



**HAL**  
open science

# Etude des interactions entre polynucléaires neutrophiles et lymphocytes T régulateurs dans un contexte physiologique et dans la polyarthrite rhumatoïde.

Maxime Batignes

► **To cite this version:**

Maxime Batignes. Etude des interactions entre polynucléaires neutrophiles et lymphocytes T régulateurs dans un contexte physiologique et dans la polyarthrite rhumatoïde.. Biologie cellulaire. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2019. Français. NNT : 2019PA131093 . tel-03340306

**HAL Id: tel-03340306**

**<https://theses.hal.science/tel-03340306>**

Submitted on 10 Sep 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.

*Année 2019*

## **THESE**

Pour l'obtention du diplôme de

### **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13**

Discipline : Biologie, Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

---

**Etude des interactions entre polynucléaires neutrophiles et  
lymphocytes T régulateurs dans un contexte physiologique et dans  
la polyarthrite rhumatoïde.**

---

Présentée par

**Maxime BATIGNES**

*Soutenue publiquement le 1<sup>er</sup> octobre 2019*

**Jury**

<b>Dr. Elodie SEGURA</b> (Institut Curie-Paris)	Rapporteur
<b>Pr. Maxime BREBAN</b> (Université de Versailles)	Rapporteur
<b>Dr. Cyril CLAVEL</b> (Université de Toulouse)	Examineur
<b>Dr. Christine LE ROY</b> (Université Paris 13)	Examinatrice
<b>Pr. Patrice DECKER</b> (Université Paris 13)	Directeur de Thèse
<b>Pr. Natacha BESSIS</b> (Université Paris 13)	Directrice de Thèse



# Remerciements

Ce travail de thèse est la conclusion d'une longue aventure impliquant de nombreuses personnes que je souhaite remercier ici.

En premier lieu je voudrais remercier mes rapporteurs de thèse le Dr. Elodie Segura et le Pr. Maxime Breban qui ont apporté un regard nouveau à mon manuscrit, améliorant significativement sa qualité.

Je remercie également les examinateurs de ma thèse, le Dr. Cyril Clavel et le Dr. Christine Le Roy, pour avoir pris le temps de lire mon manuscrit et pour leur participation à mon jury de thèse.

L'intégralité de mon activité de recherche a été effectuée au sein du laboratoire INSERM UMR 1125, connue jusqu'au Japon sous l'acronyme Li2P. A ce titre je remercie le directeur du laboratoire, le Pr. Marie-Christophe Boissier qui m'a permis de passer ces quatre années dans le laboratoire et m'a fourni les meilleures conditions possibles pour réaliser mon travail de thèse. Votre implication quotidienne dans la gestion de l'équipe se fait ressentir dans la qualité des travaux de recherche produits.

Je tiens à présent remercier mes directeurs de thèse, le Pr. Natacha Bessis et le Pr. Patrice Decker. De mon point de vue vous êtes indissociables, si bien que je vous ai secrètement, et affectueusement, surnommés Patacha. Merci Natacha pour tes encouragements perpétuels et la valeur que tu as accordé à mes prises d'initiatives. J'ai beaucoup gagné en confiance auprès de toi. Grâce à toi j'ai appris à concentrer mes efforts sur des objectifs concrets et éviter de m'éparpiller sur de trop nombreuses pistes de recherche, un mal qui m'a guetté en fin de thèse. Patrice, tu m'as enseigné la rigueur scientifique à son paroxysme. Même si certains peuvent se plaindre de la densité des plans d'expériences que tu rédiges, tous admettront que les résultats qui en découlent sont alors indiscutables. Je pense n'avoir jamais été aussi fier que la fois où tu m'as dit : "Je crois que là il y a trop de conditions contrôles dans ton expérience". L'émerveillement que tu accordes à la découverte scientifique et l'innovation fait plaisir à voir et j'espère qu'elle m'animerait aussi pendant longtemps. A vous deux, vous représentez le chercheur idéal et si je n'ai pu absorber que la moitié de vos qualités scientifiques, je me considérerai déjà comme un scientifique accompli. J'espère que vous trouverez d'autres projets en collaboration, et d'autres étudiants à taquiner de concert, car de bien belles choses peuvent provenir de votre entente. J'espère aussi que vous aurez pris autant de plaisir que moi à mener ce projet ensemble.

Je remercie aussi les autres chercheurs du laboratoire, le Dr. Eric Assier et le Dr. Jérôme Biton pour leurs conseils avisés et leur précieuse aide lors d'évènements importants comme les préparations de mes communications orales.

Le Li2P est pourvu d'une qualité exceptionnelle qui est le fait de compter non pas une, ni deux, mais bien trois ingénieures à son actif. J'ai du mal à imaginer mes quatre années de thèse sans votre aide précieuse. Delphine, tu m'as aidée à acquérir rapidement une autonomie sur les stations de cytométrie mais surtout à déchiffrer l'enfer administratif du système de commande chez les différents fournisseurs de matériel de laboratoire. Je te remercie pour ton aide essentielle. Roxane, nos premiers échanges n'ont pas été de tout repos, si bien que je t'avais surnommé "le dragon" à mes débuts. En apprenant vite les règles de vie et les bonnes pratiques de laboratoire qui me manquaient, j'ai pu me mettre à l'abri des flammes destructrices de ton courroux. C'est alors, que j'ai pu travailler de façon très agréable avec toi et je te remercie pour toute ton aide, pour la gestion des animaux de laboratoire et surtout mon initiation au monde fabuleux de la microscopie à fluorescence. Aujourd'hui, je suis ravi de te compter parmi mes amies. Magali, tu es la dernière des ingénieures à être arrivée au Li2P, précisément au même moment que mon début de thèse. Nous avons alors appris ensemble à trouver notre place respective dans cette équipe. Je ne compte plus le nombre de tris magnétiques que tu as effectué pour moi et il vaut mieux ne pas savoir, au risque d'être assommé par ce chiffre. Tu as aussi été d'un soutien moral essentiel allant jusqu'à me nourrir pour me permettre de survivre à l'épreuve parfois difficile qu'est la thèse. Je garderai un souvenir chaleureux de nos soirées pizza après avoir passé une trop longue journée à la paillasse.

De nombreux étudiants sont passés par le laboratoire et j'ai eu la chance d'en côtoyer certains. Je remercie le Dr. Mattieu Ribon pour m'avoir formé aux bases de la culture des neutrophiles lors de mes premières semaines au laboratoire. Ton implication dans ton travail m'a aidé à m'investir au maximum dans le mien. Je remercie également le Dr. François Santinon avec qui j'ai partagé ma paillasse, mes doutes et mes soirées jeux vidéo pendant 3 ans. Merci pour ton investissement dans mon travail de thèse et ton aide dans la mise au point de mes cocultures cellulaires. Il me tarde de te revoir au détour d'un congrès international ! Ensuite il y a eu le Dr. Sarra Seninet avec qui j'ai partagé mon bureau. Merci pour ta bonne humeur rayonnante et ta patience avec moi. A présent, j'ai une pensée pour Kirari Suemitsu, venue du Japon et qui a effectué un stage de 1 an au Li2P. En plus de te faire découvrir notre travail au laboratoire, je me suis improvisé professeur de français avec toi et j'ai été impressionné de voir ton niveau augmenter chaque jour. De nos échanges j'en ai aussi appris beaucoup sur ta culture, ton pays et ta façon de voir le monde. Merci d'avoir ouvert mon esprit sur ces choses-là (A riz gâteau). Parmi les personnes avec qui j'ai passé beaucoup de temps, il y a aussi Lyna. En particulier lors des prélèvements de résidus d'anneaux de cytophère ou de liquides synoviaux, des journées qui pouvaient sembler interminables. Merci pour ton aide technique et ton soutien en ces jours difficiles (le terrible vendredi !). Je remercie enfin les autres étudiants, Eliès, Dyhia, Gérome et Mégane. Ce fût un plaisir de travailler avec vous et je vous souhaite de la réussite pour vos prochaines expériences.

Mon travail de thèse s'appuie sur de nombreux prélèvements sanguins humains. Je me dois donc de remercier le service de l'"Etablissement Français du Sang" (EFS) de l'hôpital Avicenne et de l'hôpital Saint Louis à Paris pour leur professionnalisme lors des commandes d'échantillons sanguins. Pour les échantillons de patients je dois mentionner l'équipe de rhumatologie de l'hôpital Avicenne. En particulier, je remercie Mylène Petit, notre attachée de recherche clinique, chargée de faire le lien entre le service hospitalier et les chercheurs. C'est une tâche difficile que de concilier les exigences de chaque parti et tu exerces ton rôle admirablement bien. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse. Merci aussi au reste de l'équipe à l'hôpital, les infirmières, le Pr. Luca Semerano, le Pr. Philippe Musette et Johanna Sigaux.

Je remercie Myriam, notre gestionnaire, pour sa disponibilité et son efficacité à traiter les commandes urgentes.

Je remercie mes amis Anthony, Damien et Cécile qui, malgré la distance, m'ont activement soutenu, conseillé et motivé à donner le meilleur de moi-même.

Je termine par remercier ma famille à qui je dois tant. Merci à mes parents et mes grands-parents pour leur amour inconditionnel et leur soutien indéfectible.

# Sommaire



Remerciements .....	3
Sommaire .....	7
Liste des figures et tableaux .....	11
Abréviations .....	13
Introduction .....	19
Les neutrophiles .....	20
Le développement des neutrophiles .....	20
L'homéostasie des neutrophiles .....	23
Le recrutement des neutrophiles .....	25
L'activation des neutrophiles .....	27
Les réponses des neutrophiles activés .....	28
Les neutrophiles promoteurs de l'inflammation .....	32
Les neutrophiles régulateurs .....	34
Les lymphocytes T régulateurs .....	38
Le développement des Treg thymiques .....	38
Le développement des Treg en périphérie .....	43
Les autres populations régulatrices .....	45
Caractérisation des Treg .....	46
Mécanismes associés à la fonction des Treg .....	49
Stabilité ou plasticité .....	54
La polyarthrite rhumatoïde .....	59
Etiologie .....	59
La physiopathologie de la PR .....	63

Les neutrophiles dans la PR.....	66
Les Treg dans la PR .....	68
La clinique .....	71
Les modèles murins de la PR.....	76
Résultats.....	79
Article 1 .....	80
Introduction .....	81
Methods.....	82
Results .....	85
PMN promote FoxP3 expression by Treg .....	85
PMN favor Treg regulatory phenotype both in mouse and in human.....	86
PMN are over-activated and acquire an immunoregulatory phenotype upon interaction with Treg .....	88
MiP-2, IL-6 and IL-17 secretion is induced in mouse coculture.....	88
Both Treg and PMN exert suppressive activity upon interaction .....	92
Treg/neutrophil interplay is defective in RA patients .....	94
Discussion.....	96
Acknowledgements.....	99
References.....	99
Splementary data : .....	101
Article 2 .....	102
Discussion et perspectives .....	129
Le maintien du phénotype des Treg.....	130
L'activation des neutrophiles par les Treg .....	133
La production cytokinique de la coculture Treg/neutrophiles .....	133

La fonction des Treg .....	135
Le neutrophile régulateur .....	136
Mécanismes de l'interaction Treg/neutrophiles .....	139
Régulation de l'interaction Treg/neutrophiles .....	140
Place de l'interaction Treg/neutrophiles dans la PR.....	143
Conclusion .....	145
Références.....	147

# Liste des figures et tableaux

<b>Figure 1 : La différenciation du neutrophile chez la souris.</b> .....	20
<b>Figure 2 : La NETose suicidaire.</b> .....	31
<b>Figure 3 : Rôle ambivalent du neutrophile sur les lymphocytes T (LT).</b> .....	37
<b>Figure 4 : Différenciation des Lymphocytes T régulateurs thymiques (tTreg).</b> .....	41
<b>Figure 5 : Différenciation des lymphocytes T régulateurs périphériques (pTreg).</b> .....	44
<b>Figure 6 : Mécanismes de suppression des Treg.</b> .....	50
<b>Figure 7 : Caractéristiques principales des neutrophiles et des Treg en condition normale et dans la polyarthrite rhumatoïde (PR).</b> .....	71
<b>Figure 8 : Neutrophils help Treg to maintain FoxP3 expression overtime.</b> .....	86
<b>Figure 9 : Neutrophils promote FoxP3 expression and regulatory phenotype on Treg both in mice and humans.</b> .....	87
<b>Figure 10 : Neutrophils acquire an immunomodulatory phenotype upon interaction with Treg.</b> .....	89
<b>Figure 11 : Cytokine production is enhanced in coculture of activated Treg and PMN from mouse.</b> .....	90
<b>Figure 12 : Treg and PMN crosstalk is highly dependent on cell contact.</b> .....	91
<b>Figure 13 : JAK/STAT signaling pathway is also involved in Treg/PMN crosstalk.</b> .....	92
<b>Figure 14 : Both Treg and neutrophil shows regulatory properties upon coculture.</b> .....	93
<b>Figure 15: CTLA-4 induction on Treg by PMN is defective in RA but may be reverted by biotherapy.</b> .....	95
<b>Figure S1 : Assesment of molecular partners involved in Treg/PMN interaction</b> .....	101
<b>Tableau 1 : Critères de classification de la polyarthrite rhumatoïde (PR) établis par l'« American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism » en 2010.</b> .....	72

# Abréviations

ACPA : anticorps anti-protéines citullinées  
ACR : American college of rheumatology  
ADP : adénosine diphosphate  
AIRE : Auto-Immune REgulator  
AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
APRIL : a proliferation-inducing ligand  
AR : acide rétinoïque  
Arg-1 : arginase-1  
ATP : adénosine triphosphate  
BAFF : B-cell activating factor  
BCL6 : B-cell lymphoma 6  
Breg : lymphocyte B régulateur  
C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein  
CAIA : Collagen Antibody Induced Arthritis  
CD : cluster de différenciation (ex : CD3)  
cDMARDS : classical disease-modifying antirheumatic drugs  
CGD : chronic granulomatous disease  
CIIb : collagène de type II bovin  
CLP : common lymphoid precursor  
CLR : C-type lectin receptor  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CNS : conserved non coding DNA sequences  
CPA : cellules présentatrices d'antigènes  
CSF-1 : colony-stimulating factor-1  
CSH : Cellule souche hématopoïétique  
cTEC : cellules épithéliales thymiques du cortex  
CTL : lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxique  
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4  
CXCR : CXC chemokine receptor  
DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns  
DARC : Duffy antigen receptor of chemokines  
DC : dendritic cell  
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin  
DN : cellules doubles négatives (CD4<sup>-</sup> ou CD8<sup>-</sup>)  
DP : cellules double positive (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>)  
DTHA : Delayed-Type hypersensitivity Arthritis  
DUOX : Dual Oxidase

Egr2 : early growth response-2  
ELP : early lymphoid progenitor  
ETP : early thymic progenitor  
EULAR : European league Against Rheumatism  
EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2  
FcR : récepteurs pour les fractions constantes des anticorps  
Fezf2 : Fez family zinc finger 2  
FLS : fibroblastes synoviaux  
fMLP : bacteria-derived N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine  
FR : facteur rhumatoïde  
G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor  
G-CSFR : récepteur du G-CSF  
Gfi1: growth factor independent 1  
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogen  
HA : hémagglutinine  
HEV : high endothelial venules  
HLA : Human leukocyte antigen  
HMB-PP : (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate  
ICAM : intercellular adhesion molecule  
ICOS : Inducible T-cell COStimulator  
IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase  
IFN- $\gamma$  : interféron  $\gamma$   
Ig : Immunoglobuline  
IL- : Interleukine (ex : IL-2)  
iNOS : inducible Nitric Oxyde Synthase  
IRF4 : IFN regulatory factor 4  
iTreg : *in vitro* generated Treg  
iTreg35 : Treg induit, sécréteur d'IL-35  
LAG-3 : Lymphocyte-activation gene 3  
LB : lymphocyte B  
LDN : Low Density Neutrophiles  
LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1  
LPS : lipopolysaccharide  
LT : lymphocytes T  
LXR : liver X receptor  
MBL : Mannose-binding complexe  
mBSA : méthyl-bovine serum albumine



MDA-5 : melanoma differentiation-associated gene 5  
MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells  
mir : micro ARN  
MMP : métalloprotéinases matricielles  
MPO : myéloperoxydase  
mTEC : cellules épithéliales thymiques de la médulla  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NE : neutrophile élastase  
NET : neutrophil extracellular traps  
NF-κB : Nuclear Nactor-κ B  
NLR : NOD-like receptors  
NO : nitric oxide  
NOD : nucleotide-binding oligomerization domain  
NOX : NADPH oxydase  
Nrp1 : neuropiline-1  
OL-II : organes lymphoïdes secondaires  
PAD4 : peptidylarginine déiminase 4  
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PBMC : peripheral blood mononuclear cells  
pCMH : complexe peptide/CMH.  
PD-1 : Programmed Death receptor 1  
PD-L1 : Programmed Death receptor Ligand 1  
PKB : protéine kinase B  
PKC-θ : protéine kinase C thêta  
PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate  
PR : polyarthrite rhumatoïde  
PRR : Patern Recognition Receptor  
PSGL-1 : P-selectin ligand-1  
pTreg : lymphocytes T régulateurs périphériques  
RAG : recombinaison activating genes  
RANKL : Receptor activator of nuclear factor κ B ligand  
RIG-I : retinoid acid-inducible gene I  
RLR : retinoid acid-inducible gene I-like receptors  
RoRyT : RAR-related orphan receptor gamma  
ROS : Reactive oxygen species  
S1P : sphingosine-1-phosphate  
SOCS1 : cytokine signaling 1  
SP : cellules simple poisitve (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>)

TAN : tumor associated neutrophil  
T-bet : T-box expressed in T cells  
Tconv : cellules T conventionnelles  
TCR : T cell receptor  
Teff : lymphocytes T effecteurs  
Tfh : lymphocytes T folliculaires helper  
Tfr : lymphocytes T régulateurs folliculaires  
TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
Th : lymphocyte T helper  
TIGIT : T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains  
TLR : Toll like receptor  
TNF : tumor necrosis factor  
TNFR2 : récepteur de type 2 du TNF  
TOFA : Tofacitinib  
Treg : lymphocytes T régulateur  
tTreg : lymphocytes T régulateur thymique  
VLA4 : very late antigen 4

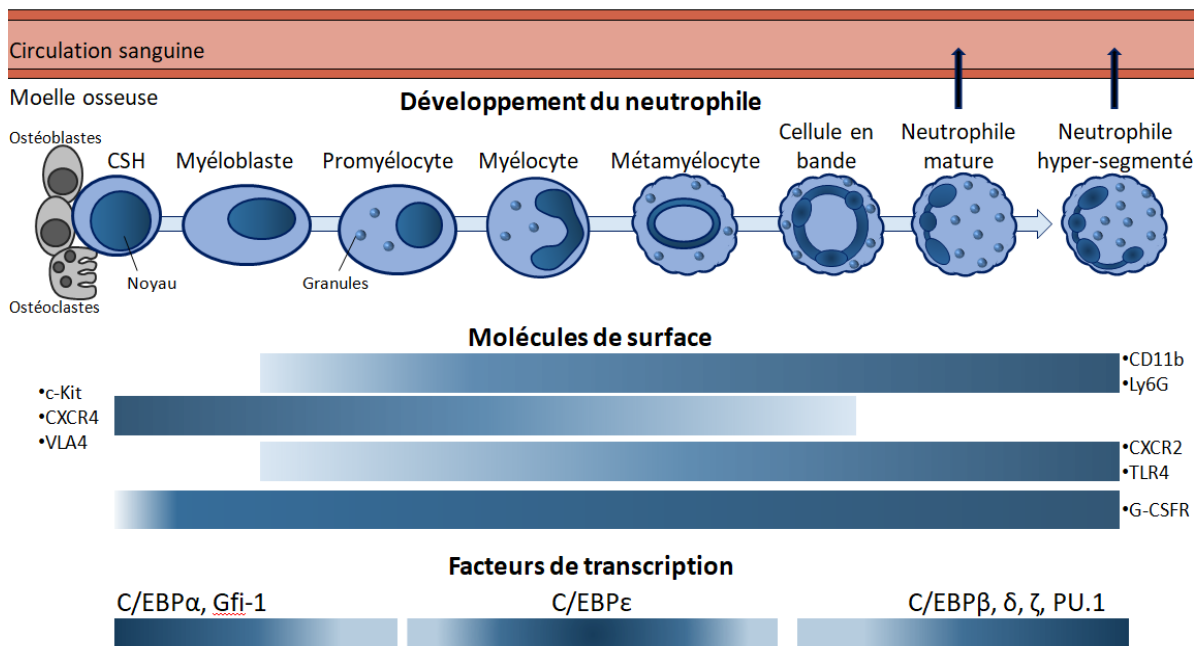


# Introduction

# Les neutrophiles

## Le développement des neutrophiles

Lors de ce projet de thèse j'ai particulièrement étudié les polynucléaires neutrophiles, une population cellulaire du système immunitaire inné. Cette cellule appartient à la lignée des cellules myéloïdes de part la provenance de ses progéniteurs et à la famille des granulocytes de part son riche contenu en granules. Les neutrophiles sont souvent associés à l'adjectif polynucléaire puisqu'ils possèdent un noyau multilobé qui se segmente au cours du processus de différenciation (figure 1, (Coffelt et al., 2016)). Chez l'homme, les neutrophiles sont la population immunitaire majoritaire dans le sang, représentant 50 à 70% des leucocytes et 95% des granulocytes à l'état basal. Afin de maintenir une telle concentration cellulaire, plus de  $10^{11}$  neutrophiles sont générés chaque jour (Dancey et al., 1976). Cela est possible grâce à une machinerie de



**Figure 1 : La différenciation du neutrophile chez la souris.**

Le développement du neutrophile se déroule dans la moelle osseuse, depuis la cellule souche hématopoïétique (CSH) jusqu'à la génération de neutrophiles matures. Le processus de différenciation fait intervenir plusieurs stades intermédiaires qui expriment différenciellement des molécules de surface et des facteurs de transcription. G-CSFR: Récepteur au G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor), C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein, Gfi1: growth factor independent 1, VLA4 : very late antigen 4, TLR : Toll like receptor, CXCR : CXC chemokine receptor. Schéma adapté de Coffelt et al.

production neutrophilique très efficace qui se déroule dans la moelle osseuse. Toutes les cellules leucocytaires proviennent de la moelle osseuse mais l'importance de la population neutrophilique fait que les deux-tiers de ce compartiment sont affectés à la production des neutrophiles (granulopoïèse) (Borregaard, 2010).

Les cellules immunitaires proviennent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui prolifèrent pour donner des précurseurs de chaque lignée leucocytaire : lymphoïde (lymphocytes T, lymphocytes B, inate lymphoid cells et Natural killers) ou myéloïde (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, plaquettes, monocytes, mastocytes et érythrocytes). Les CSH se regroupent sous forme de niches cellulaires en interagissant avec la matrice extracellulaire mais aussi avec les ostéoclastes et ostéoblastes de la moelle osseuse (Grassinger et al., 2009). Les ostéoclastes et ostéoblastes sont respectivement responsables de la dégradation et de la génération osseuse, ce qui leur octroie la capacité de modeler l'os à façon (Martin and Sims, 2005). De part cette capacité, ils participent activement à la formation et au maintien des niches de CSH (Mansour et al., 2012; Visnjic, 2004). La structure en niche cellulaire permet une compartimentation des zones responsables de la différenciation de chaque population leucocytaire et ce sont les facteurs de croissance qui vont déterminer l'orientation de ces niches vers chaque lignée.

Le facteur le plus efficace pour stimuler la différenciation neutrophilique est le « granulocyte-colony stimulating factor » (G-CSF) (Grail et al., 1994). Ceci est reflété par l'expression de son récepteur le G-CSF récepteur (G-CSFR), qui est rapidement induite chez les progéniteurs neutrophiliques et maintenue jusqu'au stade de neutrophile mature (Figure 1) (McKinstry et al., 1997). Le G-CSF induit la prolifération des progéniteurs et favorise la transition de chaque étape du développement neutrophilique. En effet, une fois que la CSH est engagée dans cette voie, la cellule se différencie progressivement en myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, cellule en bande et enfin neutrophile (Pillay et al., 2013; Rosenbauer and Tenen, 2007). Ce processus de différenciation s'accompagne de modifications morphologiques importantes. Notamment, le noyau commence à se déformer au stade myélocyte pour atteindre une forme annulaire au stade métamyélocyte. Le noyau continue de se déformer au stade de cellule en bande pour enfin atteindre une forme segmentée caractéristique, une fois le stade de neutrophile mature atteint.

Ces modifications morphologiques s'associent à des modifications d'expression moléculaire. Les plus notables sont celles des récepteurs CXCR4 et CXCR2 dont l'équilibre régule la rétention des cellules dans la

moelle osseuse. Le CXCR4 reconnaît le CXCL12 qui est produit par les ostéoblastes et les cellules stromales, ce qui favorise la rétention des cellules dans la moelle osseuse (Ma et al., 1999). A l'inverse, le CXCR2 reconnaît notamment le CXCL1 et le CXCL2 produit par les cellules endothéliales, ce qui stimule la migration vers les vaisseaux sanguins irrigant la moelle osseuse (Kohler et al., 2011). Ainsi, au cours du processus de différenciation, les cellules perdent progressivement le CXCR4 pour acquérir le CXCR2 (figure 1), cela ayant pour conséquence de maintenir les progéniteurs dans la moelle osseuse et de favoriser la migration des neutrophiles matures vers la circulation sanguine. Dans le même sens, les cellules en fin de maturation perdent l'intégrine VLA-4 qui est responsable de l'ancrage des progéniteurs dans la moelle osseuse (Vermeulen, 1998). Enfin, il est aussi possible de suivre le processus de différenciation par l'apparition des marqueurs caractéristiques des neutrophiles (CD11b et Ly6G chez la souris ou CD66b chez l'homme) et la perte de ceux associés aux progéniteurs (c-Kit).

