminuer les réponses pro-inflammatoires des lymphocytes Th1, contribuant à augmenter la production des cytokines anti-inflammatoires par les lymphocytes Th2. Enfin dernier exemple, dans les maladies auto-immunes comme le psoriasis, les thérapeutiques utilisées peuvent être des anti-IL-12 (Teng et al., 2015), ainsi que des anti-IL-23 (Astry et al., 2015). En fait, L'IL-12 et L'IL-23 modulent respectivement la voie des lymphocytes Th1 et des lymphocytes Th17, responsables de la synthèse de ces deux cytokines qui, quand elles sont synthétisées, sont responsables des manifestations cliniques du psoriasis cutané (Sofen et al., 2014).

Certes, les cytokines que je viens de vous présenter permettent la communication intercellulaire, le développement et la différenciation des cellules de l'immunité, mais un autre type de médiateurs chimiques appelé « cytokines chimio-attractantes », interviennent également lors de l'inflammation. Ces médiateurs chimiques appelés plus communément « chimiokines » vont permettre le chimiotactisme des cellules de l'immunité, en favorisant leur recrutement au site de l'inflammation (Samson et al., 1999).

3-2 Les Chimiokines

Les chimiokines, sont une large famille de plus de 50 ligands et 20 récepteurs qui sont des régulateurs essentiels de la migration cellulaire (O'Hayre et al., 2008) ; (Stone et al., 2017). Ce sont des petites protéines sécrétées appartenant à la famille des cytokines, qui ont été initialement découvertes pour leurs propriétés chimio-attractantes des cellules immunitaires (Bonavita et al., 2018). Les chimiokines et leurs récepteurs peuvent être exprimés ou peuvent être induits de manière constitutive dans plusieurs organes et différents types de cellules (Rostène, 2010).

Les chimiokines régulent elles aussi les fonctions immunitaires impliquant l'infection, l'inflammation, la migration des cellules souches au cours du développement. Ces médiateurs sont également impliqués dans les processus oncogènes, de néo vascularisation et d'athérosclérose (Rostène, 2010). C'est une famille de petites protéines (polypeptides) majoritairement solubles, elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) et d'autres, par des β arrestines **Figure 20 A**. Ils sont nommés en fonction de la sous-famille qu'ils reconnaissent **Figure 20 B**.

Il faut retenir que la plupart des récepteurs reconnaissent plusieurs chimiokines, et lorsque ces dernières (ligands) se lient à leurs récepteurs, elles stabilisent le complexe ligand-récepteur dans une conformation qui active les protéines G hétérotrimériques (α, β, γ) ou qui active la β arrestine à l'intérieur de la cellule, initiant la transduction du signal et donc les réponses cellulaires (O'Hayre et al., 2008) ; (Turner et al., 2014). De plus, tout comme les cytokines, il existe un sous-groupe de récepteurs structurels de chimiokines atypiques, appelés récepteurs « leurres », ce sont des « Apical chimiokine récepteurs » (Ars) **Figure 21**, dont le rôle est de réguler négativement l'inflammation (Bonecchi et al., 2010).

Quant au devenir des récepteurs, après leur liaison et leur activation par les chimiokines, ils sont généralement internalisés, puis dégradés ou recyclés vers la membrane plasmique (Stone et al., 2017).

Traditionnellement, les chimiokines et leurs récepteurs ont été dissociés en quatre sous-familles sur la base de l'emplacement des deux premiers résidus cystéine permettant leur distinction. Les sous-familles de chimiokines sont dénommées : CCL, CXCL (ils représentent les formes majeures), CX3CL ou XCL (ils représentent les formes mineures), où « C » correspond aux résidus Cystéines, « L » correspond au Ligand et « X » représente les amino acides (Charo and Ransohoff, 2006) ; (O'Hayre et al., 2008) ; (Zlotnik and Yoshie, 2012).

Cependant, la plupart des chimiokines ont également des noms communs ou historiques liés à leurs fonctions initialement identifiées. De plus, leur classement est également établi en fonction de leur rôle biologique **Figure 21**. En effet, alors que la plupart des chimiokines sont considérées comme pro-inflammatoires du fait de leur expression induite en réponse à une lésion tissulaire, un petit sous-ensemble est classé comme constitutif au fur et à mesure qu'ils sont exprimés dans les tissus sains. Ces chimiokines jouent un rôle dans le maintien des fonctions immunitaires comme le passage des lymphocytes B via la moelle osseuse où ils sont maturés (homing des lymphocytes) (Owen and Mohamadzadeh, 2013) ; (Stone et al., 2017).

Par ailleurs, comme précédemment mentionné, il existe des récepteurs de chimiokines « atypiques », qui ne servent pas de médiateurs à la migration cellulaire mais qui agissent dans l'inflammation comme des récepteurs « leurres » (Bonecchi et al., 2010). La plupart des chimiokines inflammatoires sont principalement impliquées dans le recrutement des leucocytes dans les zones d'inflammation (comme vu lors de la diapédèse des neutrophiles),

Type cellulaires	Récepteurs
Cellules dendritiques (DC)	
DC lymphoïde	CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CXCR1, CXCR2
DC myéloïdes	CCR1 ^{lo} , CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 ^{lo} , CCR7, CXCR3, CXCR4, CX3CR1
DC plasmacytoïde	CCR1 ^{lo} , CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 ^{lo} , CCR7, CXCR3, CXCR4
DC mature	CCR7
Lymphocytes T	
Précurseur médullaire	CXCR4, CCR9
Thymocyte	CCR4, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR3, CXCR4
Lymphocyte T naïf	CCR7, CXCR4
Lymphocyte T folliculaire	CXCR4, CXCR5
Lymphocyte T de mémoire centrale	CCR7, CXCR4
Lymphocyte T mémoire-effecteur	CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CCR9, CXCR3, CXCR4
Lymphocyte T effecteur mature Th1	CCR1, CCR4, CCR5, CCR6, CCR9, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CX3CR1, XCR1
Lymphocyte T effecteur mature Th2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, CCR9, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CX3CR1, XCR1
Monocytes	
Monocyte résident (CD11a, CD14 ^{lo} , CD16 ⁺ , CD64)	CXCR4, CX3CR1 ^{hi}
Monocyte inflammatoire (CD11a, CD14 ^{hi} , CD16 ⁻ , CD62L ⁺)	CCR2, CXCR2, CXCR4, CX3CR1 ^{lo}
Lymphocytes « Natural Killer » (NK)	
NK au repos (CD16 ^{hi} , CD56 ^{lo})	CCR7, CXCR4, CX3CR1
NK activés (CD16 ^{lo} , CD56 ^{hi})	CCR1, CCR2, CCR3, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CX3CR1

Figure 22 : Expression différentielle des récepteurs de chimiokines sur les cellules lymphoïdes humaines (d'après Combadière et al., 2007). L'expression des chimiokines et de leurs récepteurs a été observée dans une grande variété de types cellulaires du système hématopoïétique et participent à la différenciation fonctionnelle des cellules effectrices, comme pour les lymphocytes T CD4 Th1/ Th2, mais aussi pour les lymphocytes T CD8, les cellules « Natural Killer » (NK), les monocytes, les macrophages et les Cellules Dendritiques (DC).

Participant ainsi à la fois à la migration des leucocytes et à leur activation. Les chimiokines jouent un rôle clé dans la progression des tumeurs. En effet, les chimiokines et leurs récepteurs déterminent l'infiltration des cellules immunitaires dans le micro-environnement de la tumeur, modulant la réponse immunitaire et participant ainsi à l'angiogenèse et à la dissémination de la tumeur (Owen and Mohamadzadeh, 2013) ; (Teillaud and Kroemer, 2014). C'est grâce à l'étude des récepteurs dans les pathologies tumorales, que les scientifiques ont pu améliorer leur compréhension des nombreux mécanismes impliqués, leur permettant même, par exemple, d'associer certains récepteurs de chimiokines comme agents diagnostiques dans le cas du mélanome (Jacquelot et al., 2016).

Ainsi, l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs a été observée dans une grande variété de types cellulaires du système hématopoïétique. Les chimiokines et leurs récepteurs participent à la différenciation fonctionnelle des cellules effectrices, comme pour les lymphocytes T CD4 de type T helper1/ T helper2, mais aussi pour les lymphocytes T CD8, les cellules « Natural Killer » (NK), les monocytes, les macrophages et les Cellules Dendritiques (DC) (Mantovani et al., 2004a ; (Combadière et al., 2007) **Figure 22**.

Du fait que la plupart des récepteurs aux chimiokines reconnaissent plusieurs chimiokines, cette redondance fonctionnelle constitue le premier niveau de complexité du réseau formé par les chimiokines et leurs récepteurs (Combadière et al., 2007) ; (Zlotnik and Yoshie, 2012) **Figure 23**.

Outre leur fonction de chimiotactisme, la découverte de l'implication de certains récepteurs des chimiokines en tant que porte d'entrée du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) dans la cellule que le virus infecte, et la possibilité d'utiliser les chimiokines comme antiviraux, n'ont fait qu'accroître l'intérêt général pour l'ensemble de ces molécules en thérapeutique. En effet, on sait que le VIH, en plus du « Cluster de Différenciation » 4 (CD4), utilise les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 comme corécepteurs pour infecter les lymphocytes T CD4. Ainsi, des antagonistes des CCR5 et CXCR4 ont été testés en clinique (Onuffer and Horuk, 2002).

Par ailleurs, de nombreuses chimiokines sont exprimées au cours de l'inflammation des parois vasculaires. Cette inflammation constitue l'une des causes des accidents cardiovasculaires. Parmi elles, le CCL2 (MCP-1) et CX3CL1 semblent avoir un rôle particulièrement important dans la plaque d'athérome et l'influx initial de monocytes dans la paroi de l'artère (Onuffer and Horuk, 2002). Des analogues de chacune de ces cytokines ont été recherchés.

Notons également que la chimiokine CCL2 (MCP-1) et son récepteur CCR2 par exemple, représentent une cible thérapeutique dans le traitement des douleurs chroniques (Réaux-Le Goazigo and Parsadaniantz, 2009). Autre exemple, un niveau élevé des chimiokines CCL2, CCL3 et CCL5 dans les articulations des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, coïncide avec le recrutement des monocytes et des cellules T dans les tissus synoviaux (Loetscher et al., 1994) ; (Shadidi et al., 2003). Quant à la chimiokine CXCL1 et son récepteur CXCR1/2, ils sont impliqués dans les cas de cancers de l'estomac (Chen et al., 2018b).

Finalement, de nombreuses chimiokines et leurs récepteurs ont été identifiés comme des cibles thérapeutiques potentielles dans un large éventail de maladies inflammatoires (Proudfoot, 2002) ; (Stone et al., 2017) mais également pour le traitement des cancers **Figure 23**. La raison serait que, dans le cancer, les chimiokines interviennent aussi dans les phénomènes de transformation cellulaire, de dissémination des métastases, de développement tumoral et de régulation angiogénique (Combadière et al., 2007) ; (Turner et al., 2014). Au vu de l'importance des chimiokines dans les cancers, des travaux tentent d'utiliser des analogues, des agonistes ou des antagonistes des chimiokines pour obtenir une réduction tumorale (Balkwill, 2004) ; (Mantovani et al., 2010).

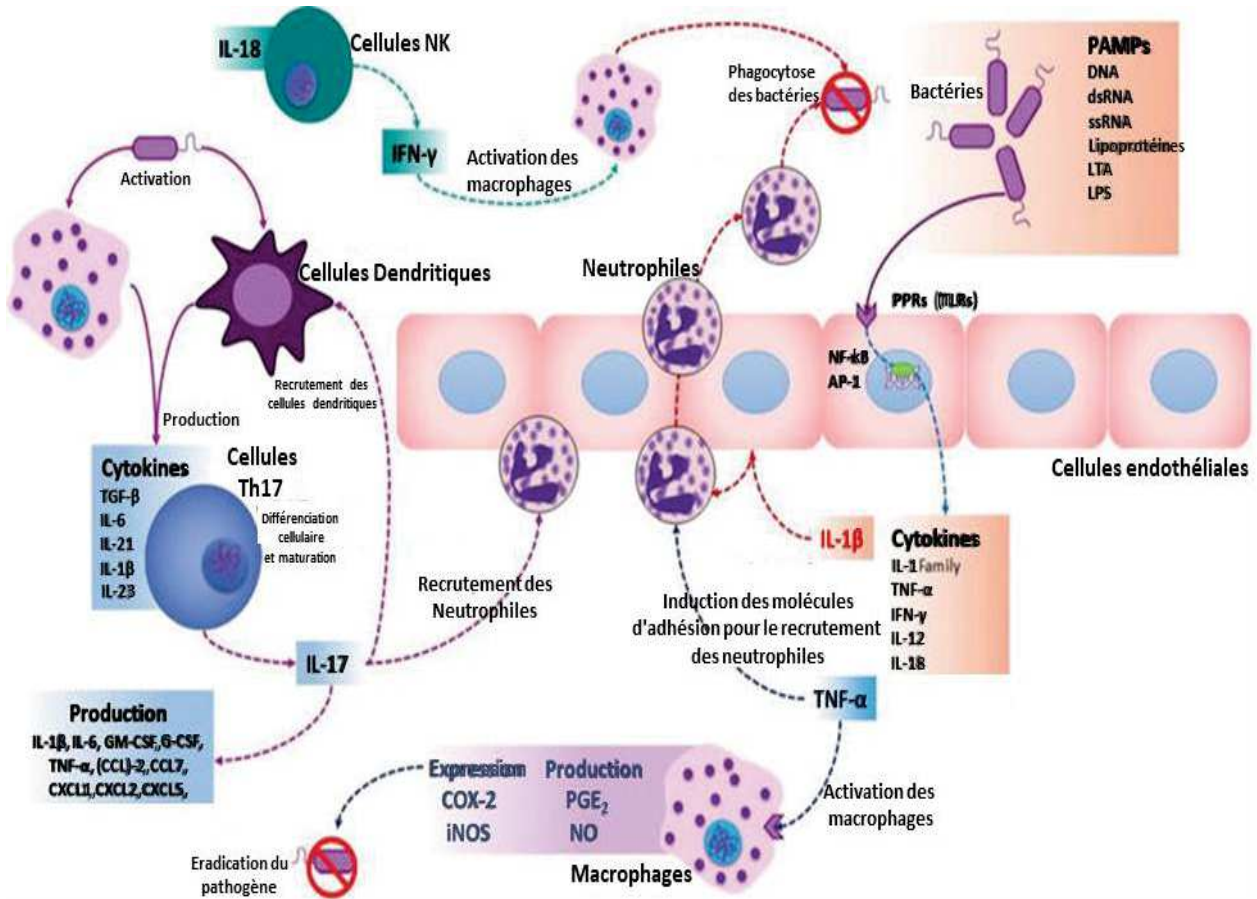


Figure 24 : Exemple du réseau combiné de médiateurs cellulaires et chimiques mis en jeu dans le cas d'une infection microbienne d'après (Muñoz-Carrillo et al., 2018). La réponse inflammatoire qui se produit en présence d'une infection consiste en plusieurs mécanismes effecteurs protecteurs qui favorisent les fonctions microbicides (immunité innée), et stimulent à leur tour l'immunité adaptative, ce qui contribue à réduire les lésions des tissus.

Pour finir sur les médiateurs cellulaires et chimiques mis en jeu lors de l'inflammation, le processus inflammatoire devient un mécanisme complexe. Ce processus complexe implique une série d'évènements cellulaires et biochimiques interdépendants essentiels au déclenchement de la réparation des tissus endommagés (Muñoz-Carrillo et al., 2018).

Ces médiateurs sont nombreux, ils permettent de mettre en place un réseau combiné qui assure la communication entre les différentes cellules de l'immunité pour permettre aux tissus endommagés d'être réparés et de retrouver l'homéostasie cellulaire et tissulaire **Figure 24**.

Outre le rôle protecteur de la mise en place de ce réseau, l'inflammation est considérée comme le facteur déterminant de nombreuses maladies, notamment en étant un facteur important dans les affections liées à l'âge (Franceschi and Campisi, 2014 ; Rea et al., 2018), mais également dans l'athérosclérose, le cancer, l'auto-immunité et les infections chroniques (Eltzschig and Carmeliet, 2011).

Bien que la nature hétérogène de la réponse inflammatoire dépende du type de maladie et de l'organe dans lequel la réponse se produit, l'inflammation peut avoir à la fois des effets protecteurs, ainsi que des conséquences collatérales délétères pour l'hôte. Les exemples de thérapies réussies qui ciblent l'inflammation soulignent l'importance de comprendre les voies inflammatoires pour permettre de nouvelles avancées thérapeutiques.

A présent voyons comment l'organisme, malgré ses défenses ne parvient toujours pas à résoudre une inflammation. En effet, le défaut d'homéostasie est engendré par un déséquilibre du trafic entre les cellules du système immunitaire via le déséquilibre de production des médiateurs chimiques pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Netea et al., 2017). Ce défaut d'homéostasie favorise ainsi des inflammations qui deviennent chroniques voire tendent vers des cancers.

Il existe différents types d'inflammations et il est nécessaire de les définir .

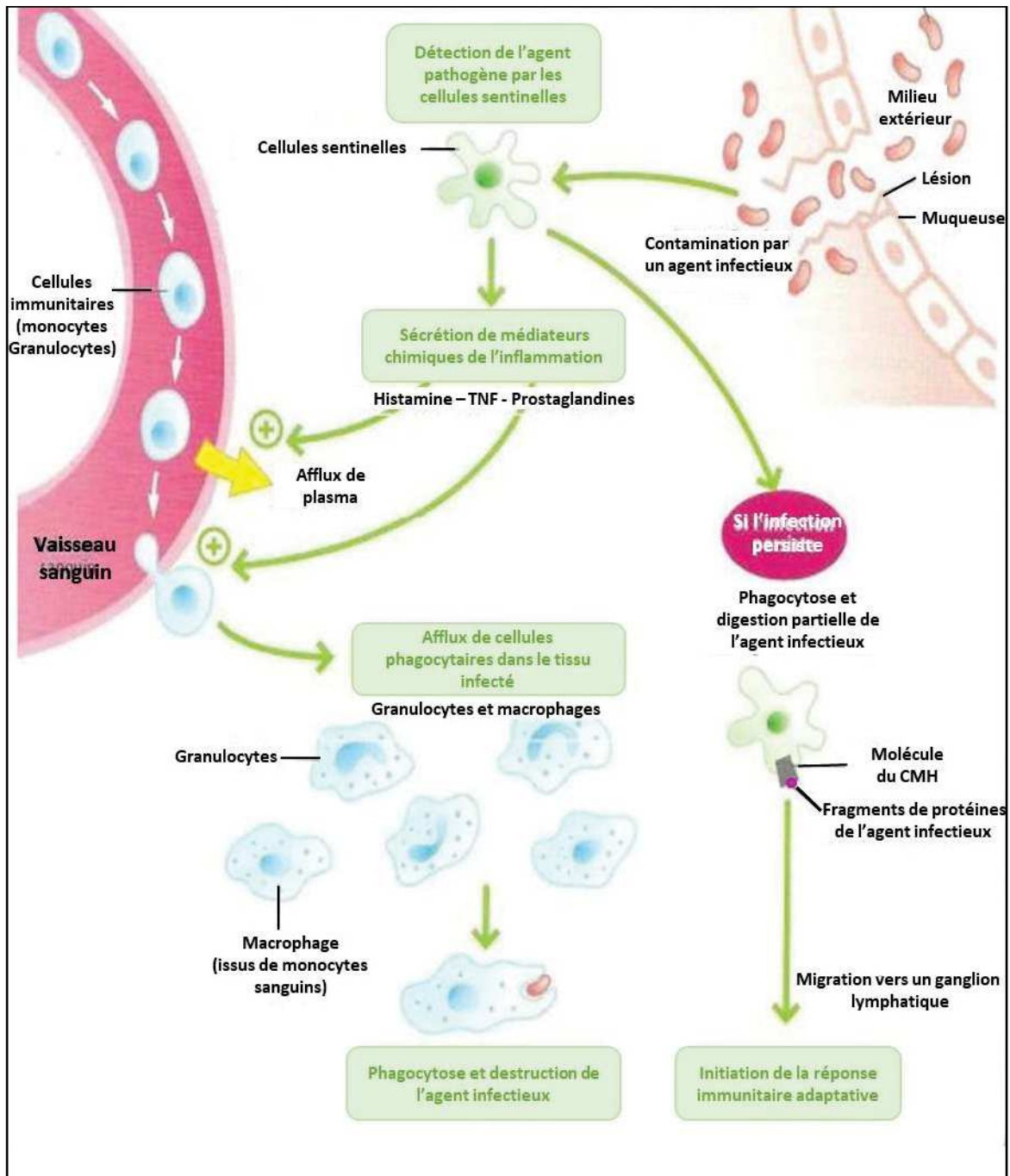


Figure 25 : Schéma récapitulatif de l'inflammation aigüe. Les agents pathogènes sont détectés par les cellules sentinelles qui sécrètent des facteurs jouant dans la vasodilatation (histamine, TNF), les cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages) éliminent les pathogènes par phagocytose. Les macrophages sécrètent des cytokines pour attirer les cellules de la réponse adaptative. La réponse inflammatoire se poursuit jusqu'à l'élimination totale du pathogène et la réparation complète du tissu.

II- Les différents types d'inflammation

1- L'inflammation *AIGUE*

L'inflammation aigüe est une inflammation non spécifique et qui agit très rapidement. Les principaux acteurs sont les cellules capables de détruire l'agresseur, comme les polynucléaires ou les macrophages. Si les mécanismes d'agression sont contrôlés, l'afflux de sang et de cellules locales, va permettre au tissu qui n'est plus agressé de se réparer et le mécanisme de l'inflammation se termine. Par conséquent, cette réponse inflammatoire aigüe se trouve bénéfique pour l'organisme.

De manière générale et succincte, l'inflammation aigüe est un processus comprenant (1) la contamination, (2) l'infection, (3) la détection de l'agent pathogène, (4) la libération des médiateurs chimiques, (5) la vasodilatation avec une augmentation de la perméabilité vasculaire, suivi (6) d'une diapédèse avec le passage des neutrophiles à travers la paroi des cellules endothéliales, (7) le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation, (8) la libération des médiateurs chimiques (chimiokines et cytokines) par les neutrophiles nécrotiques, assurant l'arrivée des macrophages sur le site. Ces derniers vont nettoyer les débris cellulaires et les neutrophiles nécrotiques (efferocytose) **Figure 25**. L'arrivée des phagocytes mononuclés va induire la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, IL-1, TNF α), (9) et se poursuit par une phase de réparation après élimination de l'agent infectieux.

Dans la phase de réparation, la réponse inflammatoire est limitée dans le temps par la mise en place d'un système contrôlant la phase d'amplification (cytokines anti-inflammatoires, anti-protéases, anti-radicaux libres). L'action complémentaire des cellules telles que : les macrophages et les fibroblastes, ainsi que des médiateurs de croissance et des cytokines, participe au remodelage du tissu.

Toutefois, l'efficacité des systèmes de contrôle et de réparation détermineront l'évolution du processus inflammatoire. Clairement, si l'inflammation n'est pas contrôlée (hyper activation des cellules inflammatoires, sécrétion intense de médiateurs pro-inflammatoires, défaut de retour au calme), l'inflammation perdure, s'auto-entretient, et dès lors, devient chronique. De plus, si les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans la réaction inflammatoire aigüe, ce sont les macrophages qui sont au centre de la réaction inflammatoire chronique.

2- L'inflammation CHRONIQUE

L'homéostasie tissulaire est régulée par une balance sensible entre le recrutement, la prolifération, la migration et la mort des cellules impliquées. Une dérégulation de cette balance conduit à une réponse inflammatoire soutenue entraînant une inflammation chronique irréversible (Lawrence and Gilroy, 2006).

Par ailleurs, selon les types d'acteurs de l'immunité (innée ou adaptative) qui sont en cause, des maladies dites auto-immunes se développent portant préjudice à l'intégrité du « soi » et à sa survie. L'immunité innée et l'immunité adaptative seront traitées dans le deuxième chapitre.

Les maladies auto-inflammatoires par exemple sont représentatives d'un dysfonctionnement des premières lignes de défense du corps (l'immunité innée), dont la nature est similaire quelle que soit la menace. Certaines maladies auto-inflammatoires, très rares peuvent causer des fièvres permanentes, des gonflements des membres ou une arthrite. Citons comme exemple « la fièvre méditerranéenne familiale ». Toutefois, cette pathologie est associée à des mutations d'un gène codant pour une protéine appelée marénostrine ou pyrine. Et lorsque les cellules de la lignée myélomonocytaire s'activent, elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 (IL-1) (Ozen et al., 2009) ; (Georgin-Lavialle et al., 2018).

Je vais à présent me focaliser, sur les maladies dites auto-immunes comme : la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), la raison étant que ces maladies inflammatoires chroniques font actuellement l'objet d'études cliniques de phase II avec la drogue ABX utilisée dans mes travaux de recherche ; d'où mon intérêt de présenter succinctement ces maladies.

Les maladies auto-immunes, concernent plutôt l'immunité qui est spécifique du danger présent (immunité adaptative), et qui prend le relais de l'immunité innée, devenue insuffisante. Bien que l'immunité sera développée plus loin, il me semble opportun ici de rappeler succinctement l'immunité adaptative pour une meilleure compréhension de la suite de mon développement. L'immunité adaptative est basée sur la détection d'antigènes, des molécules dites du « non soi », par des cellules qui portent des récepteurs spécialisés et uniques. Grâce à cette réponse spécifique, le système immunitaire se focalise alors sur le ou les antigènes détectés pour cibler l'agent pathogène qui aurait franchi la barrière de l'immunité innée. La réponse adaptative se traduit alors, par une prolifération de clones de lymphocytes spécifiques de l'antigène et une

production massive d'anticorps reconnaissant les antigènes cibles qui persistent dans l'organisme. La capacité de mémoire de cette immunité, va permettre lors d'une seconde infection par le même pathogène d'avoir la particularité de générer une réponse plus rapide et plus efficace ; et de développer également une immunité à long terme (Bonilla and Oettgen, 2010).

Concernant les maladies auto-immunes, les plus connues sont : le diabète de type 1, la sclérose en plaque et la polyarthrite rhumatoïde. Ces maladies auto-immunes ne seront pas toutes décrites, contrairement à **la polyarthrite rhumatoïde (PR)**. D'après Marie-Christophe Boissière (Professeur Directeur de l'Unité Inserm U1125 à l'université Paris13) la PR est devenue une maladie modèle pour la recherche sur l'inflammation chronique. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie qui touche les articulations qui se détruisent progressivement, entraînant un handicap.

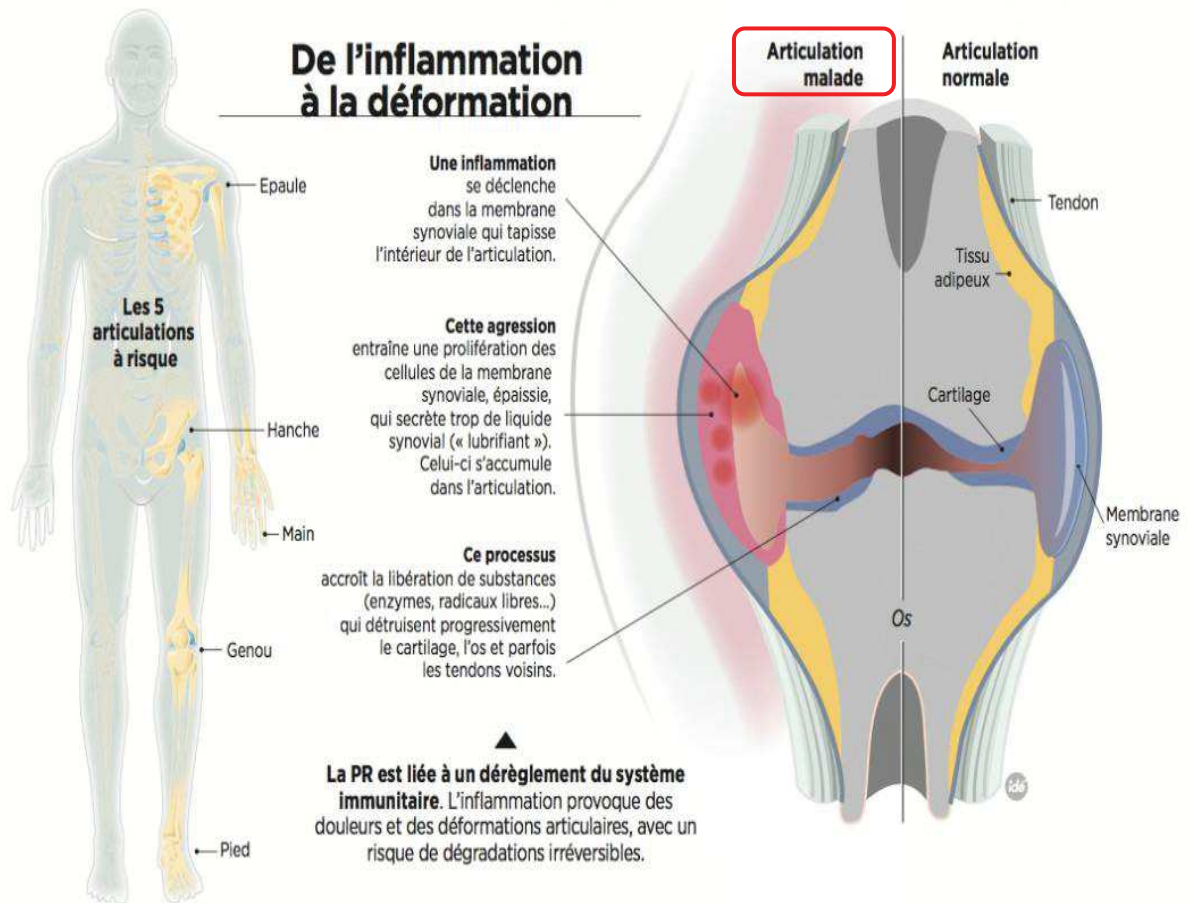


Figure 26 : La Polyarthrite Rhumatoïde (PR). Cette maladie inflammatoire auto-immune touche les articulations. Le système immunitaire se dérègle complètement avec l'apparition d'auto-anticorps, de cytokines pro-inflammatoires, qui s'attaquent aux cartilages, à l'os et aux tendons voisins. Une inflammation chronique se met en place avec une agression de la membrane synoviale, qui tapisse l'articulation qui se trouve dès lors agressée en premier lieu par le système immunitaire. Les femmes sont davantage touchées (4 femmes pour 1 homme). Même si toutes les tranches d'âges peuvent être atteintes, il y a un pic entre 40 et 50 ans.

Après plusieurs années, l'évolution d'une polyarthrite rhumatoïde peut conduire à des déformations articulaires et des destructions tendineuses **Figure 26**. Il semblerait que la prévalence soit de l'ordre de 0,5% et bien que cette maladie chronique puisse survenir à tout âge, elle serait plus fréquente entre 40 et 60 ans avec une prédominance féminine. Le professeur Boissière, mentionne que des atteintes extra-articulaires peuvent apparaître et toucher les poumons, le cœur, les nerfs, et par conséquent, entraîner une surmortalité. Il faut savoir que la polyarthrite rhumatoïde se caractérise par une infiltration de très nombreuses cellules inflammatoires (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes et des polynucléaires neutrophiles).

D'une manière générale, les principaux acteurs de l'inflammation chronique sont les macrophages (Sigaux et al., 2018), les lymphocytes et les fibroblastes. Ces cellules inflammatoires vont détruire le cartilage et l'os autour de l'articulation ce qui conduit à une fragilisation des tendons et des ligaments qui peuvent se rompre. Le professeur Boissière indique également que l'auto-immunité de la maladie se caractérise par le dérèglement du système immunitaire et l'apparition d'auto-anticorps. Une sous-population de lymphocytes T (lymphocytes T régulateurs) qui, habituellement contrôlent la réponse immunitaire se trouve en activité insuffisante.

En fait, le système immunitaire inné est stimulé de façon aberrante. Des molécules de communication intercellulaires comme les cytokines pro-inflammatoires : IL-6, IL-1, IL-17, et le TNF α sont produites en abondance, induisant une inflammation et la destruction tissulaire. L'implication des cytokines est largement démontrée dans les maladies inflammatoires chroniques (Noack and Kolopp-Sarda, 2018).

Certes, il existe des traitements pour la polyarthrite rhumatoïde, toutefois, les traitements comme les corticoïdes, les immunosuppresseurs (traitements pour réduire l'inflammation et les désordres immunitaires), des anticorps monoclonaux et des traitements qui ciblent des kinases ont été développés (Noack and Miossec, 2017). Mais d'après Mélissa Nowacki (de l'unité génomique et inflammation de l'hôpital Edouard Herriot, Paris), je cite : « ... Toutefois, une grande hétérogénéité est présente chez les patients, et influe sur la réponse aux traitements. Il faut donc développer de nouvelles stratégies pour fournir une médication personnalisée... ».

Parmi les maladies inflammatoires chroniques, il existe également les **Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)** regroupant la **maladie de Crohn** et la **rectocolite hémorragique** (appelé aussi colite ulcéreuse). Ces pathologies sont multifactorielles, elles sont liées à des mutations génétiques mais également à la perte de l'homéostasie des germes commensaux (microbiote). Ces maladies inflammatoires de la paroi d'une partie du tube digestif sont en partie liées à une hyperactivité du système immunitaire digestif (Duclos, 2017).

Par conséquent, l'activation excessive de la réponse immunitaire se traduit par une augmentation du taux de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, CXCL8) sécrétées par les cellules épithéliales et les macrophages, au lieu de l'IL-10 et le TGF- β (cytokines physiologiques, immunosuppressives) (Kökten et al., 2016). L'action conjointe entre les cytokines pro-inflammatoires, et les antigènes pathogènes reconnus par les cellules dendritiques induiront la synthèse de l'IL-12 (cytokine pro-inflammatoire) et les Lymphocytes T CD4 naïfs (LT CD4 n'ayant pas rencontré l'antigène) vont se différencier en lymphocytes T helper effecteurs (Th17, Th1 et Th2). Ces lymphocytes T effecteurs amplifient dès lors l'inflammation en sécrétant à leur tour des cytokines comme l'IFN- γ , le TGF- β , l'IL-4 et l'IL-17 (Mowat, 2003). Ce processus va amplifier et maintenir l'inflammation dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Bien qu'il existe des traitements anti-inflammatoires qui permettent de contenir l'inflammation, il n'existe toujours pas de traitement curatif. En effet, ces traitements permettraient de réguler l'immunité et de réduire l'inflammation à long terme. Et les cytokines comme vu précédemment, sont devenues des cibles importantes pour de nouvelles thérapies. Citons de nouveau les anti-TNF α (Neurath, 2017) et les anti-IL-12/IL-23 (Niederreiter et al., 2013). Ces médicaments bloquent spécifiquement les médiateurs cytokiniques impliqués dans ce type d'inflammation. Selon le professeur Pierre Desreumaux, directeur de l'unité INSERM 995 (équipe maladies inflammatoires digestives), environ 70% des patients répondent bien aux traitements. Toutefois, chez la moitié d'entre eux, l'efficacité s'altère au bout de deux ans, nécessitant de changer de molécule.

L'amélioration des traitements a permis l'existence des nouvelles générations d'immunorégulateurs spécifiques de l'intestin que sont, les anticorps monoclonaux. Ces anticorps monoclonaux se lient spécifiquement à des molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules immunitaires du sang, empêchant leur passage dans le tube digestif. Toutefois, il existe des individus résistants aux traitements pour qui, seul un traitement chirurgical s'avère efficace. Pierre Desreumaux explique qu'après 10 ans d'évolution de leur maladie, plus d'un patient sur deux a subi une intervention chirurgicale.

Voilà les raisons pour lesquelles les enjeux de la recherche restent importants pour l'amélioration par exemple des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et de la polyarthrite rhumatoïde. Les essais cliniques de phase II initié par la société ABIVAX, montrent à ce jour que la drogue ABX pourrait-être l'une des nouvelles thérapeutiques (Communiqué de presse, ABVAX PARIS, France, du 16 mars 2020).

Abordons à présent pour une meilleure compréhension le système immunitaire. Comme mentionné précédemment, selon le type d'acteur de l'immunité (innée ou adaptative) qui est en cause, des maladies dites auto-immunes se développent portant préjudice à l'intégrité du « soi » et à sa survie.

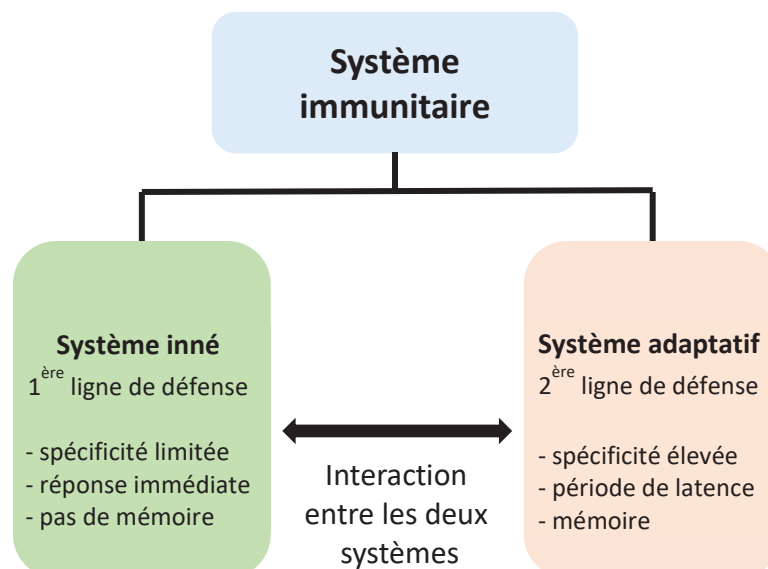
Chapitre 2

Généralités sur l'immunité

...Mais avant tout remontons dans le temps...

C'est à la fin du XIXe siècle, qu'Elie Metchnikoff établit un lien entre l'immunité et l'identité du « soi » (Mečnikov, 1901), il plaçait l'inflammation et non la défense au cœur de l'immunité. En fait, il n'assimilait pas l'identité de l'organisme et la défense de son intégrité. Pour lui, l'organisme ne définit pas son identité par sa préservation contre toute influence étrangère, mais par un échange constant entre l'intérieur (l'organisme lui-même) et l'extérieur (l'environnement) (Mečnikov, 1901). Or, c'est précisément l'assimilation de l'immunité et de la défense de l'intégrité qui est devenue caractéristique de la notion du « soi » avec les travaux de Franck M. Burnet. En effet, Franck M. Burnet est l'un des principaux investigateurs qui explique comment les lymphocytes ciblent les antigènes pour les détruire. Le modèle du « soi » et du « non soi » par Burnet, est qu'un organisme déclenche une réaction immunitaire contre toute entité qui lui est étrangère (« non soi »), alors qu'il tolère toute entité qui lui est propre (« soi ») (Immunologists, 1951).

Le diagramme synthétique ci-dessous, récapitule les caractéristiques et les différences entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif (adapté d'un séminaire « inflammation et maladies » de Ketty Schwartz).



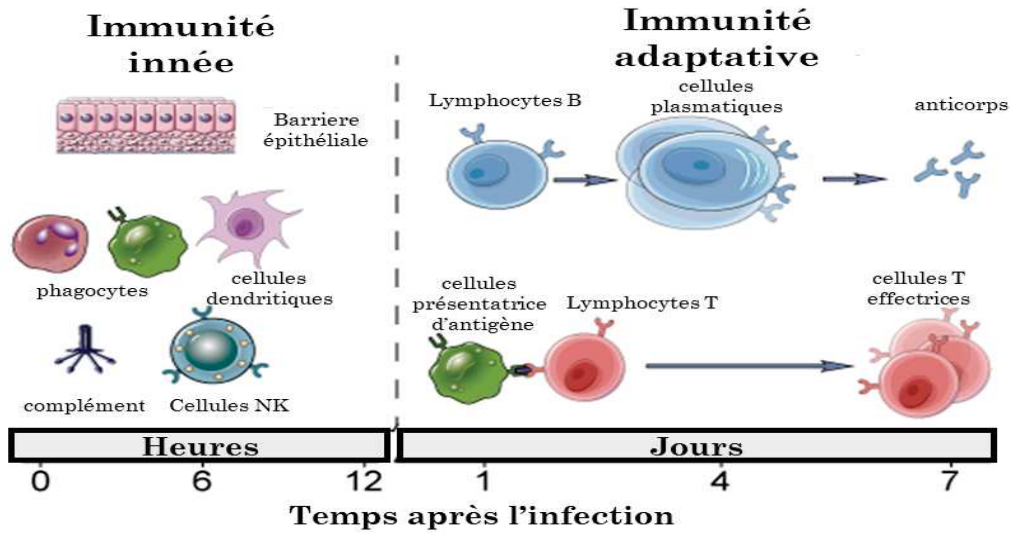


Figure 27 : Les mécanismes de l'immunité innée et adaptative. Les mécanismes de l'immunité innée assurent la défense initiale contre les infections. Certains mécanismes empêchent les infections (barrière épithéliale), tandis que d'autres les éliminent (les phagocytes, les cellules NK). La réponse immunitaire adaptative se développe plus tardivement ; elle est assurée par les lymphocytes. Les lymphocytes T éliminent les agents infectieux intracellulaires.

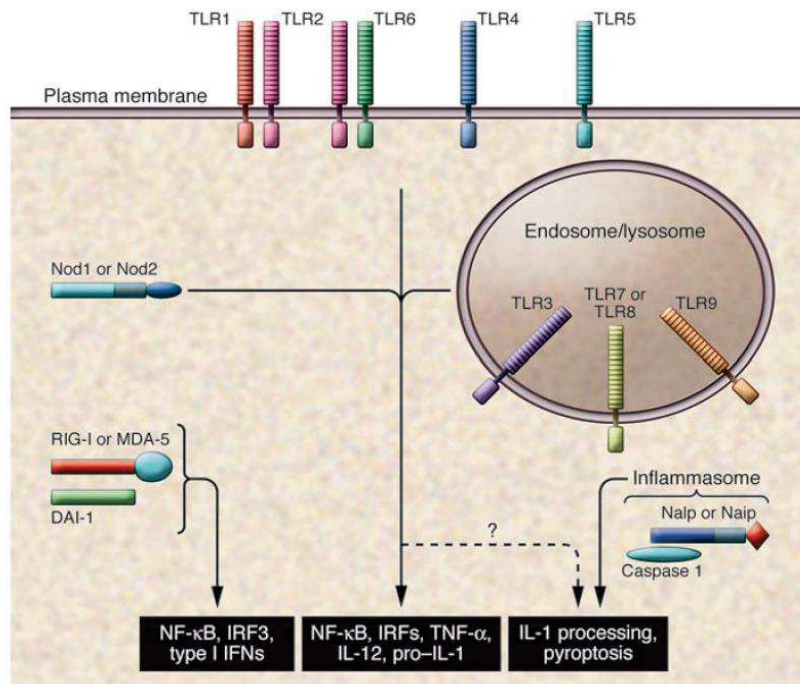


Figure 28 : Représentation schématique de la famille des « Pattern Recognition Receptor » (PRR) au sein du système immunitaire inné. (D'après Gregory M. Barton, 2008). Les « Toll-Like Receptors » (TLR) sont des récepteurs transmembranaires, tandis que les Nods, Naips, Nalps, RIG-I, MDA-5 et DAI-1 sont des capteurs d'acides nucléiques (je ne discuterai pas de ces facteurs) et se trouvent dans le cytosol. La plupart des PRR activent des facteurs de transcription communs et induisent l'expression des gènes pro-inflammatoires. Les membres de la famille Nalp et Naip contrôlent l'activité de l'inflammasome qui est un complexe multiprotéique responsable de la synthèse de l'IL-1.

I- Le système immunitaire *INNE*

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme contre un agent pathogène. Elle fait intervenir des cellules effectrices telles que : des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), des cellules « Natural Killer » (NK), des granulocytes (mastocytes, éosinophiles et basophiles) et des phagocytes (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques) **Figure 27**. Ces cellules ont pour mission de détecter le danger dû à un pathogène avant que les effecteurs de l'immunité adaptative n'aient le temps de répondre spécifiquement.

Cette fonction est remplie par plusieurs familles de couples ligands-récepteurs, parmi lesquels les « Pattern Recognition Receptor » (PRR). Par exemple, le LipoPolySaccharide (LPS) et le peptidoglycane provenant des parois cellulaires des bactéries à gram négatif et gram positif. Les PRR sont impliqués dans de multiples aspects du système immunitaire (Janeway, 2013). Ils peuvent fonctionner comme des récepteurs transmembranaires comme par exemple, le récepteur du mannose (MR ou CD206) et la dectine 1 (Fraser et al., 1998). Cependant, les plus pertinents pour l'initiation de l'inflammation sont : les PRR qui lient la reconnaissance microbienne aux signaux pro-inflammatoires. Ces PRR regroupent les Récepteurs « Toll-Like » (TLR) **Figure 28**, la plus ancienne famille de protéines transmembranaires (Akira et al., 2001). Notez que, je ne discuterai pas des facteurs Nod, RIG, MDA (représentant les capteurs des acides nucléiques).

Ces PRR reconnaissent des motifs moléculaires exprimés par de nombreux agents infectieux, ou « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMP). Ainsi, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Mellman and Steinman, 2001) reconnaissent ces PAMPs comme des structures étrangères, et déclenchent une réponse de l'hôte en activant l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-12, TNF α) ainsi que des molécules de co-stimulation. Ces événements précèdent la réponse immunitaire adaptative (Akira et al., 2001) ; (Medzhitov, 2001). Les PAMPs sont des récepteurs activateurs. Par conséquent, cela suggère que, s'il existe un déséquilibre entre les PAMPs et l'activité des TLR, alors, l'équilibre de l'intégrité des fonctions biologiques de l'organisme est en danger, provoquant des dysfonctionnements **Figure 29**.

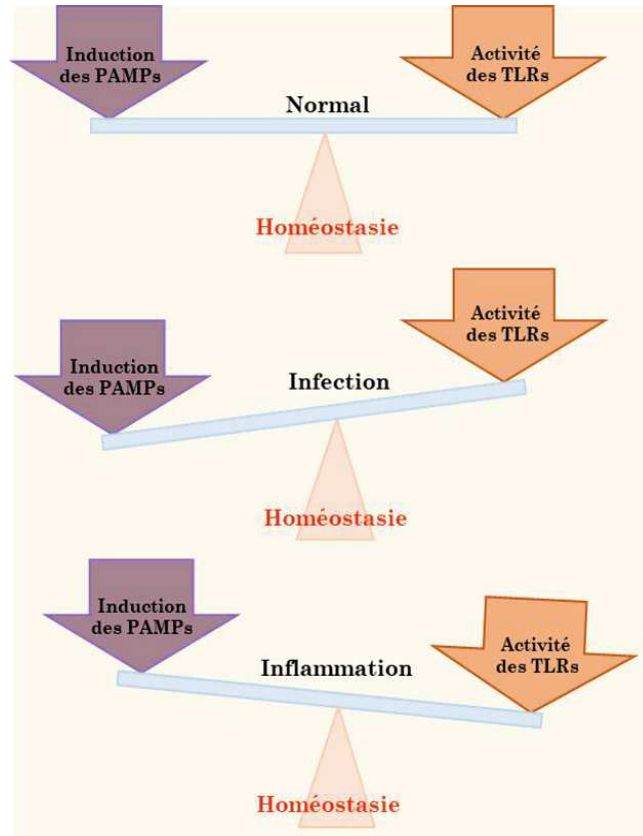


Figure 29 : Interaction homéostatique entre les bactéries commensales de l'intestin (microbiote) porteur de « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMPs) et les « Toll-Like Receptors » (TLR) d'après (Yesudhas et al., 2014). Les TLR jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du tissu intestinale. Dans l'intestin, les TLR sont à proximité et peuvent être stimulés par le microbiote. Par conséquent, il est nécessaire de réguler leurs fonctions. Dans les conditions normales, l'homéostasie entre l'induction bactérienne et l'activation des TLR est maintenue pour garantir un statut normal (soit sans inflammation, ni infection). Cependant, si les TLR sont activés de manière inappropriée, voire s'ils induisent une réponse immunitaire exagérée, alors cela aboutit à une infection bactérienne. Par ailleurs, si l'activité des TLR est insuffisante, cela peut aboutir à des maladies inflammatoires voire des cancers.

Comme présenté plus haut, dans le cas d'une réponse inflammatoire des cellules épithéliales de l'intestin et les signaux inflammatoires sont à l'origine d'interactions complexes entre les bactéries commensales (microbiote) et les TLR (Yesudhas et al., 2014).

De plus, il existe une seconde catégorie représentée par : le récepteur du mannose, les récepteurs « scavenger », le récepteur du Fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines, ou les récepteurs du complément. Cette catégorie est la plus spécialisée dans la phagocytose et l'élimination des agents susceptibles de déclencher une réponse inflammatoire (Gibot, 2004). Par conséquent, l'activation des TLR va permettre une réponse inflammatoire.

Le ligand LPS est classiquement utilisé pour simuler l'inflammation des macrophages issus de monocytes humains. Le LPS se lie au récepteur TLR4 présent à la surface des macrophages et des cellules dendritiques ; ce qui permet de déclencher une cascade de signalisation intracellulaire (Poltorak et al., 1998) ; (Medzhitov, 2007). A l'issue de cette cascade intracellulaires, il en résulte une production protéique de médiateurs pro-inflammatoires (Nathan, 2002). En effet, l'activation des TLR va permettre d'une part (1) l'inflammation avec la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-12, IL-8) ; et d'autre part (2) une réponse antivirale avec la production par exemple d'IFN α et d'IFN β , suivie de l'activation de l'immunité adaptative.

La description des TLR est nécessaire pour une meilleure compréhension.

1- Les Récepteurs "Toll-Like" (TLR)

Toll est un gène de drosophile essentiel pour l'ontogenèse et la résistance antimicrobienne. Par ailleurs, après la caractérisation du premier TLR (TLR4) plusieurs homologues de *Toll* ont été identifiés et clonés chez les vertébrés ; ils ont été nommés les « Toll-Like Receptors » (TLR) (Takeda, 2004). De ce fait, les TLR des mammifères (10 molécules chez l'homme et 11 chez la souris) présentent les mêmes spécificités structurales que la molécule Toll de la drosophile.

Les TLR sont des récepteurs conservés, ils appartiennent aux protéines transmembranaires (glycoprotéines) localisées à la surface des cellules du système immunitaire et sur des cellules ayant un contact avec le milieu externe (cellules de l'épithélium pulmonaire, cellules intestinales et des cellules de la peau).

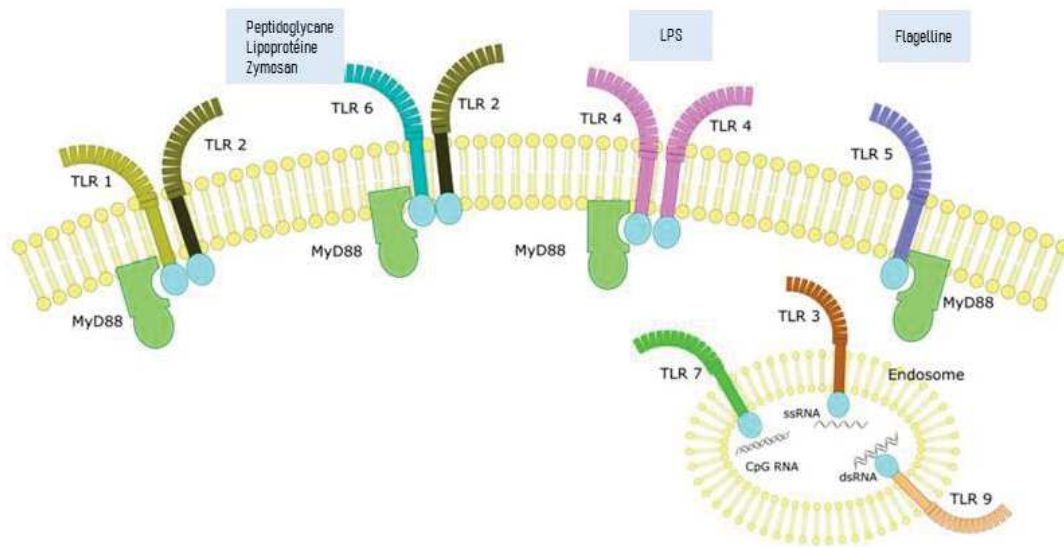


Figure 30 : Représentation schématique de la famille des TLR. Les TLR1-TLR7 et TLR9 ont été caractérisés pour reconnaître les composants microbiens. Le TLR2 est essentiel pour la reconnaissance de lipopeptides microbiens. Les TLR1 et TLR6 s'associent aux TLR2 et distinguent subtilement les lipopeptides triacylés des diacylés. Le TLR4 reconnaît le LPS. Le TLR9 est le récepteur des ADN non méthylés, tandis que le TLR3 est impliqué dans la reconnaissance de l'ARN viral. Le TLR5 est un récepteur de la flagelline. Ainsi, la famille des TLR fait la distinction entre des modèles spécifiques de composants microbiens.

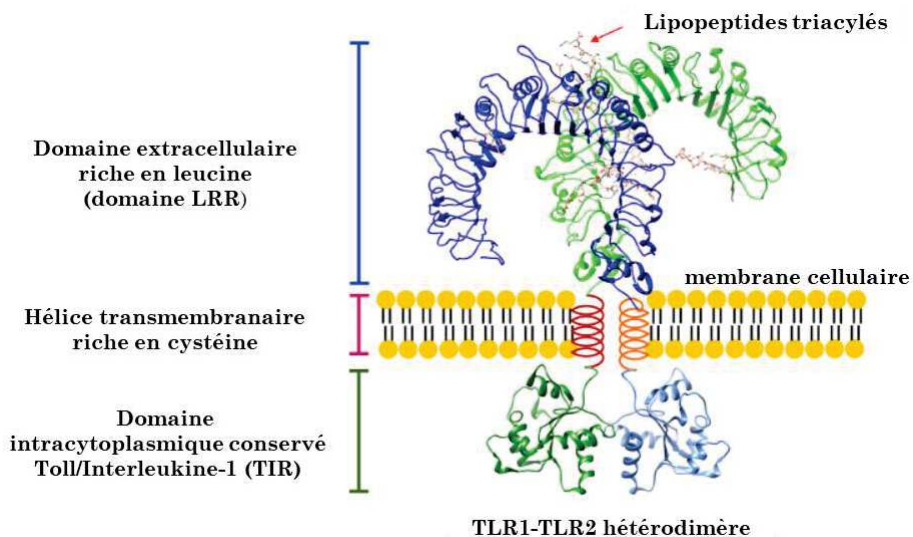


Figure 31 : Structure représentative du TLR (d'après Gao et al., 2017) Les TLR sont composés d'un domaine extracellulaire riche en leucine (domaine « Leucine Rich Repeat » LRR), d'une hélice transmembranaire riche en cystéine et d'un domaine intracytoplasmique Toll/Interleukine-1 (TIR).

D'autres TLR, se trouvent dans une localisation intracellulaire (dans la membrane de l'endosome) (Takeda, 2004) **Figure 30**. Les TLR sont composés de trois éléments structurellement importants (Gao et al., 2017). En effet, ils sont constitués (1) d'un domaine extracellulaire riche en Leucine (domaine LRR : « Leucine Rich Repeat ») pour la reconnaissance à l'extrémité N-terminale, (2) d'une hélice transmembranaire riche en cystéines (Takeda and Akira, 2015) ; (Gao et al., 2017), (3) d'un domaine intracytoplasmique conservé appelé : Toll/Interleukin-1 (domaine TIR) faisant référence à la similarité entre les domaines cytoplasmiques des TLR et du récepteur à l'IL-1 qui, par son extrémité C-terminale permettra le signal de transduction **Figure 31**.

Par conséquent, chaque type de TLR peut se lier sélectivement à un type de molécules (ligands). Ces agonistes peuvent être endogènes ou exogènes. La localisation des molécules TLR est associée à la nature des ligands qu'elles reconnaissent.

Ainsi, les récepteurs TLR 1, 2, 4, 5 et 6, exprimés à la surface des cellules, reconnaissent des composés microbiens protéiques ou lipidiques qui sont donc exogènes. A l'inverse, les récepteurs TLR 3, 7, 8 et 9 reconnaissent des acides nucléiques et sont localisés dans les endosomes / lysosomes des cellules hôtes (Gay et al., 2014).

Les acides nucléiques de l'hôte ne sont jamais présents dans l'endosome et ne peuvent donc pas activer les PRR de sa propre cellule. Par ailleurs, les cellules dendritiques possèdent un très large répertoire de TLR en relation avec leur fonction de cellules sentinelles. Ce sont les seules à exprimer le TLR3 qui est impliqué dans la reconnaissance virale (Takeda, 2004).

Tableau 4 : Agonistes microbiens de la famille des récepteurs TLR

Familles de TLR	Agonistes microbiens
Récepteurs membranaires	Ligands lipidiques ou protéiques
TLR 1 (+ TLR 2)	Lipopeptides Triacylés (bactéries)
TLR 2	Lipoprotéines (nombreux pathogènes) Peptidoglycanes (bactéries Gram positif) Zyosan (levure et autres champignons)
TLR 4	LipoPolySaccharide (= LPS) (bactéries à gram négatif) protéines virales
TLR 5	Flagelline (bactéries flagellées)
TLR 6 (+ TLR 2)	Lipopeptides Diacylés (mycobactéries)
TLR 11 (chez la souris)	Protéines de bactéries uropathogènes Protéine profiline (<i>Toxoplasma gondii</i>)
Récepteurs endosomaux	Ligands nucléiques
TLR 3	ARN double brin (virus)
TLR 7 et TLR 8	ARN simple brin (virus)
TLR 9	ADN non méthylé (= motif CpG) (bactéries)

Finalement, les agonistes des récepteurs TLR des mammifères peuvent être des ligands lipidiques, protéiques voire des ligands nucléiques comme le montre le **Tableau 4**.

Somme toute, quand un agent pathogène pénètre dans l'organisme, un ou plusieurs TLR présents à la surface des cellules immunitaires (macrophages et cellules dendritiques) s'associent aux molécules étrangères. Pour comprendre le fonctionnement des TLR, il faut identifier les molécules qui transmettent les signaux des récepteurs TLR activés à la surface cellulaire vers le noyau (transduction du signal), favorisant ainsi l'expression de gènes pro-inflammatoires. Cette cascade d'évènements intracellulaires fait intervenir un grand nombre de protéines. Ce réseau complexe constitué d'adaptateurs moléculaires, de protéines kinases, de facteurs de transcription constituent « les voies de signalisation » des TLR (Takeda, 2004).

Les voies de signalisations que les récepteurs TLR induisent, sont précisément décrites dans la revue de Takeda (Takeda, 2004).

Toutefois, il est important de rappeler ici, que c'est le domaine intracytoplasmique conservé « domaine Toll / Interleukin-1 (TIR) » des TLR qui, par son extrémité C-terminale permettra le signal de transduction. Il y a en aval du domaine TIR, un TIR domaine contenant une protéine adaptatrice appelée MyD88 (pour « **My**eloid **D**ifferentiation factor **88** »). Cette protéine adaptatrice MyD88 a d'abord été caractérisée pour jouer un rôle crucial, et les preuves accumulées indiquent que les voies de signalisation de tous les TLR sont dépendantes de la molécule adaptatrice MyD88 (Akira, 2001).

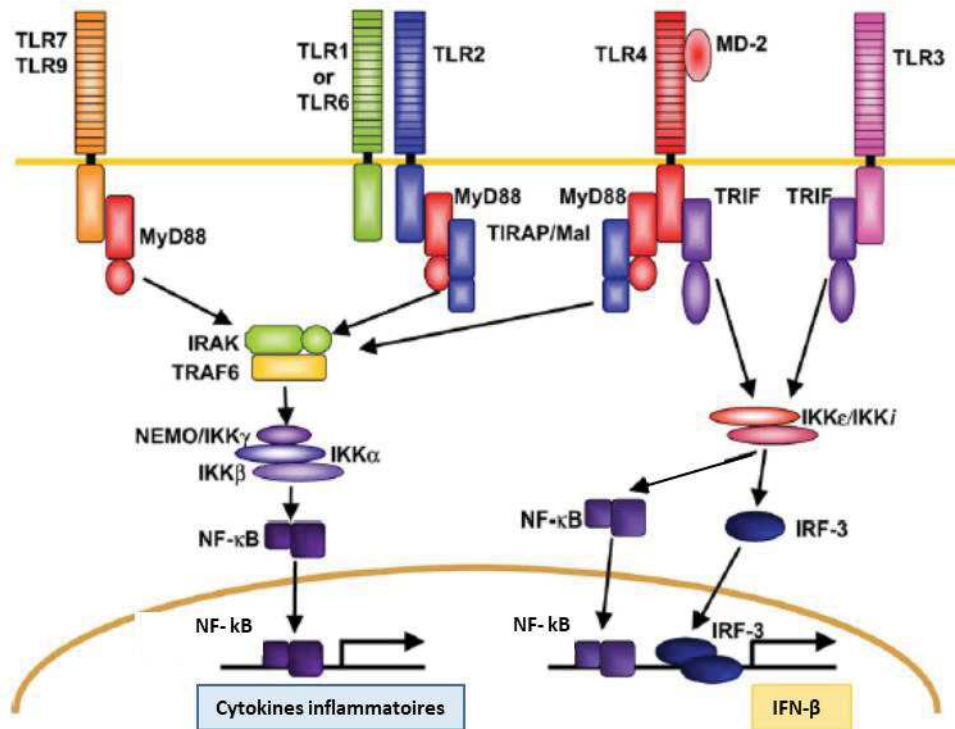


Figure 32 : Les voies de signalisation des « Toll-Like Receptor » TLR (d'après Takeda, 2004). Le « Myeloid Differentiation factor 88 » (MyD88) est un adaptateur essentiel contenant un domaine « Toll / Interleukin-1 (TIR) qui permet l'induction des cytokines via tous les TLR. Le « TIR MyD88-adaptator like » (TIRAP / Mal) est un deuxième adaptateur contenant un domaine TIR qui permet de médier spécifiquement la voie de signalisation dépendante de MyD88 via TLR2 et TLR4. Dans les voies de signalisation médiées par les TLR3 et TLR4, il existe une voie indépendante de MyD88, qui conduit à l'activation de l'« Interferon Regulatory Factor-3 » (IRF-3) via les inhibiteurs IκB Kinases : IKKε / IKKι. L'adaptateur domaine TIR induisant un IFN (TRIF) TIR sert de médiateur dans cette voie indépendante de MyD88.

En plus de MyD88, il existe d'autres protéines adaptatrices. En effet, la **Figure 32** ci-contre représente les voies de signalisation des TLR. Les deux autres protéines adaptatrices appelées : (1) la protéine d'adaptation du domaine « TIR MyD88-adaptator like » (TIRAP / Mal) et (2) la protéine domaine TIR induisant un IFN (TRIF / TIR) (Horng et al., 2001 ; (Fitzgerald et al., 2001). Ces deux adaptateurs sont remarquables en ce sens qu'ils conditionnent la voie de signalisation médiée spécifiquement par un TLR ; autrement dit, la cascade de signalisation est dès lors spécifique de chaque TLR. Ainsi, les différents TLR activent différents facteurs de transcription [« Nuclear Factor kappa B » (NF-kB), « Interferon Regulatory Factor » (IRF), « Mitogene Activated Protein Kinase » (MAPKs)] ce qui conduit à l'activation des gènes qui permettent de lutter spécifiquement contre les différents pathogènes (synthèse de protéines pro-inflammatoires et d'interferon) (Takeda and Akira, 2004 ; Sun et al., 2015a).

Le facteur de transcription nucléaire NF-kB, est particulièrement important, car il est le maître régulateur de la réponse immunitaire innée (Capece et al., 2018). NF-kB joue un rôle vital pour les macrophages et d'autres cellules de l'immunité innée. En outre, NF-kB orchestre la réponse aux agents pathogènes (Dorrington and Fraser, 2019). Mais il joue également un rôle dans la régulation du sécrétome des cellules immunitaires dans les cas de cancer ; NF-kB serait souvent dérégulé. En effet, Capece et ses collaborateurs, soulignent le rôle de NF-kB comme étant la « plaque tournante » moléculaire reliant l'inflammation et le cancer. Du fait de la sécrétion paracrine des cytokines entre la cellule cancéreuse et le micro-environnement tumoral, le facteur de transcription NF-kB serait à la base de la mécanistique de la malignité cancéreuse (Capece et al., 2018).

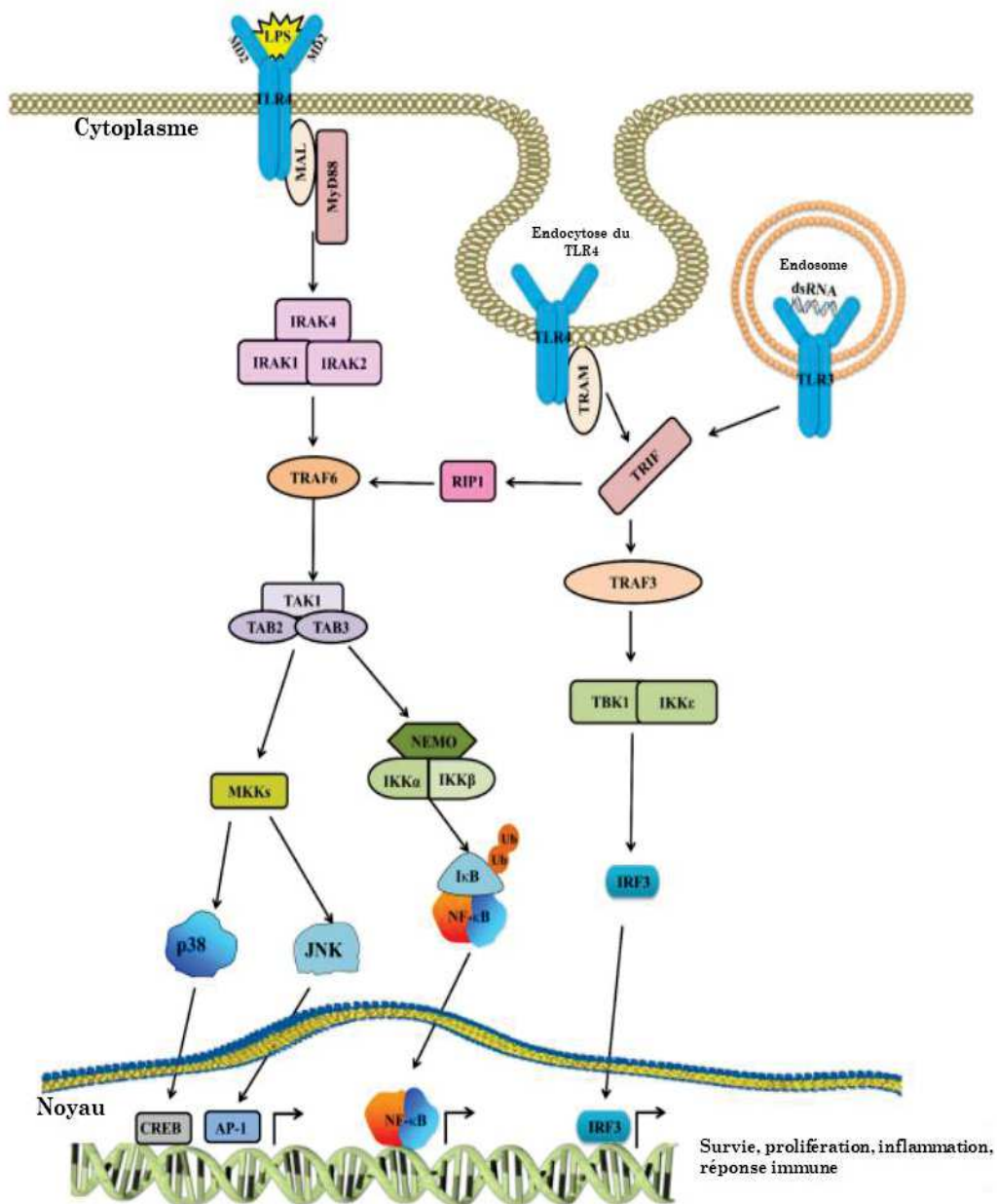


Figure 33 : Voie de signalisation du TLR4 d'après (Yesudhas et al., 2014). Le TLR4 est activé par le LPS. Le CD14 et MD-2 agissent comme des protéines accessoires pour la liaison LPS/TLR4. Le TLR4 se dimérise et recrute en aval des molécules adaptatrices comme MyD88/MAL et TRIF/TRAM pour induire la réponse inflammatoire. MyD88/MAL une fois activé, recrutent et activent IRAK4, TRAF6, TAK1 et les complexes IKK. Tandis que les signaux TRIF/TRAM activent TRAF6/TAK1 et les IKKS via RIP1. En fin, les deux voies convergent au NF-κB. Le complexe NF-κB est maintenu à l'état inactif par l'IκB, qui est à son tour dégradé par le protéasome, ce qui entraîne la translocation du NF-κB dans le noyau. En outre, l'activation de NF-κB, TAK1 permet également de phosphoryler les MAPK pour renforcer la réponse inflammatoire. La voie TRIF/TRAM active non seulement NF-κB mais également l'IRF3 pour induire une réponse antivirale. Ces voies de signalisation vont permettre d'éliminer l'infection.

A présent je vais me focaliser sur le TLR4, parce que le récepteur TLR4 est, le TLR de prédilection dans mon étude avec les macrophages issus de monocytes humains. En effet, dans les méthodes, pour induire l'état inflammatoire des macrophages humains, le récepteur membranaire TLR4 est activé par l'agoniste microbien lipidique : le LipoPolySaccharide (LPS ; constituant de la paroi des bactéries à gram négatif).

2- Le TLR4 et sa voie de signalisation

Le TLR4 est un récepteur essentiel pour la reconnaissance du LPS (Poltorak et al., 1998 ; Hoshino et al., 1999). Il faut noter que le TLR4 n'est pas uniquement retrouvé sur les macrophages issus de monocytes mais il est également retrouvé sur les cellules du tissu adipeux et sur les macrophages du système nerveux central (microglies).

C'est le seul TLR capable de se mouvoir de la membrane plasmique vers les endosomes / lysosomes après liaison au LPS ou d'autres PAMP **Figure 33**. En fait, il se lie aussi bien à MyD88 (quand il est dans la membrane plasmique, provoquant son endocytose) que TRIF (quand il est dans les endosomes, après internalisation) (Park and Lee, 2013).

La protéine de liaison au LPS (LBP) est une protéine soluble qui se lie directement au LPS (Wright et al, 1989) et favorise sa reconnaissance par le « Cluster de Différenciation » CD14 à la surface des cellules immunitaires. Puis le LPS est transféré vers le complexe TLR4 / MD-2 induisant son activation **Figure 33**. Par la suite, le TLR4 se dimérise, ce qui permet de recruter en aval les protéines adaptatrices telles que MyD88 / MAL et TRIF / TRAM pour induire la réponse inflammatoire (Yesudhas et al., 2014).

De manière générale, la signalisation sous l'activation du TLR4 est divisée en deux voies. On distingue d'une part, que, quand le complexe MyD88 / Mal s'est activé, s'ensuit l'activation de « l'IL-1 Receptor Associated Kinase-4 » (IRAK-4), qui, à son tour recrute IRAK-1, qui, après être phosphorylés séquentiellement, interagissent avec le « TNF Receptor Associated Factor-6 » (TRAF6) (Kawai and Akira, 2007).

Notons que, TRAF6 possède une activité ubiquitine ligase (Adhikari et al., 2007), et se trouve être un activateur à la fois des récepteurs au TNF mais également des récepteurs de l'Interleukine -1.

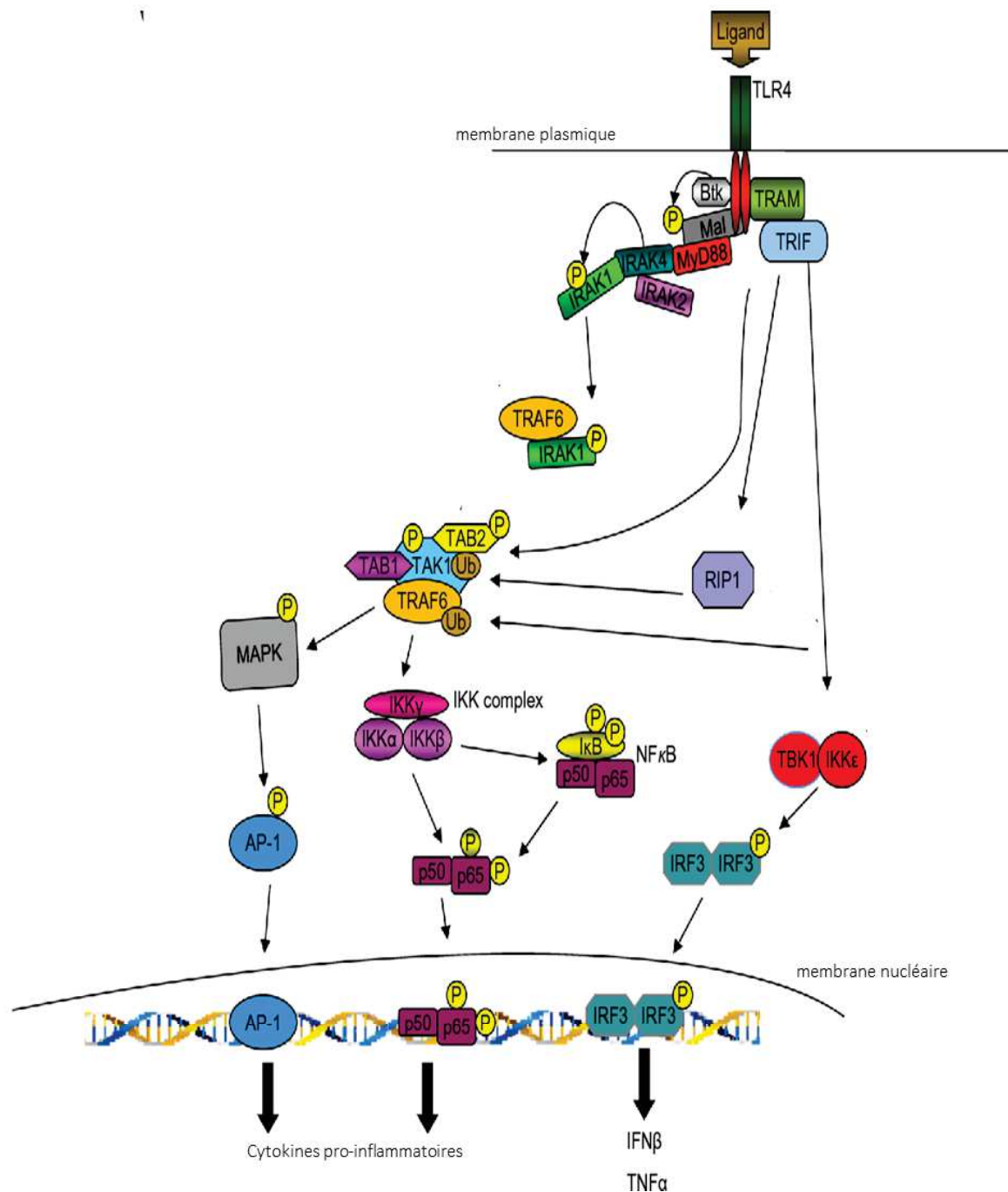


Figure 34 : Vue d'ensemble des voies de signalisation du TLR4 d'après (Noreen and Arshad, 2015). Le LPS (ligand) se lie au TLR4 qui se dimérise et recrute la protéine adaptatrice MyD88 qui active ensuite le NF-κB par la voie IRAKs-TRAF6-TAK1-IKKs, tandis que TRIF active la voie RIP1/TRAF6-TAK1-IKKs.

En outre, TRAF6 est suggéré comme la cible privilégiée de IRAK-1 (Muroi and Tanamoto, 2008), et se trouve indispensable pour l'activation des facteurs de transcription que sont : le NF- κ B et « l'Activator Protein-1 » (AP-1) (Gohda et al., 2004 ; Adhikari et al., 2007).

Il faut également noter que, AP-1 est composé de protéines appartenant à la famille Fos et à la famille Jun (Gazon et al., 2018). Et tout comme le NF- κ B, AP-1 participe également aux divers processus cellulaires comprenant la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Ce complexe moléculaire permet ensuite l'activation du « Transforming Growth Factor- β Activated Kinase-1 » (TAK1) et la famille des inhibiteurs IKKs (ce sont des I κ B-Kinases comprenant NEMO, IKK α , IKK β). Je spécifie que le rôle essentiel de TAK1 dans la réponse innée a été démontré la première fois non pas chez les mammifères mais chez la Drosophile (Vidal et al., 2001), ce qui montre le caractère très conservé de cette TGF- β kinase.

A titre informatif, la **Figure 34** représente de nouveau un schéma récapitulatif de la voie TLR4 d'après (Noreen and Arshad, 2015).

Les signaux TRIF / TRAM, sont transmis par le « Receptor Interacting Protein 1 » (RIP1) à TRAF6 / TAK1 et les IKKs. Après cela, les deux voies convergent vers le « Nuclear Factor kappa B » (NF- κ B). Rappelons que, le facteur de transcription nucléaire NF- κ B est le « maître régulateur » de l'inflammation et son rôle dans l'induction des cytokines (TNF, IL-1, IL-6) permet la régulation de la réponse immune (Capece et al., 2018). Le NF- κ B fait partie d'une famille de facteurs de transcription dimériques essentiels à la coordination des réponses inflammatoires, à l'immunité innée et adaptative, ainsi qu'à la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire dans presque tous les organismes multicellulaires (Gerondakis et al., 2006 ; Chen et al., 2018). De plus, le système de signalisation du NF- κ B est défini par ses interactions entre les régulateurs inhibiteurs I κ B et les complexes protéiques IKK (Mitchell et al., 2016).

Le NF- κ B cytoplasmique est activé par la phosphorylation des inhibiteurs I κ B ; mais une fois phosphorylé, l'I κ B sera polyubiquitinylé et dégradé par le protéasome ; tandis que le NF- κ B subira une translocation dans le noyau pour initier la transcription des gènes de réponse primaire comme par exemple : le TNF et L'IL-1 β (Kawai and Akira, 2007 ; Dorrington and Fraser, 2019).

L'activation du NF- κ B s'enclenche par le recrutement de la protéine TAK1 et de la « TAK1 Binding proteins » (TAB) (Adhikari et al., 2007) ce qui permet de phosphoryler les « Mitogene Activated Protein Kinases » (MAPKs) pour renforcer la réponse inflammatoire (Kawai and Akira, 2007). Les MAPKs comprennent les protéines kinases p38, ERK1/2, et JNK (Sun et al., 2015a).

Par conséquent, la voie TRIF / TRAM active non seulement NF-kB mais déclenche également « L'Interferon Regulatory Factor-3 » (IRF3) pour induire une réponse antivirale notamment avec la synthèse d'InterFéron (IFN) et de « Tumor Necrosis Factor » (TNF).

Somme toute, ces deux voies de signalisation (MAPKs et IκB-Kinases) contribuent à l'éradication de l'infection et jouent un rôle important dans le maintien des fonctions physiologiques normales. Finalement, la plupart des TLR activent le NF-kB par le biais de la voie dépendante de MyD88 et / ou de TRIF (voie canonique) (Lawrence, 2009). MyD88 active NF-kB par la voie IRAKs-TRAF6-TAK1-IKKs, tandis que TRIF active la voie RIP1/TRAF6-TAK1-IKKs (Chen et al., 2018a). L'activation du NF-kB est importante pour induire une réponse immunitaire innée (avec la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, et des molécules d'adhésion). Ultérieurement, cette activation permet l'induction de la réponse immunitaire adaptative.

Notons toutefois, qu'il existe une autre voie indépendante de MyD88 appelée voie alternative activée par le ligand CD40 (CD40L) ou encore par le facteur d'activation des cellules B (BAFF) (Lawrence, 2009). Je ne discuterai de cette voie alternative.

Il existe principalement trois voies de signalisation : NF-kB, MAPK et la voie « Janus Kinases-Signal Transducers and Activators of Transcription » (JAK-STAT). Bien que cette dernière voie, soit l'une des voies critiques dans la pathogénèse et la progression de la polyarthrite rhumatoïde (Malemud, 2018) ; cette voie ne sera pas traitée dans cette thèse.

Toutefois, ces trois voies jouent un rôle majeur dans l'inflammation. En effet, une dérégulation d'une ou plusieurs de ces voies peut conduire à des pathologies associées à des inflammations (Courtois and Israël, 2004 ; Coskun et al., 2011 ; Chen et al., 2018a). De plus, l'inflammation chronique est souvent un élément clé pour l'initiation et la progression pathologique et même dans les cas de cancers (Capece et al., 2018). En effet, le NF-kB serait souvent trouvé dérégulé ; reliant l'inflammation et le cancer (Perkins, 2012 ; Xia et al., 2014).

En résumé, l'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des agents infectieux et pathogènes. Cette immunité met en jeu des modules de défense tels que la phagocytose et la réponse inflammatoire qui nécessite le système des phagocytes mononucléés et des cytokines. La réponse immunitaire innée est induite par un signal de danger émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs du « soi » appelés « Pattern Recognition Receptors »

(PRR) et les molécules du « non soi » appelées « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMP) présent au niveau des micro-organismes. Les PRR sont des groupes de récepteurs, et sont exprimés au niveau des cellules immunes telles que les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les cellules « Natural Killer » (NK), les polynucléaires et les cellules résidentes (fibroblastes, cellules épithéliales). Comme décrit au-dessus, le LPS va se lier au récepteur TLR4 présent à la surface des macrophages et des cellules dendritiques, ce qui permet ainsi, de déclencher une série d'évènements protéiques intracellulaires (activation de protéines kinases, de facteurs de transcription) qui activera tout particulièrement le facteur de transcription nucléaire NF- κ B. Par la suite, la réponse immunitaire innée est induite avec la production de cytokines, de chimiokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion. Ces facteurs solubles que sont les cytokines vont jouer un rôle essentiel dans la modulation du micro-environnement.

Par ailleurs, il existe une autre classe majeure de « Pattern Recognition Receptor » (PRR) intégré dans la défense de l'hôte en complément des TLR, il s'agit des « Nod-Like Receptors » (NLR). Cependant je ferai qu'une brève description de cette autre classe de PRR.

3- Les Récepteurs « Nod-Like » (NLR)

Les « Nod-Like Receptors » (NLR) sont des récepteurs « Pattern Recognition Receptor » (PRR) cytosolique. Contrairement aux TLR qui induisent une réponse transcriptionnelle via l'activation des facteurs de transcription tels que le NF- κ B ou l'IRF3, les NLR se trouvent impliqués dans l'activation d'une caspase inflammatoire, la caspase-1 via la formation d'un complexe multi-protéique appelé l'inflammasome. Les NLR jouent un rôle clé dans l'élimination des pathogènes et la régulation de l'inflammation, en particulier dans les voies suivantes : NF- κ B / MAPK, les IFN-I et la caspase -1. La caspase-1 activée déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β et l'IL-18 (inducteur de la production de TNF, chimiokines et d'IFN- γ), ainsi qu'une mort cellulaire inflammatoire programmée appelée pyroptose (Jamilloux and Henry, 2013). Le mécanisme de sécrétion non conventionnelle contrôlé par la caspase-1, et surtout la rupture de la membrane plasmique due à la pyroptose, permettent la libération de ces cytokines et d'autres facteurs intracellulaires pro-inflammatoires dont l'IL-1 α (Gros Lambert and Py, 2018).

▫ Les inflammasomes

Les inflammasomes sont des plateformes de signalisation multiprotéique assemblées par des récepteurs cytosolique qui détectent les agents pathogènes, ou les dommages subis par la cellule, ils activent la cascade inflammatoire (Jamilloux and Henry, 2013). Trois familles de récepteurs sont décrites comme principaux déclencheurs de l'activation de l'inflammasome : les NLR, les « Aim2-like receptors » (ALR) et les « RIG-I-like receptors » (RLR) (Gros Lambert and Py, 2018). Je ne présenterai pas dans le détail l'ensemble de ces familles. En revanche il faut noter que les inflammasomes sont des complexes tripartites et se trouvent classiquement composés d'un récepteur NLR (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRC4 ou NAIP), d'une protéine adaptatrice « Apoptosis-associated Speck-like Containing a CARD domain » (ASC) et d'une protéine effectrice de la famille des caspases **Figure 35**.