Nous ne pouvons pas parler de la différenciation d'un granulocyte comme le neutrophile sans évoquer son contenu granulaire. Les granules des neutrophiles sont classiquement définies en quatre catégories : primaires, secondaires, tertiaires et les vésicules sécrétoires. Ces granules apparaissent séquentiellement au cours de la différenciation des neutrophiles et encapsulent le contenu protéique de la cellule à chaque stade (Borregaard et al., 1995). Les granules primaires apparaissent au stade promyélocyte, les secondaires au stade métamyélocyte, les tertiaires au stade de cellule en bande et les vésicules sécrétoires se forment dans les neutrophiles matures. Ces granules contiennent des molécules actives destinées à être rapidement libérées après activation des neutrophiles dont les principales sont : des sous unités de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX), la myéloperoxydase (MPO), la neutrophile élastase (NE), la cathepsine-G ou l'arginase-1 (Arg-1) (Cowland and Borregaard, 2016).

Les transitions entre les stades de différenciations, et les changements associés, sont coordonnés par l'expression transitoire de facteurs de transcription (figure 1). L'orientation des CSH vers le lignage neutrophilique est favorisée par la présence de G-CSF qui stimule l'expression du facteur de transcription « CCAAT enhancer-binding protein- $\alpha$  » (C/EBP $\alpha$ ). C/EBP $\alpha$  oriente les progéniteurs vers le lignage neutrophilique en inhibant directement PU-1, le facteur de transcription responsable de l'orientation des progéniteurs vers le lignage monocyttaire (Dahl et al., 2003). C/EBP $\alpha$  est aussi capable d'induire l'expression du microARN-223 (mir223) qui accélère la différenciation neutrophilique (Fazi et al., 2005). Notamment, mir223 cible E2F1, une

molécule impliquée dans le cycle cellulaire, pour inhiber la prolifération des progéniteurs favorisant ainsi leur différenciation (Pulikkan et al., 2010). Le « growth factor independent-1 » (Gfi-1) est un autre facteur de transcription nécessaire à l'engagement des progéniteurs vers le lignage neutrophilique (Hock et al., 2003). Dans un premier temps Gfi-1 réprime l'expression des molécules associées au lignage monocytaire comme l'« early growth response-2 » (Egr2)(Laslo et al., 2006) et le « colony-stimulating factor-1 » (CSF-1)(Zarebski et al., 2008). Gfi-1 défavorise également l'orientation vers le lignage monocytaire par l'inhibition des microRNA pro-monocytaire miR-21 et miR-196b (Velu et al., 2009). Ainsi la combinaison C/EBP $\alpha$  et Gfi-1 favorise nettement l'orientation des progéniteurs vers le lignage neutrophilique, si bien qu'un défaut dans leur expression induit de sévères neutropénies (Person et al., 2003; Skokowa and Welte, 2009). A partir du stade promyélocyte, les cellules étant engagées dans la différenciation en neutrophile, les facteurs de transcription inhibant les autres lignages deviennent obsolètes. Les expressions de C/EBP $\alpha$  et de Gfi-1 sont alors diminuées au profit d'un autre facteur de transcription, le C/EBP $\epsilon$ . Ce dernier est responsable de la production du contenu granulaire au stade myélocyte et métamyélocyte (Lekstrom-Himes et al., 1999). Enfin, C/EBP $\epsilon$  achève la sortie des myélocytes du cycle cellulaire en interagissant avec la protéine du rétinoblastome (qui inhibe la prolifération cellulaire) et en réprimant la molécule pro-mitotique E2F1 (Gery, 2004). En fin de maturation du neutrophile, on retrouve l'expression du facteur de transcription PU-1. Bien que PU-1 favorise l'orientation des CSH vers le lignage monocytaire, il est aussi nécessaire dans les dernières étapes de maturation du neutrophile. La fin de la maturation du neutrophile est aussi associée à l'expression des facteurs de transcription C/EBP $\beta$ ,  $\zeta$  et  $\delta$  (Bjerregaard, 2003). Ces facteurs de transcription favorisent notamment la formation des granules tertiaires.

Lorsque le processus de différenciation est achevé, les neutrophiles matures quittent la moelle osseuse par la circulation sanguine.

## **L'homéostasie des neutrophiles**

Une fois dans le sang, les neutrophiles circulent afin de sonder la moindre présence d'agents pathogènes. Il existe des compartiments servant de réservoir en cas de nécessité d'un apport rapide et important en neutrophiles. Ainsi il est possible de détecter des neutrophiles en grand nombre dans la rate, la moelle osseuse, le foie et les poumons chez l'homme (Kreisel et al., 2010; Szczepura et al., 2011). La durée de vie des neutrophiles a longtemps été considérée comme courte de part leur fonction principale de phagocytose



des pathogènes suivie de l'apoptose de la cellule. Cependant, de nouvelles données indiquent que ces cellules peuvent survivre jusqu'à 18 heures chez la souris et 5,4 jours chez l'homme (Pillay et al., 2010). Il a été évoqué que, due à la méthodologie utilisée, cette donnée de 5,4 jours est probablement surestimée (Tofts et al., 2011) mais la notion d'une durée de vie bien plus longue que quelques heures est admise. Ceci a été confirmé par une étude chez le zebrafish qui accorde aux neutrophiles une survivabilité de 120h (Dixon et al., 2012). De plus, au cours du processus inflammatoire, les neutrophiles activés voient leur durée de vie largement augmentée (Kim et al., 2011). Cela peut s'expliquer par le fait que de nombreuses molécules induites par l'inflammation sont des facteurs stimulant la survie des neutrophiles comme le G-CSF, l'IL-1 $\beta$ , le « tumor necrosis factor » (TNF) ou l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), mais aussi des composants bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS) (Colotta et al., 1992).

En condition physiologique, lorsque les neutrophiles arrivent en fin de vie, ils expriment à nouveau le CXCR4 ce qui les renvoie dans la moelle osseuse où ils sont éliminés par les macrophages résidants (Furze and Rankin, 2008). Ce vieillissement cellulaire est notamment influencé par le microbiome qui génère des signaux stimulant les neutrophiles circulants (Zhang et al., 2015). De façon intéressante, le vieillissement des neutrophiles est aussi dépendant du rythme circadien qui favorise leur élimination lors de la journée alors que le potentiel antibactérien des neutrophiles est à son maximum pendant la nuit (Adrover et al., 2019). Ces neutrophiles circulants peuvent aussi être éliminés par le foie. Là, des macrophages spécialisés appelés cellules de Kupffer, phagocytent les neutrophiles mourants (Shi, 2001). Suite à l'internalisation des neutrophiles sénescents, les macrophages sécrètent l'IL-23 qui stimule les lymphocytes T tissulaires pour induire leur production d'IL-17. L'IL-17 est un stimulant connu du G-CSF, qui comme nous l'avons vu, favorise la différenciation des neutrophiles (Schwarzenberger et al., 2000). Ainsi la phagocytose des neutrophiles apoptotiques entraîne une stimulation de la granulopoïèse par la production de G-CSF (Stark et al., 2005). Cet équilibre, entre élimination des neutrophiles circulants et stimulation de la granulopoïèse, est notamment régulé par le niveau d'expression du « liver X receptor » (LXR) dans les cellules phagocytaires du foie. Ce récepteur stimulé par l'internalisation des neutrophiles apoptotiques inhibe l'axe IL-23/IL-17/G-CSF (Hong et al., 2012), effectuant ainsi un rétrocontrôle négatif de la granulopoïèse. Par conséquent, l'homéostasie de la population neutrophilique est étroitement associée à l'axe IL-23/IL-17/G-CSF induit par l'élimination des neutrophiles apoptotiques circulants. Outre son importance dans l'équilibre de la granulopoïèse, l'élimination

des neutrophiles sénescents est nécessaire afin de prévenir l'apparition de graves troubles vasculaires (Adrover et al., 2019).

Il existe donc un renouvellement constant de la population neutrophilique afin de maintenir un réservoir important de neutrophiles dans certains organes et dans la circulation sanguine. Ce réservoir permet un recrutement rapide de neutrophiles lors d'événements pouvant mettre en danger l'intégrité de l'organisme.

## **Le recrutement des neutrophiles**

Deux types d'agressions peuvent menacer l'intégrité de l'organisme et font intervenir le système immunitaire. Le premier est lié aux chocs, blessures, brûlures, etc... qui portent atteintes aux tissus. Le second, correspond à l'intrusion d'un agent pathogène pouvant induire des dégâts au niveau cellulaire. Dans les deux cas, la réaction du corps est appelée inflammation (stérile ou non stérile). Celle-ci se manifeste par l'apparition d'un gonflement, de rougeurs, d'un échauffement et d'une douleur au niveau du site atteint à cause d'un important afflux de cellules immunitaires et de molécules plasmatiques recrutées pour protéger l'organisme. L'inflammation est initiée par les cellules immunitaires résidentes que sont les macrophages et les cellules dendritiques qui détectent les agents pathogènes ou la destruction tissulaire et répondent en sécrétant des médiateurs proinflammatoires. De part son réservoir important et ses capacités migratoires, le neutrophile est la cellule immunitaire circulante la plus rapidement recrutée dans le site inflammatoire. Le recrutement des neutrophiles est initié par les cellules vasculaires endothéliales qui forment les capillaires irrigant le site inflammatoire. Ces cellules sont alertées par l'IL-1 $\beta$  et le TNF produits sur le site inflammatoire ce qui provoque leur expression de la P-sélectine et E-sélectine (Bevilacqua et al., 1989). Les neutrophiles transportés par la circulation sanguine expriment sous forme d'ilots la P-selectin ligand-1 (PSGL-1), pouvant reconnaître ses ligands (P- et E-sélectines) à la surface des cellules endothéliales (Sundd et al., 2012). On donne le nom de « roulement » à cette première étape du recrutement neutrophilique car les points de contacts entre les sélectines et PSGL-1 sont défaits par la pression sanguine pour être reformé plus loin sur la membrane des neutrophiles (Sundd et al., 2012). Ce phénomène entraîne un roulement des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales, ralentissant son déplacement (Granger and Smith, 1993; Ley et al., 1991).

L'étape de roulement permet aux neutrophiles de reconnaître des molécules inflammatoires présentées par les cellules endothéliales, c'est l'étape d'activation. Les cellules endothéliales expriment, dans la lumière des vaisseaux sanguins, des heparane sulfates. Ces structures de charge négative s'associent avec les molécules qui proviennent du site inflammatoire et qui sont chargées positivement. Par ce système, les cellules endothéliales présentent des molécules permettant l'activation des neutrophiles, comme l'IL-8 ou le CCL5, et empêchent leur dissémination par la pression sanguine (Kuschert et al., 1999). Pour certaines chimiokines, comme l'IL-8 ou le CXCL1, ce rôle de présentation peut aussi être assuré par les récepteurs « Duffy antigen receptor of chemokines » (DARC) spécialisés dans le contrôle de la migration des cellules comme le neutrophile (Pruenster et al., 2009).

L'activation permet l'arrêt des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales en terminant le roulement, c'est l'étape d'adhérence. En effet, puisque le CXCL1 et l'IL-8 (ou son homologue fonctionnel chez la souris le MiP-2) sont exprimés par les cellules endothéliales, ils peuvent être reconnus par leur récepteur commun le CXCR2, exprimé sur les neutrophiles. Cette reconnaissance induit un signal intrinsèque aux neutrophiles qui aboutit à l'activation de ses intégrines LFA-1 et Mac-1 (Seo et al., 2001). LFA-1 est un dimère composé du CD11a et du CD18 et, similairement, Mac-1 est composé du CD11b et du CD18. La stimulation des neutrophiles augmente l'expression de ces intégrines et leur capacité à reconnaître leur ligand ICAM-1 et ICAM-2 (« intercellular adhesion molecule »-1 et -2) exprimés par les cellules endothéliales. Ainsi le niveau d'expression des intégrines comme CD11b est associé au niveau d'activation des neutrophiles. L'interaction entre le couple LFA-1/Mac-1 et leur ligands ICAM-1/ICAM-2 marque l'arrêt des neutrophiles à la surface de l'endothélium vasculaire. Enfin, cette interaction permet aux neutrophiles de traverser l'endothélium soit entre deux cellules (voie paracellulaire) ou à travers une cellule endothéliale (voie transcellulaire) (Henderson et al., 2001).

Après avoir répondu à l'IL-8 pour traverser l'endothélium vasculaire, les neutrophiles pénètrent dans le tissu en suivant un gradient de chimiokines dominant comme le bacteria-derived N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) (Foxman et al., 1997). Le fMLP est un dérivé de composants bactériens et donc est lié à une infection, mais la migration des neutrophiles est aussi stimulée en absence d'infection notamment par l'ADN mitochondrial libéré par les cellules qui entrent en nécrose suite à des dommages tissulaires (Zhang et al., 2010). Les cellules en nécrose perdent l'intégrité de leur membrane et sont source de nombreuses molécules

inflammatoires. Notamment, la libération dans le milieu extracellulaire de la « Dual Oxidase » (DUOX), génère un gradient de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui attire les neutrophiles (Niethammer et al., 2009). Ces molécules issues de la rupture de l'intégrité des cellules du tissu sont appelées « Damage-Associated Molecular Patterns » (DAMP) et sont reconnues par les « Pattern Recognition Receptor » (PRR) du neutrophile détaillés ci-dessous.

Des études récentes indiquent que le recrutement des neutrophiles dans les organes et aussi contrôlé par le rythme circadien. Ainsi, même en absence d'infection, les neutrophiles infiltrent quotidiennement certains tissus. Nous avons évoqué que les neutrophiles sénescents sont dirigés vers le foie ou les intestins pour être éliminés, et cela de façon dépendant du cycle jour/nuit. De nombreux neutrophiles infiltrent également les poumons pendant la journée et stimulent ainsi la production de transcrits associés au rythme circadien dans les cellules pulmonaires (Casanova-Acebes et al., 2018). Cela indique un rôle physiologique des neutrophiles dans l'homéostasie tissulaire, mais ce recrutement cyclique des neutrophiles possède aussi un rôle dans certaines pathologies comme le cancer puisque qu'il est notamment responsable de l'invasion des poumons par les cellules de mélanome (Casanova-Acebes et al., 2018).

En condition inflammatoire, la combinaison de plusieurs facteurs liés à l'initiation de l'inflammation induit l'adressage des neutrophiles vers le site de l'agression pour leur permettre de participer à l'amplification de la réponse immunitaire.

## **L'activation des neutrophiles**

Certains DAMP que nous venons d'évoquer pour le rôle de chemoattractants, sont aussi source de stimuli pour les fonctions effectrices des neutrophiles (Zhang et al., 2010). Lorsque la rupture de l'intégrité tissulaire est associée à une infection, d'autres signaux viennent s'ajouter pour stimuler les neutrophiles. Ces signaux associés aux agents pathogènes sont regroupés sous l'acronyme « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMP) et se composent de motifs exprimés par les agents pathogènes et reconnus par les PRR. Les récepteurs PRR peuvent être divisés en sous familles comprenant les récepteurs transmembranaires, « Toll like receptors » (TLR) et « C-type lectin receptor » (CLR) mais aussi les récepteurs cytoplasmiques de type « nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors » (NLR) et « retinoid acid-inducible gene I-

like receptors » (RLR). Les neutrophiles expriment les TLR1 à 10. Les TLR1, 2, 4 et 6 reconnaissent divers composant de la paroi des bactéries. Par exemple, le TLR4, qui reconnaît le LPS bactérien (Hoshino et al., 1999), est particulièrement important pour le contrôle de l'infection par les bactéries Gram-négatives (Jack et al., 1997). Le TLR-5, quant à lui, reconnaît la flagelline des bactéries. Les TLR3, 7,8 et 9 sont responsables de la reconnaissance des agents pathogènes internalisés par la détection de l'ARN simple brin ou double brin viral et de motifs CpG méthylés sur l'ADN bactérien (Hemmi et al., 2000; Tabeta et al., 2004; Yang et al., 2005). Le TLR10 quant à lui s'associe au TLR2 et module son activité (Oosting et al., 2014). Parmi les autres types de PRR, Les CLR dectin-1 et dectin-2 permettent aux neutrophiles de reconnaître les agressions fongiques (Kennedy et al., 2007; McDonald et al., 2012). Concernant les NLR, les neutrophiles expriment le NLRP3 dont on ignore le ligand mais qui est important pour la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les neutrophiles dans divers conditions inflammatoires (Mankan et al., 2012). Enfin, les neutrophiles expriment les RLR retinoid acid-inducible gene 1 (RIG-I) et melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA-5), des hélicases qui ont pour ligand l'ARN double brin des virus (Yoneyama et al., 2005).

En somme, les neutrophiles expriment un très large éventail de PRR pour reconnaître tout type d'intrusion et stimuler leurs fonctions effectrices.

## **Les réponses des neutrophiles activés**

Suite à leur activation, les fonctions principales des neutrophiles se résument en 4 mécanismes : phagocytose, dégranulation, production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène ou de l'azote (ROS/RNS) et formation de « neutrophil extracellular traps » (NET).

Nous avons mentionné que les neutrophiles pouvaient reconnaître directement les agents pathogènes via leur divers PRR. L'activation peut induire l'encapsulation de l'agent pathogène par la membrane plasmique du neutrophile dans un phénomène appelé phagocytose. Ceci est permis par le recrutement des protéine Rho, Rac et cdc42 qui modulent la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine afin de réorganiser le cytosquelette (Nobes and Hall, 1995; Ridley and Hall, 1992), entraînant la formation de structures membranaires (Caron, 1998). Cela résulte en l'internalisation de l'agent pathogène par le neutrophile dans une vésicule appelée phagosome. L'étape d'internalisation peut être efficacement favorisée par l'opsonisation de

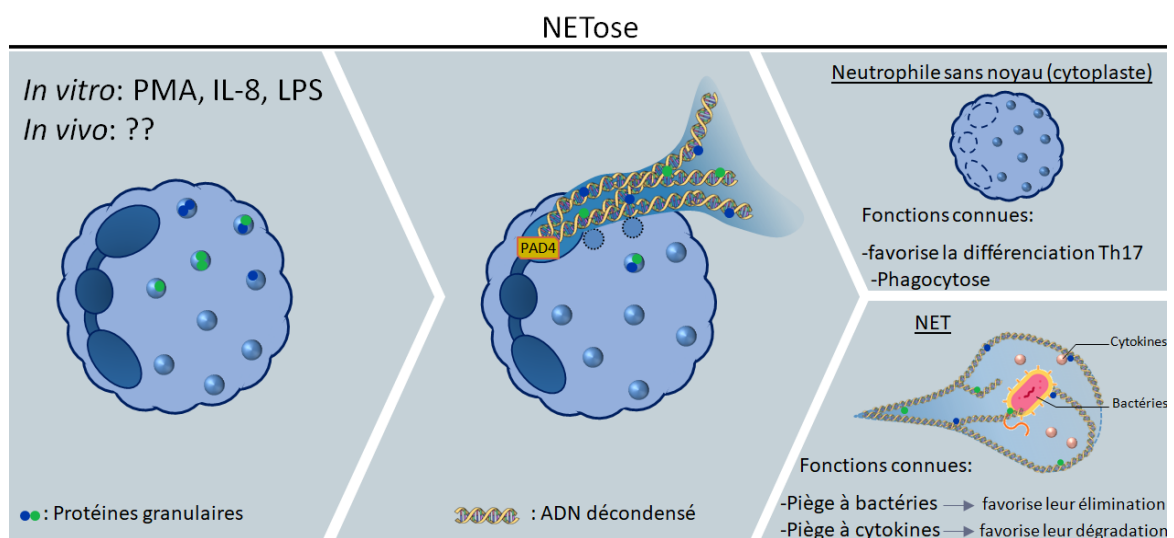
l'agent pathogène, c'est-à-dire son recouvrement par des molécules immunitaires facilitant sa reconnaissance par le neutrophile. L'opsonisation est assurée par les anticorps spécifiques de l'agent pathogène ainsi que par la molécule du complément C3b. Les anticorps reconnaissent l'agent pathogène par leur partie variable et sont facilement reconnus par les neutrophiles via les récepteurs pour les fractions constantes des anticorps (FcR). Cette reconnaissance indirecte de l'agent pathogène facilite son internalisation (Heineke et al., 2017; Rivas-Fuentes et al., 2010). Le C3b est une molécule issue de la cascade du complément qui se fixe aux membranes et qui est systématiquement éliminée de la surface des cellules saines mais pas sur les cellules apoptotiques ou les agents pathogènes (Ollert et al., 1995). Les corps ainsi opsonisés sont reconnus par les neutrophiles via le récepteur Mac-1. Nous avons vu ce récepteur dans son rôle d'intégrine facilitant la transmigration du neutrophile mais ici, en liant le C3b, il induit le processus de phagocytose (Lukácsi et al., 2017). La phagocytose liée au C3b peut être facilitée par la présence du complexe « Mannose-binding complexe » (MBL), promoteur de la cascade du complément (Brouwer et al., 2008). Après l'internalisation, le phagosome fusionne avec les granules des neutrophiles pour éliminer l'agent pathogène phagocyté (Johnson and Criss, 2013). L'activation des neutrophiles et la fusion du phagosome avec les granules entraînent la formation du complexe NADPH oxydase (NOX) à partir de ses sous unités cytosoliques et transmembranaires (Anderson et al., 2010). Cette oxydase génère dans le phagosome une forte concentration d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui ont un potentiel toxique envers les agents pathogènes. Ainsi, la mutation de cette enzyme est associée à la « chronic granulomatous disease » (CGD), une pathologie due à un défaut d'élimination des agents pathogènes phagocytés par les neutrophiles (Roesler et al., 2000). La NOX génère le ROS  $H_2O_2$  qui en plus de son action destructrice, sert de substrat à une autre enzyme granulaire, la myéloperoxydase (MPO). Celle-ci génère d'autres radicaux au potentiel antibactérien comme le HOCL (Klebanoff, 1968). Similairement aux ROS, les phagosomes des neutrophiles activés contiennent des taux élevés d'espèces réactives de l'azote (RNS). L'enzyme « inducible Nitric Oxyde Synthase » (iNOS) induit notamment la production de Nitric Oxyde (NO) ayant un rôle redondant avec les ROS (Wheeler et al., 1997). En effet des souris déficientes pour NOX et iNOS développent des infections spontanées alors que les souris déficientes uniquement pour l'une des enzymes ne présentent pas de phénotype particulier à l'état basal (Shiloh et al., 1999). Outre la production d'espèces réactives, les protéases granulaires neutrophil élastase (NE) et cathepsin-G ont un rôle non redondant dans l'élimination des agents pathogènes phagocytés suite à la fusion entre le phagosome et les granules des

neutrophiles (Reeves et al., 2002). Celles-ci agissent principalement en dégradant les protéines constituant la paroi bactérienne.

Les granules ont donc un rôle important dans l'élimination des agents pathogènes phagocytés, mais leur contenu peut aussi être libéré dans le milieu extracellulaire par le processus de dégranulation. La libération des protéases dans le milieu extracellulaire induit directement la neutralisation des agents pathogènes bien que cela soit moins efficace que lorsqu'elles sont concentrées dans le phagosome. L'effet des protéases sécrétées dans l'élimination des pathogène est surtout indirect. Notamment, la NE favorise la transmigration de nouveaux neutrophiles vers le site inflammatoire (Ginzberg et al., 2001). Autrement, Les neutrophiles accumulent une quantité importante d'IL-8 qui est libérée lors du signal de dégranulation (Pellmé et al., 2006). La dégranulation déclenche aussi la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6, bien qu'il ne soit pas clair si ces dernières cytokines sont libérées lors de la dégranulation ou synthétisées *de novo* par les neutrophiles (Naegelen et al., 2015). Nous avons vu l'importance de l'IL-8 et de l'IL-1 $\beta$  dans le recrutement neutrophilique, ainsi la dégranulation des neutrophiles entraîne un afflux exponentiel de nouveaux neutrophiles sur le site inflammatoire.

Indépendamment de la dégranulation, les neutrophiles sécrètent certaines molécules dans le milieu extracellulaire. En plus de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8, il a été montré que, selon le contexte étudié, les neutrophiles sont une source potentielle de TNF- $\alpha$  (Shikama et al., 2016), d'IL-17 (Taylor et al., 2013) ou d'IL-10 (Zhang et al., 2009). Enfin, les neutrophiles sont d'importants producteurs de ROS extracellulaires. Le potentiel toxique des ROS ne représente pas leur fonction principale une fois libérés dans le milieu. Ces molécules sont plutôt à l'origine de signalisation favorisant la production de cytokines inflammatoires (Naik and Dixit, 2011), la dégranulation des neutrophiles (Grigorieva et al., 2016) ou encore la génération de NET (Al-Khafaji et al., 2016)(décrit ci-dessous).

La dernière activité antibactérienne des neutrophiles est la NETose, qui est la capacité à produire des NET (Brinkmann, 2004). La NETose consiste en l'expulsion dans le milieu extracellulaire de l'ADN décondensé en association avec des protéines granulaires du neutrophile afin de créer un maillage, véritable piège à bactérie (figure 2). Dans un premier temps, ce mécanisme a été montré comme dépendant du niveau oxydatif de la cellule et en particulier de l'activité de la NADPH oxydase (Fuchs et al., 2007). L'élévation en ROS entraîne la localisation nucléaire de la peptidylarginine déiminase 4 (PAD4) qui citrulline alors les histones. Cette citrullination induit la décondensation de l'ADN, nécessaire à la production de NET (Wang et al., 2009). Cependant d'autres ont montré que le phénomène de NETose, pouvait dans certains cas, être indépendant de la NADPH oxydase et donc du niveau oxydatif de la cellule (Pilszczek et al., 2010). Dans chacun des cas, l'ADN décondensé est associé aux protéines du neutrophiles, notamment l'histone H2A et des protéases granulaires (NE et cathepsin-G). Il a été montré que par ces molécules bactéricides, les NET tuent les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Shigella flexneri* (Brinkmann, 2004). Cependant d'autres chercheurs n'ont pas relevé de mortalité induite par les NET sur ces même bactéries (Menegazzi et al., 2012). La capacité des NET à tuer directement les bactéries peut être influencée par le mode d'induction des NET, le contexte inflammatoire du neutrophile ou des techniques d'échappement mises en place par les bactéries. En revanche, même en absence d'activité lytique sur les bactéries, les NET limitent la dissémination bactérienne en piégeant les bactéries dans leur maillage d'ADN (Menegazzi et al., 2012). Les stimulations permettant la production de NET *in vitro* font généralement intervenir le LPS (Clark et al., 2007), la « Phorbol 12-Myristate 13-



**Figure 2 : La NETose suicidaire.**

L'ajout *in vitro* de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) provoque chez le neutrophile l'expulsion de son ADN décondensé et associé à des protéines. Ce phénomène, associé à l'activation de l'enzyme peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4), engendre des « neutrophil extracellular traps » (NET) et des cytoplastes.



Acetate » (PMA) ou l'IL-8 (Brinkmann, 2004). Cependant, les signaux responsables de la production de NET *in vivo* restent incertains. Classiquement, l'ADN décondensé est libéré dans le milieu extracellulaire par rupture de la membrane plasmique, ce qui provoque la mort du neutrophile (NETose suicidaire, Fuchs et al., 2007), mais il a aussi été décrit une NETose vitale ne menant pas à la mort cellulaire grâce à l'expulsion de fragments d'ADN encapsulés dans des vésicules sécrétoires (Yipp et al., 2012). D'autres équipes ont montrées qu'un phénomène similaire à la NETose permettait de libérer l'ADN mitochondrial (et non l'ADN nucléaire) du neutrophile en conservant son intégrité cellulaire (Yousefi et al., 2009). Le neutrophile après une NETose classique est dépourvu de noyau, il est qualifié alors de cytoplaste et conserve des fonctions limitées de migration et de phagocytose (Malawista et al., 1989). Plus récemment, un équipe a montré que les cytoplastes pouvaient conditionner les cellules dendritiques pour la génération de lymphocytes Th17 (Krishnamoorthy et al., 2018). Les lymphocytes Th17 sont proinflammatoires et producteurs d'IL-17, une cytokine stimulant la granulopoïèse via l'induction de G-CSF (Schwarzenberger et al., 2000). Ainsi, la génération de Th17 par les cytoplastes favorise indirectement le recrutement de nouveaux neutrophiles et l'amplification de la réponse inflammatoire.

En résumé, les neutrophiles sont très rapidement recrutés sur le site inflammatoire et doivent intervenir immédiatement pour contenir la dissémination des agents pathogènes. Pour cela, ils phagocytent les agents pathogènes directement reconnus ou opsonisés, libèrent le contenu de leurs granules ou produisent des NET et des ROS. Mais, comme acteur principal de la réponse inflammatoire, ils interagissent aussi avec de nombreux partenaires du système immunitaire.

### **Les neutrophiles promoteurs de l'inflammation**

Avec l'assomption que la durée de vie des neutrophiles est bien supérieure à celle originellement décrite, des équipes ont étudié un potentiel rôle des neutrophiles dans la modulation de la réponse immunitaire, en particulier en étudiant son interaction avec d'autres cellules du système immunitaire.

La mise en place de l'inflammation par les neutrophiles favorise le recrutement et l'activation de l'immunité adaptative. L'activation des lymphocytes  $T\gamma\delta$  fait partie des premiers événements de la réponse des lymphocytes T. Les neutrophiles participent à l'activation des  $T\gamma\delta$  et induisent leur prolifération par la production de (E)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) (Davey et al., 2011). Ce métabolite

est issu de la phagocytose des bactéries par les neutrophiles, suggérant un rôle de l'interaction lymphocyte  $T\gamma\delta$ /neutrophile dans l'immunité antibactérienne. Par ailleurs, l'activation des lymphocytes T nécessite la maturation des cellules dendritiques présentant l'antigène. Cette maturation est facilitée par la reconnaissance du « Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin » (DC-SIGN) des cellules dendritiques par l'intégrine Mac-1 des neutrophiles (van Gisbergen et al., 2005). Ainsi, les neutrophiles induisent indirectement la différenciation et l'activation des lymphocytes T.

Les neutrophiles ne sont pas prisonniers du site inflammatoire. Il a été mis en évidence qu'une proportion d'entre eux repasse à travers la paroi vasculaire pour retourner dans le sang. Cette capacité de « reverse migration » (ou migration transendothéliale) a été décrite en premier lieu *in vivo* chez le zebrafish (Mathias et al., 2006), puis confirmée chez la souris (Woodfin et al., 2011). Le rôle précis de ces neutrophiles activés sur le site inflammatoire qui retournent dans la circulation sanguine n'est pas encore clairement déterminé. Certains ont proposé que ce mécanisme favorise la résolution de l'inflammation en éliminant les neutrophiles du site inflammatoire (Mathias et al., 2006). D'autres laissent supposer que la « reverse migration » est la résultante d'une inflammation grave et engendre une dissémination cellulaire favorisant l'atteinte d'organes distants du site inflammatoire primaire (Wu et al., 2016). Mais ce qui nous intéresse ici, est la « reverse migration » des neutrophiles qui leur permet de se relocaliser dans les organes lymphoïdes pour interagir avec des cellules immunitaires. En effet, certains d'entre eux rejoignent la zone marginale de la rate pour interagir avec les lymphocytes B. Les neutrophiles peuvent produire du « B-cell activating factor » (BAFF), de l'« a proliferation-inducing ligand » (APRIL) et l'IL-21 qui stimulent la commutation de classe, l'hypermutation somatique et la production d'anticorps par les lymphocytes B (Puga et al., 2012). La moelle osseuse est aussi un lieu d'adressage des neutrophiles après « reverse migration ». Dans un modèle d'infection virale, des neutrophiles migrent dans la moelle osseuse pour interagir avec les lymphocytes T  $CD8^+$  et participer à l'installation d'une mémoire immunitaire (Duffy et al., 2012).

Similairement, des neutrophiles activés ont été retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (Maletto et al., 2006) et possèdent la capacité de présenter des antigènes directement aux lymphocytes T  $CD4^+$  (Abi Abdallah et al., 2011) et T  $CD8^+$  (Beauvillain et al., 2007) induisant leur prolifération et différenciation. Les neutrophiles responsables de l'activation des lymphocytes expriment fortement les molécules associées à la présentation antigénique que sont le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et les molécules de

costimulation CD80/CD86 (Abi Abdallah et al., 2011; Beauvillain et al., 2007). Ces molécules sont faiblement ou non exprimées par les neutrophiles quiescents mais induites par l'interaction avec les lymphocytes T. Nous pouvons ajouter à cela l'effet des NET qui pré-activent les lymphocytes T, les rendant plus sensibles à la présentation antigénique *in vitro* par un mécanisme encore indéterminé (Tillack et al., 2012).

Les neutrophiles ont donc un rôle important dans la progression de l'inflammation et la mise en place de la réponse adaptative via leurs nombreuses interactions aux conséquences proinflammatoires.

## **Les neutrophiles régulateurs**

Bien que les neutrophiles soient classiquement associés à leurs propriétés proinflammatoires, certaines évidences nous informent sur l'importance de leur rôle immuno-régulateur. Par exemple, la délétion des neutrophiles dans le modèle murin inflammatoire de Dry Eye Disease aggrave l'inflammation et donc la pathologie (Gao et al., 2015).

En premier lieu, les protéases NE et cathepsine-G libérées lors de la dégranulation diminuent le niveau inflammatoire en dégradant les récepteurs pour l'IL-2 et l'IL-6 à la surface des cellules cibles ainsi qu'en ciblant directement l'IL-6 (Bank et al., 1999). De façon intéressante la capacité des protéases neutrophiliques à diminuer la concentration en cytokines inflammatoires est favorisée lorsqu'elles sont complexées aux NET et en particulier dans un contexte de fort infiltrat neutrophilique comme dans la goutte (Schauer et al., 2014). Le potentiel anti-inflammatoire des NET a aussi été décrit par notre équipe. Les NET inhibent la production d'IL-6 et favorisent la sécrétion d'IL-10 par les macrophages activés et cette action est potentialisée par la présence de la protéine du complément C1q (Ribon et al., 2019). De façon importante les NET ont un rôle pro-inflammatoire si les cellules cibles ne sont pas activées, indiquant un rôle ambivalent du NET dépendant du contexte. Parallèlement, des neutrophiles sécrétant la cytokine régulatrice IL-10 ont été décrits chez la souris suite à une infection bactérienne (Zhang et al., 2009). Ces données impliquant des produits des neutrophiles dans des fonctions inhibitrices suggèrent l'existence de neutrophiles régulateurs.

La première évidence de vraie sous-population de neutrophile régulateur vient du contexte tumoral, ou sous l'influence du « Transforming Growth Factor » (TGF- $\beta$ ), les neutrophiles adoptent un phénotype favorisant la progression tumorale appelé « tumor associated neutrophil » (TAN) (Fridlender et al., 2009). De

façon intéressante, le blocage du TGF- $\beta$  dans ce modèle murin de tumeur modifie le comportement des TAN, les rendant anti-tumoraux. Par analogie avec les macrophages M1 et M2, les neutrophiles anti-tumoraux ont été nommés N1 et les pro-tumoraux, N2 (Fridlender et al., 2009). L'activité pro-tumorale des N2 est due à une inhibition des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> luttant contre la tumeur, à l'inverse les N1 limitent la progression tumorale par une cytotoxicité directe contre les cellules tumorales. Ainsi, le TGF- $\beta$  produit dans l'environnement tumoral contrôle une certaine plasticité des neutrophiles vers une fonction régulatrice N2. A ce jour, aucun marqueur précis ne permet de clairement distinguer les N1, des N2 ou même des neutrophiles non tumoraux.

Parallèlement, chez des patients atteints de cancer, des neutrophiles de faible densité présentant une activité immunosuppressive caractérisée par une inhibition des lymphocytes T on été détectés et qualifiés de « Low Density Neutrophils » (LDN). En pratique, le sang est classiquement déposé sur un gradient de densité pour en séparer les cellules chez le donneur sain. Les neutrophiles sont très denses de part leur contenu granulaire et leur noyau multilobé, ils sont donc facilement séparés des cellules mononuclées du sang (« peripheral blood mononuclear cells » ou PBMC). Cependant, chez les patients atteints de cancer, des neutrophiles peuvent être retrouvés parmi les cellules de faible densité, justifiant leur qualificatif de LDN. Ces cellules présentent des propriétés immunosuppressives (Rodriguez et al., 2009), laissant supposer que les LDN pouvaient représenter les neutrophiles régulateurs. Cependant, ceci n'est pas valable dans tous les contextes puisque les LDN sont considérés comme hautement proinflammatoires dans des pathologies auto-immunes (Denny et al., 2010; Hacbarth and Kajdacsy-Balla, 1986). Enfin, il a été montré chez des patients traités par le G-CSF, que parmi les LDN, il est possible de détecter des populations non régulatrices et que parmi les neutrophiles à densité normale, il est possible de trouver des neutrophiles aux fonctions inhibitrices (Marini et al., 2017) invalidant un peu plus la caractérisation des LDN comme neutrophiles régulateurs en dehors du contexte tumoral. Cette dernière équipe propose la molécule CD10 comme un marqueur plus fiable représentatif des neutrophiles régulateurs.

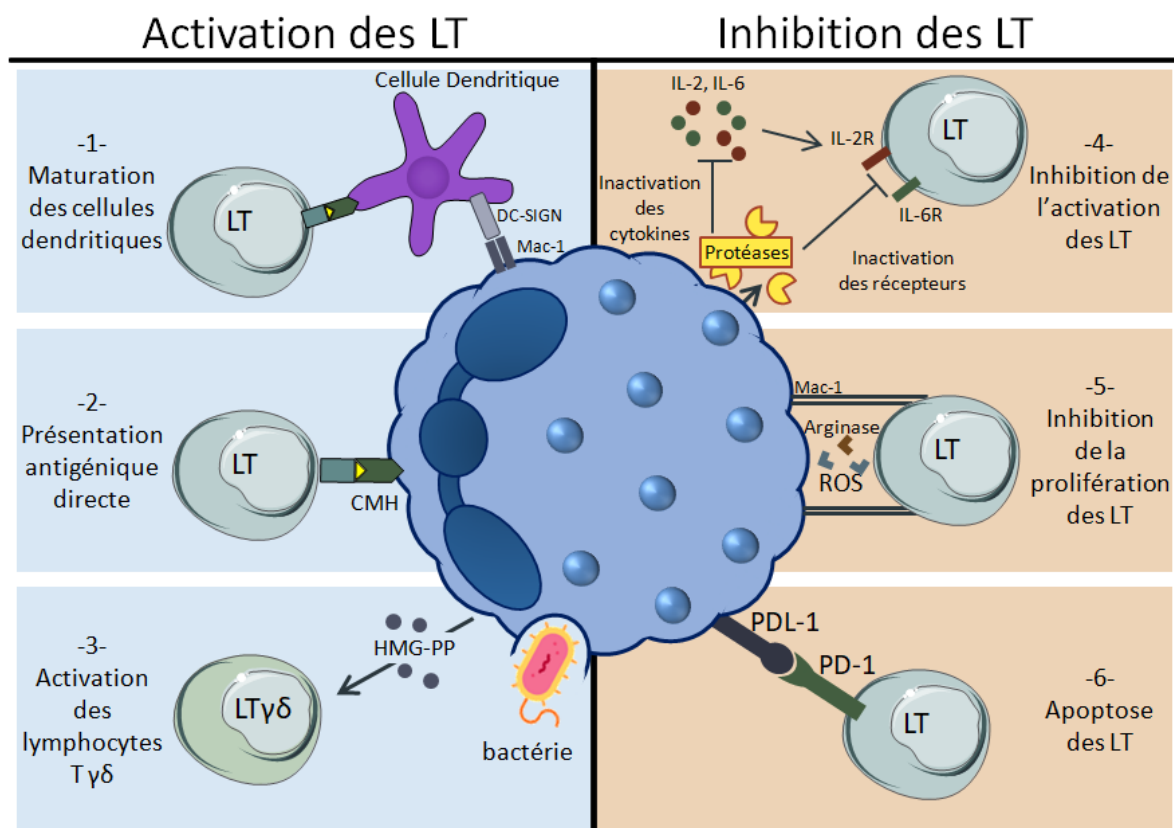
Ces neutrophiles humains CD10<sup>+</sup> sont induits par le G-CSF et possèdent la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T par un contact dépendant de Mac-1 et de la sécrétion locale d'Arg-1 (Marini et al., 2017). L'Arg-1 est libérée des granules des neutrophiles et appauvrit le milieu en L-arginine qui est un acide aminé essentiel à la prolifération lymphocytaire (Rodriguez et al., 2007) et au maintien de l'expression du « T cell receptor » TCR (Rodriguez et al., 2002). Cette étude révèle aussi que les neutrophiles CD10<sup>-</sup> ne possèdent

pas d'activité suppressive mais au contraire, stimulent la prolifération des lymphocytes T. Cependant, chez le sujet sain, tous les neutrophiles sont CD10<sup>+</sup> et ne présentent pas d'activité suppressive, cette terminologie n'est donc valable que chez le patient. Ainsi, les CD10<sup>+</sup> constituent une population de neutrophiles clairement identifiée comme régulatrice mais son apparition est restreinte au contexte très particulier qu'est le traitement de patients par le G-CSF.

Similairement, le LPS induit une population neutrophilique régulatrice inhibant la prolifération des lymphocytes T par contact direct impliquant Mac-1 et la production de ROS dirigés contre le lymphocyte (Pillay et al., 2012). Le stress oxydatif généré par les ROS inhibe l'expression du TCR (Otsuji et al., 1996) ainsi que la voie de signalisation du « Nuclear Nactor-kappa B » (NF-κB) (Malmberg et al., 2001) importantes pour l'activation des lymphocytes T. Dans ce cas, les neutrophiles régulateurs ont été caractérisés comme CD11c<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup>/CD11b<sup>high</sup>/CD16<sup>high</sup>. Ce profil d'expression est étroitement lié à un niveau d'activation élevé des neutrophiles, difficile donc de clairement les différencier des neutrophiles activés non régulateurs. Seule une étude protéomique à large échelle permet des les différencier, et définit ces cellules comme favorisant l'expression de protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire, la régulation du système immunitaire et la présentation antigénique (Tak et al., 2017). De façon intéressante l'inhibition observée envers les lymphocytes est dépendante d'un contact cellulaire via Mac-1, ce qui est commun aux neutrophiles CD10 producteurs d'Arg-1. Comme ni l'expression de CD10, ni l'implication d'Arg-1, n'ont été analysées dans ces études, on ne peut pas relier ces deux populations neutrophiliques pourtant très proches fonctionnellement.

Enfin, les neutrophiles peuvent inhiber les lymphocytes T en induisant leur apoptose. Dans un modèle de septicémie, l'IFN-γ induit l'expression de « Programmed Death receptor Ligand 1 » (PD-L1) sur les neutrophiles qui en se liant à son récepteur le « Programmed Death receptor 1 » (PD-1) sur les lymphocytes, induit leur apoptose (de Kleijn et al., 2013). Ce mécanisme d'inhibition a aussi été décrit chez une population de neutrophile tumorale (Wang et al., 2017). Les neutrophiles PD-L1<sup>+</sup> peuvent donc aussi être considérés comme régulateurs.

En conclusion, selon le contexte inflammatoire, les neutrophiles possèdent des rôles ambivalents dans leurs interactions avec les cellules immunitaires, en particulier avec les lymphocytes T (résumé figure 3). En suivant les progrès réalisés avec les populations lymphocytaires et macrophagiques, les neutrophiles se voient aussi, petit à petit, segmentés en sous-populations selon leur fonction, leur phénotype et le contexte immunitaire. Un effort particulier est prodigué pour déterminer l'origine et les caractéristiques phénotypiques liées aux neutrophiles régulateurs, puisque ceux-ci se démarquent nettement du neutrophile classiquement défini comme promoteur de la réponse inflammatoire. Dans ce contexte de l'analyse et d'identification du neutrophile immuno-modulateur, nous avons étudié son interaction avec la population régulatrice par excellence du système immunitaire qu'est le lymphocyte T régulateur (Treg).



**Figure 3 : Rôle ambivalent du neutrophile sur les lymphocytes T (LT).**

Les neutrophiles peuvent activer les LT (1) indirectement en induisant la maturation des cellules dendritiques; (2) présentation antigénique directe via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH); (3) libération de métabolites microbiens (HMG-PP après phagocytose pour activer les LT $\gamma\delta$ ). Parallèlement, les neutrophiles inhibent l'activation des LT par la libération de protéases (4), la serine protéase élastase et la cathepsine G dégradant l'IL-6 ainsi que les récepteurs pour l'IL-2 et l'IL-6 à la surface des LT; (5) production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'arginase. Cela résulte en l'inhibition de la prolifération des LT par la diminution de l'expression du TCR. (6) Expression du PDL-1. L'interaction PD-L1 / PD1 induit l'apoptose des LT.

# Les lymphocytes T régulateurs

## Le développement des Treg thymiques

Les Treg sont des lymphocytes T  $CD4^+$ , ainsi, pour introduire leur processus de différenciation il faut commencer par introduire la différenciation du lymphocyte T. Dans la moelle osseuse, le premier précurseur notable des lymphocytes T est l'early lymphoid progenitor (ELP) (Igarashi et al., 2002), qui s'oppose au common lymphoid precursor (CLP) des lymphocytes B et aux précurseurs de granulocytes. Les ELP quittent la moelle osseuse par la circulation sanguine afin de rejoindre l'organe principal de la différenciation des lymphocytes T, le thymus (Schwarz and Bhandoola, 2004). Une fois dans le thymus, les progéniteurs des lymphocytes T se localisent dans la zone sous capsulaire du thymus et sont alors appelés early thymic progenitor (ETP) (Allman et al., 2003). Les ETP s'organisent en niches cellulaires constituées de fibroblastes thymiques, qui favorisent leur différenciation en lymphocytes T (Buono et al., 2016). Cette différenciation se déroule en plusieurs étapes où les cellules perdent progressivement l'expression de la protéine d'adhésion CD44 et expriment transitoirement la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25). Les lymphocytes T se différencient alors selon 4 stades successifs  $CD44^+CD25^-$  (DN1),  $CD44^+CD25^+$  (DN2),  $CD44^-CD25^+$  (DN3) et  $CD44^-CD25^-$  (DN4) (Godfrey et al., 1993). Les fibroblastes thymiques fournissent aux DN1 les ligands nécessaires à la transition en DN2 que sont le c-kit ligand (Buono et al., 2016) et le ligand du récepteur Notch (Schmitt et al., 2004). La transition cruciale du stade DN2 à DN3 est marquée par l'expression de la chaîne  $\beta$  du T cell receptor (TCR), marquant l'engagement définitif du précurseur vers le lignage T (Mombaerts et al., 1992).

Afin de bien comprendre l'importance de cette étape de la différenciation du lymphocyte T, un aparté sur le TCR est nécessaire. Le TCR des lymphocytes T permet de faire la différence majeure entre immunité innée et immunité adaptative. En effet, ce récepteur confère aux lymphocytes une spécificité de reconnaissance pour un antigène unique, là où les cellules myéloïdes comme les neutrophiles expriment des PRR permettant de reconnaître divers agents pathogènes par des motifs conservés (voir Activation des neutrophiles). Afin de diversifier les motifs reconnus par les lymphocytes, chaque cellule exprime un TCR différent, avec une spécificité différente. Il faut alors comprendre comment une telle diversité est possible pour un même récepteur. La solution se trouve dans le mode particulier de production de la protéine TCR. Celle-ci se compose

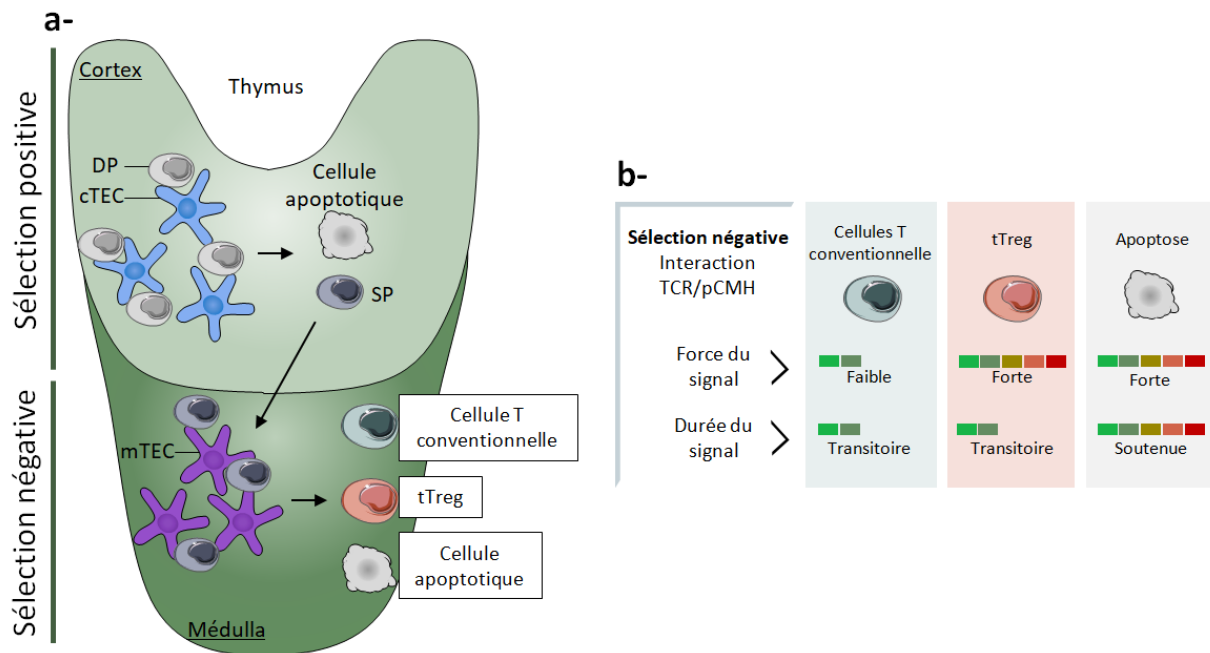
de deux chaînes protéiques définies  $\alpha$  et  $\beta$  (j'ometts ici les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  à l'origine des lymphocytes  $T\gamma\delta$ , puisque ceux-ci ne génèrent pas de Treg par la suite). La chaîne  $\beta$  est divisée en trois parties désignées variable (V), diverse (D) et de jonction (J). La chaîne  $\alpha$  est structurellement similaire mais ne possède pas de domaine D. Chaque domaine V, D et J est codé par un nombre élevé de séquences génomiques différentes, et la première étape consiste en la sélection du segment qui codera pour chaque domaine. Cela est assuré par l'enzyme « recombination activating genes » RAG (Wilson, 1994), qui génère des coupures aléatoires de l'ADN au niveau de séquences cibles encadrant les segments V, D et J (McBlane et al., 1995). En premier lieu une coupure est générée en amont d'une séquence J aléatoire puis en aval d'une séquence D aléatoire encore. S'en suit un réarrangement de l'ADN pour relier les deux séquences, ce qui peut entraîner l'ajout ou la délétion de plusieurs nucléotides (Komori et al., 1993). Similairement, une coupure en amont de la séquence DJ recombinée suivie d'une coupure en aval d'une séquence V aléatoire entraîne un autre réarrangement de l'ADN (Sleckman et al., 2000). Le réarrangement des différents segments engendre une séquence VDJ continue permettant la transcription de la chaîne  $\beta$ . La chaîne  $\alpha$  suit un processus identique mais ne comprend qu'un réarrangement entre un segment V et un segment J. Enfin les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  s'associent pour former le TCR. Cette recombinaison de l'ADN est absolument nécessaire au développement des lymphocytes T, puisque la mutation de la protéine RAG entraîne une sévère lymphopénie (Shinkai, 1992). De par le nombre de séquences V, D et J, l'ajout de nucléotides aléatoires suite aux recombinaisons et l'appariement des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , les combinaisons possibles, et donc les spécificités différentes de TCR pouvant être générées, sont virtuellement infinies (Robins et al., 2009). Il est important de noter que le TCR n'a pas pour rôle de reconnaître directement sa cible mais des peptides présentés par les CMH, il doit donc reconnaître un complexe composé d'un peptide ainsi que la molécule conservée du CMH. Cela signifie que les TCR générés aléatoirement doivent être sélectionnés par leur habilité à reconnaître le CMH, étape que nous détaillerons plus loin.