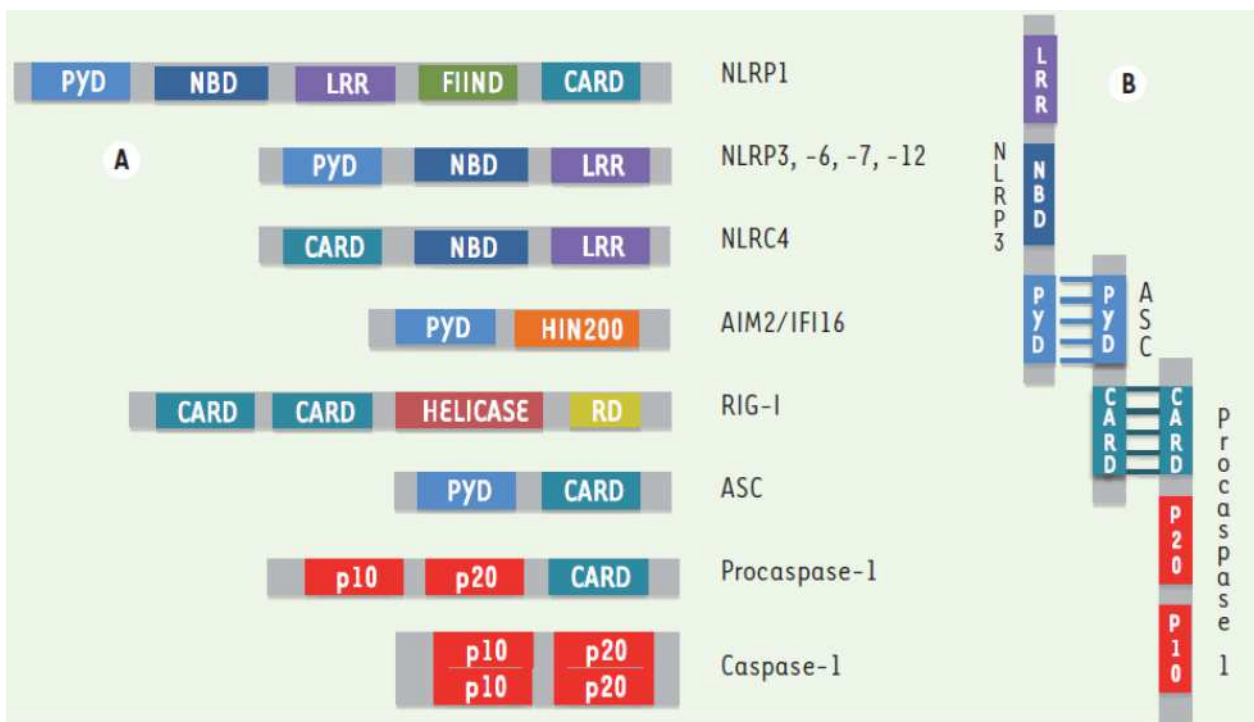


Figure 35 : Structure de l'inflammasome (d'après Jamilloux and Henry, 2013). (A) Structure des domaines composant l'inflammasome. (B) L'inflammasome NLRP3 est composé du récepteur NLRP3, de l'adaptateur ASC et de la procaspase-1. PYD: PYrine Domain; NBD: Nucleotide Binding Domain; LRR: Leucine-Rich Repeats; FIIND: Function to find domain; CARD: Caspase Activation and Recruitment Domain; RD: Repression Domain.

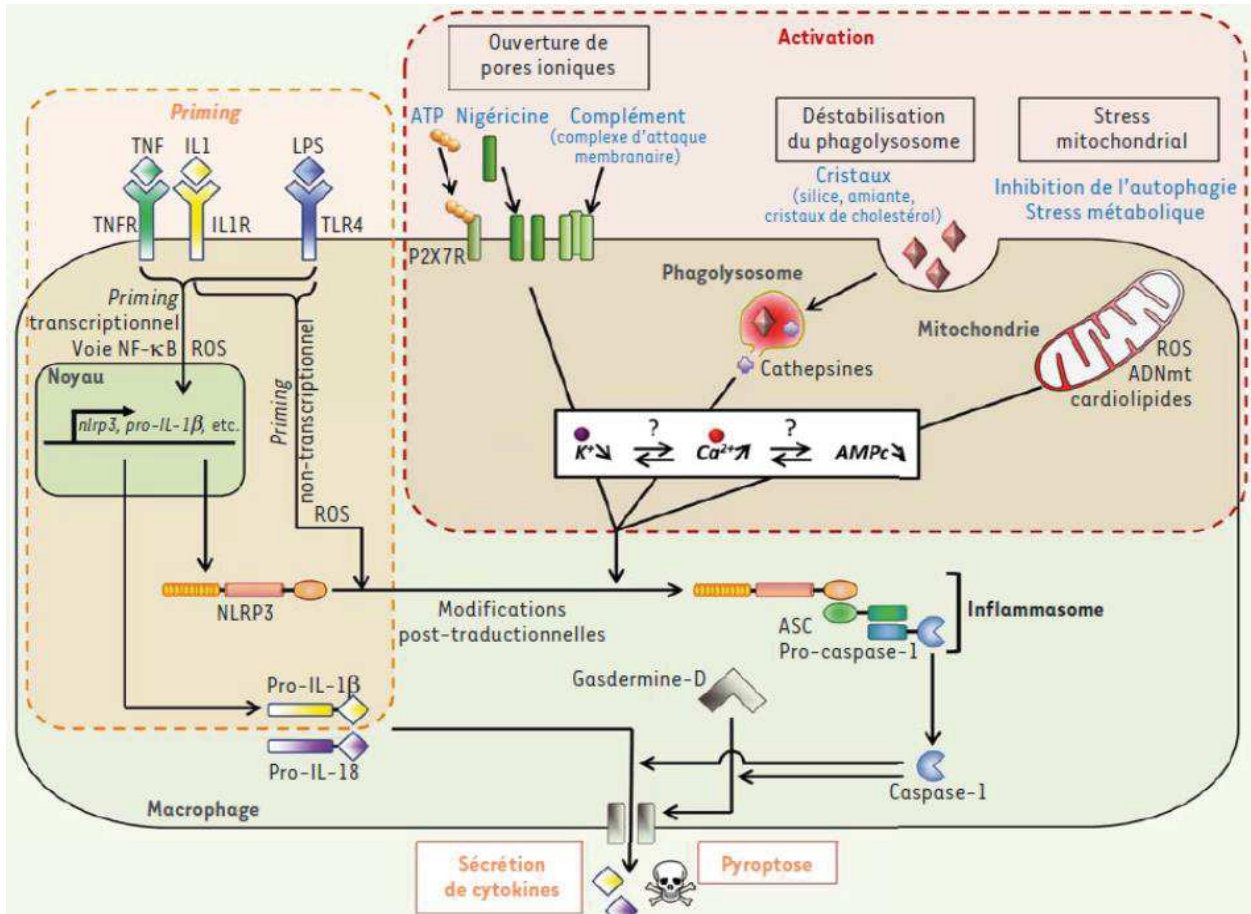


Figure 36: Voies de signalisation contrôlant l'assemblage de l'inflammasome (d'après Gros Lambert and Py, 2018). Le « priming » de NLRP3 dépend de l'activation d'autres récepteurs de l'immunité innée ou de récepteurs de cytokines. Son activation est le résultat de différents stress cellulaires ciblant entre autre la perméabilité ionique de la membrane plasmique, les lysosomes ou les fonctions mitochondriales. De façon coordonnée ces deux signaux conduisent à des modifications post-traductionnelles de NLRP3 permettant l'assemblage de l'inflammasome, l'activation de la caspase-1, la pyroptose, ainsi que la maturation et la sécrétion de cytokines. P2X7R: Purigenic Receptor P2X 7; ASC: Apoptosis-associated Speck-like protéin containing a CARD domain.

4- L'inflammasome NLRP3

Quelles sont les raisons pour lesquelles je discuterai brièvement et spécifiquement de l'inflammasome NLRP3. Dans le contexte de mon étude sur l'inflammation, il est important de souligner que l'inflammasome NLRP3 a été initialement décrit pour son association génétique avec des syndromes auto-inflammatoires héréditaires (Shinkai et al., 2008). Depuis, NLRP3 a été impliqué dans de nombreuses pathologies multifactorielles à composante inflammatoire comme l'athérosclérose par exemple (Stitham et al., 2020). Il est également impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives, dont la sclérose en plaque ainsi que dans les maladies associées au vieillissement (Yavarpour-Bali and Ghasemi-Kasman, 2020);(Guan and Han, 2020). Ainsi, une dérégulation du récepteur NLRP3 est impliqué dans de nombreuses pathologies à composante inflammatoire (Gros Lambert and Py, 2018).

Dans les macrophages, l'assemblage de l'inflammasome « Nucleotide-binding oligomerization domain Leucine-Rich repeat and pyrin domain-containing Protein-3 » (NLRP3) nécessite deux signaux, dits de « *priming* » (signal 1) et d'activation (signal 2) **Figure 36**. Les signaux de « *priming* » peuvent être des cytokines (TNF, IL-1) ou des PAMP (LPS) qui sont reconnus par des récepteurs (TNFR, IL-1R, TLR4) qui initient la transcription de nombreux gènes. Les signaux d'activation correspondent, quant à eux, à différents stress cellulaires (Gros Lambert and Py, 2018). En fait, le premier signal fourni par les activateurs de la voie NF- κ B, comme l'activation du TLR4 par le LPS est nécessaire. Le NF- κ B permet la synthèse et l'accumulation de pro-IL-1 β , de pro-IL-18 et de NLRP3. Le deuxième signal permet l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3. Lorsqu'il est activé, le récepteur NLRP3 recrute la protéine adaptatrice « Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain » (ASC) qui recrute à son tour la caspase-1. La caspase-1 active peut induire une mort cellulaire (pyroptose) et produire les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 **Figure 36**.

Enfin, dans le cas où l'immunité innée ne permet pas d'éliminer complètement les pathogènes, ce n'est qu'ultérieurement que la réponse immunitaire adaptative sera induite.

Dans le paragraphe qui suit, je vais me focaliser sur les éléments les plus importants de l'immunité adaptative, car une réaction immunitaire non contrôlée, conduit à des états inflammatoires chroniques telles que les maladies auto-immunes (inflammation chronique de l'intestin : rectocolite ulcéreuse, maladie de Crohn ; et la polyarthrite rhumatoïde) pour les citer principalement.

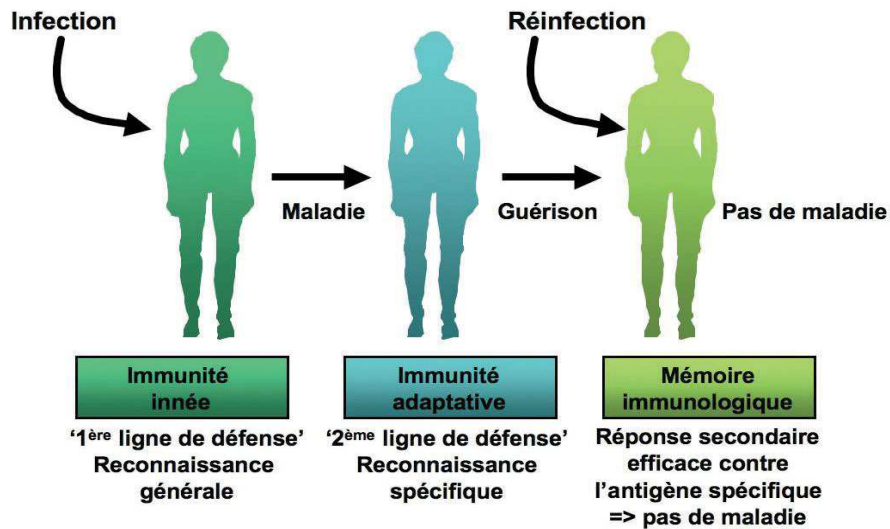


Figure 37 : Le système immunitaire adaptatif est la seconde ligne de défense contre les agents infectieux. Le système immunitaire adaptatif se compose d'un ensemble de cellules spécialisées, dont le but est de reconnaître et de mémoriser le non soi (mémoire immunologique). Cette capacité de mémoire génère une immunité à long terme permettant une réponse plus rapide et plus efficace (Bonilla and Oettgen, 2010).

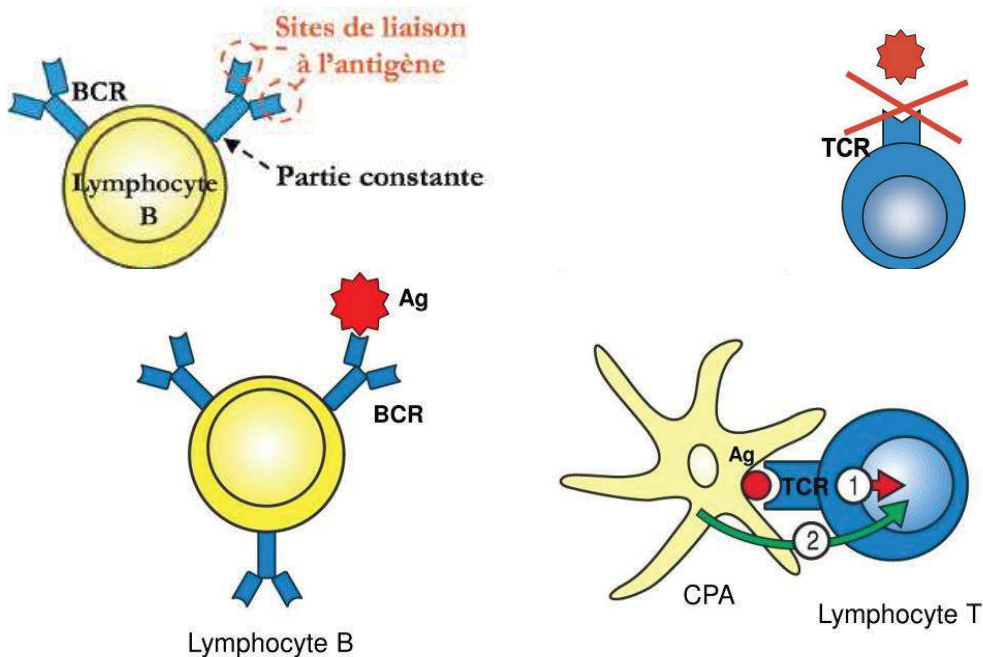


Figure 38 : Reconnaissance spécifique de l'antigène par les récepteurs des lymphocytes T et B (Immunobiology, 7 ed. ©Garland 2008). Le lymphocyte B reconnaît des antigènes sous-forme d'épitope de la protéine entière par le récepteur « B Cell Receptor » (BCR) ; mais pas le TCR. La reconnaissance antigénique par le lymphocyte T s'effectue par son récepteur « T Cell Receptor » (TCR) signal (1) et nécessite une cellule présentatrice d'antigène (CPA) ; signal pour l'apprêtement sous forme peptidique de l'antigène (2).

II- Le système immunitaire ADAPTATIF

L'immunité adaptative, se base sur la détection d'antigènes, des molécules du « non soi », par des cellules qui portent des récepteurs spécialisés et uniques. Grâce à cette réponse spécifique, le système immunitaire se focalise alors, sur le ou les antigènes détectés pour cibler l'agent pathogène qui aurait franchi la barrière de l'immunité innée. La réponse adaptative se traduit alors, par une prolifération de clones de lymphocytes et une production massive d'anticorps reconnaissant les antigènes cibles qui persistent dans l'organisme ; empêchant une seconde infection par le même pathogène.

Le système immunitaire adaptatif est donc la seconde ligne de défense contre les agents infectieux et se compose d'un ensemble de cellules spécialisées, dont le but est de reconnaître et de mémoriser le « non soi » afin d'apporter une réponse spécifique **Figure 37**. Le système adaptatif est caractérisé par la participation majeure de trois populations cellulaires : les lymphocytes T (LT CD4 et LT CD8), les lymphocytes B (LB), les plasmocytes avec leurs produits que sont les anticorps, mais également les cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques et macrophages) (Bonilla and Oettgen, 2010).

L'immunité adaptative fait intervenir les récepteurs « B Cell Receptor » (BCR) présents sur les LB, et les récepteurs « T Cell Receptor » (TCR) présents sur les LT **Figure 38**. Ces récepteurs vont reconnaître un seul ligand ; d'où la spécificité de réponse. Les TCR sont différents d'un lymphocyte à l'autre. En effet, un lymphocyte est programmé pour répondre à un antigène, il présente donc, un seul type de récepteur. L'ensemble des TCR exprimés par tous les lymphocytes T constitue le répertoire T pour la reconnaissance des antigènes ; il en est de même pour les récepteurs des lymphocytes B. L'interaction antigène-récepteur va entraîner la prolifération et la différenciation des lymphocyte B et T en lymphocytes effecteurs.

L'antigène sera présenté aux lymphocytes T, sous forme de peptides associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I ou de classe II (CMH I et CMH II) exprimées à la surface des cellules présentatrices. L'étape de reconnaissance implique, des Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) et plus particulièrement les cellules dendritiques et les macrophages (Chatenoud, 2002). De plus, l'immunité adaptative fait également intervenir des cytokines comme l'Interleukine-2 (IL-2) produite par les cellules dendritiques et les LT.

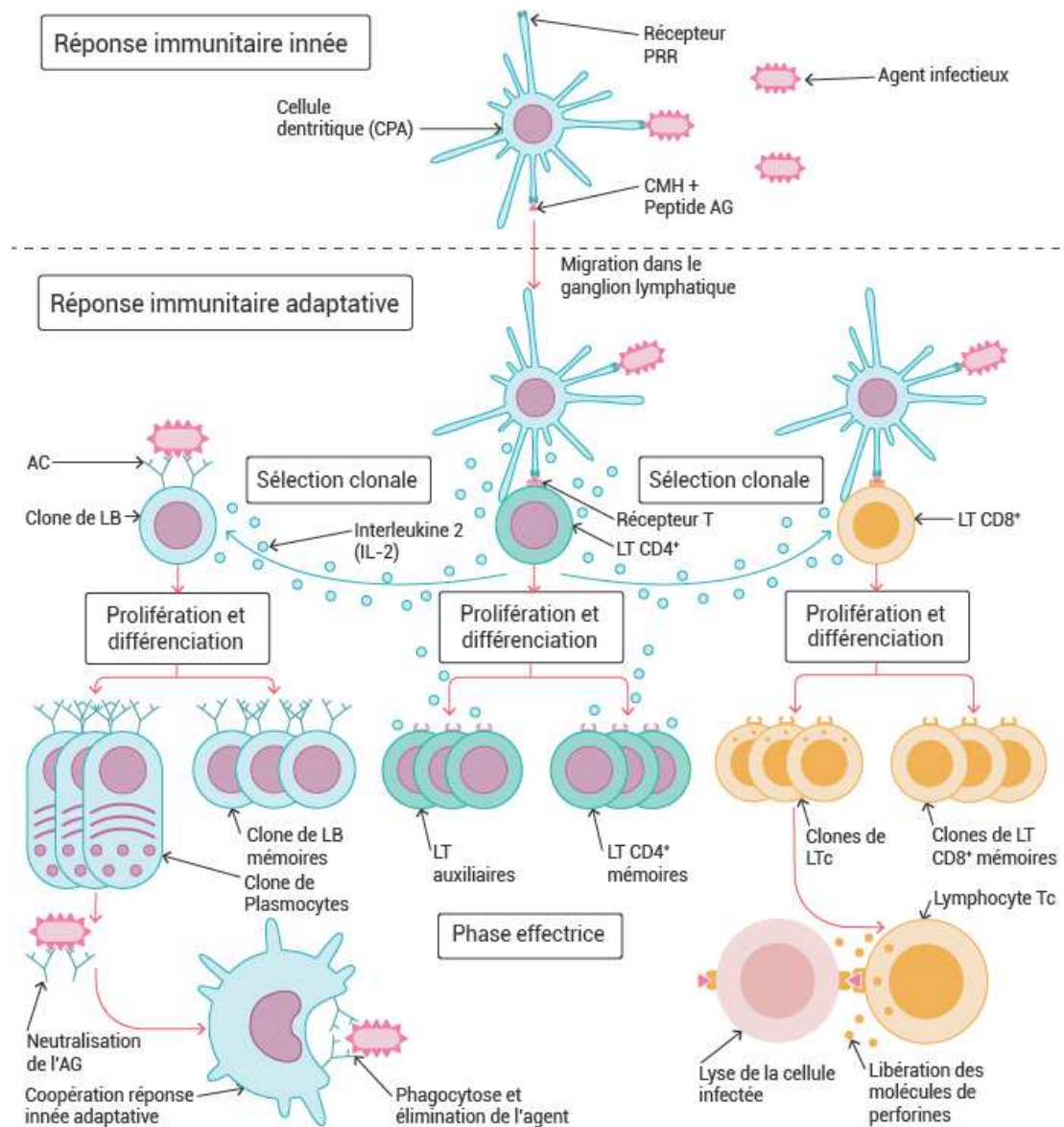


Figure 39 : Schéma de synthèse de la réponse immunitaire adaptative. La réponse immune adaptative commence par la reconnaissance de l'antigène présenté par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA : exemple des cellules dendritiques) et les récepteurs TCR spécifiques des lymphocytes T CD4 (LT CD4). S'ensuit une activation des lymphocytes T CD4 due à la sécrétion de l'Interleukine-2 (IL-2) par les CPA. Ensuite les LT CD4 se différencient en LT helper (LTh) qui produisent eux-mêmes de l'IL-2 ainsi qu'une différenciation des LT CD4 en LT mémoires qui serviront si une nouvelle rencontre avec l'antigène se réalise. L'IL-2 produite par les LT CD4 activés, va permettre l'activation et la prolifération de clones de lymphocyte B (LB) spécifiques de l'antigène. Le clone va proliférer, se différencier en clone de plasmocytes spécifiques et produire des anticorps spécifiques. Les LB vont également se différencier en LB mémoires. Quant aux lymphocytes T CD8 (LT CD8), ils sont activés par la reconnaissance de l'antigène présenté par les CPA via leurs TCR. Les LT CD8 vont proliférer et se différencier en LT mémoires et en LT cytotoxiques (LTc). Ces derniers détruiront les cellules infectées en libérant des molécules telles que les perforines.

Dans le paragraphe qui suit, je discuterai de la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T effecteurs, car leurs implications associées à celles des cytokines sont en partie à l'origine de la chronicité des inflammations. En effet, la persistance des antigènes induit une inflammation soutenue concomitante à une différenciation marquée de l'immunité adaptative, principalement dans les lymphocytes T (Moro-García et al., 2018).

Il me semble donc important dans ce chapitre consacré à l'immunité adaptative, d'avoir une vue d'ensemble sur les mécanismes qui tendent vers la chronicité des inflammations, afin de mieux comprendre l'intérêt des études faites in vitro, et du développement des essais cliniques avec la drogue ABX dans les inflammations chroniques (rectocolite hémorragique (RH) et la polyarthrite rhumatoïde (PR)).

Bien que la synthèse des mécanismes lymphocytaires mis en jeu dans le système adaptatif (rôle des sous-populations, leurs régulations...ainsi que leurs défaillances...) paraît complexe, je vais mettre en évidence certains éléments de ce système immunitaire, qui permettent de comprendre le développement de la chronicité inflammatoire.

La **Figure 39** présente globalement la mise en place du système immunitaire adaptatif, lorsque la réponse immunitaire innée devient insuffisante. Notons que la particularité de la réponse immune adaptative, consiste (1) à mettre en place un répertoire immunitaire spécifique de chacun des antigènes au niveau des organes lymphoïdes et (2) de mettre en place une mémorisation de l'antigène à la fois par les lymphocytes B et les lymphocytes T.

En effet, suite à la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes B et T via leurs récepteurs respectifs, les lymphocytes s'activent dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) proche de la zone infectée. Ce processus permet ensuite, une expansion clonale spécifique de l'antigène présenté. Une fois différenciés, les lymphocytes exercent leurs fonctions effectrices dans les tissus périphériques (Moro-García et al., 2018).

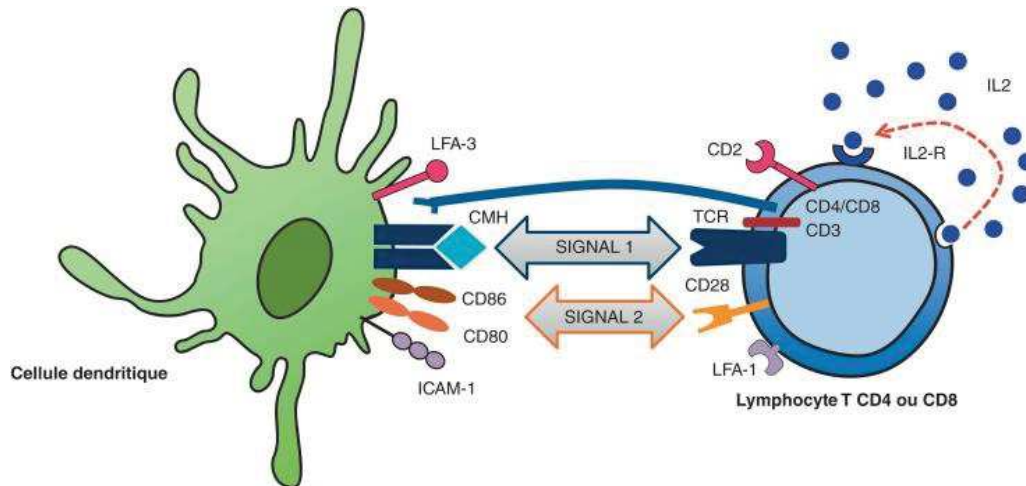


Figure 40 : Activation des lymphocytes T CD4 / CD8 (d'après Galaine et al., 2016). Lors de l'activation des LT, il y a un premier signal qui donne la spécificité de la réponse. Ce signal correspond à l'interaction entre le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)-peptide présenté par la cellule présentatrice d'antigène (ici la cellule dendritique) et le récepteur de l'antigène du lymphocyte T (TCR). L'interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide est essentielle pour déclencher l'activation de la cellule naïve (cellule n'ayant pas encore rencontré l'antigène). S'ensuit un deuxième signal nommé signal de co-stimulation qui correspond aux signaux de co-stimulation délivrés par la cellule présentatrice d'antigène (CD80 et CD86), se lie à la molécule CD28 exprimée sur le lymphocyte T. L'interaction induit dès lors des cascades enzymatiques qui correspondent au troisième signal. Ce dernier signal va conduire à la production de cytokines, et tout particulièrement d'Interleukine-2 (IL-2) avec son récepteur de haute affinité : le CD25. L'IL-2 est nécessaire à la prolifération des cellules T activées.

C'est en fonction de l'antigène présenté et des cytokines synthétisées, que les LT CD4 naïfs (lymphocytes n'ayant jamais rencontré d'antigène) deviennent des LT helper (LTh) qui sécrètent eux-mêmes des cytokines. Cette sécrétion va permettre d'augmenter l'activité de beaucoup d'autres cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages). Les LT CD8 deviennent des LT cytotoxiques (LTc) qui éliminent les cellules infectées.

En fait, les lymphocytes T peuvent être classés en fonction de l'expression de leurs différents marqueurs de surface, mais également par leur fonctionnalité. A titre d'exemple : les lymphocytes T naïfs sont porteurs de « Cluster de Différenciation » (CD) et de récepteurs aux chimiokines (CCR) ; comme par exemple le CD45RA positif notés « + » et CCR7 positif noté « + ». Tandis que les lymphocytes T mémoires effecteurs ne porteront pas le CD45 et le CCR7 donc ces lymphocytes seront négatifs pour ces marqueurs de surface (CD45 - et CCR7-) (Sallusto et al., 1999). Les lymphocytes T effecteurs, constituent une population assez hétérogène et l'utilisation des deux marqueurs comme le CD27 et le CD28 (récepteurs de co-stimulation) permettent de subdiviser de nouveau les lymphocytes T naïfs et les lymphocytes T effecteurs en d'autres sous-population (Koch et al., 2008).

Quant à l'activation d'une cellule T naïve, cela nécessite 3 signaux (Curtsinger et al., 2003 ; O'Shea and Paul, 2010). En effet, l'antigène apprêté à la surface des cellules présentatrices d'antigène, se lie aux lymphocytes T par l'intermédiaire du récepteur T (TCR). Le CMH-peptide et le TCR, sont appariés avec des corécepteurs des LT CD4 / LT CD8, mais également avec des molécules d'adhésions telles que : « l'Intercellular Adhésion Molecule-1 » (ICAM-1), et le « Lymphocyte Function-associated Antigen-1 » (LFA-1) ; constituant ainsi le premier signal.

Un deuxième signal est initié suite à l'interaction entre les molécules de co-activation (CD80 / CD86) et B27, présentes sur la surface des cellules présentatrices d'antigènes et leur récepteur CD28 sur les lymphocytes **Figure 40**.

Ainsi, l'amplification du premier signal par le second, permet l'activation intracellulaire de plusieurs voies de signalisation : MAPK et NF- κ B. L'activation des facteurs de transcription qui en résulte, favorise l'expression de nouvelles molécules par le lymphocyte T, comme la production de cytokines, particulièrement l'IL-2 avec son récepteur de haute affinité : le CD25. Cette amplification constitue ainsi le troisième signal (Halloran, 2004 ; Galaine et al., 2016).

Bien que les lymphocytes T possèdent également un grand nombre de molécules inhibitrices qui aident à la régulation de la réponse cellulaire (Chikuma, 2017), l'expression

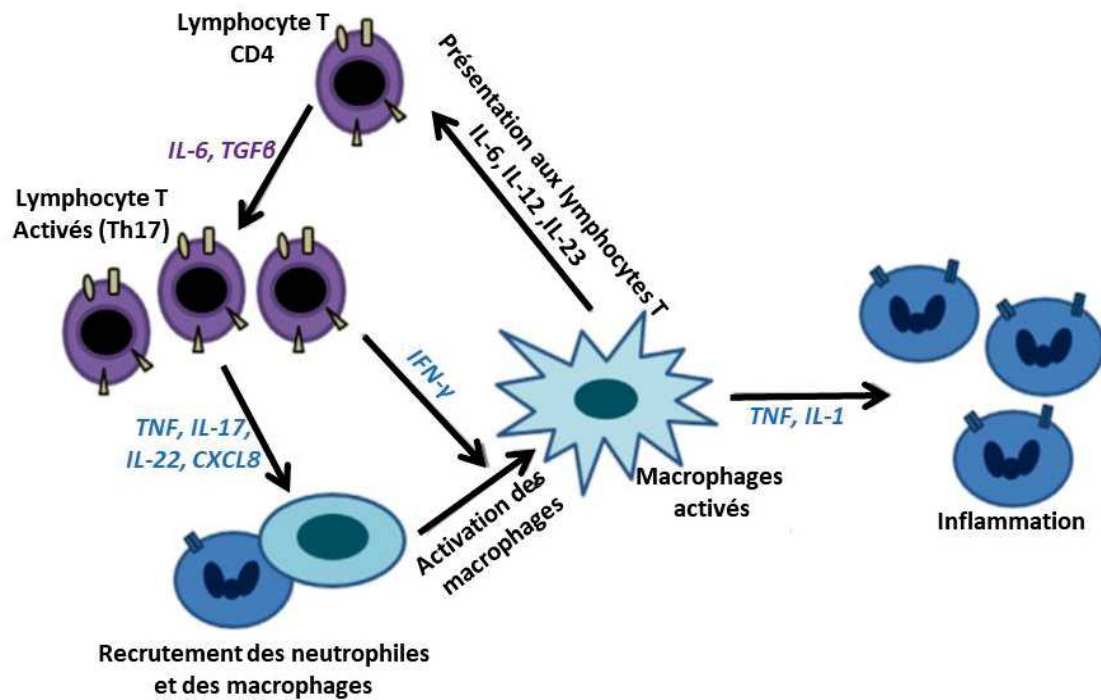


Figure 41 : Différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T CD4 effecteurs en réponse à une infection : les Th17 (d'après Moro-García et al., 2018). Les lymphocytes T activés produisent des cytokines (TNF, IL-17) et des chimiokines, qui vont recruter les macrophages. Et d'autres cytokines comme l'IFN γ vont activer les macrophages. Les sous-populations de lymphocytes T (Th1, Th2, Th17) produisent divers types de cytokines qui à leur tour, activent les macrophages et stimulent les lymphocytes T via la présentation d'antigènes et la sécrétion de différentes cytokines (IL-12, IL-6, IL-23). Les macrophages agissent également sur les neutrophiles en libérant des molécules telles que le TNF et l'IL-1.

différentielle du CD25 par exemple, sur les cellules T de la lamina propria (tissu conjonctif sous épithélium qui tapissent les muqueuses digestives) et des macrophages sont à l'origine des lésions intestinales dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Choy et al., 1990) ; (MacDermott et al., 1993).

En fait, la production de grandes quantités d'IL-1, d'IL-6, et de TNF α par les macrophages et / ou d'autres types cellulaires, permet l'activation des cellules T ; cette activation entraîne la stimulation clonale de nombreuses sous-classes de cellules T. La production d'IL-2 est augmentée dans les lésions. La production de cytokines stimule le développement des cellules T helper. La synthèse et la sécrétion d'anticorps stimulent encore plus la fonction immunitaire. Par conséquent, l'activation anormale des lymphocytes T induit une surexpression d'antigènes d'activation, comme le CD25, mais aussi le CD71 (Schreiber et al., 1991).

Retenons que les conditions créées par les cellules présentatrices de l'antigène lors du contact initial avec la cellule T naïve, vont déterminer les proportions des différents types de cellules T effectrices produites (Steinman, 2012). En outre, les cellules T vont influencer le niveau d'activation des macrophages, le recrutement local des neutrophiles, mais également influencer les classes d'immunoglobulines produites.

Concrètement, les lymphocytes T CD4 effecteurs qui sont générés les premiers en réponse à une infection, sont les Th17. En effet, les CPA (cellules dendritiques, macrophages) produisent à la fois de l'IL-6 et du « Transforming Growth Factor » (TGF- β) suite au premier contact avec l'antigène ; ce qui favorise la différenciation des cellules T naïves en cellules effectrices Th17 (Brockmann et al., 2017a) **Figure 41**.

Les Th17 produits, quittent les ganglions et migrent jusqu'au site de l'infection. En croisant le pathogène, ces LT sont réactivés et produisent des cytokines de la famille des IL-17, IL22 (Ouyang et al., 2008), favorisant ainsi la production d'IL-6 et de chimiokines (CXCL8/IL-8, CXCL2). S'ensuit le recrutement des neutrophiles, ainsi que les facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF ou GM-CSF). Par ce biais, la présence des lymphocytes Th17 spécifiques du pathogène, permet d'amplifier la réponse inflammatoire aiguë amorcée par l'activation de l'immunité innée au site d'entrée du pathogène (Brockmann et al., 2017a).

L'environnement cytokinique est fondamental dans l'amorçage de la réponse immunitaire adaptative des cellules Th17. Mais il est aussi fondamental dans son contrôle puisqu'il prévient le déclenchement inapproprié d'une réponse immunitaire à l'encontre d'antigènes du « soi » ou d'antigènes de micro-organismes de la flore commensale (Daudin J.B., D.Monnet, F. Batteux).(Daudin J.B., D.Monnet, F. Batteux)

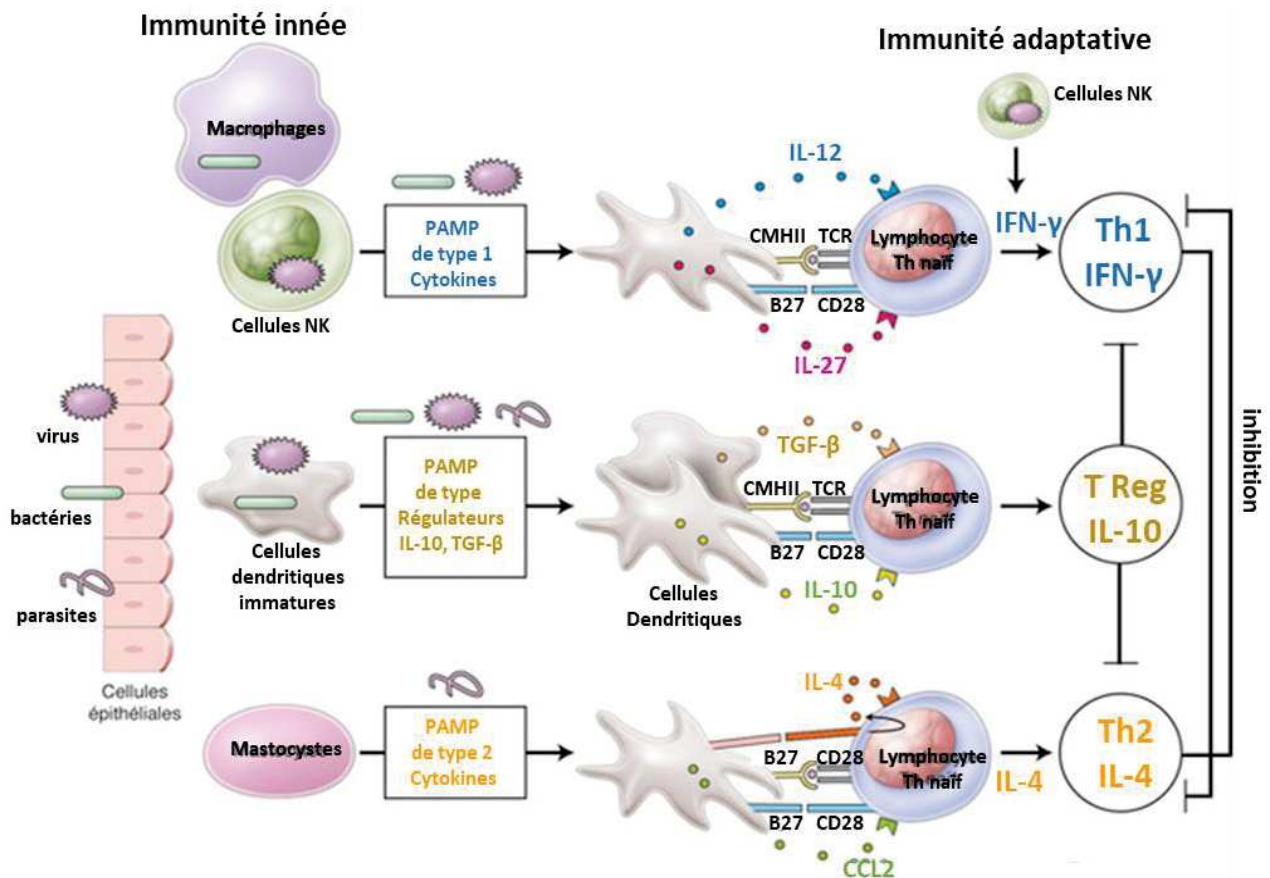


Figure 42 : Les pathogènes sont les acteurs de l'orientation des réponses immunitaires. Lorsque la réponse immunitaire se prolonge, la sécrétion de TGFβ et d'IL-6 par les cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques) décline, et se trouve remplacée par la synthèse de cytokines responsables de la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 ou Th2.

Les lymphocytes Th17 sont par conséquent, impliqués à la fois dans le recrutement massif des cellules de l'immunité innée comme les neutrophiles responsables des lésions intestinales mais également dans l'amplification de l'inflammation, aboutissant aux maladies inflammatoires de l'intestin, des arthrites et de la sclérose en plaque (Witowski et al., 2000 ; Gálvez, 2014). Les Th17 sont associés aux désordres auto-immuns chroniques ; la sécrétion non contrôlée de l'IL-23, de l'IL-17 et du TNF- α peut promouvoir la carcinogénèse (Brockmann et al., 2017a). Mais l'IL-17 et le TNF- α jouent également un rôle dans le développement des maladies inflammatoires chroniques et de la polyarthrite rhumatoïde (Pappu et al., 2011).

Quant aux lymphocytes Th1 et Th2, ils ne sont pas les premières cellules T à être produites en réponse à une infection. En outre, les cellules Th1 et Th2 sont générées lorsque l'infection se prolonge, voire devient chronique, ou lorsque l'élimination du micro-organisme nécessite la production de cellules effectrices spécialisées **Figure 42**. Les lymphocytes Th1 et Th2 participent à la régulation du système immunitaire adaptatif pour le maintien de l'homéostasie. Ainsi, tout déséquilibre (par excès ou par défaut) conduit à des pathologies. En effet, l'excès induit les maladies auto-immunes (maladies inflammatoires de l'intestin) et le défaut induit des déficits immunitaires (Syndrome de l'ImmunoDéfiance Acquise (SIDA)) ou des anomalies de l'homéostasie du système immunitaire (anomalies des lymphocytes T régulateurs).

Quant aux lymphocytes Th2, ils vont aider les cellules B à produire des anticorps (IgA, IgG). Les Th2 participent à l'élimination des pathogènes (immunité à médiation humorale) en sécrétant de l'IL-4 qui va inhiber la réponse Th1. La sécrétion de l'IL-10 va réguler les Th1 en inhibant la synthèse d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques). Quant aux Th1, ils activent les macrophages à la fois par le contact et par le biais de la sécrétion d'InterFeroN- γ (IFN- γ) pour détruire le matériel phagocyté et, ainsi inhiber la réponse Th2. De ce fait, les lymphocytes Th1 permettent l'élimination des pathogènes intracellulaires (immunité à médiation cellulaire) et permettent ainsi, l'expansion de la réponse cellulaire en activant les LT cytotoxiques CD8+. Les macrophages vont permettre l'élimination des pathogènes.

Finalement, les LT effecteurs vont amplifier l'inflammation en sécrétant à leur tour des cytokines pro-inflammatoires comme : IFN- γ , IL-17 (Mowat, 2003). Ces cellules hautement différenciées, vont contribuer à perpétuer le processus inflammatoire en produisant des niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires.

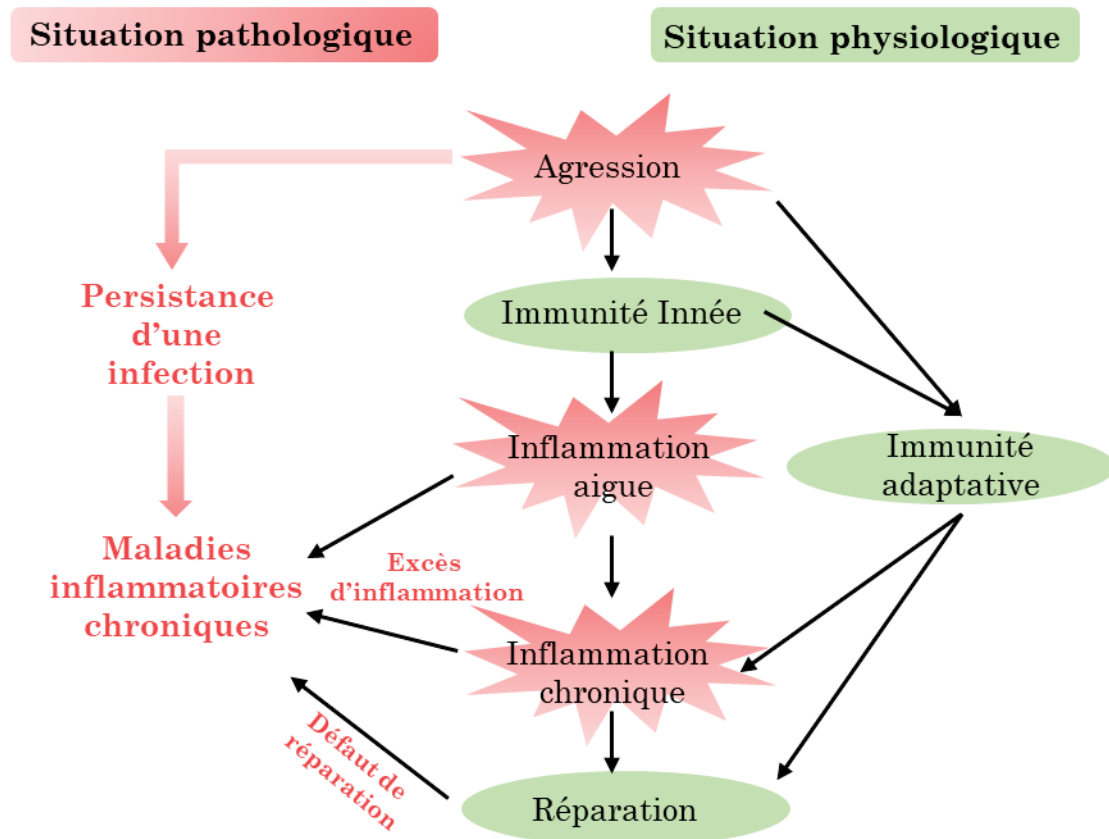


Figure 43 : Toute rupture d'équilibre induit des modifications qui peuvent devenir pathologiques. Une agression induit une réponse de défense de l'organisme. Par exemple, un déficit de l'immunité favorise l'apparition d'infections graves et parfois d'affections néoplasiques. Inversement, un "excès d'immunité" ou une réaction immunitaire "mal adaptée" provoque des maladies inflammatoires allergiques et auto-immunes. Le yin et le yang de l'immunité sont deux facettes d'un système complexe qui doit rester en équilibre

Au cours des dernières étapes de différenciation, l'environnement pro-inflammatoire peut-être responsable d'une réponse inefficace des lymphocytes T, comme cela a été constaté dans le « vieillissement inflammatoire » (Goronzy and Weyand, 2017 ; Rea et al., 2018).

Toutefois, il existe un système de contrôle, régulateur des lymphocytes dans les organes lymphoïdes, dont le but est d'éviter l'émergence de lymphocytes T et B auto-agressifs. Cette régulation des populations de lymphocytes B et T s'effectue soit par une inhibition de contact avec les lymphocytes « régulateurs » (T Reg) (Piccioni et al., 2014 ; Dhainaut and Moser, 2015), soit par la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF β (Palomares et al., 2014 ; Wang et al., 2017).

En conclusion de ce second chapitre, il est évident que le système immunitaire assure la protection contre les pathogènes, tout en assurant le maintien de l'intégrité de l'organisme par l'induction d'une tolérance vis-à-vis des composés du « soi » **Figure 43**. Cette tolérance met en jeu différents mécanismes régulés et coordonnés. L'éducation des lymphocytes à ne pas reconnaître des composants du soi dans les organes lymphoïdes primaires est maintenue en périphérie par des mécanismes hautement régulés. Cependant, en cas de rupture de tolérance souvent liée à une inflammation, les lymphocytes « auto-réactifs » sont activés par la reconnaissance de composés du « soi », ce qui peut conduire à des pathologies auto-immunes.

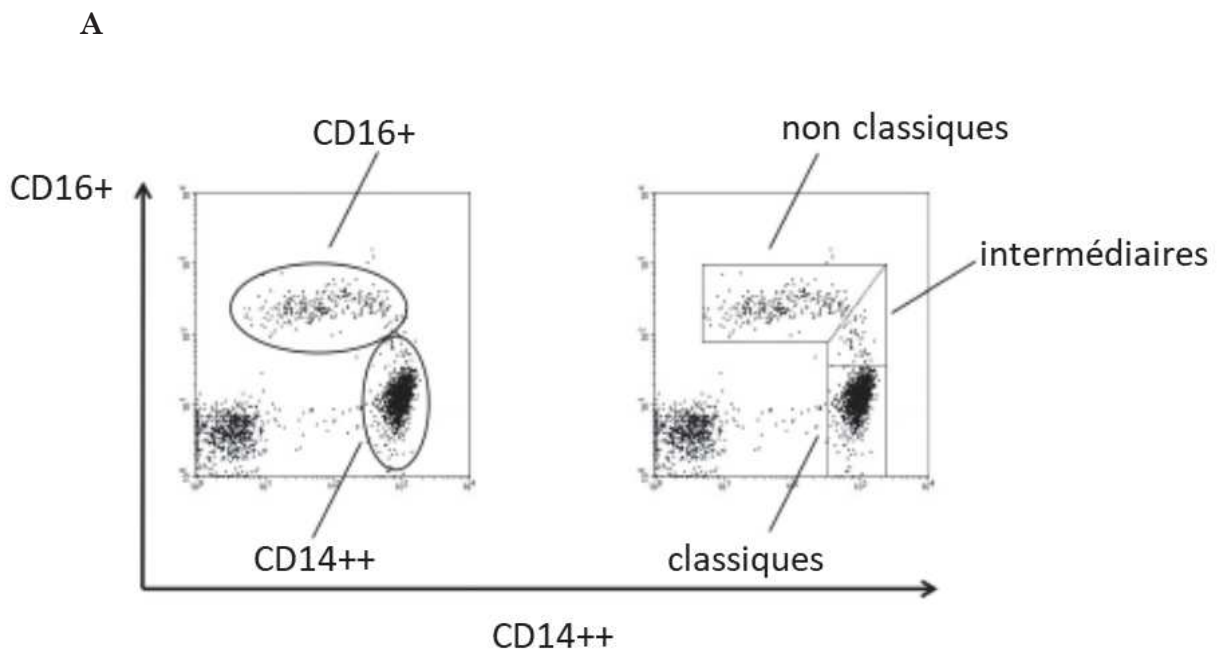
En définitive, la compréhension de la mise en place d'une réponse immunitaire est importante pour inhiber spécifiquement certains mécanismes effecteurs du système immunitaire ; afin de limiter les symptômes délétères des maladies inflammatoires qui deviennent chroniques sans toutefois compromettre complètement l'immunité physiologique.

En outre, bien que des facteurs génétiques et environnementaux entrent en jeu lors de la régulation immune, le développement de toute nouvelle molécule à potentiel anti- inflammatoire doit s'appuyer sur les mécanismes du système immunitaire déjà décrits de par la littérature, pour mieux comprendre les enjeux bénéfiques / risques sur l'organisme. Ce qui permettra ainsi, de maintenir ou de restituer l'équilibre immunologique (homéostasie immunologique).

Le yin et le yang de l'immunité, sont deux facettes d'un système complexe qui doit rester en équilibre. Par conséquent, comprendre la mécanistique moléculaire et cellulaire mise en jeu pour toute nouvelle molécule à potentiel anti-inflammatoire fait sens.

Chapitre 3

Les monocytes et les macrophages humains dans l'inflammation



B

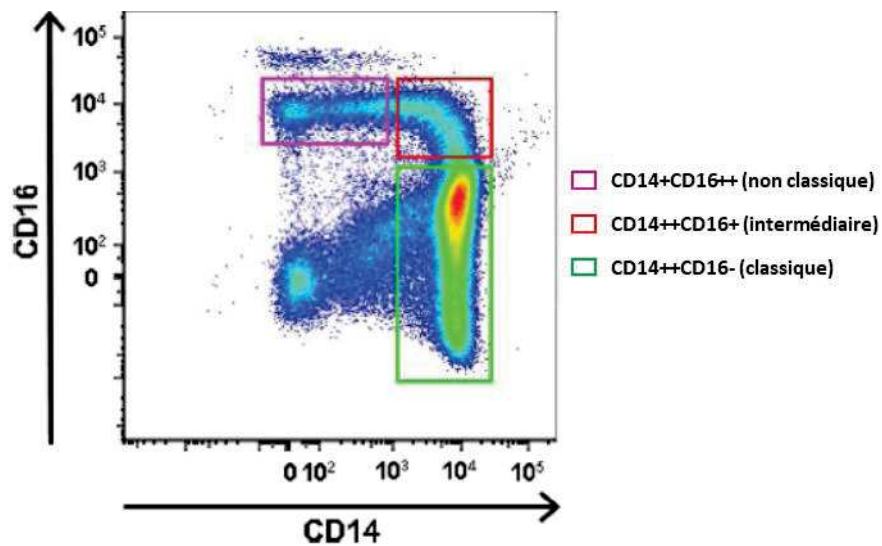


Figure 44 : Dot plot des sous-populations de monocytes avec les marqueurs de surface CD14 et CD16 d'après Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013 ; Stansfield and Ingram, 2015 . (A) Ici, Ziegler-Heitbrock définit la stratégie de caractérisation des trois sous-populations de monocytes par un marquage des membranes cellulaires en utilisant la technique de cytométrie de flux « Fluorescence Activated Cell Sorting » (FACS). (B) D'après Stansfield les monocytes classiques représentent la forme majoritaire des sous-populations de monocytes.

Ce chapitre est spécifiquement consacré aux monocytes et aux macrophages. Suite à une agression (lésion tissulaire ou infection), les monocytes circulants peuvent être nouvellement recrutés et se différencier localement en macrophages, au niveau du tissu lésé. Très généralement, les monocytes circulants dans le sang sont les précurseurs des macrophages et proviennent de la moelle osseuse (à partir des cellules souches hématopoïétiques) ; ces cellules appartiennent au système phagocytaire mononucléaire (MPS). Autrement dit, les monocytes et les macrophages participent aux mécanismes de défense de l'hôte contre les pathogènes, à l'homéostasie et aux processus de réparation tissulaire.

I- Les monocytes

1- Hétérogénéité des monocytes

Parce que le marqueur de surface « Cluster de Différenciation » 14 (CD14 : corécepteur du LipoPolySaccharide - LPS) est abondamment exprimé à la surface des monocytes et des macrophages humains, il est utilisé pour marquer les monocytes (Yang et al., 2014).

Les monocytes sont une population hétérogène qui a été mise en évidence pour la première fois par l'identification d'une population rare, possédant un marqueur de surface CD16 (CD16+). Le CD16 est un Récepteur du Fragment cristallisable (FcR) des Immunoglobulines G (IgG) (Clarkson and Ory, 1988). La co-expression du CD16+ avec le marqueur spécifique CD14+ ont permis la classification des monocytes circulants (Passlick et al., 1989).

Cette classification est par conséquent basée sur l'expression des marqueurs de surface CD14, CD16 ainsi que, sur l'expression des récepteurs aux chimiokines (CCR2, CX3CR1, CCR5). Cette population phénotypiquement hétérogène a ainsi pu être divisée en trois sous-ensembles **Figure 44**. Ces sous-ensembles présentent des caractéristiques et des fonctions distinctes. En effet, environ 90% des monocytes dit « classiques » se distinguent en une population majeure, qui possèdent fortement le marqueur de surface CD14 mais sans expression du marqueur de surface CD16 (que l'on note : CD14++CD16-). Tandis qu'une plus faible population d'environ 10% de monocytes dits « intermédiaires » co-expriment le CD14 et le CD16 (notée : CD14++CD16+), mais avec une plus forte expression du CD14 en comparaison au CD16. Enfin la troisième sous-population « non classique » se distingue également par la co-expression des CD14 et CD16, mais avec une plus forte expression du CD16 (notée : CD14+CD16++) (Italiani and Boraschi, 2014).

Sous-populations	% de monocytes dans le sang circulant	Marqueurs « Cluster de Différenciation » (CD)	Récepteurs aux chimiokines	Les autres marqueurs de surface	Fonctions principales
Classique	80 - 95	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ⁺ CX3CR1 ⁻	CD62L ⁺ CD64 ⁻ CMH II ⁺ CD163 ⁺	Phagocytose Pro-inflammatoires
Intermédiaire	2 - 11	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CCR2 ⁻ CX3CR1 ⁺ CCR5 ⁺	CD62L ⁺ CD64 ⁻ CMH II ⁺⁺ CD163 ⁺	Pro-inflammatoires
Non classique	2 - 8	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CCR2 ⁻ CX3CR1 ⁺	CD62L ⁻ CD64 ⁺ CMH II ⁺ CD163 ⁻	Antiviral "Patrouilleur"

Tableau 5: Les trois sous-populations de monocytes circulants humains (Italiani and Boraschi, 2014)

Au cours des quinze dernières années, la caractérisation de ces sous-populations a été augmentée par les technologies de la transcriptomique. En effet, Mobley et Frankenberger par exemple, ont démontré que les trois sous-populations de monocytes présentent des différences de transcriptomes (Mobley et al., 2007 ; Frankenberger et al., 2012). Et c'est par l'analyse des micro-ARN que Zawada et al, caractérisent les sous-populations de monocytes (Zawada et al., 2017).

En fait, chaque sous-type de monocytes a des caractéristiques et des fonctions distinctes. Notons que d'une manière générale, les monocytes « classiques » et « intermédiaires » ont tous deux des propriétés pro-inflammatoires **Tableau 5**. C'est-à-dire, que ces sous-populations de monocytes circulent de manière sélective sur les sites d'inflammation en produisant des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL-6) ; ces cytokines contribuent à l'inflammation locale et systémique (Kurihara et al., 1997 ; Boyette et al., 2017).

Toutefois, les monocytes « *classiques* » (CD14⁺⁺CD16⁻), expriment des hauts niveaux de CCR2 (récepteurs aux chimiokines CCL2, qui médient le chimiotactisme des monocytes) et de CD62L (L-sélectines). La fonction principale de cette sous-population de monocytes est la phagocytose. De plus, ils expriment une forte activité peroxydase et produisent de hauts niveaux d'IL-10 et de faibles taux de TNF- α en réponse au LPS (LipoPolySaccharide) (Geissmann et al., 2003). Et d'après Boyette, les monocytes classiques expriment fortement le TNF, l'IL-1, et l'IL-6 (Boyette et al., 2017).

Les monocytes « *intermédiaires* » (CD14⁺⁺CD16⁺), à la différence des monocytes « classiques », ont réduit leur capacité phagocytaire et se caractérisent par une faible activité peroxydase. Ils jouent cependant un rôle de cellules pro-inflammatoires. En effet, ces monocytes produisent et sécrètent eux aussi de l'IL-1 et du TNF- α en réponse au LPS (Cros et al., 2010). Bien qu'ils expriment moins de CCR2 au cours de l'inflammation, ces monocytes expriment des niveaux plus élevés en CX3CR1 (récepteurs aux chimiokines CX3CL1/ fractaline ; ce qui permet de médier le chimiotactisme des monocytes résidents qui s'accumulent dans la circulation). Ces derniers expriment en plus le récepteur CCR5 (récepteur aux chimiokines CCL5/ RANTES). Il est évident qu'en comparaison aux monocytes « classiques », les monocytes « intermédiaires » migreront plus vite vers les sites d'inflammation. C'est grâce à leur proximité aux parois des vaisseaux sanguins, que ces monocytes se trouvent très proches des cellules endothéliales ; et ces dernières expriment à leur surface la fractaline (CX3CL1). Par conséquent, les monocytes « intermédiaires » sont disponibles plus rapidement en cas d'inflammation (Geissmann et al., 2003).

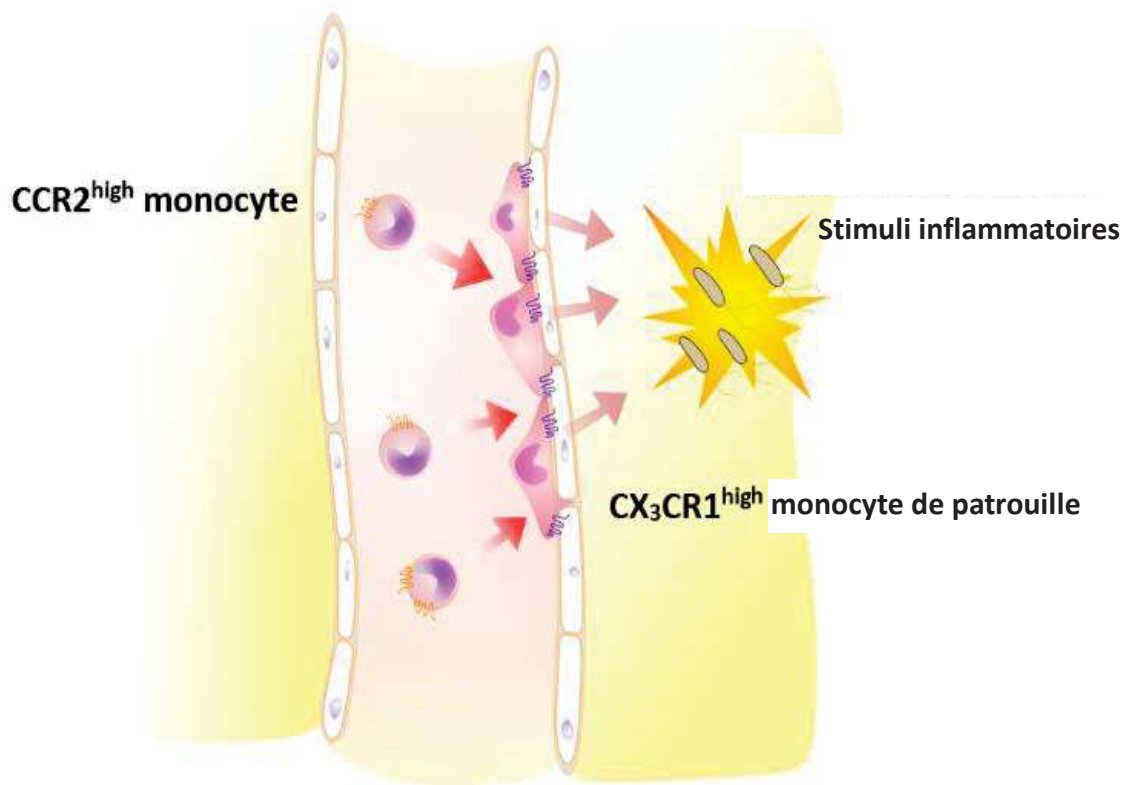


Figure 45 : Les monocytes circulants classiques CCR2^{high} et les monocytes non classiques (patrouilleurs) CX3CR1^{high}. Il a été démontré que les monocytes CX3CR1^{high} adhèrent et « rampent » le long de la face luminale de l'endothélium vasculaire de manière dépendante au CX3CR1 et de l'intégrine « Lymphocyte Function-associated Antigen-1 » (LFA-1) ; et ce, indépendamment de la direction du flux sanguin. Le fait que ces monocytes patrouilleurs rampent le long du système vasculaire sur de longues distances, leur permet d'agir en tant que « scavenger » du système vasculaire. Ces monocytes nettoient les débris, et recherchent tous les stimuli inflammatoires. Ils peuvent recruter des neutrophiles et interagir avec d'autres cellules du système immunitaire. Avec certains stimuli, ils ont des propriétés d'extravasation rapide dans les tissus et peuvent devenir inflammatoires. Le CX3CR1 fournit également un signal de survie pour ces monocytes patrouilleurs. Le recrutement des monocytes peut également être influencé par l'expression d'autre récepteur de chimiokine tel que le CCR5.

En définitif, au cours de l'inflammation ces deux sous-types de monocytes : « classiques » et « intermédiaires », vont envahir les tissus par chimiotactisme grâce aux interactions des récepteurs et leurs chimiokines associées (CCR2/CCL2 et / ou CCR5/CCL5) (Yang et al., 2014). Par ailleurs, les auteurs Grip et Shantsila montrent que les monocytes « classiques », qui expriment fortement les récepteurs CCR2, se trouvent associés à la maladie de Crohn (Grip et al., 2007) et aux maladies cardiovasculaires (Shantsila et al., 2011). De plus, Ziegler et Stansfield montrent que dans la plupart des cas où, les monocytes possèdent le phénotype CD14+CD16+, ces monocytes sont utilisés comme critère de « monocytes inflammatoires », permettant ainsi, à la clinique d'associer le niveau accru des monocytes aux inflammations chroniques (Ziegler-Heitbrock, 2007 ; Stansfield and Ingram, 2015).

Quoi qu'il en soit, les monocytes restent limités aux compartiments : sanguin, à la moelle osseuse et à la rate (Swirski et al., 2009). Ainsi, ils sont prêts à être recrutés pour rejoindre tout d'abord la circulation sanguine et ensuite les organes.

Quant aux monocytes « *non classiques* » (CD14+CD16⁺⁺), ce sont des monocytes circulants qui « patrouillent » le long des vaisseaux sanguins dans les conditions homéostatiques et inflammatoires (Yang et al., 2014). Ce sous-type de monocytes colonise les vaisseaux sanguins par l'interaction des récepteurs aux chimiokines et leurs chimiokines associées (CX3CR1/CX3CL1) via la famille des intégrines (LFA1/ICAM) (Auffray et al., 2007) **Figure 45**. Ces monocytes constituent un petit groupe de cellules qui roulent lentement le long des vaisseaux sanguins, afin de fournir une réserve de monocytes tissulaires en cas d'infection. Les monocytes de « patrouilles » s'activent dans plusieurs contextes pathologiques pour éliminer les cellules endommagées et les débris du système vasculaire. Associés à la cicatrisation des blessures, ils permettent la résolution de l'inflammation dans les tissus endommagés (Thomas Graham et al., 2015).

Enfin, tout comme les monocytes « intermédiaires », les monocytes « non classiques » dit « patrouilleurs », ne possèdent pas de récepteurs CCR2 et par conséquent, ne répondent pas à la chimiokine associée : CCL2. Les monocytes ne migrent pas vers les tissus en réponse au CCL2 (Italiani and Boraschi, 2014), mais plutôt en réponse au CX3CL1. Cependant, dans un contexte inflammatoire, les monocytes recrutés se différencient pour devenir des macrophages (Jakubzick et al., 2013).

Inflammations chroniques <i>maladies auto-immunes</i>	Groupe de patients	% total des monocytes			Sous-population amplifiée	Références
		Classique	Intermédiaire	Non classique		
Maladie de Crohn	Contrôles sains	~ 75	2,8	~ 10,0	Intermédiaire	(Grip et al., 2007)
	Contrôles malades	~ 80	10,3	~ 6,0		
Polyarthrite Rhumatoïde	Contrôles sains	Non communiqué	~ 5,0	Non communiqué	Intermédiaire	(Rossol et al., 2012)
	Contrôles malades	Non communiqué	~ 10,0	Non communiqué		

Figure 46 : Les sous-populations de monocytes dans les inflammations chroniques : maladies inflammatoires de l'intestin, polyarthrite rhumatoïde d'après Wong et al., 2012. Dans les conditions d'inflammations chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde et la maladie inflammatoire de l'intestin (Crohn), la fréquence de la sous-population de monocytes « intermédiaires » est augmentée.

C'est au cours de ces deux dernières décennies, qu'une attention considérable portée aux monocytes et à la polarisation des macrophages, a permis de fournir des indices contextuels sur le rôle des dérivés myélomonocytaires dans les maladies humaines (Ziegler-Heitbrock et al., 2010 ; Stansfield and Ingram, 2015).

2- Les monocytes dans les maladies inflammatoires chroniques

Un certain nombre d'auteurs ont démontré une expansion des monocytes CD16+ chez les patients atteints de la *Polyarthrite Rhumatoïde (PR)*. La délimitation des sous-populations CD16+ suggérant fortement que les monocytes CD14++CD16+ sont les principaux effecteurs inflammatoires (Baeten et al., 2000) ; (Iwahashi et al., 2004) ; (Rossol et al., 2012). En effet, les monocytes CD16+ se trouvent dans le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et sont associés à la destruction des articulations (Baeten et al., 2000).

De plus, Rossol et al, ont démontré qu'une élévation de la fréquence des monocytes CD16+ dans l'arthrite rhumatoïde correspondait principalement à l'expansion de la sous-population de monocytes « intermédiaires » et qui plus est, ces monocytes sont enclins à promouvoir les réponses Th17. Ce qui suggère un rôle pro-inflammatoire des monocytes « intermédiaires » dans la progression de la maladie (Rossol et al., 2012) **Figure 46**.

Les thérapies comme les anti-TNF- α ont montré une certaine efficacité dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et peuvent cibler, en partie des monocytes CD16+ ; soit les « intermédiaires » et les « non classiques ». Mais d'après Stansfield et ses collaborateurs, l'utilisation des marqueurs de monocytes comme biomarqueurs pour la réponse thérapeutique reste limitée (Stansfield and Ingram, 2015).

Par ailleurs, les monocytes CD16+ sont également étendus aux *maladies inflammatoires chroniques de l'intestin* (maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique) (Fingerle et al., 1993) ; (Hanai et al., 2008) ; (Koch et al., 2010). Comme évoqué plus haut, Grip et al, ont montré un pic de la fréquence de la sous-populations de monocytes « intermédiaires » et « classiques » chez des patients atteints de la maladie de Crohn. Ils démontrent que ces monocytes sont marqués par une expression accrue du récepteur CCR2, en comparaison à des témoins sains appariés (Grip et al., 2007) **Figure 46**. Cela suggérerait que les monocytes dans un système de sous-classification peuvent avoir d'autres signatures phénotypiques en réponse à l'inflammation.

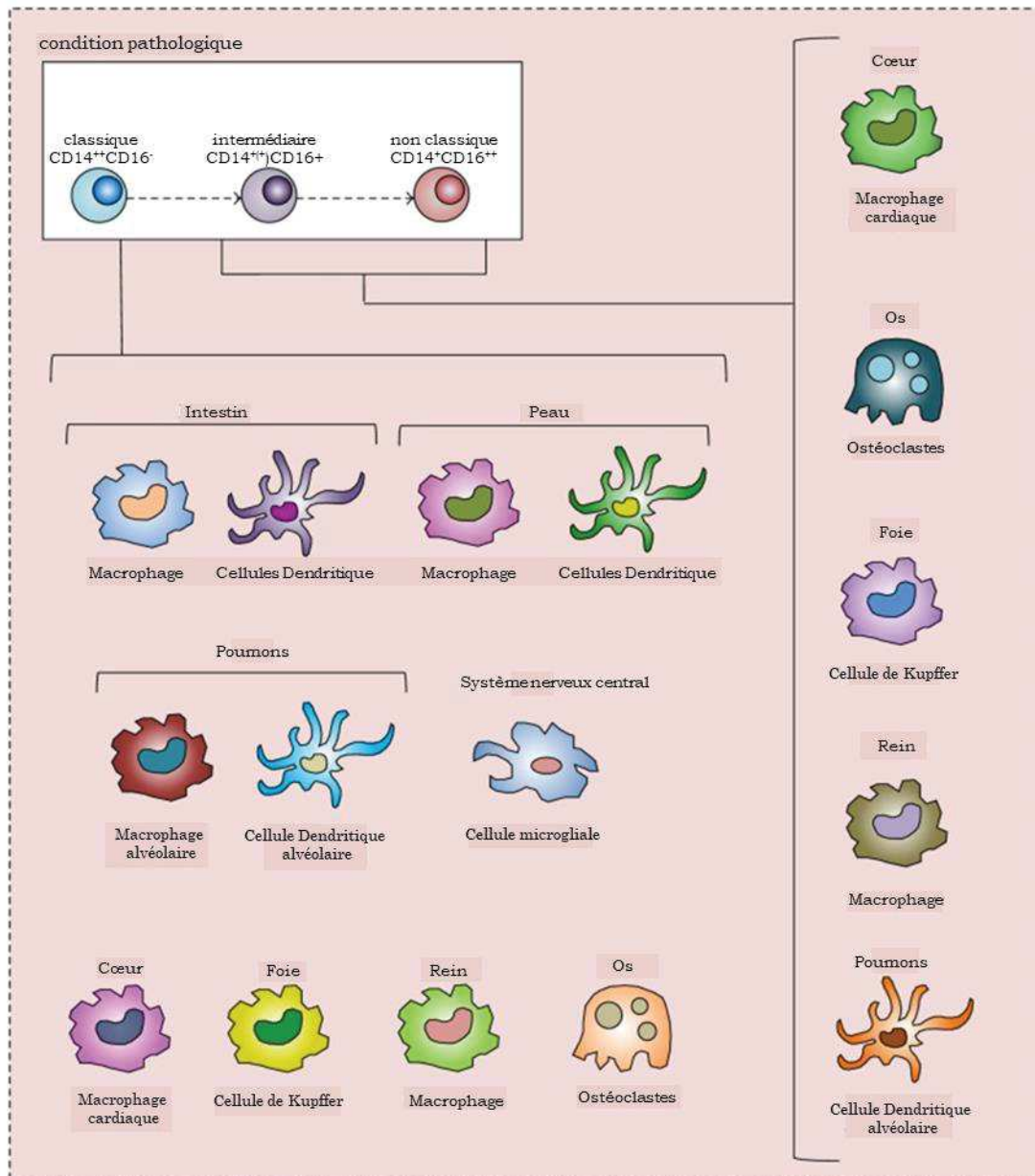


Figure 47 : Recrutement et différenciation des sous-populations de monocytes au cours de l'inflammation d'après (Sprangers et al., 2016). Sprangers propose que les sous-populations de monocytes contribueraient au cours de l'inflammation, à augmenter les cellules immunes matures. D'après Sprangers et al., les cellules matures tissulaires d'un individu sain, ne sont pas maintenues par les monocytes ; les cellules produites au cours de l'inflammation diffèrent de celles produites quand il y a une homéostasie tissulaire.

Les données de Grip et ses collaborateurs, confirmeraient la conclusion indépendante, selon laquelle le CCL2 (MCP-1) serait augmenté chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques et corrèleraient avec la gravité de la maladie.

Pour conclure, les monocytes sont des cellules du lignage myéloïde et expriment divers récepteurs qui surveillent et détectent les changements environnementaux. Ces cellules sont très plastiques et hétérogènes, elles modifient leur phénotype fonctionnel en réponse à la stimulation de leur environnement. Un certain nombre d'études suggèrent, que l'augmentation du nombre de monocytes circulants dans le sang, peut être un indicateur de diverses maladies inflammatoires chroniques (polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn).

Somme toute, les monocytes peuvent se différencier en sous-ensembles inflammatoires ou anti-inflammatoires (Yang et al., 2014). Leur hétérogénéité permet à chacune des populations de jouer un rôle au cours de l'homéostasie, et de la réponse inflammatoire. Ainsi, dans des conditions de lésions tissulaires, d'inflammations ou de pathologies chroniques, les sous-populations de monocytes sont rapidement recrutées dans les tissus. De là, les monocytes peuvent se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages tissulaires. D'ailleurs, d'après Sprangers et ses collaborateurs, les monocytes maintiennent plusieurs populations tissulaires spécifiques de l'immunité en homéostasie. En outre, leur contribution aux populations de cellules dendritiques, d'ostéoclastes et de macrophages, est considérablement accrue en cas d'inflammation (Sprangers et al., 2016) **Figure 47.**

II- Les macrophages

1- Hétérogénéité et nomenclature liée au micro-environnement des macrophages

Parce que les macrophages sont des cellules effectrices, modulateurs clés de la réponse immune, leur activation influence et active d'autres acteurs du système immunitaire. En effet, ces cellules présentent une grande variété de caractéristiques fonctionnelles, notamment (1) la clairance des pathogènes par phagocytose, (2) la présentation des antigènes permettant l'immunité adaptative, (3) l'inflammation, (4) les processus anti-inflammatoires, (5) la réparation des tissus et (6) la mobilisation d'autres cellules innées (cellules NK et neutrophiles).

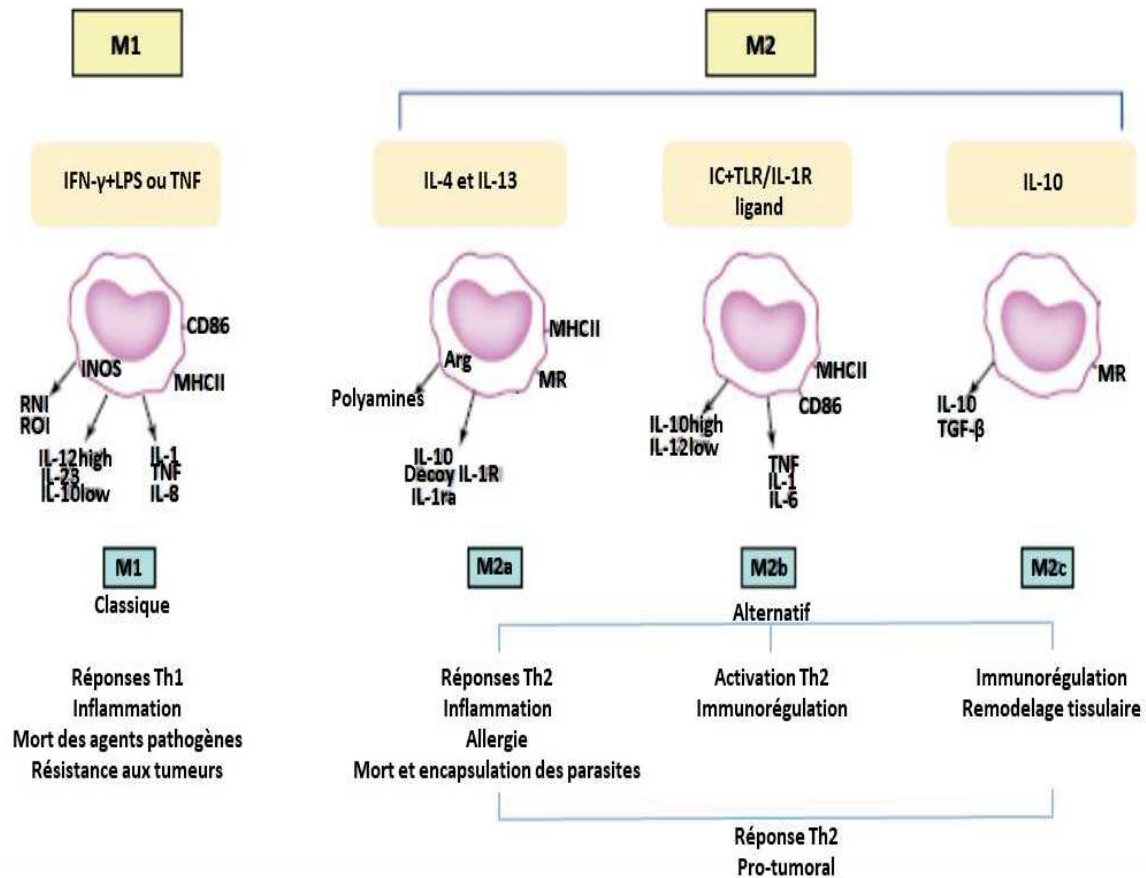


Figure 48 : Le paradigme de l'activation des macrophages M1/ M2 d'après (Mantovani et al., 2004a).

Les macrophages se polarisent et acquièrent différentes propriétés fonctionnelles en réponse aux différents stimuli de l'environnement. L'exposition des macrophages à l'IFN- γ et au LPS entraîne la polarisation classique M1, avec des propriétés cytotoxiques et des potentialités anti-tumorales. Tandis que les macrophages alternatifs M2 sont en général plus enclins à des activités immuno-régulatrices et pro-tumorales. En particulier, les macrophages M2a (induits par l'exposition combinée aux immuns complexes et aux agonistes TLR ou IL-1R) exercent des fonctions immuno-régulatrices, entraînant une réponse allergique. Quant aux macrophages M2c (induits par l'IL-10) sont davantage liés à la suppression des réponses immunitaires et au remodelage des tissus.

Cette diversité de la fonctionnalité immunitaire, est le reflet de l'hétérogénéité des sous-populations de macrophages. Leurs phénotypes et leurs fonctions sont régulés par le micro-environnement environnant (Martinez and Gordon, 2014). En effet, les connaissances actuelles, permettent de classer les macrophages en fonction de leur statut d'activation. Cette activation que l'on appelle « polarisation » existe généralement en deux sous-ensembles distincts. C'est-à-dire qu'il existe des macrophages « classiques » (type M1) et d'autres « alternatifs » (type M2), décrits à l'origine comme étant activés respectivement par l'IFN- γ / LPS et IL-4 / IL-13. Cependant la description de l'activation des macrophages reste controversée (Gordon, 2003) ; (Mosser, 2003) ; (Murray et al., 2014).

Originellement, les termes permettant la classification des macrophages remontent au début des années 1990, après l'observation des effets différentiels de l'IL-4 par rapport à l'IFN- γ et / ou au LPS sur l'expression génétique des macrophages (Nathan, 1991) ; (Stein et al., 1992).

En effet, l'absence de consensus sur la manière de définir l'activation des macrophages dans les expériences *in vitro* et *in vivo* mène toujours à de nombreuses polémiques. Notamment le fait que certains considèrent qu'il existe deux types d'activation (M1 / M2), et d'autres considèrent que l'activation des macrophages de type alternatif M2 existe sur un spectre et ne peut pas être facilement regroupée dans un groupe défini. Ce qui implique la redéfinition du type alternatif M2 en sous-populations telles que M2a, M2b, M2c et M2d (Mantovani et al., 2004a) ; (Biswas and Mantovani, 2010) ; (Martinez and Gordon, 2014) **Figure 48**.

Quoi qu'il en soit, la distinction des macrophages classiques (M1) et alternatifs (M2), reste identifiable sur les bases de leurs fonctions respectives et de leurs profils transcriptomiques (Martinez et al., 2006) ; (Xue et al., 2014) ; (Lurier et al., 2017). Mais également sur les bases d'un ensemble de marqueurs de surface cellulaire, de leur profil sécrétoire en cytokines et chimiokines et de leurs récepteurs appariés ; des enzymes et des hormones (Mantovani et al., 2004a) ; (Rószler, 2015) ; (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Leur distinction se fait également par les facteurs de croissance respectifs GM-CSF pour les profils classiques M1 et par le CSF-1 pour les profils alternatifs M2 (Joshi et al., 2014). Cependant, d'après Murray et ses collaborateurs, il n'y aurait pas de preuves irréfutables permettant d'attribuer aux macrophages dérivés du GM-CSF et du CSF-1 les profils respectifs M1 et M2; (Jaguin et al., 2013 ; Murray et al., 2014)

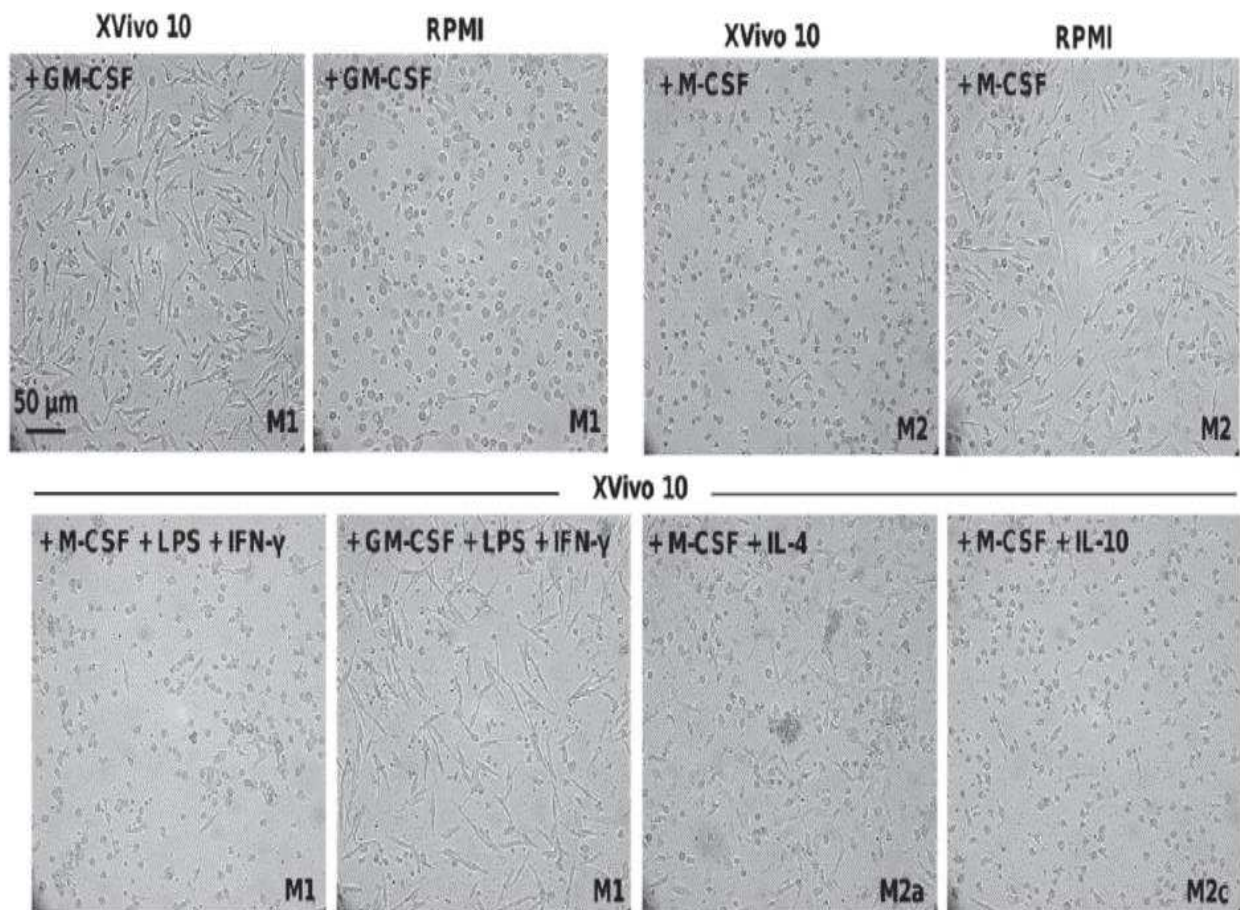


Figure 49 : Hétérogénéité *in vitro* des macrophages dérivés de GM-CSF et de M-CSF d'après (Rey-Giraud et al., 2012). Rey-Giraud et al, nous montrent ici les différentes morphologies des macrophages dérivés de monocytes obtenues après 6 jours de différenciation. En effet, il est impératif de bien décrire dans ses méthodes les conditions de culture, qui ont permis d'obtenir des macrophages classiques M1 ou alternatifs M2 *in vitro*. L'hétérogénéité phénotypique obtenue est fonction (i) des milieux de culture (X Vivo10 ou RPMI) et (ii) des stimuli (GM-CSF, M-CSF, LPS, IFN- γ) / (M-CSF, IL-4, IL-10).

Je fais d'ailleurs une parenthèse ici, pour dire qu'effectivement, au moment de la mise en place de mon projet de recherche, ma première question a été de définir comment, *in vitro*, je pouvais mettre en place sans polémique, la différenciation des macrophages humains dérivés de monocytes. En effet, certaines publications (Rey-Giraud et al., 2012) ; (Zajac et al., 2013) ; (Martinez and Gordon, 2014) démontrent bien qu'en fonction des facteurs de croissance et en tenant compte de la variabilité des conditions de milieu de culture utilisées, il existe des variabilités phénotypiques **Figure 49**.