Pour en revenir aux étapes de la différenciation des lymphocytes T, le stade DN3 est caractérisé par l'expression de la protéine RAG induisant la recombinaison de la chaîne  $\beta$  du TCR (Wilson, 1994). L'expression de la chaîne  $\beta$  à la surface de la cellule n'est pas stable, la chaîne  $\beta$  est alors associée à une pseudo-chaîne  $\alpha$ ,  $p\alpha$  pour former le pre-TCR. L'expression du pre-TCR permet la différenciation en DN4 (Fehling et al., 1995). D'un point de vue spatial, la progressive différenciation du stade DN1 à DN4 s'associe à une expression croissante du CXCR4, qui dirige les cellules vers les fibroblastes de la zone corticale du thymus exprimant le CXCL12 (Kim et al.,



1998). L'expression différentielle du CXCR4 par les DN crée des espaces réservés à chaque stade de différenciation dans la zone sous capsulaire du thymus (Lind et al., 2001). La combinaison de cette migration et de la signalisation du pre-TCR entraîne l'expression du CD4 et du CD8 sur les lymphocytes en fin de différenciation, leur valant l'appellation de cellules double positives (DP) par opposition aux DN précédemment citées. Le CD4 et le CD8 sont des corécepteurs du TCR et permettent la stabilisation de son interaction avec les molécules du CMH de classe II et de classe I respectivement. Afin de terminer la formation du TCR, c'est au stade DP que la chaîne  $\alpha$  du TCR est réarrangée en faisant intervenir la protéine RAG. Cette chaîne nouvellement formée prend alors la place de la  $p\alpha$  pour former le  $TCR\alpha\beta$  (Trop et al., 2000). L'expression du  $TCR\alpha\beta$  est associée à la molécule CD3 qui compose la partie intracellulaire nécessaire à la signalisation du TCR. Ainsi, le complexe  $TCR\alpha\beta/CD4/CD8/CD3$  forme le TCR fonctionnel à la surface du lymphocyte T. Enfin, suite à l'expression du TCR fonctionnel, le lymphocyte diminue l'expression du CXCR4 et exprime le CCR5, lui permettant de s'enfoncer dans la zone corticale du thymus (Aiuti et al., 1999; Norment et al., 2000).

C'est alors que les TCR de chaque lymphocyte vont être sélectionnés pour leur capacité à interagir avec le CMH I ou II, dans un processus appelé sélection positive. Dans le cortex, les molécules de CMH sont présentées par les cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC). Les lymphocytes portant un TCR capable de reconnaître le CMH II vont engager leur CD4, perdre l'expression du CD8 et recevoir des signaux de survie. Similairement, les lymphocytes pouvant reconnaître le CMH de classe I vont engager leur CD8 et perdre l'expression du CD4 (Teh et al., 1988). Les cellules ayant généré un TCR incapable de reconnaître le CMH ne recevront pas de signaux de survie et mourront par apoptose. La perte d'expression d'un des corécepteurs du TCR marque la transition du stade double positif au stade simple positif (SP)  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  (figure 4,a). A nouveau, l'avancé de la différenciation du lymphocyte s'accompagne par un changement d'expression de récepteurs aux chimiokines, lui permettant de quitter le cortex pour atteindre la medulla. Pour cela, le lymphocyte diminue encore l'expression du CXCR4, le retenant dans le cortex, et acquiert le CCR4 le dirigeant vers les cellules présentatrices thymiques de la medulla (Campbell et al., 1999; Chantry et al., 1999). Les cellules arrivées à ce stade expriment donc un TCR fonctionnel capable de reconnaître les molécules présentatrices. Mais, puisque généré aléatoirement, le TCR est susceptible de reconnaître n'importe quel antigène présenté par ces molécules, y compris des antigènes du soi. Une telle spécificité engendre des réponses auto-immunes



**Figure 4 : Différenciation des Lymphocytes T régulateurs thymiques (tTreg).**

a- Les cellules doubles positives  $CD4^+CD8^+$  (DP) possédant un TCR fonctionnel sont sélectionnées positivement en cellules simples positives  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  (SP) dans le cortex du thymus. Ensuite la sélection négative dans la médulla termine la maturation des SP. Les cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC) et les cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC) contrôlent respectivement ces 2 étapes. b- Les mTEC présentent des antigènes du soi sous forme de peptides complexés à leur CMH (pCMH). Lors de la sélection négative, l'interaction T cell receptor (TCR) avec le pCMH détermine le phénotype du lymphocyte.

délétères. Pour éviter cela, une étape supplémentaire de sélection thymique a lieu une fois dans la médulla, c'est la sélection négative.

La sélection négative thymique consiste à faire exprimer les antigènes du soi par les cellules présentatrices de la médulla, pour tester la spécificité des lymphocytes en différenciation. Pour cela, des cellules dendritiques (DC) circulent entre le thymus et la périphérie pour rapporter des antigènes du soi provenant de tous les organes et les présenter aux lymphocytes SP (Atibalentja et al., 2009). D'autre part les cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC) expriment d'elles mêmes, un large éventail d'antigènes du soi. Ceci est permis par les facteurs de transcription « Auto-Immune REgulator » (AIRE) et « Fez family zinc finger 2 » (Fezf2) qui induisent l'expression d'antigènes non thymiques destinés à être présentés par les mTEC (Anderson, 2002; Takaba et al., 2015). L'expression de AIRE et de Fezf2 dans les mTEC est cruciale pour le bon déroulement de la sélection négative, puisque leur délétion entraîne la libération de lymphocytes auto-réactifs (spécifiques d'antigènes du soi) dans la circulation, ce qui déclenche des troubles auto-immuns sévères (Anderson, 2002; Takaba et al., 2015). Il existe trois scénarios possibles suite à l'interaction entre un lymphocyte

SP et une mTEC : (i) le lymphocyte ne reconnaît pas d'antigène du soi présenté, il est alors autorisé à rejoindre la circulation comme cellule T conventionnelle (Tconv). (ii) Le lymphocyte reconnaît fortement un complexe CMH/peptide du soi présenté dans la medulla, il est alors sélectionné négativement et meurt par apoptose. (iii) Enfin, et c'est ce qui nous amène ici, si le lymphocyte reconnaît un complexe CMH/peptide du soi, mais n'est pas sélectionné négativement, il devient alors un lymphocytes T régulateur thymique (tTreg) (Hinterberger et al., 2010)(figure 4,a).

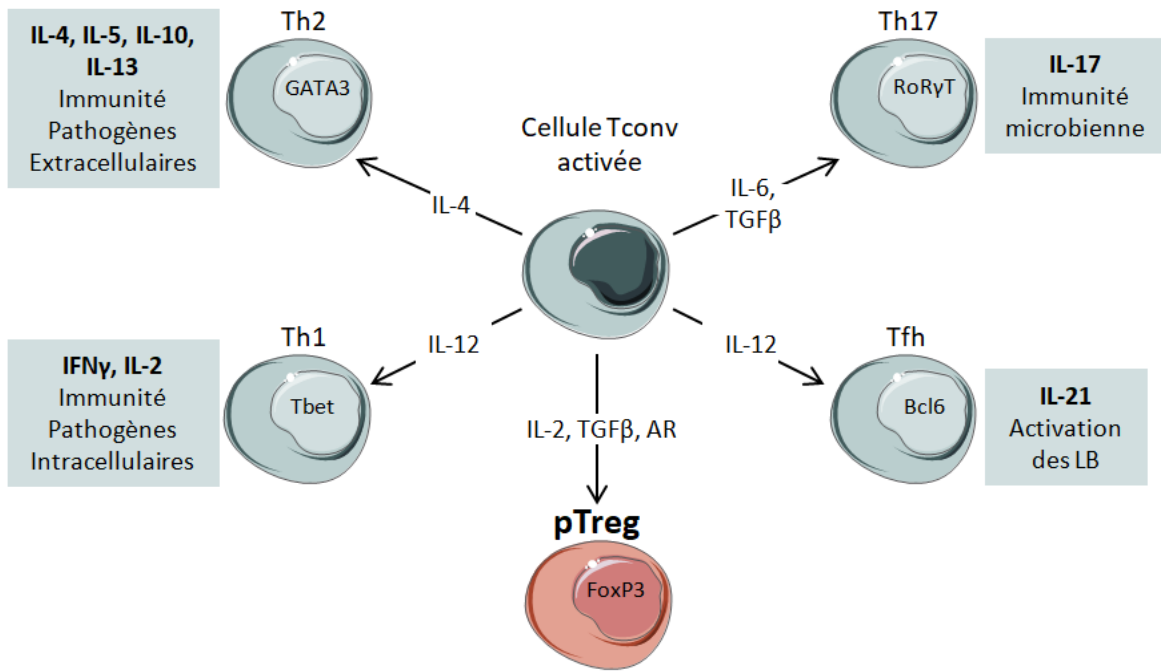
La sélection négative détermine donc le lignage Tconv ou tTreg. En effet, la délétion de AIRE ou de Fezf2 dans les mTEC, responsables de l'expression d'auto-antigène dans le thymus, abolie la différenciation en Treg en empêchant la sélection négative (Anderson, 2002; Takaba et al., 2015). Le répertoire de TCR exprimé par les Treg est donc similaire aux cellules sélectionnées négativement c'est-à-dire, auto-réactif. Il faut alors comprendre les signaux qui différencient l'induction de l'apoptose, de la différenciation en tTreg. Le choix du lignage entre tTreg ou Tconv est étroitement lié au TCR et en particulier à l'affinité avec laquelle le récepteur reconnaît son antigène. Dans un modèle murin d'expression de l'hémagglutinine (HA) dans le thymus, les cellules reconnaissant fortement l'HA se différencient en tTreg alors que ceux possédant un TCR de plus faible affinité ne se différencient pas (Jordan et al., 2001). Les tTreg reconnaissent fortement leur antigène, mais ne doivent pas soutenir un signal fort avec les mTEC au risque d'induire leur apoptose par la sélection négative classique. Il a été montré que la différenciation en tTreg est favorisée par des interactions transitoires entre le lymphocyte et la cellule présentatrice (Hinterberger et al., 2010; Sauer et al., 2008). Ainsi, le modèle dominant de différenciation du tTreg se compose de lymphocytes auto-réactifs possédant un TCR de haute affinité pour l'auto-antigène mais n'induisant pas de reconnaissance prolongé avec le complexe CMH/peptide du soi (figure 4,b). L'affinité du TCR contrôle donc la différenciation des tTreg en influençant leur durée de contact avec les CPA du thymus.

Enfin, les tTreg quittent le thymus par la circulation sanguine pour exercer leur rôle immunorégulateur en périphérie, achevant leur processus de différenciation. Cependant, les tTreg ne comptent pas pour la totalité des lymphocytes T régulateurs, puisque certains d'entre eux peuvent être différenciés, non pas dans le thymus, mais en périphérie. On parle alors de lymphocytes T régulateurs périphériques (pTreg).

## Le développement des Treg en périphérie

Une fois le processus de différenciation achevé dans le thymus, les Tconv et les tTreg se répandent dans la périphérie via le système sanguin, ils sont alors qualifiés de naïf ou « resting » (au repos). Les lymphocytes se concentrent dans les organes lymphoïdes secondaires (OL-II) comme la rate ou les différents ganglions lymphatiques. L'entrée des lymphocytes dans les OL-II se fait par des structures endothéliales spécialisées, les « high endothelial venules » (HEV) (Marchesi and Gowans, 1964). La transmigration des lymphocytes du sang vers les OL-II se déroule de façon similaire à la transmigration des neutrophiles détaillée précédemment. Une étape de rolling du lymphocyte est enclenchée par leur expression de la L-selectine qui ralentit leur course à l'approche d'une HEV (Galkina et al., 2007). L'activation suivie de la transmigration du lymphocyte sont initiées par le récepteur CCR7 qui reconnaît le CCL21, produit par les HEV (Förster et al., 1999). De façon similaire, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui ont été activées, et qui ont apprêtées des peptides antigéniques via leur CMH, sont aussi adressées dans les OL-II. L'activation des CPA induit notamment l'expression du CCR7 qui leur permet de se localiser au niveau des HEV productrices de CCL21, en étroite proximité avec les lymphocytes naïfs (Förster et al., 1999). Puisque les tTregs obéissent aux mêmes mécanismes migratoires, on assiste à un ménage à trois entre lymphocytes T naïfs, tTreg et CPA au cœur des OL-II (Tadokoro et al., 2006). Ainsi, les OL-II constituent des plateformes propices à l'interaction entre le TCR des lymphocytes et le complexe pCMH des CPA. En absence d'activation des lymphocytes, c'est-à-dire de reconnaissance de leur antigène spécifique, les cellules quittent l'OL-II pour la lymphe, par un mécanisme dépendant de la sphingosine-1-phosphate (S1P) (Schwab et al., 2005). La lymphe se déverse dans le sang, permettant ainsi aux lymphocytes de se rendre dans d'autres OL-II à la recherche de la CPA présentant l'antigène spécifique de leur TCR.

Lorsqu'un tTreg reconnaît spécifiquement l'antigène, il prolifère et met en jeu ses fonctions immunosuppressives que nous détaillerons plus bas. Lorsqu'un Tconv naïf reconnaît spécifiquement l'antigène, il prolifère et peut se différencier en diverses sous-populations de lymphocytes T effecteurs (Teff) proinflammatoires ou en cellule régulatrice pTreg (figure 5). Lors de la présentation antigénique, c'est la CPA et l'environnement cytokinique qui indiquent au lymphocyte T le phénotype qu'il doit adopter. Ainsi, l'IL-12 favorise l'expression du facteur de transcription « T-box expressed in T cells » (T-bet) polarisant le lymphocyte T en lymphocyte T helper 1 (Th1) (Szabo et al., 2000). Les Th1 produisent majoritairement de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 et jouent un rôle important dans l'immunité contre les agents pathogènes intracellulaires (Harms Pritchard et al.,



**Figure 5 : Différenciation des lymphocytes T régulateurs périphériques (pTreg).**

Après activation par une CPA, le Lymphocyte T naïf peut se différencier en plusieurs sous-populations de cellules effectrices ou en pTreg selon le signal cytokinique qu'il reçoit. Ainsi la combinaison IL-2, TGF-β et acide rétinoïque (AR) promeut la différenciation en pTreg.

2015). En présence d'IL-4, les lymphocytes T expriment le facteur de transcription GATA3 et se polarisent en Th2 (Zheng and Flavell, 1997). Les Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10 et de l'IL-13 et sont particulièrement impliqués dans la lutte contre les agents pathogènes extracellulaires ou les parasites de type helminthe (Mohrs et al., 1999). Dans un contexte riche en IL-6 et TGF-β, les lymphocytes T se polarisent en Th17 suite à leur expression du facteur de transcription « RAR-related orphan receptor gamma » (RoRyT) (Ivanov et al., 2006). Les Th17, producteurs d'IL-17, sont majoritairement impliqués dans les réactions antimicrobiennes, notamment en favorisant le recrutement des neutrophiles (Ye et al., 2001). En particulier, les Th17 sont spécialisés dans la lutte contre les bactéries extracellulaires ou les levures. La cytokine IL-12 produite par les CPA humaines (IL-6 chez la souris) (Schmitt et al., 2016; Crotty, 2019) induit le facteur de transcription « B-cell lymphoma » (Bcl6) dans les lymphocytes T, les polarisant en lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) (Yu et al., 2009a). Via la sécrétion d'IL-21, les Tfh sont nécessaires à l'activation des lymphocytes B, et donc à la production d'anticorps (Zotos et al., 2010). Enfin, en présence de l'IL-2 associé au TGF-β et à l'acide rétinoïque (AR), les Tconv se polarisent en cellules régulatrices pTreg par l'expression du facteur de transcription « forkhead box P3 » (FoxP3) (Chen et al., 2003; Mucida et al., 2007). La différenciation en pTreg requière aussi

l'expression par la CPA de molécules de surface tel que PD-L1 et « B and T Lymphocyte associated (BTLA) qui autorisent l'expression de FoxP3 dans le lymphocyte (Jones et al., 2016). Ainsi, les Tconv une fois activés se différencient en Teff (Th1, Th2, Th17 etc...) ou en pTreg.

Outre leur processus de différenciation, Il existe de nombreuses similitudes entre les tTreg et les pTreg, rendant leur discrimination bien souvent difficile.

## **Les autres populations régulatrices**

Une attention particulière est accordée aux Treg en raison de leur importance première dans le maintien de la tolérance et l'inhibition du processus inflammatoire qui nous a été démontré par les modèles présentant un défaut d'expression de FoxP3. C'est le cas des souris Scurfy qui, défectives en FoxP3, présentent de multiples maladies auto-immunes fatales au bout de 3 semaines (Brunkow et al., 2001). Cependant, il existe d'autres populations de moindre ampleur possédant des propriétés régulatrices.

Lors de l'expulsion des Tconv du thymus nous avons particulièrement suivi les CD4<sup>+</sup> afin de détailler la différenciation des pTreg, mais il existe aussi une population de lymphocytes CD8<sup>+</sup> capables d'exprimer FoxP3 et de présenter des fonctions suppressives (Robb et al., 2012). Ces cellules suppriment l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en induisant leur lyse par contact direct. Les CD8 régulateurs ont un TCR restreint à la pseudo-molécule de CMH, Qa-1 exprimée par les lymphocytes CD4<sup>+</sup>. Cette population minoritaire sera exclue de nos analyses et nous nous focaliserons sur l'expression de FoxP3 par les CD4<sup>+</sup>.

Des populations de lymphocytes CD4<sup>+</sup> dépourvus de l'expression de FoxP3 peuvent également présenter des propriétés immunosuppressives (Groux et al., 1997). La première de ces populations, appelée Tr1, a pour fonction principale de produire la cytokine immuno-régulatrice IL-10. Non seulement cette cytokine, régule négativement l'activation des CD4<sup>+</sup> (Manavalan et al., 2003), mais elle favorise en plus l'apparition de nouveaux Tr1 (Levings et al., 2001). Similairement, l'IL-35 favorise l'émergence d'une population régulatrice parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les Treg ainsi générés (iTreg35) sont dépourvus de l'expression de FoxP3, de TGF-β ou d'IL-10 mais possèdent une activité suppressive envers les Teff (Collison et al., 2007). Dans notre étude, nous partons de cellules exprimant FoxP3, ce qui élimine les Tr1 et les iTreg35 de nos analyses.

Les lymphocytes B peuvent aussi présenter une activité régulatrice (Breg). Par la sécrétion d'IL-10, les Breg inhibent la réponse inflammatoire de type Th1 et Th17 mais favorisent aussi le maintien de la population Treg (Carter et al., 2011). Les cellules Breg sont aussi sécrétrices des cytokines anti-inflammatoires TGF- $\beta$  (Tian et al., 2001) ou l'IL-35 (Wang et al., 2014) et sont importantes dans l'inhibition de réactions auto-immunes comme le diabète. Bien que la production de cytokines anti-inflammatoires par les Breg soit avérée, leur caractéristique phénotypique reste à être déterminée. Aucun facteur de transcription, à l'instar de FoxP3, n'est particulièrement exprimé par les Breg, et plusieurs équipes rapportent des patterns d'expression en molécules de surface différents pour caractériser les Breg (Ding et al., 2011; Neves et al., 2010; Yanaba et al., 2008). Il s'agit alors d'une population encore mal définie qui n'a pas fait l'objet de notre étude puisque nous nous focalisons sur la population régulatrice des lymphocytes T.

Nous avons évoqué le potentiel régulateur des neutrophiles, mais une autre cellule myéloïde a déjà été décrite comme pouvant présenter des fonctions suppressives. Il s'agit du macrophage, qui suite à sa différenciation depuis le monocyte, peut se répartir en un éventail de sous-populations qui vont d'un extrême à l'autre, du macrophage proinflammatoires M1, à une population régulatrice, M2 (Mantovani et al., 2004). La première est caractérisée par sa production de cytokines inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6 alors que la seconde est productrice d'IL-10, de TGF- $\beta$  et du récepteur antagoniste à l'IL-1, lui conférant ses propriétés immunosuppressives. Ces cellules ne sont présentes qu'en contexte inflammatoire et absentes de la circulation sanguine. De façon intéressante, une étude suggère que les Treg favorisent le phénotype régulateur M2 des macrophages (Liu et al., 2011).

Plusieurs sous populations régulatrices impliquées dans divers contextes existent en dehors du Treg, mais ont toutes été exclues de nos analyses car les Treg représentent la grande majorité des phénomènes immunosuppressifs observables chez l'homme comme la souris.

## **Caractérisation des Treg**

Qu'elle soit thymique ou périphérique, la différenciation en Treg s'accompagne de l'expression du facteur de transcription FoxP3, molécule spécifique des Treg et qui confère à la cellule ses fonctions suppressives (Hori, 2003). La mutation du gène de FoxP3 entraîne l'apparition de maladies auto-immunes

sévères chez la souris (Brunkow et al., 2001) comme chez l'homme (Bennett et al., 2001), soulignant l'importance de ce facteur de transcription, et a fortiori des Treg, dans le maintien de la tolérance immunitaire au soi. L'expression de FoxP3 est associée à celle de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de haute affinité de l'IL-2 (CD25) dont la signalisation induit fortement l'expression de FoxP3 sur les Treg (Lio and Hsieh, 2008). Nous pouvons alors caractériser les Treg chez la souris par le profil d'expression  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ . Chez l'homme, comme CD25 et FoxP3 peuvent être transitoirement exprimés par les Teff activés, pour les différencier des Treg des études ont mené à l'ajout du marqueur CD127, la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7, exprimé par les Tconv mais dont les Treg sont dépourvus (Seddiki et al., 2006). Chez l'homme, on caractérise alors les Treg sur la base du pattern d'expression  $CD4^+CD25^{high}CD127^-FoxP3^+$ . Il est très utile de pouvoir définir une population cellulaire seulement sur la base de marqueurs de surface, cela permet d'isoler ces populations par tri magnétique ou en cytométrie en flux. Chez la souris, les Treg sont classiquement isolés selon les molécules  $CD4^+CD25^+$ , FoxP3 étant intranucléaire. Similairement, les Treg humains sont isolés selon le profil d'expression  $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ . Cependant, chez l'homme comme chez la souris, il n'est pas possible de distinguer les tTreg des pTreg sur la base de ces marqueurs de surface.

Le répertoire, c'est-à-dire le type d'antigènes reconnus par le TCR des Treg, permet de différencier les tTreg des pTreg. Comme les pTreg se différencient à partir de Tconv naïfs, leur répertoire TCR n'est pas spécifique du soi, mais partage les spécificités des Tconv, et sont donc activés dans les mêmes conditions. Ainsi, le rôle des pTreg semble orienté vers le contrôle de l'inflammation liée aux infections et autres agressions pathogènes. Inversement, les tTreg sont sélectionnés dans le thymus pour leur habilité à reconnaître des antigènes du soi, ils sont alors largement retrouvés dans les inflammations auto-immunes. Cependant, le rôle des tTreg et des pTreg n'est pas si limité. Les tTreg ont un rôle important dans l'émergence des pTreg via l'expression de TGF- $\beta$  membranaire (Andersson et al., 2008). Ce phénomène appelé « tolérance infectieuse » est dépendant de l'expression de la protéine GARP par les tTreg qui fixe le TGF- $\beta$  à leur surface (Wang et al., 2008). On notera aussi le rôle essentiel des pTreg dans le maintien de la tolérance envers le microbiote intestinal (Josefowicz et al., 2012). Les bactéries colonisant nos muqueuses ne sont pas, à proprement parlé, source d'antigènes du soi, mais une tolérance immunitaire permanente envers ces micro-organismes est nécessaire pour préserver l'intégrité de la paroi intestinale. De plus, le transfert de pTreg dans des modèles murins auto-immuns inhibe effectivement l'inflammation, alors que celle-ci est dirigée contre le soi (Huter et



al., 2008). Ainsi, bien qu'il soit tentant d'extrapoler un rôle des pTreg et tTreg dans la régulation de l'inflammation infectieuse et auto-immune respectivement, leurs fonctions sont en partie redondantes.

De part la difficulté à discerner les pTreg des tTreg phénotypiquement, peu d'études démontrent clairement des différences fonctionnelles entre ces populations. Des études octroient au facteur de transcription Helios la capacité de distinguer les tTreg, des pTreg (Thornton et al., 2010). Helios n'est pas nécessaire pour la différenciation des Treg mais est exprimé dans le thymus et se retrouve parmi les tTreg mais pas les pTreg. Cependant, une équipe a rapporté que dans certains cas, l'induction de pTreg *in vitro* peut s'accompagner de l'expression de Helios (Verhagen and Wraith, 2010). De plus, le fait qu'Helios soit intracellulaire rend difficile la séparation des pTreg et des tTreg par les techniques habituelles d'isolement que sont le tri par cytométrie en flux ou le tri magnétique. D'autres études ont défini la neuropiline-1 (Nrp1) comme candidat permettant de distinguer les populations de Treg, puisque étant exprimée par les tTreg mais pas par les pTreg (Yadav et al., 2012). Cependant, l'expression de Nrp1 ne coïncide pas parfaitement avec celle d'Helios et le TGF- $\beta$  induit l'expression de Nrp1, notamment sur certains pTreg (Weiss et al., 2012). Helios et Nrp1 ne sont donc pas des marqueurs permettant de discriminer parfaitement les tTreg et les pTreg.

D'un point de vue génomique, ces deux populations de Treg se distinguent par des modifications épigénétiques en lien avec l'expression de FoxP3. L'expression de FoxP3 par les Treg est notamment régulée par le niveau de méthylation de l'ADN et un équilibre entre méthylation et acétylation des histones complexées à l'ADN sur la région promotrice du gène FoxP3. Ainsi, parmi les tTreg le promoteur du gène FoxP3 est largement déméthylé sur son ADN, comme sur ses histones, permettant l'accès à l'ADN. Une forte méthylation de ce promoteur est en revanche constatée dans les Tconv, se traduisant par une répression de la transcription de Foxp3 (Zheng et al., 2010). Dans le cas de la génération des pTreg, une déméthylation intermédiaire est favorisée lors de l'engagement du TCR en présence du TGF- $\beta$  (Janson et al., 2008). D'autres régions génomiques agissent sur la stabilité des facteurs de transcription responsables de l'expression de FoxP3. Ces régions non codantes sont situées en aval du promoteur, les principales étant les « conserved non coding DNA sequences » (CNS) 1, 2 et 3. A nouveau c'est leur niveau de méthylation d'un point de vue ADN et l'équilibre méthylation/acétylation des histones qui vont déterminer leur influence sur l'expression de FoxP3 (Zheng et al., 2010). Le CNS1 ne possédant pas de site de méthylation de l'ADN, son influence sur le promoteur de FoxP3 est régulée uniquement par les histones. Sur les tTreg comme sur les pTreg les histones H3 et H4 sont plus

fortement acétylées et associées à une plus forte méthylation de H3K4, comparé aux Tconv. Ce profil favorise la transcription de FoxP3 (Zheng et al., 2010). De façon intéressante, les modifications épigénétiques du CNS1 sont dépendantes du TGF- $\beta$  et sont nécessaires à l'expression de FoxP3 chez les pTreg mais pas pour la génération des tTreg (Josefowicz et al., 2012). Le CNS2 est la plus importante des régions régulatrices de FoxP3 puisque la déméthylation de sa séquence ADN est nécessaire à la génération de tous les Tregs, qu'ils soient thymiques ou périphériques (Zheng et al., 2010). On y retrouve aussi une forte acétylation des histones H3 et H4, ainsi qu'une méthylation de H3K4 (Zheng et al., 2010). L'IL-2, l'engagement du TCR et FoxP3 lui-même favorisent les modifications épigénétiques du CNS2 (Samstein et al., 2012; Toker et al., 2013). Enfin, le CNS3 n'est pas impliqué dans le maintien de l'expression de FoxP3 mais est crucial dans l'initiation de son expression chez les précurseurs DP, si bien que l'on peut observer une déméthylation de cette région même dans certains Tconv (Zheng et al., 2010). Une hypothèse propose que les Tconv possédant les modifications épigénétiques caractéristiques des Treg, en particulier sur le CNS3, soient plus enclins à se différencier en Treg. Des travaux récents accordent à la protéine Satb-1 la capacité d'instaurer les modifications épigénétiques nécessaires aux lymphocytes pour induire l'expression de FoxP3 lors du développement (Kitagawa et al., 2017). En résumé, les modifications épigénétiques du CNS2 et 3 sont communes aux pTreg et tTreg mais des différences existent au niveau du promoteur de FoxP3 et du CNS1.

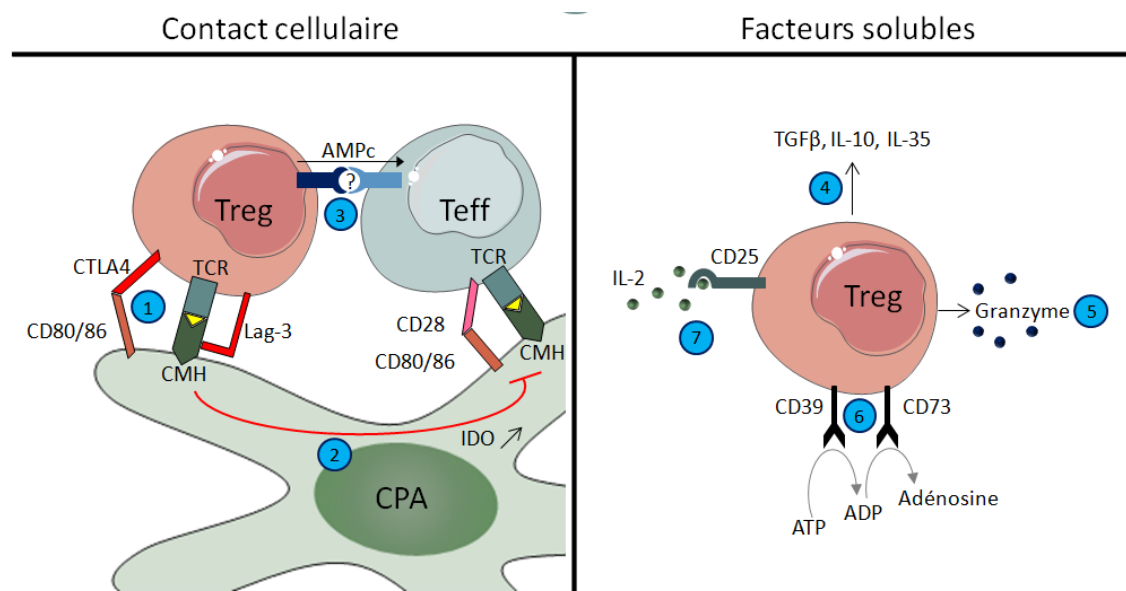
Enfin, il n'est pas possible de générer *in vitro* des tTreg. En revanche, il est possible de mimer la différenciation des pTreg dans une plaque de culture. Comme en périphérie *in vivo*, l'ajout de TGF- $\beta$ , d'IL-2 et de stimulation du TCR sur des Tconv *in vitro* entraîne l'émergence d'une population FoxP3<sup>+</sup> aux propriétés immunosuppressives (Chen et al., 2003; Davidson et al., 2007). Les Treg ainsi générés sont qualifiés d'iTreg pour « *in vitro* generated Treg ». Dans notre travail, il n'a nullement été question d'iTreg. Les Treg utilisés ayant tous été purifiés de rates de souris ou de sang de donneurs, on peut les considérer comme un mélange indéterminé de pTreg et de tTreg. Nous n'avons pas essayé de différencier ces populations en raison du manque de marqueurs spécifiques existants comme expliqué plus haut.

## Mécanismes associés à la fonction des Treg

Dans ce chapitre nous ne ferons plus référence aux tTreg et pTreg mais plus simplement aux Treg qui regroupent les deux populations. La fonction des Treg consiste à inhiber les réactions immunitaires contre les

antigènes du soi, c'est la tolérance, et à contrôler les réactions immunitaires contre les agents pathogènes. Une réaction immunitaire incontrôlée est synonyme de destruction tissulaire pouvant entraîner une perte de fonction des organes touchés. Dans les deux cas, la fonction la mieux caractérisée des Treg est l'inhibition de l'activation des lymphocytes Tconv.

L'inhibition par les Treg passe par des mécanismes à la fois liés à un contact cellulaire et par des facteurs solubles. Pour l'inhibition par contact, les Treg inhibent l'activation des lymphocytes T en contrôlant la présentation antigénique dans les OL-II. En premier lieu, les Treg entrent en compétition avec les lymphocytes T de même spécificité, en interagissant de manière stable avec les molécules de pCMH, privant les lymphocytes T de la stimulation de leur TCR (Tadokoro et al., 2006) (Figure 6). Pour accentuer cet effet, l'interaction du TCR des Treg avec le pCMH des CPA est stabilisée par l'expression d'un homologue du CD4, le « Lymphocyte-activation gene 3 » (LAG-3) (Huang et al., 2004). L'interaction entre les Treg et les PNN, en particulier dans les ganglions lymphatiques est facilité par la production du CCL22, un chemoattractant des Treg (Rapp et al., 2019). Ainsi, les Treg inhibent par compétition le premier signal d'activation des lymphocytes T qu'est l'engagement de leur TCR. Ce mécanisme implique que les Treg inhibent uniquement l'activation des T de même spécificité qu'eux, mais



**Figure 6 : Mécanismes de suppression des Treg.**

**1-**Les Treg privent les Teff des molécules de CMH et de costimulation (CD80/86) via l'expression de CTLA-4 et Lag-3. **2-**L'interaction Treg/CPA induit un phénotype tolerogénique de la cellule présentatrice. **3-**Les Treg inhibent directement les Teff par des mécanismes encore mal connus. **4-**Le TGF-β, l'IL-10 et l'IL-35 sont des facteurs solubles anti-inflammatoires. **5-** Les granzymes A et B provoquent l'apoptose des Teff et des CPA. **6-**Le CD39 puis le CD73 dégradent l'ATP extracellulaire (DAMP) en adénosine (molécule anti-inflammatoire). **7-** Le CD25, récepteur de haute affinité pour l'IL2, appauvrit le milieu en IL-2.

des études indiquent que les Treg peuvent inhiber l'activation de lymphocytes T de différentes spécificité (Tarbell et al., 2004), impliquant l'existence d'autres mécanismes d'inhibition.

Pour se différencier en T<sub>eff</sub>, les lymphocytes T ont aussi besoin de signaux de costimulation représentés par la liaison du CD28 des lymphocytes au CD80 ou CD86 des CPA. Les Treg interviennent dans cette interaction par l'expression du « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA-4), un homologue du CD28, bien plus afin pour les molécules CD80 et CD86 (Peach et al., 1994). A nouveau par compétition, l'avantage d'affinité du CTLA-4, prive les lymphocytes T des signaux de costimulation ce qui entraîne leur anergie (Harding et al., 1992). L'expression du CTLA-4 sur les Treg est cruciale puisque l'inhibition sélective de son expression entraîne un déficit de la fonction suppressive des Treg et de leur habilité à contrôler l'inflammation (Friedline et al., 2009). L'expression de CTLA-4 est fondamentale pour la fonction des Treg en privant les T<sub>conv</sub> des signaux de costimulation.

L'interaction entre Treg et CPA induit aussi des modifications dans la cellule présentatrice. Les Treg induisent un phénotype tolérogénique en interagissant avec les CPA pour inhiber leur capacité à activer les lymphocytes T. Le CTLA-4, en liant le CD80 ou le CD86 des CPA, induit l'endocytose de ces récepteurs, diminuant leur disponibilité à la surface de la cellule. Similairement, l'engagement du CMH par le LAG-3 des Treg inhibe la capacité des CPA à induire l'activation des lymphocytes (Akkaya et al., 2019; Liang et al., 2008). L'induction de CPA tolérogéniques peut aussi être assurée par la molécules « T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains » (TIGIT), fortement exprimé par les Treg (Yu et al., 2009b). Enfin, le phénotype tolérogène des CPA induit par les Treg est accentué par l'expression de l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les CPA (Fallarino et al., 2003) (Figure 6). L'IDO favorise la diminution de l'expression des molécules associées à la présentation antigénique et catalyse la dégradation de l'acide aminé essentiel tryptophane en kynurenine, une molécule induisant l'apoptose des lymphocytes T (Terness et al., 2002). Ainsi, par l'intermédiaire des CPA, les Treg éliminent les lymphocytes T activés. L'induction d'IDO dans les CPA est dépendante de l'engagement des molécules CD80 et CD86 par le CTLA-4 des Treg (Fallarino et al., 2003), ajoutant ce phénomène à l'importance du CTLA-4 dans la régulation de l'inflammation par les Treg.

L'activation des T<sub>eff</sub> se déroule principalement dans les ganglions lymphatiques, ce qui rend ces organes des lieux important pour le contrôle du phénomène inflammatoire par les Treg. Il a été montré que les

Treg des ganglions lymphatiques peuvent inhiber l'expression de la S1P sur les Teff de même spécificité antigénique (Geng et al., 2017). La S1P étant nécessaire aux Teff pour quitter les ganglions lymphatiques, ils sont alors séquestrés et incapables de rejoindre le site inflammatoire.

Certaines études indiquent que les Treg peuvent directement inhiber les lymphocytes T, indépendamment de la spécificité des TCR ou de la présence de CPA (figure 6). Les Treg entrant en contact direct avec des lymphocytes T sont en mesure de transférer de l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans la cellule cible. L'AMPC est fortement concentrée dans les Treg et inhibe la prolifération dépendante de l'IL-2 lorsque transférée dans les lymphocytes T activés (Bopp et al., 2007). Ce transfert d'AMPC est possible par la formation de jonctions communicantes entre les Treg et la cellule cible. En empêchant la prolifération des Teff, les Treg inhibent leur potentiel inflammatoire. Par ailleurs, il a été démontré que les Treg peuvent interagir avec les Teff par le CTLA-4 reconnaissant les CD80/CD86 exprimé par les Teff (Paust et al., 2004). Cette interaction est nécessaire au bon contrôle de la prolifération des Teff dans certaines inflammations auto-immunes mais aucun mécanisme inhibiteur associé n'a été décrit. Il est probable que la proche interaction entre Treg et Teff favorise l'inhibition par les facteurs solubles sécrétés par les Treg (décrit ci-dessous).

Les Treg sécrètent des cytokines immuno-régulatrices après activation, principalement le TGF- $\beta$ , l'IL-10 et l'IL-35 (Figure 6). Bien que le TGF- $\beta$  produit par les Treg ne soit pas indispensable pour le contrôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés, il est important dans l'inhibition des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> *in vivo* (Green et al., 2003). On peut aussi noter que le TGF- $\beta$  est nécessaire à la génération de pTreg, ce qui favorise indirectement l'inhibition de l'inflammation (Figure 5). La production d'IL-10 par les Treg est impliquée dans le contrôle de l'inflammation des tissus intestinaux mais son importance varie selon la pathologie en question puisque l'IL-10 favorise le contrôle de la colite auto-immune mais n'est pas nécessaire pour le contrôle de la gastrite auto-immune (Suri-Payer and Cantor, 2001). Parmi les molécules solubles sécrétées par les Treg, nous pouvons ajouter la production d'IL-35. Les Treg dépourvus de cette cytokine voient leur capacité inhibitrice amoindrie, de plus, l'IL-35 favorise l'émergence de cellules régulatrices iTreg35 (Collison et al., 2007). Néanmoins, dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde, l'IL-35 aggrave les signes cliniques, indiquant un potentiel rôle délétère dans le contrôle de l'inflammation, selon le contexte étudié (Thiolat et al., 2014a). Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre le rôle de l'IL-35 produite par les Treg.

Les molécules sécrétées par les Treg ne se limitent pas aux cytokines, ces cellules sont aussi productrices de granzymes. Les granzymes sont des sérines protéases qui dégradent les composants cellulaires menant à la mort de la cellule cible, un procédé caractéristique de l'activité cytolytique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés (CTL) (Heusel et al., 1994). Les Treg sont aussi capables de sécréter leurs granzymes pour éliminer les Teff chez l'homme (Grossman et al., 2004) comme la souris (Gondek et al., 2005). L'activité des granzymes nécessite la perforine qui crée des pores dans la membrane plasmique, permettant l'accès des granzymes à ces cibles intracellulaires. Bien que chez l'homme ce mécanisme soit effectif chez les Treg, chez la souris la mort cellulaire induite par les granzymes est indépendante de la perforine, indiquant un mode d'action alternatif encore inconnu de ces enzymes. L'étude chez la souris précise cependant que l'action des granzymes est dépendante d'un contact cellulaire entre le Treg et le Teff par une reconnaissance de molécules de surface encore inconnues. Bien que sécrétées dans le milieu extracellulaire, les granzymes nécessitent d'être directement libérées au contact de la cellule cible. Il est envisageable qu'une forte concentration soit nécessaire à son activité et que cette concentration suffisamment élevée ne soit atteignable que localement, à l'interface de l'interaction cellulaire.

Un autre moyen d'influencer le processus inflammatoire est de modifier les signaux extracellulaires responsables de l'inflammation. Les Treg expriment à leur surface deux enzymes impliquées dans la régulation de l'Adénosine Triphosphate (ATP) extracellulaire que sont le CD39 et le CD73. Le CD39 est une ectonucléotidase qui catalyse la dégradation de l'ATP en adénosine diphosphate (ADP). Ensuite, la dégradation de l'ADP en simple adénosine est elle-même catalysée par le CD73 (figure 6). L'ATP est un DAMP libéré par les cellules en nécrose, il est à ce titre hautement inflammatoire et active de nombreuses populations immunitaires dont les neutrophiles (Karmakar et al., 2016). A l'inverse, le produit de sa finale dégradation, l'adénosine, présente des propriétés immuno-régulatrices. L'adénosine se fixe sur son récepteur, le A2A, sur les Teff est inhibe leurs fonctions effectrices (Deaglio et al., 2007). De plus, l'engagement du récepteur A2A sur les lymphocytes T favorise la génération de pTreg (Zarek et al., 2008). L'élimination de l'ATP extracellulaire pro-inflammatoire associée à l'augmentation de la concentration en adénosine inhibitrice fait du couple CD39/CD73 un acteur important favorisant l'inhibition du processus inflammatoire.

Enfin, le phénotype du Treg est notamment caractérisé par sa forte expression de CD25, la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2. Comme la perte du CD25 entraîne de sévères syndromes auto-immuns (Sakaguchi et al.,

1995), il a été proposé que son expression soit nécessaire à l'activité suppressive des Treg. Des expériences *in vitro* ont montré que les Treg reconnaissent l'IL-2 avec une meilleure affinité que les Teff, limitant l'IL-2 disponible pour les Teff en fixant la cytokine sur le CD25. L'IL-2 étant un facteur induisant la prolifération des Teff, cette compétition favorise l'inhibition de la réponse Teff (de la Rosa et al., 2004). Cependant *in vivo*, les Treg CD25<sup>+</sup> sont capables d'inhiber une auto-immunité provoquée par des Teff CD25 déficient, indiquant que les Teff *in vivo* ne sont pas dépendant de l'IL-2 pour proliférer, et que la compétition pour cette cytokine n'est pas le mécanisme principal d'inhibition de ces derniers (Malek et al., 2002). Ainsi, l'auto-immunité développée par l'absence de CD25 n'est pas due à un défaut compétitif pour l'IL-2 mais plutôt à un défaut de l'induction et de la stabilité des Treg. Pour l'induction de Treg, nous avons évoqué la nécessité d'une signalisation IL-2 dans la différenciation des pTreg (Figure 5), mais il reste à présenter les signaux responsables de la stabilité du lignage régulateur au cours du temps.

## Stabilité ou plasticité

Dans ce chapitre nous allons détailler le devenir des Treg après leur différenciation et l'activation de leurs fonctions suppressives. Plusieurs arguments indiquent que les Treg peuvent acquérir des phénotypes différents de celui classiquement décrit et qui à fait l'objet des précédentes descriptions de ce manuscrit. Deux concepts étroitement liés, la stabilité et la plasticité, doivent être distingués. La stabilité fait référence à la faculté du Treg à maintenir son potentiel régulateur au cours du temps en condition normale ou inflammatoire. La stabilité des Treg est relative à leur capacité à maintenir l'expression de FoxP3. La plasticité fait référence à l'évolution du Treg en sous populations lymphocytaires qui, dans certains cas, peut mener à une perte de leurs fonctions régulatrices et une modification de leur phénotype.

Le déficit en FoxP3 entraîne de sévères réactions auto-immunitaires dues à une inflammation incontrôlée, la stabilité du lignage Treg est donc d'une importance capitale. Le premier événement favorisant la stabilité de l'expression de FoxP3 est la signalisation du CD25 induite par l'IL-2. L'engagement de l'IL-2 sur le CD25 phosphoryle le facteur de transcription STAT-5 qui entraîne la transcription de FoxP3 (Davidson et al., 2007). Le déficit en CD25, spécifiquement dans les Treg, mène à un phénotype similaire à l'absence de FoxP3 (Sakaguchi et al., 1995). En effet, les modèles murins n'exprimant pas CD25 présentent un fort déficit en nombre des Treg circulants alors que les processus de génération des Treg sont intacts (Furtado et al., 2002). Il

existe donc un lien direct entre la signalisation via l'IL-2 et le maintien de la population régulatrice. La source principale d'IL-2 favorisant le maintien des Treg sont les Teff activés (Almeida et al., 2006). Ainsi, plus les Teff activés sont nombreux plus le rôle de l'IL-2 est important dans le maintien des Treg, or les Treg inhibent les Teff et notamment leur production d'IL-2. Cela résulte en un contrôle de l'inflammation et une moindre production d'IL-2, limitant par rétrocontrôle le maintien de la population régulatrice. Cette boucle de contrôle entre Treg et Teff est largement favorisée par la localisation des Treg dans la zone T des OL-II, en proximité étroite avec les Teff (Tadokoro et al., 2006).

Un autre signal important dans le maintien de la population régulatrice, est l'engagement continu du TCR. Le TCR des Treg est nécessaire à la reconnaissance des antigènes présentés par le CMH des CPA. Nous avons vu son rôle dans l'induction des Treg aussi bien dans le thymus qu'en périphérie. Mais d'autres études ajoutent que le maintien de la population régulatrice après différenciation est soumise à une activation continue par le TCR (Vahl et al., 2014). Dans un modèle murin où le TCR est génétiquement éliminé des Treg matures, une diminution drastique du réservoir de Treg est rapidement observée (Vahl et al., 2014). De plus, les Treg dépourvus de TCR perdent leur capacité à inhiber les Teff et cela malgré une expression normale des molécules associées à la fonction des Treg. Enfin, on notera que, dans ce modèle, la production d'IL-2 est normale et ne compense pas la perte du maintien des Treg, soulignant l'importance initiale de la reconnaissance continue de l'antigène par les Treg. L'engagement du TCR recrute notamment la protéine Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) qui est un modificateur épigénétique réprimant la transcription de gènes cibles par la méthylation des histones. Lors de l'activation des Treg par le TCR, la coopération entre FoxP3 et EZH2 permet une inhibition des gènes impliqués dans la répression de l'expression de FoxP3. Ainsi, EZH2 favorise le maintien de l'expression de FoxP3 lors de l'activation et de la prolifération des Treg induite par la stimulation du TCR (DuPage et al., 2015).

L'épigénétique est un facteur important dans la stabilisation de l'expression de FoxP3 représenté d'abord par l'expression de micro-ARN qui sont de courtes séquences d'ARN non codantes (20 nucléotides environ) capables de diminuer la traduction d'ARN messagers cibles. Certains d'entre eux favorisent l'expression de FoxP3 par les Treg. Le miR-155 est préférentiellement exprimé par les Treg comparé aux autres CD4 et inhibe l'expression de la protéine « cytokine signaling 1 » (SOCS1), elle-même inhibitrice du facteur de transcription STAT5. Comme STAT5 stimule l'expression de FoxP3 suite à une signalisation par l'IL-2, l'inhibition de SOCS1 par



le miR-155 favorise l'expression de FoxP3 induite par l'IL-2 (Lu et al., 2009). Une boucle positive pour l'expression de FoxP3 est alors mise en place puisque FoxP3 induit l'expression de miR-155. Le miR-126 est aussi surexprimé par les Treg et régule l'activité de la voie de signalisation Pi3K/Akt. Cette voie de signalisation contrôle directement l'expression de FoxP3 et la perte du miR-126 dans les Treg déstabilise l'expression de FoxP3 (Qin et al., 2013). Enfin, le miR-10a est important pour la génération des pTreg en inhibant l'expression des facteurs de transcription BCL-6 et Ncor2 caractéristiques des Tfh. Se faisant, miR-10a favorise le lignage pTreg en inhibant la différenciation en Tfh (Takahashi et al., 2012). Les miRNA présentés ici sont les mieux caractérisés dans le rôle du maintien de l'expression de FoxP3 mais de nombreux autres sont préférentiellement exprimés par les Treg et influencent leur fonction ou leur activation (ie : miR-146a, miR-31, etc ...).