En revanche, outre cette polémique, c'est à l'occasion du congrès international d'immunologie qui s'est déroulé à Milan en 2013, qu'un petit groupe de biologistes spécialisés dans les macrophages s'est réuni de manière informelle pour dresser les obstacles et les pièges dans la description et la réalisation de l'activation des macrophages. Ainsi, à l'issue de cette réunion, Murray et ses collaborateurs, se sont efforcés de fournir une première série de nomenclatures et de lignes directrices expérimentales. Bien que la publication ne soit pas récente, il est intéressant de voir dans le journal *Immunity* de 2014 ces points de recommandations (Murray et al., 2014).

En définitive, ***les macrophages de type M1 / classiques*** se caractérisent par leur capacité à générer des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, l'IL-12 et IL-23). Les macrophages classiques ont des propriétés antimicrobiennes essentielles pour la protection de l'hôte contre les virus et les bactéries intracellulaires lors d'infections ou de tumeurs aiguës. Ils induisent une production accrue d'intermédiaires réactifs de l'oxygène tels que les oxydes nitriques (NO) ou des intermédiaires (ROI) (Sica et al., 2008) ; (Martinez and Gordon, 2014). Ils permettent l'induction de la réponse Th1. L'IFN- γ , le LPS et le GM-CSF participent à la polarisation des macrophages classiques M1. Bien que les macrophages produisent de l'IFN- γ , les lymphocytes Th1 en sont les principales sources dans l'organisme. Les macrophages ainsi contrôlés, vont coder pour des gènes récepteurs de cytokines, ce qui va permettre d'activer les cellules immunes et des molécules d'adhésion. Le LPS promeut également l'activation des macrophages par le récepteur TLR4.

En revanche, ***les macrophages de type M2 / alternatifs***, sont importants dans la réparation tissulaire (Mantovani et al., 2013a), bien qu'ils soient également impliqués dans des maladies (Ojalvo et al., 2010) ; (Feig et al., 2012). Les macrophages alternatifs M2 sont caractérisés par leur capacité à générer des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-13, IL-10, récepteur IL-1 « decoy »). Ils sont impliqués dans le remodelage des tissus (en partie par le TGF- β). Ces macrophages induisent la réponse Th2 et ils ont une forte efficacité à la phagocytose.

Tableau 6 : Signature fonctionnelle des macrophages M1 et M2 d'après (Shapouri-Moghaddam et al., 2018)

Phenotype	Stimuli	Marqueurs d'expression cellulaires	Cytokines, chimiokines et autres facteurs de sécrétions	Fonctions
M1	IFN- γ TNF- α , LPS	CD80, CD86, CD68, CMHII, IL-1R, TLR4, IL-10 low, IL-12 high	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5, ROS	Réponse Th1 Pro-inflammatoire Résistance aux tumeurs
M2a	IL-4, IL-13	MR (CD206), IL-1ra, il-1RII	IL-10, TGF- β CCL17, CCL18,CCL22,CCL24	Remodelage tissulaire Anti-inflammatoire
M2b	Immuns-complexe Ligands TLR, IL-1 β	IL-10 high,IL-12 low, CD86	TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL1	Activation Th2 Immunoregulation
M2c	IL-10, TGF- β , glucocorticoïdes	MR (CD206), TLR1, TLR8	TGF- β , IL-10, CCL16, CCL18, CXCL13	Phagocytose des Cellules apoptotiques
M2d	Ligands TLR Adenosines	VEGF, IL-12 low, TNF- α low, IL-10 high	IL-10, VEGF	Angiogenèse Progression tumorale

Les macrophages alternatifs M2 ont été divisés en sous-types : M2a, M2b, M2c, M2d, et ce, sur la base de leurs stimuli, et de leurs changements transcriptionnels (Mantovani et al., 2004a) ; (Rószler, 2015) ; (Shapouri-Moghaddam et al., 2018) **Tableau 6**. Cependant, il semblerait que ces sous-types possèdent des caractéristiques communes comme : la production élevée d'IL-10, et de faible niveau d'IL-12 (Mantovani et al., 2004a).

La polarisation **M2a** est souvent appelée « macrophages de cicatrisation » (Forbes and Rosenthal, 2014), liée à la réponse Th2, cette polarisation est stimulée par l'IL-4, l'IL-13, les champignons et les parasites. En effet, les lymphocytes Th2, les éosinophiles, les basophiles et les macrophages produisent de l'IL-4 et sont importants pour lutter et éliminer les parasites.

Les macrophages de la polarisation **M2b** sont activés par des immuns complexes et des récepteurs du TLR ou de l'IL-1. Par la suite ces macrophages régulent la réponse immune et produisent de l'IL-10. De plus, ils induisent la différenciation des Th2 et la production d'anticorps (Anderson and Mosser, 2002). La production d'IL-10 et la présentation des antigènes sont dès lors augmentées (MHCII, CD86), alors que la production d'IL-12 est diminuée.

Quant aux macrophages **M2c**, ils sont stimulés par la production d'IL-10, de TGF- β ou par les glucocorticoïdes (Brundu S, 2015). Ces macrophages contribuent au remodelage tissulaire et à la production de la matrice extracellulaire. Ils se caractérisent également par la baisse des cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation de leur activité de « scavenger ».

Enfin, Wang et ses collaborateurs, ont dénommé un autre sous-type de M2 : le **M2d**. Ils comparent ce sous-type aux M2a / M2c décrits par (Mantovani et al., 2004a). Ces macrophages seraient dérivés des monocytes circulants, recrutés au site de la tumeur par des facteurs chimio-attractants comme : le CCL2 (MCP-1), le M-CSF et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Mantovani et al., 2004b). Ces macrophages seraient caractérisés par une faible production d'IL-12 et une forte production d'IL-10. Bien que l'on ne connaisse pas clairement les facteurs qui induisent les « Tumor-Associated Macrophages » (TAMs), Duluc et al, démontrent que ce sous-type cellulaire est activé par les adénosines, l'IL-6 de pair avec le M-CSF (Duluc et al., 2007). En fait, ce sous-type M2d possède des caractéristiques spécifiques similaires aux macrophages associés aux tumeurs (TAMs) (Wang et al., 2010) ; ils induiraient par conséquent l'angiogenèse pour réguler le maintien et la progression de la tumeur (Rhee, 2016).

Finalement comment se définissent les « Tumor-Associated Macrophages » (TAMs) ?

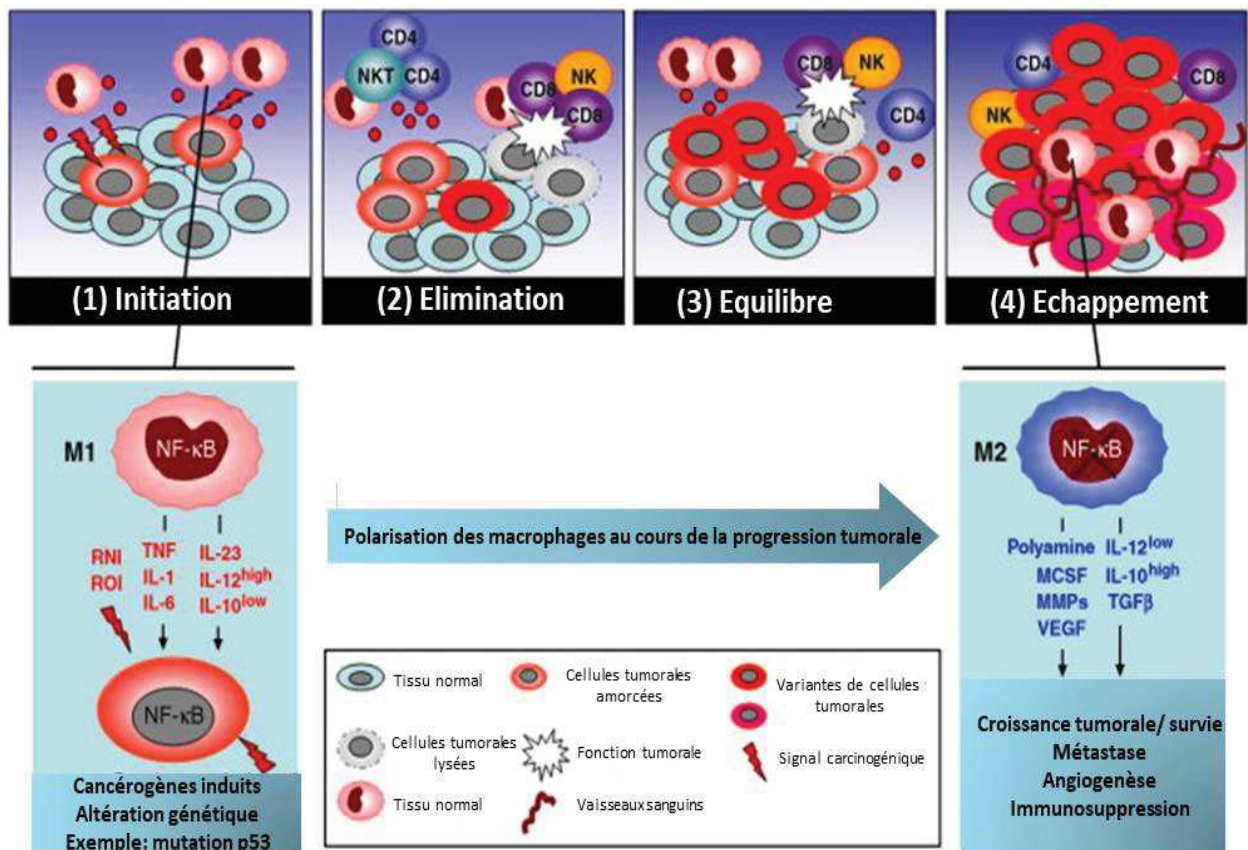


Figure 50 : Switch graduel des macrophages classiques M1 via les macrophages alternatifs M2 pour les « Tumor-Associated Macrophages » (TAMs) d'après (Mantovani and Sica, 2010). Les monocytes circulants dérivés des progéniteurs de la moelle osseuse sont recrutés sur le site de la tumeur par les chimiokines et les cytokines sécrétées par les cellules tumorales et stromales. Dans le micro-environnement de la tumeur, les monocytes sont différenciés et polarisés en macrophages classiques M1 et en TAM par les cytokines produites par les cellules tumorales et stromales (notamment le M-CSF, l'IL-10 et le TGF-β). Les TAMs jouent un rôle important dans la promotion de l'angiogenèse et de l'invasion des tumeurs en libérant diverses cytokines dont le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF), le « Transforming Growth Factor-β » (TGF-β) et les métalloprotéases matricielles (MMPs).

En fait, certains macrophages de phénotypes ambigus comme les macrophages isolés des tumeurs sont appelés « Tumor-Associated Macrophages » (**TAMs**) (Mantovani et al., 1992). D'après la littérature, les TAMs peuvent exercer une double influence sur la croissance et la progression des tumeurs. D'après Mantovani, c'est au cours de la progression de la tumeur, à un stade avancé, que les TAMs s'orientent généralement vers un phénotype de type M2. Il caractérise les TAMs, par un phénotype où, l'IL-12 est faiblement exprimé et l'IL-10 fortement exprimé, et ce, tout en ayant une faible activité anti-tumorale. Ces TAMs ont des ressemblances avec les macrophages alternatifs M2 dans le sens où, les TAMs permettent également la régénération et le développement tissulaire. En revanche, ils induisent la progression des cancers (Sica et al., 2008) ; (Mantovani and Sica, 2010) ; (Galdiero et al., 2018) **Figure 50**.

Les réactions inflammatoires et l'infiltration des macrophages peuvent favoriser la progression des tumeurs, ce qui suggère que les molécules et les cellules impliquées dans la tumorigenèse induite par les TAMs, pourraient représenter de nouvelles thérapies en cancérologie (Sica et al., 2008) ; (Brundu S, 2015). Finalement, les TAMs produisent des taux élevés de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β) et de faible niveau de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-1, TNF- α , IL-6) (Sica et al., 2000).

Pour conclure sur la nomenclature liée au micro-environnement des macrophages, un ensemble de molécules de communication est au cœur du rôle des macrophages en tant que cellules sentinelles du système immunitaire (Arango Duque and Descoteaux, 2014a). Ce qui implique que l'activation des macrophages soit dépendante de leur environnement.

2- Les molécules de communication impliquées dans les polarisations

Mantovani et ses collaborateurs dressent un « portrait » des plus importantes cytokines et chimiokines qui fluctuent au cours de l'activation environnementale des macrophages. Ce « portrait » ne présente pas ces acteurs comme étant un différentiel entre la polarisations classique M1 et la polarisation alternative M2, mais plutôt comme un continuum (Mantovani et al., 2004a). En effet, ils nous démontrent que l'activation des macrophages est associée à de profonds changements dans les profils d'expression des gènes. L'exposition aux différents stimuli dérivés des tissus induit des profils de polarisation distincts, associés à l'expression de molécules sélectionnées.

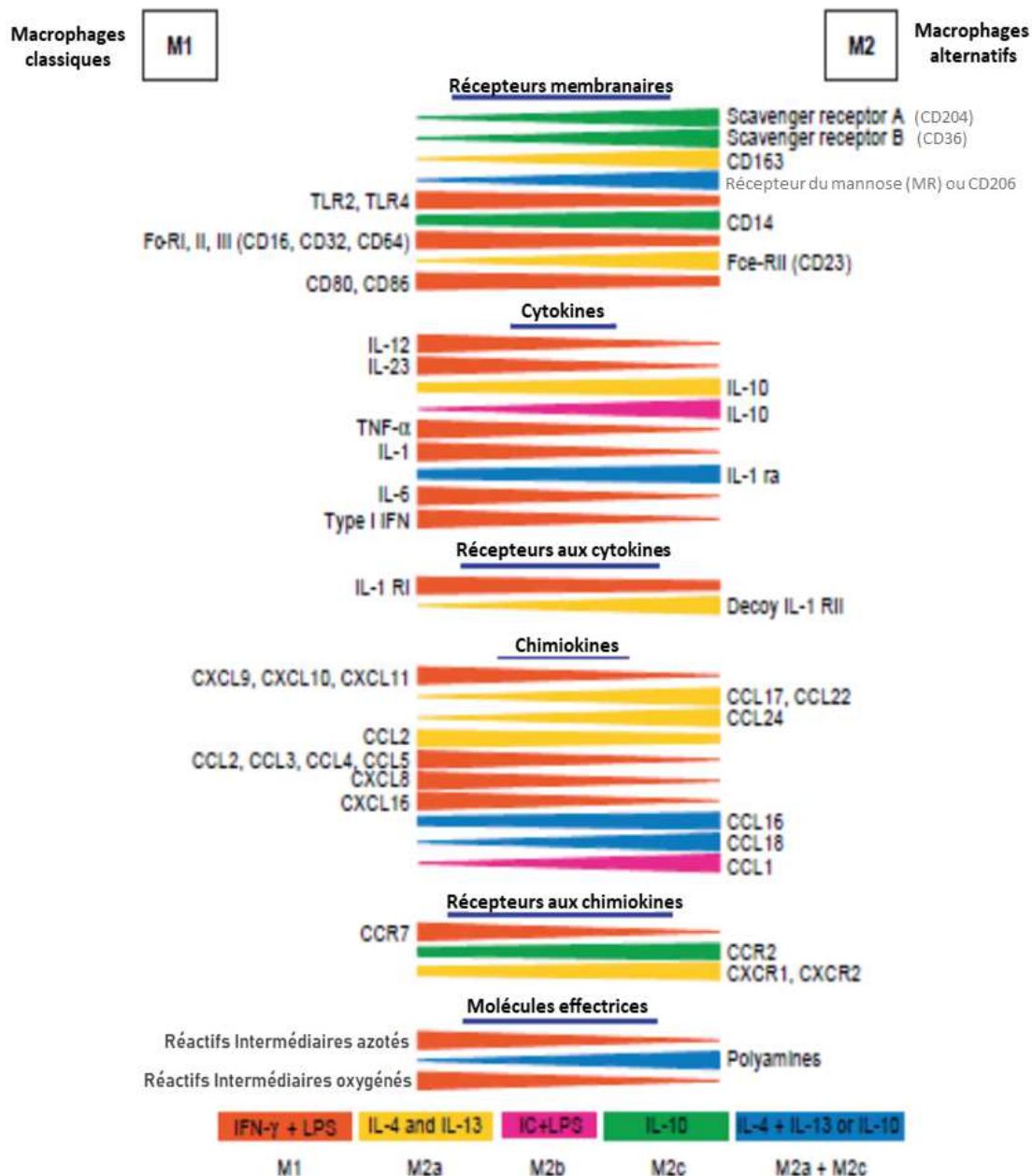


Figure 51 : Inducteurs et propriétés fonctionnelles sélectionnés des différentes populations de macrophages polarisés d'après (Mantovani et al., 2004a). D'après Mantovani l'activation classique M1 des macrophages est induite par l'exposition à l'IFN-γ et au LPS, elle est associée à un ensemble distinct de molécules (en rouge). Les différentes formes d'activation alternative M2 sont liées aux différents stimuli. Ces formes alternatives possèdent des profils moléculaires distincts. L'IL-4 et l'IL-13 induisent le profil M2a (jaune), les complexes associés au LPS induisent le profil M2b (magenta), et l'IL-10 induit le profil M2c (vert). Les molécules communes aux macrophages M2a et M2c (induites à la fois par l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10) sont indiquées en bleu.

Donc d'une manière générale, l'activation des macrophages *classiques* / **M1** est associée à un ensemble de molécules distinctes, qui se trouvent fortement exprimées. On distingue **(1)** des récepteurs de membrane impliqués dans la réponse immunitaire innée (TLR2, TLR4) et des « Cluster de Différenciation » (CD16, CD32, CD64, CD80, CD86) ; **(2)** des cytokines (IL-12, IL-23, TNF- α , IL-1, IL-6, IFN de type I) ; **(3)** des récepteurs aux cytokines (IL-1 RI) ; **(4)** des chimiokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL8, CXCL16, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5) ; **(5)** des récepteurs aux chimiokines (CCR7) ; **(6)** des molécules effectrices comme les intermédiaires réactifs de l'oxygène tels que les oxydes nitriques ou des intermédiaires. Ainsi, suite à l'activation des macrophages en M1, l'ensemble des molécules vont participer à la réponse des lymphocytes T helper de type 1 (Th1) et Th17 (Sica and Mantovani, 2012) ; (Arnold et al., 2015) pour *in fine* éliminer les micro-organismes en produisant de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires **Figure 51**.

En revanche, d'après Mantovani et ses collaborateurs, l'activation des macrophages *alternatifs* / **M2**, d'une manière générale est également associée à un ensemble de molécules dont le niveau d'expression diffère en fonction du sous-type de M2. En effet, le *sous-type M2a* stimulé par l'IL-4 et l'IL-13 exprime fortement les molécules comme par exemple **(1)** des récepteurs membranaires (CD163, CD23) ; **(2)** des cytokines (IL-10) ; **(3)** des récepteurs aux cytokines (IL-1 « decoy ») ; **(4)** des chimiokines (CCL17, CCL22, CCL24) ; **(5)** des récepteurs aux chimiokines (CXCR1, CXCR2). Quant au *sous-type M2b* stimulé par les immuns complexes et le LPS, ils exprimeraient fortement la cytokine IL-10 et la chimiokine CCL1. Alors que le *sous-type M2c* qui, quant à lui est stimulé par l'IL-10, exprimerait fortement **(1)** des récepteurs membranaires responsables de la dégradation des lipoprotéines et du métabolisme du cholestérol (« scavenger receptor » de classe A : CD204) (Kelley et al., 2014), (« scavenger receptor » de classe B : CD36) (Febbraio et al., 2001) ; **(2)** le CD14 et **(3)** le récepteur à la chimiokine CCR2. Et enfin, le *sous-type M2d* exprimerait quant à lui fortement le « Mannose Receptor » (MR) / CD206, la cytokine IL-1RA et les chimiokines CCL16, CCL18.

Bien que d'autres auteurs comme Duque et al, (dans la revue *Frontier in immunology 2014*) ne discutent pas d'une manière aussi détaillée l'ensemble des molécules de communication impliquées lors de la polarisation des macrophages, ces auteurs se rejoignent. En effet, ils sont en accord pour affirmer que, suite aux différentes activations des sous-types de macrophages alternatifs M2, l'ensemble des molécules exprimées vont permettre une réponse accrue des lymphocytes Th2, des éosinophiles et des basophiles (sous-type M2a) (Arango Duque and Descoteaux, 2014b).

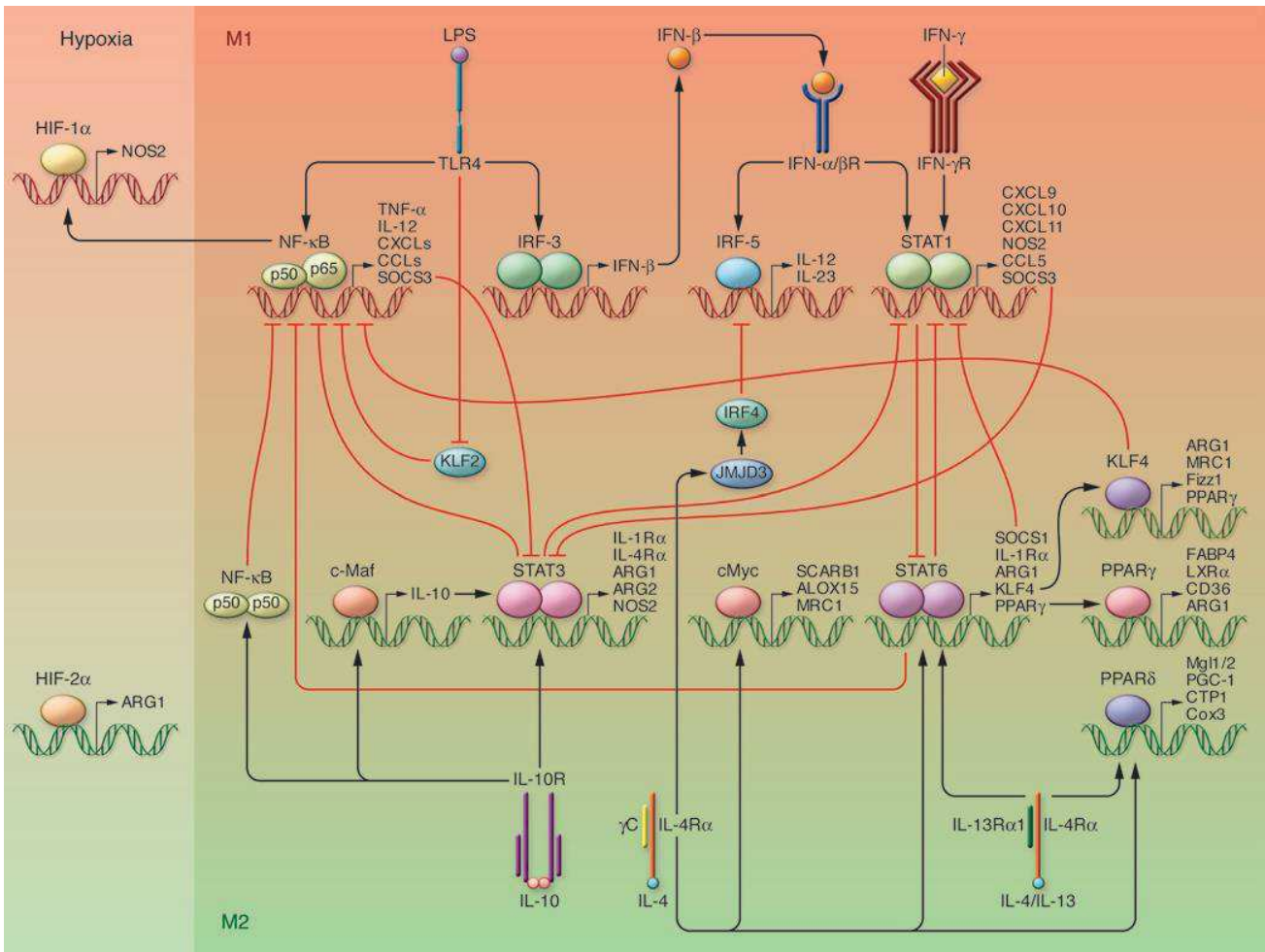


Figure 52 : Les principales voies moléculaires de la polarisation des macrophages d'après (Sica and Mantovani, 2012). Illustration de la complexité de la communication intracellulaire. Par ce schéma, Sica et ses collaborateurs nous présentent le « cross talk » complexe existant entre les déterminants moléculaires M1 et M2. L'équilibre entre l'activation de STAT1 et STAT3/STAT6 régule finement l'activité et la polarisation. Une prédominance de l'activation NF-κB et STAT1 favorise la polarisation des macrophages en M1, entraînant des effets et des fonctions cytotoxiques et inflammatoires. En revanche, une prédominance de l'activation STAT3 et STAT6 entraîne une polarisation des macrophages en M2, associée à une immunosuppression et la progression des tumeurs. Par ailleurs, les « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor » (PPAR-γ et PPAR-z) contrôlent des aspects distincts de l'activation des macrophages M2 et du métabolisme oxydatif. De plus, les « Krüppel-Like Factor » (KLF4 et KLF2) participent à l'induction des fonctions M2 en coopérant avec STAT6 et en inhibant la transcription dépendante respectivement de NF-κB / « Hypoxia-Inducible Factor » (HIF-1α). Enfin, l'IL-4 qui induit la polarisation M2 va inhiber la polarisation M1 via l'IRF5, de plus la fixation de l'IL-10 à son récepteur va induire l'activation de l'homodimère NF-κB p50 et STAT3 en faveur de la polarisation M2.

De plus, les macrophages du sous type M2b vont également favoriser le recrutement des éosinophiles mais également celui des lymphocytes T régulateurs (T reg) qui favoriseront une réponse Th2. Quant au sous-type M2c, qui sécrète de l'IL-10, son rôle immunosuppresseur va promouvoir le développement des lymphocytes Th2 mais également des T régulateurs. Le fait que ce sous-type puisse induire à la fois les T reg et promouvoir la régénération tissulaire ainsi que l'angiogenèse, font que ces macrophages M2c sont beaucoup plus efficaces que les macrophages M2b. Ces propriétés assurent une protection des organes contre les lésions causées par les infiltrats inflammatoires (Lu et al., 2013).

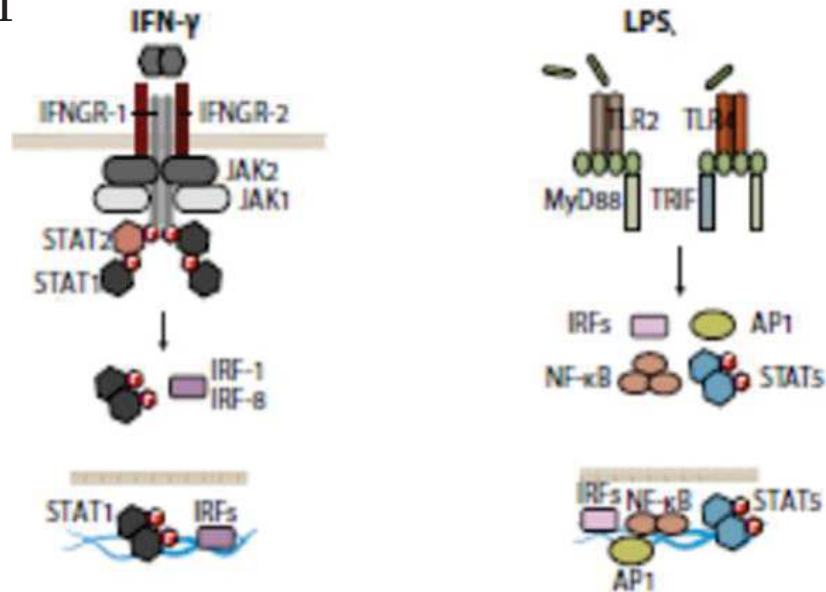
Pour conclure sur les molécules de communication impliquées lors de la polarisation des macrophages, il faut encore une fois souligner l'importance du micro-environnement qui, comme cela vient d'être discuté, régit l'interconversion des macrophages classiques et alternatifs (Wynn et al., 2013). En effet, il est de plus en plus évident que les mécanismes qui régissent la transformation des macrophages pro-inflammatoires en macrophages anti-inflammatoires peuvent avoir un impact sur les cancers ainsi que sur d'autres maladies inflammatoires chroniques (Mege and Capo, 2010). Par conséquent, les macrophages pro-inflammatoires et anti-inflammatoires doivent être en équilibre pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire.

Par ailleurs, il ne faut pas omettre que faisant suite aux stimuli cellulaires, de nombreux facteurs de transcription clés, s'activent en cascade à l'intérieur des cellules pour ensuite permettre la synthèse des protéines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. En effet, Mantovani et al, mettent en évidence les récepteurs et les principaux médiateurs de signalisation intracellulaire communs entre la polarisation classique et alternative (Mantovani et al., 2004a). Sica et ses collaborateurs nous schématisent la complexité de la communication intracellulaire entre les déterminants moléculaires M1 et M2. En effet, ils nous montrent qu'il existe un « cross talk » entre les polarisations, ce qui permet ainsi, de contrôler finement l'équilibre (Sica and Mantovani, 2012) **Figure 52**.

Il est évident, que depuis un certain nombre d'années les connaissances progressent et les voies de signalisation qu'impliquent les polarisations classique et alternative, deviennent de plus en plus précises et complexes comme le montre la figure ci-contre **Figure 52**.

Ainsi, de nombreux déterminants moléculaires sont impliqués dans la polarisation des macrophages.

M1



M2

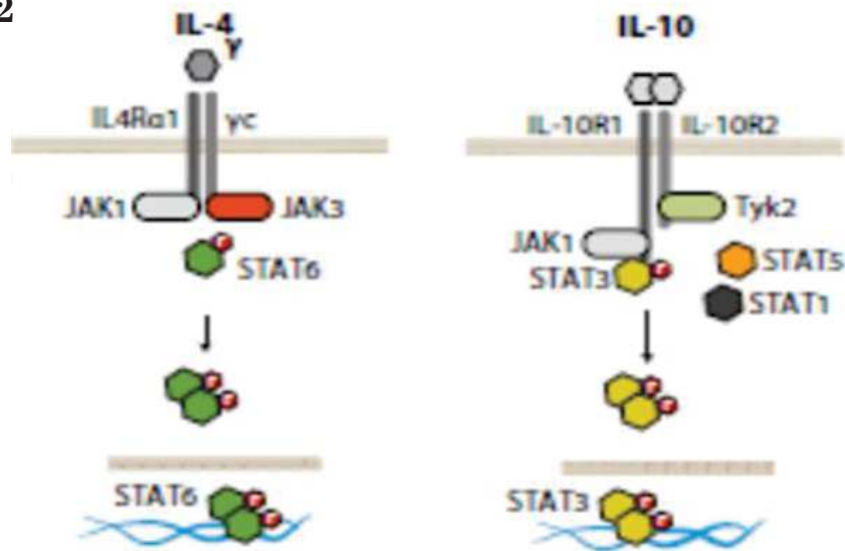


Figure 53 : Les déterminants moléculaires de la polarisation des macrophages d'après (Mantovani et al., 2004a). Les « InterFeroN Gamma Receptor » (IFNGR-1 / IFNGR-2) forment les récepteurs de l'IFN-γ. Les récepteurs recrutent les adaptateurs Janus Kinase (JAK-1 et JAK -2) qui activent le « Signal Transducers and Activators of Transcription 1 » (STAT1) et les « Interferon Regulatory Factors » (IRF-1 et l'IRF-8). Les principaux médiateurs de la signalisation induits par l'IFN-γ sont STAT1, JAK2 et IRF1. Quant aux stimuli M2, ils sont reconnus par trois paires de récepteurs différents. En effet, on distingue l'IL-4Ra1 qui se couple avec la chaîne commune gamma (γc), et permet la liaison de l'IL-4 avec la chaîne IL13Ra1 ; d'où la possibilité de stimuler une polarisation M2 à la fois par l'IL-4 et/ou l'IL-13. Ainsi, la liaison du récepteur de l'IL-4 active JAK1 et JAK3, ce qui entraîne l'activation et la translocation nucléaire de STAT6. De plus, les stimuli IL-10 (sous-type M2c), vont activer le récepteur de l'IL-10, qui est un dimère IL-10R1 / IL-10R2 ; ce dimère va s'autophosphoryler et va permettre la liaison au facteur de transcription STAT3. La translocation nucléaire de STAT3 va inhiber l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

3- Les déterminants moléculaires de la polarisation

Ces déterminants moléculaires vont permettre la signalisation intracellulaire et sont, pour la majorité des facteurs de transcription qui interagissent et régulent la conversion des macrophages en différents phénotypes. Dans les paragraphes qui suivent, je vais discuter des déterminants moléculaires de la polarisation en m'appuyant sur les démonstrations de Mantovani et al, (Mantovani et al., 2004a) ; reprises par Martinez et Gordon (Martinez and Gordon, 2014) **Figure 53**.

▣ *Stimuli M1*

Les « InterFeroN Gamma Receptor » (IFNGR-1 / IFNGR-2) forment les récepteurs de l'IFN- γ . Ces récepteurs recrutent les adaptateurs Janus Kinase (JAK) -1 et -2, qui vont activer le « Signal Transducers and Activators of Transcription-1 » (STAT1), mais également les facteurs de régulation de l'interferon (« Interferon Regulatory Factors » IRF) comme l'IRF-1 et l'IRF-8 (Hu and Ivashkiv, 2009). Ainsi, les principaux médiateurs de la signalisation induite par l'IFN- γ sont STAT1, JAK2 et IRF1. Bien que, l'IFN- γ soit inclus avec le LPS dans le paradigme M1/M2, les profils d'expression génétiques de la combinaison des deux, sont différents si l'on prend le LPS ou l'IFN- γ individuellement (Nau et al., 2002) ; (Martinez et al., 2006). Par ailleurs, comme préalablement mentionné, le LPS est le signal de la polarisation M1 le mieux étudié et se trouve reconnu par le TLR4. Au final, ce signal induit des profils contrôlés par le NF- κ B, la protéine activatrice (AP-1), STAT1 et les IRF qui participent à la réponse de l'IFN (Hu and Ivashkiv, 2009).

▣ *Stimuli M2*

En revanche, les stimuli M2 sont issus initialement de l'IL-4 et sont principalement regroupés sur leurs capacités à antagoniser les réponses inflammatoires. Toutefois, comme pour les stimuli M1, la nature des stimuli M2, le rôle de leurs récepteurs et les voies de signalisation diffèrent. En effet, comme énoncé précédemment, l'IL-4 est produit par les lymphocytes Th2, les éosinophiles, les basophiles ou par les macrophages eux-mêmes. L'IL-4 se trouve reconnu par trois paires de récepteurs différents **Figure 53**. En effet, on distingue l'IL-4Ra1 qui peut se coupler avec la chaîne commune gamma (γ c), permettant la liaison de l'IL-4 avec la chaîne IL13Ra1 ; d'où la possibilité de stimuler une polarisation M2 à la fois par l'IL-4 et / ou l'IL-13 (sous-type M2a). Ainsi, la liaison du récepteur de l'IL-4 active JAK1 et JAK3, entraînant

l'activation et la translocation de STAT6 (Martinez and Gordon, 2014). Par ailleurs, les stimuli IL-10 (sous-type M2c), vont activer le récepteur IL-10, qui est un dimère IL-10R1 / IL-10R2 ; ce dimère va s'autophosphoryler permettant au facteur de transcription STAT3 de se lier. La translocation de STAT3 au noyau va permettre d'inhiber l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

Pour conclure, le « cross talk » complexe qui existe entre les déterminants moléculaires, doit permettre une balance entre la polarisation M1(STAT1 et NF-kB) inducteur des fonctions cytotoxiques et d'inflammations ; et la polarisation M2 (STAT3 et STAT6) inducteur de la suppression immune et la progression tumorale (Sica and Bronte, 2007). De ce fait, la persistance d'une régulation fine des macrophages classiques et alternatifs doit être sans faille, pour le maintien de l'efficacité homéostatique.

Les trois voies majeures que sont le NF-kB, les MAP kinases et le JAK/STAT sont à l'origine de nombreux travaux pour comprendre leur mode de fonctionnement. Ces travaux ont permis de mieux comprendre de nombreux phénomènes biologiques et notamment leurs implications dans la pathogenèse des maladies inflammatoires. Il est de plus en plus évident que les mécanismes qui régissent la transformation des macrophages pro-inflammatoires (M1) en macrophages anti-inflammatoires (M2) peuvent avoir un impact majeur sur la progression de nombreuses maladies inflammatoires chroniques.

4- La polarisation des macrophages dans les inflammations chroniques

Comme je viens de le discuter, la polarisation des macrophages représente un continuum de cellules effectrices hautement plastiques, ressemblant à un spectre de divers états phénotypiques. Bien que les macrophages aient un rôle dans la réparation tissulaire (Murray and Wynn, 2011), ils sont des acteurs majeurs dans la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques inflammatoires. Les macrophages sont par conséquent impliqués dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Udalova et al., 2016) et les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, colite ulcéreuse) (Duclos, 2017). Dans ces maladies, il existe un déséquilibre en faveur d'une polarisation de macrophages pro-inflammatoires au détriment de la polarisation de macrophages anti-inflammatoires. Et comme les macrophages classiques M1 sont d'importantes sources de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23), ils ont été identifiés comme d'importants médiateurs en partie responsables de ces inflammations chroniques.

▣ *Polarisation associée à la polyarthrite rhumatoïde (PR)*

Dans la PR, le processus inflammatoire est initié par les macrophages. Par exemple, l'IL-6, l'IL-1, l'IL-17 et le TNF α sont produits en abondance et sont responsables de l'inflammation et de la destruction tissulaire (os et cartilages). C'est tout particulièrement l'excès de TNF qui déclenche en cascade, les effets inflammatoires néfastes pour les articulations (Meyer, 2003). L'action de ces cytokines produites à la fois par les macrophages et les cellules immunes recrutées, contribuent à maintenir l'inflammation.

En conséquence, la dérégulation de la polarisation des macrophages responsables de la synthèse de ces médiateurs, joue un rôle majeur dans la pathogenèse de la (PR) (Buchan et al.). De plus, il semblerait que l'augmentation du nombre de macrophages dans la membrane synoviale soit un signe précoce de la maladie rhumatismale active (Udalova et al., 2016). Le nombre élevé de macrophages pro-inflammatoires serait une caractéristique importante dans les lésions inflammatoires. Ainsi, le degré d'infiltration des macrophages polarisés M1 dans la membrane synoviale serait en corrélation avec le degré d'érosion des articulations. Le TNF- α fonctionnerait comme un déclencheur important de la PR, tandis que l'IFN- γ et le TNF- α seraient des inducteurs de la production de l'IL-12 et de l'IL-18. Quant à l'IL-23, il favoriserait conjointement l'inflammation et l'auto-immunité (Udalova et al., 2016).

Par ailleurs, bien que l'hétérogénéité des populations dans la PR n'ait pas été entièrement caractérisée, d'après Udalova et ses collaborateurs, de nombreuses études ont mis en évidence un niveau d'hétérogénéité étonnamment élevé, de par les origines et les fonctions de ces populations de macrophages. De plus, Udalova et al, soulignent également un rôle des facteurs environnementaux dans la spécialisation fonctionnelle.

En accord avec les observations d'Udalova, Siouti et son collègue Andreakos, démontrent que, bien que la polarisation des macrophages responsables de la physiopathologie de la PR soit due aux cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et l'IL-1 β , il semblerait qu'il y ait également la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 en faveur des réponses immuno-régulatrices et protectrices en liaison avec la présence de macrophages polarisés M2 (Majoska HM et al., 2018). Ce qui suggère l'existence de macrophages polarisés ayant des activités fonctionnelles distinctes et diverses (Siouti and Andreakos, 2019). Selon les auteurs, bien que les fondements de ce phénomène soient restés obscurs pendant des années, de nouvelles preuves permettent de mieux comprendre les mécanismes et les processus moléculaires mis en jeu.

Finalement, l'élucidation des mécanismes moléculaires qui entraînent la polarisation des macrophages vers des phénotypes pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires pourrait conduire à l'identification des voies de signalisation qui éclaireraient les futures stratégies thérapeutiques.

Notons que les traitements actuels pour la PR représentent des traitements de fond ayant pour objectif de stopper l'évolution de la maladie. Il existe des traitements de fond dit conventionnels tels que : des immunosuppresseurs qui altèrent la réponse chimiotactique des neutrophiles et inhibent l'activité des lymphocytes TCD4 comme le méthotrexate par exemple, des inhibiteurs de la famille Janus Kinases (JAK) comme le tofacitinib qui entraîne l'inhibition des JAK1 et JAK3 atténuant ainsi la signalisation des interleukines (IL-2, -4, -6, -7, -9, -15 et -21). Mais il existe d'autres traitements comme les biothérapies visant principalement à bloquer des mécanismes importants de l'inflammation comme par exemple les anti-TNF α (l'infliximab), les inhibiteurs de l'IL-1 (l'anakinra), les inhibiteurs de l'IL-6 (le tocilizumab). Enfin, il existe des traitements dit biologiques tels que des inhibiteurs des lymphocytes B (le Rituximab) et des lymphocytes T (l'abatacept). En revanche, il existe une grande hétérogénéité chez les patients et influe sur la réponse aux traitements, il est par conséquent nécessaire de développer de nouvelles stratégies pour fournir une médication spécialisée d'où l'intérêt probable de la nouvelle molécule ABX.

▣ Polarisation associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Il est bien connu que tout changement dans la composition du pool cellulaire et le microbiote intestinal perturbe l'homéostasie intestinale.

Dans les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), il a été observé une accumulation de macrophages polarisés pro-inflammatoires. La capacité de ces cellules à produire de grandes quantités de médiateurs chimiques tels que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α , distingue bien ces populations par rapport aux populations trouvées dans un intestin sain (Bain and Mowat, 2014). La polarisation des macrophages responsables de la production d'IL-23 et d'IL-17 joue un rôle primordial notamment dans la maladie de Crohn. La dérégulation de la polarisation des macrophages dans la production excessive de ces médiateurs pro-inflammatoires, va entraîner le recrutement d'autres cellules de l'inflammation, surexprimer des molécules d'adhésion, puis entraîner un déséquilibre entre les cellules pro-inflammatoires et les cellules régulatrices.

La maladie de Crohn par exemple, est caractérisée par un dysfonctionnement du système immunitaire inné, ce qui entraîne une destruction inflammatoire médiée par un axe pathogénique lymphocytes Th1/ IL-12 et lymphocytes Th17/IL-23 avec la production d'IFN- γ , de TNF α et d'IL-17 (Strober et al., 2010). Cet axe inflammatoire à forte teneur en IL-12 est en déséquilibre avec la polarisation macrophagique responsable des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β). Ce déséquilibre entraîne un appauvrissement des cytokines anti-inflammatoires dans les muqueuses intestinales. Bien que la maladie soit également associée à des mutations génétiques, Maeda et ses collaborateurs, ont démontré une corrélation entre l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , l'IL-1 β , l'IL-12) et l'augmentation du facteur de transcription NF-kB par les macrophages polarisés de la muqueuse intestinale (Maeda et al., 2005). Cet environnement inflammatoire est propice à une activation de la polarisation classique M1 des macrophages, avec une surexpression des cytokines pro-inflammatoires (Bouma and Strober, 2003).

Finalement, le ciblage thérapeutique des macrophages polarisés M1 ou encore l'augmentation des réponses, par le biais des macrophages polarisés M2 pourraient permettre de contrôler cette maladie inflammatoire chronique.

Actuellement, les traitements correspondent à des traitements de fond et un traitement de crise. Le premier est destiné à prévenir l'apparition des poussées et prolonger les phases de rémission. Le second permet d'écourter la durée des poussées inflammatoires et de limiter les symptômes. Par exemple lors des poussées sont prescrits les anti-inflammatoires comme le 5-aminosalicylés (5-ASA) et les corticoïdes. En traitement de fond, les immunomodulateurs sont prescrits pour réguler l'immunité et réduire l'inflammation à long terme comme le méthotrexate. Enfin, les biothérapies comme les anti-TNF α qui bloquent spécifiquement le TNF α (l'infliximab), ainsi que l'anticorps monoclonal qui cible l'intégrine α 4- β 7 (le vedolizumab) sont utilisés à ce jour pour la maladie de Crohn et la rectocolite ulcéreuse (Holmer and Singh, 2019). Ces derniers sont réservés aux formes sévères et résistantes aux autres traitements. Mais depuis ces dernières années, les stratégies thérapeutiques visent à réguler le microbiote intestinal (Yue et al., 2020).

Pour conclure sur ce troisième chapitre, les monocytes qui migrent dans les tissus en réponse à une infection peuvent se différencier en macrophages spécifiques du tissu concerné. Tout comme les monocytes, les macrophages peuvent jouer plusieurs rôles. Certains macrophages sont des résidents tissulaires de longue durée et jouent un rôle important dans la régulation, la réparation et la régénération du tissu correspondant. D'autres macrophages participent à la réponse innée et subissent un certain nombre de changements importants

lorsqu'ils sont stimulés avec l'agent pathogène ou des lésions tissulaires. Ces macrophages inflammatoires jouent un double rôle dans le système immunitaire en tant que phagocytes efficaces, qui contribuent à éliminer les pathogènes des tissus. En outre, ces macrophages sont représentés en tant que cellules présentatrices d'antigènes, capables d'activer les lymphocytes T helper.

Enfin, quand les macrophages sont activés par l'action des stimuli environnants, ils acquièrent une polarisation qui leur confère des phénotypes et des fonctions distinctes. Bien qu'un continuum de macrophages pro-inflammatoires via des macrophages anti-inflammatoires soit régulé, le maintien d'une homéostasie passe également par un ensemble de déterminants moléculaires. Par conséquent, tout déséquilibre peut induire des pathologies. Il est évident que ces polarisations doivent être contrôlées et régulées pour qu'il n'y ait pas une production excessive d'une polarisation à l'autre, au risque d'induire des maladies inflammatoires chroniques, auto-immunes voire des cancers.

Et bien heureusement, plusieurs types de contrôles moléculaires permettent de réguler à la baisse les réponses inflammatoires des macrophages polarisés. En effet, il s'agit notamment de régulateurs négatifs de la signalisation, je cite par exemple (i) les récepteurs solubles des TLR, qui agissent comme des récepteurs leurres (sTLR2, sTLR4) (Liew et al., 2005), (ii) des facteurs d'activation de transcription, qui peuvent réprimer l'expression des gènes comme par exemple : « Suppressor of cytokine signaling protein1 » (SOCS1). SOCS1 agit tel un inhibiteur du système de transduction JAK/STAT et de l'IL-6 (Liau et al., 2018) , mais il existe également (iii) des molécules régulatrices endogènes (prostaglandine E2, résolvines et lipoxines), qui, d'origine lipidique, préviennent l'inflammation incontrôlée et participent à la résolution de l'inflammation (Hamidzadeh et al., 2017).

Par ailleurs, la régulation de l'activation des macrophages dans l'inflammation et l'auto-immunité s'effectue également au niveau transcriptionnel par des ARN non codants. En effet, par exemple, les micro-ARN (miARN) vont participer à la diminution des réponses inflammatoires.

Je vais à présent discuter cette régulation transcriptionnelle par les micro-ARN, dans le dernier chapitre qui suit.

Chapitre 4

Les micro-ARN : régulateurs des réponses inflammatoires

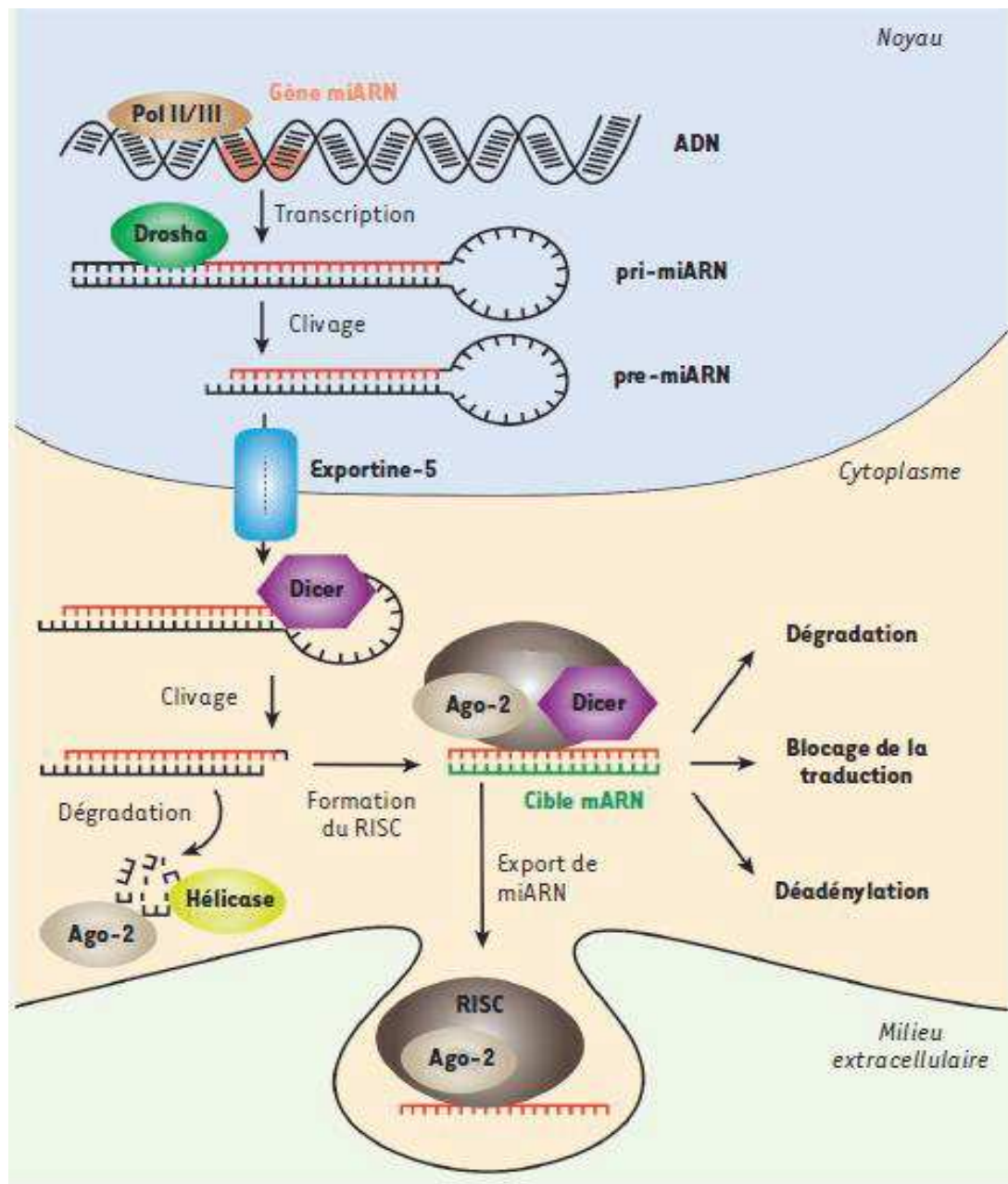


Figure 54 : Biogenèse et mécanisme d'action des miARN d'après (Jagot and Davoust, 2017). Les gènes codants les miARN sont transcrits par les ARN polymérase II et III. Les premiers miARN formés (**primary**-miARN), sont pris en charge par un complexe comprenant une RNase appelée Drosha ayant pour rôle de cliver l'extrémité double-brin du **pri**-miARN, cette première forme mature génère le **precursor**-miARN (**pré**-miARN). Ensuite, l'exportine-5 permet la translocation du pré-miARN vers le cytosol, où il sera clivé par une endonucléase appelée Dicer. Un des brins, dit brin passager, est dégradé, probablement par l'action concertée d'hélicases et de l'Argonaute 2 (Ago 2), tandis que le brin complémentaire, fonctionnel, est chargé sur le complexe « RNA Induced Silencing Complex » (RISC) formé de Dicer, et d'autres protéines. L'association du complexe RISC et d'un miARN permet le ciblage de (des) ARN messager(s) et conduit à l'inhibition de la traduction en protéine de l'ARN ciblé : (1) par dégradation de l'ARN messager (ARNm), (2) par blocage mécanique de la traduction (3) ou par déadénylation de l'ARN messager et leur dégradation ultérieure. Les miARN peuvent également être exportés vers d'autres cellules par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires pour exercer leurs effets.

Les deux premiers micro-ARN (lin-4 et let-7) ont été identifiés en 1993 (Grosshans and Filipowicz, 2008), mais ce n'est qu'au cours de ces dernières années, qu'il a été démontré que les micro-ARN (miARN) jouent un rôle important ; et ce, dans les maladies auto-immunes en régulant les fonctions des macrophages. Les miARN relient fonctionnellement divers mécanismes impliqués dans l'activation des macrophages et ils contribuent à l'initiation et à la résolution de l'inflammation. Il semblerait que ces derniers représenteraient des cibles diagnostiques et thérapeutiques prometteuses dans différentes conditions, telles que les maladies infectieuses, l'athérosclérose et le cancer (Wei and Schober, 2016). Par ailleurs, les cellules humaines expriment plus de 1000 miARN, chacun pouvant se lier à des centaines d'ARN messagers (ARNm), mais seule une petite fraction de ces interactions a été validée expérimentalement (www.mirBase.com).

I- Généralités sur les micro-ARN (miARN)

1- Biogenèse et mécanismes d'action des micro-ARN

Les micro-ARN (miARN) sont des petits ARN monocaténaire conservés au cours de l'évolution. Ce sont des molécules d'ARN non codantes contenant 18 à 24 nucléotides. Les miARN sont des opérateurs post-transcriptionnels qui régulent l'expression génique. Les miARN peuvent être produits à partir d'unités transcriptionnelles indépendantes, dans des clusters polycistroniques ou dans les introns de gènes codants pour des protéines (Bartel, 2004).

Les précurseurs de miARN sont d'abord transcrits par une ARN polymérase II ou III (Jagot and Davoust, 2017) dans le noyau **Figure 54**, sous la forme de longs précurseurs « **primary miARN** » (**pri-miARN**) où ils subissent une étape de maturation avant d'être exportés par l'exportine-5 dans le cytosol de la cellule. En effet, le pri-miARN est pris en charge par un complexe comprenant une RNase appelée Drosha qui clive alors l'extrémité double brin du pri-miARN pour générer un « **precursor-miARN** » (**pré-miARN**). Une fois dans le cytoplasme, les pré-miARN sont alors clivés par l'enzyme Dicer et pris en charge par le complexe « RNA induced silencing complex » (RISC) (Krol et al., 2010).

Les miARN associés au complexe RISC exercent ensuite leur action régulatrice dans le cytoplasme (Hartmann et al., 2004). En effet, quand le complexe RISC identifie l'ARN messager (ARNm) cible complémentaire ou partiellement complémentaire de la séquence du miARN, il entraîne généralement une dégradation de l'ARNm ou une inhibition de la traduction, voire une déadénylation (Camier and Séraphin, 2007). Ainsi, les micro-ARN peuvent influencer sur la régulation de l'expression des gènes cibles (Fabbri et al., 2007).

Tableau 7 : Micro-ARN gènes cibles et régulation de l'immunité d'après (Anglicheau et al., 2010)

Micro-ARN	Gène(s) cible(s)	Fonction et processus régulés
let-7e	TLR4	Régulation de l'immunité innée
miR-9	NF-κB1	Régulation de la réponse à l'inflammation
miR-16	TNFα	Fixation à des motifs ARE des régions 3' non traduites ; induit la dégradation du TNFα
miR-17-5p	RUNX1	Inhibition de la prolifération, de la différenciation et de la maturation des monocytes
miR-17~92 (cluster)	BIM, PTEN	Régulation de la transition de prolymphocytes à prélymphocytes des lignées B et T ; promotion de la survie des cellules B et T
miR-20a	AML-1	Inhibition de la prolifération, de la différenciation et de la maturation des monocytes
miR-21	PTEN, PDCD4, IL12A	Expression augmentée dans les macrophages en réponse à l'inflammation ; induit par les TLR ; régule négativement l'activation macrophagique
miR-32	PFV1, ORF2	Inhibition de la réplication de PFV1 en ciblant le génome viral
miR-34	JAG1, WNT1, FOXP1	Régule la différenciation des cellules dendritiques d'origine myéloïde
miR-106a	AML-1	Inhibition de la prolifération, de la différenciation et de la maturation des monocytes
miR-122	–	Requis pour la réplication du VHC
miR-121/miR-122	KIT	Régule la prolifération des cellules souches et des cellules progénitrices
miR-125b	TNFα	Diminue au cours de la réponse à l'inflammation, induisant ainsi la production de TNFα
miR-126	HOXA9, PLK2	Induit l'expansion des cellules progénitrices
miR-132	–	Régule la réponse immune aux infections bactériennes ; impliqué dans la voie de signalisation de CREB
miR-142	AC9	Réprimé par FOXP3, conduisant à une augmentation de la production d'AMPc et aux fonctions suppressives des cellules T régulatrices
miR-146a	TRAF6, IRAK1, IRAK2	Augmenté dans les macrophages et les cellules épithéliales en réponse à l'activation de TLR2, 4 et 5 ou à l'exposition au TNFα ou à l'IL-10 ; régule la réponse immune aux infections bactériennes
miR-150	Myb	Régule la production de lymphocytes B matures ; régule la transition de pro- à pré-B ; régule l'activation des lymphocytes T
miR-155	PU.1, MAF, SHIP1, AID, SOCS1, BACH1, CEBPB, CSFR, TAB2, JARID2	Régule la réponse immune aux infections bactériennes et virales ; induit par la signalisation des TLR ; régule TNFα ; requis pour les fonctions lymphocytaires normales, la réponse des centres germinatifs, la commutation de classe, la génération de plasmocytes, la polarisation Th1/Th2, le développement thymique des cellules T régulatrices, la prolifération des granulocytes et des monocytes
miR-181a	DUSP5, DUSP6, SHP2, PTPN22, BCL-2, CD69	Régule le développement des lymphocytes B et T ; module la sensibilité des lymphocytes T aux antigènes en régulant les niveaux d'expression de plusieurs phosphatases impliquées dans la signalisation du TCR
miR-181b	AID	Impliqué dans la commutation de classe des lymphocytes B
miR-196b	Famille HOX	Rôle fonctionnel en modulant l'homéostasie des cellules souches et l'engagement dans les voies de différenciation cellulaire
miR-223	MEF2C	Régulation de la granulopoïèse
miR-326	ETS1	Promotion du développement des cellules T _H 17
miR-424	NFIA, SPI1	Impliqué dans la différenciation et la maturation des monocytes

Par ailleurs, les miARN peuvent parfois renforcer la stabilité de l'ARN et même réguler à la hausse la transcription et la traduction de leurs cibles spécifiques (Vasudevan et al., 2007). Il semblerait qu'il ait été démontré que les miARN peuvent cibler les ARN longs non codants, les ARN ribosomiques, les ARN de transfert et les petits ARN nucléaires, et réguler l'expression d'autres miARN (Tang et al., 2012) ; (Helwak et al., 2013). En revanche, les conséquences fonctionnelles de ces actions restent inconnues.

Comme évoqué précédemment, outre leurs expressions par les macrophages, les miARN sont exprimés dans une grande variété d'organes et de cellules. Ils réguleraient à la fois des actions pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.

Il a été estimé qu'il y aurait près de 5 000 à 10 000 miARN chez les mammifères, formant ensemble, un réseau de miARN qui contrôle l'expression de plus de deux-tiers de tous les gènes codants pour les protéines (www.mirBase.com). En fait, ce système agit tel un réseau organisationnel complexe, où un seul miARN peut être impliqué dans la régulation de plusieurs cibles d'ARNm, et un ARNm peut également être ciblé par plus d'un miARN (Lim et al., 2005) ; (Fabian et al., 2010).

Les micro-ARN sont des régulateurs essentiels de l'hématopoïèse, du développement des cellules immunitaires, des réponses inflammatoires et de l'auto-immunité. C'est par leurs capacités à s'apparier aux ARN messagers cibles, qu'ils interviennent dans de nombreuses fonctions et processus régulés **Tableau 7**.

2- Les micro-ARN dans le système immunitaire

Au cours de ces dernières décennies, des études ont démontré que les miARN fonctionnent comme de fins régulateurs du système immunitaire, jouant un rôle central dans le développement et l'homéostasie des cellules immunes ; important pour le bon fonctionnement des réponses immunes. De plus, il est intéressant de voir que certains micro-ARN ont des rôles respectifs dans les deux immunités : innée et adaptative (Liu and Abraham, 2013). Les miR-146 et le miR-155 par exemple, ont un impact sur l'activation des voies de défense de l'hôte et se trouvent liés au contrôle de l'immunité (Testa et al., 2017). En effet, ces deux micro-ARN ciblent et répriment plusieurs effecteurs du TLR4 comme le TNF- α , le régulateur transcriptionnel PU.1 (Moreau-Gachelin, 1997) et le « Suppressor of Cytokine Signaling prtein1 » (SOCS1) (dans le cas du miR-155) ; et TRAF6, IRAK, IRF3, IRF5 (dans le cas du miR-146).

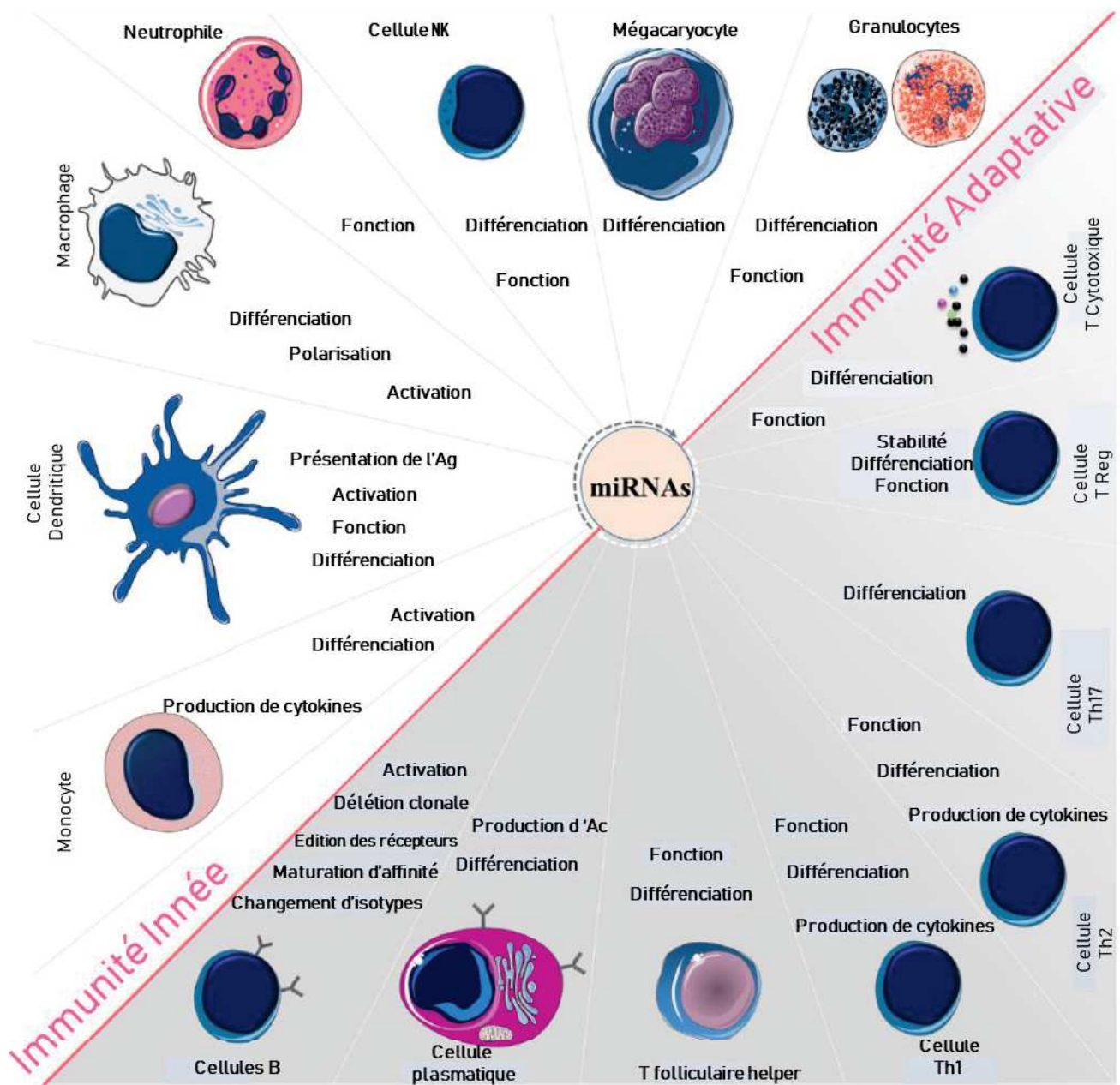


Figure 55 : Fonction générale des micro-ARN dans la régulation immunitaire d'après (Tahamtan et al., 2018). Les micro-ARN sont exprimés dans les cellules immunitaires et fonctionnent comme de fins régulateurs pour les réponses immunitaires adaptatives. Ils font partie intégrante des réseaux de régulation de l'immunité innée et régulent les fonctions des cellules immunitaires telles que les monocytes, les cellules dendritiques, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes « Natural Killer » (NK) et les granulocytes. Dans l'immunité adaptative, ils sont impliqués dans chaque processus biologique, y compris les voies impliquées dans le développement, la différenciation, la tolérance centrale et périphérique des lymphocytes T et B, ainsi que leur fonction.

Des études antérieures ont démontré qu'un seul miARN pouvait jouer un rôle central dans le développement des deux immunités (innée et adaptative). Et dans certaines conditions, ces miR effectueraient des boucles de rétrocontrôles négatives sur la réponse immune (Lindsay, 2008).

Les micro-ARN sont également des régulateurs clés du développement et de l'induction de différents lignages des lymphocytes T helper (Cobb et al., 2005). Ils jouent un rôle central dans le développement, la prolifération, la survie, la migration, la différenciation et les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 et des lymphocytes T Régulateurs (T Reg) (Liang et al., 2015) ; (Zhou et al., 2008). Comme indiqué plus haut, un certain nombre de micro-ARN sont impliqués dans plusieurs maladies auto-immunes comme : la polyarthrite rhumatoïde et les scléroses multiples (Duroux-Richard et al., 2011) ; (Zhang et al., 2015a). Zhang et ses collaborateurs par exemple, montrent que le miR-26a est capable de cibler l'IL-6 ; ce qui permet de réguler négativement les lymphocytes Th17 en faveur des lymphocytes T régulateurs. Cette régulation permet ainsi, de réduire les cytokines liées aux lymphocytes Th17 (en partie responsables des scléroses multiples) ; ce qui induirait une forme plus atténuée de la maladie.

Par ailleurs, dans le cas des lymphocytes B, les miARN semblent jouer un rôle clé dans la génération des plasmocytes, pour produire une réponse optimale des anticorps (Koralov et al., 2008). To-Ha Thai et ses collaborateurs, montrent que ce rôle serait en partie lié au miR-155 par la régulation de la production des cytokines (Thai et al., 2007).

Garo et Murugaiyan, quant à eux, démontrent que les altérations de l'expression et de la fonction des miARN, peuvent entraîner un dysfonctionnement majeur du système immunitaire et influencer sur la susceptibilité aux maladies auto-immunes (Garo and Murugaiyan, 2016). De plus, les miARN ont la capacité de faire des régulations épigénétiques dans les lymphocytes telle que la méthylation. Par ailleurs, il semblerait que, lorsque le miR-181 par exemple, se trouve surexprimé, il aurait la capacité d'augmenter la sensibilité antigénique intrinsèque au cours du développement des lymphocytes T, et ce, en régulant les niveaux d'expression de plusieurs phosphatases impliquées dans la signalisation du récepteur de l'antigène du lymphocyte T (TCR) (Li et al., 2007).

Pour finir sur cette partie, les exemples précédemment présentés, montrent que les miARN constituent un réseau complexe de régulations essentiel dans de nombreux processus biologiques **Figure 55**, dont le système immunitaire inné et adaptatif, et je vais particulièrement présenter ce dernier point.

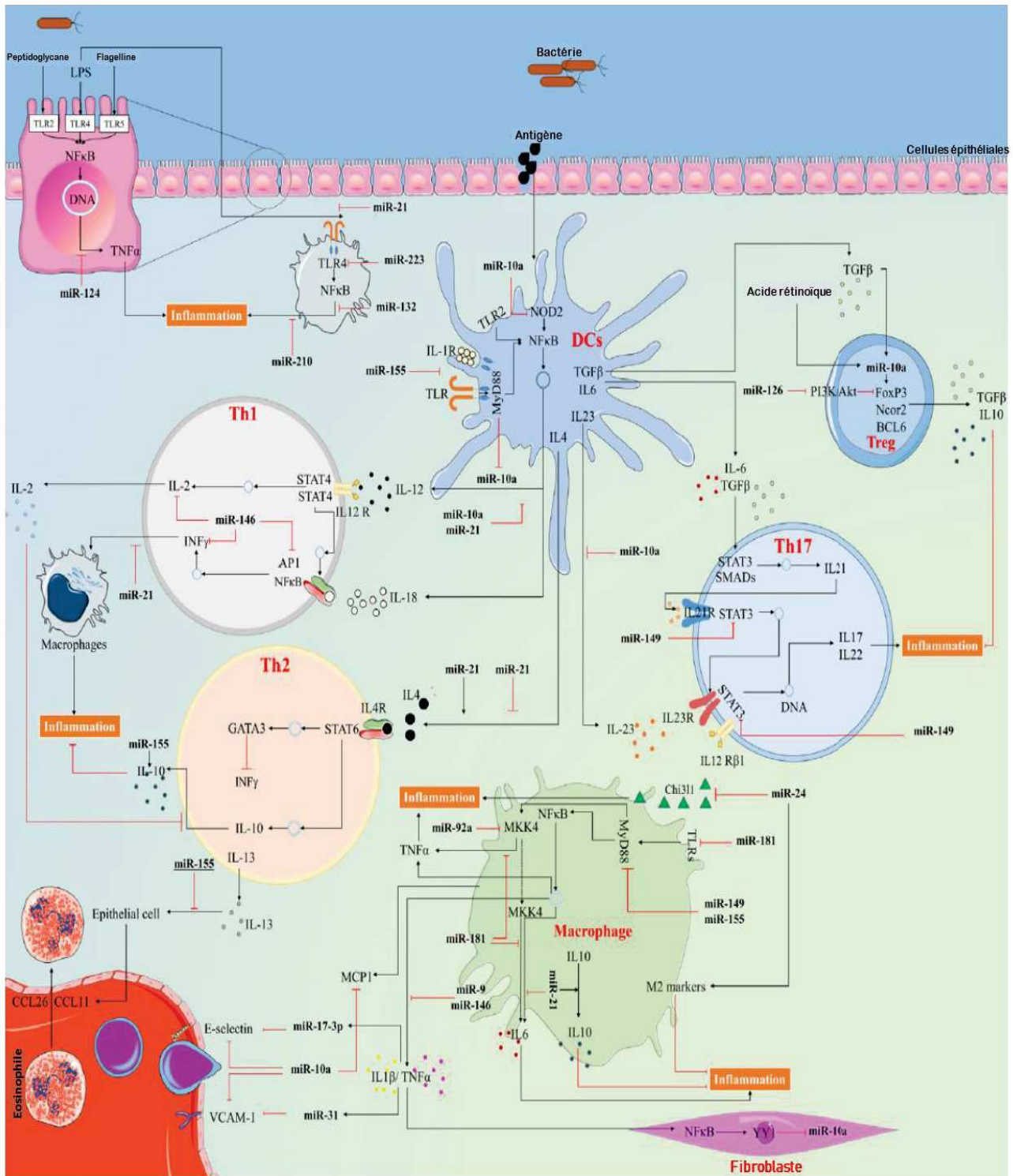


Figure 56 : Les multiples voies et boucles de rétrocontrôles positives et négatives exercés par les micro-ARN dans la réponse inflammatoire d'après (Tahamtan et al., 2018). Les micro-ARN sont à l'origine d'importantes boucles de rétrocontrôles négatives dans le processus de l'inflammation et des maladies inflammatoires. En ciblant le signal de transduction des protéines impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire innée, et en ciblant directement les ARN messagers (ARNm) qui codent spécifiquement pour les médiateurs inflammatoires, les micro-ARN peuvent avoir un impact important sur les effets de la réponse inflammatoire qui s'ensuit. (en rouge : les processus d'inhibition ; en noir : les processus d'activation)

II- Régulation de l'inflammation par les micro-ARN

1- Effets anti-inflammatoires des micro-ARN

L'inflammation est une réponse biologique et physiopathologique complexe induite par une infection et /ou une lésion tissulaire ; qui implique un réseau de médiateurs chimiques pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.

Outre les facteurs de régulation comme les facteurs de transcription, les micro-ARN sont également des régulateurs clés de l'inflammation. Il se pourrait qu'ils modulent la signalisation initiale et terminale de l'inflammation. En fonction des ARN messagers cibles, les miARN peuvent soit favoriser, soit supprimer l'inflammation. Par conséquent, le système immunitaire utilise plusieurs miARN pour réguler sa capacité fonctionnelle, en établissant un équilibre subtil entre l'activation et l'inhibition. L'interaction entre la fonction des miARN et la réponse inflammatoire est mise en évidence. Cette interaction peut contribuer à une meilleure compréhension, d'une part, sur la manière dont est régulé le déséquilibre de l'homéostasie immunitaire, et d'autre part sur leur implication dans les pathologies.

O'Connell et al, montrent que la biogenèse des miARN est régulée dans le cadre de la réponse inflammatoire par altération de la transcription, ou de la stabilisation des transcrits précurseurs ou matures des miARN (O'Connell et al., 2012). Les miARN exercent leurs fonctions anti-inflammatoires *via* d'une part, de multiples voies complexes et d'autre part, de multiples boucles de rétrocontrôles positives et négatives sur les cellules impliquées dans l'inflammation.

Au vu de ces voies multiples comme le montre la **Figure 56**, il est raisonnable de penser que les boucles de rétrocontrôle positives permettraient de déclencher des cascades d'évènements intracellulaires moléculaires en vue de lutter contre l'invasion des agents pathogènes. Ces évènements induiraient de ce fait, une réparation efficace des lésions cellulaires. En revanche, les boucles de rétrocontrôle négatives quant à elles, s'activeraient uniquement en cas d'inflammations excessives, et ce rétrocontrôle serait vital pour prévenir des effets néfastes au risque de mettre en péril l'homéostasie cellulaire et tissulaire ; voire induire des états pathologiques.

Les micro-ARN font partie intégrante des réseaux de régulation de la réponse immunitaire innée, et agissent en première ligne de l'immunité. En effet, l'activation des « Toll

Like Receptor » (TLR) par exemple, doit être étroitement régulée pour éviter une inflammation excessive et permettre la réparation des tissus et surtout le retour à l'homéostasie suite à une infection ou une lésion tissulaire.

De ce fait, les miARN sont des régulateurs importants de la signalisation des TLR. Ainsi, leur expression peut réguler la synthèse des gènes inflammatoires (O'Neill et al., 2011). Plusieurs miARN sont induits par l'activation des TLR dans les cellules immunitaires innées. Ces miARN ainsi que d'autres, ciblent les extrémités 3' non traduites des ARN messagers (3'UTR) codants pour les composants du système de signalisation des TLR.

Outre leurs rôles dans la régulation immunitaire, un dérèglement pourrait également jouer un rôle dans la pathogenèse des maladies inflammatoires (O'Neill et al., 2011). Boldin et ses collaborateurs démontrent que, les miARN dérégulés peuvent moduler la traduction des transcrits. Cette dérégulation entraîne une diminution des niveaux de facteurs immunomodulateurs, qui peuvent inhiber ou déclencher la réponse inflammatoire ; agissant ainsi comme des freins pour réguler l'inflammation. Boldin et al. démontrent un rôle central du miR146a dans le contrôle des TLR et de la signalisation des cytokines par une boucle de rétrocontrôle négative en réponse aux stimuli pro-inflammatoires ; contrôlant ainsi une inflammation excessive (Taganov et al., 2006) ; (Boldin et al., 2011). Incontestablement, ils montrent que le miR-146a est un gène dépendant du facteur de transcription NF- κ B. En fait, le miR-146a s'apparierait avec les séquences des extrémités 3' non traduites des ARNm de deux molécules adaptatrices clés de la voie TLR / NF- κ B : (1) « TNF Receptor Associated Factor-6 » (TRAF6) et (2) « IL-1 Receptor Associated Kinase-1 » (IRAK-1). Les ARNm ainsi ciblés, entraînent une diminution de l'activité du NF- κ B et par conséquent une diminution du niveau d'expression des protéines associées TRAF6 et IRAK-1. S'ensuit une diminution de la synthèse des protéines pro-inflammatoires.

En revanche, une surexpression du miR-146a a été reportée dans des cas de cancer du sein et du pancréas (Ma et al., 2011). Tandis qu'une expression réduite du miR146a serait plutôt associée au cancer de la prostate (Williams et al., 2008).

Le miR-155, quant à lui, présente des fonctions anti-inflammatoires et pro-inflammatoires en fonction des stimuli (Duan et al., 2016). Duan et ses collègues, montrent qu'une surexpression de ce miR entraînerait une atténuation des voies inflammatoires en diminuant les médiateurs de l'inflammation. En fait, le miR-155 induit par le TNF- α et l'IFN- γ aurait un effet régulateur, en induisant un rétrocontrôle négatif par ciblage du facteur de transcription NF- κ Bp65. Par ce ciblage, le miR-155 régule à la baisse certains inhibiteurs du NF- κ B ainsi que d'autres gènes comme les cytokines pro-inflammatoires. Le miR155 est dépendant du NF- κ B ; en outre, sa

surexpression réduirait l'inflammation chronique (Ma et al., 2011). En revanche, l'augmentation du miR-155 est également retrouvée dans les cancers (lymphomes, leucémie) (Eis et al., 2005) et le cancer du pancréas (Greither et al., 2010). Ce qui souligne que le miR-155 a également un rôle oncogène.

Plusieurs études récentes ont montré le rôle essentiel du miR-21. Lin et ses collaborateurs, par exemple, démontrent que le miR-21 agit dans la résolution de l'inflammation par une boucle de rétrocontrôle négative sur les voies de l'inflammation (Lin et al., 2017). Sheedy et ses collaborateurs, démontrent que le miR-21 agit comme un modulateur négatif de la voie de signalisation du TLR4 par ciblage de la protéine pro-inflammatoire « Programmed Cell Death Protein 4 » (PDCD4). Cette protéine PDCD4 favoriserait l'activation du NF-kB et la suppression de l'IL-10. Ce qui suggère que le miR-21 module la voie TLR4/NF-kB. De plus, la surexpression de ce miR dans les macrophages permettrait de réduire la production de l'IL-6 (cytokine pro-inflammatoire) en faveur de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire).

Ces quelques données mettent en évidence le miR-21, comme étant également un facteur qui permettrait de contrôler l'excès d'inflammation et qui plus est, serait NF-kB dépendant.

L'ensemble des miRs impliqués dans les effets anti-inflammatoires ne sera pas discuté ici. Toutefois, relevons qu'en dehors du micro-ARN 124 qui sera traité plus loin, de nombreux autres micro-ARN ont également un potentiel dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques. En effet, ces miRs sont dépendants du NF-kB et par conséquent, le rétrocontrôle négatif implique une réduction des protéines pro-inflammatoires. Par ailleurs, il semblerait que les causes de la dérégulation de l'expression des micro-ARN dans les maladies auto-immunes, peuvent inclure des variantes génétiques, épigénétiques, ainsi que divers facteurs environnementaux (Long et al., 2018). Ce qui laisse à penser que, pour toute thérapeutique qui serait développée directement à partir « d'agoniste » de micro-ARN sur l'unique base de l'effet anti-inflammatoires, il sera nécessaire de tenir compte des potentielles variantes épigénétiques. Sans oublier le fait, qu'un même micro-ARN peut avoir une double action (anti-inflammatoire versus pro-inflammatoire) en fonction du contexte environnemental (stimuli des médiateurs chimiques).

D'une manière générale, les micro-ARN dépendant du NF-kB, jouent un rôle dans la régulation de l'excès d'inflammation *via* l'immunité adaptative, mais également *via* l'immunité innée en régulant entre autre, l'état de polarisation des macrophages.

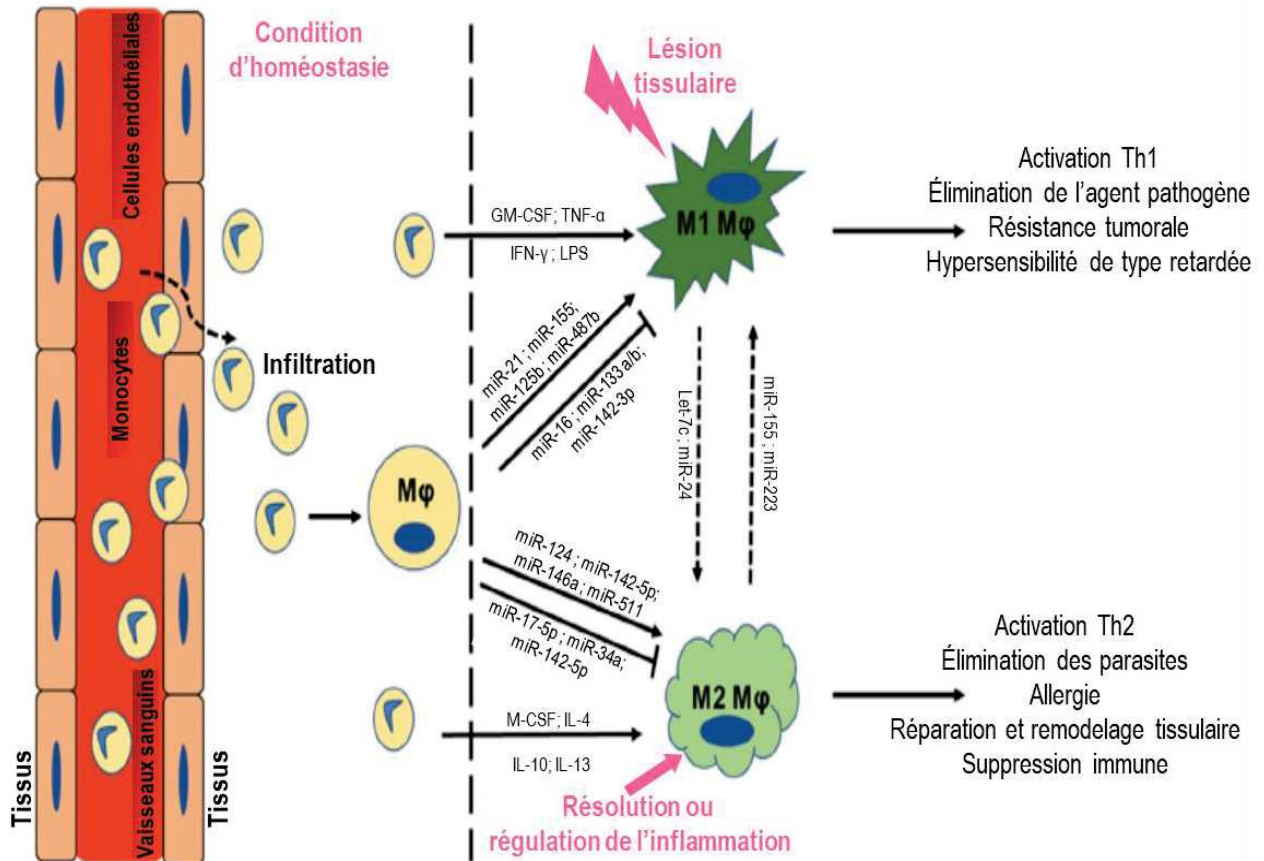


Figure 57: Régulation de la plasticité et de la polarisation des macrophages par les micro-ARN d'après (Self-Fordham et al., 2017). L'expression plus élevée des miR pro-inflammatoires tels que les miR-155 et miR-125b favorise la polarisation classique M1 des macrophages. L'expression de certains miARN comme les miR-146a et miR-511, favorise la polarisation alternative M2 des macrophages en régulant négativement les gènes impliqués dans la signalisation inflammatoire. De plus, Let-7c et miR-24 favorisent le phénotype M2 tandis que le miR-155 et le miR-223 peuvent repolariser les macrophages M2 vers le phénotype M1.

2- Rôle des micro-ARN dans la polarisation des macrophages

Des études récentes ont suggéré que les micro-ARN jouent un rôle essentiel dans la régulation de la polarisation des macrophages, et ce, par des interactions de liaison avec plusieurs facteurs de transcription clés (Li et al., 2018a) **Figure 57**.

De nombreuses études sur la fonction des micro-ARN dans l'activation des macrophages étaient axées sur la famille des TLR et le plus souvent sur le TLR4 (Self-Fordham et al., 2017). C'est d'ailleurs, en s'appuyant sur la régulation transcriptionnelle de la polarisation des macrophages que les études sur les miRs ont pu être comparées.

En effet, Lawrence et Natoli ont démontré que les facteurs de transcription tels que : NF- κ B, la protéine activatrice-1 (AP-1), le « CCAAT/ enhancer-binding protein- α » (C/ EBP- α), PU.1 (facteur de transcription impliqué dans le développement des cellules myéloïdes et lymphoïdes) et « l'IFN-regulatory factor 5 » (IRF5), participaient à l'activation classique M1 des macrophages induit par le TLR (Lawrence and Natoli, 2011).