Des signaux extracellulaires induisant des modifications épigénétiques influencent aussi le maintien des Treg. Nous avons évoqué que l'expression de FoxP3 était associée au niveau de méthylation de son promoteur, ainsi que des CNS, de telle sorte qu'une déméthylation élevée de ces séquences favorise l'expression de FoxP3. Ce niveau particulier de méthylation propre aux Treg est accordée par la stimulation du TCR dès la différenciation thymique des lymphocytes T (Ohkura et al., 2012). Cependant, parmi les cellules FoxP3<sup>+</sup> à la sortie du thymus, il est possible de détecter des événements possédant une déméthylation que partielle des CNS et du promoteur de FoxP3, liée à une trop faible stimulation du TCR lors de la différenciation thymique. Ces tTreg ne possédant pas une empreinte génétique très marquée sont plus susceptibles de perdre l'expression de FoxP3 en périphérie et sont donc considérés comme instables (Ohkura et al., 2012). Les pTreg peuvent aussi présenter une instabilité de l'expression de FoxP3. Du fait de leur différenciation à partir de Tconv, les pTreg nécessitent une déméthylation de leur CNS1 dépendant du TGF- $\beta$  et de l'IL-2 afin de permettre l'expression de FoxP3. Leur origine implique aussi que les pTreg sont souvent associés à une déméthylation seulement partielle du CNS2. L'empreinte épigénétique incomplète de la plupart des pTreg leur confère une instabilité de leur expression de FoxP3 (Ohkura et al., 2012). Une meilleure stabilité de l'expression de FoxP3 chez les pTreg est atteignable par une stimulation continue du TCR. Celle-ci induit une déméthylation des séquences CNS, y compris le CNS2, octroyant aux pTreg une bonne stabilité de l'expression de FoxP3 (Ohkura et al., 2012). Par conséquent, Les modification épigénétiques du promoteur de FoxP3 et des CNS sont fortement impliquées dans la stabilité de son expression et peuvent être modifiées, dans une certaine mesure, par les signaux du TCR. Nos données récentes indiquent que le TNF- $\alpha$  peut aussi affecter le niveau de méthylation des

CNS afin de favoriser l'expression de FoxP3 (Santinon et al., article soumis en révision dans *Arthritis Rheumatology*).

Les Treg peuvent donc perdre totalement ou en partie l'expression de FoxP3, reflétant une instabilité de ce lignage. Nous pouvons nous demander quel est le devenir de ces cellules dépourvues ou presque de l'expression de FoxP3. C'est alors que la stabilité, ou plutôt l'instabilité, des Treg rejoint le concept de plasticité puisque plusieurs évidences indiquent que les Treg peuvent perdre leur fonction suppressive pour acquérir des capacités effectrices. Par exemple, la déplétion sélective de FoxP3 dans des Treg induit passivement leur déviation vers un phénotype Th1 producteur d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Williams and Rudensky, 2007). Similairement, en présence d'IL-6 (et en absence de TGF- $\beta$ ), les Treg perdent progressivement l'expression de FoxP3 pour acquérir celle de RoR $\gamma$ t. Cela résulte en la perte de leurs fonctions régulatrices en faveur d'une activité effectrice de type Th17 (Xu et al., 2007). La conversion de Treg en Th17 a notamment été décrite dans le contexte de la polyarthrite rhumatoïde suggérant un rôle pathologique de la dédifférenciation des Treg (Komatsu et al., 2013). Certains ont évoqué que ces déviations phénotypiques ne concernent pas tous les Treg mais seulement ceux présentant une instabilité de l'expression de FoxP3. Les Treg possédant une méthylation partielle des séquences associées à l'expression de FoxP3 sont plus à même d'être convertis en Teff, alors que les Treg avec une forte hypométhylation de ces séquences maintiennent leurs capacités suppressives (Miyao et al., 2012). Ainsi, l'instabilité du lignage régulateur génère une plasticité des Treg vers les lignages effecteurs.

Le concept de plasticité des Treg se complique avec la découverte de populations régulatrices co-exprimant FoxP3 et des facteurs de transcription associés aux Teff. Selon le contexte inflammatoire, les Treg expriment les facteurs de transcription des Th1, Th2 ou Th17, leur permettant de co-localiser avec ces cellules et de contrôler l'inflammation *in situ*. C'est cette faculté d'adaptation qui accorde aux Treg une certaine plasticité. En présence d'IFN- $\gamma$  les Treg expriment, en même temps que FoxP3, le facteur de transcription associé aux Th1, T-bet (Koch et al., 2009). L'expression de T-bet dans les Treg favorise l'expression du récepteur aux chimiokines CXCR3 responsable de l'adressage des Th1. *In vivo*, les Treg déficients en T-bet sont incapables d'exprimer le CXCR3 et de contrôler une inflammation Th1 spécifique (Koch et al., 2009). Comme les Treg déficients en T-bet ne présentent pas d'altération de leurs fonctions effectrices *ex-vivo* (Bettelli et al., 2004), le rôle de T-bet dans les Treg consiste à induire l'expression des récepteurs aux chimiokines des Th1 afin de faciliter l'inhibition *in situ* par co-localisation des Treg et des Th1 (Koch et al., 2009). GATA-3, le facteur de transcription

associé aux Th2 peut aussi être exprimé par les Treg. Cette expression favorise celle de FoxP3 et les fonctions suppressives des Treg déficients en GATA-3 sont diminuées, limitant leur capacité à contrôler l'inflammation générée par tout type de Teff (Wang et al., 2011). Cela suggère que l'expression de GATA-3 a un rôle dans le maintien de l'expression de FoxP3 en conditions inflammatoires, même celles non orientées Th2. L' « IFN regulatory factor 4 » (IRF4) est aussi un facteur de transcription nécessaire à la différenciation en Th2 (Lohoff et al., 2002). IRF4 peut être retrouvé dans les Treg et similairement à T-bet, IRF4 est nécessaire au Treg pour contrôler efficacement l'inflammation orientée vers le lignage effecteur correspondant, ici Th2 (Zheng et al., 2009). Les facteurs de transcription STAT-3 (Mathur et al., 2007) et RoR $\gamma$ T (Figure 5) contrôlent la différenciation des Th17. L'IL-10 induit sur les Treg l'expression de STAT-3 favorisant leur expression des cytokines régulatrices IL-10 et IL-35 et du récepteur aux chimiokines associé aux Th17, le CCR6 (Chaudhry et al., 2009). A nouveau, l'expression de STAT-3 par les Treg favorise leur contrôle des inflammations orientées Th17 (Chaudhry et al., 2009). L'expression conjointe de FoxP3 et de RoR $\gamma$ T a aussi été décrite chez l'homme et ces cellules conservent une activité suppressive tout en produisant des cytokines effectrices (Voo et al., 2009). Finalement, nous pouvons évoquer l'existence des lymphocytes T régulateurs folliculaires (Tfr), qui sont des Treg exprimant le facteur de transcription BCL-6, caractéristique du lignage Tfh (Chung et al., 2011). BCL-6 induit l'expression du CXCR5 permettant aux Treg de co-localiser avec les Tfh au niveau des follicules B des OL-II. Cette localisation privilégiée leur octroie la capacité de réguler la formation des centres germinatifs nécessaires à l'activation des lymphocytes B (Chung et al., 2011).

Il faut cependant évoquer que des études montrent que les cellules co-exprimant FoxP3 et un facteur de transcription effecteur sont plus susceptibles de perdre totalement l'expression de FoxP3 au profit d'un phénotype effecteur (Xu et al., 2007). En lien avec cela nous pouvons supposer que les Treg exprimant des facteurs effecteurs ne représentent qu'un stade intermédiaire lié à l'instabilité du lignage régulateur. Néanmoins, les Treg aillant perdu leurs fonctions régulatrices au profit de fonctions effectrices peuvent, dans certains cas, retrouver leur potentiel régulateur en présence d'IL-2 et d'une stimulation du TCR (Beriou et al., 2009). En conclusion, il est difficile de déterminer s'il existe une réelle plasticité du Treg ou si elle n'est que le reflet d'une instabilité de l'expression de FoxP3, mais nous pouvons affirmer que les Treg sont capables de détecter de nombreux signaux de leur environnement et de répondre en conséquence par des modifications épigénétiques, translationnelles et traductionnelles importantes responsables de nouveaux phénotypes.

# La polyarthrite rhumatoïde

Ce travail avait pour but de caractériser l'interaction entre les neutrophiles et les Treg en situation normale et au cours de l'inflammation chronique. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la polyarthrite rhumatoïde (PR), où les neutrophiles et les Treg jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et la pérennisation de la pathologie. Dans cette pathologie auto-immune, la rupture de la tolérance pour un ou plusieurs antigènes du soi est à l'origine d'une inflammation chronique résultant en une hyperplasie synoviale et, au final, à la destruction du cartilage et de l'os, jusqu'à une perte de la fonction articulaire.

## Etiologie

La PR touche de 0,5% à 1% de la population adulte dont 3 fois plus de femmes que d'hommes. Sa prévalence peut varier selon des critères géographiques avec une préférence pour les pays développés comme l'Europe du Nord ou l'Amérique du Nord. La probabilité de déclencher une PR augmente avec l'âge et atteint son pic chez les femmes de plus de 45 ans, indiquant un rôle encore méconnu des hormones dans l'initiation ou le maintien de la pathologie. L'étiologie de la PR est le point le moins bien caractérisé de cette pathologie. Nous ne savons pas pourquoi, ni comment, la pathologie se déclenche chez un sujet sain. En revanche, des facteurs de prédisposition, des caractéristiques qui favorisent l'apparition de la pathologie, ont été largement identifiés.

En premier lieu, certains auto-anticorps, en particulier le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-protéines citullinées (ACPA), sont présents chez un grand nombre de patients atteints de PR. Environ 70% des patients présentent le FR et autant des ACPA. Si le FR peut être retrouvé dans d'autres maladies, la présence d'ACPA est fortement associée à la PR (Nishimura et al., 2007). Le FR reconnaît les parties constantes d'autres anticorps, ce qui entraîne la formation de complexes immuns multimériques susceptibles d'activer des populations immunitaires comme les macrophages ou les neutrophiles. Dans la PR, une partie des anticorps reconnus par le FR sont les ACPA, des auto-anticorps qui reconnaissent une modification post-traductionnelle des protéines appelée citrullination. Le phénomène de citrullination est tout à fait physiologique et contrôle l'adressage ou la fonction de diverses protéines du soi telles que le collagène, la vimentine ou les histones (Zhang et al., 2016). Ce processus est principalement régulé par deux enzymes, les peptidyl-déaminase 4 et 2

(PAD4 et PAD2), et normalement toléré par le système immunitaire. Cependant, il a été proposé que l'apparition d'ACPA associés au FR puisse entraîner la formation de complexes auto-immuns activateurs du système immunitaire et, ainsi, déclencher la PR chez l'homme (Sokolove et al., 2014). Cette hypothèse est à tempérer par le fait que les ACPA ne sont pas forcément associés aux FR. De plus, l'apparition d'ACPA peut avoir lieu des années avant le déclenchement de la pathologie sans pour autant induire de symptômes, indiquant l'existence d'autres événements déclencheurs (van de Stadt et al., 2011). Notons également que la PR peut se développer en absence d'ACPA, même si certains suggèrent que la PR ACPA négative représente une entité différente. Enfin, les mécanismes induisant l'apparition des ACPA, et donc de rupture de la tolérance, restent incertains.

La PR est fortement associée au fond génétique puisqu'il a été estimé que plus de 50% du risque de déclencher la pathologie peut être attribué à des facteurs génétiques (van der Woude et al., 2009). Grâce à des études à large échelle basées sur le séquençage du génome (Genome Wide Association study ou GWAS) de patients PR, plusieurs mutations ont été préférentiellement retrouvées chez les patients comparés à des donneurs sains (BIRAC Consortium et al., 2010). Les mutations ciblent largement les cytokines du système immunitaire comme les gènes du CCL21, CCR6, IL-6 ou IL-2. Cependant, aucune étude fonctionnelle ne propose d'explications quant au rôle de ces mutations sur le système immunitaire ou dans le déclenchement de la PR. Par contre, deux sites de mutation localisés sur les gènes du CMH (Hill et al., 2003) et sur la phosphatase PTPN22 (Chang et al., 2016) ont été plus amplement détaillées. Les molécules de CMH (« Human leukocyte antigen » ou HLA chez l'homme) sont codées par au moins 14 gènes différents et chaque individu présente plusieurs versions ou haplotypes de ces molécules (la moitié des haplotypes sont hérités du père et l'autre de la mère). Ceci crée une grande diversité de sous types de ces molécules dans la population. Des études datant de plus de 30 ans avaient déjà mis en évidence l'existence de plusieurs haplotypes des HLA DR4 et DR1 particulièrement retrouvés chez les patients PR. Une hypothèse propose qu'il existe un épitope partagé par les molécules de HLA conférant une susceptibilité à la PR (Gregersen et al., 1987). La présentation préférentielle d'un peptide du soi à cause du polymorphisme des molécules du HLA pourrait en effet mener à une rupture de la tolérance et l'induction d'une inflammation auto-immune. Il a été proposé que les molécules modifiées post-traductionnellement par citrullination, cibles des ACPA, étaient préférentiellement présentées par les molécules de HLA DR4 et DR1 (Hill et al., 2003; Scally et al., 2013). Pour conforter cette hypothèse, l'injection de peptides

citrullinés dans des souris transgéniques exprimant le DR4 induit une arthrite sévère (Hill et al., 2008). Cependant, d'autres ne confirment pas l'association entre les molécules de HLA et les peptides citrullinés (Sidney et al., 2017), suggérant que ce mécanisme ne doit pas être la cause de la plupart des PR. De plus cette théorie n'explique pas l'apparition de la pathologie chez les patients ne possédant pas les allèles de susceptibilité du HLA. Parallèlement aux molécules de HLA, la mutation perte de fonction de la PTPN22 a été caractérisée comme facteur de prédisposition de la PR et est aussi en relation avec les peptides citrullinés (Chang et al., 2016). La phosphatase PTPN22 interagit avec la PAD4 et inhibe son activité de citrullination, diminuant ainsi la quantité de molécules potentiellement cibles des ACPA (Chang et al., 2015). Or, parmi les patients PR, une plus large proportion d'individus porte cette mutation et il a été proposé que cela engendre une plus forte quantité de peptides citrullinés dans la circulation, pouvant expliquer la perte de la tolérance observée dans la PR. Cette hypothèse à l'avantage de faire le lien avec d'autres facteurs de prédisposition que sont les ACPA et les molécules de HLA DR4/DR1. Cependant, à nouveau, la mutation n'est pas nécessaire au développement de la maladie mais n'est qu'un facteur aggravant de plus.

En lien avec les polymorphismes génétiques, des modifications épigénétiques caractéristiques des patients PR ont été mises en évidence. Par exemples, les fibroblastes synoviaux des articulations de patients présentent une plus forte hypométhylation de certains gènes associés à la migration, la transmigration et l'interaction avec la matrice extracellulaire (Nakano et al., 2013). Plus intéressant encore, chez les patients PR, les Treg présentent une hyperméthylation de certains gènes responsables de leur fonction, inhibant leur transcription (Cribbs et al., 2014). Par ailleurs, l'expression de certains micro-ARN comme le mir155 est très élevée chez les patients (Li et al., 2013) et dans des modèles murins de PR (Blüml et al., 2011). Son expression favorise la production de cytokines inflammatoires délétères dans la PR comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . Ces données, parmi d'autres, suggèrent un profil épigénétique particulier des populations cellulaires impliquées dans la physiopathologie de la PR. Cependant, l'implication de ces modifications dans les mécanismes physiopathologiques de la PR n'est pas élucidée. Il reste notamment à déterminer si ces modifications épigénétiques sont à l'origine du déclenchement de la maladie ou si elles ne sont que la conséquence de la mise en place de la pathologie.

Les facteurs de prédisposition à la PR les mieux identifiés sont des facteurs environnementaux. Tout d'abord, le tabagisme augmente significativement le risque de déclencher une PR (Silman et al., 1996). Un

mécanisme possible d'action est l'augmentation du taux de peptides citrullinés après exposition au tabac (Bidkar et al., 2016). En lien avec les modifications épigénétiques présentées dans le paragraphe précédent, la fumée de cigarette induit aussi d'importantes modifications dans l'expression génique des fibroblastes synoviaux (Engler et al., 2014). Parmi les autres causes environnementales nous pouvons évoquer l'exposition à certains agents pathogènes. Il a été montré que l'infection par *Porphyromonas gingivalis*, une bactérie des muqueuses orales responsable de périodonties, aggrave la pathologie dans des modèles murins (Jung et al., 2017). De même, l'infection par *P.gingivalis* est un facteur de prédisposition à la PR et certains traitements contre cette bactérie induisent une diminution du taux d'ACPA dans le sang, améliorant indirectement l'état des patients (Okada et al., 2013). Un mécanisme possible implique une protéine bactérienne analogue de la PAD qui pourrait être à l'origine d'une citrullination excessive des protéines du soi. Cette source importante d'auto-antigènes associée à l'inflammation générée par le LPS de *P. gingivalis* pourrait être à l'origine de lymphocytes T auto-réactifs spécifiques des résidus citrulline et subséquentement de lymphocytes B producteurs d'ACPA. Par exemple, la majorité des patients atteints de PR et de périodontie possèdent des anticorps spécifiques pour l'énolase de *P.gingivalis*. Or ces anticorps réagissent également avec l' $\alpha$ -énolase peptide 1 citrullinée humaine qui est abondamment retrouvée dans les articulations (Lundberg et al., 2008). Ainsi, la mise en place de la réponse immunitaire contre *P.gingivalis* pourrait être à l'origine de l'inflammation auto-immune ciblant les articulations des patients atteints de PR. Similairement, une réaction immunitaire contre l'Epstein-Barr virus (EBV) pourrait favoriser la génération d'auto-anticorps spécifique de la PR. Bien que l'EBV soit présent chez la majorité de la population adulte mondiale, la plupart du temps sous forme latente, sa charge virale est bien supérieure chez les patients souffrant de PR que chez le reste de la population (Lünemann et al., 2008). Il a été montré que des anticorps spécifiques pour le « Citrullinated Epstein Barr Virus Nuclear antigen 1 » pouvaient réagir avec le fibrinogène citrullinée, un composant de la matrice des articulations (Pratesi et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la réponse immunitaire montée contre l'EBV, associée à une forte activité de citrullination, pourrait être à l'origine du déclenchement de la PR. Là encore, il n'existe pas de preuves formelles de ces mécanismes mais seulement des corrélations indiquant que les personnes infectées par EBV ou *P.gingivalis* sont des populations à risque pour le déclenchement de la PR.

La multitude de facteurs de prédisposition évoquée fait de la PR une pathologie multifactorielle et est à l'origine de l'identification de plusieurs types de PR. On constate notamment qu'il y a des patients ACPA<sup>+</sup> et d'autres ACPA<sup>-</sup> (van der Woude et al., 2009).

## **La physiopathologie de la PR**

Bien que les mécanismes déclencheurs de la PR ou les auto-antigènes cibles soient inconnus, nous savons que cette pathologie est due à une inflammation articulaire, suite à une activation excessive des cellules de l'immunité. Cela peut induire une destruction du cartilage puis de l'os.

Quatre types cellulaires non immunitaires sont responsables de l'intégrité articulaire, ce sont les fibroblastes synoviaux (FLS), les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Leur dérégulation induite par l'inflammation articulaire est la principale cause de la destruction tissulaire. Les FLS forment la membrane synoviale, une couche cellulaire de protection qui recouvre l'intérieur de l'articulation. La membrane synoviale est tapissée d'une couche liquide favorisant la mobilité de l'articulation appelée liquide synovial. Dans la PR, la membrane et le liquide synovial sont envahis par les neutrophiles, des monocytes, des lymphocytes T et des lymphocytes B. Les FLS de patients présentent un phénotype aberrant induisant une mobilité accrue et une perte de leur cohésion, déstabilisant la structure de la membrane synoviale. De plus, les FLS produisent des cytokines inflammatoires favorisant le recrutement de ces cellules immunitaires (Bradfield et al., 2003) et créent un environnement favorisant la survie de ces cellules (Filer et al., 2006). De façon intéressante, la mobilité accrue des FLS de patients confère à ces cellules la capacité de migrer vers d'autres articulations, favorisant la dissémination des atteintes articulaires à plusieurs articulations (Lefèvre et al., 2009). Les FLS aggravent ainsi l'inflammation articulaire mais peuvent aussi participer directement aux dommages tissulaires. Ces cellules produisent des métalloprotéinases matricielles (MMP) qui ont pour cible la matrice de collagène constituant le cartilage. Les FLS induisent ainsi une dégradation du cartilage chez les patients PR. Le cartilage n'est pas seulement constitué d'une matrice, mais aussi de cellules, les chondrocytes. Le milieu inflammatoire des articulations de patients atteints de PR est riche en IL-1 $\beta$  qui entraîne l'apoptose des chondrocytes (Yang et al., 2016b) ou en IL-17 qui inhibe leur différenciation (Kondo et al., 2013), parachevant la destruction du cartilage, dernière protection avant l'exposition de l'os. Dans l'os en situation non pathologique, il existe une constante formation et déformation du tissu osseux. Cet équilibre est assuré par deux types cellulaires, les



ostéoclastes et ostéoblastes. Les ostéoblastes sont responsables de la régénération osseuse en fabriquant du tissu alors que les ostéoclastes contrebalancent l'activité des ostéoblastes en dégradant le tissu osseux superficiel. Le « Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand » (RANKL) est une molécule cruciale dans l'intégrité osseuse puisque inductrice de la différenciation des ostéoclastes et donc de la résorption osseuse. Dans la PR, les cytokines inflammatoires produites dans l'articulation, principalement l'IL-17 (Sato et al., 2006), l'IL-1 $\beta$  (Zwerina et al., 2007), et le TNF- $\alpha$  (Lam et al., 2000), entraînent une érosion osseuse en induisant la production de RANKL par les FLS et en rendant les précurseurs ostéoclastogéniques plus sensibles au RANKL. La relation entre PR et ostéoblastogénèse quant à elle est bien moins caractérisée, mais nous savons que, contrairement à d'autres pathologies articulaires, il n'existe pas de phénomène de réparation osseuse dans la PR, rendant les lésions créées définitives. Il est probable que l'activité des ostéoblastes soit inhibée ou que l'inflammation excessive active les ostéoclastes de telle façon que la balance entre génération et dégradation osseuse penche largement en leur faveur. La dégradation progressive et irréversible du cartilage et de l'os des articulations est au cœur de la physiopathologie de la PR en provoquant une diminution de la mobilité des patients.

L'activité des cellules composant l'articulation (FLS, chondrocytes et ostéoclastes) est ainsi largement influencée par l'infiltration en cellules immunitaires. Les lymphocytes B (LB) font partie de ces cellules. La déplétion des LB dans des modèles d'arthrite comme chez des patients traités par un anticorps anti-CD20, atténue les symptômes de la pathologie, indiquant un rôle important de ces cellules dans la physiopathologie de la PR (Edwards et al., 2004). Ce rôle n'est pas clairement élucidé mais peut faire intervenir une production cytokinique ou leur capacité de présentation antigénique. Nous avons évoqué le rôle des auto-anticorps comme cause potentielle du déclenchement de la PR, mais les LB sont de faibles producteurs d'anticorps, c'est à au stade de différenciation en plasmocyte que la production d'anticorps devient vraiment intense. Les plasmocytes se localisent dans les articulations de patients et produisent *in situ* de grandes quantités d'auto-anticorps de type ACPA et FR. Les auto-anticorps sont essentiellement de classe IgG, mais au cours de la pathologie il est possible de détecter les classes IgM et IgA qui participent également aux dommages causés par la PR. En premier lieu, la reconnaissance de la vimentine citrullinée par les ACPA favorise la différenciation des ostéoclastes, entraînant la résorption osseuse (Harre et al., 2012). Ensuite, les complexes auto-immuns permettent l'initiation de la cascade du complément. Cette suite de réactions enzymatiques mène à la

libération des protéines du complément C1q, C3a et C5a, capables d'activer plusieurs types de cellules immunitaires comme les neutrophiles, les mastocytes ou les macrophages (Chen et al., 2007; Ribon et al., 2019). Enfin, les complexes auto-immuns solubles forment des structures d'activation directe pour les neutrophiles et les macrophages. Ces cellules possèdent des récepteurs pour les fractions constantes des anticorps, les FcR, qui reconnaissent les auto-anticorps des complexes auto-immuns. Suite à cette reconnaissance, c'est l'agrégation des FcR à la surface des cellules qui induit un signal activateur.

La reconnaissance des complexes auto-immuns est le principal mode d'activation des macrophages. Comme dans tout processus inflammatoire, les articulations des patients PR sont infiltrées par des monocytes qui, sous l'influence de facteurs de croissance, se différencient *in situ* en macrophages. Le principal facteur de différenciation macrophagique est le « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF) qui est fortement concentré dans les articulations de patients. L'importance de la population macrophagique dans la physiopathologie de la PR est identifiable par le fait que les modèles murins de PR sont protégés de l'arthrite en absence de GM-CSF (Campbell et al., 1998). Dans la membrane synoviale, les macrophages présentent un phénotype activé de type M1 et produisent les molécules inflammatoires et ostéoclastogéniques IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Sun et al., 2017). Ainsi, les macrophages synoviaux favorisent le maintien du statut inflammatoire de l'articulation et les dommages qui en résultent.