En revanche, le « Signal Transducer and Activator of Transcription 6 » (STAT6), le « Peroxysome Proliferator-Activated Receptor- γ » (PPAR- γ), et le « Kruppel-Like Factor 4 » (KLF4), quant à eux sont impliqués dans l'activation alternative M2 des macrophages (Lawrence and Natoli, 2011). De plus, Takeuche et Akira, montrent que l'activation alternative M2 est régulée par des modifications épigénétiques telles que des enzymes capables de modifier les histones : « Jumonji domain containing 3 » (Jmjd3) (Takeuch and Akira, 2011).

Ainsi, plusieurs régulateurs clés de la polarisation des macrophages ont été élucidés. Bien que les interférons et la famille des STAT soient depuis longtemps considérés comme les principaux acteurs ; outre les régulateurs du métabolisme des lipides et les familles de facteurs de transcription, de nombreux micro-ARN se sont avérés être des régulateurs clés de la polarisation des macrophages. Et ce, tant dans les modèles *in vitro* qu'*in vivo*. Leurs implications dans l'inflammation, leur permet soit, de diminuer, soit de potentialiser la réponse inflammatoire en ciblant d'importants régulateurs du réseau transcriptionnel (Graff et al., 2012) ; (Li et al., 2018a).

Etant donné que la stimulation du TLR induit une polarisation de type classique M1, en considérant arbitrairement, que les micro-ARN modulent l'inflammation comme les autres facteurs régulateurs de la polarisation classique M1. De ce fait, si les médiateurs pro-

inflammatoires sont régulés à la baisse, cela permettrait d'équilibrer la balance polarisation classique versus polarisation alternative.

Les développements en bio-informatique et l'utilisation de la technologie du séquençage à haut débit des ARN immunoprécipités avec la protéine Argonaute (Ago), ont permis d'identifier les cibles potentielles des micro-ARN. Ces avancées technologiques ont également permis d'évaluer le rôle central des miRs dans la réponse inflammatoire (Majoros et al., 2013). En effet, les trois différentes méthodes basées sur « le cross-link », l'immunoprécipitation suivie d'un séquençage à haut débit, ont permis d'identifier à grande échelle les cibles des micro-ARN (Majoros et al., 2013). Par ailleurs, ces méthodes sont indépendantes de l'induction des stimuli des TLR.

▫ Profil des micro-ARN au cours de la polarisation

Auparavant, Graff et ses collaborateurs, ont démontré que la capacité à modifier simultanément l'expression de plusieurs gènes, relève de la responsabilité des micro-ARN, à changer de manière coordonnée, l'expression des gènes qui se produisent au cours des changements de polarisation des macrophages (Graff et al., 2012). Leur hypothèse de départ avait été étayée par de nombreuses études publiées impliquant différents micro-ARN dans la réponse inflammatoire des monocytes / macrophages humains (Bazzoni et al., 2009) ; (Tserel et al., 2011). Ainsi, Graff et ses collaborateurs montrent qu'après polarisation des macrophages humains primaires dérivés de monocytes (6 donneurs indépendants) en couvrant le spectre d'activation décrit par Alberto Mantovani (M1, M2a, M2b, M2c), un certain nombre de micro-ARN ont été modifiés dans les conditions polarisantes (Graff et al., 2012).

Ils ont observé que le miR-125a était surexprimé dans les conditions de polarisation classique M1, le miR-193b dans les conditions de polarisation alternative M2a et le miR-27a dans les conditions alternatives M2b. De plus, ils montrent que le miR-155 était surexprimé dans les deux conditions de polarisation classique M1 et alternative M2b. De manière constante, le miR-125a, le miR-27a et le miR-155 avaient des profils d'expression similaires à la fois dans les lignées de monocytes humains (THP-1) polarisées, que dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés (Hu MDM). Ils démontrent également que, les micro-ARN miR-29b et miR-125a ont tous deux réprimé l'expression d'un régulateur négatif de la signalisation du NF- κ B : le « Tumor Necrosis Factor Alpha Induced Protein3 » (TNFAIP3) ; expliquant partiellement la propriété inflammatoire de ces micro-ARN (Graff et al., 2012).

D'autres études comme celles de Cobos Jimenez et al, ont permis de dresser un profil des micro-ARN à partir des « Peripheral Blood Mononuclear Cells » (PBMC) polarisés (Cobos Jiménez et al., 2013). Ils démontrent après analyses par micro-ARN arrays qu'un nombre de 303 micro-ARN sont surexprimés ou sous exprimés dans les conditions de polarisation classique (M1 : induit par l'IFN- γ et TNF- α), alternative (M2a : induit par l'IL-4) ou M2c (induit par l'IL-10) versus sans polarisation. Ils confirment par RT-PCR, que les miR-125b, miR-181a, miR-193 et le miR-125a étaient significativement surexprimés dans les conditions de polarisation classique M1 en comparaison aux macrophages non polarisés. Cependant, ces miRs étaient dérégulés dans les conditions de polarisation alternatives M2 (Cobos Jiménez et al., 2013). De plus, ils constatent que les miR-145, miR146a, miR-193a et le miR-29b sont surexprimés, alors que, seul le miR-629 était diminué dans les conditions de polarisation classique M1.

Enfin, Cobos Jimenez et al, démontrent que, les miR-500a et le miR-502 sont surexprimés, tandis que le miR-181 était diminué uniquement dans les conditions de polarisation alternatives M2a. Enfin, le miR-21, le miR-22 et le miR-146 sont surexprimés tandis que le miR-339 et le miR-200a se trouvent diminués uniquement dans les conditions alternatives M2c.

En définitive, l'ensemble de leurs données serait la preuve de (i) l'impact de la régulation de l'expression des gènes par les miRs, et (ii) de l'importance de ces différents miRs dans le rôle et la fonction des macrophages dans l'immunité innée.

▣ Fonction et rôle des micro-ARN dans la polarisation

Comme précisé précédemment, les micro-ARN peuvent cibler divers facteurs de transcription et protéines adaptatrices impliqués dans les voies IRF/STAT. Il est donc possible que, ces miRs puissent réguler la polarisation classique et alternative dans les macrophages. En effet, les miRs jouent des rôles distincts dans la régulation de la polarisation des macrophages.

Par exemple, le miR-9, a été montré comme étant impliqué dans la polarisation classique M1 par Thulin et ses collaborateurs. En fait, le miR-9 ciblerait le « Peroxysome Proliferator-Activated Receptor- δ » (PPAR δ) (THULIN et al., 2013). Ils démontrent que le niveau d'expression relatif de miR-9 est augmenté, alors que le niveau de PPAR δ est diminué dans les monocytes primaires humains après stimulation au LPS. PPAR δ est connu pour réguler l'homéostasie des lipides, du glucose, ainsi que l'inflammation par activation de la protéine « B-Cell lymphoma protein-6 » (BCL-6) ; un suppresseur transcriptionnel anti-inflammatoire.

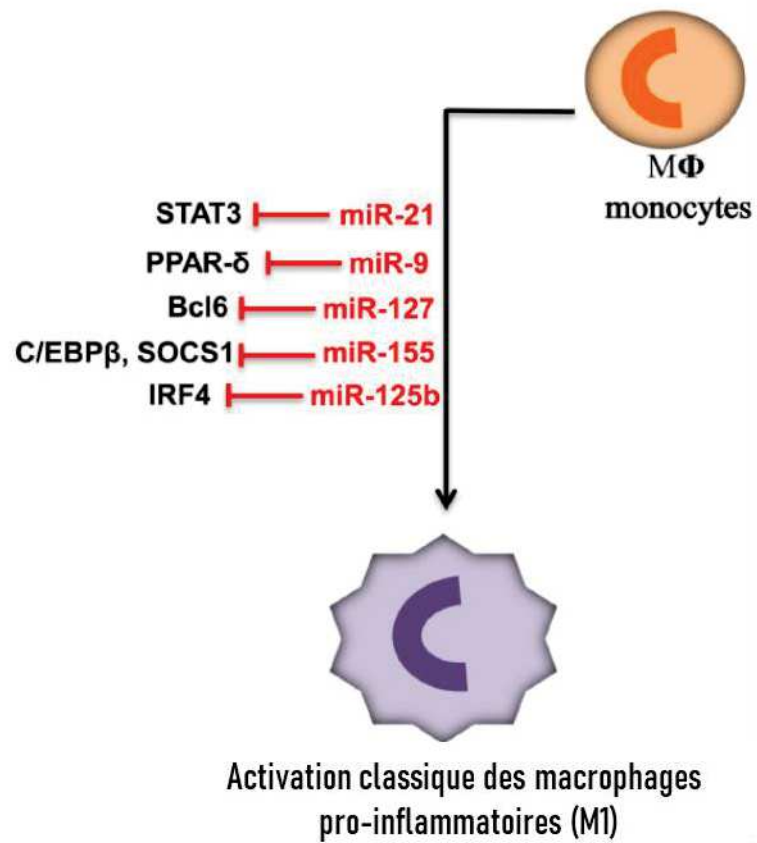


Figure 58 : Les micro-ARN qui favorisent la polarisation classique (M1) par répression des facteurs de transcription d'après (Essandoh et al., 2016a).

De ce fait, une surexpression de miR-9 supprime l'activité de PPAR δ , empêchant ainsi, les effets anti-inflammatoires médiés par le BCL-6. Donc l'état de polarisation classique inflammatoire M1 des macrophages est maintenu (THULIN et al., 2013).

Un autre miR a été reporté comme étant un inducteur de la polarisation classique M1, c'est le miR-127 (Ying et al., 2015). En fait, le LPS induit mécaniquement la surexpression du miR-127, ce qui a pour effet d'inhiber l'expression de BCL-6, qui a son tour supprime une phosphatase appelée « Dual Specificity Protein Phosphatase » (Dusp1). La suppression de cette phosphatase permet la phosphorylation de la kinase « c-Jun N-Terminal kinase » (JNK). Par conséquent l'activation de cette voie de signalisation, induit la synthèse des cytokines et autres protéines pro-inflammatoires (Ying et al., 2015).

En outre, les miR-155 et miR-125b ont été démontrés comme étant des miRs qui régulent positivement la polarisation classique pro-inflammatoire M1 dans les macrophages. En effet, O'Connell et ses collaborateurs, démontrent que le miR-155 est surexprimé lorsque les TLR2, TLR3 et TLR4 des macrophages sont stimulés. Et quand les auteurs inhibent la voie de signalisation « c-Jun N-Terminal kinase » (JNK), ils observent une diminution d'expression du miR-155 ainsi qu'une diminution de la production du TNF- α . Ce qui suggère, que la polarisation classique pro-inflammatoire M1 par le miR-155 est liée à l'induction de la voie de signalisation JNK (O'Connell et al., 2007). Quant au miR-125b, Chaudhuri et al, montrent que le miR-125b est surexprimé dans les macrophages en réponse à l'IFN- γ (inducteur de la polarisation classique M1), et ce, par ciblage du facteur de transcription « Interferon Regulatory Factor » (IRF4) (Chaudhuri et al., 2011).

Finalement, les miR-9, miR-127, miR-155 et le miR-125b sont des micro-ARN qui favorisent la polarisation classique, soit pro-inflammatoire de type M1 en réprimant divers facteurs de transcription **Figure 58**.

Mais qu'en est-il de la régulation de la polarisation alternative, soit anti-inflammatoire de type M2.

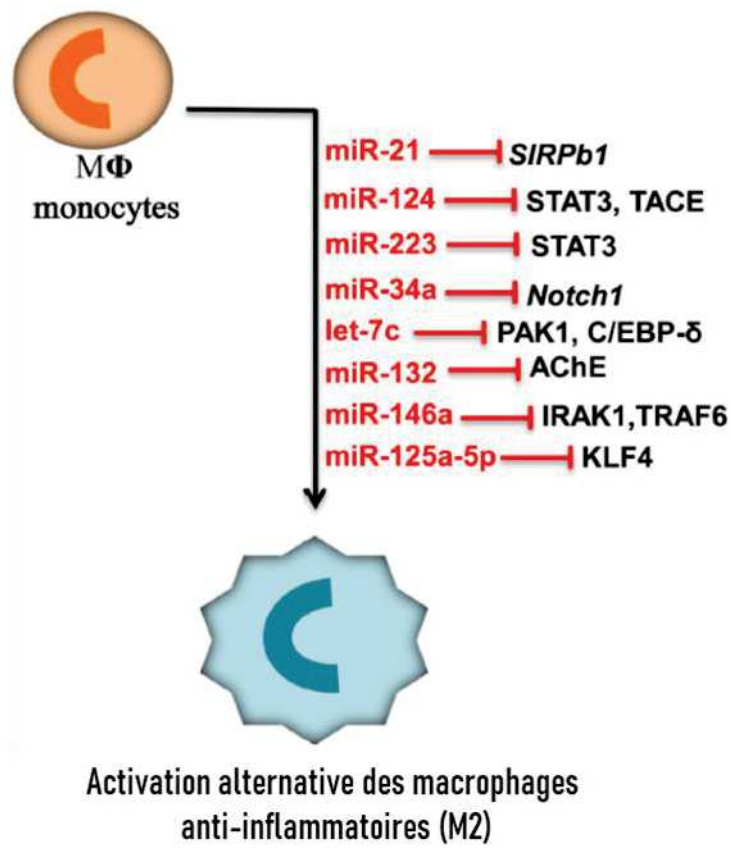


Figure 59 : Les micro-ARN qui favorisent la polarisation alternative (M2) par répression des facteurs de transcription d'après (Essandoh et al., 2016a).

En ce qui concerne la régulation de la polarisation alternative M2 par les micro-ARN, il a été démontré par exemple, que le miR-223 initie la polarisation anti-inflammatoire M2 des macrophages (Chen et al., 2012). Chen et al, montrent que la surexpression du miR-223 dans les macrophages, induit la répression de la production de l'IL-6 et de l'IL-1 β après stimulation par le LPS. Ils démontrent que le miR-223 agit, en ciblant le facteur de transcription STAT3.

Jiang et ses collaborateurs ont démontré quant à eux, que le miR-34a bloque la réponse pro-inflammatoire des macrophages stimulés par le LPS. Et ce, après avoir observé la diminution du niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 (Jiang et al., 2012). En fait, le miR-34a agit en ciblant *Notch1*. Mécaniquement, *Notch1* est nécessaire à la production des protéines inflammatoires quand les macrophages sont stimulés par le LPS (Jiang et al., 2012).

En outre, le micro-ARN Let-7c diminue le phénotype classique M1 des macrophages stimulés par le LPS en faveur d'une polarisation alternative M2 (Banerjee et al., 2013a) ; (Zhang et al., 2015b). Banerjee et al, démontrent que le micro-ARN Let-7c est surexprimé dans les macrophages polarisés M2 en comparaison aux macrophages M1. Ils démontrent également, que cette surexpression du miR Let-7c, diminue l'expression des protéines de la polarisation classique comme l'IL-12 et les oxydes nitrique synthases inductibles (iNOS). Finalement, les auteurs montrent, que le micro-ARN Let-7c agit en ciblant le facteur de transcription « CCAAT / Enhancer-Binding Protein- δ » (C/EBP- δ) dont le rôle est important dans la réponse inflammatoire. Et lorsqu'ils font le « knockdown » de Let-7c dans les macrophages alternatifs M2, il en résulte une diminution des protéines anti-inflammatoires et une augmentation des protéines pro-inflammatoires. Zhang et ses collaborateurs, démontrent également que le micro-ARN Let-7c induit la polarisation alternative M2 des macrophages. Cependant, ils démontrent que le Let-7c agit en ciblant un autre facteur appelé « p-21-Activated Kinase1 » (PAK1), une sérine/thréonine kinase qui se trouve augmentée dans les macrophages polarisés M1 (Zhang et al., 2015b).

Pour citer un autre exemple, le miR-125a, est un micro-ARN qui intervient dans la régulation de la polarisation des macrophages. Banerjee et al, démontrent que le miR-125a se trouve surexprimé après l'activation des TLR2 et TLR4 dans les macrophages. Ils démontrent en accord avec d'autres études, que le miR-125a se comporte comme un régulateur négatif de l'activité des macrophages en réponse à l'inflammation. Les auteurs montrent que le miR-125a agit en ciblant le facteur de transcription « Kruppel-Like factor 4 » (KLF4) (Banerjee et al., 2013b).

D'autres miR, comme le miR-132 et le miR-146a ont la capacité de diminuer l'expression des protéines pro-inflammatoires des macrophages polarisés classique M1 en réponse à l'inflammation (Liu et al., 2015) ; (Zheng et al., 2017). Les travaux de Liu et al, démontrent que la surexpression du miR-132 diminue l'expression du facteur de transcription NF-kB et de STAT3, induit par les macrophages stimulés par le LPS. En revanche, une diminution de l'expression du miR-132 augmente la translocation du facteur de transcription NF-kB (Liu et al., 2015). Le miR-132 agit en ciblant l'acétylcholinestérase (AChE) ; ce qui potentialise la réponse anti-inflammatoire cholinergique induit par l'acétylcholine. Par conséquent les auteurs suggèrent que la fonction du micro-ARN 132 est un régulateur négatif dans les macrophages en réponse à l'inflammation. Quant au miR-146a, Zheng et ses collaborateurs démontrent comme d'autres auteurs, que le miR-146a est un miR anti-inflammatoire qui agit en ciblant la voie de signalisation du TLR4. Le MiR-146a cible plusieurs médiateurs de la voie de signalisation du NF-kB comme « l'IL-1 Receptor Associated Kinase-1 » (IRAK-1) et le « TNF Receptor Associated Factor-6 » (TRAF).

Pour conclure, Sun et ses collaborateurs démontrent que le **miR-124** module la production des cytokines induites par le LPS. Ils montrent que le micro-ARN 124 est surexprimé par les agonistes cholinergiques. En ciblant le facteur de transcription STAT3, le miR-124 diminue la production d'IL-6 et l'enzyme de conversion du TNF- α (TACE) ; ce qui permet de réduire la libération du TNF- α (Sun et al., 2013). Par ailleurs, Ma et al, démontrent que le micro-ARN 124 est surexprimé dans les macrophages et diminue la signalisation des TLR, et ce, en ciblant plusieurs facteurs de transcription et adaptateurs de la voie des TLR. En effet, les auteurs montrent que le miR-124 cible à la fois le « TNF Receptor Associated Factor-6 » (TRAF6), le « Myeloïd Differentiation factor 88 » (MyD88) et le TNF- α (Ma et al., 2014). Le miR-124 est également impliqué dans l'inhibition de l'immunité innée en ciblant directement le NF-kB et TRAF6 (Qiu et al., 2015) ; ce qui suggère que le miR-124 induit une boucle de rétrocontrôle négative sur la voie de signalisation des TLR pour prévenir l'excès d'inflammation.

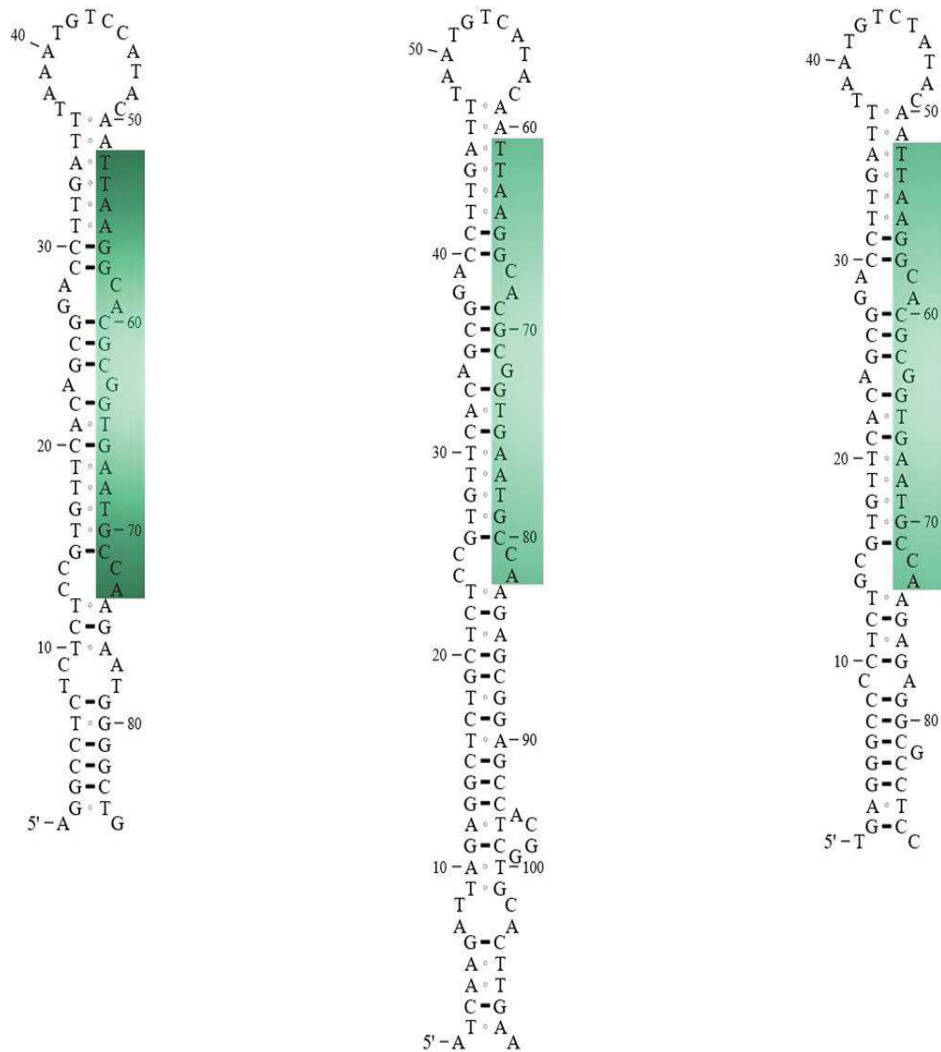
Finalement, les miR-223, miR-132, miR-146a, let-7c, miR-125a et le miR-124 sont des micro-ARN qui favorisent la polarisation alternative, soit anti-inflammatoire de type M2 en réprimant divers facteurs de transcription et adaptateurs **Figure 59**.

Des efforts ont été réalisés pour délimiter le rôle des micro-ARN dans l'activation des macrophages dans les maladies inflammatoires. Et l'un des meilleurs exemples est le miR-124.

Ces dernières années, le miR-124 est apparu comme un modulateur critique de l'immunité et de l'inflammation. Des études ont montré que le miR-124 exerce un rôle crucial dans le développement du système immunitaire, la régulation des réponses immunitaires et les troubles inflammatoires y compris des troubles de type auto-immuns (Qin et al., 2016) ; (Iwamoto and Kawakami, 2019) .

Ainsi, dans ce dernier paragraphe de revue bibliographique, je vais me focaliser sur le miR-124. Outre le rôle du miR-124 en tant que modulateur critique de l'immunité et de l'inflammation, je vais discuter des données de la littérature qui me paraissent importantes pour impliquer ce micro-ARN 124 dans les effets observés *in vitro* au laboratoire avec la drogue ABX sur les cellules immunes.

MIR124-1 ENST00000385275 MIR124-2 ENST00000385081 MIR124-3 ENST00000384866



CTCTCCG**TG**TT**CACAGCGGACCTTGATT**TAAATGTCCATACAA **TTAAGGCACGCGGTGAATGCCA** AGAGAGGCGC
(green sequence found in drosophila, zebrafish, planaria and thousand of species)

Figure 60 : Les trois sous-type de micro-ARN 124 (<https://www.ensembl.org>). Les séquences surlignées en verts correspondent aux séquences identiques retrouvées dans les trois sous-types du miR-124 et qui plus est, sont retrouvées identiques dans différentes espèces. Ce qui souligne le caractère très conservé du miR-124.

3- Le micro-ARN 124

Tout d'abord, il est intéressant de voir qu'il existe trois sous-types de miR-124 : miR-124-1, miR-124-2 et le miR-124-3 possédant des localisations chromosomiques distinctes (<https://www.ensembl.org>). Bien que les précurseurs du miR-124 proviennent d'espèces différentes, la séquence du miR-124 mature retrouvée chez l'homme, la souris, le rat et chez d'autres espèces, est totalement identique **Figure 60** (Lagos-Quintana et al., 2002) ; (Smerkova et al., 2015). Cette caractéristique souligne le caractère très conservé du miR 124.

Par ailleurs, le miR-124 est le micro-ARN le plus abondamment exprimé dans les cellules neuronales, mais il est également retrouvé dans les cellules immunes incluant : les cellules mononucléaires du sang périphérique, la moelle, les ganglions lymphatiques et le thymus (Sun et al., 2015b) ; (Qin et al., 2016).

Des progrès ont été réalisés pour évaluer (1) les activités biologiques, (2) la régulation du miR-124, y compris (3) la validation expérimentale d'un certain nombre de cibles prédictives (base de données : CSmiRTar / TargetScan), ainsi que (4) l'évaluation des mécanismes de régulation. De ces faits, il est maintenant possible de comprendre le rôle du miR-124 dans l'immunité innée, les maladies associées à l'inflammation et les maladies auto-immunes.

Quant à la mécanistique, le miR-124 dans le complexe « RNA Induced Silencing Complex » (RISC) reconnaît les extrémités 3' non traduites d'ARN messenger grâce à un appariement imparfait. C'est d'ailleurs, le premier miR qui cible un membre de la famille des inhibiteurs I κ B du NF- κ B (I κ B ζ /NFKBIZ). En effet, le miR-124 cible I κ B ζ /NFKBIZ et permet une régulation fine de l'expression des gènes médiés par le NF- κ B (Lindenblatt et al., 2009).

Satoh et ses collaborateurs, ont montré que des macrophages résidents sont présents dans différents tissus dont le système nerveux central, le péritoine, les poumons, le foie et les tissus adipeux. Les macrophages résidents expriment un certain nombre de marqueurs de la polarisation alternative M2 tels que le CD206, l'IL-4, l'IL-10. Satoh et al, suggèrent que les macrophages résidents dans les tissus, ont souvent sous une polarisation alternative M2 dans les conditions physiologiques normales (Satoh et al., 2013). De ce fait, le miR-124 a été démontré comme étant essentiel pour l'induction et le maintien du phénotype alternatif M2. Veremeyko et al, démontrent que lorsque le miR-124 est inhibé dans les macrophages polarisés alternatifs M2, dès lors, la surexpression du CD206 et la down régulation du CD86 et du TNF sont abrogés. (Veremeyko et al., 2013).

D'après Ponomarev et al, le miR-124 sert de régulateur universel de la polarisation alternative M2. Le facteur de transcription « CCAAT / Enhancer-Binding Protein- α (C/EBP- α) » serait considéré comme le médiateur des effets du miR-124 sur la polarisation des macrophages (Ponomarev et al., 2011).

De plus, le micro-ARN 124 module également la différenciation des lymphocytes T auxiliaires. Wei et ses collaborateurs, par exemple démontrent que, lorsque le miR-124 est surexprimé, l'induction des lymphocytes Th17 et l'interleukine IL-17A sont inhibés, tandis que la différenciation des lymphocytes Th1 et l'IFN γ sont renforcées (Wei et al., 2013).

Enfin, Qiu et al, ont découvert qu'une longue exposition à la morphine inhibe l'immunité innée des macrophages neuronaux (microglies) en partie par la régulation différentielle des TLR et de l'acétylcholinestérase (AChE). Il semblerait que les effets sont médiés par le miR-124. En fait, les auteurs démontrent que la morphine ou l'inhibition de l'acétylcholine (ACh), favorise la surexpression du miR-124 dans les microglies mais également dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse. Le miR-124 induit l'inhibition de l'immunité innée par la morphine en ciblant le facteur de transcription nucléaire NF-kB p65 et le « TNF Receptor Associated Factor-6 » (TRAF6) en se liant directement au promoteur du miR-124. Qiu et al, suggèrent donc, qu'une longue exposition à la morphine maintient la surexpression du miR-124, qui inhibe le NF-kB p65 et le TRAF6 dépendant de la signalisation du TLR (Qiu et al., 2015).

D'autres études démontrent que le miR-124 cible les médiateurs chimiques impliqués dans l'adhésion cellulaire et le recrutement des leucocytes. Par exemple, Gu et al, montrent que, lorsqu'ils font la déplétion de l'ARN « InterCellular Adhesion Molecule-1 » (ICAM-1) dans les macrophages, ils observent une surexpression de la chimiokine « Monocyte Chemoattractant Protein-1 » (MCP-1) appelée aussi « Chemokine Ligand 2 » (CCL2). D'après Gu et ses collaborateurs ICAM-1 induit l'expression d'un facteur de transcription appelé « Specificity Protein 1 » (Sp1), lequel serait important pour l'expression du miR-124 dans les macrophages. Ils démontrent que l'expression d'ICAM-1 induit la diminution de l'expression MCP-1 en contrôlant le facteur Sp1 médié par le niveau d'expression du miR-124 ; et ainsi régulent la polarisation alternative M2 (Gu et al., 2017). Ces études se trouvent en corrélation avec celles de Chu-Tan et al, qui démontrent qu'un équilibre de l'expression du miR-124 est nécessaire pour réguler MCP-1/CCL2. D'après les bases de données, le miR-124 cible la région 3' non traduite (3'UTR) de la chimiokine MCP-1/CCL2, Chu-Tan et al, montrent que le miR-124 diminue l'infiltration des macrophages, suggérant que la surexpression du miR-124 est en corrélation inverse avec l'expression du MCP-1/CCL2 (Chu-Tan et al., 2018). En outre, Li et al, démontrent

qu'une surexpression du miR-124 inhibe la réponse inflammatoire excessive via l'inhibition de la cascade de signalisation TLR4 / NF-kB / CCL2 (Li et al., 2018b).

L'ensemble de ces études montrent que le miR124 module l'activation TLR/ NF-kB et se trouve grandement impliqué dans la régulation des maladies inflammatoires. MiR-124 induit une boucle de rétrocontrôle négative sur la voie de signalisation des TLR pour prévenir l'excès d'inflammation. Le miR-124 se trouve également impliqué dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI : colite ulcéreuse et maladie de Crohn) ainsi que dans la polyarthrite rhumatoïde.

Je vais à présent discuter brièvement des données connues de la littérature en ce qui concerne ces maladies inflammatoires chroniques. Car je rappelle, que la colite ulcéreuse et la polyarthrite rhumatoïde, font actuellement l'objet d'études cliniques avec la drogue ABX utilisée dans mes travaux in vitro. Les premiers résultats obtenus en clinique sont très prometteurs (Communiqué de presse, ABVAX PARIS, France, du 16 mars 2020).

▣ *Le miR-124 régulateur des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*

Outre le fait que ces maladies inflammatoires soient multifactorielles, des études ont montré que le miR-124 pouvait être impliqué. Koukos et ses collaborateurs, démontrent que le miR-124 régule l'expression de STAT3. Ils montrent que le niveau d'expression du miR-124 est en corrélation inverse avec l'expression de STAT3. En outre, les bases de données identifient STAT3 comme une cible du miR-124 (CSmiRTar). Par ailleurs, il semblerait, qu'une diminution du miR-124 dans les colons des enfants atteints de rectocolite serait due à une hyperméthylation de la région promotrice du miR. De plus, Koukos et al, constatent qu'une diminution de l'expression du miR-124 favoriserait l'inflammation et la pathogenèse de la rectocolite en augmentant l'expression et l'activité de STAT3 dans les tissus du colon. Ils démontrent alors, que l'inhibition de la méthylation dans les cellules du colon, induit une surexpression du miR-124 et par conséquent une diminution de l'expression de l'ARN messagers de STAT3 (Koukos et al., 2013).

En revanche, chez les patients atteints de la maladie de Crohn c'est l'inverse, le miR-124 est surexprimé dans les tissus du colon et dans les cellules épithéliales de l'intestin. Des études ont montré que le miR-124 pouvait cibler directement le facteur de transcription « Aryl Hydrocarbon Receptor » (AHR) pour moduler la production de cytokines pro-inflammatoires et

ainsi promouvoir la pathogenèse de la maladie de Crohn (Guo et al., 2015) ; (Zhao et al., 2016). Mais la mécanistique semble inconnue. Enfin, d'autres données montrent que la nicotine (principal agent responsable du tabagisme) (Qin et al., 2020), et le double rôle du miR-124 dans le traitement de la rectocolite et de la maladie de Crohn pourraient-être responsables de cette divergence et doivent être à étudiés plus en profondeur.

Finalement, ces données démontrent que l'utilisation du miR-124 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin doit tenir compte du micro-environnement, d'autant plus que ces maladies sont multifactorielles.

▣ *Le miR-124 régulateur de la polyarthrite rhumatoïde (PR)*

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune où le système immunitaire s'attaque aux articulations. Zhou et al, suggèrent qu'une dérégulation épigénétique est également impliquée dans le mécanisme du développement de la PR. Ils observent que la région promotrice du miR-124 se trouve méthylée chez les patients atteints de PR contrairement aux patients contrôles sains. L'état de méthylation du miR semble être un processus de régulation du miR-124 qu'il ne faut pas négliger (Zhou et al., 2013).

Kawano et Nakamachi, publient quant à eux qu'une surexpression du miR-124 dans les macrophages de la membrane synoviale (synoviocytes) des patients PR, diminue significativement la production protéique de la « Cyclin-Dependent Kinase -2 » CDK-2 et de MCP-1/CCL2. Le miR-124 cible la région 3' non traduite des ARN messagers de la CDK-2 et du MCP-1/CCL2. Ce mécanisme permet d'inhiber ainsi la prolifération des synoviocytes, l'infiltration des leucocytes et par conséquent, l'inhibition de la destruction des os et des cartilages (Kawano and Nakamachi, 2011).

Enfin, Yang et al, en concordance avec les travaux de Kawano et al, démontrent que le miR-124 inhibe la prolifération et l'inflammation, mais en ciblant les voies de signalisation PIK3 / NF-kB. De ce fait, en inhibant l'expression des composants clés des voies de signalisation PIK3/NF-kB, le miR-124 induit l'inhibition de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires TNF- α et la cytokine IL-6 (Yang et al., 2019).

Outre l'existence de traitements existants pour les maladies inflammatoires chroniques auto-immunes, une grande hétérogénéité existe chez les patients, et influe sur la réponse aux traitements. Il faut donc développer de nouvelles stratégies pour fournir de nouvelles thérapeutiques. Le laboratoire privé ABIVAX a développé plusieurs molécules chimiques dont la plus avancée est une drogue ABX, cette drogue se trouve actuellement en phase II d'études cliniques chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques à caractère auto-immuns (Colite Ulcéreuse et la Polyarthrite Rhumatoïde).

Le laboratoire public CNRS (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier), s'est associé à la société privée ABIVAX afin d'unir ses forces techniques et scientifiques pour analyser et comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu, avec cette nouvelle drogue et son métabolite : N-Glucuronide. Outre ses propriétés anti rétrovirale (Campos et al., 2015), cette drogue ABX est un puissant anti-inflammatoire (Chebli et al., 2017) et permet la surexpression spécifique du miR-124, décrit pour ses propriétés anti-inflammatoires (Vautrin et al., 2019). En partant des données déjà obtenues dans le laboratoire concernant les puissants effets anti-inflammatoires, à savoir : sur des modèles de souris de rectocolite traités par la drogue ABX, Chebli et al, démontrent un effet protecteur de la drogue contre les dommages causés par la colite. En effet, ils observent d'une part, une réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α), et d'autre part une réduction de la chimiokine responsable de l'infiltration des macrophages (MCP-1/CCL2), sécrétées par les cellules du colon. De plus, des études *ex vivo* sur ces modèles, montrent que les macrophages issus de la moelle osseuse, stimulés par le LPS et traités par la drogue ABX, augmentent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et également la cytokine IL-22, décrite pour ses effets réparateurs du tissu intestinal. Par ailleurs, les données des études cliniques menées sur des patients adultes atteints de colite ulcéreuse, montrent que les cellules de colon surexpriment le miR-124. D'autres études *in vitro* sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et des lymphocytes T CD4 humain, montrent également une surexpression du miR-124.

En partant des données déjà obtenues dans le laboratoire, *mon objectif* de thèse est de caractériser *in vitro* les modulations phénotypiques et les mécanismes moléculaires mis en jeu à partir de Macrophages Dérivés de Monocytes Humains (Hu MDM) de donneurs sains, dans un contexte inflammatoire (par une polarisation M1 en présence d'IFN- γ et de LPS), et traités par la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide versus contrôle DMSO.

PARTIE 2

TRAVAUX DE RECHERCHE

1- Résumé (Abstract)

Contexte : Les macrophages sont des médiateurs cellulaires hétérogènes. Ils participent à l'homéostasie cellulaire et tissulaire en collaborant avec les lymphocytes T et également par leur capacité à sécréter des cytokines et des chimiokines. Les macrophages s'activent et acquièrent des phénotypes d'expression différentielle en réponse à leur micro-environnement. Leur rôle est crucial dans l'inflammation. Une nouvelle molécule chimique ABX a été développée par la société privée ABIVAX. Cette drogue ABX se métabolise en N-Glucuronide chez l'homme, et se trouve en phase II d'essais cliniques (colite ulcéreuse, polyarthrite rhumatoïde). En collaboration avec le CNRS, les données obtenues montrent que cette drogue ABX est un puissant anti-inflammatoire et induit la surexpression spécifique d'un micro-ARN (miR-124) décrit pour ses propriétés anti-inflammatoires. L'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM-CNRS) en association avec la société privée ABIVAX appréhendent les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu par cette nouvelle drogue.

Objectif : L'objectif de mon projet de thèse est de caractériser *in vitro* les modulations phénotypiques et les mécanismes moléculaires mis en jeu par la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide sur des macrophages humains dérivés de monocytes (HuMDM) de donneurs sains, dans un contexte pro-inflammatoire (polarisés M1 par LPS/IFN- γ), et prétraités par la drogue ABX et son métabolite versus contrôle DMSO. La finalité est de répondre aux questions suivantes : (i) est-ce que la drogue ABX et son métabolite induisent une réversion totale du phénotype pro-inflammatoire M1 vers un phénotype anti-inflammatoire M2 ; (ii) est-ce que la drogue ABX et son métabolite induisent une surexpression du miR-124 dans les macrophages, comme c'est le cas *in vivo* (colons de patients atteints de colite ulcéreuse) et *in vitro* (lymphocytes T CD4, cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) humains) et enfin, (iii) est-ce que la drogue ABX et son métabolite ont un impact sur la voie de signalisation du TLR4, étant donné qu'une stimulation IFN- γ /LPS dans les macrophages active la voie de signalisation du TLR4 en réponse à l'inflammation.

Méthodes : De manière systématique, l'ensemble de mes travaux de recherche a été établi avec au moins 6 Hu MDM de donneurs sains polarisés M1, et prétraités par les drogues (ABX et N-Glucuronide) versus contrôle DMSO. La cytométrie en flux a permis d'évaluer le niveau d'expression des récepteurs membranaires et d'établir le phénotype de polarisation des macrophages traités par les drogues. L'utilisation de la technologie du « Proteome Profiler™

Array Human Cytokine » (R&D Systems) et du Luminex, a permis d'établir le profil sécrétoire en cytokines et chimiokines induit par les drogues. La RT-PCR quantitative a permis de détecter et d'estimer le niveau d'expression du micro-ARN 124 avec 14 Hu MDM polarisés M1, traités par les drogues versus contrôle DMSO. Enfin, le western blot couplé à la technologie LI-COR a permis d'évaluer le niveau d'expression des protéines totales induit par les drogues, concernant les facteurs impliqués dans la voie de signalisation du TLR4 (NF-kB p65 et ses protéines associées).

Résultats : Les données obtenues après prétraitement de 6 Hu MDM polarisés M1 (LPS/IFN- γ) par les drogues versus contrôle DMSO, montrent une diminution significative des récepteurs membranaires du phénotype M1 (CD86, CD274), sans augmentation des récepteurs membranaires du phénotype M2 (CD163, CD206, CD36). Les données du profil sécrétoire montrent une diminution significative des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α , IL-18). En revanche, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, l'IL-12p70 et l'IFN- γ , ne présentent pas de variations en comparaison au contrôle DMSO. Les données obtenues montrent également une diminution très significative du niveau d'expression des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaires et le recrutement des leucocytes (ICAM-1, CXCL1), ainsi qu'une diminution très significative du niveau d'expression de la chimiokine responsable de l'infiltration des macrophages (MCP-1/ CCL2). Par ailleurs, les données obtenues avec 14 HuMDM polarisés M1, traités par la drogue ABX, montrent une surexpression du micro-ARN 124 de 3,4 fois par rapport au contrôle DMSO. Enfin, les données obtenues montrent que le niveau d'expression des protéines totales des facteurs impliqués dans la voie de signalisation du TLR4 (p65/RelA, I κ B ζ /NFKBIZ, TRAF6) est également significativement diminué.

Conclusion : L'ensemble de ces données suggère que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide limitent l'excès d'inflammation qu'amplifient les lymphocytes T CD4 et Th17 en réponse à l'inflammation. La drogue ABX jouerait un rôle dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire. La surexpression du miR-124 est en concordance avec les données obtenues *in vitro* (lymphocytes T CD4, PBMC humains) et *in vivo* (colons de patients atteints de colite ulcéreuse). Finalement, le laboratoire identifie, pour la première fois, le potentiel immunorégulateur de la drogue ABX dans l'inflammation. En induisant la surexpression spécifique du miR-124, la drogue ABX et son métabolite atténuent le profil pro-inflammatoire des macrophages stimulés par l'IFN- γ /LPS, par un rétrocontrôle négatif de la voie TLR4/NF-kB. Ainsi, la réponse inflammatoire est atténuée par la diminution du niveau d'expression protéique des médiateurs chimiques dépendants du NF-kB. La drogue ABX contrôle l'inflammation en limitant l'hyper-activation des cellules inflammatoires, ce qui favoriserait un retour à l'homéostasie cellulaire. Cette nouvelle

drogue ABX pourrait représenter une nouvelle perspective thérapeutique, visant à rééquilibrer certains médiateurs impliqués dans l'immunité innée et adaptative.

Mots-clés : macrophages, inflammation, drogue ABX, N-Glucuronide, micro-ARN-124, TLR4, NF-kB

2- Introduction

Les macrophages sont des médiateurs cellulaires hétérogènes. Ils participent à l'homéostasie cellulaire et tissulaire en collaborant avec les lymphocytes T. Leur capacité à sécréter des cytokines et des chimiokines permet aux lymphocytes T CD4 et Th17 d'induire l'amplification de la réponse à l'inflammation. Les macrophages s'activent et acquièrent des phénotypes d'expression différentielle en réponse à leur micro-environnement. Leur rôle est crucial dans l'inflammation, car ils contribuent à l'orchestration de la réponse cellulaire pour la résolution de l'inflammation (Mantovani et al., 2013b). La persistance d'une régulation fine des macrophages classiques (pro-inflammatoires M1) et alternatifs (anti-inflammatoires/ pro-résolutifs M2) est nécessaire, pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Il est de plus en plus évident que, les mécanismes qui régissent la transformation des macrophages pro-inflammatoires (M1) en macrophages anti-inflammatoires (M2) peuvent avoir un impact majeur sur la progression de nombreuses maladies inflammatoires chroniques (Mege and Capo, 2010). Bien que les macrophages aient un rôle dans la réparation tissulaire (Murray and Wynn, 2011), ils sont des acteurs majeurs dans la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques inflammatoires. Les macrophages sont par conséquent impliqués dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Udalova et al., 2016) et les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, colite ulcéreuse) (Duclos, 2017). Dans ces maladies, il existe un déséquilibre en faveur d'une polarisation de macrophages pro-inflammatoires au détriment de la polarisation de macrophages anti-inflammatoires. Et comme les macrophages classiques M1 sont d'importantes sources de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23), ils ont été identifiés comme d'importants médiateurs en partie responsables de ces inflammations chroniques.

Heureusement, plusieurs types de contrôles moléculaires permettent de réguler à la baisse les réponses inflammatoires des macrophages polarisés. Notamment, la régulation de l'activation des macrophages dans l'inflammation et l'auto-immunité, peut s'effectuer au niveau transcriptionnel. Des ARN non codants comme les micro-ARN peuvent diminuer les réponses inflammatoires (Yang and Wang, 2016) ; (Essandoh et al., 2016b). Ces dernières années, le miR-124 est apparu comme un modulateur critique de l'immunité et de l'inflammation. Des études ont montré que le miR-124 exerce un rôle crucial dans le développement du système immunitaire, la régulation des réponses immunitaires et les troubles inflammatoires même auto-immuns (Qin

et al., 2016) ; (Iwamoto and Kawakami, 2019). Outre l'existence de traitements existants pour les maladies inflammatoires chroniques auto-immunes, une grande hétérogénéité existe chez les patients, et influe sur la réponse aux traitements. Il faut donc développer de nouvelles stratégies pour fournir de nouvelles thérapeutiques.

Le laboratoire privé ABIVAX a développé plusieurs molécules chimiques, dont la plus avancée est une drogue ABX. Cette drogue se métabolise en N-Glucuronide chez l'homme et fait actuellement l'objet d'études cliniques de phase II chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques à caractère auto-immuns (Colite Ulcéreuse et la Polyarthrite Rhumatoïde). Le laboratoire public CNRS, s'est associé à la société privée ABIVAX afin d'unir ses forces techniques et scientifiques pour analyser et comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu, avec cette nouvelle drogue et son métabolite. Outre ses propriétés anti-rétrovirale (Campos et al., 2015), cette drogue ABX est un puissant anti-inflammatoire (Chebli et al., 2017) et induit la surexpression spécifique du miR-124 décrit pour ses propriétés anti-inflammatoires (Vautrin et al., 2019). En partant des données déjà obtenues dans le laboratoire concernant les effets anti-inflammatoires, à savoir : sur des modèles de souris de colite traités par la drogue ABX, Chebli et al, démontrent un effet protecteur exercé par la drogue ABX contre les dommages causés par la colite. En effet, ils observent d'une part, une réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α), et d'autre part une réduction de la chimiokine responsable de l'infiltration des macrophages (MCP-1/CCL2), sécrétées par les cellules du colon. En outre, des études *ex vivo* sur ces modèles, montrent que les macrophages issus de la moelle osseuse, stimulés par le LPS et traités par la drogue ABX, augmentent la cytokine anti-inflammatoire IL-10, mais également la cytokine IL-22 décrit pour ses effets réparateurs du tissu intestinal. Par ailleurs, les données obtenues des études cliniques menées sur des patients atteints de colite ulcéreuse, montrent que les cellules de colon surexpriment le miR-124. D'autres études *in vitro* sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et des lymphocytes T CD4 humains, montrent également une surexpression du miR-124.

En partant de ces données obtenues dans le laboratoire, *l'objectif* de mon projet de thèse est de caractériser *in vitro* les modulations phénotypiques et les mécanismes moléculaires mis en jeu à partir de Macrophages Dérivés de Monocytes Humains (Hu MDM) de donneurs sains, dans un contexte pro-inflammatoire (polarisés M1 par l'IFN- γ / LPS), et prétraités par la drogue ABX et son métabolite versus contrôle DMSO. *Je me suis demandée* : (i) est-ce que la drogue ABX et son métabolite induisent une réversion totale du phénotype pro-inflammatoire M1 vers un phénotype anti-inflammatoire M2 (pro-résolutif) ; (ii) est-ce que la drogue ABX et son métabolite induisent une surexpression du miR-124 dans les macrophages, comme c'est le cas *in vitro* avec

les lymphocytes T CD4 et les PBMC humains et enfin (iii) est-ce que la drogue ABX et son métabolite ont un impact sur la voie de signalisation du TLR4, puisqu'une stimulation IFN- γ /LPS dans les macrophages active la voie de signalisation du TLR4 en réponse à l'inflammation.

Mon hypothèse est que cette molécule serait une drogue qui contrôlerait l'homéostasie cellulaire, et dont le rôle serait en premier lieu, de limiter l'excès d'inflammation qu'amplifient les lymphocytes T CD4 et Th17. La drogue ABX atténuerait directement ou indirectement (soit *via* l'induction de la surexpression spécifique du miR-124), le profil pro-inflammatoire des macrophages, en exerçant un rétrocontrôle négatif de la voie TLR4/NF-kB. Ainsi, la réponse inflammatoire serait atténuée par la diminution du niveau de l'expression protéique des médiateurs chimiques dépendants du NF-kB. La drogue ABX contrôlerait l'inflammation en limitant l'hyper-activation des cellules inflammatoires ; ce qui favoriserait un retour à l'homéostasie cellulaire.

Pour étayer mon hypothèse, je me suis particulièrement intéressée à déterminer d'une part, les changements du niveau d'expression des récepteurs membranaires, que pourraient induire la drogue ABX et son métabolite en comparaison au contrôle DMSO, et d'autre part, j'ai évalué le niveau d'expression protéique des cytokines, des chimiokines et des protéines impliquées dans l'adhésion et le recrutement des leucocytes. Par ailleurs, comme le laboratoire a observé une surexpression spécifique du micro-ARN 124 *in vitro* dans les lymphocytes T CD4 et les PBMC humains, j'ai vérifié la détection et le niveau d'expression de ce miR-124 dans les macrophages pro-inflammatoires traités par la drogue ABX et son métabolite versus contrôle DMSO. Enfin, étant donné qu'une stimulation IFN- γ /LPS dans les macrophages active la voie de signalisation du TLR4, j'ai contrôlé le niveau d'expression protéique des facteurs moléculaires qui pouvaient être modulés par la drogue ABX et son métabolite en comparaison au contrôle DMSO, notamment le NF-kB p65 et ses protéines associées.

3- Matériels et Méthodes

3.1 *In vitro* préparation des Macrophages Dérivés de Monocytes Humains (Hu MDM), culture, différenciation, prétraitement par les drogues et polarisation M1

A- Isolation des monocytes primaires humains en provenance de sang périphérique

Les monocytes primaires humains sont isolés à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) en provenance de poches de concentré leuco-plaquettaire de donneurs sains. Ces poches de donneurs ont été obtenues par l'Etablissement Français de Sang (EFS, Montpellier, France), sous l'autorisation de la convention établie entre l'EFS/OCPM - l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM - CNRS) et le laboratoire collaboratif ABIVAX Therapeutics.

Concrètement, les PBMC sont isolés à partir d'un gradient de ficoll (Histopaque®1077-Sigma) et les monocytes sont purifiés des PBMC par une sélection positive en utilisant les billes CD14 (CD14 MicroBeads human # 130-050-201- Miltenyi Biotec) avec les colonnes de séparation MACS (LS Columns # 130-042-401- Miltenyi Biotec) en suivant les instructions du fabricant. Les monocytes sont mis en suspension dans un milieu de culture de différenciation contenant du RPMI 1640 (with Glutabio ; with 2g/l NaHCO₃ - Eurobio # CM1RPM08-01) supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF – Eurobio # CVFSVF00-01), avec 1X Pénicilline/Streptomycine (Pen Strep - LifeTechnologies # 151040-122) et 100 ng/ml final de M-CSF recombinant humain (Recombinant Human M-CSF - Peprotech® # 300-25). Après purification, la numération des monocytes CD14⁺ est faite en bleu trypan avec les lames de chambre de comptage de cellules Countess™ (# C10228 - Invitrogen) et l'hémocytomètre automatique Countess™ (# C10281 - Invitrogen) ; les monocytes sont utilisés directement pour être différenciés en macrophages (Hu MDM).

B- Différenciation en Macrophages Dérivés de Monocytes Humains (Hu MDM) et prétraitement par la drogue ABX, son métabolite (N-Glucuronide) et le contrôle DMSO et polarisation classique (inflammatoire M1)

Les monocytes isolés et purifiés comme décrit au-dessus sont mis en culture à raison de 1,5-1,7 million / puits d'une plaque 6 puits (6 well Cell Culture Plate – Greiner bio-one

CELLSTAR® # 657 160) dans un volume de 2 ml/ puits de milieu de culture supplémenté. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C en atmosphère humide et 5% CO₂.

Au 4ème jour de différenciation : Prétraitement par les drogues, les Hu MDM sont prétraités avec 5 µM final de la drogue ABX, 5 µM de son métabolite N-Glucuronide versus 0,01% final contrôle DMSO. Pour cela, l'ancien milieu de culture est enlevé et remplacé par 2 ml/ puits de milieu de culture supplémenté contenant respectivement les drogues. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C en atmosphère humide et 5% CO₂.

Au 6ème jour de différenciation : Arrêt du M-CSF et maintien des drogues, le M-CSF est enlevé des cultures. Pour cela, l'ancien milieu est enlevé et remplacé par 2 ml/ puits de milieu supplémenté sans M-CSF en présence des drogues. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C en atmosphère humide et 5% CO₂.

Au 7ème jour de différenciation : Polarisation M1 et maintien des drogues, les Hu MDM sont polarisés en M1 (en pro-inflammation) en ajoutant dans le milieu supplémenté : 20 ng/ml final d'IFN-γ (Recombinant Human IFN-γ # 300-02 - Peprotech®) et 100 ng/ml final de LPS (Lipopolysaccharides from Escherichia coli O55: B5 # L2880 - Sigma) en présence des drogues. Les cultures cellulaires sont maintenues en polarisation M1 pendant 24h à 37°C en atmosphère humide et 5% CO₂.

Au 8ème jour de culture soit après 24h de polarisation M1 (correspondant à 4 jours de traitement par les drogues) : Collecte des surnageants et des cellules pour l'extraction des protéines totales (i) les surnageants des cultures cellulaires traitées avec les drogues ABX et N-Glucuronide sont prélevés à raison de 500 µl/ tube eppendorf et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour l'analyse des profils sécrétoires et (ii) les cellules sont collectées en maintenant les plaques 6 puits sur la glace, les cellules sont détachées avec du PBS 1X 2 mM EDTA. Après numération, les cellules sont lavées en PBS 1X 4°C, les surnageants de lavage sont éliminés et après « snap freezing » dans l'azote liquide, les cellules sont conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation pour l'extraction cellulaire totale et l'analyse par western blot des protéines impliquées dans la voie TLR4/NF-kB. D'autres plaques 6 puits sont maintenues en milieu RPMI 10% SVF, 1X Pen/Strep en présence des drogues ABX et N-Glucuronide, et conservées à 37°C en atmosphère humide et 5% CO₂ jusqu'au 10ème jour (qui correspondra à 6 jours de traitement par les drogues)

Au 10ème jour de culture soit 6 jours de traitement avec les drogues, une partie des plaques de culture cellulaires sont arrêtées (i) pour la collecte des cellules en vue de la détection et la quantification du miR-124, et (ii) l'autre partie pour les analyses des récepteurs membranaires par cytométrie en flux.

3.2 Cytométrie en flux pour déterminer le niveau d'expression des récepteurs membranaires des Hu MDM prétraités par les drogues (X, N-Glucuronide, DMSO) et polarisés M1

A- Réactifs pour la cytométrie en flux

Tous les anticorps primaires anti-humains conjugués aux fluorochromes suivants, ont été utilisés dans cette étude à raison de 2 µl / 100 000 cellules et proviennent tous de chez BD Biosciences Pharmingen™ : anti-CD11b Fite, anti-CD14 APC, anti-CD16 Fite, anti-CD86 APC, anti-CD206 Fite, anti-CD36 PE, anti-CD274 APC, anti-CMHII PE, anti-CD163 PE. *Agent bloquant*: Fc Block (Globulins Cohn fraction II, III human # G2388 – Sigma) 10X final. *Solution de viabilité cellulaire*: BD Via-Probe™ (7-Amino-actinomycin D # 555816 - BD) 2µl / 100 000 cellules. *Visualisation de l'état d'apoptose* : FITC Annexin V (# 556419 – BD) 2 µl/ 100 000 cellules + Buffer Annexin 10X (# 556454 – BD) à utiliser au 1X.

B- Procédure de marquage

Les cellules sont collectées après 6 jours de traitement par les drogues (drogue ABX, son métabolite N-Glucuronide et le contrôle DMSO). Les plaques 6 puits sont maintenues sur la glace et les cellules sont détachées avec du PBS 1X 2 mM EDTA 4°C. Les cellules sont mises directement dans des tubes FACS BD (polystyrène 12 X 75mm) pour être lavées 1 fois en PBS 1X 4°C. Avant le marquage cellulaire, la numération cellulaire est faite en bleu trypan avec les lames de chambre de comptage de cellules Countess™ (# C10228 - Invitrogen) et l'hémocytomètre automatique Countess™ (# C10281 - Invitrogen). Les cellules sont remises en suspension avec du PBS 1X 2% SVF 4°C. Les récepteurs Fc des macrophages sont bloqués avec l'agent blockant Human Fc, 10X final pendant 30 min à 4°C. Les suspensions cellulaires sont réparties dans des tubes FACS à raison de 100 000 cellules/ tube dans un volume final de 100 µl et marquées avec les anticorps conjugués pendant 1h sur glace à l'abri de la lumière. En fin d'incubation les cellules marquées sont lavées 1 fois en PBS 1X 2% SVF 4°C puis remises en suspension en PBS 1X 2% SVF 4°C, et directement analysées par le FACS Calibur (BD Biosciences). Pour exclure les cellules mortes et visualiser l'état d'apoptose des cellules, chaque condition drogue est doublement marquée avec le 7AAD et l'Annexin V selon les instructions du fabricant. Dans cette étude, les contrôles utilisés pour l'analyse, correspondent à chaque condition drogue, sans marquage par les anticorps. Les contrôles de compensation, sont utilisés de manière à ce que chaque anticorps listé dans le paragraphe réactif soit tel que : 1 anticorps / tube de cellules.

C-Procédures d'acquisition et d'analyses

Les acquisitions sont faites sur le cytomètre en flux Calibur (Beckman Coulter). La visualisation de la fluorescence et le réglage des photomultiplicateurs (PMT), gains et voltages sont enregistrés à partir des tubes contrôles (contrôles cellules simplement marquées, contrôles cellules sans marquage). Au moins 10 000 évènements sont acquis pour l'ensemble des tubes d'analyses. Les données sont enregistrées sous Cell Quest et les analyses sont faites avec la clé FlowJo V7.6.5 pour PC.

3.3 Proteome Profiler™ Array pour déterminer le niveau d'expression des cytokines / chimiokines dans les surnageants des Hu MDM prétraités drogues et polarisés M1

Pour l'analyse, les surnageants de culture cellulaires des Hu MDM polarisés M1 pendant 24h (correspondant à 4 jours de traitement avec les drogues) conservés à -80°C, sont décongelés sur la glace puis centrifugés à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Le niveau d'expression relatif des cytokines et des chimiokines est déterminé en utilisant la technologie du Proteome Profiler™ Array Human Cytokine (# ARY005B – R&D Systems) en suivant les instructions du fabricant (**Annexe I**). Dans cette étude, 500 µl de surnageant de culture de chacune des conditions drogues sont utilisés. Les détections sont faites en utilisant la technologie LI-COR (IRDye® 800CW Streptavidin # 926-32230 LI-COR, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant (**Annexe II**). La lecture des signaux est faite par l'automate Odyssey® Imager (LI-COR Version 3.0). L'analyse et la quantification des signaux pour chacune des conditions est faite par le logiciel Image Studio Lite Version 5.2, où le signal moyen (densité de pixels) d'une paire de spot représente l'expression de chacune des cytokines et des chimiokines. Pour déterminer et quantifier les changements relatifs d'une cytokine ou chimiokine de la condition drogue ABX et de son métabolite N-Glucuronide versus contrôle DMSO, les analyses sont traitées avec le logiciel GraphPad Prism version 7.0.

3.4 RT PCR quantitative pour détecter et estimer le niveau d'expression du micro-ARN 124 des Hu MDM prétraités et polarisés M1

Les plaques 6 puits de culture des Hu MDM polarisés M1 (correspondant à 6 jours de traitement avec les drogues) sont mises sur la glace (3 plaques 6 puits/ condition de drogue), les cellules sont détachées avec du PBS 1X 2mM EDTA 4°C, lavées 1 fois en PBS 1X 4°C, la numération est faite en bleu trypan avec les lames de chambre de comptage de cellules Countess™ (# C10228 - Invitrogen) et l'hémocytomètre automatique Countess™ (# C10281 - Invitrogen). Après un 2^{ème} lavage en PBS 1X 4°C, les culots cellulaires sont remis en suspension avec 700 µl de tampon de lyse QIAzol® (QIAzol® Lysis Reagent (# 79306 – QIAGEN®), les tubes d'échantillons mis dans la glace sont conservés ensuite à -80°C jusqu'à leur transfert en carboglace en destination du prestataire ACOBIOM, Montpellier. La société ACOBIOM réalisera la prestation sur 14 échantillons de Hu MDM polarisés M1, traités 6 jours par les drogues (drogue ABX, N-Glucuronide et le contrôle DMSO). La prestation réalisée comprend : l'extraction des ARN, leurs qualités, la préparation des ADNc, la RT PCR TaqMan quantitative (protocole en **Annexe III**), la comparaison relative d'expression du miR-124 des drogues ABX et N-Glucuronide avec le contrôle DMSO ainsi que l'analyse statistique.

3.5 Western Blot pour analyser le niveau d'expression des protéines impliquées dans la voie de signalisation du TLR4 des Hu MDM prétraités et polarisés M1 (IFN-γ/LPS)

A- Réactifs pour les extractions cellulaires, le dosage des protéines et le western blot

Le tampon utilisé pour réaliser les extractions cellulaires est un tampon NP 40 fait maison composé de : 50mM HEPES pH7.5 (HEPES 1 M # 15630-080 Gibco™), 0,5% sodium deoxycholate (# D6750 Sigma), 150mM NaCl (fait maison), 1% NP40 (IGEPAL® CA-630 Sigma), 1mM EDTA (fait maison), cocktail d'inhibiteur de protéase 25X (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets # 11697498001 Roche), inhibiteur de phosphatase 100X (Halt Phosphatase inhibitor cocktail 100X # 78426 Life Technologies). Les inhibiteurs sont à utiliser au 1X. Le dosage des protéines est réalisé avec le réactif BCA (660 nm Pierce™ # 22660). Pour réaliser la gamme étalon, 1 ampoule de sérum albumine bovine à 2mg/ml est utilisée (BSA Albumin Standard # 23209 Thermo Scientific).

La migration des protéines est faite sur des mini gels de polyacrylamide à gradient : Bis-Tris 4-12% (NuPAGE # NP0335BOX Life Technologies) en présence des deux tampons préconisés par le fournisseur : MOPS SDS Running Buffer 20X (# NP0001 Life Technologie), NuPAGE Antioxydant (# NP0005 Life Technologies). Les gels et tampons sont utilisés en suivant les instructions du fabricant. Le marqueur protéique de poids moléculaire utilisé est le PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder, 10 – 250 kDa (# 26620 ThermoFisher Scientific). Pour le transfert des gels sur les membranes, ce sont des membranes Protran® de nitrocellulose qui sont utilisées (Amersham Protran Western blotting membrane # GE10600001 Sigma). Le tampon de transfert est un tampon Tris Glycine 20X fait maison (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% éthanol), à utiliser au 1X final.

B- Les anticorps primaires / les anticorps secondaires couplés à la fluorescence (technologie LI-COR)

Les ***anticorps primaires*** sont dilués en tampon TBS 0,1%Tween-20 lait5%, pour l'application du western blot selon les instructions du fabricant, les dilutions et références sont indiquées ci-dessous. A noter que les anticorps primaires suivants, proviennent tous de chez Cell Signaling Technology® : anti-NF-kB p65 monoclonal # 8242 (D14E12 dilué au 1 :1000), anti-phospho NF-kB p65 polyclonal # 3031 (Ser536 dilué au 1 :1000), anti-IkBa monoclonal # 4814 (L35A5 dilué au 1 :1000), anti- Phospho IkBa monoclonal # 9246 (Ser32/36 dilué au 1 :1000), anti-TRAF6 monoclonal # 8028 (D21G3 dilué au 1 :1000), anti-MyD88 monoclonal # 4283 (D80F5 dilué au 1 :1000), anti-p38 MAPK monoclonal # 8690 (D13E1 dilué au 1 :1000), anti-Phospho p38 MAPK monoclonal # 4511 (Thr180/Tyr182 D3F9 dilué au 1 :1000), anti-p44/42 MAPK monoclonal # 4695 (Erk1/2 137F5 dilué au 1 :1000), anti-Phospho p44/42 MAPK monoclonal # 4370 (Erk1/2 Thr202/Tyr204 D13.14.4E dilué au 1 :2000), anti-Akt monoclonal # 4685 (11E7 dilué au 1 :1000), anti-Phospho Akt monoclonal # 4058 (Ser473 193H12 dilué au 1 :1000), anti-PI3 Kinase p110 α monoclonal # 4249 (C73F8 dilué au 1 :1000), anti-mTOR monoclonal # 2983 (7C10 dilué au 1 :1000), anti- Phospho mTOR monoclonal # 5536 (Ser2448 D9C2 dilué au 1 :1000), anti-PI3K p110 α monoclonal # 4249 (C73F8 dilué au 1 :1000), Anticorps primaire en provenance d'ABCAM : anti-IkB- ζ polyclonal # ab155142 (dilué au 1 :1000), Anticorps primaire en provenance de Millipore : anti-Actin monoclonal # MAB1501 (dilué au 1 :5000), Anticorps en provenance de Santa Cruz : anti-C-Jun polyclonal # sc-1694 (dilué au 1 :1000), anti- Phospho C-Jun polyclonal # sc-16312 (Ser63/72 dilué au 1 :1000).

Les **anticorps secondaires couplés à la fluorescence** proviennent tous de chez LI-COR et sont tous utilisés dilués au 1 :15000 en tampon TBS 0,1%Tween-20 à l'abri de la lumière : anti-rabbit 800 (# 925-32211 IRDye), anti-rabbit 680 (# 925-68073 IRDye), anti-mouse 800 (# 925-32210 IRDye), anti-mouse 680 (# 925-68072 IRDye), anti-goat 800 (# 925-32214 IRDye).

C- Extraction des protéines totales

Pour l'extraction des protéines totales, les culots de culture cellulaires des Hu MDM polarisés M1 traités 4 jours avec les drogues ABX et N-Glucuronide conservés à -80°C, sont décongelés sur la glace. L'extraction est faite avec le tampon de lyse NP40 (volume culot cellulaire à volume tampon de lyse), bien mixer et laisser les échantillons incuber dans la glace pendant 1h (en vortexant de temps en temps). En fin d'incubation, les échantillons sont centrifugés 30 min à 12000G 4°C. Les surnageants sont collectés dans des tubes eppendorf propres, maintenus sur la glace, et la concentration des protéines totales est déterminée par une gamme BSA avec le réactif BCA en suivant les instructions du fabricant.

D- Western Blot et quantification du niveau d'expression des protéines de la voie TLR4

25 µg d'extraits protéiques de chacune des conditions sont dénaturés en tampon laemmli et déposés dans chaque puits pour être séparés sur les mini gels à gradient. Les protéines sont ensuite transférées sur des membranes de nitrocellulose dans un tampon de transfert pendant 1h avec le système Bio-Rad (Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfert Cell). En fin de transfert, après avoir bloqué les sites non spécifiques pendant 1h à température ambiante en tampon TBS 0,1%Tween-20 lait 5%, les anticorps primaires sont incubés toute la nuit à 4°C. Les protéines sont révélées par la technologie LI-COR : après 30 minutes d'incubation avec les anticorps secondaires fluorescents LI-COR et lavages des membranes. La lecture des signaux des protéines transférées sur les membranes est effectuée par l'automate Odyssey® Imager (LI-COR Version 3.0). L'analyse et la quantification des signaux protéiques sont faites avec le logiciel Image Studio Lite Version 5.2. Pour chacune des conditions (drogue ABX, N-Glucuronide et contrôle DMSO), chaque protéine est normalisée avec l'actine. Pour déterminer les changements quantitatifs, les quantifications des protéines normalisées de la drogue ABX et de son métabolite, sont comparées aux quantifications des protéines normalisées de la condition contrôle DMSO.

3.6 Illustration de l'expression du facteur nucléaire NF-kB p65 par immunofluorescence

A- Réactifs

PBS 1X (DPBS (1X) Sigma), ampoule de paraformaldéhyde 16% (sans méthanol Pierce), Triton™ X-100 (Solution Sigma), tampon de blocage (PBS 1X, 2% Bovin Serum Albumin). Anticorps primaire : anti-NF-kB p65 monoclonal Cell Signaling Technology® # 8242 (D14E12 dilué au 1 :400), anticorps secondaire : anti-rabbit IgG conjugué Alexa Fluor™ 488 (# A11008 Invitrogen), milieu de montage : VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI # H-1200 Clinisciences).

B- Immunofluorescences, analyses

Pour les immunofluorescences, les Hu MDM polarisés M1 et traités 4 jours sont cultivés sur des lamelles de 15mm de diamètre disposées dans chaque puits d'une plaque 6 puits, par condition de drogue. *Fixation* : les cellules sont rincées 2 fois en PBS 1X avant d'être fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 15 minutes à température ambiante. En fin d'incubation, la PFA 4% est éliminée et les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X (bain de 5 min / rinçage). *Perméabilisation* : les cellules sont perméabilisées 5 minutes à température ambiante avec une solution de 0,1% triton™ X-100. Après 3 lavages en PBS 1X (bain de 5 min / rinçage), les sites non spécifiques sont bloqués avec le tampon de blocage pendant 1h à température ambiante. Après avoir enlevé le tampon de blocage, les cellules sont marquées avec l'anticorps anti-NF-kB p65 dilué au 1 :400 en tampon de blocage toute la nuit à 4°C en chambre humide. Après avoir enlevé l'anticorps primaire, les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X (bain de 5 min / rinçage). Les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-rabbit IgG conjugué Alexa Fluor™ 488 pendant 50 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. En fin d'incubation les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X (bain de 5 min / rinçage) et 1 fois avec de l'eau milliQ. Les noyaux sont directement marqués en 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) par le milieu de montage VECTASHIELD® Antifade en suivant les instructions du fabricant. Les préparations cellulaires entre lames et lamelles sont maintenues à l'abri de la lumière toute une nuit à température ambiante avant d'être analysées. Les images sont prises au microscope inversé Leica et analysées avec le logiciel ImageJ (Fiji).

3.7 Morphologies des monocytes et des Macrophages Dérivés de Monocytes Humains (Hu MDM)

Pour examiner la morphologie des monocytes et des macrophages polarisés M1 traités par la drogue ABX, son métabolite et le contrôle DMSO, les cellules sont photographiées à l'objectif x10 avec le microscope inversé EVOS™ (Invitrogen™).

3.8 Analyses statistiques

La significativité statistique est déterminée par le test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié, avec l'utilisation du logiciel GraphPad Prism version 7.0. Une valeur * $p < 0,05$ est considérée comme étant statistiquement significative, une valeur ** $p < 0,01$ est considérée comme étant statistiquement très significative et une valeur *** $p < 0,001$ est considérée comme étant extrêmement significative.

4- Résultats

4.1 La drogue ABX et son métabolite le N-Glucuronide ont un impact sur la morphologie des Macrophages Dérivés de Monocytes Humains (Hu MDM) polarisés M1

Les monocytes primaires humains sont isolés à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) en provenance de poches de concentré leuco-plaquettaire de donneurs sains. Les monocytes sont purifiés des PBMC par une sélection positive avec les billes CD14, comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les monocytes purifiés sont différenciés avec du M-CSF (100 ng/ml) en RPMI 1640 supplémenté avec 10% SVF 1X Pen/Strep pendant 6 jours (**Figure 1**).

Au 4ème jour de différenciation, les cellules sont prétraitées avec les drogues (drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide à une concentration finale de 5µM) versus contrôle DMSO à 0,01%. Au 7ème jour de différenciation les Hu MDM sont polarisés en M1 avec de l'IFN-γ 20ng/ml + LPS 100ng/ml pendant 24h pour être dans un contexte pro-inflammatoire en présence des traitements par la drogue ABX, le N-Glucuronide et le DMSO.

Après 24h de polarisation M1, les surnageants de chaque condition cellulaire sont collectés en vue d'analyser les profils sécrétoires en cytokines/chimiokines. Les cellules sont collectées en vue de l'extraction des protéines pour l'analyse protéique en western blot.

Au 10ème jour de culture (soit après 6 jours de traitement par la drogue ABX, le N-Glucuronide et le DMSO), les cellules sont collectées pour détecter et quantifier le micro-ARN124 mais également pour analyser par cytométrie en flux le niveau d'expression des récepteurs membranaires.

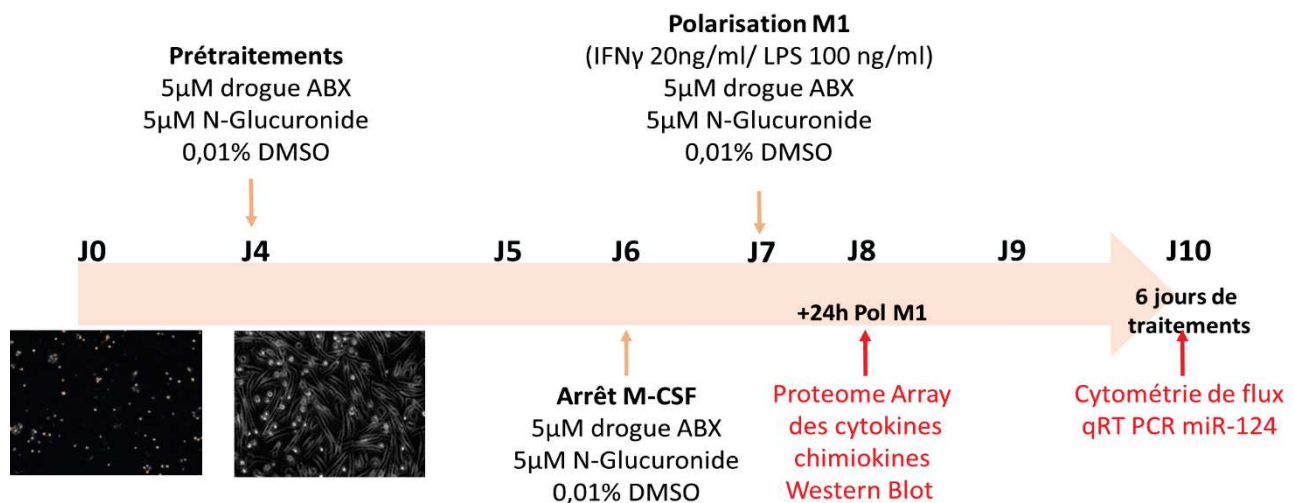
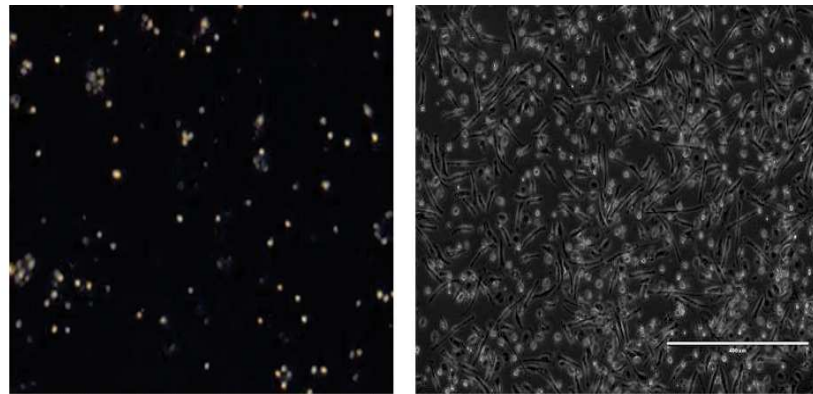


Figure 1. Diagramme représentatif de la méthode utilisée pour la différenciation, le prétraitement par la drogue ABX, le N-Glucuronide, le DMSO et la polarisation M1 des Hu MDM en vue des différentes analyses. Les monocytes purifiés sont différenciés avec du M-CSF (100 ng/ml) pendant 6 jours. Au 4^{ème} jour de différenciation les cellules sont prétraitées avec les drogues (Drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide à une concentration finale de 5µM) versus contrôle DMSO à 0,01% final. Au 7^{ème} jour de différenciation les Hu MDM sont polarisés en M1 pendant 24h avec l'IFN- γ 20ng/ml +LPS 100ng/ml en présence des traitements par la drogue ABX, le N-Glucuronide et le DMSO. Après 24h de polarisation en M1, les surnageants de chaque condition cellulaire sont collectés en vue d'analyser les profils sécrétoires en cytokines/chimiokines par Proteome Profiler Array R&D. Les cellules sont collectées en vue de l'extraction des protéines pour une analyse par le western blot. Au 10^{ème} jour de culture (soit après 6 jours de traitement par la drogue ABX, le N-Glucuronide, le DMSO), les cellules sont collectées pour détecter et quantifier le micro-ARN 124 par qRT PCR mais également pour analyser le niveau d'expression des récepteurs membranaires par cytométrie en flux.

Les images prises au microscope inversé avec l'objectif x10 montrent que les monocytes morphologiquement homogènes, sont de petites tailles rondes, flottantes qui deviennent dès le 4ème jour de culture en présence du M-CSF (100 ng/ml) des cellules macrophagiques adhérentes (**Figure 2**).

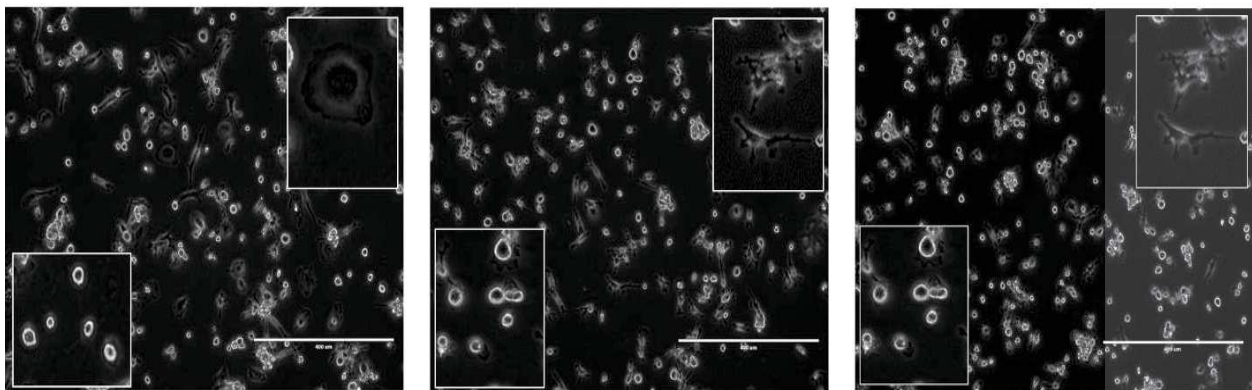
La morphologie des macrophages est hétérogène, bien que majoritairement sous forme de fuseau irrégulièrement allongés de forme fibroblastique, il est possible de distinguer des petites cellules rondes aux bords réguliers.

Au 8ème jour de culture et après 24h de polarisation M1, les cellules traitées par la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide comparé à la condition DMSO, présentent moins, voire ne présentent plus les larges cellules plates aux bords irréguliers (en forme « d'œuf sur le plat ») au profit de cellules ayant une forme arborescente associées à des petites cellules rondes aux bords réguliers et réfringents (**Figure 2**). Une tendance similaire a été observée parmi l'ensemble des 6 Hu MDM testé, avec cependant des variabilités dans les proportions des cellules arborescentes versus des cellules rondes (l'ensemble des images n'est pas représenté ici). Les images prises au microscope inversé avec l'objectif x10, montrent que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide changent la morphologie hétérogène des Hu MDM polarisés M1 en comparaison à la morphologie des Hu MDM polarisés M1 traités par le contrôle DMSO (**Figure 2**).



J0 Monocytes (cellules en suspension)
RPMI 10% SVF 1X P/S M-CSF 100ng/ml

J4 différenciation (avant pré traitement)
RPMI 10% SVF 1X P/S M-CSF 100ng/ml



J8 +24h de Pol M1 #DMSO 0,01%

J8 +24h de Pol M1 #Drogue X 5µM

J8 +24h de Pol M1 #N-Glucuronide 5µM

Figure 2. Images illustrant des monocytes en cours de différenciation et des Hu MDM polarisés 24 h en M1 et prétraités 4 jours par la drogue ABX, N-Glucuronide, DMSO (microscope inversé EVOS objectif x10). Les monocytes morphologiquement homogènes, ronds, sont des petites cellules flottantes qui deviennent des cellules adhérentes dès le 4^{ème} jour de culture en présence du M-CSF (100ng/ml) ; de morphologie hétérogène (petites cellules rondes aux bords réguliers + cellules irrégulièrement allongées ayant une forme fibroblastique). Au 8^{ème} jour de culture et après 24h de polarisation M1, les cellules traitées par la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide en comparaison à la condition DMSO, présentent moins voire ne présentent plus, les larges cellules plates (en forme « d'œuf sur le plat ») au profit de cellules ayant une forme arborescente et des petites cellules rondes aux bords réguliers réfringents. Les drogues ABX et N-Glucuronide modifient la morphologie hétérogène des Hu MDM polarisées M1 en comparaison à la condition contrôle DMSO.

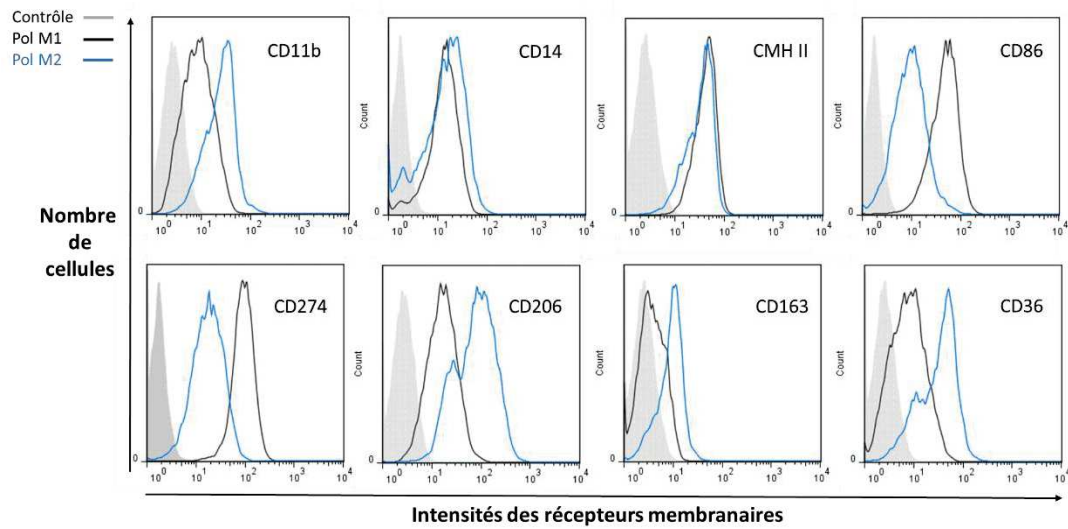
4.2 La drogue ABX et son métabolite induisent la diminution de l'expression des récepteurs membranaires inflammatoires sans augmenter les marqueurs anti-inflammatoires des Hu MDM

De manière à appréhender l'expression des récepteurs membranaires lors du traitement par la drogue ABX, N-Glucuronide et le contrôle DMSO, j'ai dans un premier temps, comparé le niveau d'expression de 8 récepteurs membranaires sur des Hu MDM non traités polarisés M1 et M2. Les histogrammes obtenus montrent les expressions différentielles (**Figure 3A**) lors d'une polarisation M1 versus M2. Les données obtenues par la cytométrie en flux et présentées sous forme d'histogrammes permettent d'observer dans cette étude que, lorsque l'on polarise des Hu MDM en M1 (pro-inflammatoires) en absence des drogues (X, N-Glucuronide et DMSO), alors, les cellules présentent initialement un fort niveau d'expression pour les marqueurs CD86 et CD274 principalement. En revanche, lorsque l'on polarise les Hu MDM en M2 (anti-inflammatoires), alors, les cellules présentent un niveau d'expression plus élevé pour les marqueurs CD206, CD163 et CD36. Ces données sont similaires d'un donneur à l'autre, mis à part le CD11b, qui peut être exprimé de manière identique lors d'une polarisation M1 ou M2 (données non montrées).

Cette base d'expression différentielle des récepteurs de surfaces est importante pour appréhender dans un second temps les changements des expressions des récepteurs membranaires des Hu MDM en présence de la drogue ABX, son métabolite le N-Glucuronide et le contrôle DMSO.

En effet, les 6 Hu MDM polarisés M1, traités pendant 6 jours avec les drogues (**Figure 3B**), les données montrent une diminution significative de la Moyenne d'Intensité de Fluorescence (MFI) des marqueurs de polarisation M1 (pro-inflammatoires) : CD86 (↓ 21%) et CD274 (↓25%) lorsque les Hu MDM sont traités par la drogue ABX versus contrôle DMSO. Les données sont équivalentes pour le métabolite N-Glucuronide (données non montrées). En revanche, dans cette étude, les drogues ABX et N-Glucuronide en comparaison au contrôle DMSO, n'influent pas en faveur d'une augmentation en ce qui concerne les marqueurs anti-inflammatoires M2 (CD206, CD163, CD36).