Enfin, un infiltrat de lymphocytes T, essentiellement de type Th1 et Th17, est détectable dans le liquide synovial des patients PR (Liu et al., 2015). La réponse T est soutenue par la présence de molécules de présentation et de signaux de costimulation sur les macrophages, les cellules dendritiques (Lebre et al., 2008), les lymphocytes B ou les neutrophiles. L'importance de stimulation des lymphocytes T dans la PR est révélée par l'efficacité de certains traitements bloquant les signaux de costimulation (abatacept). Les TH1 sont producteurs d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2, stimulant respectivement les cellules myéloïdes et les lymphocytes. Les TH17 sont essentiellement producteurs de la cytokine IL-17, décrite notamment comme ostéoclastogénique et inhibitrice de la différenciation des chondrocytes. De plus, l'infiltrat lymphocytaire T favorise la génération de structure ectopiques responsables de l'activation et de la différenciation des LB directement dans l'articulation (Humby et al., 2009). L'infiltrat lymphocytaire dans la PR agit donc sur plusieurs cibles pour entretenir l'inflammation, participer à l'érosion osseuse et stimuler les autres populations immunitaires.

En résumé, de nombreuses populations immunitaires activées infiltrent la membrane synoviale pour entretenir une inflammation locale. Les cellules immunitaires induisent la destruction du cartilage et l'érosion osseuse soit directement soit par le biais de cytokines inflammatoires affectant le comportement des FLS, des chondrocytes et ostéoclastes (IL-17, le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ ). Un dernier facteur crucial dans la physiopathologie de la PR est la présence d'auto-anticorps de type ACPA et FR. Comme nous allons à présent le développer, deux autres populations cellulaires, les neutrophiles et les Treg, sont présentes dans les articulations de patients atteints de PR et ont été les sujets principaux de cette étude.

## **Les neutrophiles dans la PR**

Les neutrophiles représentent la majorité des cellules recrutées dans les articulations des patients PR et peuvent représenter jusqu'à 80% des cellules immunitaires infiltrées dans le liquide synoviale ou la membrane synoviale. Cette prévalence est conditionnée par la forte expression de l'IL-17 par les Th17 qui induit le recrutement des neutrophiles (Ruddy et al., 2004) et stimule la granulopoïèse (Schwarzenberger et al., 2000). A cela s'ajoute une augmentation de la survie, et donc de la durée de vie des neutrophiles, permise par l'environnement hypoxique de l'articulation inflammatoire (Cross, 2006). Leur prévalence et le constant recrutement des neutrophiles dans l'articulation des patients en font un acteur principal de la destruction articulaire.

Une fois dans l'articulation, les neutrophiles présentent un phénotype inflammatoire très activé, et leur stimulus principal est la reconnaissance des complexes auto-immuns par leur FcR (Robinson et al., 1994) mais peuvent aussi être activés par des DAMPS libérés lors de la destruction tissulaire. Pour être sensibles à l'activation par les FcR, les neutrophiles subissent une étape de sensibilisation (« priming ») provoquée par des molécules inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et le GM-CSF (Robinson et al., 1994), très concentrées dans les articulations de patients. En effet, les neutrophiles de patients PR présentent une sensibilisation et sont alors plus facilement activables que des neutrophiles de donneurs sains (Eggleton et al., 1995). Les complexes auto-immuns solubles sont reconnus par le Fc $\gamma$ RIII mais les neutrophiles peuvent aussi reconnaître par le Fc $\gamma$ RII les auto-anticorps liés au cartilage. La reconnaissance de complexes auto-immuns induit une dégranulation des neutrophiles et la libération de ROS qui est potentialisée par la sensibilisation. Les ROS sont des molécules hautement réactives avec un fort potentiel cytotoxique. L'activité des ROS altère l'adhérence des chondrocytes

(Clancy et al., 1997), mais aussi dégrade directement la matrice extracellulaire du cartilage (Rees et al., 2004). Lors de la dégranulation, les protéines granulaires NE, cathepsin G et gélatinase sont libérées dans le milieu articulaire. La NE et la cathepsine G participent à l'inflammation en activant l'IL-33 par la clivage de son précurseur (Lefrançais et al., 2012). De plus, la NE, la cathepsin G et la gélatinase endommagent directement le cartilage en dégradant la matrice de collagène (Janusz and Doherty, 1991; Van Den Steen et al., 2002). La dégranulation et la production de ROS bénéfiques lors de la lutte contre des agents pathogènes, se retrouvent ainsi délétères dans le contexte de la PR où leur production aggrave les dommages tissulaires.

Dans la PR, les neutrophiles présentent des activités non classiques. Par exemple, les neutrophiles sont producteurs de molécules médiatrices envers les autres populations impliquées dans la pathologie. Par l'expression de RANKL induite après activation via de l'ADN mitochondrial (Contis et al., 2017), les neutrophiles induisent la différenciation des ostéoclastes responsables de l'érosion osseuse (Chakravarti et al., 2009), ou encore par l'expression de BAFF les neutrophiles stimulent la différenciation des LB en cellules productrices d'auto-anticorps (Assi et al., 2007). Comme les autres populations immunitaires infiltrées, les neutrophiles participent à la pérennisation de l'inflammation, notamment par l'expression de TNF- $\alpha$  membranaire délétère dans la PR (Wright et al., 2011) ou la production d'IL-8, impliquée dans le recrutement de nouveaux neutrophiles. De plus, les neutrophiles de patients PR expriment le CMH-II et présentent des antigènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Cross et al., 2003). Le contexte particulier de la PR peut même induire une trans-différenciation des neutrophiles en cellules de type cellule dendritique capable d'activer les lymphocytes T (Iking-Konert, 2005).

Une dernière fonction des neutrophiles est impliquée dans la physiopathologie de la PR, c'est la NETose suicidaire. Les neutrophiles de patients atteints de PR se caractérisent par une NETose spontanée élevée (Khandpur et al., 2013), de plus, le sérum comme le liquide synovial ou les auto-anticorps de patients induisent la NETose. Cette induction est dépendante du TNF- $\alpha$  et de l'IL-17, fortement exprimées dans les articulations des patients. Le processus de NETose implique une décondensation de la chromatine régulée en partie par les enzymes PAD (PAD4 principalement chez les neutrophiles). Les PAD ont pour fonction enzymatique de citrulliner les protéines et en particulier les histones complexées à l'ADN et c'est cette activité de déimination qui participe à la décondensation puis la NETose. Or, lors du processus de NETose, l'ADN emporte avec lui des protéines neutrophilaire et donc aussi des protéines citrullinées par les PAD. Ainsi, les NET ont été proposés

comme source importante de protéines citrullinées et comme une cible potentielle des ACPA (Khandpur et al., 2013). En outre, les NET augmentent la production de cytokines proinflammatoires par les FLS comme l'IL-6 et l'IL-8. De même, nous avons récemment montré que les NET sont reconnus par les ACPA et qu'ils ont une activité pro-inflammatoire sur les neutrophiles et les macrophages au repos (Ribon et al., 2019). A l'instar des autres capacités effectrices des neutrophiles, la NETose favorise le développement de la PR.

Dans la PR les neutrophiles sont amorcés par les cytokines inflammatoires et activés par les complexes auto-immuns. Bien qu'aucun agent pathogène ne soit présent, les neutrophiles mettent en jeu leurs fonctions effectrices de NETose, de dégranulation, de production de ROS et de libération de cytokines qui, sur la durée, se montrent délétères pour l'environnement articulaire. L'importance de cette population dans la physiopathologie est démontrée par le fait que des souris sont protégées contre le développement d'arthrite dans un modèle de PR en absence de neutrophiles (Wipke and Allen, 2001). Bien que ces données indiquent un rôle délétère important, peu d'études s'intéressent à un potentiel rôle bénéfique des fonctions régulatrices des neutrophiles. Par exemple, bien que les ROS favorisent la dégradation du cartilage, ils ont aussi des propriétés inhibitrices envers les lymphocytes T (Pillay et al., 2012). Cet effet antagoniste des ROS peut expliquer l'échec des thérapies basées sur des antioxydants dans la PR (Edmonds et al., 1997; Jaswal et al., 2003). Similairement, des résultats récents produits dans notre équipe confirment le rôle délétère des NET dans la PR mais indiquent, en même temps, un potentiel anti-inflammatoire de ces structures selon le type cellulaire ciblé et son niveau d'activation (Ribon et al., 2019). Des études approfondies sur le double jeu des neutrophiles pourraient ainsi expliquer l'échec d'autres thérapies ciblant des fonctions ou des populations considérées uniquement proinflammatoires.

## **Les Treg dans la PR**

Le rôle principal des Treg est de maintenir la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. Ils sont de plus responsables du contrôle de la réponse inflammatoire. Ces fonctions sont altérées chez les patients atteints de PR. Plusieurs modèles murins de PR indiquent que le transfert de Treg améliore les symptômes et que, à l'inverse, la déplétion de cette population aggrave la pathologie (Morgan et al., 2005). En situation non pathologique, les Treg inhibent la différenciation ostéoclastique par l'expression de CTLA-4 ou la sécrétion de TGF- $\beta$  (Kim et al., 2007; Zaiss et al., 2007). A ce titre, parmi les effets bénéfiques du transfert de Treg chez la

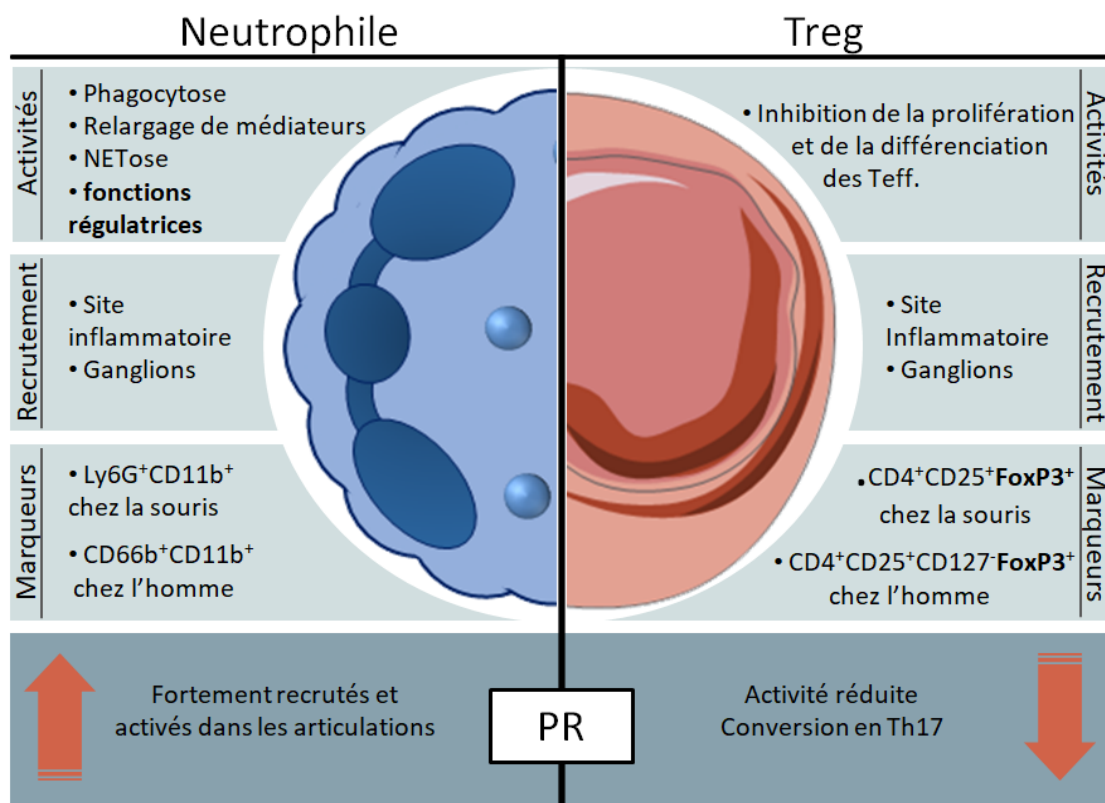
souris arthritique, une diminution de la résorption osseuse a été observée (Zaiss et al., 2010). Via plusieurs mécanismes inhibiteurs dont l'expression de CTLA-4, les Treg inhibent aussi l'activation des lymphocytes T et B, directement ou en contrôlant la présentation antigénique (Figure 6). Dans la PR, même si plusieurs études présentent des résultats contradictoires quant à la quantité de Treg présents dans le sang de patients, il est plutôt admis que leur nombre n'est pas modifié dans le sang et augmenté dans le liquide synovial mais que leur fonction est bien altérée dans les deux compartiments (Cao et al., 2004). Le recrutement des Treg dans les articulations des patients ne suffit pas à contrôler l'inflammation à cause d'une capacité suppressive amoindrie.

Plusieurs arguments indiquent que les capacités régulatrices des Treg sont altérées dans la PR. En premier lieu, le milieu inflammatoire composant le liquide synovial possède des propriétés inactivatrices pour les Treg (Herrath et al., 2011). Le liquide synovial est riche en cytokines inflammatoires et, certaines équipes, ont avancé un rôle du TNF- $\alpha$  comme inhibiteur des Treg par l'augmentation de l'activité de la protéine kinase C  $\theta$  (PKC- $\theta$ ) (Zanin-Zhorov et al., 2010). De plus, dans la PR, le TNF- $\alpha$  pourrait inhiber l'action des Treg en induisant la déphosphorylation de FoxP3 (Nie et al., 2013) et l'utilisation d'un traitement bloquant l'activité du TNF- $\alpha$  restaure les capacités suppressives des Treg (Nadkarni et al., 2007). Cependant, et de manière plus généralement admise, d'autres études indiquent un rôle bénéfique du TNF- $\alpha$ , plus précisément du TNF- $\alpha$  membranaire, dans la fonction des Treg (Nguyen and Ehrenstein, 2016). Les Treg expriment des quantités élevées du récepteur de type 2 du TNF (TNFR2) et le rôle du TNFR2 dans la réponse des Treg au TNF- $\alpha$ , en particulier en condition inflammatoire, fait l'objet d'une étude en lien avec ce travail de thèse (Santinon et al., article en révision). L'IL-6 présent dans les articulations de patient influence aussi la fonction des Treg en diminuant leur potentiel régulateur et celui-ci peut être restauré par un traitement dirigé contre l'IL-6 (Thiolat et al., 2014b). Par ailleurs, parmi les gènes de susceptibilité favorisant l'apparition de la PR, un variant du CTLA-4, une molécule largement impliquée dans les mécanismes de suppression exercés par les Treg, est plus fréquemment détectable chez les patients que dans le reste de la population. Ceci suggère un rôle de cette molécule dans la pathologie (Plenge et al., 2005). En effet, même parmi les patients ne possédant pas le variant délétère, les Treg présentent une expression faible du CTLA-4 et ce défaut est associé à une diminution des capacités suppressives des Treg de PR envers les T<sub>H</sub>17 (Flores-Borja et al., 2008). Une diminution de l'expression, et donc de l'activité de la molécule CTLA-4, est fréquemment associée à la PR et il est probable que certains variants favorisent cette chute d'expression et ainsi le développement de la pathologie. L'incapacité des Treg à

contrôler la réponse T dans la PR est accentuée par une résistance des Teff à la suppression. Cette résistance est conférée par le milieu articulaire riche en IL-6 et en TNF- $\alpha$  qui active de façon excessive la protéine kinase B (PKB) dans les Teff (Wehrens et al., 2011). Ainsi, malgré leurs nombreux mécanismes inhibiteurs, les Treg échouent à contrôler la réponse immunitaire générée lors de la PR. Ce défaut est causé par des événements génétiques ou liés à l'environnement articulaire inflammatoire.

En plus de capacités suppressives amoindries, le phénotype des Treg de patients est instable. Plusieurs contextes inflammatoires peuvent favoriser une instabilité de l'expression de FoxP3 au profit de fonctions effectrices pathogènes (Zhou et al., 2009). Dans le contexte de la PR, le transfert de Treg chez la souris arthritique induit une conversion des Treg en Th17 arthritogéniques, limitant l'effet bénéfique du transfert des cellules régulatrices (Komatsu et al., 2013). La conversion des Treg en cellules effectrices proches des Th17 (exFoxP3Th17) puis leur accumulation dans le liquide synovial est dépendante de l'IL-6 produite par les FLS. Il existe donc une différence importante entre les Treg transférés dans cette expérience et ceux dont le transfert inhibe efficacement l'arthrite, sans générer d'exFoxP3Th17 (Morgan et al., 2005). Les exFoxP3Th17 proviennent de Treg instables, et se différencient préférentiellement à partir des Treg exprimant faiblement CD25, si bien que le transfert sélectivement des cellules exprimant faiblement CD25 n'a pas d'effet protecteur sur l'arthrite mais, au contraire, aggrave l'inflammation par leur conversion en exFoxP3Th17 (Komatsu et al., 2013). Les Treg exprimant faiblement CD25 sont plus vraisemblablement originaires des pTreg mais cette hypothèse reste à être vérifiée. Les exFoxP3Th17 ont un profil d'expression unique, différent des Th17 classiques ou des Treg. En particulier, ces cellules expriment RANKL, et stimulent l'ostéoclastogénèse (Komatsu et al., 2013). La conversion des Treg en exFoxP3Th17 arthritogéniques participe donc au maintien du statut inflammatoire des articulations et à l'érosion osseuse.

Le rôle de Treg dans la PR est de contrecarrer l'excessive inflammation auto-immune articulaire. Cependant, une combinaison de facteurs génétiques combinés à un environnement articulaire inflammatoire empêche les Treg d'effectuer leur rôle régulateur. De surcroît, les Treg infiltrés étant plus instables du fait de cet environnement, ont tendance à se convertir en cellules effectrices hautement arthritogéniques. En résumé, non seulement les Treg sont incapables de résoudre l'inflammation dans la PR mais participent aussi directement aux atteintes articulaires. Les caractéristiques respectives des Treg et des neutrophiles ainsi que leur implication dans la PR sont résumés en figure 7.



**Figure 7 : Caractéristiques principales des neutrophiles et des Treg en condition normale et dans la polyarthrite rhumatoïde (PR).**

Dans la PR, les neutrophiles sont fortement recrutés et activés dans les articulations. Ils ont essentiellement un rôle délétère bien que leurs fonctions suppressives dans ce contexte n'ont jamais été étudiées. Les Treg quant à eux devraient être bénéfiques dans la PR, mais leurs fonctions régulatrices sont diminuées et leur stabilité est compromise.

## La clinique

La PR est une maladie auto-immune inflammatoire chronique qui touche plusieurs articulations sur un mode bilatéral et symétrique (petites et moyennes articulations de préférence). La maladie se complique souvent d'une destruction articulaire responsable d'un handicap important.

Les patients atteints de PR présentent des articulations douloureuses, gonflées et enraidies, ainsi qu'une concentration en protéine C réactive (CRP) élevée et une vitesse de sédimentation des érythrocytes (VS) importante témoignant d'une inflammation systémique. Le diagnostic de la PR se fait sur des critères cliniques mais également biologiques afin d'éliminer les diagnostics différentiels (lupus, rhumatisme psoriasique etc..) La classification de la PR repose sur la caractérisation du nombre et du type d'articulations touchées, la présence d'anticorps (FR et ACPA), le syndrome inflammatoire biologique (CRP ou VS) et la durée des symptômes (tableau 1). Ces recommandations pour l'identification la plus rapide possible des patients PR ont



été établies par une association entre l'« American college of rheumatology » (ACR) et l' « European league Against Rheumatism » (EULAR) (Aletaha et al., 2010).

L'atteinte principale et la plus handicapante des patients atteints de PR réside en l'érosion osseuse et la destruction du cartilage. Des techniques d'imagerie avancée permettent de détecter et de définir l'ampleur des dommages articulaires. Les radiographies conventionnelles ou informatisées permettent d'observer les articulations des patients et de suivre l'évolution de la destruction articulaire. Ces techniques sont utilisées pour assurer le diagnostic mais surtout pour évaluer l'efficacité d'un traitement sur la destruction osseuse, la principale manifestation de la PR qui doit être contrôlée (Bruynesteyn, 2004). Plus le diagnostic de la PR est établi rapidement, plus la destruction articulaire peut être contrôlée efficacement. Face à cet enjeu, des techniques de haute résolution comme l'ultrasonographie ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont

	<b>Score</b>
<b>Population cible (Quels patients doivent être testés ?):</b>	
1) au moins une articulation présente un synovite (gonflement)	
2) la synovite ne peut pas être expliquée par une autre pathologie*	
Classification de la PR (score cumulatif des catégories A à D), un score $\geq 6/10$ est nécessaire pour une classification définitive.	
A. Articulations touchées**	
1 grande articulation	<b>0</b>
2 à 10 grandes articulations	<b>1</b>
1 à 3 petites articulations (avec ou sans grandes articulations touchées)	<b>2</b>
4 à 10 petites articulations (avec ou sans grandes articulations touchées)	<b>3</b>
>10 articulations dont au moins 1 petite	<b>5</b>
B. Sérologie***	
Négative pour FR <b>et</b> négative pour ACPA	<b>0</b>
Faible pour FR <b>ou</b> Faible pour ACPA	<b>2</b>
Forte pour FR <b>ou</b> Forte pour ACPA	<b>3</b>
C. Syndrome inflammatoire biologique	
Normal pour CRP <b>et</b> normal pour VS	<b>0</b>
Anormal pour CRP <b>ou</b> anormal pour VS	<b>1</b>
D. Durée des symptômes	
<6 semaines	<b>0</b>
$\geq 6$ semaines	<b>1</b>

**Tableau 1 : Critères de classification de la polyarthrite rhumatoïde (PR) établis par l'« American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism » en 2010.**

\*Les diagnostics différentiels incluent le lupus érythémateux systémique, arthrite psoriasique et la goutte. \*\*Les grandes articulations comprennent les épaules, les coudes, les hanches, les genoux et les chevilles alors que les petites articulations font références aux phalanges des doigts et aux poignets. \*\*\*Une sérologie négative indique un dosage des anticorps sous le seuil normal, une sérologie faible comprend des dosages  $\leq 3$  fois la normale et une sérologie forte correspond à des dosages  $> 3$  fois la normale. FR: facteur rhumatoïde; ACPA: Anticorps anti-protéines citrullinés; CRP: protéine C réactive; VS: vitesse de sédimentation.

été mises en application pour l'observation de la PR. L'ultrasonographie possède l'avantage d'être relativement peu onéreuse et accessible pour les services de rhumatologie. De plus, cette technique permet de détecter les phénomènes inflammatoires comme des synovites, ce qui n'est pas le cas de la radiographie (Chauvin and Doria, 2017). La MRI est la technique la plus résolutive dans le but de détecter les érosions osseuses des patients souffrant de PR, avant même qu'elles ne soient détectables par radiographie (Hetland et al., 2009). Comme l'ultrasonographie la MRI peut détecter les phénomènes inflammatoires mais comporte un coût de fonctionnement très élevé et n'est pas accessible facilement. De façon intéressante, certaines études proposent que le MRI soit capable de prédire l'apparition d'une arthrite chez des sujets à risque, ce qui pourrait représenter un avantage considérable dans l'optique de traiter précocement ces pathologies (Kleyer et al., 2016).

Il convient d'évaluer l'activité de la maladie afin de pouvoir suivre l'évolution des patients au cours du temps et, surtout, pour déterminer l'efficacité des traitements administrés. Plusieurs scores existent, le plus utilisé en pratique étant le DAS28 (Prevoe et al., 1995). Un score inférieur ou égal à 2,6 indique une rémission, entre 2,7 et 3,1 il traduit une activité faible de la maladie, entre 3,2 et 5.1 une activité modérée et au delà de 5,1 une activité forte. D'autres scores d'activité peuvent être utilisés, comme le SDAI, basé sur le ressenti du patient (PtGA) et une évaluation globale du médecin (EGA) (Smolen et al., 2003). Le CDAI est un autre exemple de score simplifié qui lui ne se base que sur une évaluation clinique (Aletaha et al., 2005).

Outre les lésions articulaires, les patients souffrant de PR peuvent aussi présenter des atteintes extra-articulaires. En premier lieu, la comorbidité la plus fréquemment associée à la PR, est l'augmentation du risque cardiovasculaire. Celui-ci est notamment causé par une athérosclérose fréquemment retrouvée chez les patients souffrant de PR. Avec une prévalence importante, des atteintes pulmonaires sont présentes chez les patients PR. Une pneumopathie interstitielle se déclarent chez 20% des patients atteints de PR et, rarement, peuvent générer des fibroses pulmonaires au détriment de l'état de santé du patient (Olson et al., 2011). Les patient atteints de PR font aussi des vascularites entraînant, entre autres, des manifestations dermatologiques comme des ulcérations ou des gangrènes aux doigts (Scott and Bacon, 1984). Bien qu'il existe une dissociation entre l'atteinte articulaire et celle extra-articulaire, le traitement systémique de la PR permet dans la majorité des cas de limiter l'atteinte extra-articulaire.