A



B

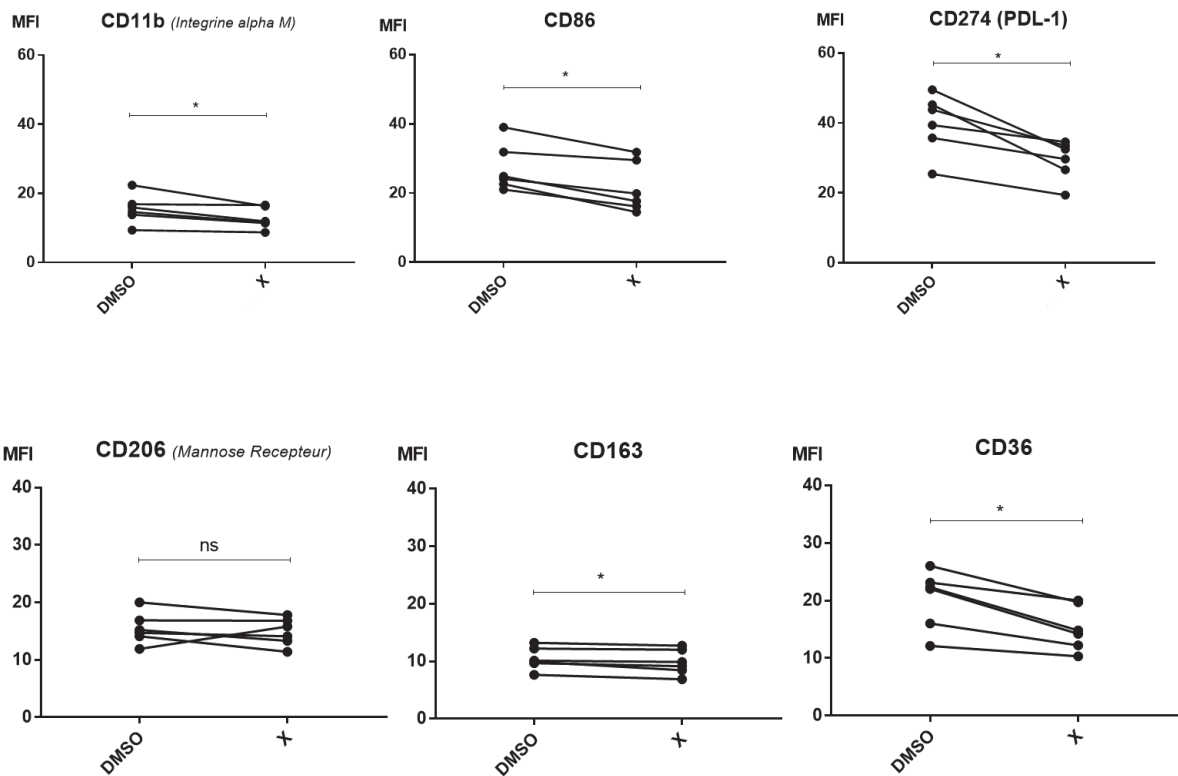


Figure 3. Cytométrie en Flux : analyses de l'expression différentielle des récepteurs membranaires sur des Hu MDM non traités polarisés M1 / M2 et sur des Hu MDM polarisés M1 traités 6 jours par la drogue ABX et DMSO (A) Le niveau d'expression des 8 marqueurs de surfaces cellulaires des Hu MDM polarisés M1 et M2, montre que, des Hu MDM non traités polarisés M1, se caractérisent principalement dans cette étude par les marqueurs CD86 et CD274. En revanche, des Hu MDM non traités polarisés M2 se caractérisent principalement dans cette étude par le CD206, le CD163 et le CD36. (B) Avec les 6 Hu MDM traités 6 jours par la drogue ABX versus le contrôle DMSO, les données montrent une diminution significative de la Moyenne d'Intensité de Fluorescence (MFI) des marqueurs de polarisation M1 (pro-inflammatoires) : CD86 (\downarrow 20%) et CD274 (\downarrow 23%). En revanche, la drogue ABX n'influe pas sur le marqueur anti-inflammatoire M2 (CD206), voire diminue les marqueurs CD163 (8%) et CD36 (24%). Les données sont équivalentes avec le métabolite N-Glucuronide (figures non présentées).

*N= 6 Significativité statistique * $p < 0.05$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié, ns : non significatif*

En outre, l'analyse des pourcentages de variation des Moyenne d'Intensité de Fluorescence (MFI) des 9 marqueurs de surfaces testés (CD11b, CD14, CD16, CD86, MHCII, CD274, CD163, CD206, CD36) sur les 6 Hu MDM polarisés M1 et traités 6 jours (**Figure 4**), les données montrent que la drogue ABX et son métabolite versus le contrôle DMSO, diminuent significativement le % de variation des MFI des marqueurs : CD11b (17% drogue ABX et 19% N-Gluc), CD14 (10% drogue ABX et N-Gluc), CD86 (21% drogue ABX et N-Gluc), CD163 (8% drogue ABX et 5% N-Gluc) et CD36 (24% drogue ABX et 26% N-Gluc). Toutefois, seule la drogue ABX diminue significativement le % de variation des MFI du marqueur CD274 (↓25%), bien qu'il y ait une tendance à la diminution avec son métabolite N-Glucuronide (↓22%). *N= 6 Hu MDM polarisés M1 et traités par les drogues (drogues ABX son métabolite N-Glucuronide versus le contrôle DMSO). Significativité statistique *p<0.05 test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié. Détermination du % de variation des MFI [(MFI ABX - MFI DMSO) / MFI DMSO] X100, idem N-Glucuronide.*

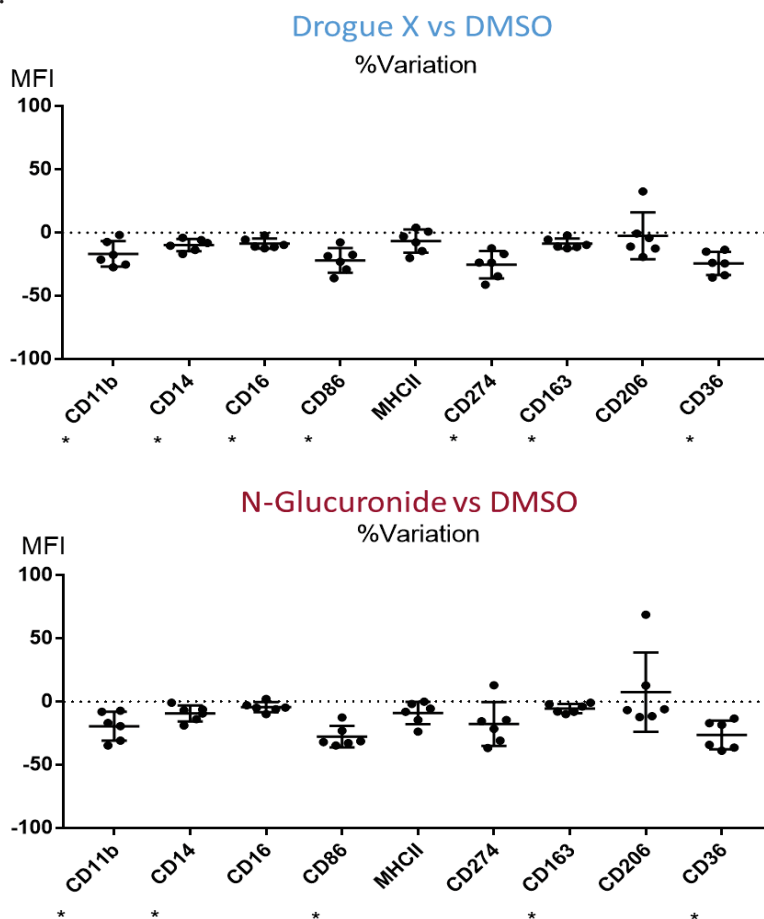


Figure 4. Comparaison en % de variation des Moyennes d'Intensité de Fluorescence (MFI) de l'expression des récepteurs membranaires de 6 Hu MDM polarisés M1 et traités 6 jours par la drogue **ABX**, **N-Glucuronide**, **DMSO**. Après détermination des % de variation des Moyennes d'Intensité de Fluorescence (MFI) de 6 Hu MDM, les données montrent que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide versus contrôle DMSO, diminuent significativement le % de variation des récepteurs suivants : CD11b, CD14, CD86, CD163 et CD36. En outre, seule la drogue ABX diminue significativement le récepteur CD274, bien qu'il y ait une tendance à la diminution avec son métabolite N-Glucuronide. *N= 6 Significativité statistique *p<0.05 test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié. % de variation des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) = [(MFI ABX - MFI DMSO) / MFI DMSO] X100*

4.3 La drogue ABX et son métabolite induisent la diminution de l'expression des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires dans les surnageants des Hu MDM polarisés M1

Le niveau d'expression relatif de 36 cytokines et chimiokines a été analysé dans les surnageants de 9 Hu MDM polarisés M1, traités 4 jours par la drogue ABX, N-Glucuronide et DMSO, en utilisant la technologie du Proteome Profiler™ Array Human Cytokine associée à la technologie LI-COR (IRDye® 800CW Streptavidin LI-COR) comme décrit dans la section matériels et méthodes. L'analyse des signaux pour chacune des conditions est faite par le logiciel Image Studio Lite Version 5.2, où le signal moyen (densité de pixels) d'une paire de spot représente l'expression de chacune des cytokines et chimiokines (**Figure 5A**). Sur les 36 cytokines et chimiokines analysées, 17 protéines ont été détectées en fonction de leur différentiel d'expression relatif par rapport au contrôle DMSO (**Figure 5B**).

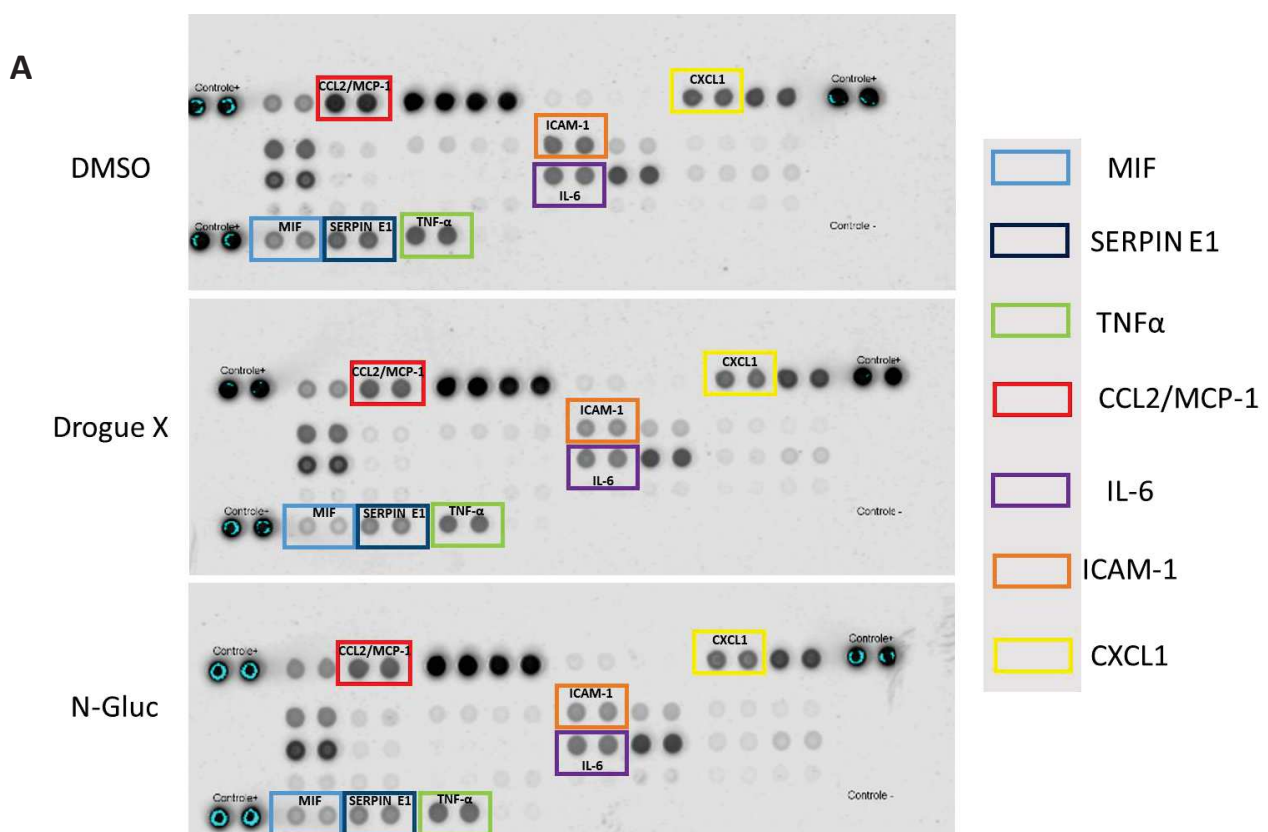


Figure 5A. Exemple des membranes illustrant 1 donneur de Hu MDM polarisés M1 et prétraités par les drogues (drogue ABX son métabolite N-Glucuronide et le contrôle DMSO). Les membranes sont révélées par l'utilisation de la technologie LI-COR (IRDye® 800CW Streptavidin). La lecture des signaux est faite par l'automate Odyssey® Imager. L'analyse et la quantification des signaux pour chacune des conditions sont faites par le logiciel Image Studio Lite, où le signal moyen (densité de pixels) d'une paire de spot représente l'expression de chacune des cytokines, chimiokines et autres protéines de l'inflammation. Pour comparer les niveaux des expressions relatifs d'une protéine en fonction des conditions (drogue ABX, son métabolite versus contrôle DMSO), les analyses sont traitées avec le logiciel GraphPad Prism. Contrôle spot + : contrôle présence signal spot / Contrôle spot - : contrôle absence de signal non spécifique spot.

Parmi ces 17 protéines analysées, 8 protéines impliquées dans l'inflammation montrent un profil différentiel intéressant dans cette étude (IL-6, l'IL-1, le TNF- α , CCL2, CXCL1, ICAM-1, MIF et la SERPINE E1). Les % de variation des intensités relatives de la drogue ABX et de son métabolite versus contrôle DMSO (**Figure 5B**) montrent, que ces protéines sont diminuées de manière significative dès que les Hu MDM polarisés M1 sont traités par la drogue ABX et le N-Glucuronide en comparaison au contrôle DMSO.

B

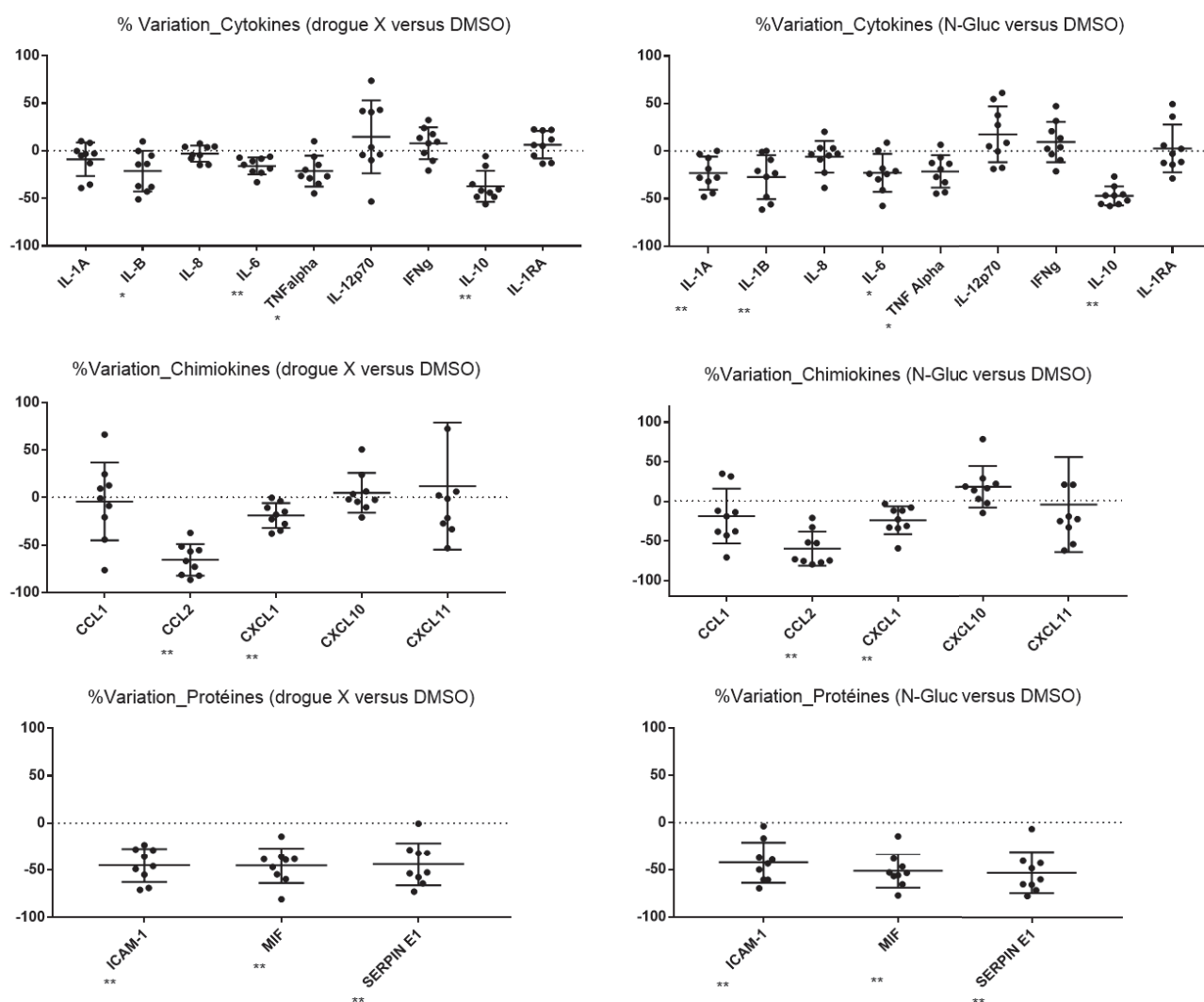


Figure 5B. Profil d'expression Proteome Array R&D exprimé en % de variation des valeurs d'intensité relatives des protéines inflammatoires de 9 Hu MDM polarisés M1 et traités par la drogue ABX, N-Glucuronide et DMSO. Les % de variation des valeurs des intensités relatives des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 (\downarrow 23% drogue ABX et N-Glucuronide), l'IL-6 (\downarrow 23% drogue ABX - 25% N-Glucuronide) et le TNF- α (\downarrow 23% drogue ABX et N-Gluc), sont significativement diminuées. Tandis que les protéines pro-inflammatoires comme l'IL-8 et l'IL-12p70 et l'IFN- γ ne présente pas de variation en comparaison au contrôle DMSO. En revanche, les chimiokines CCL2/MCP-1 (\downarrow 65% drogue ABX et N-Gluc), CXCL1 (\downarrow 30% drogue ABX et 24% N-Gluc) sont très significativement diminués, tandis que les chimiokines CXCL10 et CXCL11 ne présentent pas de variations. Mais les protéines comme l'ICAM-1 (\downarrow 45% drogue ABX et 42% N-Gluc), MIF (\downarrow 45% drogue ABX et 50% N-Gluc) et la SERPINE E1 (\downarrow 43% drogue ABX et 52% N-Gluc), présentent des % de variation des valeurs d'intensité relatives très significativement diminuées. Tandis que dans cette étude l'IL-10 (\downarrow 32% drogue ABX et 47% N-Gluc) est très significativement diminuée, la chimiokine CCL1, et la cytokine IL1RA ne présentent pas de variations notables, ces données sont équivalentes pour la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide. N=9 Significativité statistique * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié.

Comme les graphes le montrent, les données obtenues sont équivalentes avec le métabolite N-Glucuronide, à la différence près, que l'IL-1A est très significativement diminué de 23% en présence du N-Glucuronide. On observe dans cette étude une diminution statistiquement significative des protéines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 (↓16% drogue ABX, 25% N-Gluc), l'IL-1B (↓23% drogue ABX et N-Gluc) et le TNF-α (↓23% drogue ABX et N-Gluc). En revanche, les protéines pro-inflammatoires comme l'IL-8, l'IL-12p70 et l'IFN-γ ne présentent pas de variations dans cette étude. Les données montrent également une diminution très statistiquement significative des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaires et le recrutement des leucocytes telles que l'ICAM-1 (↓45% drogue ABX, 42% N-Gluc), CXCL1(↓30 % drogue ABX, 24% N-Gluc) ; il en est de même pour la chimiokine MCP-1/ CCL2 (↓65% drogue ABX et N-Gluc) responsable de l'infiltration des macrophages. En revanche, la chimiokine pro-inflammatoire CXCL10 et la protéine responsable de l'attraction des lymphocytes T activés : CXCL11 ne présentent pas de variations significatives.

On note également que la protéine pro-inflammatoire « Macrophage migration Inhibitory Factor » (MIF) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (rôle dans la fibrose) : la SERPINE E1 sont également significativement diminuées (MIF ↓45% par la drogue ABX et ↓50% par N-Gluc ; SERPINE E1 ↓43% par la drogue ABX et ↓52% par N-Gluc). Par ailleurs, la cytokine IL-10 (cytokine anti-inflammatoire, sécrétées par les cellules ayant un phénotype M2) dans cette étude, se trouve très significativement diminuée (↓32% drogue ABX et ↓47% N-Gluc).

En revanche, la cytokine IL-1RA (antagoniste récepteur de l'IL-1) et la chimiokine CCL1 (chimio attractante des monocytes, sécrétée par les cellules ayant une polarisation M2b) ne présentent pas de variations notables dans cette étude.

Enfin, bien que les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 (sécrétées par les cellules ayant une polarisation M2) soient « spottées » sur les membranes, dans cette étude, sur les 9 Hu MDM analysés, l'IL-4 et l'IL-13 ne sont pas du tout détectées en présence des drogues ABX et N-Glucuronide et DMSO.

Le dosage par la technologie du Luminex réalisée par le prestataire ABL Lyon, permet de confirmer la diminution statistiquement significative des protéines pro-inflammatoires (**Figure 6A et 6B**). Les graphes présentés illustrent et mettent en comparaison les mêmes surnageants de Hu MDM polarisés M1 et prétraités par les drogues ABX et N-Glucuronide versus contrôle DMSO par deux techniques différentes. Cependant, pour des raisons techniques, sur l'ensemble des 8 cytokines d'intérêts, seulement 5 cytokines ont pu être dosées correctement pour permettre une analyse statistique. Malheureusement, le TNF- α n'a pas pu être dosé et les cytokines comme l'IL-6 et l'IL-1B ne permettent pas une analyse statistiquement interprétable, malgré la tendance à la diminution **Figure 6C**.

*N= 9 Proteome Array N= 8 Luminex. Significativité statistique * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié. % variation relative = [(valeur drogue – valeur contrôle DMSO) / valeur drogue] X 100.*

A

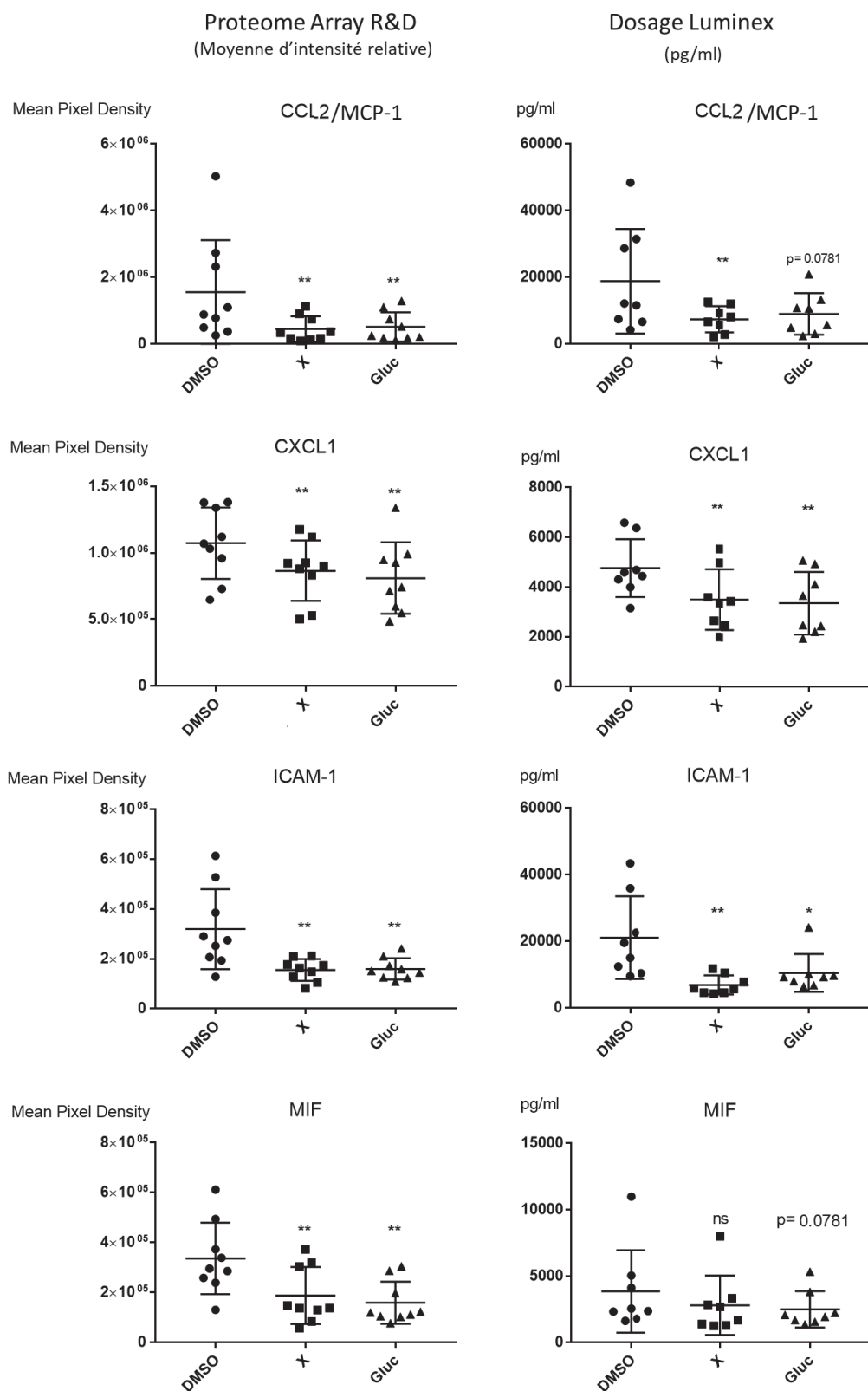


Figure 6A. Comparaison Proteome Array R&D (moyenne d'intensité relative) et dosage quantitatif (pg/ml) par Luminex avec une analyse statistique des chimiokines CCL2/MCP-1, CXCL1 et des protéines ICAM-1, MIF. Le dosage par la technologie du Luminex réalisé par le prestataire ABL Lyon, permet de confirmer la diminution statistiquement significative des protéines pro-inflammatoires. Les graphes présentés illustrent et mettent en comparaison les mêmes surnageants de Hu MDM polarisés M1 et prétraités par les drogues ABX, N-Glucuronide versus contrôle DMSO par deux techniques différentes. Cependant, sur l'ensemble des 8 cytokines d'intérêts, seulement 5 protéines ont pu être dosées correctement pour permettre une analyse statistique. $N=9$ Proteome Array $N=8$ Luminex - Significativité statistique * $p<0.05$, ** $p<0,01$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié ; ns : non significatif

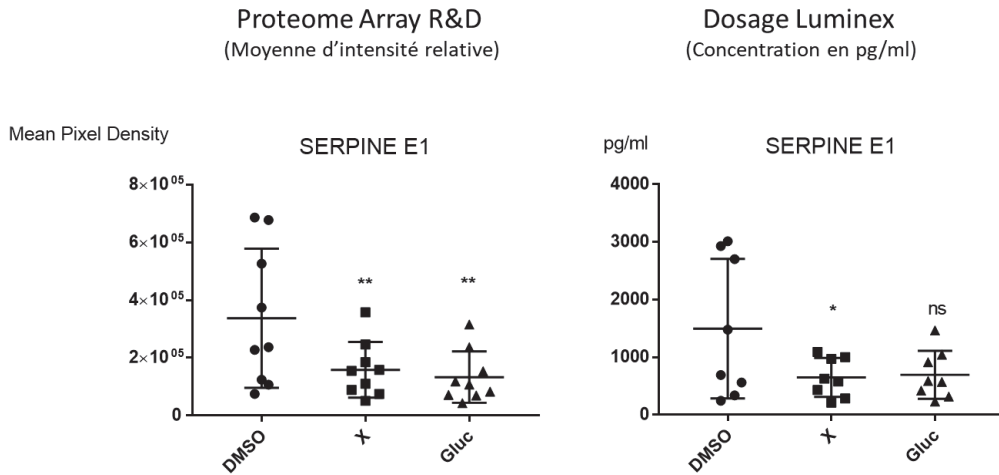
B

Figure 6B. Comparaison Proteome Array R&D (moyenne d'intensité relative) et dosage quantitatif (en pg/ml) par Luminex avec une analyse statistique de la protéine SERPINE E1 (protéine inhibitrice des protéases à sérine). Le dosage quantitatif de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1: la SERPINE E1 (rôle dans la fibrose) montre une diminution statistiquement significative par les deux techniques en présence de la drogue ABX. Cependant le dosage quantitatif de la SERPINE E1 par le Luminex en présence du métabolite N-Glucuronide, ne montre pas une diminution statistiquement significative, bien que la tendance soit à la diminution par rapport au contrôle DMSO. $N=9$ Proteome Array $N=8$ Luminex. Significativité statistique $*p<0.05$, $**p<0,01$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié ; ns : non significatif

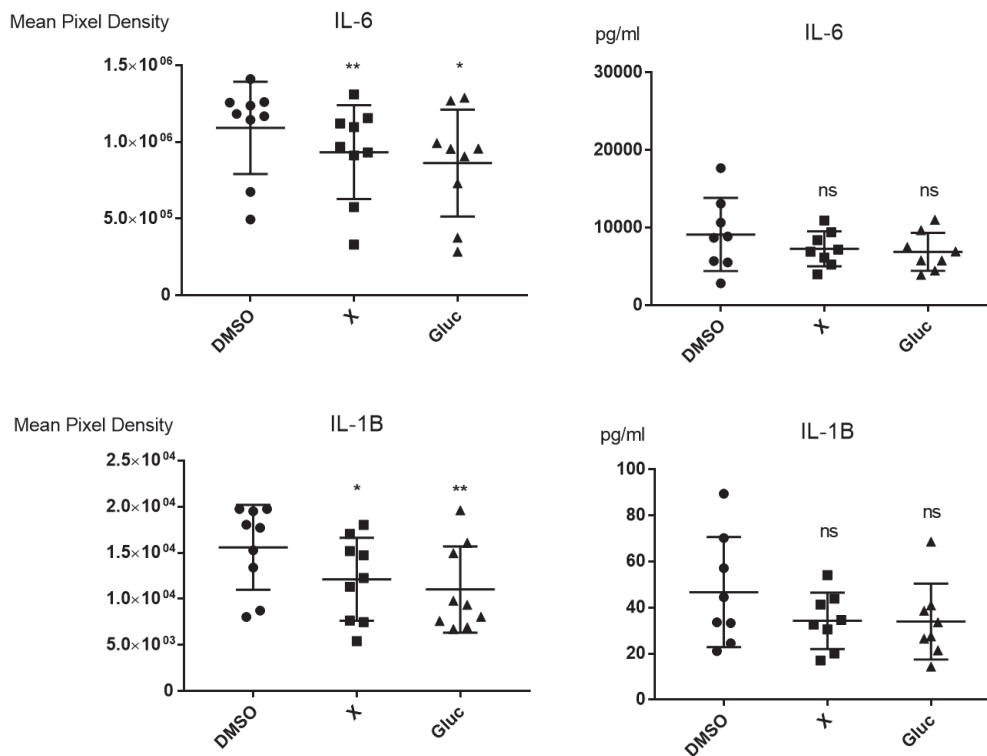
C

Figure 6C. Comparaison Proteome Array R&D (moyenne d'intensité relative) et dosage quantitatif (pg/ml) par Luminex (sans la possibilité d'établir des statistiques) des cytokines IL-6 et IL-1B. La protéine pro-inflammatoire TNF- α n'a pas pu être dosée (donc absence de graphe !). Quant aux protéines pro-inflammatoires : IL-6 et IL-1B, leur dosage ne permet pas une analyse statistique, bien que les graphes montrent une tendance à la diminution de la concentration en comparaison au contrôle DMSO. $N=9$ Proteome Array $N=8$ Luminex. Significativité statistique $*p<0.05$, $**p<0,01$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié ; ns : non significatif

Finalement, dans cette étude, les données montrent que les 9 Hu MDM polarisés M1, traités 4 jours par les drogues ABX et N-Glucuronide diminuent significativement en comparaison au contrôle DMSO, les protéines normalement sécrétées par des macrophages pro-inflammatoires : IL-6 (↓16% drogue ABX - 25% N-Gluc), l'IL-1 (↓23% drogue ABX et N-Gluc), le TNF- α (↓23% drogue ABX et N-Gluc), CCL2 (↓65% drogue ABX et N-Gluc), CXCL1 (↓30% drogue ABX - 24% N-Gluc), l'ICAM-1 (↓45% drogue ABX - 42% N-Gluc), MIF (↓45% drogue ABX - 50% N-Gluc) et la SERPINE E1 (↓43% drogue ABX - 52% N-Gluc).

Ces données suggèrent, que la drogue ABX et son métabolite diminuent le phénotype pro-inflammatoire des Hu MDM polarisés M1. En revanche, les données obtenues ici, montrent que la drogue ABX et son métabolite ne favorisent pas l'augmentation de la production des protéines qui peuvent être impliquées lors d'un phénotype anti-inflammatoires (polarisés M2) des Hu MDM. Les données obtenues dans cette étude, ne montrent aucune variation de la protéine IL-1RA (antagoniste récepteur de l'IL-1) et de la chimiokine CCL1 (chimio attractante des monocytes, sécrétée par les cellules ayant une polarisation M2b). En outre, l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire, sécrétées par les cellules ayant un phénotype M2) n'est pas augmentée et les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 (sécrétées par les cellules ayant une polarisation M2) ne sont pas détectées dans cette étude. Enfin, la chimiokine pro-inflammatoire CXCL10 et la protéine responsable de l'attraction des lymphocytes T activés : CXCL11, ne présentent pas de variations notables.

Somme toute, bien que le dosage Luminex montre une tendance à la diminution, le Proteome Profiler Array présente une diminution significative de 20% des protéines pro-inflammatoires : IL-6, IL-1 et TNF- α . En outre, les données obtenues dans cette étude, montrent que ce sont surtout les protéines responsables de l'adhésion cellulaires, du recrutement des leucocytes (ICAM-1, CXCL1), de l'infiltration des macrophages (MCP-1/CCL2), du « Macrophage migration Inhibitory Factor » (MIF) et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (SERPINE E1) qui se trouvent très significativement diminuées en présence des drogues ABX, N-Glucuronide versus DMSO (↓45% avec la drogue ABX et 65% avec le N-Glucuronide).

4.4 La drogue ABX et son métabolite induisent la surexpression du micro-ARN 124 dans les Hu MDM polarisés M1

Pour cette étude, 14 Hu MDM de donneurs sains polarisés M1 (IFN- γ /LPS) pendant 24h et traités pendant 6 jours avec les drogues (drogue ABX, N-Glucuronide et contrôle DMSO), sont lysés dans le tampon QIAzol® pour l'extraction des ARN totaux. Après vérification de la qualité des ARN et de leur quantification, une pré amplification des ADNc est réalisée suivie de la reverse transcription. La détection et la quantification relative de l'expression du micro-ARN 124 a été réalisées par PCR TaqMan quantitative par le prestataire ACOBIOM Montpellier, selon le protocole en **Annexe III**. La quantification de l'expression relative du micro-ARN 124 de chaque Hu MDM a été réalisée individuellement (données non montrées). Pour être synthétique, la **Figure 7A** montre un histogramme représentant la quantification des expressions relatives du miR-124 du pool des 14 Hu MDM polarisés M1 et traités par la drogue ABX, N-Glucuronide et contrôle DMSO. Les données obtenues montrent que les drogues ABX et N-Glucuronide induisent la surexpression de manière extrêmement significative du miR-124 versus contrôle DMSO. En effet, on observe que les données du pool des 14 Hu MDM polarisés M1 et traités 6 jours par la drogue ABX présentent une surexpression du miR-124 de 3,41 fois versus contrôle DMSO. En revanche, le pool des 14 Hu MDM polarisés M1 et traités 6 jours par le métabolite N-Glucuronide présentent une surexpression du miR-124 de 2,67 fois versus contrôle DMSO. Finalement, c'est la drogue ABX qui induit le plus la surexpression du miR-124 par rapport à son métabolite N-Glucuronide versus contrôle DMSO.

Par ailleurs, dans l'idée d'évaluer à quel moment est induit la surexpression du micro-ARN 124 *in vitro* dans les Hu MDM dès le traitement par la drogue ABX, une cinétique exploratoire du micro-ARN 124 a été réalisée sur 2 donneurs. Les Hu MDM, sont prétraités avec la drogue ABX versus DMSO dès le 4ème jour de différenciation. Les cellules sont collectées après 3h, 9h, 24h, 96h de traitement ainsi que, 3h après les avoir polarisés en M1 en présence de la drogue ABX (**Figure 7B**). Les cellules ont ensuite été dosées par RT PCR quantitative (en suivant le même protocole que la société ACOBIOM, Montpellier en **Annexe III**).

Comme le montre la **Figure 7C**, l'induction de la surexpression du micro-ARN 124 se produit dès lors que les Hu MDM sont en présence de la drogue ABX, et ce, indépendamment de l'état inflammatoire. Les données obtenues montrent que le miR124 est 1,13 fois surexprimé par rapport au contrôle DMSO après 9h de traitement par la drogue ABX, et se trouve 1,67 fois surexprimé après 24h et c'est après 3 jours (+96h) de traitement par la drogue ABX que le micro-ARN 124 atteint son pic et se trouve 4, 99 fois surexprimé par rapport au contrôle DMSO. Ces

premières données exploratoires suggèrent que le micro-ARN 124 est surexprimé dès que les cellules sont en présence de la drogue ABX. Outre, le fait que l'induction de la surexpression du micro-ARN 124 soit maintenue dans les cellules en inflammation (soit 3h après la polarisation en M1), cela suggère que si l'on maintien le traitement de la drogue ABX, alors les cellules continuent, voire maintiennent l'induction de la surexpression du miR124. C'est d'ailleurs, ce que démontrent les données obtenues par RT PCR quantitative des 14 Hu MDM polarisés en M1 et traités pendant 6 jours avec la drogue ABX (**Figure 7A**). L'induction de la surexpression du micro-ARN 124 est maintenue lorsque les cellules sont pro-inflammatoires.

A

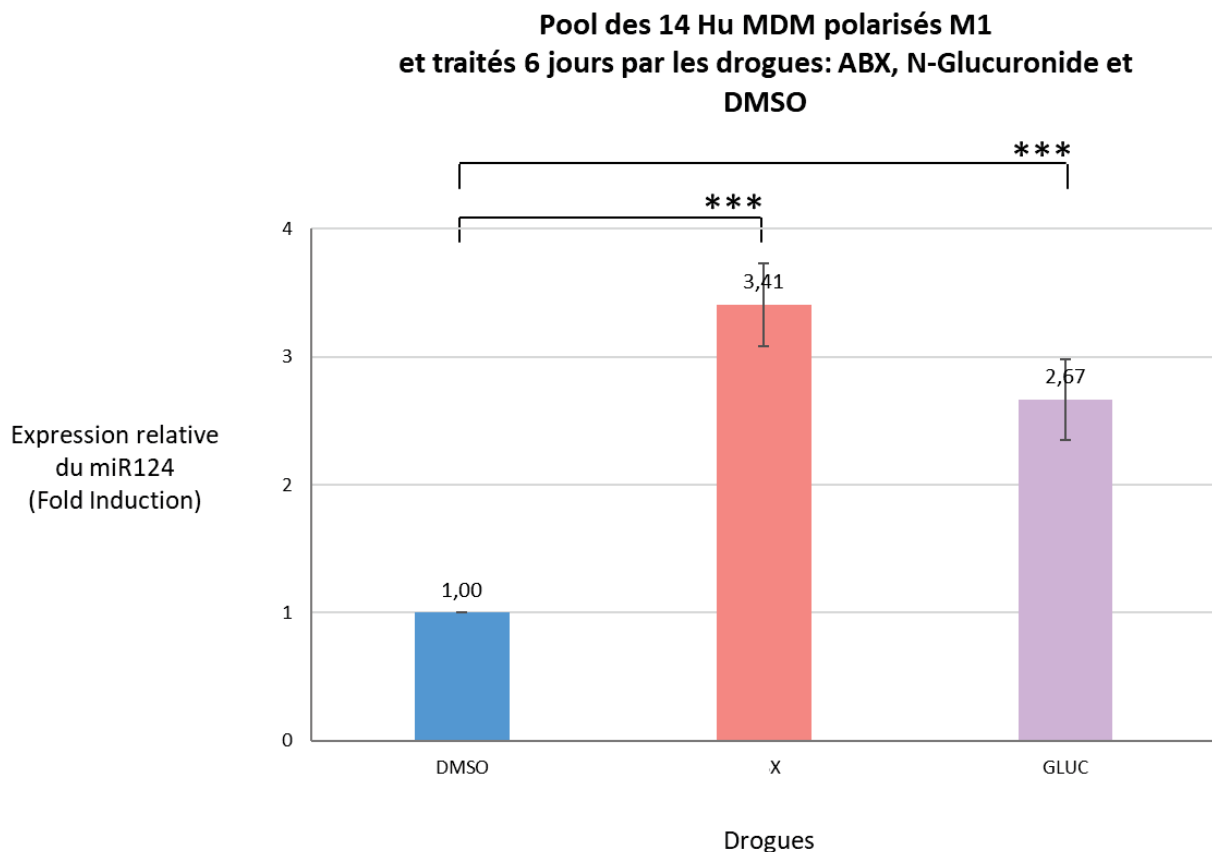


Figure 7A. Histogramme représentatif de l'expression relative du miR124 par RT PCR quantitative – pool des 14 Hu MDM polarisés M1 et traités 6 jours par les drogues. Ici les données obtenues par le prestataire ACOBIOM Montpellier, montrent sur cet histogramme, que le traitement des Hu MDM par la drogue ABX et son métabolite **GLUC**urionide pendant 6 jours induit la surexpression de manière extrêmement significative du micro-ARN 124 de 3,41 fois pour la drogue ABX et 2,67 fois pour le métabolite N-Glucuronide versus contrôle DMSO. Les histogrammes individuels des 14 Hu MDM ne sont pas représentés ici, à la préférence d'un histogramme où les 14 Hu MDM polarisés M1 et traités 6 jours sont en pool.

*N=14 Le test d'hypothèse statistique utilisé est le test de Wilcoxon apparié où ***p=0,001 (valeur extrêmement significative).*

B

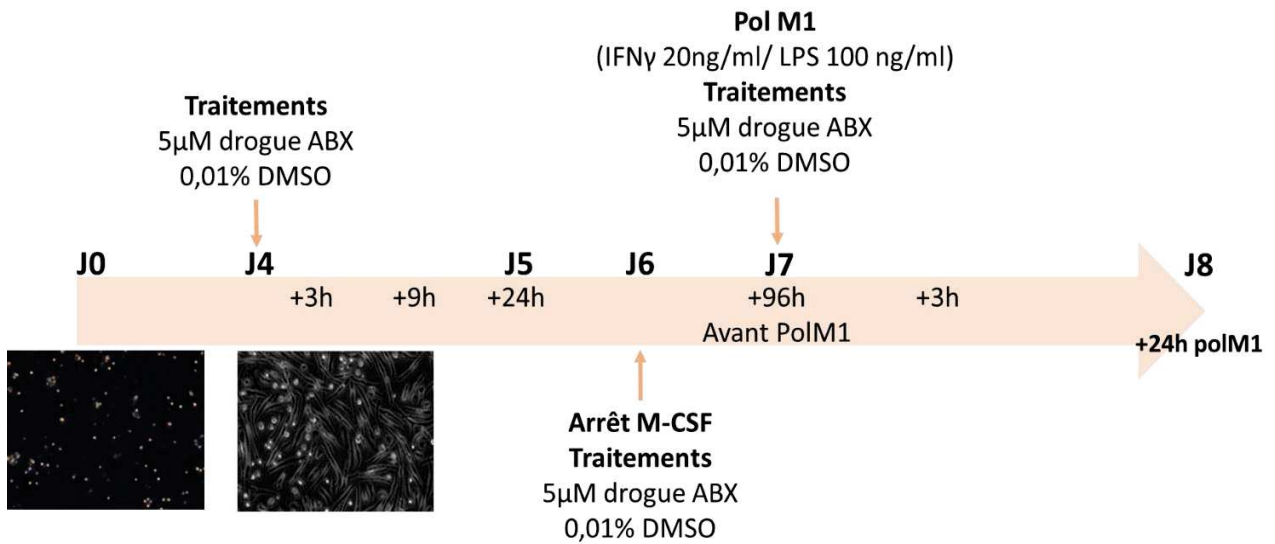


Figure 7B. Diagramme représentatif de la méthode utilisée pour réaliser la cinétique exploratoire de l'expression relative du micro-ARN 124 dans les Hu MDM traités par la drogue ABX et polarisés M1. La cinétique exploratoire du micro-ARN 124 a été réalisée sur 2 donneurs. Les Hu MDM, sont traités avec la drogue ABX versus DMSO dès le 4ème jour de différenciation. Les cellules sont collectées après 3h, 9h, 24h, 96h de traitement ainsi que, 3h après les avoir polarisés M1 en présence de la drogue ABX. Les cellules ont ensuite été dosées par RT PCR quantitative (en suivant le même protocole que la société ACOBIOM, Montpellier - Annexe III).

C

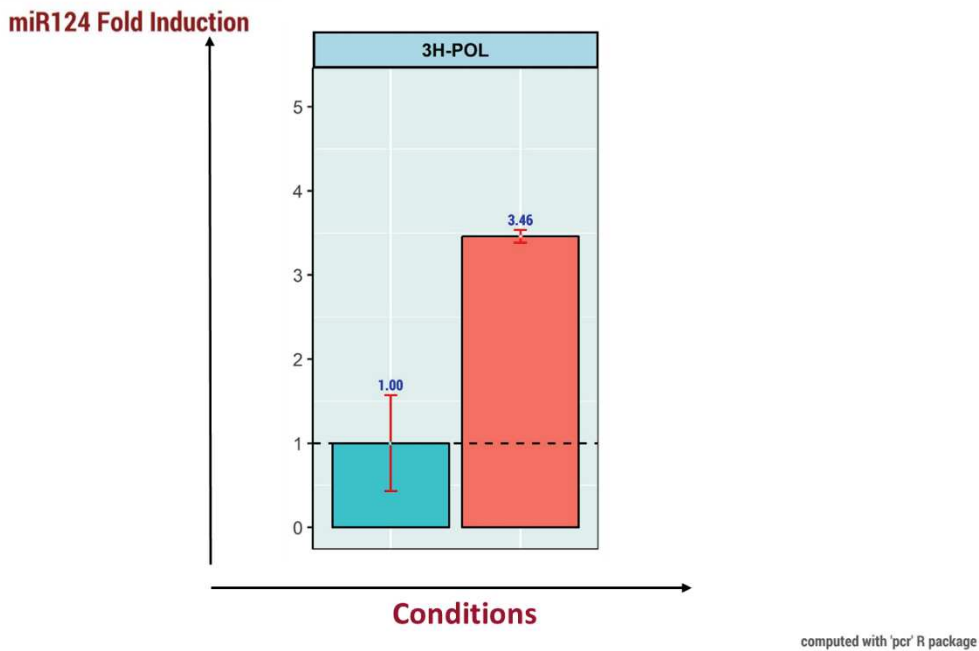
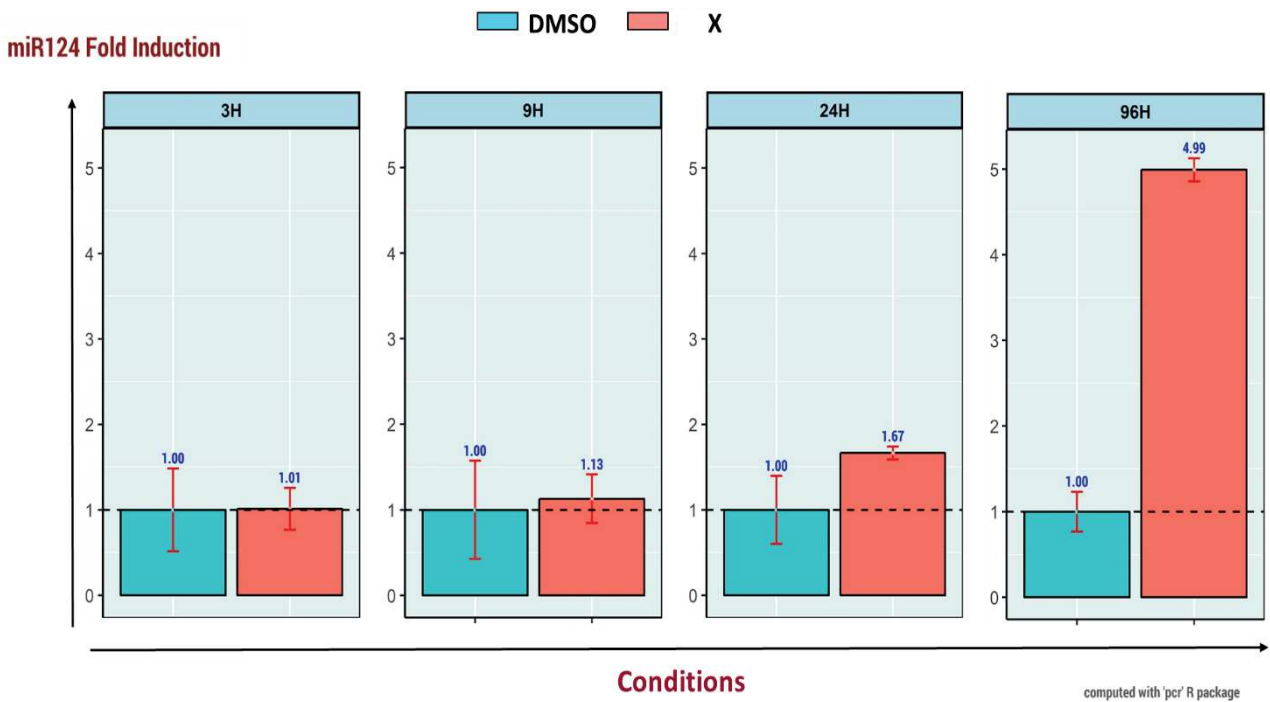


Figure 7C. Histogrammes représentant la cinétique d'expression du micro-ARN 124 dans les Hu MDM traités par la drogue ABX et polarisés M1. Les histogrammes représentent la cinétique exploratoire d'expression du miR124 dès les premières heures de traitement par la drogue ABX. Les cellules ont été collectées après 3h, 9h, 24h et 96h après les avoir traitées par la drogue ABX et également 3h après les avoir polarisés en M1 en présence de la drogue ABX. L'ensemble des cellules collectées a été ensuite dosé par Taqman RT PCR quantitative (en suivant le même protocole que la Ste ACOBION, Montpellier Annexe III). Les données montrent que le micro-ARN 124 est 1,13 fois surexprimé par rapport au contrôle DMSO après 9h de traitement par la drogue ABX et se trouve 1,67 fois surexprimé après 24h et c'est après 3 jours (soit +96h) de traitement par la drogue ABX que le micro-ARN 124 atteint son pic de surexpression et se trouve 4,99 fois surexprimé par rapport au contrôle DMSO.

4.5 La drogue ABX et son métabolite induisent la diminution du niveau de l'expression protéique des facteurs impliqués dans la voie TLR4/NF-kB (p65/RelA, IκBζ/NFKBIZ et TRAF6)

Une stimulation IFN-γ/LPS active la voie TLR4/NF-kB en réponse à l'inflammation. Par conséquent, vérifier que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide pouvaient avoir un impact sur le niveau de l'expression des facteurs protéiques impliqués dans cette voie, fait sens. En outre, les données présentées plus haut, montrent que certaines protéines pro-inflammatoires sont significativement diminuées. Les protéines totales extraites des cellules de Hu MDM traités pendant 4 jours et polarisés en M1 (IFN-γ/LPS) pendant 24h, ont été séparées sur des mini gels Bis-Tris 4-12% pour réaliser des western blot couplés à la technologie LI-COR. C'est-à-dire que pour cette étude, des anticorps secondaires fluorescents ont été utilisés, associés à une lecture des signaux protéiques par l'automate Odyssey® Imager. L'analyse et la quantification ont été faites avec le logiciel Image Studio Lite comme décrit dans la section matériels et méthodes. Cette méthodologie a permis de vérifier le niveau de l'expression quantitative des facteurs protéiques impliqués dans la voie TLR4/NF-kB (**Figure 8A**) : *p65/RelA* (facteur de transcription nucléaire, régulateur clé de l'inflammation) et sa forme phosphorylée, *MyD88* (« Myeloid Differentiation factor 88 » adaptateur essentiel qui permet l'induction des cytokines via tous les TLR), *TRAF6* (« TNF Receptor Associated Factor-6 » activateur à la fois des récepteurs au TNF mais également des récepteurs de l'Interleukine-1), *IκBζ/NFKBIZ* (famille des inhibiteurs IκB du NF-Kb), *IκBa* (famille des inhibiteurs du NF-kB) (**Figure 8B**). J'ai également tenté de tester d'autres facteurs impliqués dans la voie TLR4/NF-kB comme : IRAK1 et TAK1, mais malgré plusieurs tentatives d'optimisation, et après avoir changé de fournisseur pour les anticorps, aucun résultat n'a pu être observé. Les données obtenues dans cette étude montrent, que sur l'ensemble des 7 protéines testées de la voie TLR4/NF-kB, les drogues ABX et N-Glucuronide ont tendance à diminuer le niveau de l'expression protéique des facteurs p65/RelA (↓30-20%), TRAF6 (↓25%) et IκBζ/NFKBIZ (↓10-25%). Toutefois, les données montrent que, seule la drogue ABX diminue significativement les trois facteurs : p65/RelA (↓30%), TRAF6 (↓25%) et IκBζ/NFKBIZ (↓10%), tandis que les données du facteur MyD88 et phospho p65 ne présentent pas de variations significatives malgré la tendance. En effet, il y a une tendance à l'augmentation pour MyD88 et une tendance à la diminution pour le phospho p65, mais non significative. Avec le métabolite N-Glucuronide, les données montrent que le facteur TRAF6 est très significativement diminué (↓25%) et l'IκBζ/NFKBIZ tend à diminuer de 25% versus DMSO avec une significativité où $p=0,0625$; tandis que la diminution du facteur p65/RelA (↓20% versus DMSO) n'est pas significative, malgré la tendance. En revanche, le facteur adaptateur MyD88 et le phospho p65 montrent la même tendance que celle observée avec la drogue ABX.

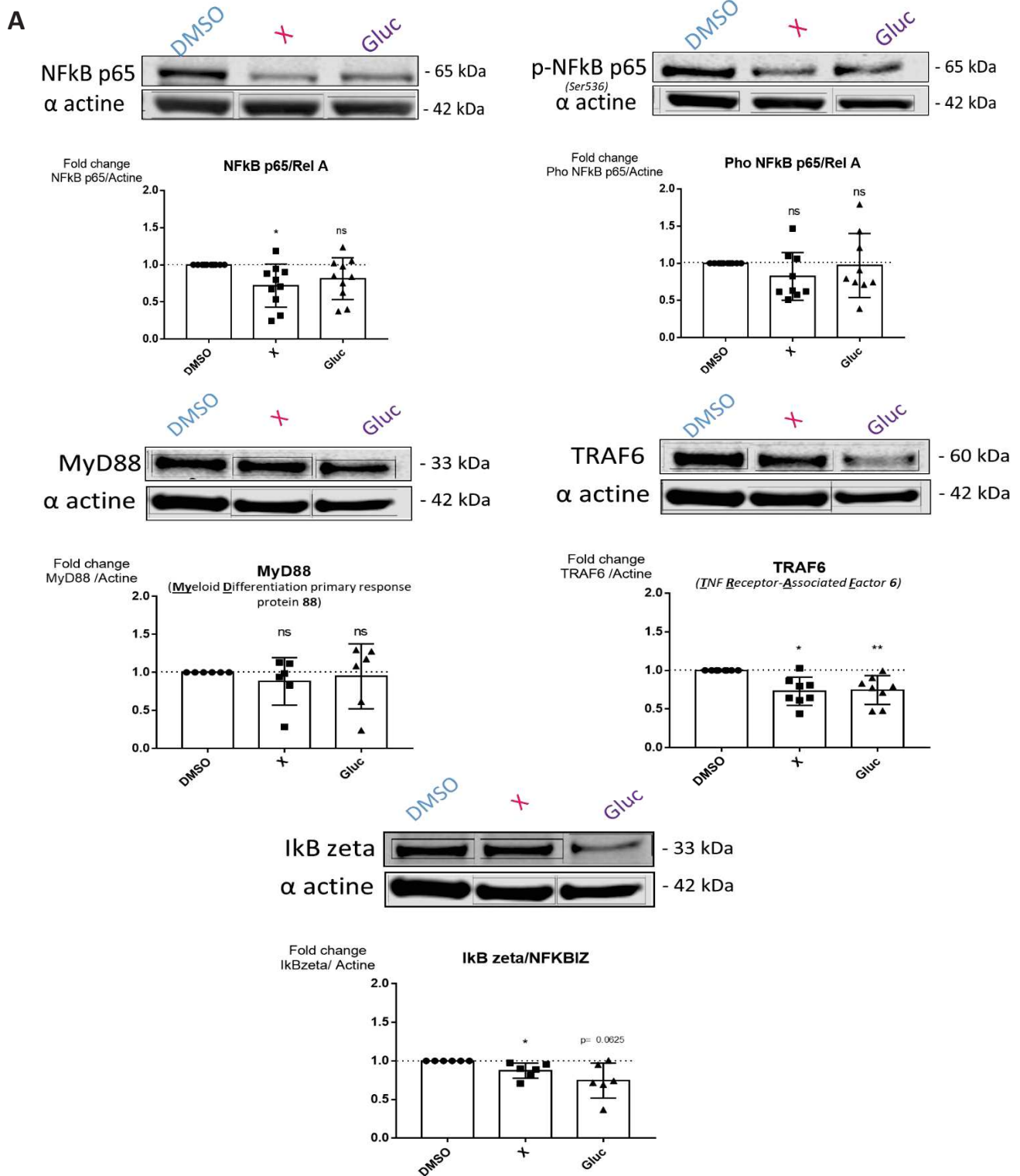


Figure 8A. Western Blot des extraits totaux protéiques – la drogue ABX diminue significativement le niveau de l'expression protéique des facteurs p65/RelA, TRAF6 et IκBζ/NFKBIZ impliqués dans la voie TLR4/NF-κB. On observe que les drogues ABX et N-Glucuronide ont tendance à diminuer le niveau de l'expression des protéines p65/RelA (↓30% drogue ABX ↓20% Gluc), TRAF6 (↓25% drogue ABX et Gluc) et IκBζ/NFKBIZ (↓10% drogue ABX ↓25% Gluc). Cependant, les données montrent que seule la drogue ABX diminue significativement ces trois facteurs impliqués dans la voie TLR4 ; tandis que les données du facteur MyD88 et phospho p65 ne présentent pas de variations significatives. Avec le métabolite N-Glucuronide, les données montrent que les facteurs TRAF6 (↓25%) et IκBζ/NFKBIZ (↓25%) sont significativement diminués, tandis que la diminution pour le facteur p65/RelA (↓20%) n'est pas significative, malgré la tendance à la diminution comme le montre l'histogramme. En revanche, le facteur MyD88 et le phospho p65, ne présentent pas de variations significatives. Bien qu'il y ait une tendance à l'augmentation pour MyD88 et une tendance à la diminution pour le phospho p65, mais non significative. $N=10$ (p65/RelA), $N=9$ (Phospho p65/RelA), $N=8$ (TRAF6), $N=6$ (IκBζ/NFKBIZ, MyD88). Significativité statistique * $p<0.05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié ns = non significatif.

Enfin, comme le montre la **Figure 8B**, l'inhibiteur du NF- κ B, appelé I κ B α (famille des I κ B protéines) et sa forme phosphorylée (Pho I κ B α) ne présentent pas de variations du niveau de son expression protéique.

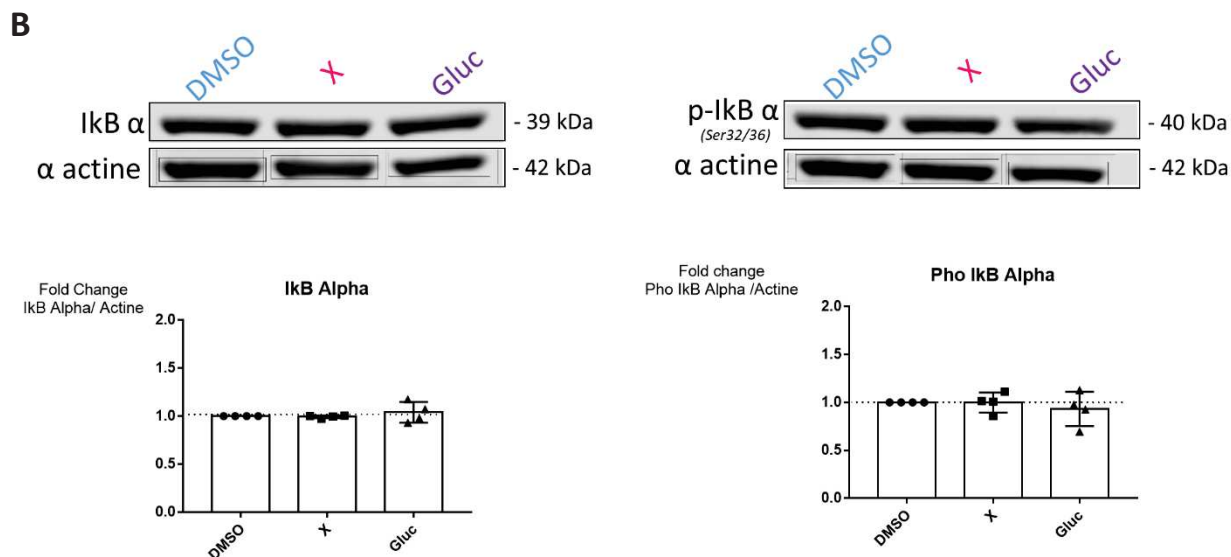


Figure 8B. Western Blot des extraits totaux – la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide n’ont pas d’impact sur le niveau de l’expression protéique du facteur inhibiteur I κ B α . Lorsque les Hu MDM sont traités pendant 4 jours en présence des drogues ABX, N-Glucuronide versus contrôle DMSO et polarisés M1, le niveau de l’expression protéique de l’inhibiteur I κ B α (inhibiteur du NF- κ B) ne présente pas de variabilité. N=4 Significativité statistique * $p < 0.05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié.

Finalement, l’ensemble des données de cette étude démontre que, lorsque les Hu MDM polarisés M1, en présence des drogues ABX, N-Glucuronide versus contrôle DMSO, le niveau de l’expression protéique des trois facteurs : p65/RelA, I κ B ζ /NFKBIZ et TRAF6, impliqués dans la voie TLR4/NF- κ B, tend à être diminué de 30% avec la drogue ABX et 20% N-Glucuronide (p65/RelA), \downarrow 25% avec la drogue ABX et le N-Glucuronide (TRAF6), \downarrow 10% avec la drogue ABX et 25% N-Glucuronide (I κ B ζ /NFKBIZ) par rapport au contrôle DMSO. Ces données révèlent que la voie NF- κ B est impactée par les drogues ABX et N-Glucuronide en comparaison au contrôle DMSO.

De manière à pouvoir explorer plus largement le niveau d’expression des protéines associées aux facteurs NF- κ B, sans utiliser la technique du western blot qui consommerait une trop grande panoplie d’anticorps, 6 donneurs sains de Hu MDM traités 4 jours et polarisés M1 ont été testés avec la technologie du Proteome Profiler™ Array spécifique Human NF- κ B pathway (# ARY029 R&D Systems) en suivant les instructions du fabricant (**Annexe IV**) ; associée à la technologie LI-COR (IRDye® 800CW Streptavidin LI-COR – **Annexe II**). Dans cette étude, 400 μ g de lysat cellulaire ont été utilisés. L’analyse des signaux protéiques pour chacune des conditions est faite par le logiciel Image Studio Lite, où le signal moyen (densité de pixels)

d'une paire de spot représente l'expression de chacune des protéines. Après avoir déterminé le % de variation des intensités relatives de la drogue ABX versus contrôle DMSO, cette étude exploratoire, permet d'observer que les facteurs protéiques associés au NF-kB comme : l'inhibiteur Ikbε/IKBKE et « l'IL-1 Receptor Associated Kinase-1 » (IRAK1) tendent à être diminués de 18% (Ikbε/IKBKE) et 11% (IRAK1), avec une significativité où $p=0,0625$ (test de Wilcoxon apparié) (**Figure 9**). En outre, cette étude montre, que lorsque les Hu MDM polarisés M1 sont en présence de la drogue ABX, alors le pourcentage de variation des intensités relatives du facteur p65/RelA et de sa forme phosphorylée tend à être diminué de 25% avec une significativité où $p=0,0625$ en comparaison au contrôle DMSO (**Figure 9**). Par ailleurs, les données montrent également, que l'autre sous-unité du NF-kB : c-Rel a tendance à être diminué de 23% par rapport au DMSO, sans significativité statistique. Quant au facteur adaptateur MyD88, les données montrent que le pourcentage de variation d'intensité relative ne semble pas varier par rapport au contrôle DMSO. De plus, les autres facteurs protéiques associés au facteur nucléaire NF-kB de la famille des inhibiteurs IKKs (Ikb-Kinases) comme NEMO, IKKα, IKKβ, les données obtenues dans cette étude montrent que le pourcentage de variation des intensités relatives ne varie pas versus contrôle DMSO (**Figure 9**). Il en est de même pour les autres membres de la famille du NF-kB comme : p105 (NF-kB1 ; précurseur de p50) et le p100 (NF-kB2 ; précurseur de p52) le pourcentage de variation des intensités relatives ne présentent pas de variations par rapport au contrôle DMSO (**Figure 9**).

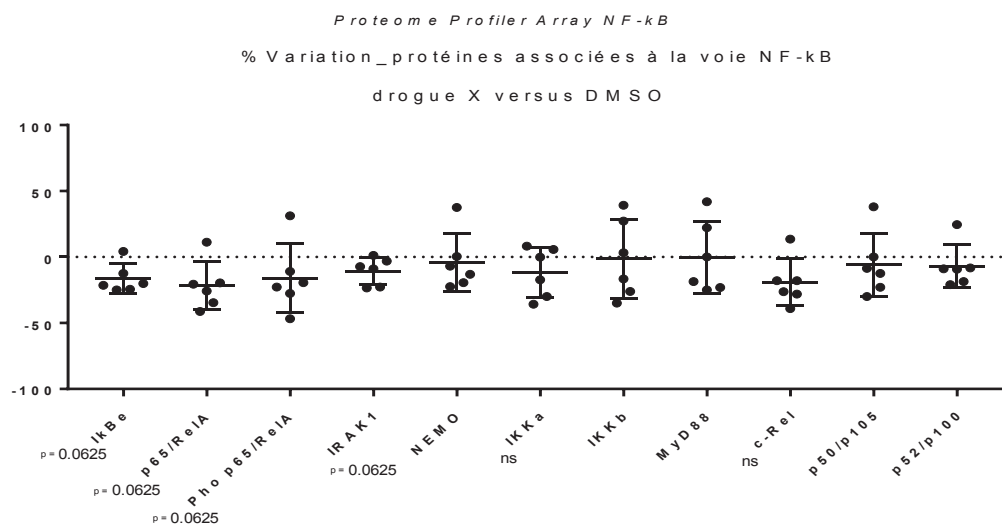


Figure 9. NF-kB pathway Proteome Profiler™ Array drogue ABX versus DMSO à partir des lysats cellulaires de 6 Hu MDM traités 4 jours et polarisés en M1. Le Proteome Profiler™ Array human NF-kB, montre que, le % de variation des intensités relatives des protéines associées au NF-kB tend à être diminués : Ikbε/IKBKE (18%), p65/RelA et sa forme phosphorylée (25%) ainsi que « l'IL-1 Receptor Associated Kinase-1 » (IRAK1) 11%, mais avec un test d'hypothèse statistique où $p=0,0625$ (test de Wilcoxon apparié). En outre, les données montrent que l'autre sous-unité du NF-kB : c-Rel a tendance à être diminué (23%), cependant, les données ne sont pas significativement statistiques. Par ailleurs, la protéine adaptatrice MyD88 est un facteur dont l'expression ne varie pas. De plus, les données montrent que les facteurs de la famille des inhibiteurs IKKs : NEMO, IKKα, IKKβ, ne varient pas versus contrôle DMSO. Il en est de même pour les autres membres de la famille du NF-kB comme : p105 (NF-kB1 ; précurseur de p50) et le p100 (NF-kB2 ; précurseur de p52) le % de variation des intensités relatives ne varient pas en comparaison au contrôle DMSO.

*N=4 Significativité statistique * $p<0.05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié et ns = non significatif.*

Lorsque les Hu MDM sont en présence du N-Glucuronide, les données obtenues par le Proteome Profiler™ Array NF-kB pathway ont une tendance similaire aux données obtenues avec la drogue ABX, sans significativité statistiques (données non montrées).

Finalement, en présence de la drogue ABX et de son métabolite N-Glucuronide versus contrôle DMSO, les Hu MDM polarisés M1 tendent à diminuer l'expression des facteurs protéiques p65/RelA (↓30% drogue ABX - ↓20% N-Glucuronide), TRAF6 (↓25% drogue ABX et N-Glucuronide) et IκBζ/NFKBIZ (↓10% drogue ABX - ↓25% N-Glucuronide). En revanche, les données de cette étude démontrent que, seule la drogue ABX diminue significativement les trois facteurs : p65/RelA (↓30%), TRAF6 (↓25%) et IκBζ/NFKBIZ (↓10%). En outre, les données obtenues par le Proteome Profiler™ Array NF-kB pathway, révèlent que les 6 Hu MDM polarisés M1 en présence de la drogue ABX et de son métabolite N-Glucuronide, ne présentent pas de variation d'expression protéique pour le facteur adaptateur MyD88. En outre, les données révèlent également que des Hu MDM polarisés M1 en présence de la drogue ABX, tendent à diminuer le niveau de l'expression des autres facteurs associés au NF-kB comme : l'IκBε/IKBKE (↓18%) et l'IRAK1 (↓11%) mais avec une significativité où $p=0,0625$. Le niveau de l'expression protéique des autres facteurs associés au NF-kB comme : NEMO, IKKα, IKKβ, p50/p105 et p52/p100, ne présentent pas de variations quand les Hu MDM polarisés M1 sont traités par les drogues ABX et N-Glucuronide. Cependant les données de cette étude révèlent que le facteur c-Rel (sous-unité du facteur NF-Kb) à tendance à être diminué de 23% mais sans significativité statistique.

Quant au facteur de transcription nucléaire p65/RelA, les illustrations par immunofluorescence présentées dans la **Figure 10** démontrent qu'en présence de la drogue ABX et de son métabolite le N-Glucuronide, le facteur de transcription nucléaire p65/RelA est moins exprimé en comparaison au contrôle DMSO.

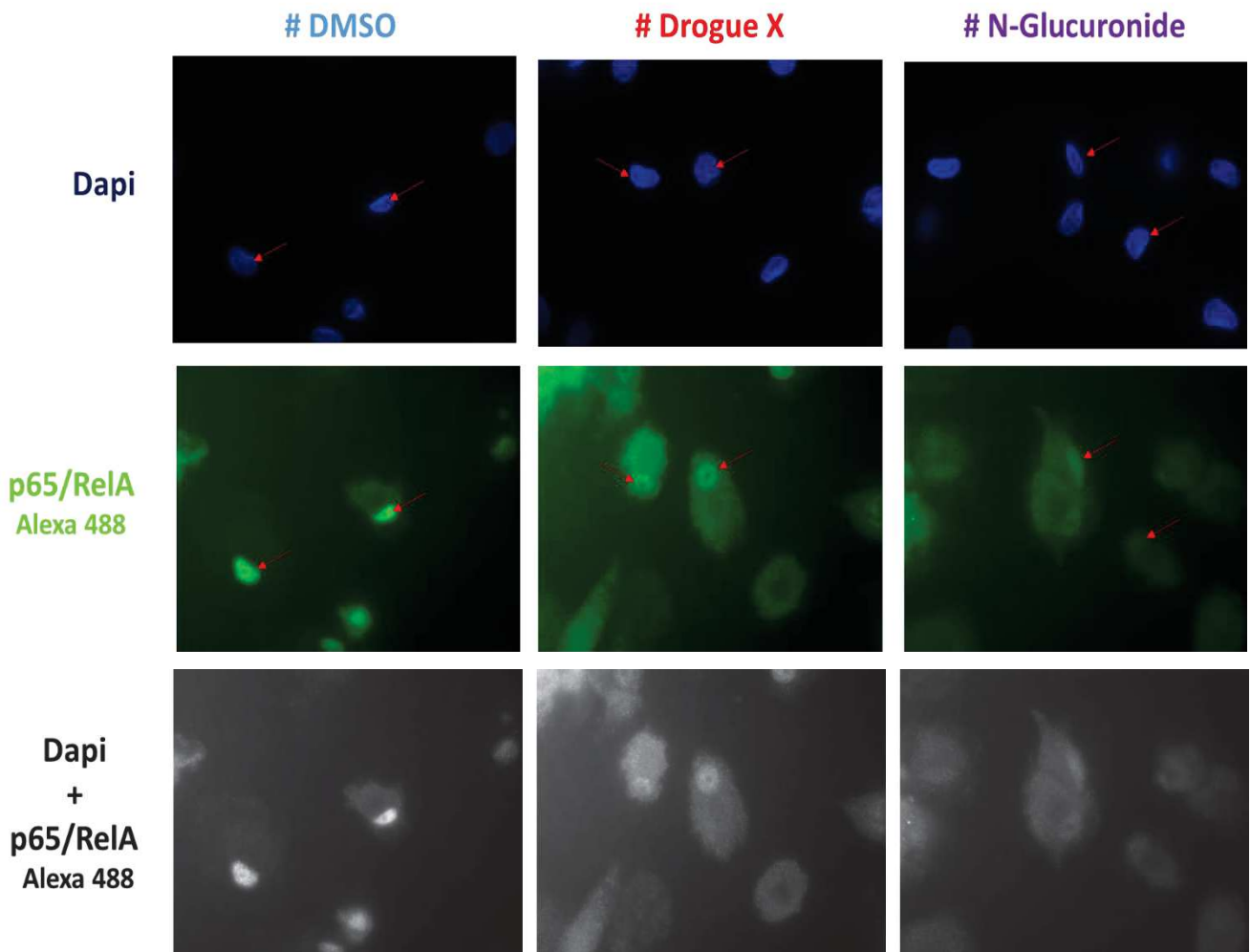
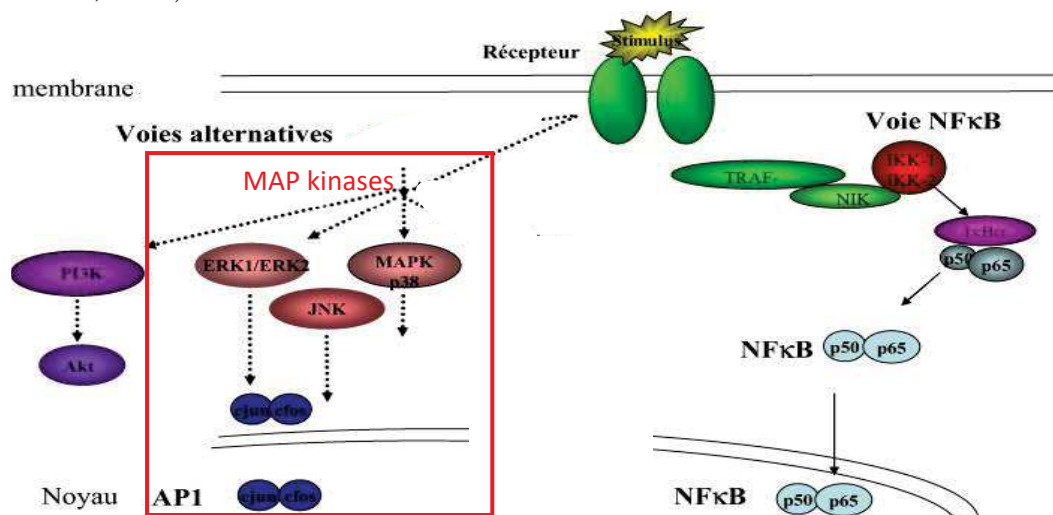


Figure 10. Illustration par immunofluorescence de la diminution du niveau de l'expression protéique du facteur de transcription nucléaire p65/RelA. Les immunofluorescences ont été réalisées pour illustrer la diminution du niveau de l'expression du facteur de transcription nucléaire p65/RelA, où les noyaux sont marqués par le Dapi (bleu) et le p65/RelA par l'Alexa Fluor 488 (vert). Les images d'immunofluorescences illustrent simplement ici, le fait que les drogues **ABX** et **N-Glucuronide** diminuent le niveau de l'expression protéique du facteur de transcription nucléaire p65/RelA par rapport à la condition contrôle **DMSO**. Les images sont prises au microscope inversé Leica à l'objectif x63 et analysées avec le logiciel ImageJ (Fiji).

4.6 La drogue ABX et son métabolite n'impactent pas sur le niveau de l'expression protéique des MAP kinases (ERK1/2, p38, c-Jun) impliquées dans la voie TLR4

Après avoir démontré que les drogues ABX et N-Glucuronide ont un impact sur les facteurs p65/RelA, I κ B ζ /NFKBIZ et TRAF6 (facteurs impliqués dans la voie TLR4/NF- κ B), il me paraissait important de vérifier également les autres voies de signalisation induites par une stimulation IFN- γ /LPS ; qui participent aussi à la réponse inflammatoire. Le schéma ci-dessous, rappelle les facteurs impliqués dans la voie de signalisation des « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAPK). J'ai vérifié le niveau d'expression protéique des facteurs « Extracellular signal-Regulated Kinase » (ERK1/2), p38 et c-Jun (facteur qui induit « l'Activator Protein-1 » AP-1) (Gazon et al., 2018).



Pour ce faire, les protéines totales extraites des cellules de 4 Hu MDM traités pendant 4 jours et polarisés M1 (IFN- γ /LPS) pendant 24h, ont été séparées sur des mini gels de polyacrylamide à gradient (Bis-Tris 4-12%) pour réaliser des western blot couplés à la technologie LI-COR. C'est-à-dire que pour cette étude, des anticorps secondaires fluorescents ont été utilisés, associés à une lecture des signaux par l'automate Odyssey® Imager. Les signaux ont été analysés et quantifiés avec le logiciel Image Studio Lite comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les données comparatives (drogue ABX, N-Glucuronide versus contrôle DMSO) ont été analysées par le logiciel GraphPad. Cette méthodologie a permis de vérifier que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide versus contrôle DMSO, n'impactent pas sur le niveau de l'expression protéique des facteurs composants les MAP Kinases (**Figure 11**). La drogue ABX et le N-Glucuronide ne modifient pas le niveau de l'expression des protéines ERK1/2, p38, c-Jun, ainsi que leurs formes phosphorylées. Bien que la forme phosphorylée de c-Jun a tendance à être plus élevée que le contrôle DMSO, les données ne sont pas significatives.

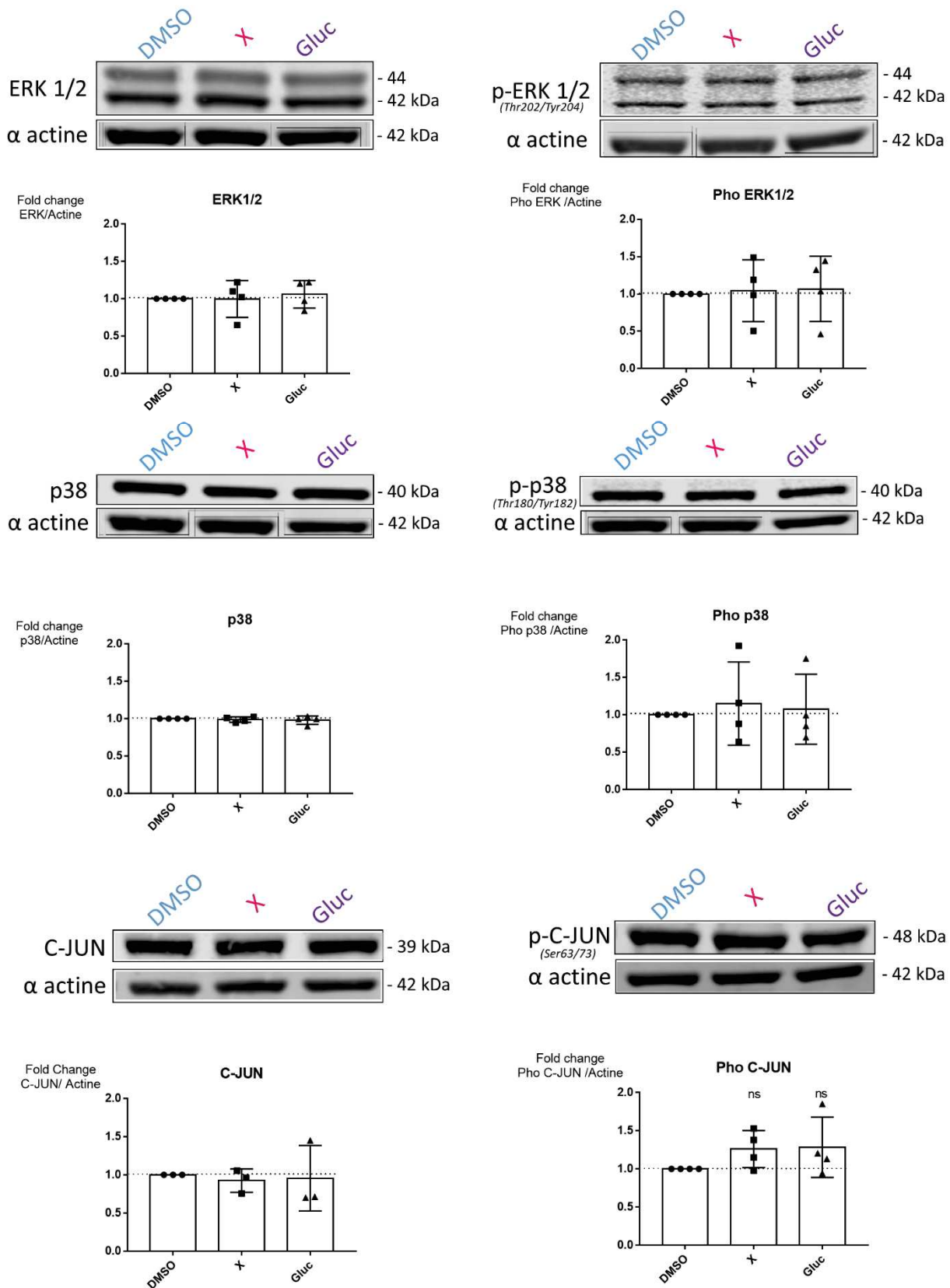
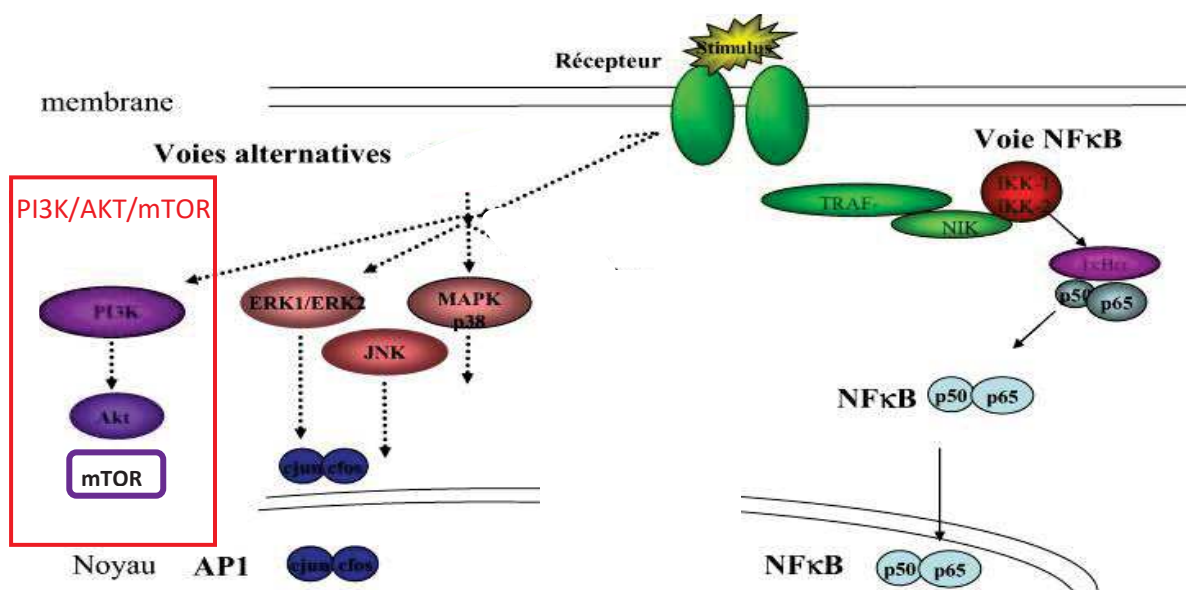


Figure 11. Western Blot des extraits totaux – la drogue ABX et son métabolite n'impactent pas sur le niveau de l'expression protéique des « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAPK). Lorsque les Hu MDM polarisés M1 sont traités pendant 4 jours avec les drogues ABX et N-Glucuronide, le niveau de l'expression protéique de p38, ERK1/2, C-Jun et de leurs formes phosphorylées ne présentent pas de variabilité significative. $N=4$ sauf C-Jun où $N=3$. Les données ont été analysées par GraphPad prism. Significativité statistique $*p<0.05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié et ns = non significatif.

4.7 La drogue ABX et son métabolite n'impactent pas sur le niveau de l'expression protéique de la voie PI3K / Akt / mTOR

La voie de signalisation PI3K / Akt / mTOR (« mammalian Target Of Rapamycin ») est une voie de signalisation intracellulaire un peu complexe qui se trouve impliquée dans la régulation de la croissance, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse et le métabolisme cellulaire. Cette voie suit un chemin parallèle à la voie des MAP kinases, elle s'ouvre en aval de l'interaction de stimuli avec des récepteurs à activité tyrosine kinase. En outre, cette voie se trouve interconnectée avec la voie des MAPKs ; c'est pour cette raison que l'exploration de cette voie de signalisation fait sens.



Pour cette étude, les protéines totales extraites des cellules de 4 Hu MDM traités pendant 4 jours et polarisés M1 (IFN- γ /LPS) pendant 24h, ont été séparées sur des mini gels de polyacrylamide à gradient (Bis-Tris 4-12%) pour réaliser des western blot couplés à la technologie LI-COR. C'est-à-dire que pour cette étude, des anticorps secondaires fluorescents ont été utilisés, associés à une lecture des signaux par l'automate Odyssey® Imager. Les signaux ont été analysés et quantifiés avec le logiciel Image Studio Lite comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les données comparatives (drogue ABX, N-Glucuronide versus DMSO) ont été analysées par le logiciel GraphPad. Cette méthodologie a permis de vérifier que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide dans cette étude, n'impactent pas sur le niveau de l'expression protéique des facteurs composants la voie PI3K / Akt / mTOR (**Figure 12**). La drogue ABX et le N-Glucuronide ne modifient pas significativement le niveau de l'expression protéique des facteurs PI3K p110 α , Akt et mTOR ainsi que leurs formes phosphorylées en comparaison à la condition contrôle DMSO.

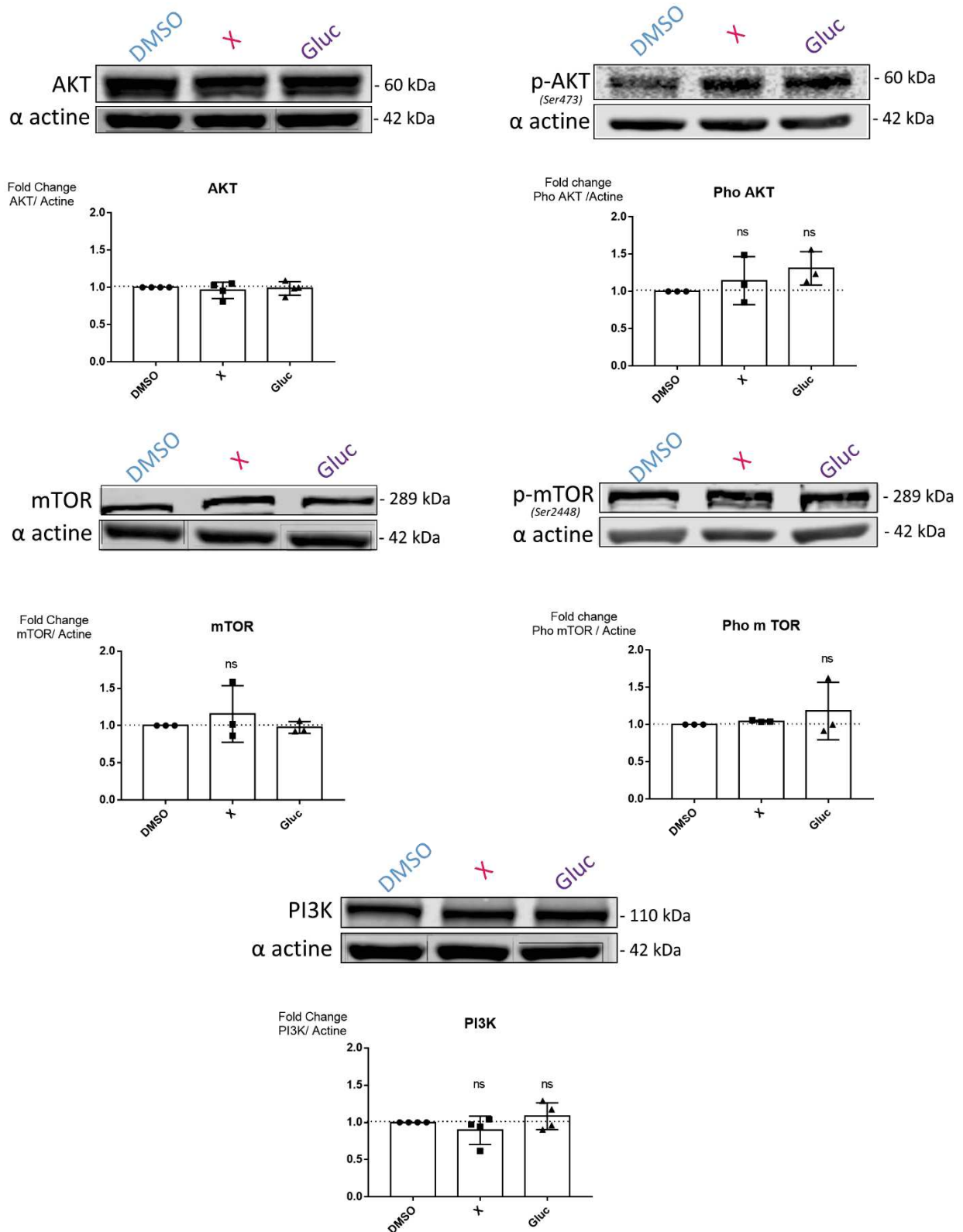


Figure 12. Western Blot des extraits totaux – la drogue ABX et son métabolite n'impactent pas sur le niveau de l'expression protéique des facteurs impliqués dans la voie PI3K /Akt / mTOR. Lorsque les Hu MDM polarisés M1 sont traités pendant 4 jours avec les drogues ABX et N-Glucuronide, le niveau de l'expression protéique des facteurs AKT, mTOR et de leurs formes phosphorylées, ainsi que le facteur PI3K ne présentent pas de variabilité significative de leur niveau d'expression. Malgré la tendance à une augmentation pour la forme phosphorylée AKT ainsi que mTOR et sa forme phosphorylée, les données ne présentent pas de significativité. $N= 4$ sauf pour les formes phosphorylées où $N=3$, car les western blot n'étaient pas interprétables. Les analyses ont été faites avec le logiciel GraphPad prism. Significativité statistique $*p<0.05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney en apparié et ns = non significatif.

5- Discussion

Les macrophages sont des cellules effectrices, modulateurs clés de la réponse immune, leur activation influence et active d'autres acteurs du système immunitaire. Ils participent à l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Leur capacité à sécréter des cytokines et des chimiokines permet aux lymphocytes T CD4 et Th17 d'induire l'amplification de la réponse à l'inflammation. Leurs phénotypes et leurs fonctions sont régulés par le micro-environnement environnant (Martinez and Gordon, 2014).

Les macrophages ont un rôle crucial dans l'inflammation, car ils contribuent à l'orchestration de la réponse cellulaire pour la résolution de l'inflammation (Mantovani et al., 2013b). Ils sont des acteurs majeurs dans la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques inflammatoires. Les macrophages sont par conséquent impliqués dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Siouti and Andreakos, 2019) et les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, colite ulcéreuse) (Duclos, 2017). Dans ces maladies, il existe un déséquilibre en faveur d'une polarisation de macrophages pro-inflammatoires au détriment de la polarisation de macrophages anti-inflammatoires. Et comme les macrophages pro-inflammatoires M1 sont d'importantes sources de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23), ils ont été identifiés comme d'importants médiateurs en partie responsables de ces inflammations chroniques.

Outre l'existence de traitements existants pour ces maladies inflammatoires chroniques auto-immunes, une grande hétérogénéité existe chez les patients, et influe sur la réponse aux traitements. Il est urgent de développer de nouvelles stratégies pour fournir de nouvelles thérapeutiques. Le laboratoire privé ABIVAX a développé plusieurs molécules chimiques dont la plus avancée est un composé ABX qui se métabolise en N-Glucuronide chez l'homme. Cette drogue est en phase II d'essais cliniques chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques à caractère auto-immuns (Colite Ulcéreuse et la Polyarthrite Rhumatoïde). En collaboration avec la société ABIVAX, notre laboratoire de l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM - CNRS), a montré que ce composé ABX est un puissant anti-inflammatoire (Chebli et al., 2017) et induit la surexpression spécifique d'un micro-ARN (miR-124) (Vautrin et al., 2019) décrit pour ses propriétés anti-inflammatoires.

C'est en collaboration avec la société ABIVAX, que nous nous sommes demandés quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires *in vitro* mis en jeu des cellules immunes par cette nouvelle molécule chimique ABX et son métabolite le N-Glucuronide.

Dans cette étude, je démontre que cette drogue ABX et son métabolite le N-Glucuronide, atténuent le profil pro-inflammatoire des macrophages stimulés par l'IFN- γ /LPS en faisant un rétrocontrôle négatif de la voie TLR4/NF-kB potentialisé par la surexpression spécifique du micro ARN 124. L'induction de la surexpression du miR124 par la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide, réprime les réponses inflammatoires *in vitro* des macrophages en partie par un mécanisme qui cible les régions 3' non traduites (3' UTR) des ARN messagers de certains facteurs de signalisation du TLR4. Dans cette étude je révèle en effet, que la drogue ABX diminue statistiquement le niveau de l'expression protéique des facteurs p65/RelA, I κ B ζ /NF κ BIZ et TRAF6. La base de données TargetScan (www.TargetScanHuman) présente ces facteurs comme étant des cibles du micro-ARN 124. La diminution des facteurs protéiques impliqués dans la voie du TLR4/NF-kB par le miR124 induit une atténuation de certains médiateurs chimiques pro-inflammatoires dépendants du NF-kB. En effet, dans cette étude, je démontre une diminution significative (i) des cytokines pro-inflammatoires que sont l'IL-6, l'IL-1, le TNF- α , (ii) des chimiokines pro-inflammatoires telles que MCP-1/CCL2, CXCL1 ainsi que (iii) des protéines pro-inflammatoires comme l'ICAM-1, MIF et la SERPINE E1. L'ensemble de ces données suggèrent que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide limitent l'inflammation en réponse aux stimuli inflammatoires (IFN- γ /LPS), atténuant ainsi, le niveau d'expression protéiques des cytokiniques pro-inflammatoires. Cette régulation de l'inflammation permettrait au système immunitaire de réprimer l'amplification de l'inflammation lié aux lymphocytes T CD4 et Th17. Par conséquent, cela permettrait un retour au calme voire de rééquilibrer la balance entre les médiateurs de la réponse pro-inflammatoire et les médiateurs anti-inflammatoires et faciliter ainsi un retour à l'homéostasie.

Ces données sont très importantes, parce que dans le cas d'une production trop importante de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1, TNF- α) par les macrophages, ces derniers activent les lymphocytes T CD4 qui se différencient en premier lieu en lymphocytes Th17, pour amplifier la réponse inflammatoire ; qui à leur tour sécrètent des cytokines (Brockmann et al., 2017b). A long terme, s'il y a un défaut de régulation, l'amplification de la réponse inflammatoire continue, ce qui peut induire un excès des inflammations pour une chronicité (responsable des maladies auto-immunes) (Pappu et al., 2011) ; (Gálvez, 2014). Ainsi, les données obtenues dans cette étude démontrent le rôle de la drogue ABX et de son métabolite le N-Glucuronide comme étant des

composés capables de limiter l'excès d'inflammation, et pourraient représenter un nouveau potentiel thérapeutique.

En outre, la surexpression du miR124 dans les macrophages, est un résultat qui renforce les données obtenues auparavant dans le laboratoire ; à savoir *in vitro* dans les lymphocytes T CD4 et dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) humains où le miR124 est également trouvé surexprimé (Vautrin et al., 2019). Finalement l'ensemble de ces données obtenues *in vitro* dans les cellules immunes, conforte les données obtenues en clinique où le miR124 se trouve surexprimé dans les cellules de colons des patients atteints de colite ulcéreuse (*Communiqué de presse, ABVAX PARIS, France, du 16 mars 2020*). D'après la professeure Séverine Vermeire (spécialiste de la génomique fonctionnelle des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin à l'Université de Louvain- Belgique), je cite : « ...ces patients ne répondant pas aux immunomodulateurs, anti-TNF- α et/ou corticoïdes, ont atteint un stade de rémission clinique lors du traitement avec la drogue ABX... ».

Bien que plusieurs mécanismes de régulation négative du signal TLR aient été décrits, l'induction de la réponse anti-inflammatoire et le processus de résolution de l'inflammation reste mal compris.

Compte tenu des effets impressionnants et encourageants obtenus en clinique, quant à la cicatrisation totale ou partielle de la muqueuse du colon des patients atteints par la colite (*Communiqué de presse, ABVAX PARIS, France, du 21 octobre 2019*), dans le laboratoire, nous avons émis l'hypothèse, que la drogue ABX et/ou son métabolite N-Glucuronide changent le profil pro-inflammatoire (polarisation M1) des macrophages pour un profil anti-inflammatoire (polarisation M2) et par là même, les drogues modifieraient le profil sécrétoire pro- inflammatoire des cellules immunes pour adopter un profil sécrétoire anti-inflammatoire, voire pro-résolutif. La vérification de ces hypothèses, permettrait en partie, d'expliquer à la clinique les mécanismes moléculaires et cellulaires qui expliqueraient le stade de rémission des patients atteints de colite.

Pour vérifier ces hypothèses, je démontre dans cette étude, qu'*in vitro*, le traitement par la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide versus contrôle DMSO avec des donneurs sains de macrophages humains dérivés de monocytes (HuMDM) pro-inflammatoires (polarisés M1 par l'IFN- γ /LPS), montre d'une part, une diminution significative des récepteurs membranaires du phénotype M1 (CD86, CD274) mais sans augmentation des récepteurs membranaires du phénotype anti-inflammatoire M2 (CD163, CD206, CD36). Ces données suggèrent que la drogue ABX et son métabolite, n'induisent pas *in vitro* une réversion totale du phénotype pro-

inflammatoire M1 vers un phénotype anti-inflammatoire M2. La drogue ABX et son métabolite, diminuent les récepteurs membranaires à caractères pro-inflammatoires (M1) sans impacter les récepteurs membranaires à caractères anti-inflammatoires (M2) que nous avons supposé tendre vers une augmentation.

Dans la continuité de la caractérisation des macrophages pro-inflammatoires en présence des drogues ABX et N-Glucuronide, je démontre dans cette étude, que l'analyse du profil sécrétoire révèle une diminution significative des cytokines pro-inflammatoires principales que sont l'IL-6, le TNF α et l'IL-1 β . En revanche, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, l'IL-12p70 et l'IFN- γ , ne présentent pas de variations en comparaison au contrôle DMSO. Finalement, ces données suggèrent que la drogue ABX et son métabolite, atténuent partiellement l'induction des médiateurs chimiques pro-inflammatoires impliqués en réponse aux stimuli inflammatoires (IFN- γ /LPS). En effet, la diminution des cytokines pro-inflammatoires principales que sont l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α (Noack and Kolopp-Sarda, 2018) ; responsables de l'inflammation aigue associée au maintien des cytokines pro-inflammatoires (IL8/CXCL8, IL-12, l'IFN- γ) responsables du chimiotactisme des neutrophiles, de l'activation des cellules T et des cellules NK, permet de tendre vers une inflammation modérée. Cette étude du profil sécrétoire des macrophages démontre également, que la drogue ABX et son métabolite diminuent très significativement les protéines inflammatoires : CXCL1, ICAM-1, MCP-1/ CCL2 et MIF. Ces données suggèrent également, que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide, diminuent (i) le recrutement des leucocytes, (ii) l'adhésion cellulaire (iii) l'infiltration et la migration des macrophages. Finalement, la drogue ABX et son métabolite, atténuent le profil sécrétoire pro-inflammatoire des macrophages stimulés par l'IFN- γ /LPS.

Bien que ces données doivent être confirmées par des expériences fonctionnelles, comme les tests de migration cellulaire *in vivo* ou *in vitro*, je démontre ici, par la diminution à la fois des récepteurs membranaires, des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, des protéines responsables du recrutement, de l'adhésion, de l'infiltration et de la migration des cellules immunes qu'*in vitro*, la réponse inflammatoire des HuMDM polarisés M1 par l'IFN- γ /LPS est atténuée. Il est décrit dans la littérature que l'homéostasie tissulaire est régulée par une balance sensible entre le recrutement, la prolifération, la migration et la mort des cellules impliquées. Une dérégulation de cette balance conduit à une réponse inflammatoire soutenue par l'intermédiaire des lymphocytes Th17, entraînant une inflammation chronique (Lawrence and Gilroy, 2006). Ici, les données obtenues dans cette étude, permettent de dire que la drogue ABX et son métabolite contrôlent l'inflammation en limitant l'hyper activation des cellules inflammatoires ; ce qui favoriserait un retour au calme, voire limiterait la chronicité des inflammations.

En revanche, les données de cette étude ne permettent en aucun cas de dire que la drogue ABX et son métabolite permettent une interconversion du profil pro-inflammatoire des Hu MDM M1 vers un profil anti-inflammatoire M2 (pro-résolutif). En effet, d'une part, les récepteurs membranaires à caractères anti-inflammatoires comme le CD206 (Mannose Récepteur, rôle dans l'endocytose et la phagocytose), le CD163 (rôle dans la « clearance » et l'endocytose) ainsi que le CD36 (« scavenger receptor B » impliqué dans le recrutement des phagocytes mononuclés) (Mantovani et al., 2004c), ne sont pas en faveur d'une augmentation de ces récepteurs sur les Hu MDM M1, traités par la drogue ABX et son métabolite, comme nous avons pu le supposer. Et d'autre part, les données du profil sécrétoire, ne montrent aucune variation de la protéine IL-1RA (antagoniste récepteur de l'IL-1) et de la chimiokine CCL1 (chimio attractante des monocytes, sécrétée par les cellules ayant une polarisation M2b) (Sironi et al., 2006). En outre, l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire, sécrétées par les cellules ayant un phénotype M2) n'est pas augmenté et les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 (sécrétées par les cellules ayant une polarisation M2) (Mantovani et al., 2013b) ne sont pas détectées dans cette étude.

L'ensemble de ces données permet de caractériser le phénotype des HuMDM stimulés IFN- γ /LPS et traités par la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide. La drogue ABX et son métabolite, atténuent le caractère pro-inflammatoire des cellules immunes inflammatoires ; ce qui permettrait un retour à l'équilibre de la balance pro-inflammatoire versus anti-inflammatoire ; ainsi rétablir l'homéostasie cellulaire.

Par ailleurs, de manière à comprendre par quels mécanismes les Hu MDM stimulés IFN- γ /LPS, traités par les drogues ABX et N-Glucuronide limitent la production des médiateurs chimiques pro-inflammatoires, j'ai émis l'hypothèse que le maître régulateur de l'inflammation représenté par le facteur de transcription nucléaire NF-kB était dérégulé (Dorrington and Fraser, 2019).

Comme l'IFN- γ mais surtout le LPS (agoniste du TLR4) représentent les signaux de la polarisation pro-inflammatoire (M1), le LPS en présence du CD14 stimule la voie de signalisation du TLR4 (Yesudhas et al., 2014). S'ensuit une cascade de signalisation intracellulaire qui permet d'activer le facteur de transcription nucléaire NF-kB, mais également les MAP Kinases, pour conduire à la synthèse des médiateurs chimiques pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, protéines de l'adhésion et de la migration cellulaire) pour ainsi développer la réponse innée et adaptative en réponse à l'inflammation (Sun et al., 2015; Orekhov et al., 2019). Ces voies de signalisation contribuent normalement à l'éradication de l'inflammation et jouent un rôle

important dans le maintien des fonctions physiologiques normales. La plupart des TLR activent le NF- κ B par le biais de la voie dépendante de MyD88 (Lawrence, 2009).

Pour vérifier mon hypothèse, je démontre dans cette étude que la drogue ABX et son métabolite, (i) diminuent significativement le niveau d'expression protéique des facteurs impliqués dans la voie TLR4/NF- κ B : p65/RelA, I κ B ζ /NFKBIZ, TRAF6, et (ii) tend à diminuer les facteurs phospho p65/RelA, I κ B ϵ /NFKBIE, IRAK1 et c-Rel et enfin (iii) les drogues ABX et N-Glucuronide n'impactent pas sur les MAP Kinases ni sur la voie PI3K/Akt /mTOR. Néanmoins, ces données pourraient être confirmées par une deuxième technique comme par exemple le Luminex ou l'ELISA.


En outre, de manière très intéressante, la littérature décrit que certains micro-ARN ont des rôles respectifs dans l'immunité innée et adaptative (Liu and Abraham, 2013). Par exemple, le miR-132 et le miR-146a, se trouvent liés au contrôle de l'immunité et favorisent la polarisation alternative (M2) (Liu et al., 2015) ; (Zheng et al., 2017). Ces micro-ARN ciblent et répriment plusieurs effecteurs du TLR4. Dans le cas du miR-146a, par exemple, ce dernier est rapidement surexprimé dans des Hu MDM stimulés par le LPS (ligand du TLR4), et agit comme un régulateur négatif de la voie de signalisation des TLR, en ciblant TRAF6 (« « TNF Receptor Associated Factor-6 ») et IRAK-1 (« « IL-1 Receptor Associated Kinase-1 »), contrôlant ainsi l'excès d'inflammation (Boldin et al., 2011).

Dans le laboratoire nous démontrons, une surexpression du miR-124 à la fois *in vivo* (cellules de colons des patients atteints de colite ulcéreuse) et *in vitro* (PBMC, lymphocytes T CD4) et ici dans cette étude, je démontre une surexpression du miR-124 dans les Hu MDM polarisés en M1. Appuyée par la littérature et les bases de données, mon hypothèse a été de me dire que les protéines pro-inflammatoires observées diminuées dans mon étude, sont probablement des cibles du miR-124.

En effet, en rentrant dans les bases de données CSmiRTar et TargetScan, le miR-124 ; dénommé hsa-miR-124-3p (<http://cosbi4.ee.ncku.edu.tw/CSmiRTar/search>) et les principaux facteurs statiquement diminués de la voie TLR4/NF- κ B que sont : p65/RelA, I κ B ζ /NFKBIZ et TRAF-6 ; ces facteurs sont des cibles validées du miR-124 (cibles validées par « luciférase reporter assay », qPCR et microarray) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Cibles du miR-124 (www.TargetScanHuman)

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 1840-1847 of RELA 3' UTR hsa-miR-124-3p.1	5' ...UCUCCUCUUCUCAAGUGCCUUA... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU
Position 77-83 of NFKBIZ 3' UTR hsa-miR-124-3p.1	5' ...UGUACAUGACCAUUUGCCUUA... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU
Position 42-48 of TRAF6 3' UTR hsa-miR-124-3p.1	5' ...UACCUGGAGAAAACAGUGCCUUU... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU



region seed

D'après la littérature, le miR-124 s'apparie aux extrémités 3' non traduites des ARN messagers de ses cibles Ikb ζ /NFKBIZ (Lindenblatt et al., 2009), p65/RelA et TRAF6 (Qiu et al., 2015) pour exercer une boucle de rétrocontrôle négative, ce qui permet une régulation fine de l'expression des facteurs médiés par le NF-kB. Les données obtenues dans cette étude, suggèrent que la drogue ABX et son métabolite le N-Glucuronide atténuent le profil pro-inflammatoire des macrophages stimulés par l'IFN- γ /LPS par un rétrocontrôle négatif de la voie TLR4/NF-kB potentialisé par la surexpression spécifique du miR-124 ; et ainsi « downregule » les médiateurs chimiques pro-inflammatoires dépendants de NF-kB. La drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide ont un effet homéostatique faisant de ces composés, de nouvelles thérapeutiques visant à limiter les excès d'inflammations en limitant l'induction des cytokines pro-inflammatoires.

Cependant, de manière à pouvoir confirmer que les effets observés de la drogue ABX et de son métabolite sont directement liés à la surexpression du miR-124 (connu pour ses propriétés anti-inflammatoires), il serait judicieux par exemple d'inhiber le micro-ARN 124 dans les Hu MDM pro-inflammatoires en présence des drogues ABX et N-Glucuronide. Par la suite, il faudrait d'une part vérifier le niveau de l'expression protéique des principales cibles diminuées de la voie TLR4/NF-kB (p65/RelA, TRAF6, Ikb ζ /NFKBIZ), et d'autre part, vérifier également les autres protéines pro-inflammatoires diminuées dans cette étude qui sont également des cibles du miR-124 ; à savoir : TNF, CCL2/MCP-1, CXCL1, SERPINE E1 et Ikb ϵ /IKBKE (Tableau 2).

Tableau 2 : Cibles du miR-124 (www.TargetScanHuman)

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	
Position 628-635 of TNF 3' UTR hsa-miR-124-3p.1	5'	...CCCCUGGCCUCUGUGCCUUC... : 3' CCGUAAGUGGCG-CACGGAAU
Position 113-120 of CCL2 3' UTR hsa-miR-124-3p.1	5'	...UGAUGUGAAACAUUUGCCUUA... 3' CGUAAGUGGCGCACGGAAU
Position 589-608 of CXCL1 3' UTR hsa-miR-124-3p.1	5'	...UUGUAAGGCAUACUGCCUUG... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU
Position 379-398 of SERPINE1 3' UTR hsa-miR-124-3p.1	5'	...AGGAGCUUUUGUGUGCCUGG... : : : 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU
Position 206-227 of IKBKE 3' UTR hsa-miR-124-3p.1	5'	...AGCAUU-ACCUUCCACUGCCUU... : 3' CCGUAAGUGGCG---CACGGAAU



region seed

L'idée serait de faire en sorte que le miR124 dans les cellules pro-inflammatoires ne soient plus du tout exprimé en présence de la drogue ABX et du N-Glucuronide et de vérifier les cibles du miR-124. De là, plusieurs scénarii sont possibles : si les cibles restent réprimées même après l'inhibition du miR124 ; alors les effets observés concernant l'atténuation des protéines pro-inflammatoires sont indépendantes de la surexpression du miR-124. Par conséquent les effets sont directement lié à la drogue ABX et son métabolite. En revanche, si les cibles ne sont plus du tout réprimées après l'inhibition du miR124 dans les cellules pro-inflammatoires en présence des drogues ABX et N-Glucuronide ; alors les effets observés de la drogue ABX et de son métabolite sont directement liés à la surexpression du miR 124.

Enfin, l'ensemble des données de cette étude me permette de proposer le modèle d'immunorégulation suivant (Figure 14) :

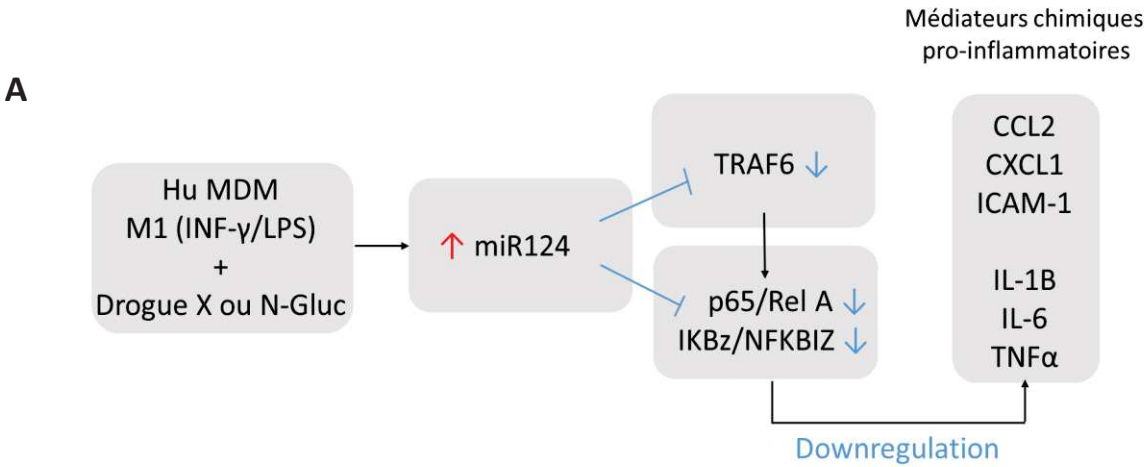


Figure 14A : Modèle d'immunorégulation de la drogue ABX et de son métabolite N-Glucuronide (N-Gluc). La drogue ABX et son métabolite N-Gluc atténuent le profil pro-inflammatoire des macrophages (Hu MDM) stimulés par l'IFN-γ /LPS par un rétrocontrôle négatif de la voie TLR4/NF-κB potentialisé par la surexpression spécifique du miR-124. Le miR-124 cible le 3' UTR de ses cibles p65/RelA, IKBζ/NFKBIZ et TRAF6 principalement ; ce qui conduit à la diminution de la synthèse des médiateurs chimiques pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, protéines de l'adhésion et de la migration cellulaire), limitant ainsi l'excès d'inflammation.

↑ : surexpression de micro-ARN 124 ⇩ : cibles du micro-ARN 124

↓ : diminution du niveau de l'expression des facteurs protéiques : TRAF6, p65/RelA, IKBζ/NFKBIZ

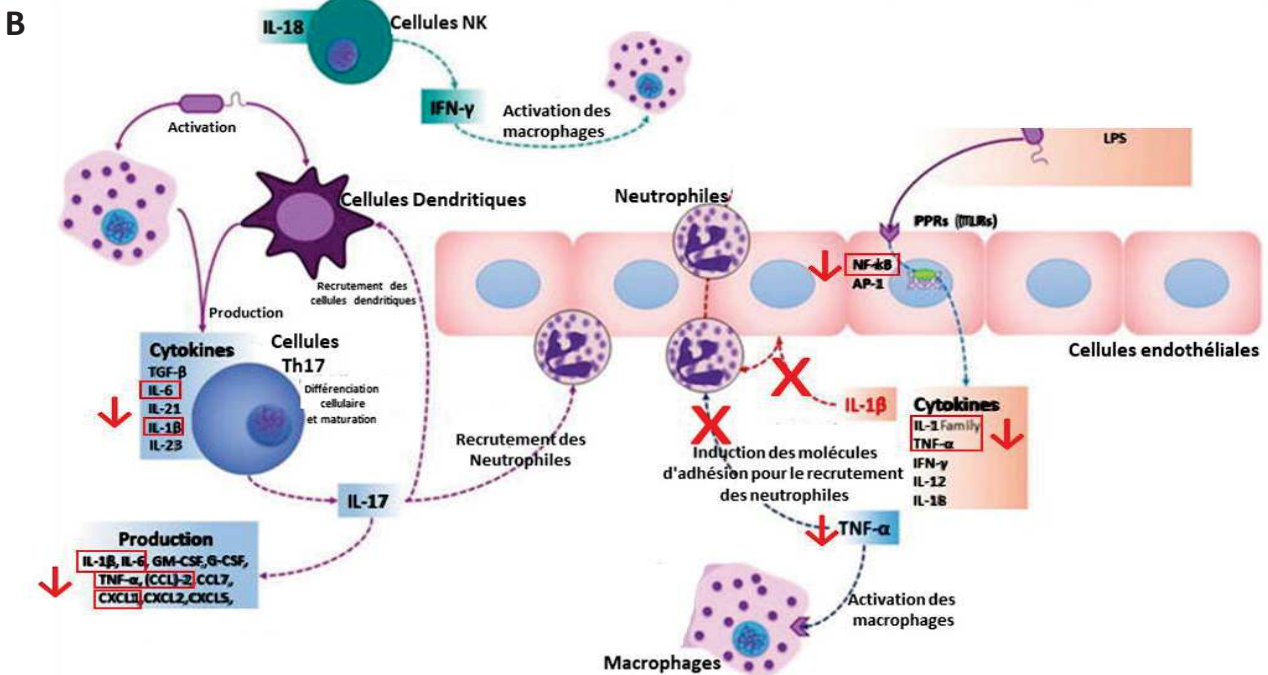


Figure 14B : Modèle d'action de la drogue ABX et de son métabolite sur le réseau combiné des médiateurs cellulaires et chimiques dans l'inflammation - adapté de (Muñoz-Carrillo et al., 2018). La drogue ABX et son métabolite diminuent l'induction des protéines pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, protéines de l'adhésion et de la migration cellulaire), limitant ainsi l'amplification de la réponse inflammatoire exercée par les lymphocytes T CD4 différenciés en Th17, qui à leur tour sécrètent des cytokines. La drogue ABX et son métabolite atténuent le niveau de l'expression des chimiokines responsables (i) du recrutement des leucocytes, (ii) de l'adhésion cellulaire (iii) de l'infiltration et la migration de cellules immunes.

↓ : illustration de la diminution des cytokines et le facteur NF-κB

X : illustration de l'action de la drogue ABX et son métabolite le N-Glucuronide

Finalement nous pourrions nous demander quel est l'intérêt de cette drogue ABX face aux thérapeutiques existantes pour les maladies inflammatoires chroniques.

Tout d'abord sans discuter de la mécanistique fonctionnelle et des cibles thérapeutiques des médicaments biologiques actuels, l'avantage principal de la drogue ABX est son mode d'administration. En effet, la drogue ABX est administrée par voie orale (50mg/jour) contrairement aux thérapeutiques actuelles que représentent les anti-TNF qui quant à eux, sont administrés par voie intraveineuse ou en sous-cutané. En outre, selon *le communiqué de presse, ABIVAX PARIS, France, du 16 mars 2020*, le candidat médicament ABX a démontré un « ...très bon profil de tolérance et des preuves supérieures à long terme... » sur des patients atteints de colite ulcéreuse (sous traitement journalier pendant 2 ans). Il faut noter qu'au moins 30% des patients ne répondent pas aux traitements de fonds actuels dit : « Disease-modifying antirheumatic drugs » (DMARD) comme par exemple les anti-TNF dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (résistance ou intolérance aux traitements) (Lazarou et al., 2019).

Par conséquent, de nouvelles thérapeutiques non biologiques et efficaces doivent être développées. Au cours de cette discussion, je citerai uniquement les traitements de fond communs aux deux grandes pathologies représentées par (1) les rhumatismes inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, psoriasis, rhumatisme psoriasique) et (2) les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). En effet, les traitements de fonds utilisés actuellement, sont des médicaments biologiques (issus de production cellulaire à la différence des médicaments issus de la chimie). Les thérapeutiques communes aux deux grandes pathologies inflammatoires citées ci-dessus, sont pour la plupart des anticorps monoclonaux anti interleukines (anti IL-12/anti-IL-23 : ustekinumab), des immunosuppresseurs de lymphocytes T CD4 (méthotrexate) et des anti-TNF α (infliximab, etanercept, adalimumab) (Neurath, 2017) ; (Holmer and Singh, 2019). Ces médicaments biologiques visent à réguler la réponse immunitaire (\downarrow lymphocytes TCD4, \downarrow Th1, \downarrow Th17) avec pour conséquence : des effets anti-inflammatoires voire des effets destinés à réduire l'inflammation à long terme. En revanche, ces thérapeutiques sont administrées en sous-cutanée (etanercept et adalimumab, ustekinumab) ainsi qu'en intraveineuse (infliximab), ce qui représente une contrainte pour les patients. Bien que ces traitements aient révolutionné la prise en charge et le devenir des patients en termes de morbidité/mortalité, qualité de vie, ils sont malheureusement accompagnés d'effets secondaires sévères au niveau de la peau et du système respiratoire. En outre, la littérature décrit que ces patients sont sujets à développer un lymphome, une insuffisance cardiaque voire de réactiver une ancienne tuberculose (Singh et al.,

2011); (Fleury and Gabay, 2017). Il semblerait que les agents biologiques immunomodulateurs (anticorps monoclonaux) augmentent les risques infectieux.

De ces faits, étant donné que le candidat médicament ABX est (i) issu de la chimie, (ii) administré par voie orale et surtout (iii) d'après mes données, ce candidat médicament ne bloque pas les voies de signalisation TLR4/NF- κ B, MAPK et PI3K/ AKT/mTOR et qui plus est, ne bloque pas la synthèse des protéines pro-inflammatoires. En effet, selon nos données *in vivo* et *in vitro* la drogue ABX module l'inflammation en **diminuant** la quantité des protéines pro-inflammatoires. Ainsi, selon moi, ce candidat médicament d'un point de vue sémantique, est un médicament homéostatique. Et j'ajouterai que, contrairement aux thérapeutiques actuelles, cette drogue ABX induit spécifiquement un micro ARN (rôle connu pour réguler finement le système immunitaire) qui lui offre la potentialité, de réajuster finement le déséquilibre qui s'est créé entre les protéines pro-inflammatoires des protéines anti-inflammatoires.

Par conséquent, la drogue ABX pourrait représenter une nouvelle perspective thérapeutique pour les patients réfractaires aux traitements conventionnels.

A présent je vais discuter des données que j'ai obtenues au cours de cette étude en essayant de faire une comparaison avec les données comparatives de la littérature en ce qui concerne les traitements de fond actuels communs appliqués aux rhumatismes inflammatoires et aux Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

Cependant, afin de pouvoir faire une telle discussion objective, je pense qu'il aurait fallu, qu'au cours de mes travaux je puisse comparer les effets de la molécule chimique ABX sur des HuMDM polarisés M1 versus un anti-TNF (infliximab ou adalimumab) versus un anti IL-6 (tocilizumab), versus un anti Jak/Stat (tofacitinib), versus anti lymphocyte TCD4 (méthotrexate), versus un anti-IL-1 (anakinra). J'aurais ainsi pu avoir des données comparatives (marqueurs de surface cellulaires, profil sécrétoire en cytokines/chimiokines, détection de l'expression du miR124). En outre, sauf erreur de ma part, il existe très peu de littérature ayant établi un comparatif sur le mécanisme d'action de ces thérapeutiques sur les cellules du système immunitaire inné.

En revanche, il est plus facile de trouver dans la littérature des comparatifs d'efficacité de réponse cliniques, dans le traitement des patients.

Toutefois, Yannick Degboé et ses collaborateurs dans la revue *Frontiers in Immunology* 2019, établissent un comparatif thérapeutique *in vitro* en partant de macrophages dérivés des

monocytes issus de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) versus patients sains (Degboé et al., 2019). Si je mène ma discussion sur la base de cette publication, alors, il est intéressant de voir que les thérapeutiques anti-TNF (etanercept, adalimumab) en condition inflammatoire diminuent le récepteur membranaire CD80. En revanche, les récepteurs membranaires CD16 et CD163, présentent une augmentation de leur expression sur les macrophages des donneurs PR traités versus donneurs sains traités, et qui plus est sans effet sur le CD206. En revanche, les auteurs montrent que l'anti IL-6 (tocilizumab) présente les mêmes effets que les anti-TNF, mais augmente de manière significative le CD206.

En comparaison avec mon étude *in vitro*, la drogue ABX quant à elle, présente des effets similaires aux anti-TNF comme la diminution du récepteur membranaire CD86 (molécule de co-stimulation équivalente au CD80) et se trouve également sans effet sur le récepteur membranaire CD206. En revanche, dans mon étude la drogue ABX contrairement aux anti-TNF ne favorise clairement pas le CD16 ni le CD163 voire d'après mes données, ces récepteurs sont même significativement diminués. Si je me réfère à l'interprétation des auteurs, étant donné que la drogue ABX ne favorise pas l'expression des récepteurs de surface en lien avec la phagocytose (CD16 et CD163), alors la phagocytose n'est pas favorisée. En outre, Degboé et ses collaborateurs, montrent que les anti-TNF diminuent la production des cytokines inflammatoires que sont : l'IL-6, l'IL-12 et le TNF. En comparaison avec mes données, je constate que la drogue ABX tout comme les anti-TNF, diminue l'IL-6 et le TNF, en revanche, la drogue ABX n'influe pas significativement sur l'IL-12. Par ailleurs, en ce qui concerne l'IL-10, j'observe tout comme les anti-TNF une diminution, de l'IL-10. Dans mon étude, l'IL-10 se trouve très significativement diminué.

En conséquence, bien qu'il y ait des similarités avec les anti-TNF, la drogue ABX présente des différences majeures, qui traduisent un autre mode d'action que celui des anti-TNF. En effet, bien que la drogue ABX diminue le récepteur membranaire CD86 et les cytokines : IL-1, IL-6 et TNF- α , la drogue ABX n'influe pas sur les cytokines IL-12 et IL-8. En outre, les marqueurs de surface cellulaires de type alternatifs ne sont pas favorisés (CD16, CD163) voire sont diminués dans mon étude. Quant à l'effet de l'induction sur la phagocytose, elle devrait être vérifiée de manière plus approfondie dans mon étude.

Quoi qu'il en soit, le mode d'action de la plupart des biothérapies existantes sont des anticorps monoclonaux, utilisés comme des agents **bloquants** contrairement à la drogue ABX.

Pour la plupart de ces biothérapies actuelles, les cibles thérapeutiques sont des cytokines telles que le TNF (les anti-TNF cités plus haut bloquent l'interaction avec les récepteurs p55 et

p75 du TNF voire modulent le taux des molécules d'adhésions responsables de la migration des leucocytes ICAM-1), l'IL-1 (anakinra : anti-IL-1 est une forme recombinante de l'IL-1 Receptor Antagonist » son action antagonise l'IL-1 tel un inhibiteur compétitif), l'IL-6 (tocilizumab : anti-IL-6 récepteur se lie au récepteur soluble anti-IL-6 pour bloquer l'action pro inflammatoire de l'IL-6) et l'IL-17 (secukinumab : anti-IL-17 est un anticorps monoclonal qui se lie de façon sélective à l'IL-17 pour le neutraliser) (Prieto-Peña and Dasgupta, 2020).

En revanche, d'autres biothérapies ont un effet déplétant sur une population cellulaire comme par exemple les lymphocytes B (rituximab : anti-CD20 qui se lie spécifiquement à l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes B ; cette liaison permet au fragment Fc de l'anticorps d'entraîner la lyse de ces lymphocytes B voire d'induit une mort cellulaire par apoptose). Des thérapies permettent également de dépléter les lymphocytes T (abatacept : inhibiteur de l'activation des lymphocytes T, cet antigène extracellulaire du lymphocyte T4 lie les molécules costimulatrices CD80 et CD86 des cellules présentatrices d'antigène ; ainsi la liaison du CD28 aux molécules costimulatrices est bloquée, inhibant dès lors l'activation des lymphocytes TCD4).

Finalement, la future thérapeutique ABX d'après mes données ne représente pas un agent bloquant avec des effets inhibiteurs. En effet, les agents bloquants actuels tendent à altérer la réaction immunitaire, promouvant la réactivation de certaines infections auparavant contrôlées ou encore qui suscitent une réaction immunitaire inadéquate à de nouveaux pathogènes qui exigent une immunité à médiation cellulaire) (Le Saux, 2012). Selon moi, la drogue ABX serait plutôt une drogue homéostatique. Bien que les cliniciens n'aient pas un recul à très long terme (10 ans) des effets de la drogue ABX sur les patients, il apparaît qu'à ce jour, personne n'a connaissance des éventuels effets secondaires sévères que pourraient induire la drogue ABX.

Par ailleurs, parmi les thérapies actuelles pour traiter ces deux grandes pathologies représentées par (1) les rhumatismes inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, psoriasis, rhumatisme psoriasis) et (2) les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), il me semble, qu'aucune biothérapie ne cible spécifiquement la surexpression d'un micro ARN connu pour ces effets anti-inflammatoires. En conséquence, cette spécificité de la drogue ABX à induire la surexpression du miR124, l'inflammation se trouve régulée *finement*, ce qui permet d'induire un rééquilibrer entre le niveau de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires des médiateurs anti-inflammatoires.

PARTIE 3

Conclusion / Perspectives

Pour **conclure**, les données de cette étude démontrent que la drogue ABX et son métabolite le N-Glucuronide, atténuent le profil pro-inflammatoire des macrophages stimulés par l'IFN- γ /LPS en potentialisant la surexpression spécifique du micro-ARN 124. La surexpression du miR124, réprime les réponses inflammatoires *in vitro* dans les macrophages par un mécanisme qui cible les régions 3' non traduites (3' UTR) des ARN messagers de certains facteurs protéiques de la voie de signalisation du TLR4 ; faisant un rétrocontrôle négatif de la voie TLR4/NF-kB. Dans cette étude les données obtenues démontrent en effet, que le niveau de l'expression protéique des facteurs p65/RelA, I κ B ζ /NFKBIZ et TRAF6 qui sont des cibles du miR-124, sont significativement diminués. La diminution des ces facteurs protéiques de la voie TLR4/NF-kB par le miR124 induit, une atténuation de la réponse inflammatoire par la diminution de l'induction de l'expression protéique des médiateurs chimiques pro-inflammatoires dépendants du NF-kB. Ici, les données obtenues démontrent une diminution significative (i) des cytokines pro-inflammatoires que sont l'IL-6, l'IL-1, le TNF- α , (ii) des chimiokines pro-inflammatoires telles que MCP-1/CCL2, CXCL1 ainsi que (iii) des protéines pro-inflammatoires comme l'ICAM-1, MIF et la SERPINE E1. En revanche, les données obtenues sur les récepteurs membranaires des Hu MDM pro-inflammatoires en présence des drogues ABX et N-Glucuronide, ne permettent pas de montrer une interconversion de la polarisation M1 vers une polarisation alternative M2. Les récepteurs membranaires qui caractérisent un phénotype alternatif M2 dans cette étude (CD163, CD206, CD36) ne sont pas augmentés, en revanche, les récepteurs membranaires qui caractérisent un phénotype pro-inflammatoire M1 (CD86 et CD274) sont significativement diminués. Finalement, outre la surexpression du miR124 connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, l'ensemble des données obtenues dans cette étude ne présentent pas d'augmentation des médiateurs testés qui caractériseraient un phénotype pro-résolutif M2. Toutefois, l'ensemble de ces données suggèrent que la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide en diminuant certaines protéines pro-inflammatoires, permettraient de limiter l'amplification de l'inflammation provoquée par les lymphocytes TCD4 et Th17 en réponse aux stimuli inflammatoires (IFN- γ /LPS). On observe ici, une atténuation de l'excès de cytokines pro-inflammatoires, de protéines responsables du recrutement, de l'infiltration et de la migration des cellules immunes. En modifiant leur microenvironnement les macrophages permettraient de restaurer l'homéostasie. Cette immunorégulation de l'inflammation, permettrait au système immunitaire un retour au calme, ce qui laisserait un laps de temps nécessaire pour que la balance entre les médiateurs pro-inflammatoires et les médiateurs anti-inflammatoires retournent à l'équilibre ; facilitant ainsi un retour à l'homéostasie.

Finalement au vu de l'ensemble de ces données, les composés ABX et N-Glucuronide pourraient représenter de nouvelles thérapeutiques immunorégulatrices de l'inflammation pour

prévenir l'emballement du système immunitaire inné et adaptatif et ainsi limiter les excès d'inflammation.

Quant aux ***perspectives***, si je devais poursuivre le projet, il serait dans un premier temps intéressant de consolider par une deuxième technique quantitative l'ensemble des données obtenues par western blot/LI-COR, en utilisant le Luminex ou l'ELISA par exemple. Il en est de même pour les données obtenues en Proteome Array NF-kB pathway.

Enfin, pour être plus convaincant sur les données obtenues quant à l'atténuation très significative des protéines impliquées dans la transmigration des cellules immunes inflammatoires, des tests fonctionnels de migration cellulaire *in vitro* (« transwell chamber ») mais surtout *in vivo* à l'aide de la microscopie multiphotonique en temps réel, serait d'une importance capitale. En effet, au vu de la significativité de la diminution de certaines protéines majeures liées au chimiotactisme des cellules immunes, ces tests fonctionnels caractériseraient le fait que, la drogue ABX et son métabolite N-Glucuronide, diminuent le recrutement des leucocytes, l'adhésion, l'infiltration et la migration des macrophages.

- ***Mise en place d'un test fonctionnel de migration in vivo chez la souris modèle de colite ulcéreuse (imagerie intra vitale en temps réel)***

En effet, pour étudier le rôle fonctionnel de la molécule ABX sur la migration des macrophages *in vivo*, nous pourrions imaginer la mise en place d'une technique d'imagerie intra vitale en temps réel (Pittet et al., 2018) ; (Turk et al., 2018) sur le modèle murin appliqué pour la colite ulcéreuse. En effet, ce modèle *in vivo* complémentaire aux techniques *in vitro* de « transwell chamber » serait plus relevant puisque le système vivant entier va nous permettre de tenir compte de l'ensemble de la complexité du système immunitaire et de ses interactions. Ainsi, cela nous permettrait de suivre le dynamisme de la migration des monocytes / macrophages sur les modèles murins d'inflammation induite par le Dextran Sodium Sulfate (DSS) traités ou non par la molécule ABX. Grâce à la microscopie multiphotonique nous pourrions caractériser et quantifier en temps réel la transmigration des cellules immunes inflammatoires (Choi et al., 2015).

L'observation des colons murin DSS traités ou non par la drogue ABX, pourra être réalisée en disposant un système de fenêtre optiquement transparente au niveau de l'abdomen de l'animal. Pour notre étude nous pourrions par exemple utiliser les souris issues du croisement entre les souris reportrices CX3CR1-GFP ; CCR2-RFP (Saederup et al., 2010) ; (Wang and Kubes, 2016) et le modèle murin d'inflammation au Dextran Sodium Sulfate (DSS).

Si la mise en place de l'imagerie intra vitale est fonctionnelle, alors, chez les souris DSS contrôles (c'est-à-dire des souris n'ayant pas reçu de traitement ABX), après l'induction de l'inflammation par le DSS l'inflammation intestinale des souris DSS CX3CR1 GFP+ ; CCR2 RFP+ sera induite (Figure d'après S. Nancey et al., Hepato-Gastro 2008). Nous devrions observer dès lors, une infiltration des monocytes/macrophages pro inflammatoires avec une très forte expression du CX3CR1 GFP+ et du CCR2 RFP+.

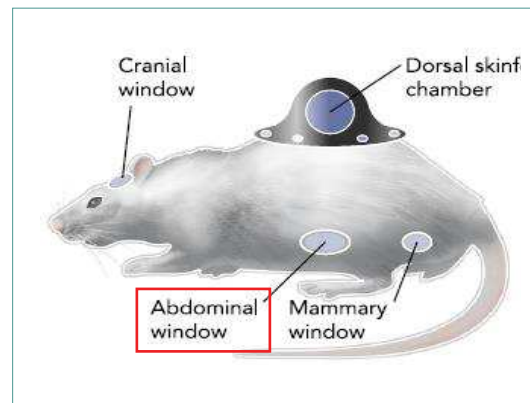
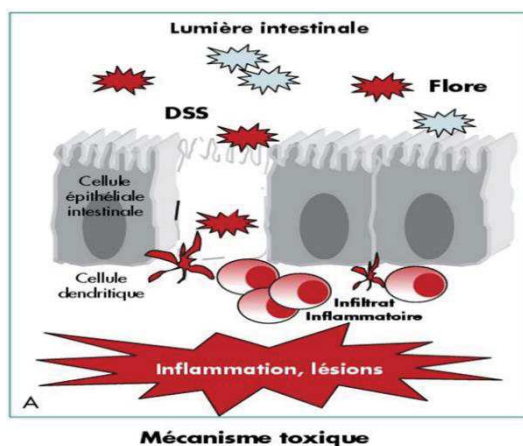


Figure d'après Stephane Nancey et al.,
Hepato-Gastro 2008

Déclenchement de la colite ulcéreuse
chez le modèle murin DSS

Figure Stratégies d'imagerie intra vitale

Ainsi, la « Green Fluorescence Protein » (GFP) exprimée sous le promoteur CX3CR1 permettra de marquer et de suivre la transmigration des monocytes « de patrouille » qui se transformeront en macrophages dans le tissu intestinal. En outre, la « Red Fluorescence Protein » (RFP) exprimée sous le promoteur CCR2 permettra de marquer tous les monocytes du sang circulant (Ly6C^{hi}) dépendantes du gradient « Monocyte chemoattractant Protein 1 » (MCP-1/CCL2). Nous pourrions supposer dès lors que, chez les souris DSS CX3CR1 GFP+ ; CCR2 RFP+ traitées avec la drogue ABX, alors la microscopie multiphotonique intra vitale des colons, montrerait une diminution du nombre de cellules immunes CX3CR1 marquées GFP+ et par la même une diminution du signal GFP+. Ce qui confirmerait *in vivo* en temps réel que la drogue ABX diminue le recrutement des monocytes de « patrouille » vers le tissu intestinal. En outre, étant donné qu'une diminution de MCP-1 (CCL2) a été observée chez les souris modèles DSS (Chebli et al., 2017), alors nous devrions également observer une diminution du nombre des cellules immunes

CCR2 marquées RFP+ qui se trouve sous la dépendance du gradient CCL2 et par là même une diminution du signal RFP+.

Bien entendu, il serait tout à fait possible de faire les mêmes observations en réalisant un croisement de lignées murines beaucoup plus simplement entre la lignée reportrice CCR2 RFP+ et le modèle murin DSS et de faire uniquement le suivi des monocytes pro-inflammatoires du sang circulant (Ly6C^{hi}).

- ***Mise en place d'un test fonctionnel de migration in vivo chez la souris modèle de polyarthrite rhumatoïde (imagerie intra vitale en temps réel)***

Nous pourrions également utiliser le modèle de souris polyarthrite rhumatoïde, c'est-à-dire le modèle d'arthrite induite par le collagène ; « Collagen-Induced Arthritis » (CIA) (Byrne et al., 2012) qui représente également le modèle relevant de notre étude compte tenu de l'étude de phase 2 qui est actuellement en cours d'essai en clinique. Dans ce modèle, l'arthrite est induite chez les souris sensibles par l'immunisation avec un adjuvant de collagène de type II, ce qui entraîne une réponse immunitaire transréactive au collagène de type II murin (Byrne et al., 2012).

A partir de ce modèle murin CIA, nous pourrions réaliser des croisements de lignées avec la lignée reportrice CCR2 RFP+ (Wang and Kubes, 2016). L'observation serait que chez les souris CIA CCR2 RFP+ contrôle (c'est-à-dire les souris n'ayant pas reçu de traitement ABX) en présence du collagène de type II, la réaction inflammatoire induite sera tout d'abord évaluée et classée par un score, qui se fera sur la base du gonflement des articulations : pattes, orteils et chevilles figure ci-dessous (Redlich et al., 2002) ; (Zimmerman et al., 2012).

Figure d'après (Zimmerman et al., 2012)
Evaluation de l'évolution de la polyarthrite chez le modèle murin CIA (score clinique)



Ensuite, grâce à la microscopie multiphotonique en temps réel, nous pourrions caractériser et quantifier l'infiltration des cellules immunes pro-inflammatoires responsables de l'état arthrosique des pattes du modèle. Nous devrions observer chez ces souris contrôles un très fort

signal RFP+ des cellules immunes marquées CCR2. En revanche, si l'on traite par la molécule ABX des souris CIA CCR2 RFP+, tout d'abord, d'un point de vue phénotypique, le score clinique des pattes devrait être diminué chez ces souris traitées par la drogue ABX. Ensuite, par la microscopie multiphotonique en temps réel, nous devrions observer une diminution du signal CCR2 RFP+. Cela permettrait de confirmer que le nombre de cellules immunes pro-inflammatoires marquées CCR2 RFP+ serait diminué dans les articulations des pattes du modèle (diminution du signal RFP+ soit une diminution de l'infiltrat cellulaire). En outre, cela devrait nous permettre de prouver qu'il y a une diminution de la transmigration des cellules immunes pro-inflammatoires dans le tissu des articulations. Bien entendu il sera également possible de corroborer ces données avec une analyse post mortem en réalisant des coupes histologiques (coloration hématoxyline-éosine-safran) des articulations des pattes du modèle traité versus non traité.

Par ailleurs, si l'on décidait de choisir un modèle alternatif au modèle murin moins complexe à mettre en place en imagerie intra vital, et ce, pour répondre simplement à l'effet de la molécule ABX sur le chimiotactisme et l'infiltration tissulaire des cellules immunes pro-inflammatoires dans un organisme entier, il semblerait que l'utilisation du modèle zebrafish soit le modèle le mieux adapté. En effet, les principaux avantages de ce modèle sont d'une part, la transparence naturelle des larves (stade primitif du développement), d'autre part la conservation du système immunitaire notamment les monocytes /macrophages, neutrophiles, et enfin n'oublions pas que le miR124 (qui semblerait jouer un rôle essentiel dans notre étude) est conservé chez le zebrafish (Morris et al., 2015).

- **Le modèle zebrafish pour mettre en place un test fonctionnel de migration *in vivo* par l'imagerie intra vitale en temps réel**

Nous pourrions par exemple utiliser la lignée double transgénique zebrafish telle que mpeg1:mCherryF/Tnfa :GFP-F (Nguyen-Chi et al., 2015), cela nous permettraient de suivre l'infiltration des macrophages dans un tissu exempt de toutes cellules macrophagiques en conditions homéostatique. Ainsi, il sera possible de suivre (1) les macrophages (marqués mCherry) qui se trouve sous le promoteur de la protéine spécifique des macrophages : « macrophage express gene 1 » (mpeg1) (Ellett et al., 2011) et plus spécifiquement (2) les macrophages pro-inflammatoires (marqués GFP) sous le promoteur de la protéine pro-inflammatoire Tnfa (voire la figure d'après (Nguyen-Chi et al., 2015)).

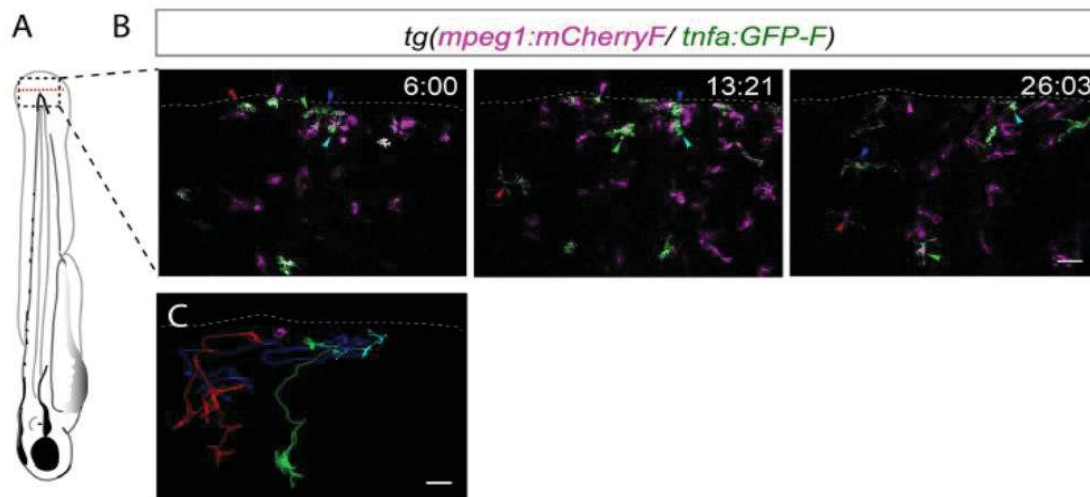


Figure d'après (Nguyen-Chi et al., 2015) : (A) Diagramme montrant le site où a lieu l'inflammation (point rouge = transection de la nageoire caudale) sur une larve double transgénique de 3 jours après fécondation (3dpf), la boîte en pointillées noires représente la zone imagée. (B) Time-lapse montrant la migration des macrophages $Tnfa^+$ (magenta + vert) aux temps indiqués (heures : minutes). (C) Suivi (« tracking ») des macrophages $Tnfa^+$. Les lignes de couleurs correspondent aux macrophages indiqués par les flèches en (B).

Par conséquent, avec ce modèle nous pourrions envisager de traiter par la molécule ABX les larves de zebrafish double transgénique ($mpeg1: mCherryF / Tnfa : GFP-F$) et par la suite, faire exactement la même technique que l'équipe d'Nguyen versus des larves contrôle. Dès lors, si la technique fonctionne (que les larves prennent bien la molécule mélangée à leurs granules, que le temps du traitement ABX vs contrôle soit suffisant), et que l'on induit l'inflammation par l'amputation (transection) de l'extrémité de la queue (nageoire caudale) de la larve (3j après fécondation) suivi d'un « tracking » en microscopie photonique en temps réel, nous pourrions caractériser et quantifier un signal diminué des macrophages pro-inflammatoires soit une diminution du nombre de cellules marquées $Tnfa^+$ (vert) versus les larves non traitées par la molécule ABX.

Par ailleurs, l'utilisation du zebrafish transgénique ($lyz :EGFP$) peut également nous permettre de suivre la dynamique transmigratoire des neutrophiles suite à la transection de la nageoire caudale du zebrafish (voire la Figure d'après (Da-Long Ren and Han Wang, 2015)). En effet, la « Green Fluorescence Protein » (GFP) exprimée sous le promoteur lysozyme (lyz) permettra de marquer et de suivre spécifiquement les neutrophiles. Cette étude pourrait se révéler également très intéressante car dans mon étude le TNF α est significativement diminué et certaine chimiokine comme le CXCL1 (chimioattractant des neutrophiles) est très significativement diminué.

Etant donné que ces deux protéines (TNF- α et CXCL1) sont en partie responsables du chimiotactisme des neutrophiles, il serait très intéressant d'élargir l'étude de migration sur ces cellules de l'immunité innée.

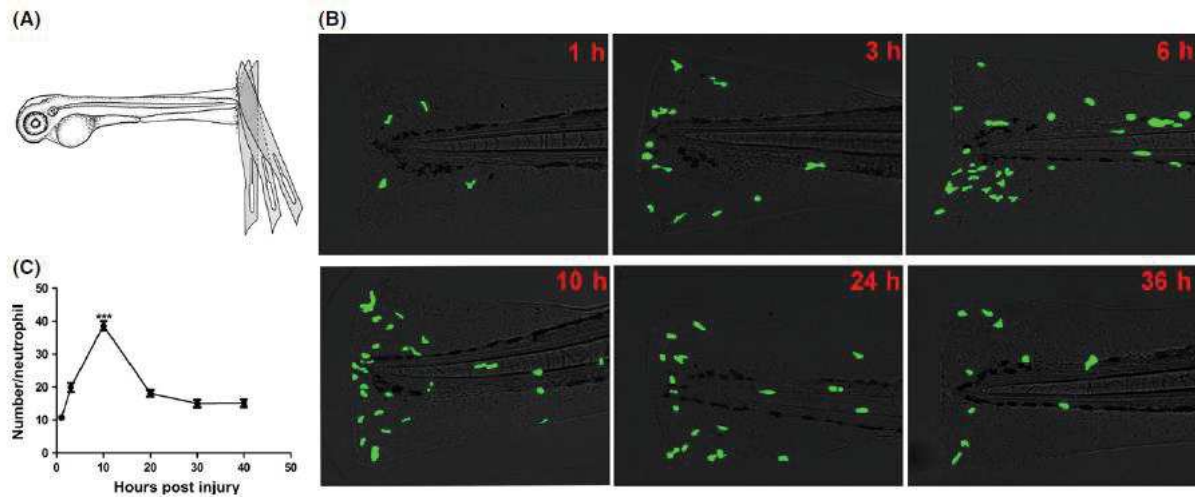


Fig. 1. In vivo monitoring of neutrophil migration in a zebrafish tail fin transection model. (A) Zebrafish spinal cord terminal was injured by a sterile scalpel blade. (B) Neutrophils were traced in real time by an Olympus confocal microscope during a 36-hr period. (C) Neutrophil recruitment peaked around 10 hr postinjury and gradually waned after 20 hr. (***) $P < 0.001$.

Figure d'après (Da-Long Ren and Han Wang, 2015). Illustration d'un test fonctionnel intra vital pour étudier la migration des neutrophiles *in vivo* en temps réel. Cette application permettrait d'imager et de quantifier les neutrophiles pour ainsi caractériser d'un point de vue fonctionnel les effets de la molécule ABX sur le chimiotactisme des cellules immunes pro-inflammatoires.

Par ailleurs, afin de pouvoir confirmer que les effets observés avec la drogue ABX et son métabolite, sont directement liés à la surexpression du miR-124, il serait très intéressant d'inhiber le miR-124 *in vitro* dans les Hu MDM pro-inflammatoires en présence des drogues ABX et N-Glucuronide et de procéder à la vérification du niveau de l'expression protéique des principales cibles de la voie TLR4/NF-kB (p65/RelA, TRAF6, IκBζ/NFKBIZ).

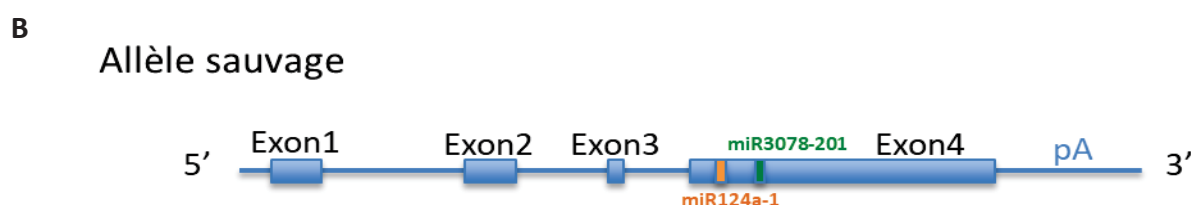
Et dans un second temps de faire une inhibition du miR124 *in vivo* en créant un modèle murin à partir de cellules souches embryonnaires (ESC) en utilisant le système Cre/Lox.

- Mise en place d'un système de recombinaison « Cyclic recombinaison/ Locus of X-over P1 » (Cre/Lox) pour l'inhibition du miR124 *in vivo* et *in vitro*

A Stem-loop Details

Human ▲

Stem-loop ID	hsa-mir-124-1
Stem-loop Accession #	MI0000443
Stem-loop Sequence	AGGCCUCUCUCUCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAAUGUCCAUACA AUUAAGGCACGCG GUGAAUGCCAAGAAUGGGGCUG
Chromosome Location	Chr. 8 - 9903388 - 9903472 [-] on Build GRCh38
Mature MicroRNA	miRBase Accession #: MIMAT0000422 miRBase ID: hsa-miR-124-3p Mature miRNA Sequence: UAAGGCACGCGGUGAAUGCC Chromosome Location: Chr. 20 - 63178500 - 63178586 [+] on Build GRCh38



Diagrammes : (A) Structure et localisation chromosomique du miR124.1. (B) Structure de l'allèle sauvage.

Le laboratoire coopérative CNRS/ABIVAX a eu le projet d'établir avec la société Cyagen un modèle murin « Knock Out » (KO) conditionnel du miR124 en utilisant le système de recombinaison « Cyclic recombinase/ Locus of X-over P1 » (Cre/Lox). Le design a été établi avec la société Cyagen. La stratégie consiste à dupliquer un exon (l'exon4 contenant un miR3078-201) qui à priori pourrait-être important au cours du développement. Cette stratégie appelée « stratégie de l'exon artificiel » permettra de conserver l'exon4 et son miR (MiR 3078-201). La société Cyagen devrait fournir au laboratoire des cellules souches embryonnaires (ESC) avec la construction Cre /Lox miR124 (pour mener des études *in vitro*). En outre, la société Cyagen est en charge de produire les chimères et surtout de fournir au moins trois premiers fondateurs de souris hétérozygote (F1).

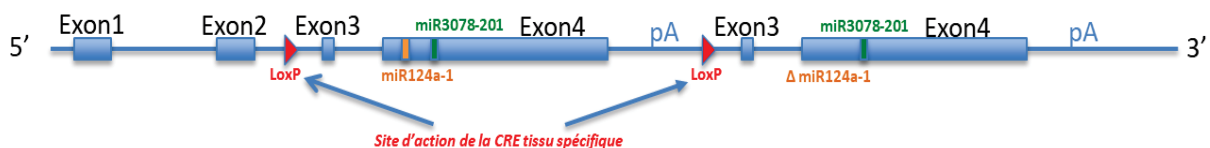
Ces souris F1 porteront l'allèle muté et seront KO conditionnel pour le miR124 (ci-dessous diagramme de stratégie de construction du KO), ce qui signifie que le KO proprement dit, sera obtenu après croisement avec les souris Cre du tissu spécifique que l'on veut étudier (ces souris porteront l'allèle recombiné). Par exemple, dans le contexte de notre étude, les souris F1 pourront être mises en croisement avec des souris porteuses du gène rapporteur Cre tissu spécifique de l'intestin (Villin Cre), ou encore avec les souris Cre spécifique de la lignée myéloïde (Lysozyme M Cre), voire la lignée spécifique des macrophages (CX3CR1 Cre) (Shi et al., 2018).

Stratégie de l'exon artificiel

Allèle sauvage



Allèle muté



Allèle recombiné



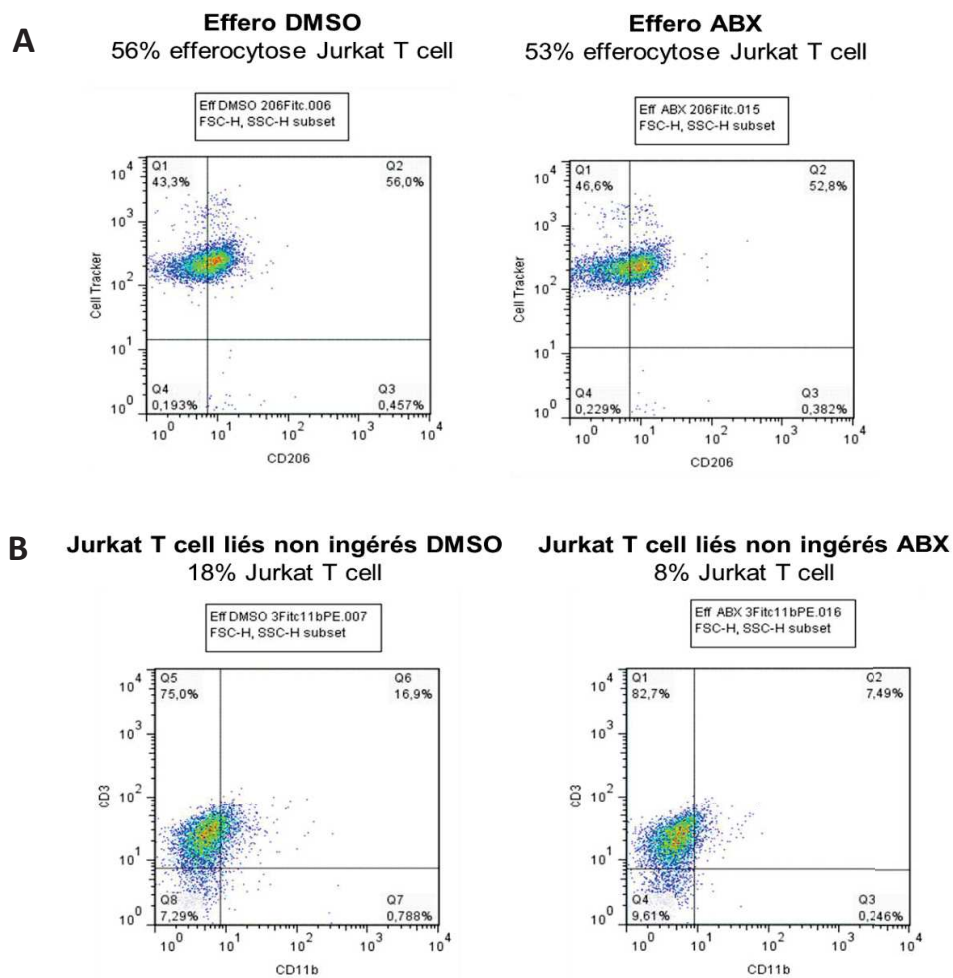
Diagramme : Stratégie de construction pour créer un modèle murin KO conditionnel du miR124 : stratégie de l'exon artificiel

L'analyse se fera tout d'abord par la vérification de l'absence d'expression du miR124 par q RT PCR dans les tissus d'intérêt des souris KO versus souris sauvage traitées ou non par la drogue ABX. L'analyse du phénotype des souris KO homozygote versus souris sauvages traitées ou non par la molécule ABX se fera par l'analyse de l'anatomie des souris (taille, poids) et de l'intégrité du tissu spécifique ciblé. Ensuite, la caractérisation de l'impact de la déplétion du miR124 des souris KO traitées ou non par la drogue ABX se fera par des analyses histologiques (immunohistochimie) des cellules immunes (polynucléaires, monocytes, macrophages). La qRT-PCR et les western blot permettront de vérifier la présence ou non des cibles du miR124 comme par exemple : RelA, TRAF6, IκBζ, MCP-1 voire STAT3. En revanche, il faut garder à l'esprit que si malgré l'inhibition du miR124, il n'y a aucun phénotype, des phénomènes compensatoires (comme la synergie avec d'autres miR par exemple) pourront masquer tout phénotype éventuel. Ensuite, idéalement pour être dans le contexte de notre étude, il faudrait induire une inflammation sur ces souris KO. Auquel cas, il faudrait voire la faisabilité d'une mise en accouplement avec des souris modèle de l'inflammation (souris DSS, souris CIA), suivi d'analyses en immunohistochimie des organes d'intérêts. Des analyses de cicatrisation ou d'imagerie intra vitale en temps réel pourront également être envisagées.

Par ailleurs, l'une des propriétés physiologiques des macrophages représentés par l'efferocytose, qui consiste à éliminer les granulocytes apoptotiques, pourrait être réalisée de manière plus conséquente. L'efferocytose est un processus important pour l'homéostasie tissulaire, en outre, des études ont démontré qu'un défaut de clairance des cellules apoptotiques est considérée comme la cause et la conséquence de nombreuses maladies chroniques voire de cancer (Novak and Thorp, 2013) ; (Liang et al., 2018) . De plus, la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages est à l'origine d'un microenvironnement pro-résolutif (IL-10, TGFβ, résolvines, lipoxines...) et représente un potentiel physiologique additionnel pour l'efficacité thérapeutique (Chen et al., 2001) ; (Poon et al., 2014) ; (Bonney et al., 2018). Nous pourrions émettre l'hypothèse que le traitement par la drogue ABX et son métabolite permettrait aux macrophages d'être plus efficient dans le processus de pro résolution suite à l'efferocytose. Non pas que la molécule ABX augmenterait l'efferocytose en elle-même, mais que le sécrétome de ce processus d'efferocytose soit plus important en protéines pro-résolutives.

- Collecte et dosage *in vitro* du sécrétome d'efferocytose issus des co-cultures de HuMDM PolM1 traités ou non par ABX en présence de lymphocyte T CD4 apoptotique

La raison pour laquelle je ne pense pas que la molécule tend à augmenter l'efferocytose est, parce qu'au cours de mon étude, j'ai initié *in vitro* sur 2 donneurs de HuMDM Polarisés M1 traités et non traités par la molécule ABX un mimétisme de la résolution de l'inflammation (données non montrées dans les résultats du manuscrit). Après une analyse par le FACS, la co-culture de ces HuMDM (marqués CD206⁺) en présence de cellules Jurkat (lignée lymphocytaire CD4) préalablement mis en apoptose (marquées cell Tracker⁺) ne montrait pas de différence significative entre le nombre de cellules Jurkat apoptotiques ingérées par les HuMDM (CD206⁺CellTracker⁺) traités ABX versus contrôle HuMDM DMSO. Bien qu'il n'y ait que 2 donneurs réalisés, à priori, le traitement par la molécule ABX n'augmente pas le processus d'efferocytose (Figure FACS test d'efferocytose).



Figures FACS : Test exploratoire d'efferocytose. (A) Efferocytose des cellules Jurkat (Cell Tracker⁺) par les HuMDM (CD206⁺) traités ABX versus DMSO. (B) Jurkat liés non ingérés (CD3⁺) sur les HuMDM (CD11b⁺) traités ABX versus DMSO.

En revanche, je n'ai pas eu à ce moment-là, l'idée de collecter les surnageants de ces expériences d'efferocytose et de faire un dosage des protéines anti-inflammatoires des sécrétomes (surnageants d'efferocytose traités ABX versus surnageants contrôle DMSO). Nous pourrions émettre l'hypothèse que certes, le nombre de cellules ingérées est inchangées sous traitement ABX versus DMSO, mais étant donné que le traitement des macrophages pro-inflammatoires en présence de la drogue ABX modifie leur profil, alors il se pourrait que les macrophages traités ABX « amplifient » la sécrétion de protéines pro-résolutives (TGF β , lipoxines, IL-10) de manière plus importante exclusivement après avoir effectué l'ingestion des cellules T apoptotiques.

Par ailleurs, bien que des essais cliniques de phase II soient en cours en ce qui concerne la polyarthrite rhumatoïde, au laboratoire, des études *in vivo* sur des modèles murins d'arthrite induit par le collagène (modèle CIA) ont été mises en place.

- **Etude *in vivo* de l'effet anti-inflammatoire d'ABX sur la polyarthrite rhumatoïde: mise en place du modèle murin de l'arthrite induite par le collagène (modèle CIA)**

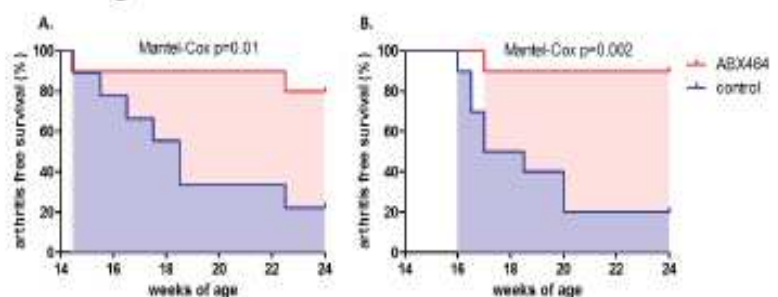
Ces expériences ont été entreprises à titre exploratoire pour étudier les effets anti-inflammatoires de la molécule ABX en supplément du modèle murin de colite ulcéreuse (Chebli et al., 2017). A ce jour, deux expériences indépendantes ont été réalisées permettant de suggérer que la molécule ABX diminue l'incidence de l'arthrite induite par le collagène. Ces données ont été présentées sous forme de poster lors du Congrès Européen de Rhumatologie (EULAR 2020).

Figure n°3 du POSTER EULAR 2020
ABX464, a novel drug in the field of inflammation, increases miR-124 and modulates macrophages and T-cell functions.

C. BEGON-PESCIA¹, J. MIELLE¹,
 N. CAMPOS², K. CHEBLI¹, L. MANCHON¹,
 J. SANTO², C. APOLIT², K. MARTIN²,
 L. LAPASSET², A. VAUTRIN²,
 D. SCHERRER², A. GARCEL²,
 J. TAZI², C. DAIEN¹.

The cooperative Lab. 1. IGMM, UMR5535,
 CNRS, Montpellier and Montpellier University
 2. Abivax R&D Montpellier

Figure 3. ABX464 decreases incidence of collagen-induced arthritis



Arthritis-free survival in mice treated with ABX464 or vehicle (MC). Arthritis was defined as an mean joint thickness ≥ 2 mm on at least consecutive 2 timepoints. The figures represent two independent experiments (A and B) with n=10 and 9 mice for A and n=10 and n=10 for B for ABX464 and MC, respectively. Mantel-Cox tests performed.

En revanche, sur ces modèles CIA traités ou non par la molécule ABX, il aurait été très pertinent et intéressant de faire post mortem l'évaluation histologique de l'arthrite des modèles CIA traités ou non par la molécule ABX. Comme par exemple évaluer par immunohistochimie des coupes à partir des articulations des pattes de l'animal et entreprendre de marquer les protéines pro-inflammatoires comme par exemple l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α . Nous pourrions envisager de marquer et de quantifier les monocytes/ macrophages (F4/80, CCR2, Ly6C, CD64) par exemple, et d'imager les coupes histologiques permettant de montrer que le traitement ABX diminue effectivement l'infiltration des cellules immunes pro-inflammatoires versus contrôle. En outre, nous pourrions également envisager des marquages qui permettent d'évaluer la quantité en lymphocytes T (par un marquage CD3) et en lymphocytes B (par un marquage CD20) ainsi que l'état de différenciation des lymphocytes T. Ces marquages en immunohistochimie nous permettraient très probablement de caractériser et de déterminer quantitativement la proportionnelle de lymphocytes différenciés. La raison étant que, dans la polyarthrite, il est clairement décrit que les principaux acteurs qui initient le processus inflammatoire sont les fibroblastes et les macrophages (Sigaux et al., 2018). Les macrophages vont sécréter en abondance les cytokines pro-inflammatoires : TNF α , IL-6, IL-1, IL-17 qui recruteront les lymphocytes (qui eux-mêmes sécréteront des cytokines pro-inflammatoires), la différenciation des lymphocytes en lymphocytes Th17, Th1 se mettra en place au détriment des lymphocytes T régulateurs (T reg) et l'inflammation se maintiendra en association avec la production d'auto-anticorps.

De ces faits, étant donné que nous avons montré que la molécule ABX diminue les cytokines IL-6, TNF α et IL-1, nous pourrions supposer que les lymphocytes seront moins enclins à se différencier en lymphocytes Th17 ; ce qui permettrait un rééquilibrage probable en faveur des lymphocytes T régulateurs. Par conséquent, l'analyse post mortem du modèle murin CIA traité ou non par la molécule ABX par des analyses d'immunohistochimie, ou par la microscopie électronique, serait un très bon moyen de vérifier et de confirmer la diminution de l'infiltrat cellulaire. Ainsi, nous pourrions confirmer très probablement que l'observation de la diminution des cytokines pro-inflammatoires par la molécule ABX, est enclin à diminuer la différenciation des lymphocytes, en lymphocytes Th17.

Pour finir sur ces perspectives, nous pourrions supposer qu'en dehors de la voie de signalisation TLR4/NF-kB, d'autres voies de signalisation comme celles impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (voie Rho GTPases), du métabolisme (glycolyse, fer, acides gras, acides aminés) ou de l'inflammasome (NLRP3, caspase-1) par exemple, pourraient être impactées. Il ne serait pas aberrant de penser que la drogue ABX ou le N-Glucuronide modifierait le profil transcriptomique des macrophages pro-inflammatoires. L'hypothèse serait

que la drogue ABX laisserait une empreinte moléculaire dans les cellules immunes. Techniquement pour vérifier cette hypothèse, une analyse transcriptomique par le biais du « single cell RNA sequencing » par exemple, pourrait être envisagé de manière à caractériser plus précisément le spectre phénotypique des macrophages en cellules uniques en présence du traitement de la drogue ABX et de son métabolite N-Glucuronide.

Références bibliographiques

- André Jean-Michel, Catala M., Morère J.-J., Escudier E., Katsanis G., Poirier J. (2008). Histologie : les tissus
- Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z.J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26, 3214–3226.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675–680.
- Al Murri, A.M., Bartlett, J.M.S., Canney, P.A., Doughty, J.C., Wilson, C., and McMillan, D.C. (2006). Evaluation of an inflammation-based prognostic score (GPS) in patients with metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* 94, 227–230.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Lymphocytes and the Cellular Basis of Adaptive Immunity. *Mol. Biol. Cell* 4th Ed.
- Albregues, J., Meneguzzi, G., and Gaggioli, C. (2014). L'invasion des cellules tumorales - Quand les fibroblastes s'en mêlent. *médecine/sciences* 30, 391–397.
- Alessandri, A.L., Sousa, L.P., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Pinho, V., and Teixeira, M.M. (2013). Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol. Ther.* 139, 189–212.
- Altan-Bonnet, G., and Mukherjee, R. (2019). Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 205–217.
- Amigorena, S. (1999). Présentation antigénique par les cellules dendritiques. *médecine/sciences* 15, 931.
- Anderson, C.F., and Mosser, D.M. (2002). A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.* 72, 101–106.
- Anglicheau, D., Muthukumar, T., and Suthanthiran, M. (2010). MicroRNAs: Small RNAs with Big Effects. *Transplantation* 90, 105–112.
- Arango Duque, G., and Descoteaux, A. (2014a). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5, 491.
- Arango Duque, G., and Descoteaux, A. (2014b). Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 5.
- Arnold, C.E., Gordon, P., Barker, R.N., and Wilson, H.M. (2015). The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. *Immunobiology* 220, 10–19.
- Astry, B., Venkatesha, S.H., and Moudgil, K.D. (2015). Involvement of the IL-23/IL-17 axis and the Th17/Treg balance in the pathogenesis and control of autoimmune arthritis. *Cytokine* 74, 54–61.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* 317, 666–670.
- Baeten, D., Boots, A.M., Steenbakkens, P.G., Elewaut, D., Bos, E., Verheijden, G.F., Berheijden, G., Miltenburg, A.M., Rijnders, A.W., Veys, E.M., et al. (2000). Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 1233–1243.

- Bain, C.C., and Mowat, A.M. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* *260*, 102–117.
- Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 540–550.
- Banerjee, S., Xie, N., Cui, H., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., Abraham, E., and Liu, G. (2013a). microRNA let-7c regulates macrophage polarization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 6542–6549.
- Banerjee, S., Cui, H., Xie, N., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., Thannickal, V.J., Abraham, E., and Liu, G. (2013b). miR-125a-5p Regulates Differential Activation of Macrophages and Inflammation. *J. Biol. Chem.* *288*, 35428–35436.
- Barash, H., R Gross, E., Edrei, Y., Ella, E., Israel, A., Cohen, I., Corchia, N., Ben-Moshe, T., Pappo, O., Pikarsky, E., et al. (2010). Accelerated carcinogenesis following liver regeneration is associated with chronic inflammation-induced double-strand DNA breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2207–2212.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* *116*, 281–297.
- Bazzoni, F., Rossato, M., Fabbri, M., Gaudiosi, D., Mirolo, M., Mori, L., Tamassia, N., Mantovani, A., Cassatella, M.A., and Locati, M. (2009). Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 5282–5287.
- Benmerah, A., and Lamaze, C. (2002). Endocytose : chaque voie compte ! *MS Médecine Sci.* *18*, 1126–1136.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* *11*, 889–896.
- Blanchard, C., and Rothenberg, M.E. (2009). Biology of the Eosinophil. *Adv. Immunol.* *101*, 81–121.
- Blériot, C., Chakarov, S., and Ginhoux, F. (2020). Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* *52*, 957–970.
- Boldin, M.P., Taganov, K.D., Rao, D.S., Yang, L., Zhao, J.L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., et al. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J. Exp. Med.* *208*, 1189–1201.
- Bonavita, O., Mollica Poeta, V., Massara, M., Mantovani, A., and Bonecchi, R. (2018). Regulation of hematopoiesis by the chemokine system. *Cytokine* *109*, 76–80.
- Bonecchi, R., Savino, B., Borroni, E.M., Mantovani, A., and Locati, M. (2010). Chemokine Decoy Receptors: Structure–Function and Biological Properties. In *The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology*, O. Bruserud, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 15–36.
- Bonecchi, R., Garlanda, C., Mantovani, A., and Riva, F. (2016a). Cytokine decoy and scavenger receptors as key regulators of immunity and inflammation. *Cytokine* *87*, 37–45.
- Bonecchi, R., Garlanda, C., Mantovani, A., and Riva, F. (2016b). Cytokine decoy and scavenger receptors as key regulators of immunity and inflammation. *Cytokine* *87*, 37–45.
- Bonilla, F.A., and Oettgen, H.C. (2010). Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S33–S40.

- Bonnefoy, F., Gauthier, T., Vallion, R., Martin-Rodriguez, O., Missey, A., Daoui, A., Valmary-Degano, S., Saas, P., Couturier, M., and Perruche, S. (2018). Factors Produced by Macrophages Eliminating Apoptotic Cells Demonstrate Pro-Resolutive Properties and Terminate Ongoing Inflammation. *Front. Immunol.* 9.
- Borel, J., Monboisse, J., and Bellon, G. (1988). Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés. *médecine/sciences* 4, 304.
- Borgne, M.L., Dubois, B., and Kaiserlian, D. (2007). Cellules dendritiques des muqueuses et de la peau - « Recruter pour vacciner ». *médecine/sciences* 23, 819–825.
- Bouillon, M., and Mourad, W.M. (2003). Complexe majeur d’histocompatibilité de classe II : diversité fonctionnelle. *médecine/sciences* 19, 988–993.
- Boulakirba, S., Pfeifer, A., Mhaidly, R., Obba, S., Goulard, M., Schmitt, T., Chaintreuil, P., Calleja, A., Furstoss, N., Orange, F., et al. (2018). IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential. *Sci. Rep.* 8.
- Bouma, G., and Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 521–533.
- Boyette, L.B., Macedo, C., Hadi, K., Elinoff, B.D., Walters, J.T., Ramaswami, B., Chalasani, G., Taboas, J.M., Lakkis, F.G., and Metes, D.M. (2017). Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE* 12.
- Braun, V., Fraiser, V., Raposo, G., Hurbain, I., Sibarita, J.-B., Chavrier, P., Galli, T., and Niedergang, F. (2004). TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J.* 23, 4166–4176.
- Brem, H., Howell, R., Criscitelli, T., Senderowicz, A., Siegart, N., Gorenstein, S., and Gillette, B. (2018). Practical Application of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) in Patients with Wounds. *Surg. Technol. Int.* 32, 61–66.
- Breton, G. (2015). Origine et développement des cellules dendritiques humaines. *médecine/sciences* 31, 725–727.
- Brockmann, L., Giannou, A.D., Gagliani, N., and Huber, S. (2017a). Regulation of TH17 Cells and Associated Cytokines in Wound Healing, Tissue Regeneration, and Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Brockmann, L., Giannou, A.D., Gagliani, N., and Huber, S. (2017b). Regulation of TH17 Cells and Associated Cytokines in Wound Healing, Tissue Regeneration, and Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Brodsky, F.M., Chen, C.-Y., Knuehl, C., Towler, M.C., and Wakeham, D.E. (2001). Biological Basket Weaving: Formation and Function of Clathrin-Coated Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 517–568.
- Brown, E.J. (1991). Complement receptors and phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 76–82.
- Brundu S, F.A. (2015). Polarization and Repolarization of Macrophages. *J. Clin. Cell. Immunol.* 06.
- Bryceson, Y.T., Chiang, S.C.C., Darmanin, S., Fauriat, C., Schlums, H., Theorell, J., and Wood, S.M. (2011). Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J. Innate Immun.* 3, 216–226.
- Buchan, G., Barrett, K., Turner, M., Chantry, D., MAINit, R.N., and Feldmann, M. Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1a. 7.

- Byrne, R., Rath, E., Hladik, A., Niederreiter, B., Bonelli, M., Frantal, S., Smolen, J.S., and Scheinecker, C. (2012). A Dynamic Real Time In Vivo and Static Ex Vivo Analysis of Granulomonocytic Cell Migration in the Collagen-Induced Arthritis Model. *PLoS ONE* 7.
- Cameron, M.J., and Kelvin, D.J. (2013). *Cytokines, Chemokines and Their Receptors* (Landes Bioscience).
- Camier, S., and Séraphin, B. (2007). Détruisez ce message (ARN) après l'avoir lu ! *médecine/sciences* 23, 850–856.
- Campos, N., Myburgh, R., Garcel, A., Vautrin, A., Lapasset, L., Nadal, E.S., Mahuteau-Betzer, F., Najman, R., Fornarelli, P., Tantale, K., et al. (2015). Long lasting control of viral rebound with a new drug ABX464 targeting Rev – mediated viral RNA biogenesis. *Retrovirology* 12.
- Capece, D., Verzella, D., Tessitore, A., Alesse, E., Capalbo, C., and Zazzeroni, F. (2018). Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF- κ B. *Semin. Cell Dev. Biol.* 78, 51–61.
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). *The components of the immune system. Immunobiol. Immune Syst. Health Dis.* 5th Ed.
- Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610–621.
- Chatenoud, L. (2002). Immunité innée et immunité adaptative : un flirt bénéfique? *Médecine/Sciences* 18, 1183–1184.
- Chaudhuri, A.A., So, A.Y.-L., Sinha, N., Gibson, W.S.J., Taganov, K.D., O'Connell, R.M., and Baltimore, D. (2011). MiR-125b potentiates macrophage activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 5062–5068.
- Chebli, K., Papon, L., Paul, C., Garcel, A., Campos, N., Scherrer, D., J. Ehrlich, H., Hahne, M., and Tazi, J. (2017). The Anti-Hiv Candidate Abx464 Dampens Intestinal Inflammation by Triggering IL-22 Production in Activated Macrophages. *Sci. Rep.* 7.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., and Zhao, L. (2018a). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9.
- Chen, Q., Wang, H., Liu, Y., Song, Y., Lai, L., Han, Q., Cao, X., and Wang, Q. (2012). Inducible MicroRNA-223 Down-Regulation Promotes TLR-Triggered IL-6 and IL-1 β Production in Macrophages by Targeting STAT3. *PLoS ONE* 7.
- Chen, W., Frank, M.E., Jin, W., and Wahl, S.M. (2001). TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14, 715–725.
- Chen, X., Jin, R., Chen, R., and Huang, Z. (2018b). Complementary action of CXCL1 and CXCL8 in pathogenesis of gastric carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 11, 1036–1045.
- Chikuma, S. (2017). CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation. In *Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity*, A. Yoshimura, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 99–126.
- Choi, M., Kwok, S.J.J., and Yun, S.H. (2015). In Vivo Fluorescence Microscopy: Lessons From Observing Cell Behavior in Their Native Environment. *Physiology* 30, 40–49.

- Chow, A., Brown, B.D., and Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 788–798.
- Choy, M.Y., Walker-Smith, J.A., Williams, C.B., and MacDonald, T.T. (1990). Differential expression of CD25 (interleukin-2 receptor) on lamina propria T cells and macrophages in the intestinal lesions in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* *31*, 1365–1370.
- Chu-Tan, J.A., Rutar, M., Saxena, K., Aggio-Bruce, R., Essex, R.W., Valter, K., Jiao, H., Fernando, N., Wooff, Y., Madigan, M.C., et al. (2018). MicroRNA-124 Dysregulation is Associated With Retinal Inflammation and Photoreceptor Death in the Degenerating Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *59*, 4094–4105.
- Clarkson, S.B., and Ory, P.A. (1988). CD16. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes. *J. Exp. Med.* *167*, 408–420.
- Clément, K., and Vignes, S. (2009). Inflammation, adipokines et obésité. *Rev. Médecine Interne* *30*, 824–832.
- Cobb, B.S., Nesterova, T.B., Thompson, E., Hertweck, A., O'Connor, E., Godwin, J., Wilson, C.B., Brockdorff, N., Fisher, A.G., Smale, S.T., et al. (2005). T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J. Exp. Med.* *201*, 1367–1373.
- Cobos Jiménez, V., Bradley, E.J., Willemsen, A.M., van Kampen, A.H.C., Baas, F., and Kootstra, N.A. (2013). Next-generation sequencing of microRNAs uncovers expression signatures in polarized macrophages. *Physiol. Genomics* *46*, 91–103.
- Combadière, B., Combadière, C., and Deterre, P. (2007). Les chimiokines : un réseau sophistiqué de guidage cellulaire. *médecine/sciences* *23*, 173–179.
- Conner, S., and Schmid, S. (2003). Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*: 37-44. *Nature* *422*, 37–44.
- Coskun, M., Olsen, J., Seidelin, J.B., and Nielsen, O.H. (2011). MAP kinases in inflammatory bowel disease. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *412*, 513–520.
- Courtois, G., and Israël, A. (2004). [Human pathologies associated with NF-kappaB defects]. *J. Soc. Biol.* *198*, 93–96.
- 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.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 Determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T Cells. *J. Exp. Med.* *197*, 1141–1151.
- Da-Long Ren, and Han Wang (PDF) Melatonin regulates the rhythmic migration of neutrophils in live zebrafish.
- Daudin J.B., D.Monnet, F. Batteux, U.F.O. 1: Immunologie générale | Medicine Key.
- Degboé, Y., Rauwel, B., Baron, M., Boyer, J.-F., Ruyssen-Witrand, A., Constantin, A., and Davignon, J.-L. (2019). Polarization of Rheumatoid Macrophages by TNF Targeting Through an IL-10/STAT3 Mechanism. *Front. Immunol.* *10*.

- Dhainaut, M., and Moser, M. (2015). Chapter Six - Mechanisms of Surveillance of Dendritic Cells by Regulatory T Lymphocytes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, A. Liston, ed. (Academic Press), pp. 131–154.
- Dinareello, C.A. (2007). Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.* *37 Suppl 1*, S34-45.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 857–902.
- Dorrington, M.G., and Fraser, I.D.C. (2019). NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front. Immunol.* *10*.
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of Hemopoiesis by Bone Marrow Stromal Cells and Their Products. *Annu. Rev. Immunol.* *8*, 111–137.
- Driss, V., Legrand, F., Loiseau, S., and Capron, M. (2010). L'éosinophile : nouvel acteur de la réponse immunitaire innée ? *médecine/sciences* *26*, 621–626.
- Drouet, L. (2018). NETose, ce que c'est, à quoi ça sert ? *JMV-J. Médecine Vasc.* *43*, 112–113.
- Duan, Q., Mao, X., Xiao, Y., Liu, Z., Wang, Y., Zhou, H., Zhou, Z., Cai, J., Xia, K., Zhu, Q., et al. (2016). Super enhancers at the miR-146a and miR-155 genes contribute to self-regulation of inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* *1859*, 564–571.
- Duclos, B. (2017). Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales. *JMV-J. Médecine Vasc.* *42*, 91–92.
- Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.-P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegon, I., Catala, L., Ifrah, N., et al. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* *110*, 4319–4330.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991–998.
- Duroux-Richard, I., Presumez, J., Courties, G., Gay, S., Gordeladze, J., Jorgensen, C., Kyburz, D., and Apparailly, F. (2011). Les microARN : de nouveaux acteurs de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum.* *78*, 109–115.
- East, L., and Isacke, C.M. (2002). The mannose receptor family. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1572*, 364–386.
- Eis, P.S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3627–3632.
- Eltzschig, H.K., and Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and Inflammation. *N. Engl. J. Med.* *364*, 656–665.
- Emilie, D., and Galanaud, P. (2000). Cytokines et anticytokines : un enjeu thérapeutique. *Rev. Médecine Interne* *21*, 833–836.
- Essandoh, K., Li, Y., Huo, J., and Fan, G.-C. (2016a). MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and Its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock Augusta Ga* *46*, 122–131.
- Essandoh, K., Li, Y., Huo, J., and Fan, G.-C. (2016b). MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and Its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock Augusta Ga* *46*, 122–131.

- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., et al. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15805–15810.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.
- Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., Kirchhausen, T., Clementi, E., and Meldolesi, J. (2006). Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J. Cell Sci.* *119*, 4758–4769.
- Febbraio, M., Hajjar, D.P., and Silverstein, R.L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* *108*, 785–791.
- Feig, J.E., Vengrenyuk, Y., Reiser, V., Wu, C., Statnikov, A., Aliferis, C.F., Garabedian, M.J., Fisher, E.A., and Puig, O. (2012). Regression of Atherosclerosis Is Characterized by Broad Changes in the Plaque Macrophage Transcriptome. *PLoS ONE* *7*.
- Fingerle, G., Pforte, A., Passlick, B., Blumenstein, M., Ströbel, M., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* *82*, 3170–3176.
- Fitzgerald, K., Palsson-McDermott, E., Bowie, A., Jefferies, C., Mansell, A., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M., et al. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* *413*, 78–83.
- Flamand, V. (2014). Neonatal tolerance to alloantigens. *Médecine Sci. MS* *30*, 166–172.
- Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* *7*, 61–98.
- Fleury, G., and Gabay, C. (2017). [Adverse events of biologic therapies]. *Rev. Med. Suisse* *13*, 542–548.
- Forbes, S.J., and Rosenthal, N. (2014). Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat. Med.* *20*, 857–869.
- Franceschi, C., and Campisi, J. (2014). Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *J. Gerontol. Ser. A* *69*, S4–S9.
- Franken, L., Schiwon, M., and Kurts, C. (2016). Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cell. Microbiol.* *18*, 475–487.
- Frankenberger, M., Hofer, T.P.J., Marei, A., Dayyani, F., Schewe, S., Strasser, C., Aldraihim, A., Stanzel, F., Lang, R., Hoffmann, R., et al. (2012). Transcript profiling of CD16-positive monocytes reveals a unique molecular fingerprint. *Eur. J. Immunol.* *42*, 957–974.
- Fraser, I.P., Koziel, H., and Ezekowitz, R.A.B. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* *10*, 363–372.
- Freeman, S.A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol. Rev.* *262*, 193–215.

- Furth, R.V., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. Le système phagocytaire mononucléaire: nouvelle classification des macrophages, des monocytes et de leurs cellules souches. *8*.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *J. Exp. Med.* *128*, 415–435.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J.M., and Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* *110*, 119–131.
- Galaine, J., Godet, Y., and Adotévi, O. (2016). Pour comprendre : l'activation lymphocytaire T. *Bull. Cancer (Paris)* *103*, S127–S131.
- Galdiero, M.R., Marone, G., and Mantovani, A. (2018). Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *10*.
- Gálvez, J. (2014). Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm.* *2014*.
- Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., and Yang, H. (2017). Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Front. Physiol.* *8*.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). THE INTERLEUKIN-1 FAMILY: BACK TO THE FUTURE. *Immunity* *39*, 1003–1018.
- Garo, L.P., and Murugaiyan, G. (2016). Contribution of MicroRNAs to autoimmune diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 2041–2051.
- Gay, N.J., Symmons, M.F., Gangloff, M., and Bryant, C.E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 546–558.
- Gazon, H., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., and Peloponese, J.-M.J. (2018). Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Front. Microbiol.* *8*.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* *19*, 71–82.
- Georgin-Lavialle, S., Hentgen, V., Stankovic Stojanovic, K., Bachmeyer, C., Rodrigues, F., Savey, L., Abbara, S., Conan, P.-L., Fraisse, T., Delplanque, M., et al. (2018). La fièvre méditerranéenne familiale. *Rev. Médecine Interne* *39*, 240–255.
- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., and Banerjee, A. (2006). Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* *25*, 6781–6799.
- Gibot, S. (2004). Nouveaux acteurs de l'immunité innée : les récepteurs TREM. *médecine/sciences* *20*, 503–505.
- Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* *44*, 439–449.

- Gohda, J., Matsumura, T., and Inoue, J. (2004). Cutting Edge: TNFR-Associated Factor (TRAF) 6 Is Essential for MyD88-Dependent Pathway but Not Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β (TRIF)-Dependent Pathway in TLR Signaling. *J. Immunol.* *173*, 2913–2917.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 23–35.
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* *44*, 463–475.
- Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2017). Successful and Maladaptive T Cell Aging. *Immunity* *46*, 364–378.
- Graff, J.W., Dickson, A.M., Clay, G., McCaffrey, A.P., and Wilson, M.E. (2012). Identifying Functional MicroRNAs in Macrophages with Polarized Phenotypes. *J. Biol. Chem.* *287*, 21816–21825.
- Greither, T., Grochola, L.F., Udelnow, A., Lautenschläger, C., Würfl, P., and Taubert, H. (2010). Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int. J. Cancer* *126*, 73–80.
- Grip, O., Bredberg, A., Lindgren, S., and Henriksson, G. (2007). Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *13*, 566–572.
- Gros Lambert, M., and Py, B.F. (2018). NLRP3, un inflammasome sous contrôle. *médecine/sciences* *34*, 47–53.
- Grosshans, H., and Filipowicz, W. (2008). The expanding world of small RNAs. *Nature* *451*, 414–416.
- Gu, W., Yao, L., Li, L., Zhang, J., Place, A.T., Minshall, R.D., and Liu, G. (2017). ICAM-1 regulates macrophage polarization by suppressing MCP-1 expression via miR-124 upregulation. *Oncotarget* *8*, 111882–111901.
- Guan, Y., and Han, F. (2020). Key Mechanisms and Potential Targets of the NLRP3 Inflammasome in Neurodegenerative Diseases. *Front. Integr. Neurosci.* *14*, 37.
- Guo, Z., Wu, R., Gong, J., Zhu, W., Li, Y., Wang, Z., Li, N., and Li, J. (2015). Altered microRNA expression in inflamed and non-inflamed terminal ileal mucosa of adult patients with active Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *30*, 109–116.
- Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2715–2729.
- Hamidzadeh, K., Christensen, S.M., Dalby, E., Chandrasekaran, P., and Mosser, D.M. (2017). Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. *Annu. Rev. Physiol.* *79*, 567–592.
- Hanai, H., Iida, T., Takeuchi, K., Watanabe, F., Yamada, M., Kikuyama, M., Maruyama, Y., Iwaoka, Y., Hirayama, K., Nagata, S., et al. (2008). Adsorptive Depletion of Elevated Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 1210–1216.
- Hartmann, C., Corre-Menguy, F., Boualem, A., Jovanovic, M., and Lelandais-Brière, C. (2004). Les microARN - Une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique. *médecine/sciences* *20*, 894–898.
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., and Tollervey, D. (2013). Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell* *153*, 654–665.
- Hentges, F. (1994). B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin. Exp. Immunol.* *97*, 3–9.
- Holmer, A., and Singh, S. (2019). Overall and comparative safety of biologic and immunosuppressive therapy in inflammatory bowel diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *15*, 969–979.

- Hornig, T., Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2, 835–841.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J. Immunol.* 162, 3749–3752.
- Hu, X., and Ivashkiv, L.B. (2009). Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- γ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. *Immunity* 31, 539–550.
- Hume, D.A., and MacDonald, K.P.A. (2012). Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* 119, 1810–1820.
- Hyun, Y.-M., Sumagin, R., Sarangi, P.P., Lomakina, E., Overstreet, M.G., Baker, C.M., Fowell, D.J., Waugh, R.E., Sarelius, I.H., and Kim, M. (2012). Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels. *J. Exp. Med.* 209, 1349–1362.
- Immunologists, A.A. of (1951). *The Production of Antibodies (2nd Edition)*: by F. M. Burnet and F. Fenner. \$3.00. 142 pp. Macmillan and Co., Ltd., Melbourne, Australia, 1949. *J. Immunol.* 66, 485–486.
- Israels, L.G., and Israels, E.D. (1999). Lymphocytes. *STEM CELLS* 17, 180–188.
- Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5.
- Iwahashi, M., Yamamura, M., Aita, T., Okamoto, A., Ueno, A., Ogawa, N., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P.J., and Makino, H. (2004). Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 1457–1467.
- Iwamoto, N., and Kawakami, A. (2019). Recent findings regarding the effects of microRNAs on fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Med.* 42, 156–161.
- Jacquelot, N., Enot, D.P., Flament, C., Dalle, S., and Zitvogel, L. (2016). L'expression des récepteurs de chimiokines à la surface des lymphocytes T reflète la dissémination métastatique du mélanome. *médecine/sciences* 32, 690–692.
- Jagot, F., and Davoust, N. (2017). Les microARN: Nouveaux acteurs dans la physiopathologie de la sclérose en plaques. *Médecine/Sciences* 33, 620–628.
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecreur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* 281, 51–61.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39.
- Jamilloux, Y., and Henry, T. (2013). Les inflammasomes - Plates-formes de l'immunité innée. *médecine/sciences* 29, 975–984.
- Janeway, C.A. (2013). Pillars Article: Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989. 54: 1–13. *J. Immunol.* 191, 4475–4487.

- Janeway, C.A., Goodnow, C.C., and Medzhitov, R. (1996). Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance. *Curr. Biol. CB* 6, 519–522.
- Jenkins, S.J., and Hume, D.A. (2014). Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends Immunol.* 35, 358–367.
- Jiang, P., Liu, R., Zheng, Y., Liu, X., Chang, L., Xiong, S., and Chu, Y. (2012). MiR-34a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through targeting Notch1 in murine macrophages. *Exp. Cell Res.* 318, 1175–1184.
- Joshi, S., Singh, A.R., Zulcic, M., Bao, L., Messer, K., Ideker, T., Dutkowski, J., and Durden, D.L. (2014). Rac2 Controls Tumor Growth, Metastasis and M1-M2 Macrophage Differentiation In Vivo. *PLoS ONE* 9.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13, 460–469.
- Kawano, S., and Nakamachi, Y. (2011). miR-124a as a key regulator of proliferation and MCP-1 secretion in synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, i88–i91.
- Kelley, J.L., Ozment, T.R., Li, C., Schweitzer, J.B., and Williams, D.L. (2014). Scavenger Receptor-A (CD204): A Two-Edged Sword in Health and Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 34, 241–261.
- Kendall, R.T., and Feghali-Bostwick, C.A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* 5.
- Khoufache, K., and Akoum, A. (2013). Forme soluble du récepteur de type 2 de l'IL-2 - Un candidat potentiel pour traiter l'endométriose. *médecine/sciences* 29, 1097–1098.
- Koch, S., Larbi, A., Derhovanessian, E., Ozcelik, D., Naumova, E., and Pawelec, G. (2008). Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun. Ageing A* 5, 6.
- Koch, S., Kucharzik, T., Heidemann, J., Nusrat, A., and Luegering, A. (2010). Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 161, 332–341.
- Kökten, T., Hansmannel, F., Melhem, H., and Peyrin-Biroulet, L. (2016). Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale*.
- Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merckenschlager, M., Rajewsky, N., et al. (2008). Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 132, 860–874.
- Koukos, G., Polytarchou, C., Kaplan, J.L., Morley-Fletcher, A., Gras-Miralles, B., Kokkotou, E., Baril-Dore, M., Pothoulakis, C., Winter, H.S., and Iliopoulos, D. (2013). MicroRNA-124 Regulates STAT3 Expression and is Downregulated in Colon Tissues of Pediatric Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 145, 842-52.e2.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610.
- Krzywinska, E., Allende-Vega, N., Cornillon, A., Vo, D.-N., Cayrefourcq, L., Panabieres, C., Vilches, C., Déchanet-Merville, J., Hicheri, Y., Rossi, J.-F., et al. (2015). Identification of Anti-tumor Cells Carrying Natural Killer (NK) Cell Antigens in Patients With Hematological Cancers. *EBioMedicine* 2, 1364–1376.

- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., and Bravo, R. (1997). Defects in Macrophage Recruitment and Host Defense in Mice Lacking the CCR2 Chemokine Receptor. *J. Exp. Med.* *186*, 1757–1762.
- Kwiatkowska, K., and Sobota, A. (1999). Signaling pathways in phagocytosis. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *21*, 422–431.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol. CB* *12*, 735–739.
- Lawrence, T. (2009). The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*.
- Lawrence, T., and Gilroy, D.W. (2006). Chronic inflammation: a failure of resolution?: The resolution of inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.* *88*, 85–94.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 750–761.
- Lazarou, I., Méric De Bellefon, L., Lauwerys, B., and Gabay, C. (2019). [Inflammatory arthritides pathotypes]. *Rev. Med. Suisse* *15*, 522–527.
- Le Saux, N. (2012). Les modificateurs de la réponse biologique pour réduire l'inflammation : pleins feux sur les risques d'infection. *Paediatr. Child Health* *17*, 151–154.
- LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* *112*, 1570–1580.
- Lee, J., Breton, G., Oliveira, T.Y.K., Zhou, Y.J., Aljoufi, A., Pühr, S., Cameron, M.J., Sékaly, R.-P., Nussenzweig, M.C., and Liu, K. (2015). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* *212*, 385–399.
- León, B., López-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity* *26*, 519–531.
- Li, C., Xu, M.M., Wang, K., Adler, A.J., Vella, A.T., and Zhou, B. (2018a). Macrophage polarization and meta-inflammation. *Transl. Res.* *191*, 29–44.
- Li, Q.-J., Chau, J., Ebert, P.J.R., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., et al. (2007). miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* *129*, 147–161.
- Li, Q.-R., Tan, S.-R., Yu, J., and Yang, J. (2018b). MicroRNA-124 alleviates hyperoxia-induced inflammatory response in pulmonary epithelial cell by inhibiting TLR4/NF- κ B/CCL2. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *11*, 76–87.
- Liang, Y., Pan, H.-F., and Ye, D.-Q. (2015). microRNAs function in CD8+T cell biology. *J. Leukoc. Biol.* *97*, 487–497.
- Liang, Y.Y., Schwarzingler, I., Simonitsch-Klupp, I., Agis, H., and Oehler, R. (2018). Impaired efferocytosis by monocytes in multiple myeloma. *Oncol. Lett.* *16*, 409–416.
- Liau, N.P.D., Laktyushin, A., Lucet, I.S., Murphy, J.M., Yao, S., Whitlock, E., Callaghan, K., Nicola, N.A., Kershaw, N.J., and Babon, J.J. (2018). The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat. Commun.* *9*.
- Liew, F.Y.E. (2002). TH1 and TH2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.*

- Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., and O'Neill, L.A.J. (2005). Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 446–458.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773.
- Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., et al. (2008). Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320, 807–811.
- Lin, Q., Geng, Y., Zhao, M., Lin, S., Zhu, Q., and Tian, Z. (2017). MiR-21 Regulates TNF- α -Induced CD40 Expression via the SIRT1-NF- κ B Pathway in Renal Inner Medullary Collecting Duct Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 41, 124–136.
- Lindenblatt, C., Schulze-Osthoff, K., and Totzke, G. (2009). κ B ζ expression is regulated by miR-124a. *Cell Cycle* 8, 2019–2023.
- Lindsay, M.A. (2008). microRNAs and the immune response. *Trends Immunol.* 29, 343–351.
- Liu, G., and Abraham, E. (2013). MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 170–177.
- Liu, F., Li, Y., Jiang, R., Nie, C., Zeng, Z., Zhao, N., Huang, C., Shao, Q., Ding, C., Qing, C., et al. (2015). miR-132 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar macrophages by the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Exp. Lung Res.* 41, 261–269.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994). Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 8, 1055–1060.
- Long, H., Wang, X., Chen, Y., Wang, L., Zhao, M., and Lu, Q. (2018). Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets. *Cancer Lett.* 428, 90–103.
- Lu, J., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Yu, X., Wang, Y., Lee, V.W.S., Zheng, G., Tan, T.K., et al. (2013). Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int.* 84, 745–755.
- Lugo-Villarino, G., Cougoule, C., Meunier, E., Rombouts, Y., Vérollet, C., and Balboa, L. (2019). Editorial: The Mononuclear Phagocyte System in Infectious Disease. *Front. Immunol.* 10.
- Lurier, E.B., Dalton, D., Dampier, W., Raman, P., Nassiri, S., Ferraro, N.M., Rajagopalan, R., Sarmady, M., and Spiller, K.L. (2017). Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology* 222, 847–856.
- Ma, C., Li, Y., Li, M., Deng, G., Wu, X., Zeng, J., Hao, X., Wang, X., Liu, J., Cho, W.C.S., et al. (2014). microRNA-124 negatively regulates TLR signaling in alveolar macrophages in response to mycobacterial infection. *Mol. Immunol.* 62, 150–158.
- Ma, X., Becker Buscaglia, L.E., Barker, J.R., and Li, Y. (2011). MicroRNAs in NF- κ B signaling. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 159–166.

- MacDermott, R.P., Lichtenstein, G.R., Izutani, R., and Muraki, T. (1993). Anomalies du système immunitaire de la muqueuse au cours des maladies inflammatoires de l'intestin. *médecine/sciences* 9, 853.
- Maeda, S., Hsu, L.-C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., and Karin, M. (2005). Nod2 Mutation in Crohn's Disease Potentiates NF- κ B Activity and IL-1 β Processing. *Science* 307, 734–738.
- Majoros, W.H., Lekprasert, P., Mukherjee, N., Skalsky, R.L., Corcoran, D.L., Cullen, B.R., and Ohler, U. (2013). MicroRNA Target Site Identification by Integrating Sequence and Binding Information. *Nat. Methods* 10, 630–633.
- Majoska HM, B., Nicoline M, K., Gerrit, J., and Willem Evert, van S. (2018). Synovial Macrophages: Potential Key Modulators of Cartilage Damage, Osteophyte Formation and Pain in Knee Osteoarthritis. *J. Rheum. Dis. Treat.* 4.
- Malemud, C.J. (2018). The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 10, 117–127.
- Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 231–237.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* 13, 265–270.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004a). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Mantovani, A., Allavena, P., and Sica, A. (2004b). Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur. J. Cancer* 40, 1660–1667.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004c). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Mantovani, A., Savino, B., Locati, M., Zammataro, L., Allavena, P., and Bonecchi, R. (2010). The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 27–39.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013a). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229, 176–185.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013b). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229, 176–185.
- Maréchal, V., Prevost, M.-C., Petit, C., Perret, E., Heard, J.-M., and Schwartz, O. (2001). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis. *J. Virol.* 75, 11166–11177.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311.

- Marziniak, M., and Meuth, S. (2014). Current Perspectives on Interferon Beta-1b for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Adv. Ther.* *31*, 915–931.
- Mečnikov, I.I. (1845-1916) A. du texte (1901). *L'Immunité dans les maladies infectieuses / par Élie Metchnikoff*,...
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 135–145.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* *449*, 819–826.
- Medzhitov, R., Schneider, D.S., and Soares, M.P. (2012). Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science* *335*, 936–941.
- Mege, J.-L., and Capo, C. (2010). La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes ? *Médecine/Sciences* *26*, 83–88.
- Melendez, A.J., and Tay, H.K. (2008). Phagocytosis: a repertoire of receptors and Ca²⁺ as a key second messenger. *Biosci. Rep.* *28*, 287–298.
- Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell* *106*, 255–258.
- Mesquita Júnior, D., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., Souza, A.W.S. de, Cruvinel, W. de M., Andrade, L.E.C., and Silva, N.P. da (2010). Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev. Bras. Reumatol.* *50*, 552–580.
- Meyer, O. (2003). [Role of TNF-alpha and cytokines in the physiopathology of rheumatoid arthritis. Therapeutic perspectives]. *Bull. Acad. Natl. Med.* *187*, 935–954; discussion 954-955.
- Miller, C.H.T., Maher, S.G., and Young, H.A. (2009). Clinical Use of Interferon-γ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1182*, 69–79.
- Mitchell, S., Vargas, J., and Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFκB system. *WIREs Syst. Biol. Med.* *8*, 227–241.
- Mobley, J.L., Leininger, M., Madore, S., Baginski, T.J., and Renkiewicz, R. (2007). Genetic Evidence of a Functional Monocyte Dichotomy. *Inflammation* *30*, 189–197.
- Moreau-Gachelin, F. (1997). Le régulateur transcriptionnel Spi-1/PU.1 est un facteur déterminant de la différenciation des lymphocytes B et des macrophages. *Hématologie* *3*, 195–196.
- Moro-García, M.A., Mayo, J.C., Sainz, R.M., and Alonso-Arias, R. (2018). Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes. *Front. Immunol.* *9*.
- Morris, J.K., Chomyk, A., Song, P., Parker, N., Deckard, S., Trapp, B.D., Pimplikar, S.W., and Dutta, R. (2015). Decrease in levels of the evolutionarily conserved microRNA miR-124 affects oligodendrocyte numbers in Zebrafish, *Danio rerio*. *Invertebr. Neurosci.* *15*, 4.
- Mortaz, E., Alipoor, S.D., Adcock, I.M., Mumby, S., and Koenderman, L. (2018). Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front. Immunol.* *9*, 2171.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 209–212.

- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 331–341.
- Muñoz-Carrillo, J.L., Contreras-Cordero, J.F., Gutiérrez-Coronado, O., Villalobos-Gutiérrez, P.T., Ramos-Gracia, L.G., and Hernández-Reyes, V.E. (2018). Cytokine Profiling Plays a Crucial Role in Activating Immune System to Clear Infectious Pathogens. *Immune Response Act. Immunomodulation.*
- Muntasell, A., Costa-Garcia, M., Vera, A., Marina-Garcia, N., Kirschning, C.J., and López-Botet, M. (2013). Priming of NK cell anti-viral effector mechanisms by direct recognition of human cytomegalovirus. *Front. Immunol.* *4*, 40.
- Muroi, M., and Tanamoto, K. (2008). TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- κ B. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 702–707.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 723–737.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* *41*, 14–20.
- Natarajan, V., Lempicki, R.A., Sereti, I., Badralmaa, Y., Adelsberger, J.W., Metcalf, J.A., Prieto, D.A., Stevens, R., Baseler, M.W., Kovacs, J.A., et al. (2002). Increased peripheral expansion of naive CD4+ T cells in vivo after IL-2 treatment of patients with HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 10712–10717.
- Nathan, C. (1991). Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst. Mitt.* 200–207.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* *420*, 846–852.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 173–182.
- Nau, G.J., Richmond, J.F.L., Schlesinger, A., Jennings, E.G., Lander, E.S., and Young, R.A. (2002). Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 1503–1508.
- Netea, M.G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M.Y., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Golenbock, D., Gresnigt, M.S., Heneka, M.T., Hoffman, H.M., et al. (2017). A guiding map for inflammation. *Nat. Immunol.* *18*, 826–831.
- Neurath, M. (2017). Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 688.
- Nguyen-Chi, M., Laplace-Builhe, B., Travnickova, J., Luz-Crawford, P., Tejedor, G., Phan, Q.T., Duroux-Richard, I., Levraud, J.-P., Kissa, K., Lutfalla, G., et al. (2015). Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. *ELife* *4*.
- Niedergang, F., and Grinstein, S. (2018). How to build a phagosome: new concepts for an old process. *Curr. Opin. Cell Biol.* *50*, 57–63.
- Niederreiter, L., Adolph, T.E., and Kaser, A. (2013). Anti-IL-12/23 in Crohn's disease: bench and bedside. *Curr. Drug Targets* *14*, 1379–1384.

- Noack, M., and Kolopp-Sarda, M.-N. (2018). Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Rev. Francoph. Lab.* 2018, 28–37.
- Noack, M., and Miossec, P. (2017). Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.* 39, 365–383.
- Noreen, M., and Arshad, M. (2015). Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunol. Res.* 62.
- Novak, M.L., and Thorp, E.B. (2013). Shedding Light on Impaired Efferocytosis and Nonresolving Inflammation. *Circ. Res.* 113, 9–12.
- 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.
- O’Connell, R.M., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2012). microRNA Regulation of Inflammatory Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 295–312.
- Ofek, I., Goldhar, J., Keisari, Y., and Sharon, N. (1995). Nonopsonic Phagocytosis of Microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 239–276.
- O’Hayre, M., Salanga, C.L., Handel, T.M., and Allen, S.J. (2008). Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem. J.* 409, 635–649.
- Ojalvo, L.S., Whittaker, C.A., Condeelis, J.S., and Pollard, J.W. (2010). Gene Expression Analysis of Macrophages That Facilitate Tumor Invasion Supports a Role for Wnt-Signaling in Mediating Their Activity in Primary Mammary Tumors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 702–712.
- Olsen Saraiva Camara, N., Lepique, A.P., and Basso, A.S. (2012). Lymphocyte Differentiation and Effector Functions.
- O’Neill, L.A., Sheedy, F.J., and McCoy, C.E. (2011). MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 163–175.
- Onuffer, J.J., and Horuk, R. (2002). Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 459–467.
- Opal, S.M., and DePalo, V.A. (2000). Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest* 117, 1162–1172.
- Oppenheim, J.J. (2001). Cytokines: past, present, and future. *Int. J. Hematol.* 74, 3–8.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132, 631–644.
- O’Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098.
- Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* 28, 454–467.
- Owen, J.L., and Mohamadzadeh, M. (2013). Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Front. Physiol.* 4.

- Ozen, S., Aktay, N., Lainka, E., Duzova, A., Bakkaloglu, A., and Kallinich, T. (2009). Disease severity in children and adolescents with familial Mediterranean fever: a comparative study to explore environmental effects on a monogenic disease. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 246–248.
- Palomares, O., Martín-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2014). Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun.* *15*, 511–520.
- Pappu, R., Ramirez-Carrozzi, V., and Sambandam, A. (2011). The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology* *134*, 8–16.
- Park, B.S., and Lee, J.-O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* *45*, e66–e66.
- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*, 2527–2534.
- Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* *214*, 1913–1923.
- Pavelka, M., and Roth, J. (2010). Lymphocyte. In *Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology*, M. Pavelka, and J. Roth, eds. (Vienna: Springer), pp. 350–351.
- Perkins, N.D. (2012). The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 121–132.
- Piccioni, M., Chen, Z., Tsun, A., and Li, B. (2014). Regulatory T-Cell Differentiation and Their Function in Immune Regulation. In *T Helper Cell Differentiation and Their Function*, B. Sun, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 67–97.
- Pittet, M.J., Garris, C.S., Arlauckas, S.P., and Weissleder, R. (2018). Recording the wild lives of immune cells. *Sci. Immunol.* *3*, eaaq0491.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* *282*, 2085–2088.
- Ponomarev, E.D., Veremeyko, T., Barteneva, N., Krichevsky, A.M., and Weiner, H.L. (2011). MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nat. Med.* *17*, 64–70.
- Poon, I.K.H., Lucas, C.D., Rossi, A.G., and Ravichandran, K.S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 166–180.
- Poret, M., Tran, T., Villotte, M., and Nüsse, O. (2017). La myéloperoxydase : un fin stratège face à l'infection par un pathogène. *médecine/sciences* *33*, 741–743.
- Prieto-Peña, D., and Dasgupta, B. (2020). Biologic agents and small-molecule inhibitors in systemic autoimmune conditions: an update. *Pol. Arch. Intern. Med.*
- Proudfoot, A.E.I. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 106–115.

- Qin, Z., Wang, P.-Y., Su, D.-F., and Liu, X. (2016). miRNA-124 in Immune System and Immune Disorders. *Front. Immunol.* *7*.
- Qin, Z., Wang, P.-Y., Wan, J.-J., Zhang, Y., Wei, J., Sun, Y., and Liu, X. (2020). MicroRNA124-IL6R Mediates the Effect of Nicotine in Inflammatory Bowel Disease by Shifting Th1/Th2 Balance Toward Th1. *Front. Immunol.* *11*.
- Qiu, S., Feng, Y., LeSage, G., Zhang, Y., Stuart, C., He, L., Li, Y., Caudle, Y., Peng, Y., and Yin, D. (2015). Chronic Morphine-Induced MicroRNA-124 Promotes Microglial Immunosuppression by Modulating P65 and TRAF6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 1021–1030.
- Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* *5*, 85–87.
- Rea, I.M., Gibson, D.S., McGilligan, V., McNerlan, S.E., Alexander, H.D., and Ross, O.A. (2018). Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front. Immunol.* *9*.
- Réaux-Le Goazigo, A., and Parsadaniantz, S.M. (2009). La chimiokine CCL2 et son récepteur CCR2 : nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des douleurs chroniques ? *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* *10*, 192–201.
- Redlich, K., Hayer, S., Ricci, R., David, J.-P., Tohidast-Akrad, M., Kollias, G., Steiner, G., Smolen, J.S., Wagner, E.F., and Schett, G. (2002). Osteoclasts are essential for TNF- α -mediated joint destruction. *J. Clin. Invest.* *110*, 1419–1427.
- Rey-Giraud, F., Hafner, M., and Ries, C.H. (2012). In Vitro Generation of Monocyte-Derived Macrophages under Serum-Free Conditions Improves Their Tumor Promoting Functions. *PLoS ONE* *7*.
- Rhee, I. (2016). Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch. Pharm. Res.* *39*, 1588–1596.
- Rosales, C., and Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Res. Int.* *2017*.
- Rosol, 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.
- Rostène, W. (2010). [New prospects for chemokines]. *Biol. Aujourd'hui* *204*, 267–272.
- Röszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* *2015*.
- Roth, M. (2006). Roth, MG. Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*: 63-68. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 63–68.
- Rudick, R.A., and Goelz, S.E. (2011). Beta-interferon for multiple sclerosis. *Exp. Cell Res.* *317*, 1301–1311.
- Russell, D.G. (2011). Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol. Rev.* *240*, 252–268.

- Saederup, N., Cardona, A.E., Croft, K., Mizutani, M., Cotleur, A.C., Tsou, C.-L., Ransohoff, R.M., and Charo, I.F. (2010). Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* 5, e13693.
- Sahu, A., and Lambris, J.D. (2001). Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol. Rev.* 180, 35–48.
- Saint-Paul, L., Nguyen, C.-H., Bastie, J.-N., Delva, L., and Quéré, R. (2016). CD45, une protéine phosphatase cible importante dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques. *médecine/sciences* 32, 1051–1053.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.
- Samson, M., Aubry, F., and Parmentier, M. (1999). Que sont les chimiokines ? *médecine/sciences* 15, 966.
- Sany, J. (2006). Anticorps monoclonaux dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde : vers une révolution thérapeutique. *C. R. Biol.* 329, 228–240.
- Satoh, T., Kidoya, H., Naito, H., Yamamoto, M., Takemura, N., Nakagawa, K., Yoshioka, Y., Morii, E., Takakura, N., Takeuchi, O., et al. (2013). Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature* 495, 524–528.
- Schmid, E.M., and McMahon, H.T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* 448, 883–888.
- Schreiber, S., MacDermott, R.P., Raedler, A., Pinnau, R., Bertovich, M.J., and Nash, G.S. (1991). Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 101, 1020–1030.
- Scita, G., and Fiore, P.P.D. (2010). The endocytic matrix. *Nature* 463, 464–473.
- Segura, É., and Amigorena, S. (2014). Les cellules dendritiques inflammatoires. *médecine/sciences* 30, 64–68.
- Self-Fordham, J.B., Naqvi, A.R., Uttamani, J.R., Kulkarni, V., and Nares, S. (2017). MicroRNA: Dynamic Regulators of Macrophage Polarization and Plasticity. *Front. Immunol.* 8.
- Sereti, I., Martinez-Wilson, H., Metcalf, J.A., Baseler, M.W., Hallahan, C.W., Hahn, B., Hengel, R.L., Davey, R.T., Kovacs, J.A., and Lane, H.C. (2002). Long-term effects of intermittent interleukin 2 therapy in patients with HIV infection: characterization of a novel subset of CD4(+)/CD25(+) T cells. *Blood* 100, 2159–2167.
- Shadidi, K.R., Aarvak, T., Henriksen, J.E., Natvig, J.B., and Thompson, K.M. (2003). The chemokines CCL5, CCL2 and CXCL12 play significant roles in the migration of Th1 cells into rheumatoid synovial tissue. *Scand. J. Immunol.* 57, 192–198.
- Shantsila, E., Wrigley, B., Tapp, L., Apostolakis, S., Montoro-Garcia, S., Drayson, M.T., and Lip, G.Y.H. (2011). Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1056–1066.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.

- Shi, J., Hua, L., Harmer, D., Li, P., and Ren, G. (2018). Cre Driver Mice Targeting Macrophages. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1784, 263–275.
- Shinkai, K., McCalmont, T.H., and Leslie, K.S. (2008). Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clin. Exp. Dermatol.* 33, 1–9.
- Sica, A., and Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.* 117, 1155–1166.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.
- Sica, A., Saccani, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., Damme, J.V., and Mantovani, A. (2000). Autocrine Production of IL-10 Mediates Defective IL-12 Production and NF- κ B Activation in Tumor-Associated Macrophages. *J. Immunol.* 164, 762–767.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., Rimoldi, M., Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.* 18, 349–355.
- Sigaux, J., Semerano, L., Favre, G., Bessis, N., and Boissier, M.-C. (2018). Salt, inflammatory joint disease, and autoimmunity. *Joint Bone Spine* 85, 411–416.
- Singh, J.A., Wells, G.A., Christensen, R., Tanjong Ghogomu, E., Maxwell, L., Macdonald, J.K., Filippini, G., Skoetz, N., Francis, D., Lopes, L.C., et al. (2011). Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008794.
- Singh, R., Mishra, M.K., and Aggarwal, H. (2017). Inflammation, Immunity, and Cancer. *Mediators Inflamm.* 2017, 6027305.
- Siouti, E., and Andreakos, E. (2019). The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. *Biochem. Pharmacol.* 165, 152–169.
- Sironi, M., Martinez, F.O., D'Ambrosio, D., Gattorno, M., Polentarutti, N., Locati, M., Gregorio, A., Iellem, A., Cassatella, M.A., Van Damme, J., et al. (2006). Differential regulation of chemokine production by Fc γ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J. Leukoc. Biol.* 80, 342–349.
- Smerkova, K., Hudcova, K., Vlahova, V., Vaculovicova, M., Pekarik, V., Masarik, M., Adam, V., and Kizek, R. (2015). Label-free and amplification-free miR-124 detection in human cells. *Int. J. Oncol.* 46, 871–877.
- Sofen, H., Smith, S., Matheson, R.T., Leonardi, C.L., Calderon, C., Brodmerkel, C., Li, K., Campbell, K., Marciniak, S.J., Wasfi, Y., et al. (2014). Guselkumab (an IL-23-specific mAb) demonstrates clinical and molecular response in patients with moderate-to-severe psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1032–1040.
- Soucie, E.L., Weng, Z., Geirsdóttir, L., Molawi, K., Maurizio, J., Fenouil, R., Mossadegh-Keller, N., Gimenez, G., VanHille, L., Beniazza, M., et al. (2016). Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science* 351.
- Sprangers, S., Vries, T.J. de, and Everts, V. (2016). Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J. Immunol. Res.* 2016, 1–10.
- Stanley, E.R., Cifone, M., Heard, P.M., and Defendi, V. (1976). Factors regulating macrophage production and growth: identity of colony-stimulating factor and macrophage growth factor. *J. Exp. Med.* 143, 631–647.

- Stansfield, B.K., and Ingram, D.A. (2015). Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin. Transl. Med.* *4*.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* *176*, 287–292.
- Steinman, R.M. (2012). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 1–22.
- Stitham, J., Rodriguez-Velez, A., Zhang, X., Jeong, S.-J., and Razani, B. (2020). Inflammasomes: a preclinical assessment of targeting in atherosclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* *0*, 1–20.
- Stone, M.J., Hayward, J.A., Huang, C., E. Huma, Z., and Sanchez, J. (2017). Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Strober, W., Zhang, F., Kitani, A., Fuss, I., and Fichtner-Feigl, S. (2010). Pro-Inflammatory Cytokines Underlying the Inflammation of Crohn's Disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *26*, 310–317.
- Sun, Y., Li, Q., Gui, H., Xu, D.-P., Yang, Y.-L., Su, D.-F., and Liu, X. (2013). MicroRNA-124 mediates the cholinergic anti-inflammatory action through inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines. *Cell Res.* *23*, 1270–1283.
- Sun, Y., Liu, W.-Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., and Zhou, H.-F. (2015a). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J. Recept. Signal Transduct.* *35*, 600–604.
- Sun, Y., Luo, Z.-M., Guo, X.-M., Su, D.-F., and Liu, X. (2015b). An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Front. Cell. Neurosci.* *9*.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* *325*, 612–616.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., and Baltimore, D. (2006). 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.* *103*, 12481–12486.
- Tahamtan, A., Teymoori-Rad, M., Nakstad, B., and Salimi, V. (2018). Anti-Inflammatory MicroRNAs and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatment. *Front. Immunol.* *9*.
- Takeda, K. (2004). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* *17*, 1–14.
- Takeda, K., and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* *16*, 3–9.
- Takeda, K., and Akira, S. (2015). Toll-Like Receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* *109*, 14.12.1-14.12.10.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2011). Epigenetic control of macrophage polarization. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2490–2493.
- Tanaka, T. (2013). Introduction for inflammation and cancer. *Semin. Immunopathol.* *35*, 121–122.

- Tang, R., Li, L., Zhu, D., Hou, D., Cao, T., Gu, H., Zhang, J., Chen, J., Zhang, C.-Y., and Zen, K. (2012). Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell Res.* *22*, 504–515.
- Teillaud, J.-L., and Kroemer, G. (2014). Microenvironnements tumoraux : conflictuels et complémentaires. *médecine/sciences* *30*, 343–344.
- Teng, M.W.L., Bowman, E.P., McElwee, J.J., Smyth, M.J., Casanova, J.-L., Cooper, A.M., and Cua, D.J. (2015). IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* *21*, 719–729.
- Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G., and Labbaye, C. (2017). miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Non-Coding RNA* *3*.
- Thai, T.-H., Calado, D.P., Casola, S., Ansel, K.M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J.L., et al. (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* *316*, 604–608.
- Thomas Graham, Tacke Robert, Hedrick Catherine C., and Hanna Richard N. (2015). Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *35*, 1306–1316.
- THULIN, P., WEI, T., WERNGREN, O., CHEUNG, L., FISHER, R.M., GRANDÉR, D., CORCORAN, M., and EHRENBORG, E. (2013). MicroRNA-9 regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor δ in human monocytes during the inflammatory response. *Int. J. Mol. Med.* *31*, 1003–1010.
- Tserel, L., Runnel, T., Kisand, K., Pihlap, M., Bakhoff, L., Kolde, R., Peterson, H., Vilo, J., Peterson, P., and Rebane, A. (2011). MicroRNA Expression Profiles of Human Blood Monocyte-derived Dendritic Cells and Macrophages Reveal miR-511 as Putative Positive Regulator of Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* *286*, 26487–26495.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D.J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1843*, 2563–2582.
- Udalova, I.A., Mantovani, A., and Feldmann, M. (2016). Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 472–485.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* *318*, 1931–1934.
- Vautrin, A., Manchon, L., Garcel, A., Campos, N., Lapasset, L., Laaref, A.M., Bruno, R., Gislard, M., Dubois, E., Scherrer, D., et al. (2019). Both anti-inflammatory and antiviral properties of novel drug candidate ABX464 are mediated by modulation of RNA splicing. *Sci. Rep.* *9*.
- Veremeyko, T., Siddiqui, S., Sotnikov, I., Yung, A., and Ponomarev, E.D. (2013). IL-4/IL-13-Dependent and Independent Expression of miR-124 and Its Contribution to M2 Phenotype of Monocytic Cells in Normal Conditions and during Allergic Inflammation. *PLoS ONE* *8*.
- Vidal, S., Khush, R.S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., and Lemaitre, B. (2001). Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF- κ B-dependent innate immune responses. *Genes Dev.* *15*, 1900–1912.
- Viret, F., Gonçalves, A., Tarpin, C., Chabannon, C., and Viens, P. (2006). [G-CSF in oncology]. *Bull. Cancer (Paris)* *93*, 463–471.

- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 331, 44–49.
- Walzer, T., Tomkowiak, M., Arpin, C., and Marvel, J. (2000). Caractéristiques et fonctions des lymphocytes T CD8 mémoires. *Médecine Thérapeutique* 6, 258–263.
- Wang, J., and Kubes, P. (2016). A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell* 165, 668–678.
- Wang, Q., Ni, H., Lan, L., Wei, X., Xiang, R., and Wang, Y. (2010). Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Res.* 20, 701–712.
- Wang, S., Xia, P., Chen, Y., Qu, Y., Xiong, Z., Ye, B., Du, Y., Tian, Y., Yin, Z., Xu, Z., et al. (2017). Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell* 171, 201-216.e18.
- Watts, C. (1997). Capture and Processing of Exogenous Antigens for Presentation on Mhc Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 821–850.
- Way, K.J., Dinh, H., Keene, M.R., White, K.E., Clanchy, F.I.L., Lusby, P., Roiniotis, J., Cook, A.D., Cassady, A.I., Curtis, D.J., et al. (2009). The generation and properties of human macrophage populations from hemopoietic stem cells. *J. Leukoc. Biol.* 85, 766–778.
- Wei, Y., and Schober, A. (2016). MicroRNA regulation of macrophages in human pathologies. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3473–3495.
- Wei, J., Wang, F., Kong, L.-Y., Xu, S., Doucette, T., Ferguson, S.D., Yang, Y., McEnery, K., Jethwa, K., Gjyshi, O., et al. (2013). miR-124 inhibits STAT3 signaling to enhance T cell-mediated immune clearance of glioma. *Cancer Res.* 73, 3913–3926.
- Weinblatt, M.E., Kremer, J.M., Bankhurst, A.D., Bulpitt, K.J., Fleischmann, R.M., Fox, R.I., Jackson, C.G., Lange, M., and Burge, D.J. (1999). A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N. Engl. J. Med.* 340, 253–259.
- Welch, D.R., Schissel, D.J., Howrey, R.P., and Aeed, P.A. (1989). Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to “normal” circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5859–5863.
- Williams, A.E., Perry, M.M., Moschos, S.A., Larner-Svensson, H.M., and Lindsay, M.A. (2008). Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1211–1215.
- Wilson, N.S., and Villadangos, J.A. (2005). Regulation of Antigen Presentation and Cross-Presentation in the Dendritic Cell Network: Facts, Hypothesis, and Immunological Implications. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 241–305.
- Witowski, J., Pawlaczyk, K., Breborowicz, A., Scheuren, A., Kuzlan-Pawlaczyk, M., Wisniewska, J., Polubinska, A., Friess, H., Gahl, G.M., Frei, U., et al. (2000). IL-17 Stimulates Intraperitoneal Neutrophil Infiltration Through the Release of GRO α Chemokine from Mesothelial Cells. *J. Immunol.* 165, 5814–5821.
- Wong, K., Yeap, W., Tai, J., Ong, S.-M., Dang, M., and Wong, S.-C. (2012). The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57.
- Wright et al (1989). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 170, 1231–1241.

- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* 496, 445–455.
- Xia, Y., Shen, S., and Verma, I.M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* 2, 823–830.
- Xue, J., Schmidt, S.V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T.D., Emde, M., Schmidleithner, L., et al. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* 40, 274–288.
- Yan, W.-L., Shen, K.-Y., Tien, C.-Y., Chen, Y.-A., and Liu, S.-J. (2017). Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 9, 347–360.
- Yang, Y., and Wang, J.-K. (2016). The functional analysis of MicroRNAs involved in NF- κ B signaling. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 1764–1774.
- Yang, B., Ge, Y., Zhou, Y., Wang, J., Xie, X., Li, S., Tang, M., Xu, L., and Tian, J. (2019). miR-124a inhibits the proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via targeting PIK3/NF- κ B pathway. *Cell Biochem. Funct.* 37, 208–215.
- 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.
- Yavarpour-Bali, H., and Ghasemi-Kasman, M. (2020). The role of inflammasomes in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 1352458520932776.
- Yesudhas, D., Gosu, V., Anwar, M.A., and Choi, S. (2014). Multiple Roles of Toll-Like Receptor 4 in Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* 5.
- Yeung, Y.T., Aziz, F., Guerrero-Castilla, A., and Arguelles, S. (2018). Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. *Curr. Pharm. Des.* 24, 1449–1484.
- Ying, H., Kang, Y., Zhang, H., Zhao, D., Xia, J., Lu, Z., Wang, H., Xu, F., and Shi, L. (2015). MiR-127 Modulates Macrophage Polarization and Promotes Lung Inflammation and Injury by Activating the JNK Pathway. *J. Immunol.* 194, 1239–1251.
- Yue, B., Yu, Z.-L., Lv, C., Geng, X.-L., Wang, Z.-T., and Dou, W. (2020). Regulation of the intestinal microbiota: An emerging therapeutic strategy for inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 26, 4378–4393.
- Zajac, E., Schweighofer, B., Kupriyanova, T.A., Juncker-Jensen, A., Minder, P., Quigley, J.P., and Deryugina, E.I. (2013). Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9. *Blood* 122, 4054–4067.
- Zawada, A.M., Zhang, L., Emrich, I.E., Rogacev, K.S., Krezdorn, N., Rotter, B., Fliser, D., Devaux, Y., Ziegler-Heitbrock, L., and Heine, G.H. (2017). MicroRNA profiling of human intermediate monocytes. *Immunobiology* 222, 587–596.
- Zawrotniak, M., and Rapala-Kozik, M. (2013a). Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim. Pol.* 60.
- Zawrotniak, M., and Rapala-Kozik, M. (2013b). Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim. Pol.* 60.

- Zhang, R., Tian, A., Wang, J., Shen, X., Qi, G., and Tang, Y. (2015a). miR26a Modulates Th17/Treg Balance in the EAE Model of Multiple Sclerosis by Targeting IL6. *NeuroMolecular Med.* *17*, 24–34.
- Zhang, W., Liu, H., Liu, W., Liu, Y., and Xu, J. (2015b). Polycomb-mediated loss of microRNA let-7c determines inflammatory macrophage polarization via PAK1-dependent NF- κ B pathway. *Cell Death Differ.* *22*, 287–297.
- Zhao, Y., Ma, T., Chen, W., Chen, Y., Li, M., Ren, L., Chen, J., Cao, R., Feng, Y., Zhang, H., et al. (2016). MicroRNA-124 Promotes Intestinal Inflammation by Targeting Aryl Hydrocarbon Receptor in Crohn's Disease. *J. Crohns Colitis* *10*, 703–712.
- Zheng, C.-Z., Shu, Y.-B., Luo, Y.-L., and Luo, J. (2017). The role of miR-146a in modulating TRAF6-induced inflammation during lupus nephritis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* *21*, 1041–1048.
- Zhou, Q., Long, L., Shi, G., Zhang, J., Wu, T., and Zhou, B. (2013). Research of the Methylation Status of miR-124a Gene Promoter among Rheumatoid Arthritis Patients. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*.
- Zhou, X., Jeker, L.T., Fife, B.T., Zhu, S., Anderson, M.S., McManus, M.T., and Bluestone, J.A. (2008). Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J. Exp. Med.* *205*, 1983–1991.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 584–592.
- Ziegler-Heitbrock, L., and Hofer, T.P.J. (2013). Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets. *Front. Immunol.* *4*.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74–e80.
- Zimmerman, D.H., Steiner, H., Carmabula, R., Talor, E., and Rosenthal, K.S. (2012). LEAPS therapeutic vaccines as antigen specific suppressors of inflammation in infectious and autoimmune diseases. *J. Vaccines Vaccin.* *3*.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity* *36*, 705–716.

Annexes

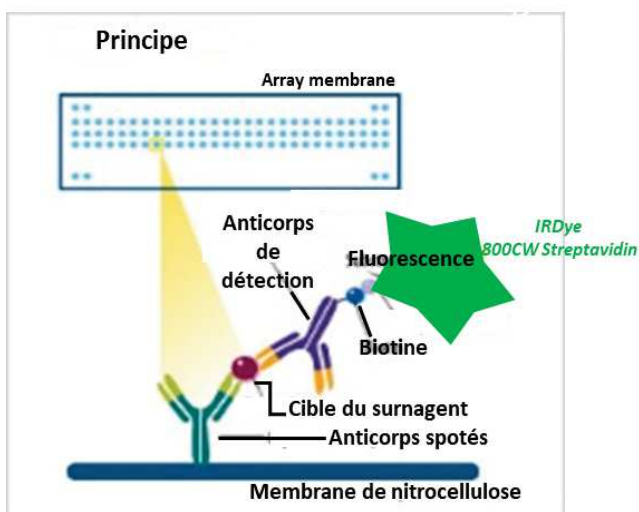
ANNEXE I

Proteome Profiler™ Array

Human Cytokine Array

Catalog Number ARY005B

For the parallel determination of the relative levels of selected human cytokines and chemokines.



Proteome Profiler™ Array

Human Cytokine Array R&D

Catalog Number ARY005B

Expression de 36 Hu cytokines (en duplicate)

INTRODUCTION

Cytokines and chemokines are extracellular signaling molecules that mediate cell-cell communication. They are released from cells and have critical roles in many biological processes such as cellular growth, differentiation, gene expression, migration, immunity and inflammation. In most biological processes, multiple cytokines operate in a large network, where the action of one cytokine is regulated by the presence or absence of other cytokines. The Human Cytokine Array Kit is a rapid, sensitive, and economic tool to simultaneously detect cytokine differences between samples. The relative expression levels of 36 human cytokines can be determined without performing numerous immunoassays.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Carefully selected capture antibodies have been spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. Cell culture supernates, cell lysates, serum, plasma, saliva, urine, and human milk samples are diluted and mixed with a cocktail of biotinylated detection antibodies. The sample/antibody mixture is then incubated with the Human Cytokine Array membrane. Any cytokine/detection antibody complex present is bound by its cognate immobilized capture antibody on the membrane. Following a wash to remove unbound material, Streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents are added sequentially. Light is produced at each spot in proportion to the amount of cytokine bound. Refer to the Appendix for a list and coordinates of analytes and controls.

TECHNICAL HINTS

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- This kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- **Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources. Substitution of some high intensity chemiluminescent reagents for Chemi Reagents 1 and 2 may cause either increased background or diminished signal, depending on the reagent.**
- Any variation in sample handling, buffers, operator, pipetting technique, washing technique, and incubation time or temperature can alter the performance of the kit.
- The Human Cytokine Array membranes are validated for single use only.
- Always use gloved hands and flat-tipped tweezers to handle the membranes.
- Pick up the membranes from the edge on the side with the identification number avoiding the area with the printed antibodies.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Individual arrays should be washed in separate containers to minimize background. Wash Buffer should be removed completely from the membrane before proceeding to the next step.
- Do not allow the membrane to dry out. This will cause high background.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers.
- Soluble receptors and other proteins present in biological samples do not necessarily interfere with the measurement of cytokines in samples. Until these proteins have been tested with the Human Cytokine Array, the possibility of interference cannot be excluded.
- For a procedure demonstration video, please visit: www.RnDSystems.com/ProteomeProfilerVideo.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human Cytokine Array	898260	4 nitrocellulose membranes each containing 36 different capture antibodies printed in duplicate.	Return unused membranes to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of the zip-seal. May be stored for up to 3 months at 2-8 °C.*
Array Buffer 4	895022	21 mL of a buffered protein base with preservatives. <i>May contain a precipitate. Mix well before and during use.</i>	May be stored for up to 3 months at 2-8 °C.*
Array Buffer 5	895876	21 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Wash Buffer Concentrate	895003	2 vials (21 mL/vial) of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Detection Antibody Cocktail, Human Cytokine Array	898261	1 vial of biotinylated antibody cocktail; lyophilized.	
Streptavidin-HRP	893019	200 µL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase.	
Chemi Reagent 1	894287	2.5 mL of stabilized hydrogen peroxide with preservative.	
Chemi Reagent 2	894288	2.5 mL of stabilized luminol with preservative.	
4-Well Multi-dish	607544	Clear 4-well rectangular multi-dish.	
Transparency Overlay Template	607940	1 transparency overlay template for coordinate reference.	Store at room temperature.

* Provided this is within the expiration date of the kit.

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Since the Human Cytokine Array Kit detects relative expression levels of individual analytes, it is important to include appropriate control samples.

Note: Sample amount may be empirically adjusted to attain optimal sensitivity with minimal background. Suggested starting ranges are 200-700 μL for cell culture supernates, 100-300 μg for cell and tissue lysates, and 50-200 μL for serum, plasma, saliva, urine, and human milk samples.

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation. Assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Cell Lysates - Rinse cells with PBS, making sure to remove any remaining PBS before adding lysis buffer. Solubilize cells at 1×10^7 cells/mL in lysis buffer. Pipette up and down to resuspend and rock the lysates gently at 2-8 $^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes. Microcentrifuge at 14,000 x g for 5 minutes, and transfer the supernate into a clean test tube. Quantitation of sample protein concentrations using a total protein assay is recommended. Assay immediately or aliquot and store at $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Thawed lysates should be kept on ice prior to use. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Tissue Lysates - Excise tissue and place in Tissue Lysis buffer (0.5% Igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 150 mM NaCl) with Protease Inhibitor Cocktail. Homogenize tissue and centrifuge at 1000 x g for 10 minutes at 2-8 $^{\circ}\text{C}$ to remove cellular debris. Transfer supernate to a new tube. Quantitation of sample protein concentration using a total protein assay is recommended. Assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Allow blood samples to clot for 30 minutes at room temperature before centrifuging for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at approximately 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Saliva - Collect saliva in a tube and centrifuge for 5 minutes at 10,000 x g. Collect the aqueous layer, and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freezethaw cycles.

Urine - Collect urine and centrifuge to remove particulate matter. Assay immediately or aliquot and store at $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Human Milk - Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g at 2-8 $^{\circ}\text{C}$. Collect the aqueous fraction and repeat this process a total of 3 times. Assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

Human Cytokine Array - Four nitrocellulose membranes each containing 36 different anticytokine antibodies printed in duplicate. **Handle arrays only with gloved hands and flattipped tweezers.**

Detection Antibody Cocktail - One vial of lyophilized biotinylated antibodies. Before use, reconstitute Detection Antibody Cocktail in 100 μL of deionized or distilled water.

1X Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm the bottles to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 40 mL of 25X Wash Buffer Concentrate to 960 mL of deionized or distilled water to prepare 1000 mL of 1X Wash Buffer.

Chemi Reagent Mix - Chemi Reagent 1 and 2 should be mixed in equal volumes within 15 minutes of use. **Protect from light. 1 mL of the resultant mixture is required per membrane.** Discard any remaining after use.

ARRAY PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature before use. Keep samples on ice. To avoid contamination, wear gloves while performing the procedures.

1. Prepare all reagents and samples as directed in the previous sections.
2. Pipette 2.0 mL of Array Buffer 4 into each well of the 4-Well Multi-dish to be used. Array Buffer 4 serves as a block buffer.
3. Using flat-tip tweezers, remove each membrane to be used from between the protective sheets and place in a well of the 4-Well Multi-dish. The array number should be facing upward.

Note: *Upon contact with Array Buffer 4, the blue dye from the spots will disappear, but the capture antibodies are retained in their specific locations.*

4. Incubate for one hour on a rocking platform shaker. Orient the tray so that each array rocks end to end in its well.
5. While the membranes are blocking, prepare samples by adding up to 1 mL of each sample to 0.5 mL of Array Buffer 4 in separate tubes. Adjust to a final volume of 1.5 mL with Array Buffer 5 as necessary.
6. Add 15 μ L of reconstituted Human Cytokine Array Detection Antibody Cocktail to each prepared sample. Mix and incubate at room temperature for one hour.
7. Aspirate Array Buffer 4 from the wells of the 4-Well Multi-dish and add sample/antibody mixtures prepared in steps 5 and 6. Place the lid on the 4-Well Multi-dish.
8. Incubate overnight at 2-8 °C on a rocking platform.

Note: *A shorter incubation time may be used if optimal sensitivity is not required.*

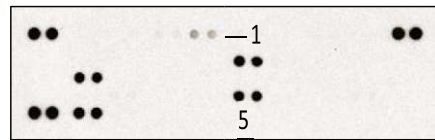
9. Carefully remove each membrane and place into individual plastic containers with 20 mL of 1X Wash Buffer. Rinse the 4-Well Multi-dish with deionized or distilled water and dry thoroughly.
10. Wash each membrane with 1X Wash Buffer for 10 minutes on a rocking platform shaker. Repeat two times for a total of three washes.
11. Dilute the Streptavidin-HRP in Array Buffer 5 using the dilution factor on the vial label. Pipette 2.0 mL of diluted Streptavidin-HRP into each well of the 4-Well Multi-dish.

12. ANNEXE II

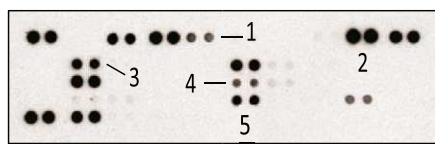
PROFILING PROTEINS IN CELL CULTURE SUPERNATES

The Human Cytokine Array detects multiple cytokines, chemokines, growth factors and other soluble proteins in cell culture supernates

2B



Untreated



IFN- γ , LPS Treated

THP-1 Untreated vs. IFN- γ , LPS Treated

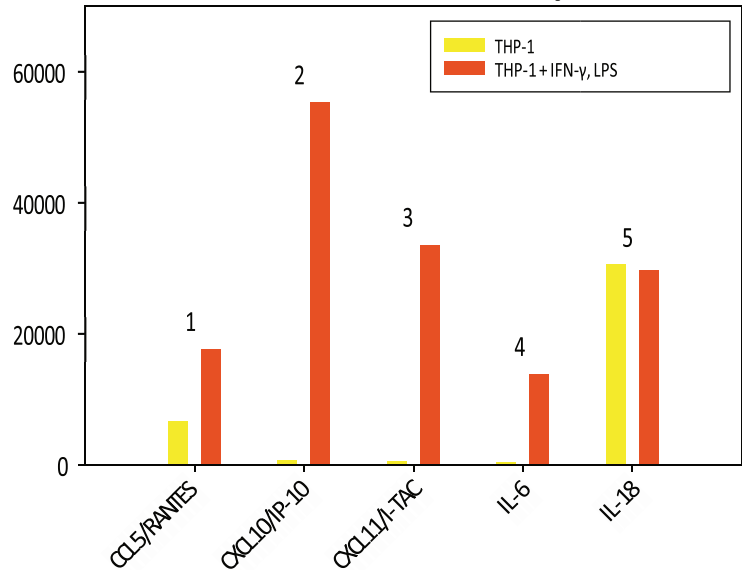


Figure 2B: THP-1 human acute monocytic leukemia cells were untreated or treated with 1 μ g/mL recombinant human IFN- γ (R&D Systems, Catalog # 285-IF) for 8 hours, then 1 μ g/mL LPS for 16 hours (200 μ g of cell lysate, 5 minute exposure).

APPENDIX

Refer to the table below for the Human Cytokine Array coordinates.

Coordinate	Target/Control	Entrez Gene ID	Alternate Nomenclature
A1, A2	Reference Spots	N/A	_____
A3, A4	CCL1/I-309	6346	P500, SCYA1, SCYA2, TCA-3
A5, A6	CCL2/MCP-1	6347	MCAF
A7, A8	MIP-1 α /MIP-1 β	6348/6351	CCL3/CCL4
A9, A10	CCL5/RANTES	6352	_____
A11, A12	CD40 Ligand/TNFSF5	959	CD154, CD40LG, gp39, TRAP
A13, A14	Complement Component C5/C5a	727	C5/C5a
A15, A16	CXCL1/GRO α	2919	CINC-1, KC
A17, A18	CXCL10/IP-10	3627	CRG-2
A19, A20	Reference Spots	N/A	_____

B3, B4	CXCL11/I-TAC	6373	β -R1, H174
B5, B6	CXCL12/SDF-1	6387	PBSF
B7, B8	G-CSF	1440	CSF β , CSF-3
B9, B10	GM-CSF	1437	CSF α , CSF-2
B11, B12	ICAM-1/CD54	3383	_____
B13, B14	IFN- γ	3458	Type II IFN
B15, B16	IL-1 α /IL-1F1	3552	_____
B17, B18	IL-1 β /IL-1F2	3553	_____
C3, C4	IL-1ra/IL-1F3	3557	_____
C5, C6	IL-2	3558	TCGF
C7, C8	IL-4	3565	BCDF, BSF1
C9, C10	IL-5	3567	_____
C11, C12	IL-6	3569	BSF-2
C13, C14	IL-8	3576	CXCL8, GCP1, NAP1
C15, C16	IL-10	3586	CSIF
C17, C18	IL-12 p70	3592/3593	CLMF p35

continued on next page...

APPENDIX CONTINUED

Coordinate	Target/Control	Entrez Gene ID	Alternate Nomenclature
D3, D4	IL-13	3596	_____
D5, D6	IL-16	3603	LCF
D7, D8	IL-17A	3605	CTLA-8
D9, D10	IL-17E	64806	IL-25
D11, D12	IL-18/IL-1F4	3606	IGIF
D13, D14	IL-21	59067	_____
D15, D16	IL-27	246778	IL-27 A
D17, D18	IL-32 α	9235	
E1, E2	Reference Spots	N/A	_____
E3, E4	MIF	4282	GIF, DER6
E5, E6	Serpin E1/PAI-1	5054	Nexin, PLANH1
E7, E8	TNF- α	7124	TNFSF1A
E9, E10	TREM-1	54210	CD354
E19, E20	Negative Control	N/A	_____

ANNEXE II

Use of Proteome Profiler Arrays with LI-COR Detection

R&D Systems' Proteome Profiler arrays are rapid, sensitive, and economical multiplex arrays for the simultaneous detection of many proteins in a single sample. Originally developed for chemiluminescent detection, many Proteome Profiler arrays are amenable to near-infrared (NIR) fluorescence detection using the LI-COR Odyssey® Infrared Imaging System. To achieve this adaptation, **the HRP-conjugated Streptavidin provided in the kit is simply replaced with IRDye® 800CW Streptavidin**, and the arrays are scanned using a LI-COR Odyssey Infrared Imaging System. (This protocol is not applicable to Proteome Profiler arrays that use an HRP-conjugated detection antibody instead of Streptavidin-HRP.).

An advantage of NIR detection is that protein expression can be measured over a much wider linear dynamic range compared to that allowed by chemiluminescence methods. This approach facilitates accurate analysis of weak and strong spots on the same membrane without the uncertainty and inconvenience of multiple exposures. In addition, NIR does not require film, chemicals for development, or the use of a dark room.

Collect and store samples based on the directions in the product insert (kit booklet).

Refer to the kit booklet for reagents provided and other reagents needed.

Bring all reagents to room temperature before use and prepare reagents according to the directions in the kit booklet.

Pipette array buffer into the dish as directed in the kit booklet.

Using flat-tip tweezers, remove each membrane to be used from between the protective sheets. **IMPORTANT: CAREFULLY CUT OFF THE STAMPED IDENTIFICATION NUMBER ON THE MEMBRANE USING SCISSORS.** The dye used for the numbers on the membranes will fluoresce and interfere with LI-COR detection. If desired, the membranes may instead be labeled with pencil in the empty space to the right side of the array. Pick up the membrane from this edge during all processing steps.

Continue to follow the directions in the kit booklet, completing the incubation(s) and steps to wash the membranes, and stop when reaching the steps to prepare and use Streptavidin-HRP. Streptavidin-HRP will not be used in this protocol.

Dilute the IRDye 800CW Streptavidin (LI-COR, Catalog #926-32230) 1:2000 using the array buffer specified in the kit booklet for Streptavidin-HRP dilution.

Refer to the volume of diluted Streptavidin-HRP the kit booklet specifies to be added to the 4-well dish. Instead, pipette this volume of diluted IRDye 800CW Streptavidin into each well of the dish.

Carefully remove each membrane from its wash container. Allow excess buffer to drain from the membrane by blotting the lower edge onto absorbent paper. Return the membrane to the 4-well dish containing the diluted IRDye 800CW Streptavidin. Cover the wells with the lid.

Incubate the membranes for 30 minutes at room temperature on a rocking platform.

Wash each array as described previously in the kit booklet.

Carefully remove each membrane from the wash container. Allow excess wash buffer to drain from the membrane by blotting the lower edge onto absorbent paper. Collect images with an Odyssey Imager.

Data Analysis

The positive signals seen on developed film can be quickly identified by placing the transparency overlay on the array image and aligning it with the three pairs of positive control spots in the corners of each array. The location of controls and capture antibodies is listed in the Appendix of each kit booklet.

Suggested starting Odyssey scan parameters:

Resolution: 84 μm
Quality: Medium
Focus offset: 0.0 mm
Intensity: 5, adjust as necessary.

Collected images may be manipulated using Adjust Image Curve and Alter Image Display Odyssey settings.

Technical Hints & Limitations

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

This kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.

Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.

Any variation in buffers, operator, pipetting technique, washing technique, and incubation time or temperature can alter the performance of the kit.

The membranes are validated for single use only.

Always use gloved hands and flat-tipped tweezers to handle the membranes.

A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance.

Wash buffer should be removed completely from the membrane before proceeding to the next step.

Avoid microbial contamination of reagents and buffers.

Soluble receptors and other proteins present in biological samples do not necessarily interfere with the measurement of proteins in samples. However, until these proteins have been tested with the Proteome Profiler Array, the possibility of interference cannot be excluded.

Stamped identification number on membranes must be removed carefully with scissors prior to block step.

Membrane may be labeled with pencil in the empty space to the right side of the array. Pick up the membrane from this edge during all processing steps.

Do not allow the membranes to dry out during any step of the protocol. Membranes should be scanned wet and bubbles should be carefully removed when placing membranes on the Odyssey scanning bed.

ANNEXE III

1.1 RNA EXTRACTION

RNA extractions is performed using miRNeasy Kit (QIAGEN) following manufacturer protocol. Briefly, sample are disrupted in 700 µl QIAzol® Lysis Reagent in a 2 ml SafeLock microcentrifuge tube containing one 5mm stainless bead. Samples are disrupted and homogenized using Qiagen TissueLyzer apparatus during 2 x 2 minutes at 20 Hz. Incubate homogenate on the benchtop at room temperature (15-25°C) for 5 min. Add 140 µl chloroform to the homogenate and securely cap the tube. Shake the tube vigorously for 15 s and place it back onto the benchtop for another 2-3 min. Centrifuge lysate at 12,000 x g for 15 min at 4°C in a microcentrifuge. Carefully transfer upper, aqueous phase (approximately 350 µl) to a clean 2 ml microcentrifuge.

The rest of the procedure is performed following manufacturer protocol. At the end of the procedure, each miRNA are extracted and eluted into 50µl of Buffer on robotic workstation (QIAcub – QIAGEN), according the preinstalled protocol to optimize reproducibility and standardization of miRNA extraction. A 3 µl aliquot is pipetted into a new microcentrifuge tube for quality validation and all tubes were stored ultra-low freezer immediately.

1.2 QUALITY CONTROLS VALIDATION

RNA concentration and purity was measured using spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Minimum RNA quantities: for each RNA sample, a minimum of 100 ng is required.

RNA Integrity was assessed using Agilent 2200 TapeStation with RNA ScreenTapes. RINe (RNA Integrity Number equivalent) score varies between 0 and 10. In literature, the commonly accepted RINe score is > 6.

1.3 REVERSE TRANSCRIPTION

cDNA templates are prepared using TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) starting from 10 ng total RNA matrix according to the manufacturer protocol. Briefly, The TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit uses 3' poly-A tailing and 5' ligation of an adaptor sequence to extend the mature miRNAs present in the sample on each end prior to reverse transcription. Universal RT primers recognize the universal sequences present on both the 5' and 3' extended ends of the mature miRNAs. All mature miRNAs in the sample are reverse transcribed to cDNA. cDNA templates are then 1:10 diluted in 1X TE prior to Real-Time PCR experiments.

1.4 MIR-AMP REACTION

To improve detection of low-expressing miR124 targets, cDNA are amplified using the Universal miR-Amp Primers and miR-Amp Master Mix (Applied Biosystems, according to the manufacturer protocol) to uniformly increase the amount of cDNA for each target, maintaining the relative differential expression levels. Unlike traditional preamplification, the Universal miR-Amp Primers recognize the universal sequences added to all mature miRNAs on the 5' and 3' ends, ensuring that there is no amplification bias.

miR-Amplified cDNA templates are 1:10 diluted in 1X TE prior to Real-Time PCR experiments.

1.5 REAL-TIME PCR

Real-Time PCR is carried out using a TaqMan Advanced miRNA Assays (applied Biosystems, according to the manufacturer protocol, targeting miR124 miRNA (Assay id: 477879_mir). Assay is labelled with FAM-MGB chemistry.

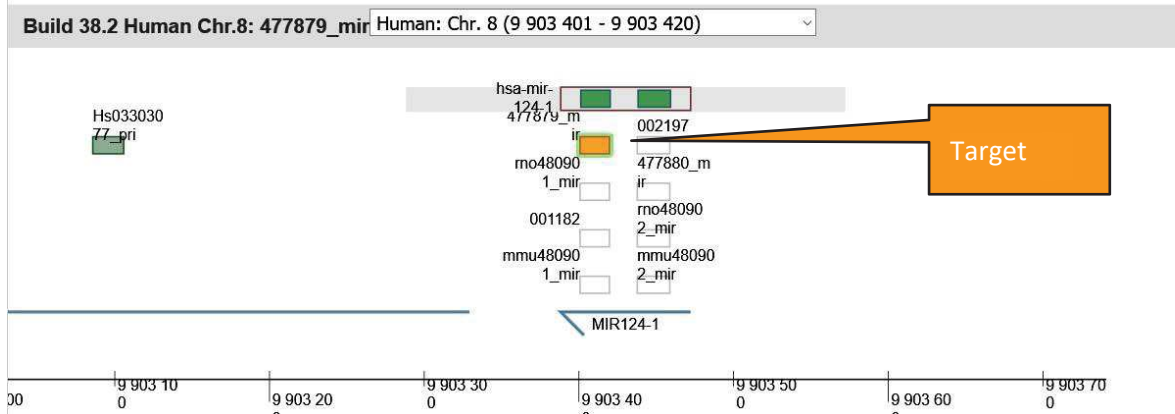
All Real-Time PCR are carried out using 384-well plates in 3 technical replicates in 10µl final reaction volume using TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X), specific TaqMan Advanced miRNA Assay (20X), 2.5µl of each 1:10 diluted cDNA and PCR grade water q.s.p. 10µl.

Details of targeted sequence

Specificity testing was performed using human anti-targets.

Assay Name:	hsa-miR-124-3p
Stem-loop Accession Number:	MI0000443
miRBase Version:	v21
Chromosome Location:	Chr.8: 9903388 - 9903472 [-] on Build GRCh38
Mature miRNA Sequence:	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
Species:	Human, Mouse, Rat, Caenorhabditis remanei, Goat, Horse, Ictalurus punctatus, Pongo pygmaeus, Pristionchus pacificus
Product Type:	TaqMan™ Advanced miRNA Assay

Genomic Map



Stem-loop Details

Human ▲

Stem-loop ID	hsa-mir-124-1
Stem-loop Accession #	MI0000443
Stem-loop Sequence	AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCG GUGAAUGCCAAGAAUGGGGCGUG
Chromosome Location	Chr. 8 - 9903388 - 9903472 [-] on Build GRCh38
Mature MicroRNA	miRBase Accession #: MIMAT0000422 miRBase ID: hsa-miR-124-3p Mature miRNA Sequence: UAAGGCACGCGUGAAUGCC Chromosome Location: Chr. 20 - 63178500 - 63178586 [+] on Build GRCh38

1.5.2 MIR16 GENE

Real-Time PCR is carried out using A TaqMan Advanced miRNA Assay (applied Biosystems, according to the manufacturer protocol), The assay targets the endogenous miR16 (Assay id: 477860_mir) in order to be used as reference for expression data normalization.

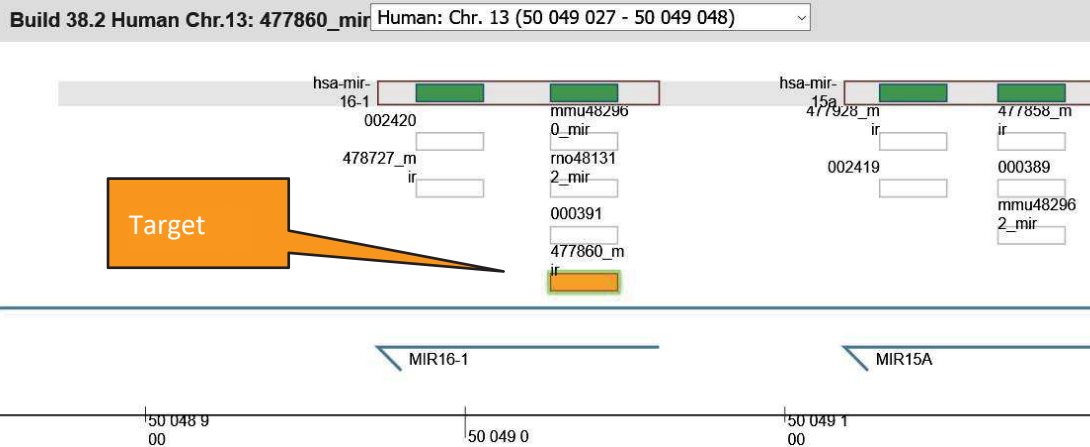
All Real-Time PCR are carried out using 384-well plates in 3 technical replicates in 10µl final reaction volume using TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X), specific TaqMan Advanced miRNA Assay (20X), 2.5µl of each 1:10 diluted cDNA and PCR grade water q.s.p. 10µl.

Details of targeted sequence

Specificity testing was performed using human anti-targets.

Assay Name: hsa-miR-16-5p
Stem-loop Accession Number: MI0000070
miRBase Version: v21
Chromosome Location: Chr.13: 50048973 - 50049061 [-] on Build GRCh38
Mature miRNA Sequence: UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
Species: Human, Mouse, Rat, Ateles geoffroyi, Cricetulus griseus, Dog, Gorilla gorilla, Horse, Lagothrix lagotricha, Macaca nemestrina, Monodelphis domestica, Ornithorhynchus anatinus, Pan paniscus, Pan troglodytes, Pig, Rhesus monkey, Saguinus labiatus, Salmo salar
Product Type: TaqMan™ Advanced miRNA Assay

Genomic Map



Stem-loop Details

Human ▲

Stem-loop ID	hsa-mir-16-1
Stem-loop Accession #	MI0000070
Stem-loop Sequence	GUCAGCAGUGCCUUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUUAAGAUUCUAAAAUAUCUCCAGUAUUA ACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC
Chromosome Location	Chr. 13 - 50048973 - 50049061 [-] on Build GRCh38
Mature MicroRNA	miRBase Accession #: MIMAT0000069 miRBase ID: hsa-miR-16-5p Mature miRNA Sequence: UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG Chromosome Location: Chr. 13 - 50048973 - 50049061 [-] on Build GRCh38

1.6 REAL-TIME PCR PROGRAM

Real-Time PCR cycling consists in 20 seconds at 95°C for Enzyme activation, followed by 45 cycles of 3 seconds for denaturation and 30 seconds for annealing and extension with fluorescence measurement.

Real6Time PCR are performed on LightCycler 480 (Roche) platform.

Before analysis, Operator have to applied standard procedures of ROCHE Diagnostics to control the Real-Time PCR apparatus:

- The Xenon lamp control before each analysis,
- Validation of the LC480 platform using Accreditation Services of ROCHE or using LightCycler 480 Control Kit (Roche, Cat. No. 04 710 924 001).

ANNEXE IV

Proteome Profiler™ Array

Human NFκB Pathway Array Kit

Catalog Number ARY029

For the parallel determination of the relative levels of selected NFκB Pathway proteins.

INTRODUCTION

The NFκB signaling pathway plays a central role in many physiological and pathological processes. Dysregulation of NFκB activity is associated with inflammatory disorders, autoimmune and metabolic diseases, as well as cancer. Profiling NFκB signaling pathway proteins may help to better understand their underlying mechanisms. The Human NFκB Pathway Array is a rapid, sensitive, and economical tool to simultaneously detect the relative levels of 41 proteins and 4 serine or tyrosine phosphorylation sites involved in NFκB signal transduction without performing numerous immunoprecipitations and Western blots. Each capture antibody was carefully selected using cell lysates prepared from cell lines known to express the target protein.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Capture and control antibodies have been spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. Cell lysates are diluted and incubated overnight with the Human NFκB Pathway Array. The array is washed to remove unbound proteins, followed by incubation with a cocktail of biotinylated detection antibodies. Streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents are applied, and a signal is produced at each capture spot corresponding to the amount of protein bound. Refer to the Appendix for a list and coordinates of analytes and controls.

TECHNICAL HINTS

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- This kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- **Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources. Substitution of some high intensity chemiluminescent reagents for Chemi Reagents 1 and 2 may cause either increased background or diminished signal, depending on the reagent.**
- Any variation in sample handling, buffers, operator, pipetting technique, washing technique, and incubation time or temperature can alter the performance of the kit.
- The Human NFκB Pathway Array membranes are validated for single use only.
- Always use gloved hands and flat-tipped tweezers to handle the membranes.
- Pick up the membranes from the edge on the side with the identification number avoiding the area with the printed antibodies.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Individual arrays should be washed in separate containers to minimize background. Wash Buffer should be removed completely from the membrane before proceeding to the next step.
- Do not allow the membrane to dry out. This will cause high background.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers.
- Other proteins present in biological samples do not necessarily interfere with the measurement of analytes in samples. Until these proteins have been tested with the Proteome Profiler Array kit, the possibility of interference cannot be excluded.
- For a procedure demonstration video, please visit: www.RnDSystems.com/ProteomeProfilerVideo.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human NFκB Pathway Array	894251	4 nitrocellulose membranes each containing 45 different capture antibodies printed in duplicate.	Return unused membranes to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of the zip-seal. May be stored for up to 3 months at 2-8 °C.*
Array Buffer 1	895477	21 mL of a buffered protein base with preservatives.	May be stored for up to 3 months at 2-8 °C.*
Array Buffer 3	895008	21 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Array Buffer 6	893573	21 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Lysis Buffer 6	895561	21 mL of a denaturing buffered solution with preservatives.	
Wash Buffer Concentrate	895003	2 vials (21 mL/vial) of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Detection Antibody Cocktail, Human NFκB Pathway Array	894252	1 vial of biotinylated antibody cocktail; lyophilized.	
Streptavidin-HRP	893019	200 μL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase.	
Chemi Reagent 1	894287	2.5 mL of stabilized hydrogen peroxide with preservative.	
Chemi Reagent 2	894288	2.5 mL of stabilized luminol with preservative.	
4-Well Multi-dish	607544	Clear 4-well rectangular multi-dish.	

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Since the Human NFκB Pathway Array Kit detects relative expression levels of individual analytes, it is important to include appropriate control samples.

Note: Sample amount may be empirically adjusted to attain optimal sensitivity with minimal background. The suggested starting range for cell lysates is 200-500 μg.

Cell Lysates - Rinse cells with PBS and remove any remaining PBS before adding lysis buffer. Solubilize the cells at 1×10^7 cells/mL in Lysis Buffer 6. Pipette up and down to resuspend and rock the lysates gently at 2-8 °C for 30 minutes. Microcentrifuge at 14,000 x g for 5 minutes, and transfer the supernate into a clean test tube. Quantitation of sample protein concentrations using a total protein assay is recommended. The maximum allowable lysate volume is 250 μL/array. Cell lysates should be used immediately or aliquoted and stored at ≤ -70 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Thawed lysates should be kept on ice prior to use.

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

Human NFκB Pathway Array - Four nitrocellulose membranes each containing 45 different capture antibodies printed in duplicate. **Handle arrays only with gloved hands and flattipped tweezers.**

Detection Antibody Cocktail - One vial of lyophilized biotinylated antibodies. Before use, reconstitute the Human NFκB Pathway Detection Antibody Cocktail in 100 μL of deionized or distilled water.

1X Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm the bottles to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 40 mL of 25X Wash Buffer Concentrate to 960 mL of deionized or distilled water to prepare 1000 mL of 1X Wash Buffer.

Chemi Reagent Mix - Chemi Reagent 1 and 2 should be mixed in equal volumes within 15 minutes of use. **Protect from light. 1 mL of the resultant mixture is required per membrane.** Discard any remaining after use.

Array Buffer 3/6 – Mix equal volumes of Array Buffer 3 and Array Buffer 6 to make Array Buffer 3/6. **Make fresh for each day of the assay procedure.**

ARRAY PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature before use. Keep samples on ice. To avoid contamination, wear gloves while performing the procedures.

1. Prepare all reagents and samples as directed in the previous sections.
2. Pipette 2.0 mL of Array Buffer 3/6 into each well of the 4-Well Multi-dish to be used. Array Buffer 3/6 serves as a block buffer.
3. Using flat-tip tweezers, remove each membrane to be used from between the protective sheets and place in a well of the 4-Well Multi-dish. The array number should be facing upward.

Note: Upon contact with Array Buffer 3/6, the blue dye from the spots will disappear, but the capture antibodies are retained in their specific locations.

4. Incubate for one hour on a rocking platform shaker. Orient the tray so that each array rocks end to end in its well.
5. While the membranes are blocking, prepare samples by adding the desired quantity of lysate to Array Buffer 1 for a total volume of 1.5 mL. Maximum lysate volume is 250 μ L.
6. Aspirate Array Buffer 3/6 from the wells of the 4-Well Multi-dish. Add prepared samples and place the lid on the 4-Well Multi-dish.
7. Incubate overnight at 2-8 $^{\circ}$ C on a rocking platform.

Note: *A shorter incubation time may be used if optimal sensitivity is not required.*

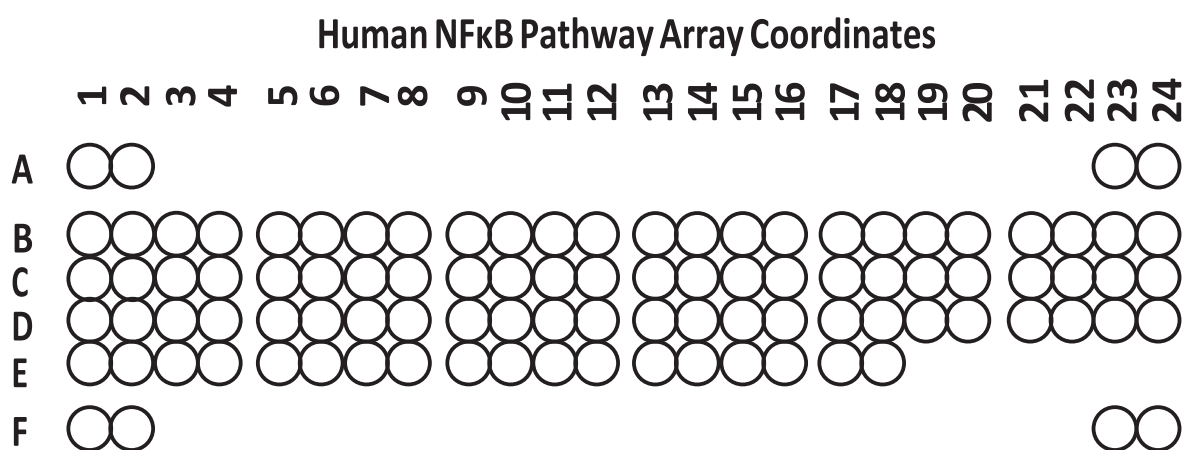
8. Carefully remove each membrane and place into individual plastic containers with 20 mL of 1X Wash Buffer. Rinse the 4-Well Multi-dish with deionized or distilled water and dry thoroughly.
9. Wash each membrane with 1X Wash Buffer for 10 minutes on a rocking platform shaker. Repeat two times for a total of three washes.
10. For each array, dilute 15 μ L of reconstituted Detection Antibody Cocktail to 1.5 mL with Array Buffer 3/6. Pipette 1.5 mL per well of diluted Detection Antibody Cocktail into the 4-Well Multi-dish.
11. Carefully remove each membrane from its wash container. Allow excess buffer to drain from the membrane. Return the membrane to the 4-Well Multi-dish containing the diluted Detection Antibody Cocktail. Cover the wells with the lid.
12. Incubate for 1 hour at room temperature on a rocking platform shaker.
13. Wash each array as described in steps 8 and 9.
14. Dilute the Streptavidin-HRP in Array Buffer 3/6 using the dilution factor on the vial label. Pipette 2.0 mL into each well of the 4-Well Multi-dish.

ARRAY PROCEDURE CONTINUED

15. Carefully remove each membrane from the wash container. Allow excess Wash Buffer to drain from the membrane. Return the array to the 4-Well Multi-dish containing the diluted Streptavidin-HRP, and cover with the lid. Incubate for 30 minutes on a rocking platform shaker.
16. **ANNEXE II**

DATA ANALYSIS

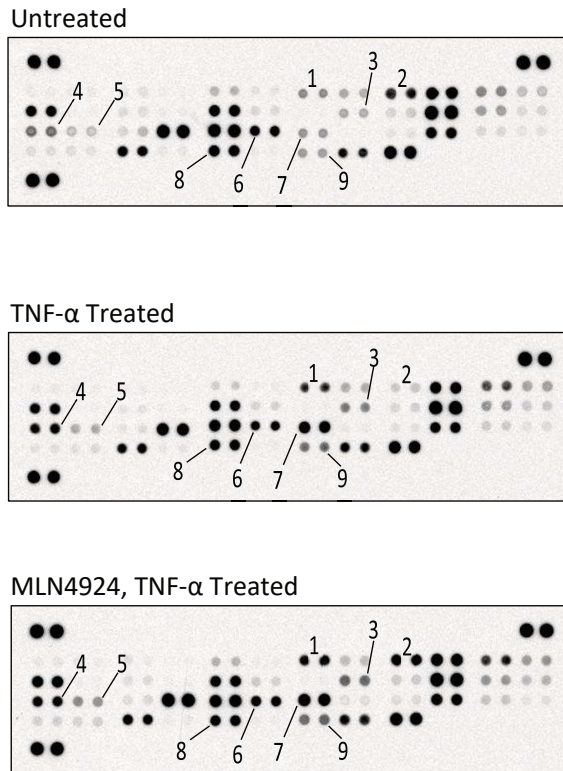
1. Create a template to analyze pixel density in each spot of the array.
2. Export signal values to a spreadsheet file for manipulation in a program such as Microsoft Excel.
3. Determine the average signal (pixel density) of the pair of duplicate spots representing each analyte.
4. Subtract an averaged background signal from each spot. Use a signal from a clear area of the array or negative control spots as a background value.
5. Compare corresponding signals on different arrays to determine the relative change in protein levels between samples.



PROFILING PROTEINS IN CELL LYSATES

The Human NFκB Pathway Array detects multiple proteins in cell lysates. Cells were either untreated or treated as indicated below. The amount of cell lysate used on each array and the duration of exposure to X-ray film is indicated below. Profiles of mean spot pixel density were created using a transmission-mode scanner and image analysis software.

PROFILING PROTEINS IN CELL LYSATES *CONTINUED*



HT-29 Untreated vs. TNF- α +/- MLN4924 Treatment

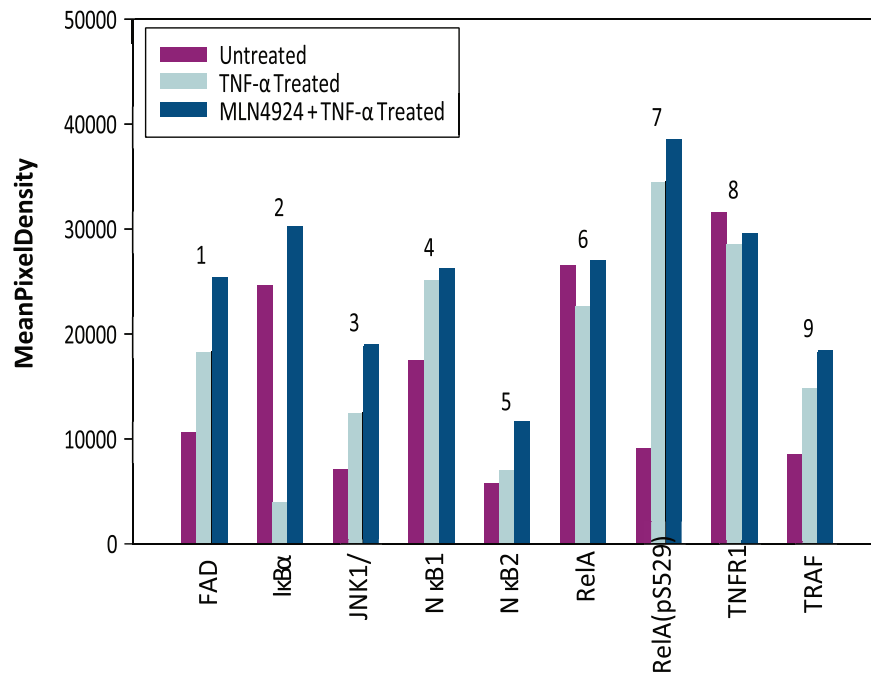


Figure 1C: HT-29 human colorectal carcinoma cells were untreated or treated with 50 ng/mL recombinant human TNF- α (R&D Systems®, Catalog # 210-TA) for ten minutes with or without pretreatment with 5 μ M MLN4924 (Boston Biochem, Catalog # I-502) for 1 hour (400 μ g lysate, 5 minute exposure).

APPENDIX

Refer to the table below for the Human NFκB Pathway Array coordinates.

Coordinate	Target/Control	Entrez Gene ID	Alternate Nomenclature
A1, A2, A23, A24	Reference Spots	NA	RS
B1, B2	ASC	29108	PYCARD/CARD5
B3, B4	BCL10	8915	CLAP/CIPER/CARMEN/c-E10
B5, B6	CARD6	84674	CINCIN1
B7, B8	CD40/TNFRSF5	958	CDW40
B9, B10	cIAP1/BIRC2	329	_____
B11, B12	cIAP2/BIRC3	330	_____
B13, B14	FADD/MORT1	8772	GIG3
B15, B16	Fas/TNFRSF6/CD95	355	_____
B17, B18	IκBα	4792	NFKBIA/MAD-3/NFKBI/IKBA
B19, B20	IκBε	4794	NFKBIE/IKBE
B21, B22	IKK1/IKKα/CHUK	1147	IKKA/IKBKA/TCF16
B23, B24	IKK2/IKKβ	3551	IKKB/NFKBIKB/IMD15
C1, C2	IKKγ/NEMO	8517	IKBKG/FIP3/IMD33
C3, C4	IL-1 RI	3554	CD121A/IL-1R-alpha
C5, C6	IL-17 RA	23765	CD217/CANDF5/CDw217
C7, C8	IL-18 Rα	8809	CD218a/IL18RA/IL1 RRP
C9, C10	IRAK1	3654	IRAK/pelle
C11, C12	IRF5	3663	SLEB10
C13, C14	IRF8	3394	ICSBP/IMD32A
C15, C16	JNK1/2	5599/5601	SAPK1/MAPK8; SAPK1a/MAPK9
C17, C18	JNK2	5601	SAPK1a/MAPK9
C19, C20	LTBR/TNFRSF3	4055	CD18
C21, C22	Metadherin/AEG-1	92140	LYRIC/MTDH
C23, C24	MYD88	4615	_____
D1, D2	NFκB1	4790	p50/p105
D3, D4	NFκB2	4791	p52/p100
D5, D6	NGF R/TNFRSF16	4804	CD271/p75NTR
D7, D8	p53	7157	_____
D9, D10	p53 (pS46)	7157	_____
D11, D12	RelA/p65	5970	NFKB3

D13, D14	RelA/p65 (pS529)	5970	NFKB4
D15, D16	c-Rel	5966	_____
D17, D18	SHARPIN	81858	SIPL1
D19, D20	SOCS6	9306	CIS4/SSI4/SOCS4/STATI4
D21, D22	STAT1p91	6772	ISGF-3/STAT91
D23, D24	STAT1 (pY701)	6772	ISGF-3/STAT91

APPENDIX CONTINUED

Coordinate	Target/Control	Entrez Gene ID	Alternate Nomenclature
E1, E2	STAT2	6773	P113/STAT113
E3, E4	STAT2 (pY689)	6773	P113/STAT113
E5, E6	STING/TMEM173	340061	_____
E7, E8	TLR2	7097	TIL4/CD282
E9, E10	TNF RI/TNFRSF1A	7132	CD120a/TNFR
E11, E12	TNF RII/TNFRSF1B	7133	CD120b/p75
E13, E14	TRAF2	7186	TRAP/TRAP3
E15, E16	TRAIL R1/DR4	8797	TNFRSF10A/CD261
E17, E18	TRAIL R2/DR5	8795	TNFRSF10B/CD262/KILLER/TRICK2
F1, F2	Reference Spots	NA	RS
F23, F24	Negative Control	NA	Controls (-)

Drug Discovery Today

Specific and selective induction of miR-124 in immune cells by the quinoline ABX464:

A transformative therapy for inflammatory diseases

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Short Review
Keywords:	Inflammatory diseases, Ulcerative colitis, microRNA, miR-124, quinoline
Corresponding Author:	Jamal Tazi, Ph. D ABIVAX Montpellier, Hérault FRANCE
First Author:	Jamal Tazi, Ph.D
Ordre of Autours:	Jamal Tazi, Ph.D Christina Begon-Pescia Noelia Campos, Master Aude Garcel, PhD Didier Scherrer, PhD
Abstract:	Inflammatory diseases are believed to develop as a result of dysregulated inflammatory responses to environmental factors on susceptible genetic backgrounds. Operating at the level of post-transcriptional gene regulation, microRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, small non-coding RNAs that can promote downregulation of protein expression by translational repression and/or mRNA degradation of target mRNAs involved inflammation. Mire - 124 is a critical modulator of inflammation and innate immunity that may provide therapeutic restitution of physiological pathways lost in inflammatory diseases. A recently discovered small quinoline, ABX464, was shown to upregulate miR-124 in human immune cells. In vivo, in a proof of concept clinical study, ABX464 showed a robust and consistent efficacy in ulcerative colitis (UC). This review will examine the current therapeutic options proposed for UC and discuss the drug candidate ABX464 in this context
Suggestif Revers:	Herbert Tilt, MD, PhD Professor, University of Innsbruck: Universidad Innsbruck Herbert.Tilg@i-med.ac.at Wella know Gastroentérologies Bernard Malison, PhD Director, INSERM bernardm@ciml.univ- mrs.fr well known Immunologist

Highlights

Teaser:

MicroRNA have the potential to dampen inflammation by downregulating pro-inflammatory cytokine expression. ABX464 is the first-in-class small molecule tested in the clinic to induce specifically miR-124 in immune cells and initiate an anti-inflammatory program in preclinical animal models and human.

Manuscript File

[Click here to view linked References](#)

Specific and selective induction of miR-124 in immune cells by the quinoline ABX464: A transformative therapy for inflammatory diseases

Short title: ABX464 specific inducer of miR-124 expression

Autours: Jamal Tazi*, Christina Begon- Pescia, Noëlle Campos, Aude Garcel & Didier Scherrer

Affiliations:

Cooperative laboratory CNRS-Montpellier University and ABIVAX, 1919 Route de Mende, 34293
Montpellier, France

Corresponding author *:

Prof. Jamal Tazi, Vice President Research ABIVAX

5 Rue de la Baume 75008 Paris, France

email: jamal.tazi@igmm.cnrs.fr Phone: 33

(0) 434 359 685 Cella phone: 33 (0) 632

727 725

Keywords:

Inflammatory diseases, Ulcerative colitis, microRNA, miR-124, quinoline

Teaser:

MicroRNA have the potential to dampen inflammation by downregulating pro-inflammatory cytokine expression. ABX464 is the first-in-class small molecule tested in the clinic to induce specifically miR-124 in immune cells and initiate an anti-inflammatory program in preclinical animal models and human.

Abstract

Inflammatory diseases are believed to develop as a result of dysregulated inflammatory responses to environmental factors on susceptible genetic backgrounds. Operating at the level of post-transcriptional gene regulation, microRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, small non-coding RNAs that can promote downregulation of protein expression by translational repression and/or mRNA degradation of target mRNAs involved in inflammation. MiR-124 is a critical modulator of inflammation and innate immunity that may provide therapeutic restitution of physiological pathways lost in inflammatory diseases. A recently discovered small quinoline, ABX464, was shown to upregulate miR-124 in human immune cells. In vivo, in a proof of concept clinical study, ABX464 showed a robust and consistent efficacy in ulcerative colitis (UC). This review will examine the current therapeutic options proposed for UC and discuss the drug candidate ABX464 in this context.

Cytokines, are small secreted proteins released by immune cells that initiate inflammation and innate immune responses by coordinating cellular communications [1]. Cytokines bind to cognate receptors to trigger a cytosolic signal transduction proteins and affect an array of cellular functions that include proliferation, differentiation and death [1]. As exemplified in figure 1a, activation of the gp130 homodimer by IL-6 leads to the initiation of the Janus kinases (JAK)- signal transducers and activators of transcription (STAT) signalling, a pathway that is often constitutively switched on in inflammatory diseases.

Immune cells can also be reprogrammed by a set of small (22 nucleotides in length) noncoding RNAs called microRNAs (miRNAs) which will modulate their biological processes such as cell growth, differentiation, and death [2]. MiRNAs negatively regulate gene expression by binding to target messenger RNAs to inhibit translation or increase mRNA degradation. MiRNAs have been shown to impact entire signaling pathway and alter the functions of myeloid and lymphoid lineages, including differentiation, survival and activation [3]. Thus, miRNAs contribute to immune homeostasis on the one hand and to the control of immune

tolerance on the other hand [3, 4]. Among the most important proteins whose expression is targeted by miRNAs, cytokines and signaling pathways proteins leading to cytokines expression (Figure 2 a and b).

The discovery that ABX464, a small molecule that induces the selective upregulation of miR124 in immune cells, is potentially potent in treating patients with ulcerative colitis opens the door to a new therapy for inflammatory diseases.

Targeting cytokine and chemokine pathways in inflammation

Cytokines bind to cell surface receptors and trigger activation through one main activation JAK/STAT pathway [5]. Following phosphorylation, STAT dimers are translocated to the nucleus where they induce the expression of set of transcripts that define cytokine responses (Figure 1a). Several diseases have been described in which aberrant or excessive signaling by cytokines contributes to pathogenesis (Table 1). For example, dysregulated sustained synthesis of IL-6 [6] and IL1 [7] has a pathological effect on chronic inflammation and autoimmunity (Figure 1a, Table 1). As such, JAK-STAT dysregulation participates in autoimmune disorders including rheumatoid arthritis (RA), ulcerative colitis (UC), and Crohn's disease (CD). To interfere with excessive activation of the JAK/STAT pathway in inflammatory disease, drugs that target JAK were recently added to the arsenal of anti-inflammatory therapies [8] (Figure 1a). Tofacitinib is a pan-JAK inhibitor that is approved by the FDA for the treatment of RA, while ruxolitinib is a JAK1/2 inhibitor that is approved for the treatment of polycythemia vera and myelofibrosis [9].

Cytokines can also be targeted directly. Tocilizumab, a humanized anti-IL-6 receptor antibody, [10] and numerous IL-1 inhibitors have been developed and tested primarily in RA [7] (Figure 1a, Table 1). IL-1 antagonists has been uniformly associated with beneficial effects in patients with hereditary autoinflammatory conditions associated with excessive IL-1 signaling, such as cryopyrinopathies and IL-1receptor deficiency. Successful treatment with IL-1 blockers has also been reported in other hereditary autoinflammatory diseases such as atherosclerosis, diabetes, neurodegenerative syndrome and

osteoporosis as well as in nonhereditary inflammatory diseases, such as Schnitzler syndrome, systemic-onset juvenile idiopathic arthritis and adult-onset Still disease [7].

The central role of TNF in inflammation (Figure 1a and Table 1) has also been demonstrated by the ability of agents that block the action of TNF to treat a range of inflammatory conditions, including RA, ankylosing spondylitis, inflammatory bowel disease (IBD) and psoriasis [11].

Importantly, appropriate levels of TNF α are also essential to perform key homeostatic functions, exerting a variety of effects on normal cell function, including cell proliferation, necrosis and apoptosis [7,11] (Table 1). TNF α that is mainly produced by activated macrophages, T lymphocytes, and natural killer (NK) cells (Table 1), serves a key function in orchestrating the inflammatory response [7,11] that includes both systemic and local responses. Importantly, insight into the central function of TNF α in synovial inflammation led to the development of

TNF α blockers, which have proven to be highly effective therapies [11] (Figure 1a, Table 1).

This picture has been somewhat modified by the recent discovery of a new subsets of CD4 T cells called Th17 cells [12] (Figure 1b). Th17 cytokines, that include IL-17, IL-23, and IL-22, are often increased in the inflamed intestinal mucosa of active ulcerative colitis (UC) and Crohn disease (CD) patients relative to unaffected regions and healthy controls [13,14] (Figure 2b). Moreover, several studies have shown a correlation between normalization of mucosal IL17A expression with treatment and short- and long-term clinical remission [13,14]. The drug targeting IL23 and IL12 regulate the pathogenicity and plasticity of intestinal Th17 cells in CD and UC [15]. Ustekinumab and risankizumab, humanized monoclonal IgG1 antibodies that bind to and neutralize p40, the shared subunit of IL-12 and IL-23 [16] and mirikizumab [17], a monoclonal IgG4 that binds to the p19 subunit of IL-23 and thus only blocks IL-23 are currently in clinical trials for IBD (Figure 1b, Table 1).

Other cytokines and their receptors have also been found to be elevated in affected tissues of patients with other inflammatory conditions [18]. IL-8 is such a cytokine that has been implicated in

inflammatory diseases involving neutrophil activation [19] (Figure 1a, Table 1). IL-8 can be detected in synovial fluid from patients with various inflammatory rheumatic diseases [20] and mucosal levels of IL-8 are elevated in patients with active UC [21].

Elevated levels of CC chemokines are also found in inflammatory diseases such as RA in which CCL2, CCL3, and CCL5 are present joint effusion and correlates with the recruitment of monocytes and T cells into synovial tissues [22] (Figure 1a, Table 1). In addition, CC receptors such as CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4 and CXCR5 have been implicated in B-cell synovial cytokine production and activity [23] (Table 1). Similarly, the pathophysiology of psoriasis is also linked to chemokine-mediated inflammation and lymphocyte recruitment in the skin, with for instance a CXCR3 ligand-mediated infiltration of T cells [24] (Table 1).

Modulation of inflammatory disease pathways by microRNAs

Over the past decade, a number of studies have established that miRNAs are important regulators of the immune response [3] (Figure 2 a and b). MiRNAs might promote a differentiation program or interfere with an inappropriate gene expression pattern. For instance, as shown in figure 2b, miR-146a one of the miRNAs prevalently expressed in Treg cells, is critical for their suppressor functions and miR-146a is selectively downregulated in Th1 lymphocytes to allow Th1 to secrete IFN γ and TNF α [25]. Following the same rule of miR-146a, a single miRNA can be pivotal for the development and function of most immune cells [26] and in some cases be central to immune dysfunctions and diseases when the targets of the miRNA are transcription factors, or signaling proteins, or regulators of cell death [27]. MiRNAs interact with the 3' untranslated region (3' UTR) of target mRNAs to induce mRNA degradation and/or translational repression [28]. The interaction of miRNAs with their target genes is dynamic and dependent on many factors, such as the subcellular location of the miRNAs, their abundance and the abundance of their target

mRNAs, as well as the affinity of miRNA-mRNA interactions [29]; in some situations miRNAs can act as “on-off” brakes to regulate inflammation [2,3,30].

Depending on their target mRNAs, miRNAs might either promote or suppress inflammation [2,3,30]. Therefore, miRNAs are often used by the immune system as rheostats of activation [31] [32] (Figure 2 a and b). The biogenesis of miRNAs is regulated as part of the inflammatory response by altering the transcription, processing, and/or stabilization of mature or precursor miRNA transcripts [33]. The initiation, spread, and resolution steps of inflammation are subject to both positive and miRNA-mediated negative feedback loops [27]. MiRNA negative feedback which is activated during severe inflammation is vital to maintaining tissue homeostasis [2].

However, while miRNA biology is still not completely understood, the development of potential miRNA-based therapies is a very active field.

MiR-124 is a physiological regulator of inflammation

As described above, miRNAs are an integral part of the regulatory network of immune responses. Recently, miR-124 was identified as a negative regulator of inflammation and was shown to target RNAs such as STAT and TLR [34] (Figure 2 a and b). In addition, its downregulation has been reported in diseases such as RA [35] and in patients with pediatric intestinal failure [36]. To the opposite, overexpression of miR-124 inhibits intestinal inflammation by attenuating the production of IL-6 and TNF- α converting enzyme (TACE) through the targeting of STAT3 mRNA [36,37]. STAT3 is one of the major cytoplasmic signaling molecules downstream of cytokine receptor engagement, making it central to more inflammatory processes [36]. Furthermore, in addition to targeting TACE, miRNA 124 negatively regulates LPS-induced TNF- α production in mouse macrophages by binding ubiquitin-specific protein (USP) 2 and 14 RNAs [38,39]. Importantly, children with active UC have, apart from increase local levels of TNF,

reduced levels of miR-124 and elevated levels of STAT3 in their colon tissues, a combination that is likely to promote inflammation and participate in the pathogenesis of the disease [40].

To note, miR-124 expression is increased during allergic inflammation and participate to the development and maintenance of the anti-inflammatory M2 phenotype [38] while it inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis and reduces neuroinflammation in mice through an inactivation of the C/EBP- α -PU.1 pathway [41]. Finally but importantly, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), a member of the nuclear receptor superfamily, exerts its anti-inflammatory effects by binding the promoter region of miR-124 and inducing its expression. This process has been shown to be important for PPAR γ -mediated inhibition of the production of proinflammatory cytokines [42].

Discovery of the quinoline ABX464, which induces a selective expression of miR-124

ABX464 was isolated from a chemical library by a screen designed to target RNA biogenesis.

ABX464 was isolated from amongst 2,000 compounds based on its promising preclinical profile [43]. Originally developed as an inhibitor of HIV replication [43-45] and HIV reservoir reduction [46], ABX464 binds to the Cap Binding Complex (CBC), a key component of RNA biogenesis [43]. CBC regulates splicing, export of mRNA from the nucleus, and RNA quality control in the cytoplasm [47]. ABX464-CBC interaction affects the quality control of HIV RNA biogenesis, thus preventing the production of unspliced HIV RNA [47] and reducing the viral reservoir of HIV-infected patients [46].

Despite binding to a major component of RNA biogenesis, deep sequencing of RNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) treated with ABX464, revealed that only ~0.1% of all RNA transcripts were affected. The effects of ABX464 on the cellular population of microRNAs were measured using the Affymetrix Genechip microRNA array 2.0 and a TaqMan[®] Array Human microRNA. ABX464 affected the expression of a single miRNA: miR124 [48]. MiR-124 is transcribed from 3 genomic loci, miR-124.1, miR-124.2 and miR-124.3. Studies have demonstrated that ABX464 induces miR-124 expression

from the miR-124.1 locus only [48]. The miR-124.1 locus contains the long noncoding RNA lncRNA00599-205, from which miR-124 is derived by splicing. Mutation of the splice sites of lncRNA00599-205 prevented the overexpression of miR-124 [48].

The strength of a predicted splice site using maximum entropy calculations (MaxEnt) revealed that the 5' splice site between exon 2 and intron 2 of lncRNA 599-205 was very weak compared to the other splice sites [48]. Since unspliced lncRNA 0599-205 will not leave the nucleus due to the quality control machinery and the involvement of the CBC complex in this mechanism, spliced lncRNA 0599-255 constitutes a form of miRNA storage, possibly in addition to other functional properties of the intact spliced transcript. This storage may be maintained through low transcriptional activity and degradation of the unspliced lncRNA 0599-255 and low production of mature miR-124 under normal conditions. Indeed, when lncRNA 0599-205 is unspliced, it is similar to other short-lived transcripts [49] and susceptible to a CBC complex called CBC-NEXT [50] which promotes RNA degradation via the nuclear RNA exosome [51]. Therefore, splicing of lncRNA 599-205 will be important to stabilize the mature transcript for the microRNA processing machinery and thereby produce miR-124. Mechanistically, ABX464 may act by enabling a quick release of miR-124 through lncRNA 0599-205 splicing without requiring transcriptional activation of the lncRNA 0599-255 locus. This situation could be specific for immune cells where the quality control of RNA has a major role [52]. Consistently, ABX464 did not affect the expression of miR-124 from miR-124.2 and miR-124.3 loci that do not harbor lncRNAs for miR-124 biogenesis.

Following in vitro and in vivo pre-clinical studies, ABX464 was shown to upregulate miR-124 expression in human including HIV infected patients [48]. As such, ABX464 can be qualified as first-in-class for targeting miR-124 selective expression.

ABX464 demonstrated anti-inflammatory effects in both preclinical models and UC patients

The hallmark of UC inflammatory lesions is a pronounced infiltration of immune cells from the epithelium to the lamina propria [53]. Their activation produces a cocktail of proinflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , and IL-23 [53]. Similar findings were found for a mouse model of intestinal inflammation in which dextran sulfate sodium (DSS) was used as an irritant to trigger an overwhelming inflammatory reaction that erased the epithelium layer and led to bacterial infiltration of the mucosa [54]. In this model, ABX464 rescued all DSS-treated mice and preserved the integrity of the intestinal architecture and villi while blunting the influx of inflammatory cells [55]. ABX464 treatment strongly attenuated DSS-induced colitis in mice and produced long-term protection against prolonged DSS exposure after drug cessation. Concomitantly, proinflammatory soluble mediators such as MCP-1, TNF- α and IL-6 were reduced by several-fold in the colon of the ABX464-treated mice [55]. These effects were consistent with the induction of miR-124 by ABX464. The miR-124/STAT3 pathway is known to be dysregulated in both DSS and IL-10 KO mouse models of colitis [40], and MiR-124 levels were shown to be decreased and STAT3 mRNA levels increased in the colonic tissues of DSSexposed mice [40] .

In vitro, ABX464 treatment of monocyte-derived macrophages led to a decrease in several proinflammatory cytokines, including IL1b, IL6, and TNFa, and the chemokines MCP1 and CXCL1 (ABIVAX, data in files). These findings were consistent with the induction of miR124 in treated cells and the role played by miR-124 as a regulator of monocyte and macrophage activation [38,39,41] (Figure 3). In PBMCs, ABX464 treatment did not affect the Treg populations but significantly reduced the number of Th17 and Th1 population and increased Th 2 cells population (ABIVAX, data in files). Th17 cells are known to differentiate in response to IL1b, IL6 and IL23 through STAT3 signaling [56]. More importantly, the increased numbers of proinflammatory Th17 cells observed in the mesenteric lymph nodes of DSS-exposed mice were corrected by ABX464 treatment, while Treg cells were unaffected (ABIVAX, data in files) (Figure 3).

Having already carried out a phase 1 dose-safety trial, and following these favorable results in the DSS colitis animal model, ABX464 was taken to a phase 2a clinical proof-of-concept study in patients with UC [57]. In this randomized (2:1) placebo-controlled doubleblinded 8-week induction study, 32 patients with moderate to severe UC, resistant or intolerant to immunomodulators, anti-TNF α , vedolizumab and/or corticosteroids, received 50 mg ABX464 or a placebo. In rectal biopsies of patients treated with ABX464 for 56 days, miR-124 was increased 7.6-fold compared to the placebo group. A larger increase in miR-124 in excess of 200-fold was observed in peripheral blood cells. This ABX464-driven induction of miR-124 was sustained for at least 360 days. ABX464 demonstrated significant clinical efficacy as measured by endoscopic mucosal improvement (50% vs. 11%, $p=0.03$), partial Mayo Score reduction (62% vs. -32%, $p=0.02$) and total Mayo Score reduction (-53% vs. -27%, $p=0.03$). Clinical remission and response and fecal calprotectin all trended favorably in the ABX464 treated group.

The very good safety profile and durability of the clinical efficacy with further improvement and clinical remission with longer treatment were correlated with sustained overexpression of miR124. MiR-124 appeared to not only decrease inflammation but also to promote tissue repair, consistent with its dual function on inflammatory cytokines and the promotion of M2 macrophage differentiation. To date, more than 300 patients have been treated with ABX464, some for over 2 years, with a favorable safety profile. The bioavailability of ABX464, systemically and locally, such as in the colon or the lung, after oral administration is rapid and sustained.

Conclusion

Unregulated levels of cytokines are central mediators of many inflammatory diseases. Targeting TNF, IL-1, IL-6 and IL-17 using recombinant soluble receptors, or antibodies, or inhibitors of their signaling has demonstrated preferable clinical outcomes in patients with autoimmune diseases, which are refractory

to glucocorticoid treatments. However, systemic cytokine blocking suffers from serious side effects such as an increased risk of severe infections. In addition, the pleiotropic nature of most cytokines and their necessity for the function of multiple cell types across different organs make it almost impossible to inhibit their signaling cascade in long-term therapy without severe complications. Therefore, new approaches with selective inhibition of cytokines, which maintain cytokine activity at other sites, are highly sought-after.

MiRNAs have been shown to modulate inflammatory pathways and immune responses. Among these miRNAs, miR-124 has been identified as a functionally relevant physiological miRNA associated with processes that attenuate inflammation by limiting cytokine overexpression. Therapeutic modulation of miR-124 may have several advantages over biologic targeting strategies such as the simultaneous downregulation of multiple cytokines. Therefore, although the induction of miR-124 expression by ABX464 is high in immune cells, the reduction in proinflammatory pathways is mild and can overcome severe complications associated with other treatments (Figure 3). In addition, the biogenesis of miR-124 triggered by ABX464, i.e., splicing of lncRNA 599-205 as a prerequisite to generate miR-124, limits the cell types where miR-124 is induced by ABX464 and promotes selective inhibition of cytokine expression. In contrast to what would be expected from using synthetic miR-124 therapy, ABX464, by inducing miR-124 in specific cell types, will avoid excessive inhibition or overexpression of miR-124, which might predispose patients to cellular abnormalities, impaired immunity, or even cancer. ABX464 prevents the proliferation of proinflammatory macrophages and proinflammatory CD4⁺ Th17 cells in inflammatory but not normal conditions (Figure 3). Oral administration of ABX464, once daily, profoundly decreased inflammation and induced clinical, biological and endoscopic remission in patients with moderate to severe ulcerative colitis while upregulating miR-124. ABX464, with its unique mode of action, is currently in Phase IIb in UC and CD and phase IIa in RA. This new class of drugs might transform the treatment of multiple inflammatory diseases.

Acknowledgements

We are indebted to our colleagues at ABIVAX for their critical comments on the manuscript, and Dr. Luc Teyton (Scripps Research) for comments and editing. Special thanks is to Joost Bakker from LifeSci Advisors for preparing the figures.

Role of the funding source

This work was supported by a grant from ABIVAX to the cooperative laboratory.

Conflicts of interest

Jamal Tazi, Didier Scherrer, Noëlie Campos and Aude Garcel are employees of ABIVAX.

REFERENCES

- [1] Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007;45:27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
- [2] O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2012;30:295–312. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075013.
- [3] Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Current Opinion in Pharmacology* 2009;9:514–20. doi:10.1016/j.coph.2009.05.003.
- [4] Chen C-Z, Schaffert S, Fragoso R, Loh C. Regulation of immune responses and tolerance: the microRNA perspective. *Immunol Rev* 2013;253:112–28. doi:10.1111/imr.12060.
- [5] Spangler JB, Moraga I, Mendoza JL, Garcia KC. Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering. *Annu Rev Immunol* 2015;33:139–67. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120211.
- [6] Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006;8 Suppl 2:S3. doi:10.1186/ar1917.
- [7] Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011;117:3720–32. doi:10.1182/blood-2010-07-273417.
- [8] Coskun M, Salem M, Pedersen J, Nielsen OH. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Res* 2013;76:1–8. doi:10.1016/j.phrs.2013.06.007.
- [9] Roskoski R. Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases. *Pharmacol Res* 2016;111:784–803. doi:10.1016/j.phrs.2016.07.038.

- [10] Choy EH, De Benedetti F, Takeuchi T, Hashizume M, John MR, Kishimoto T. Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16:335–45. doi:10.1038/s41584-020-0419-z.
- [11] Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25:453–72. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.016.
- [12] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
- [13] Leal RF, Planell N, Kajekar R, Lozano JJ, Ordás I, Dotti I, et al. Identification of inflammatory mediators in patients with Crohn's disease unresponsive to anti-TNF α therapy. *Gut* 2015; 64:233–42. doi:10.1136/gutjnl-2013-306518.
- [14] Arijs I, Li K, Toedter G, Quintens R, Van Lommel L, Van Steen K, et al. Mucosal gene Signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2009;58:1612–9. doi:10.1136/gut.2009.178665.
- [15] Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, et al. IL23 Differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008;57:1682–9. doi:10.1136/gut.2007.135053.
- [16] Sands BE, Sandborn WJ, Panaccione R, O'Brien CD, Zhang H, Johans J, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* 2019; 381:1201–14. doi:10.1056/NEJMoa1900750.
- [17] Sandborn WJ, Ferrante M, Bhandari BR, Berliba E, Feagan BG, Hibi T, et al. Efficacy and Safety of Mirikizumab in a Randomized Phase 2 Study of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2020;158:537–549.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.043.
- [18] Bendall L. Chemokines and their receptors in disease. *Histol Histopathol* 2005;20:907–

26. doi:10.14670/HH-20.907.

- [19] Skov L, Beurskens FJ, Zachariae COC, Reitamo S, Teeling J, Satijn D, et al. IL-8 as antibody therapeutic target in inflammatory diseases: reduction of clinical activity in palmoplantar pustulosis. *J Immunol* 2008;181:669–79. doi:10.4049/jimmunol.181.1.669.
- [20] Seitz M, Dewald B, Ceska M, Gerber N, Baggiolini M. Interleukin-8 in inflammatory rheumatic diseases: synovial fluid levels, relation to rheumatoid factors, production by mononuclear cells, and effects of gold sodium thiomalate and methotrexate. *Rheumatol Int* 1992;12:159–64. Doi:10.1007/BF00274936.
- [21] Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Schölmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38:216–22. doi:10.1136/gut.38.2.216.
- [22] Elemam NM, Hannawi S, Maghazachi AA. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Rheumatoid Arthritis. *Immunotargets Ther* 2020;9:43–56. doi:10.2147/ITT.S243636.
- [23] Henneken M, Dörner T, Burmester G-R, Berek C. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1001–13. doi:10.1186/ar1776.
- [24] Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* 2011;317:620–31. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.017.
- [25] 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. doi:10.1016/j.cell.2010.08.012.

- [26] Mehta A, Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat Rev Immunol* 2016;16:279–94. doi:10.1038/nri.2016.40.
- [27] 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. doi:10.1038/ni.f.209.
- [28] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [29] O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:111–22. doi:10.1038/nri2708.
- [30] Alam MM, O'Neill LA. MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. *Eur J Immunol* 2011;41:2482–5. doi:10.1002/eji.201141740.
- [31] Tahamtan A, Teymoori-Rad M, Nakstad B, Salimi V. Anti-Inflammatory MicroRNAs and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatment. *Front Immunol* 2018;9:1377. doi:10.3389/fimmu.2018.01377.
- [32] Kuchroo VK, Ohashi PS, Sartor RB, Vinuesa CG. Dysregulation of immune homeostasis in autoimmune diseases. *Nat Med* 2012;18:42–7. doi:10.1038/nm.2621.
- [33] Bronevetsky Y, Ansel KM. Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system. *Immunol Rev* 2013;253:304–16. doi:10.1111/imr.12059.
- [34] He X, Jing Z, Cheng G. MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *Biomed Res Int* 2014;2014:945169. doi:10.1155/2014/945169.
- [35] 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 synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1294–304. doi:10.1002/art.24475.

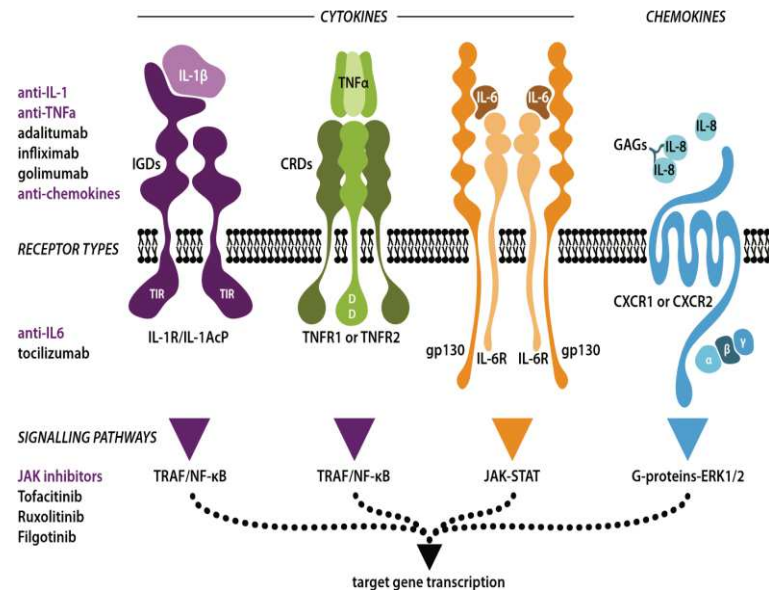
- [36] Xiao Y-T, Wang J, Lu W, Cao Y, Cai W. Downregulated expression of microRNA-124 in pediatric intestinal failure patients modulates macrophages activation by inhibiting STAT3 and AChE. *Cell Death Dis* 2016;7:e2521. doi:10.1038/cddis.2016.426.
- [37] Sun Y, Li Q, Gui H, Xu D-P, Yang Y-L, Su D-F, et al. MicroRNA-124 mediates the cholinergic anti-inflammatory action through inhibiting the production of proinflammatory cytokines. *Cell Res* 2013;23:1270–83. doi:10.1038/cr.2013.116.
- [38] Veremeyko T, Siddiqui S, Sotnikov I, Yung A, Ponomarev ED. IL-4/IL-13-dependent and independent expression of miR-124 and its contribution to M2 phenotype of monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. *PLoS ONE* 2013;8:e81774. doi:10.1371/journal.pone.0081774.
- [39] Qin Z, Wang P-Y, Su D-F, Liu X. miRNA-124 in Immune System and Immune Disorders. *Front Immunol* 2016;7:406. doi:10.3389/fimmu.2016.00406.
- [40] Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Morley-Fletcher A, Gras-Miralles B, Kokkotou E, et al. MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2013;145:842–2. doi:10.1053/j.gastro.2013.07.001.
- [41] Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL. MicroRNA124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nat Med* 2011;17:64–70. doi:10.1038/nm.2266.
- [42] Wang D, Shi L, Xin W, Xu J, Xu J, Li Q, et al. Activation of PPAR γ inhibits proinflammatory cytokines production by upregulation of miR-124 in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;486:726–31. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.106.

- [43] Campos N, Myburgh R, Garcel A, Vautrin A, Lapasset L, Nadal ES, et al. Long lasting control of viral rebound with a new drug ABX464 targeting Rev - mediated viral RNA biogenesis. *Retrovirology* 2015;12:30. doi:10.1186/s12977-015-0159-3.
- [44] Scherrer D, Rouzier R, Noel Barrett P, Steens J-M, Gineste P, Murphy RL, et al. Pharmacokinetics and tolerability of ABX464, a novel first-in-class compound to treat HIV infection, in healthy HIV-uninfected subjects. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:820–8. doi:10.1093/jac/dkw458.
- [45] Steens J-M, Scherrer D, Gineste P, Barrett PN, Khuanchai S, Winai R, et al. Safety, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of a Novel HIV Antiviral, ABX464, in Treatment-Naive HIV-Infected Subjects in a Phase 2 Randomized, Controlled Study. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61. doi:10.1128/AAC.00545-17.
- [46] Rutsaert S, Steens J-M, Gineste P, Cole B, Kint S, Barrett PN, et al. Safety, tolerability and impact on viral reservoirs of the addition to antiretroviral therapy of ABX464, an investigational antiviral drug, in individuals living with HIV-1: a Phase IIa randomised controlled study. *J Virus Erad* 2019;5:10–22.
- [47] Gonatopoulos-Pournatzis T, Cowling VH. Cap-binding complex (CBC). *Biochem J* 2014;457:231–42. doi:10.1042/BJ20131214.
- [48] Vautrin A, Manchon L, Garcel A, Campos N, Lapasset L, Laaref AM, et al. Both antiinflammatory and antiviral properties of novel drug candidate ABX464 are mediated by modulation of RNA splicing. *Sci Rep* 2019;9:792. doi:10.1038/s41598-018-37813-y.
- [49] Lubas M, Christensen MS, Kristiansen MS, Domanski M, Falkenby LG, LykkeAndersen S, et al. Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting complex. *Mol Cell* 2011;43:624–37. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.028.

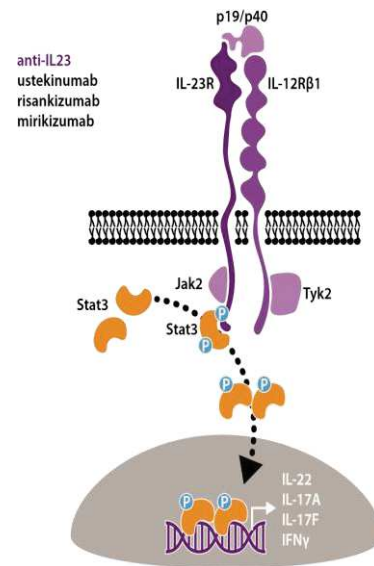
- [50] Ogami K, Chen Y, Manley JL. RNA surveillance by the nuclear RNA exosome: mechanisms and significance. *Noncoding RNA* 2018;4. doi:10.3390/ncrna4010008.
- [51] Andersen PR, Domanski M, Kristiansen MS, Storvall H, Ntini E, Verheggen C, et al. The human cap-binding complex is functionally connected to the nuclear RNA exosome. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:1367–76. doi:10.1038/nsmb.2703.
- [52] Rigby RE, Rehwinkel J. RNA degradation in antiviral immunity and autoimmunity. *Trends Immunol* 2015;36:179–88. doi:10.1016/j.it.2015.02.001.
- [53] Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1756–67. doi:10.1053/j.gastro.2011.02.016.
- [54] Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007;2:541–6. doi:10.1038/nprot.2007.41.
- [55] Chebli K, Papon L, Paul C, Garcel A, Campos N, Scherrer D, et al. The Anti-Hiv Candidate Abx464 Dampens Intestinal Inflammation by Triggering IL-22 Production in Activated Macrophages. *Sci Rep* 2017;7:4860. doi:10.1038/s41598-017-04071-3.
- [56] Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007;282:9358–63. doi:10.1074/jbc.C600321200.
- [57] Vermeire S, Hébuterne X, Napora P, Wisniewska-Jarosinska M, Kiss G, Bourreille A, et al. OP21 ABX464 is safe and efficacious in a proof-of-concept study in ulcerative colitis patients. *Journal of Crohn's and Colitis* 2019;13:S014–5.

Figure 1

a. Targeting cytokine and chemokine signalling



b. Targeting Th17 cells



a. MicroRNAs as regulators of TLR signalling pathway

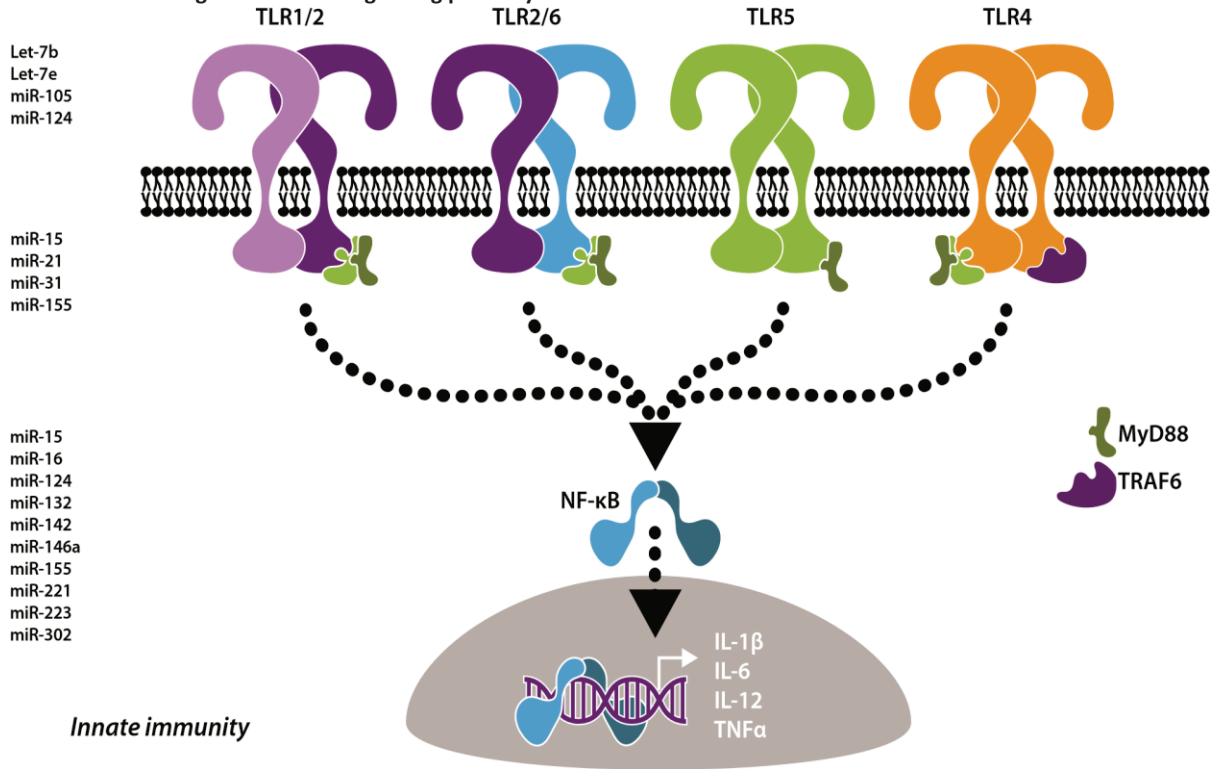


Figure 2

b. MicroRNAs as regulators of T cell differentiation

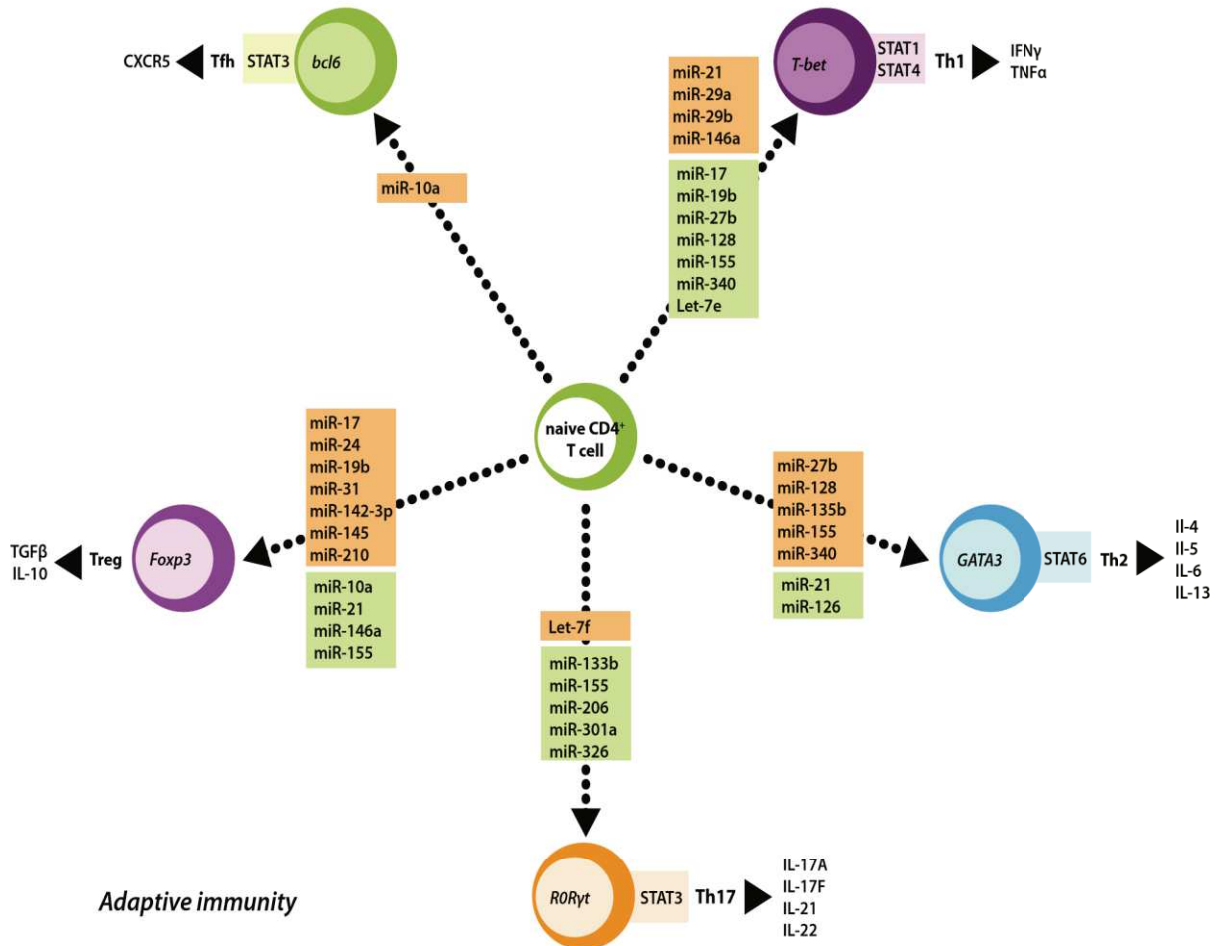


Figure 3

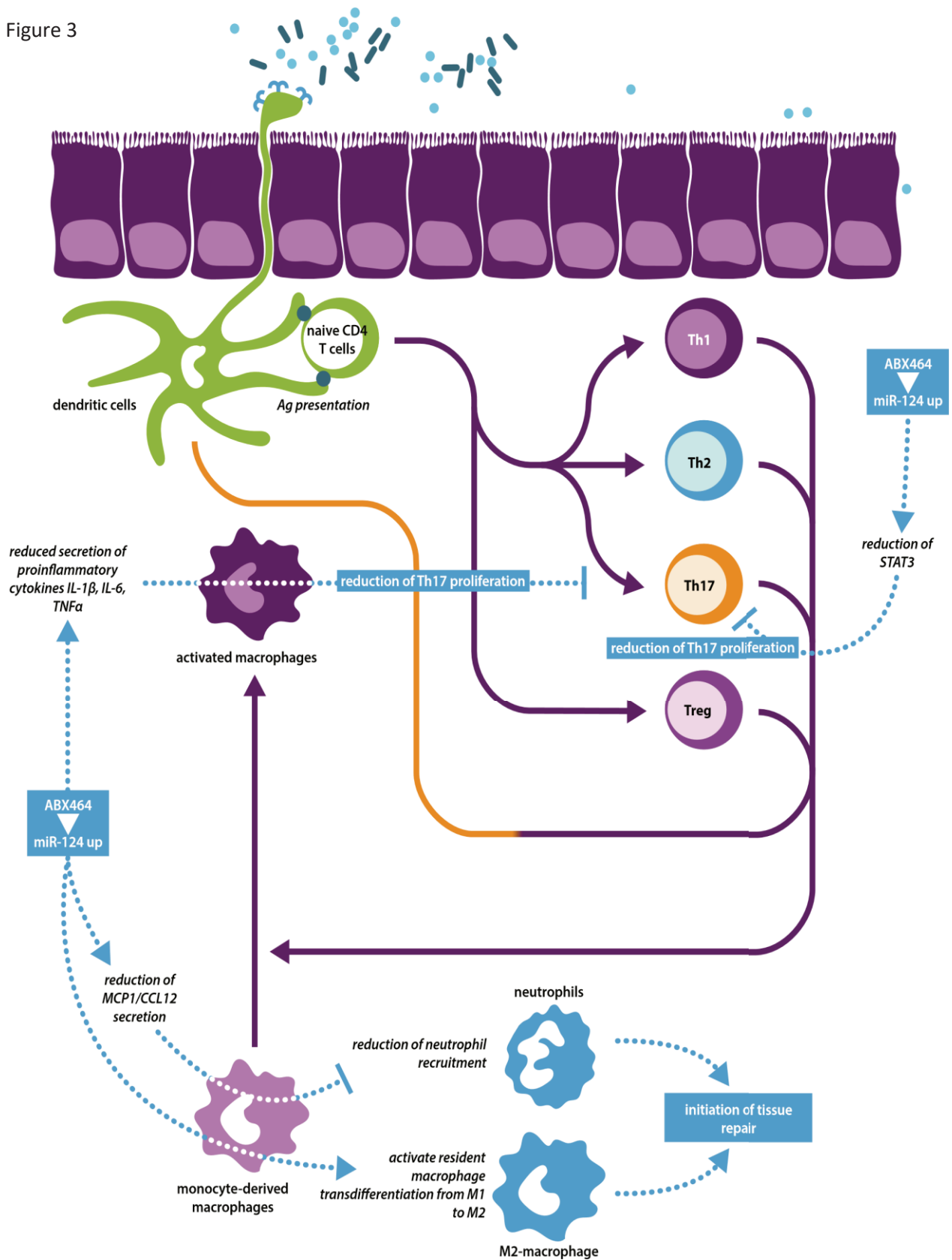


FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic drawing of cytokines, chemokines and Th17 cells signalling targeted by therapeutic agents. **a.** Cytokines and chemokines bind to cognate receptor to trigger signalling pathways like TRAF/NF- κ B, JAK/STAT and G-proteins/ERK1/2 activation to modulate gene expression. Anti-IL1, anti-TNF α (adalimumab, infliximab and golimumab) and anti-IL-8 are specific antibodies preventing cytokines and chemokines receptors activation. Different receptors associate with different JAKs, so that selective blockade of one JAK can inhibit a specific biologic function and used as therapeutic treatment of inflammatory. **b.** T helper 17 (Th17) cells play a central role in inflammatory and autoimmune diseases via the production of proinflammatory cytokines interleukin- (IL-) 17, IL-17F, IL-22 and IFN γ . Binding of IL-23 (p19 and p40) to the heteromeric IL-23R-IL-12R β 1 receptor at the surface of Th17 cells triggers activation JAK2/STAT3 pathway to produce proinflammatory cytokines. Blockade of IL-23 by anti-IL-23 (ustekinumab, risankizumab and mirkizumab) is used as therapeutic to reduce Th17 proliferation in inflammatory diseases.

Figure 2. Schematic of miRNAs as regulators of TLR signalling pathway and also involved in the differentiation of CD4⁺ T helper cell subsets. MicroRNAs bind directly to 3' untranslated region of specific mRNA to downregulate expression of signalling protein and cytokine expression. **a.** microRNAs can intervene at different levels of TLR signalling to regulate gene expression. First, miRNAs like let-7 family members, miR-21, miR-105, and miR-124 modulate TLRs or TLR-related genes. Second, miRNAs; miR-15, miR-21, miR-31 and miR-155, serve as physiological ligands of mRNAs encoding signalling proteins like MyD88 and TRAF6 or miR-16, miR-124, miR-132, miR-142, miR-146a as modulators of NF- κ B transcription factors which can activate TLR signalling and stimulate the release of inflammatory cytokines and IFN genes in some cell types. Functional studies have demonstrated that these miRNAs may participate in activation of TLR signalling through regulating the NF- κ B pathway and the production of inflammatory cytokines, which are shown here. **b.** miRNAs control the differentiation of CD4⁺ T helper cell subsets. miRNAs regulates the differentiation of different effector (Th1, Th2, Th17, and Tfh) and regulatory (Treg) sub-population of CD4⁺ T helper cells. Each cell population is characterized by the activation of specific transcription factors (bcl6 for Tfh, T-bet for Th1, GATA3 for Th2 ROR γ t for Th17 and Foxp3 for Treg) and STAT proteins (STAT3 for Tfh, STAT1/STAT4 for Th1, STAT6 for Th2 and STAT3 for Th17) allowing secretion of specific cytokines/chemokines (CXCR5 for Thf, IFN γ and TNF α for Th1, IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13 for Th2, IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22 for Th17, and IL-10 in addition to TGF β for Treg). MiRNAs shown in green color are reported to positively regulate whereas those in Braun color negatively regulate the differentiation of each CD4⁺ T-cell population.

Figure 3. Model of ABX464 mode of action in the control of the intestinal immune system homeostasis. The presence of either pathogenic bacteria or disruption of the epithelial-cell barrier results in the initiation of the infectious inflammation at the site of the lesion. First, complex networks of cytokines and chemokines originate through interaction of monocytes/macrophages and neutrophils. Monocytes/macrophages can be activated directly by neutrophil products, including released granule molecules, with boosting of their phagocytic and antimicrobial capacities and neutrophils are activated by macrophage secreted cytokines like IL-1 β , IL-6 and TNF α and chemokines like MCP1 and acquire an inflammatory effector phenotype. Second, upon capturing antigens through pinocytosis and phagocytosis and becoming activated by inflammatory cytokines, the dendritic cells migrate to the mesenteric lymph nodes, where they activate naive T cells, which then undergo differentiation into Th1, Th2, Th17 and Treg. Persistent secretion of Th17 cytokines (including IL-17, IL-22 and IFN γ) promotes chronic inflammation and may be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disorders. ABX464 by increasing miR-124 in activated macrophages and Th17 cells leads to fine tuning of inflammatory responses. In one hand miR-124 modulates macrophage cytokine production by targeting STAT3 to reduce secretion of IL-1 β , IL-6 and TNF- α which can reduce Th17 proliferation. The up-regulation of miR-124 in macrophages also reduces MCP1 production which will limit neutrophils recruitments and activate resident macrophages transdifferentiation from M1 to M2 to initiate tissue repair. In the other hand miR-124 up-regulation in Th17 cells can target STAT3 and reduce the production of IL-17 and other inflammatory cytokines. Through induction of miR124, ABX464 acts at different levels of inflammation by tempering immune responses.

Cytokines/ chemokines	Main sources	Target cells	Major function	Inflammatory disease	Treatment
Interleukins					
IL-1	Macrophages, B cells, DCs	B cells, NK cells, T-cells	Pro-inflammatory, proliferation and differentiation	Autoinflammatory diseases; chronic and acute metabolic syndrome	Anakinra, Riloncept, Canakinumab
IL-4	Th cells, Macrophages, fibroblasts	Macrophages, B cells, T-cells	Proliferation of B and cytotoxic cells, enhances MHC class II expression, stimulates IgG and IgE production	Macrophage polarization	–
IL-6	Macrophages	Activated B cells, plasma cells	Differentiation into plasma cells, IgG production	Autoinflammatory diseases; metabolic syndrome, systemic sclerosis, cardiovascular, cancer	Tocilizumab
IL-8	Macrophages	Neutrophils	Chemotaxis, pro-inflammatory	Autoinflammatory diseases, RA, IBD, psoriasis	HuMab 10F8
IL-10	T cells, macrophages	B cells, macrophages	Inhibition of cytokine and mononuclear cell function, anti-inflammatory	Asthma, Systemic lupus erythematosus, IBD, psoriasis, RA, Tuberculosis, Melanoma	–
IL-12	T cells, macrophages	NK cells	Activates NK cells	Autoinflammatory diseases; chronic and acute	Ustekinumab, risankizumab
IL-17	Th17 cells, macrophages, NK cells, lymphoid tissue inducer and $\gamma\delta$ -T cells	T cells, B cells, DC, macrophages, neutrophils, lung/gut epithelial cells, keratinocytes, Synoviocytes, chondrocytes	Protection against extra- and intracellular pathogens	IBD, psoriasis, RA	Several IL-17 inhibitors FDA approved
IL-22	T cells, innate leukocytes (ILC) and NK T-cells	Several epithelial and stromal cells in various tissues	Preservation of mucosal barriers and protection of the host from microbial parasites in the skin, lung and intestine. Promotion of cell survival and proliferation in solid organs	Persistent infections, chronic inflammation and autoimmune diseases	–
IL-23	DC, macrophages	T cells and ILC	Differentiation of Th17 and protection against extra- and intracellular pathogens	Autoinflammatory diseases; chronic and acute	Ustekinumab, risankizumab
Tumour necrosis factors					
TNF- α	Macrophages	Macrophages	Pro-inflammatory, survival proliferation, differentiation and apoptosis	Autoinflammatory diseases, RA, IBD, psoriasis	Adalimumab, Infliximab, golimumab
Interferons					
IFN- α	Leukocytes	various	Anti-viral	Anti-viral	–
IFN- γ	T-cells	various	Anti-viral, macrophage activation, increases neutrophil and monocyte function, expression of MHC-I and -II on various cells	–	–
Colony stimulating factors					
GM-CSF	T-cells, macrophages, fibroblasts	Stem cells	Granulocyte, monocyte, eosinophil production	Autoimmune and inflammatory disorders, RA	Mavrilimumab, namilumab
Chemokines					

CCL2/MCP1	Endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, epithelial cells, mesangial cells, astrocytes, T cells and tumor cells, as myeloid cells	Monocytes, T cells, B cells, NK, basophils, macro phages, DC, neutrophils	Chemoattractant for various immune cells	Inflammatory disorders potential	–
CCL3/MIP-1 α	macrophages	Monocytes, T cells, hematopoietic stem/progenitor cells	Pro-inflammatory, mobilisation of monocytes and lymphocytes	–	–
CCL5	macrophages	Monocytes, memory T-helper cells and eosinophils	Pro-inflammatory, mobilisation of monocytes, lymphocytes and eosinophils	–	–

Table 1. Summary data about major proinflammatory cytokines/chemokines; main sources, major target cells, major functions, involvement in inflammatory diseases and existing treatments.

POSTER: EULAR 2020

ABX464, a novel drug in the field of inflammation, increases miR-124 and modulates macrophages and T-cell functions.

C. BEGON-PESCIA¹, J. MIELLE¹, N. CAMPOS², K. CHEBLI¹, L. MANCHON¹, J. SANTO², C. APOLIT², K. MARTIN², L. LAPASSET², A. VAUTRIN², D. SCHERRER², A. GARCEL², J. TAZI², C. DAIEN¹.

The cooperative Lab. 1. IGMM, UMR5535, CNRS, Montpellier and Montpellier University 2. Abivax R&D Montpellier

Background: ABX464 is a small oral molecule with a novel mode of action. It binds the Cap Binding Complex, involved in the biogenesis of RNAs and predominantly upregulates the expression of a microRNA miR-124 in PBMCs and T cells (1). miR-124 has been widely described for its anti-inflammatory properties, with many confirmed targets i.e. monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1, CXCL-1, SERPIN-E1, NFkB/RelA, STAT-3, IL-6 receptor. It post-transcriptionally regulates the expression of MCP-1 in rheumatoid arthritis (RA) synoviocytes and decreases their proliferation (2). While miR-124 is decreased in synoviocytes of RA patients, its injection in joint improved arthritis in rats (3). miR-124 expression in macrophages leads to the induction and maintenance of anti-inflammatory M2 phenotype (4). Its effect in T cells remains controversial.

Objectives: (i) To assess the effect of ABX464 on miR-124 expression *in vitro* in macrophages and *in vivo* in patients; (ii) to assess the effect of ABX464 on arthritis in mice and (iii) to decipher the effect of ABX464 on human macrophages and T cells.

Methods: miR-124 was measured in human monocyte-derived macrophages (huMDM) treated with ABX464 for 4 days and in patients with ulcerative colitis included in a phase IIa RCT in blood and rectal biopsies at day 56 by TaqMan qPCR. Collagen-induced arthritis (CIA) was induced using usual protocol and ABX464 was given by gavage 2 weeks at 40 mg/kg after the 2nd injection of collagen and Freund adjuvant. HuMDM were exposed to 5 µM of ABX464 or DMSO (control) for 4 days, during a M1-polarization. Cytokines and chemokines were assessed in supernatants using both Proteome Profiler Array and Luminex and signaling molecules were assessed by both Western Blot (WB) and Proteome Profiler NFkB Array. PBMCs were exposed to ABX464 (5 µM) for 6 days. Th1 (IFN-g+), Th17 (CCR6+IL-17+), Th2 (CRTH2+ IL-4+) and Tregs (CD25+CD125-/loFoxP3+) were assessed by flow cytometry. IL-6 receptor was assessed in CD4+ supernatant using ELISA.

Results: ABX464 increased miR-124 *in vitro* by 3.41 folds in huMDM (p=0.001) compared to DMSO. The phase IIa RCT conducted in 32 patients with moderate to severe active ulcerative colitis showed a good safety profile and significant clinical efficacy. A strong increase of miR-124 was observed both in blood and rectal biopsies of patients treated with ABX464 (637 and 7.69 folds respectively, compared to placebo, p<0.05). The use of ABX464 drastically decreased the incidence of arthritis from 52% (15/ 29 mice) to 10% (3/30 mice) in a CIA model. Macrophages treated with ABX464 produced significantly less MCP-1 (median decrease -67%, p=0.004), CXCL-1 (-18%, p=0.004) and SERPIN-E1 (-53%, p=0.004), as confirmed by the 2 technics (n=9). NFkB/RelA decreased by 25% in ABX464 treated macrophages compared to DMSO (WB, n=8; p=0.008, with a similar trend in Proteome Profiler Array). ABX464 significantly decreased Th17 (-56%, p=0.02), while increasing Th2 (+21%, p=0.01). IL-6 soluble receptor was significantly decreased in supernatant of PBMCs treated with ABX464 (-43%, p=0.04).

Conclusion: We demonstrated that ABX464 increases miR-124 both *in vitro* and in patients. *In vitro*, ABX464 decreased the expression of miR-124 target genes, that is MCP-1, CXCL-1, SERPIN-E1, NFkB/RelA in macrophages and decreases the number of Th17 as well as IL-6 soluble receptor in CD4+ T cells. A phase IIa RCT is currently ongoing in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate and/or TNF-inhibitors (n=60). Results are expected during 2020 summer.

References:

- (1) Vautrin A et al. Sci Rep. 2019;9:792
- (2) Nakamachi Y et al. Arthritis Rheum 2009; 60:1294-304
- (3) Nakamachi Y et al. Ann Rheum Dis 2016 ; 75 :601-8
- (4) Veremeyko T et al. PLoS ONE 2013 ; 8 :e81774

ABX464, a new drug candidate, for the treatment of COVID-19: miR-124 induction, reduction of pro-inflammatory cytokine secretion and inhibition of SARS-CoV2 replication

Authors: Christina Begon-Pescia, Aude Garcel, Manuel Rosa Calatrava, Hartmut Ehrlich Philippe Pouletty and Jamal Tazi,

ABX464 is a small molecule that binds to the Cap Binding Complex to modulate RNA biogenesis. This orally administered drug is safe, and has been shown to decrease inflammation and promote tissue repair. ABX464 has demonstrated clinical, biological and endoscopic efficacy in patients with moderate to severe ulcerative colitis resistant to steroids and biologic drugs, in a phase 2a, placebo-controlled clinical trial. It is a first in-class drug that selectively and specifically upregulates a microRNA (miR), miR-124. The main metabolite of ABX464 in human is ABX464-N-Glu. Here, we show that both ABX464 and ABX464-N-Glu are able to induce miR-124 in PBMCs and activated monocyte derived macrophages. MiR-124 affects inflammatory pathways by down-regulating RNAs critical for cytokine signaling, both ABX464 and ABX464-N-Glu are, thus, able to decrease secretion of pro-inflammatory cytokine. Interestingly, through its effects on RNA biogenesis, ABX464 inhibits the replication of RNA viruses, including SARS-CoV2 as shown in an in vitro human respiratory primary epithelium model. The profile of activity of ABX-464 fits remarkably what would be expected of a drug needed to treat the moderate and severe forms of COVID-19: inhibition of viral replication, anti-inflammatory effects, and promotion of tissue repair.

Titre : Etude *in vitro* de l'impact de la drogue ABX sur les macrophages primaires humains issus de monocytes du sang périphérique dans un contexte inflammatoire - Implication du micro-ARN 124

Résumé

Les macrophages sont des médiateurs cellulaires hétérogènes, dont le rôle est crucial dans l'inflammation. Une molécule chimique ABX a été développée par la société privée ABIVAX et fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II (colite ulcéreuse, polyarthrite rhumatoïde). En collaboration avec le CNRS, il a été observé que cette drogue ABX est un puissant anti-inflammatoire capable d'induire spécifiquement la surexpression du miR-124, décrit pour ses propriétés anti-inflammatoires. L'objectif de mon projet de thèse a été de caractériser *in vitro*, les modulations phénotypiques et les mécanismes moléculaires mis en jeu par la drogue ABX, sur des macrophages humains dérivés de monocytes (Hu MDM) de donneurs sains dans un contexte inflammatoire, et prétraités par la drogue ABX versus contrôle. Les données obtenues sur 6 Hu MDM montrent d'une part, une diminution significative des récepteurs membranaires du phénotype M1 (CD86, CD274), et d'autre part, une diminution significative des facteurs impliqués dans la voie de signalisation du TLR4 (p65/RelA, I κ B ζ /NFKBIZ, TRAF6). De plus l'analyse du profil sécrétoire montre une diminution significative d'un ensemble de protéines pro-inflammatoires, à savoir : des cytokines (IL-6, TNF α , IL-1 β), des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaires et le recrutement des leucocytes (ICAM-1, CXCL1), ainsi que la chimiokine responsable de l'infiltration des macrophages (MCP-1/ CCL2). Fait remarquable, les données obtenues avec 14 HuMDM, montrent une surexpression significative du micro-ARN 124 de 3,4 fois par rapport au contrôle. Somme toute, l'ensemble de ces données suggère que la drogue ABX, limite l'excès d'inflammation, et jouerait un rôle dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire. La surexpression du miR-124 est en concordance avec les données obtenues *in vitro* sur les lymphocytes T CD4 et les PBMC humains, mais également avec les données cliniques obtenues avec des patients atteints de colite ulcéreuse. Finalement, le laboratoire identifie, pour la première fois le potentiel immunorégulateur de la drogue ABX dans l'inflammation. En induisant la surexpression spécifique du miR-124, la drogue ABX, atténue le profil pro-inflammatoire des macrophages par un rétrocontrôle négatif de la voie TLR4/NF-kB. Le miR-124 potentialise l'effet homéostatique de la drogue ABX. Cette nouvelle molécule chimique ABX pourrait représenter une nouvelle perspective thérapeutique, visant à rééquilibrer certains médiateurs impliqués dans l'immunité innée et adaptative.

Mots-clés : macrophages, inflammation, drogue ABX, micro-ARN 124, TLR4, NF-kB

Abstract

Macrophages are heterogeneous cell mediators, which play a crucial role in inflammation. A chemical molecule ABX has been developed by the private company ABIVAX and is currently undergoing phase II clinical trials (ulcerative colitis, rheumatoid arthritis). In collaboration with the CNRS, it has been observed that drug ABX is a potent anti-inflammatory drug able to specifically induce the overexpression of the miR-124, described for its anti-inflammatory properties. The aim of my PhD project was to characterize *in vitro* the phenotypic modulations and molecular mechanisms involved by drug ABX, on Human Monocyte-Derived Macrophages (Hu MDM) of healthy donors in an inflammatory context, and pretreated with drug ABX versus control. The data obtained on six Hu MDM show on the one hand, a significant decrease in the membrane receptors of the M1 phenotype (CD86, CD274) and on the other hand, a significant decrease in the factors involved in the TLR4 signaling pathway (p65/RelA, I κ B ζ /NFKBIZ, TRAF6). In addition, the secretory profile shows a significant decrease of a set of pro-inflammatory proteins such as cytokines (IL-6, TNF α , IL-1 β), proteins involved in cell adhesion and leukocyte recruitment (ICAM-1, CXCL1), as well as the chemokine responsible for the infiltration of macrophages (MCP-1/ CCL2). Remarkably, the data obtained with 14 Hu MDM, show a significant overexpression of micro-RNA 124 of 3.4 times that of the DMSO control. All of these data suggest that drug ABX limits excessive inflammation and could play a role in the control of cellular homeostasis. The overexpression of miR-124 is consistent with *in vitro* data obtained with T CD4 lymphocyte and human PBMC data, as well as clinical data from ulcerative colitis patients. For the first time, the laboratory identifies the immunomodulatory potential of drug ABX in inflammation. By inducing specific overexpression of miR-124, drug ABX attenuates the pro-inflammatory profile of macrophages by a negative feedback loop of the TLR4/NF-kB signaling. MiR-124 potentiates the homeostatic effect of drug ABX. This new chemical molecule ABX could represent a new therapeutic perspective, in order to rebalance some mediators involved in innate and adaptive immunity.

Keywords: macrophages, inflammation, drug ABX, micro-RNA 124, TLR4, NF-kB