Puisque l'inflammation articulaire est la cause des symptômes cliniques et des dommages associés, elle constitue la principale cible thérapeutique de la PR. Plusieurs molécules sont utilisables chez les patients PR avec des activités distinctes et une efficacité patient-dépendante. L'initiation du traitement chez un patient PR nouvellement diagnostiqué comprend l'utilisation de « classical disease-modifying antirheumatic drugs » (cDMARD), une classe de molécules diverses avec un potentiel bénéfique avéré contre les pathologies rhumatismales. Ces molécules possèdent généralement des propriétés anti-inflammatoires et améliorent l'état des patients en contrôlant l'inflammation synoviale. Le cDMARD le plus couramment utilisé dans la PR est le méthotrexate, un inhibiteur du cycle cellulaire. Délivré en première intention, il peut être toutefois remplacé par un autre cDMARD comme la sulfasalazine, le leflunomide ou les dérivés de la chloroquine dans les cas d'intolérance. Par exemple, en cas de grossesse, le méthotrexate et le leflunomide sont particulièrement contre-indiqués. En traitement de première intention, les cDMARDs sont combinés avec des faibles doses de glucocorticoïdes, comme la prednisolone, qui potentialisent l'effet des cDMARDs (Wassenberg et al., 2005). Les injections de glucocorticoïdes doivent être espacées et ne peuvent durer plus de 6 mois au risque de développer des effets secondaires indésirables. A 6 mois de traitement de première intention, si la diminution souhaitée du DAS28 n'est pas atteinte ( $DAS28 < 2,6$ ), le traitement doit s'adapter par l'ajout d'une biothérapie.

Les biothérapies sont des thérapies ciblant des voies clés de l'inflammation dans la PR : le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, la stimulation des lymphocytes T, les lymphocytes B ou la voie de signalisation JAK/STAT. L'inhibition de l'inflammation par l'inhibition du TNF- $\alpha$  peut être atteinte par 5 molécules. L'éta nercept est une molécule de fusion entre la partie constante d'un anticorps et le TNFR2. Après injection, l'éta nercept interagit avec le TNF- $\alpha$  et l'empêche de reconnaître son récepteur à la surface des cellules immunitaires. Similairement, l'infliximab, l'adalimumab, le certolizumab pegol et le golimumab sont des anticorps monoclonaux qui reconnaissent le TNF- $\alpha$  et empêchent sa fixation sur ses cellules cibles. En dehors du TNF- $\alpha$ , l'IL-6 est une autre cible qui peut être bloquée par le tocilizumab et le saralimumab, deux anticorps reconnaissant le récepteur de l'IL-6 et inhibant sa signalisation. Enfin, l'IL-6 peut être directement ciblé par des anticorps monoclonaux comme le sirukumab. L'inhibition de la réponse T quant à elle est obtenue en privant les lymphocytes du signal de costimulation lors de la présentation antigénique. L'abatacept a été développé pour cela, c'est une molécule de fusion entre la partie constante d'un anticorps et le CTLA-4. L'abatacept se fixe préférentiellement sur les molécules de costimulation CD80/CD86 et prive les lymphocytes de leur activation tout en rendant la CPA tolérogène

(Patakas et al., 2016). Ainsi, l'abatacept supplémente le CTLA-4 des Treg qui ne suffit pas à contrôler l'inflammation dans la PR. Enfin, il est possible de cibler les LB. Le rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 des LB, son interaction avec sa cible induit une déplétion des LB. Bien que classiquement prescrit qu'après un échec des autres biothérapies, le rituximab montre une efficacité particulière dans le traitement des arthrites précoces lorsque celles-ci peuvent être diagnostiquées à temps (Tak et al., 2011). La plupart des biothérapies montrent une plus grande efficacité en combinaison avec les cDMARDs (Burmester et al., 2007), le traitement de première intention est donc maintenu lors de l'ajout d'une biothérapie. Les efficacités globales des biothérapies sont similaires, cependant, de part leur mécanismes d'actions différents, l'échange d'une biothérapie par une autre est une stratégie thérapeutique efficace chez les patients résistant à une biothérapie donnée (Nam et al., 2017). Il est important de noter que les biothérapies ne sont pas données en première intention, ni même en combinaison entre elles, à cause de leurs effets secondaires non négligeables. Principalement, les biothérapies induisent une immunodéficience qui peut mener à des infections opportunistes ou des réactivations tuberculeuses (Ramiro et al., 2017). Il faut aussi mentionner que les biothérapies représentent un coût de traitement fortement supérieur aux traitements de première intention.

Une dernière classe de traitement indiquée dans la PR est l'utilisation des inhibiteurs de la voie de signalisation JAK/STAT impliquée dans l'effet inflammatoire des cytokines comme l'IL-6, le GM-CSF ou l'IL-2. Le tofacitinib et le baricitinib sont utilisés comme inhibiteur des Janus kinase (JaK) et sont des alternatives intéressantes en cas d'échec d'autres biothérapies (Taylor et al., 2017) ou même en première intention.

En résumé, le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde est difficile, menant parfois à des prises en charges tardives. Le traitement de première intention comprend des cDMARDs et des glucocorticoïdes qui, en cas d'échec, est supplémente par une thérapie ciblant le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'activation des lymphocytes T, les LB ou la signalisation JAK/STAT. Toujours en cas de résistance au traitement, la thérapie ciblée est échangée pour une autre jusqu'à obtention d'une réponse satisfaisante (rémission ou activité faible : DAS28<3.1). Lors de l'utilisation de biothérapies, les effets secondaires doivent être soigneusement surveillés, en particulier le risque d'infection. Cependant, malgré le nombre élevé d'options à disposition, plus de 25% des patients ne présentent pas de rémission à long terme et ne possèdent pas d'alternative de traitement. Il reste donc un effort de recherche à effectuer pour le développement de traitements plus sûrs et permettant d'aider les patients non répondeurs aux traitements actuels.

## Les modèles murins de la PR

Etudier une pathologie chez l'homme engendre de nombreuses limitations, en particulier sur les données biologiques analysables, sur la disponibilité des sujets ou la quantité d'échantillons biologiques utilisables. Comme pour de nombreuses autres pathologies, il existe plusieurs modèles de la PR visant à mimer la pathologie humaine principalement chez le rongeur.

Le modèle le plus commun est l'arthrite expérimentale au collagène (AEC), qui se base sur une immunisation des souris avec du collagène afin de générer une réponse auto-immune contre cette molécule exprimée spécifiquement dans le cartilage articulaire (Courtenay et al., 1980). Le protocole consiste à injecter du collagène de type II bovin (CIIb) dans des souris DBA/1 en présence d'adjuvant complet de Freund (ACF). La présence d'ACF, un mélange de composants bactériens hautement inflammatoires, stimule le système immunitaire afin de monter une réponse contre le CIIb, autrement toléré par les souris. Pour induire les signes cliniques de la pathologie, 3 semaines après la première injection, un rappel de CIIb mélangé à l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) est nécessaire. L'immunisation génère une forte réponse B dominée par la production d'anticorps anti-CIIb de classe IgG2a et IgG2b. Une réponse T est aussi détectable, principalement de type Th1 et Th17, et aussi spécifique du CIIb. Cette réponse immunitaire contre le CIIb cross-réagit avec le collagène de l'hôte engendrant une inflammation des articulations. L'inflammation provoque des œdèmes, des érythèmes et une déformation des articulations qui sont les symptômes d'une hyperplasie synoviale et de l'érosion du cartilage comme de l'os. Dans les 20 jours suivants le rappel, la plupart des souris développe les signes cliniques de la pathologie proches de la PR (Boissier et al., 1987). De façon intéressante, l'incidence de l'AEC est influencée par le génotype des souris et en particulier leur haplotype de CMH, comme c'est le cas chez l'homme. En effet, la souche DBA/1 est bien plus susceptible de déclencher la pathologie que la souche C57BL/6 et des modifications génétiques des CMH peuvent conférer une plus grande sensibilité à l'AEC (Rosloniec et al., 1998). A nouveau comme chez l'homme, ce modèle évolue par phases de poussées et de rémissions (Marinova-Mutafchieva et al., 2006). Ainsi, l'AEC est un modèle qui mime chez la souris de nombreuses caractéristiques de la PR. L'AEC a cependant pour inconvénient que sa réponse immunitaire est exclusivement dirigée contre le collagène. Bien qu'il existe une immunité anti-collagène dans la PR, la réponse B et T est bien plus hétérogène que dans l'AEC (Schwenzer et al., 2016), suggérant des mécanismes immunitaires différents.

Les anticorps auto-réactifs ont un rôle essentiel dans la mise en place de la PR, si bien qu'il est possible d'induire une arthrite par transfert passif d'anticorps de souris développant une AEC chez une souris naïve (Stuart and Dixon, 1983). Un autre modèle a d'ailleurs été développé par l'injection des anticorps anti-collagène uniquement et dénommé Collagen Antibody Induced Arthritis (CAIA) (Nandakumar et al., 2003). La reconnaissance du collagène par les anticorps entraîne une activation des neutrophiles et des macrophages menant à une destruction du cartilage et de l'os des articulations dès 48h après l'injection (Santos et al., 1997). Ce développement très rapide implique des neutrophiles et des macrophages et permet une étude de la destruction osseuse. Cependant, contrairement à la PR, aucune réponse T ou B n'est induite, et ce n'est pas un modèle chronique car l'inflammation générée se résorbe d'elle même sous 15 jours. Ces différences importantes doivent être prises en compte lors de l'utilisation du modèle CAIA.

Afin de générer un modèle inflammatoire articulaire qui ne soit pas complètement spécifique du collagène, le modèle Delayed-Type hypersensitivity Arthritis (DTHA) a été mis au point (Tanaka et al., 2007). Ce modèle consiste en l'immunisation intradermique d'une souris avec de la méthyl-BSA (mBSA) émulsionnée avec du CFA pour entraîner une réponse immunitaire contre la mBSA. L'injection est complétée par des anticorps anti-collagène qui servent à déterminer la localisation articulaire de l'inflammation. Enfin, un rappel à la mBSA dans le coussinet plantaire entraîne une réponse T et B contre la mBSA et une forte inflammation locale. L'association de cette inflammation lymphocytaire et de l'injection des anticorps anti-collagène déclenche une arthrite sévère de la patte immunisée de la souris (Atkinson et al., 2012). Ce modèle compile destruction osseuse et inflammation en faisant intervenir neutrophiles, macrophages et lymphocytes. De plus le modèle DTHA recrée des signes cliniques proches de la PR et n'est pas conscrit à une réaction contre le CIIb. En revanche, bien que persistante, l'inflammation générée diminue fortement en quelques jours ne reflétant pas la chronicité de la PR. Plus important encore, l'arthrite générée par la DTHA est limitée à l'articulation immunisée et ne rend pas compte du potentiel systémique de la PR.

Un autre modèle intéressant d'arthrite chez le rongeur rend compte de l'importance des anticorps et du fond génétique dans la PR, c'est le modèle K/BxN. Les souris de souche K/BxN sont issues d'un croisement entre une lignée possédant un TCR transgénique et une lignée possédant le CMH de classe II A<sup>B7</sup>. La reconnaissance du A<sup>B7</sup> par le TCR transgénique des lymphocytes déclenche l'émergence d'un syndrome auto-immun caractéristique d'une arthrite sévère (Kouskoff et al., 1996). L'inflammation articulaire développée est

dépendante du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 ainsi que de la génération d'anticorps anti-glucose-6-phosphate isomérase. Les anticorps produits sont hautement pathogènes puisque le transfert du sérum de souris K/BxN déclenche une arthrite chez des souris naïves (Korganow et al., 1999). Les souris K/BxN sont donc à l'origine de deux modèles, une arthrite spontanée dépendante du fond génétique, et un modèle d'arthrite par transfert de sérum, proche du modèle CAIA. Ce modèle a pour avantage d'être spontané et d'être favorisé génétiquement comme chez l'homme. L'inflammation est bien chronique et systémique avec des atteintes articulaires. De plus, le TCR transgénique facilite l'étude des populations de lymphocytes T en éliminant leur clonalité. En revanche les mécanismes impliqués restent mal compris, en particulier le fait que l'infiltrat des articulations est essentiellement de type myéloïde alors que le fond génétique, basé sur un TCR transgénique, suggère une prévalence lymphocytaire. Enfin, sa particularité génétique qui fait sa force est aussi une faiblesse. Chez la souris, les études *in vivo* s'appuient sur l'utilisation de souches déficientes pour des molécules clés du système immunitaire pour en étudier le rôle dans divers contextes (souris KO « knock-down »). Ces déficiences précises sont très répandues parmi la souche de souris C57BL/6 et obtenues par croisements successifs mais ce travail est moins complet pour la souche K/BxN. Il est donc difficile d'étudier l'effet d'une molécule sur le développement spontané de l'arthrite chez la souris K/BxN en utilisant des KO (ex : Etude du rôle du TNFR2 dans l'arthrite en utilisant des souris TNFR2 KO). Similairement, bien que le développement spontané de la pathologie corresponde à la PR, il est difficile de synchroniser des expériences avec des souris développant la maladie à plusieurs jours d'intervalle.

Un dernier modèle chez la souris récapitule la PR, ce sont les souris sur-exprimant le TNF- $\alpha$  humain (Keffer et al., 1991). La surexpression du TNF- $\alpha$  génère une inflammation chronique caractérisée par une atteinte articulaire. Les dommages osseux sont essentiellement dus aux macrophages infiltrés qui produisent le TNF- $\alpha$ , mais un important infiltrat de neutrophiles et de lymphocytes T est aussi détectable ce qui rapproche le modèle de la pathologie humaine. A l'inverse, l'inflammation TNF- $\alpha$  dépendante n'est pas associée à une élévation du titre d'anticorps dans le sang et les lymphocytes B ne jouent pas de rôle dans ce modèle.

En résumé, plusieurs modèles murins peuvent simuler la pathologie humaine, chacun avec ses défauts et ses avantages, chacun représentant un aspect de la pathologie. Aucun n'est plus performant que les autres, le choix du modèle à utiliser doit se faire dans la compréhension de sa physiopathologie et en accord avec la question scientifique posée.

# Résultats



# Article 1

Le but de ce travail de thèse était de caractériser l'interaction entre les Treg et les neutrophiles en étudiant les conséquences de cette interaction sur le phénotype et la fonction des deux populations cellulaires. Pour cela nous avons mis au point des expériences de cocultures entre Treg et neutrophiles purifiés chez la souris comme chez l'homme. Ensuite, nous avons caractérisé les mécanismes impliqués dans cette interaction. Enfin, nous avons étudié les effets du contexte particulier de la PR sur le dialogue entre les Treg et les neutrophiles chez les patients afin de déterminer de nouveaux mécanismes impliqués dans le déclenchement ou la chronicité de la pathologie. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article scientifique présenté ci-après. (Article en préparation)

## **Polymorphonuclear Neutrophils and Regulatory T Lymphocytes (Treg) Cooperate to Sustain Treg Activity but this interaction is altered in rheumatoid arthritis patients**

Maxime Batignes<sup>1</sup>, François Santinon<sup>1</sup>, Magali Breckler<sup>1</sup>, Roxane Hervé<sup>1</sup>, Marie-Christophe Boissier<sup>1,2</sup>, Natacha Bessis<sup>1\*</sup> and Patrice Decker<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>INSERM UMR 1125, University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, <sup>2</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Rheumatology Department, Avicenne Hospital, Bobigny, France.

\*equal contribution

# Introduction

The immune system is tightly controlled in order to maintain tissue homeostasis and control inflammation, thus disruption of this regulation leads to several inflammatory diseases like autoimmune diseases (Dominguez-Villar and Hafler, 2018). While inhibition of immune system has long been attributed to lymphoid cells, some evidences reveal the involvement of the myeloid compartment (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). For example, polymorphonuclear neutrophils (PMN) are myeloid cells well characterized for their pathogen clearance properties and ability to promote inflammation. However, some recent evidences show that PMN are able to modulate inflammation, mainly through inhibition of T cell activation. These so-called regulatory PMN represent an emerging concept and two mechanisms have been identified. On one hand, PMN expressing high level of programmed death-ligand 1 (PD-L1) are able to suppress T cell proliferation when engaging the programmed cell death 1 (PD-1) receptor (Wang et al., 2017). On the other hand, PMN may interact with T cell and locally release arginase-1 (Arg-1) (Marini et al., 2017) or reactive oxygen species (ROS) (Pillay et al., 2012) to inhibit T cell activation and proliferation. This inhibition is dependent on cell contact and integrin engagement but conflicting results failed to define a clear phenotype for these regulatory PMN (Marini et al., 2017; Pillay et al., 2012; Wang et al., 2017). According to these findings, a growing body of evidence indicates that PMN may be important in the regulation of inflammation through interaction with T cells but it is still not clear which signals may drive PMN to become regulatory. In this context, we wanted to assess the interaction of PMN with regulatory cells among T cell population (Treg). Treg are specialized in the inhibition of several immune cells and are necessary to control inflammation and maintain tolerance (Dominguez-Villar and Hafler, 2018). Their regulatory phenotype and stability are defined by the expression of forkhead box P3 (FoxP3) transcription factor which confers suppressive functions (Hori, 2003). In inflammatory contexts, Treg may lose FoxP3 expression, as well as suppressive capacity, in favor of effector-like functions mimicking Th17 (Komatsu et al., 2013) or Th1 cells (Williams and Rudensky, 2007). This phenomenon has been referred to Treg plasticity and revealed instability of FoxP3 expression in Treg. Maintenance of FoxP3-expressing Treg is crucial in order to control the immune system and prevents inflammatory diseases (Brunkow et al., 2001). However, little is known about the mechanisms involved in the maintenance of Treg population, especially in inflammatory context. In this study we aimed at determining if Treg and PMN interact and at deciphering the consequences of PMN/Treg

interaction on their phenotypes and functions. We studied this interplay in healthy conditions and in the strong inflammatory context of rheumatoid arthritis (RA). RA is an autoimmune, chronic, inflammatory disease mediated by Th1 and Th17 cells, as well as Treg impaired functions, that leads to joint destruction (Vyas et al., 2019). Interestingly, in RA patients, a pathogenic shift of Treg into Th17 cells has been detected (Komatsu et al., 2013) and PMN are highly activated in joints (Chen et al., 2018). Both phenomena are involved in disease worsening. We hypothesized that PMN and Treg interaction is disrupted in RA patients and might unveil new therapeutic targets.

## Methods

### Human samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and neutrophils of healthy donors were isolated from fresh EDTA-blood and cytopheresis collected at “Etablissement Français du Sang (EFS)” of Saint Louis Hospital, Paris, France. Human neutrophils and PBMC of RA patients were from fresh blood collected at rheumatology department of Avicenne Hospital, Bobigny, France. Patients were selected according to the American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) revised 2010 criteria for RA and were not treated with biologic therapies. Informal consents were collected. Experiments were approved by the local ethic committee CPP “Paris Ile de France” (NI-2016-11-01)

### Mice

Spleen and bones were collected from C57BL/6 male mice (6-10 weeks old) purchased from Janvier Lab (Le Genest-Saint-Isle, France). Samples were used immediately. All experiments with animals were performed in accordance with protocols approved by ethic care use committee of Paris 13 University (Bobigny, France), committee Charles Darwin (number Ce5/2010/037).

### Cell isolation

For human cocultures, neutrophils of healthy donors as well as neutrophils and PBMC of RA patients were isolated by density gradient centrifugation (Polymorphprep, Proteogenix) from whole blood. PBMC of healthy donors were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll hypaque, Eurobio) from cytopheresis samples diluted two fold in sterile phosphate-buffer saline (PBS). Human Treg were purified from PBMC using magnetic

cell sorting (Miltenyi, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> human regulatory T cell isolation kit II) according manufacturer instructions. Human neutrophil and human Treg purity was systematically measured by flow cytometry (CD66b<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> respectively). A purity >90% was considered satisfactory.

In mice, bone marrow was flushed from tibia and femur with sterile PBS. Red blood cells were lysed by hypotonic solution and neutrophils were further isolated by negative magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, mouse neutrophil isolation kit) according manufacturer instructions. Splenocytes were obtained by fine grinding of spleen in PBS with 5% fetal bovine serum (FBS). Red blood cells were lysed and Treg were further isolated by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, mouse regulatory T cell isolation kit) according manufacturer instructions. Mouse neutrophil and mouse Treg purity was systematically verified by flow cytometry (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> respectively). A purity >90% was considered satisfactory. In some experiments, cells were sorted by flow cytometry. Briefly, splenocytes were first enriched in CD4<sup>+</sup> cells by negative magnetic sorting and stained with anti-mouse CD25-PE (Miltenyi Biotec) and CD4-APC\_Cy7 (BD Bioscience, clone GK1.5) for cell sorting isolation of effector T cells (Teff: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) and fresh Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). For the sorting after coculture, cells were harvested and counted. All cells were stained with anti-mouse CD4-APC\_Cy7 (BD Bioscience, clone GK1.5) as well as anti-mouse Ly6G-FITC (BD Bioscience, Clone 1A8) and filtered before acquisition. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells from splenocytes, as well as CD4<sup>+</sup> and Ly6G<sup>+</sup> cells from cocultures were sorted using an ARIA cell sorter (BD Bioscience) and purity were assessed on the same cytometer. A purity >90% was considered satisfactory.

### **Culture and reagents**

Cells were cultured in RPMI medium completed with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mM 2-Mercaptoethanol, 1 M HEPES. Treg and neutrophils were cultured on round bottom 96 wells plates either alone ( $2.5 \times 10^5$ /ml for mouse cultures and  $1.25 \times 10^5$ /ml for human cultures) or in coculture at 1:1 ratio. When indicated the following reagent were added: anti-human CD3 (2 µg/ml, eBioscience, clone OKT3), anti-human CD28 (1 µg/ml, BD Bioscience, clone CD28.2), anti-mouse CD3 (0.5 µg/ml, BD Bioscience, clone 2C11), anti-mouse CD28 (0.5 µg/ml, BD Bioscience, clone 37.51), LPS from *Salmonella Typhimurium* (5 ng/ml in human and 7.5 µg/ml in mouse cultures, Sigma), catalase (Sigma), tofacitinib (gift from Pfizer). Final culture volume always reached 200 µl. In some experiments, cocultures were done in Transwell plates

(Corning). Cells were incubated during 72 hours at 37°C / 5% CO<sub>2</sub> before flow cytometry analysis and harvesting of culture supernatants.

### **Flow cytometry**

Cells were incubated for surface staining with the following antibodies: anti-human CD4-V510 (Ozyme, clone RPA-T4), anti-human CD25-PerCpCy5.5 (Ozyme, clone 3G7A02), anti-human CD66b-FITC (BD Bioscience, Clone G10F5), anti-human CD11b-PeCy7 (Biolegend, Clone ICRF44), anti-human CD127-PeCy7 (Ozyme, clone A019D5) anti-mouse CD4-APC\_Cy7 (BD Bioscience, clone GK1.5), anti-mouse PD-L1-PeCy7 (Biolegend, Clone 10F.9G2), anti-mouse Ly6G-FITC (BD Bioscience, Clone 1A8), anti-mouse CD11b-Alexa fluor 647 (BD Bioscience, clone M1/70) or anti-mouse CD39-PeCy7 (Biolegend, clone Duha59). Intracellular markers were stained using the fixation and permeabilization kit from eBioscience (Invitrogen) and the following antibodies: anti-human FoxP3-PE (Life technologies, clone PCH101), anti-human CTLA-4-APC (BD Bioscience, Clone BNI3), anti-mouse FoxP3-eF450 (Life technologies, clone FJK-16s) or anti-mouse CTLA-4-PerCpCy5.5 (Biolegend, clone UC10-4B9). Cells were acquired on a FACS Canto II cell analyzer (BD Bioscience). Gates were set based on Full Minus One (FMO) isotype controls and results were analyzed using FACS Diva software (BD Bioscience).

### **Phagocytosis assay**

For phagocytosis assessment, PE-labeled beads (Polyscience Inc.) were added the last 2 hours of culture at a final dilution of 1/2000. Then cells were washed with culture medium and stained with anti-CD66b or Ly6G antibodies. Phagocytosis was quantified by PE staining on cells using FACS Canto II cell analyzer (BD Bioscience). Gates were set based on unlabelled cells.

### **Proliferation assay**

To assess Treg or PMN suppressive properties, we evaluated their capacity to inhibit Teff proliferation. Teff were CFSE-labeled (Invitrogen, C34554) and activated with 5µg/mL of anti-mouse CD3 antibody (BD Bioscience, clone 2C11). Treg, PMN, cocultured Treg/PMN or sorted cells were incubated at 1:1 ratio with proliferating Teff in presence of equal number of mitomycin treated splenocytes. Teff proliferation was evaluated following CFSE dilution on CD4<sup>+</sup> cells by flow cytometry. In some cases, the proliferation of CFSE-labeled Treg was also evaluated.

## ELISA

Supernatants from cultures were collected at the end of culture (72 hours). Cytokine concentrations were quantified using ELISA kit for mouse IL-17 (R&D Systems), mouse MiP-2 (R&D Systems), human IL-8 (BD Bioscience), mouse IL-6 (R&D Systems) or mouse IFN- $\gamma$  (R&D Systems) according to manufacturer's instructions.

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed on at least 3 pooled experiments using a two-way ANOVA analysis with Tukey's post hoc analysis (GraphPad Software). In one experiment, a t-test was used. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. A p-value  $<0.05$  was considered significant.

# Results

## PMN promote FoxP3 expression by Treg

Effects of PMN on Treg were first studied by *in vitro* cocultures between mice purified Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) and purified PMN from mice. To reproduce inflammatory conditions, cell activation was achieved through TCR stimulation for Treg (using antibodies against CD3 and CD28). Similarly, PMN were activated through TLR4 stimulation by LPS. As previously reported, Treg alone lose FoxP3 expression spontaneously over time during *in vitro* cultures, even after TCR stimulation. After 24 hours of culture, FoxP3<sup>+</sup> cells was decreased to 20% among total CD4<sup>+</sup> cells (although the culture was started with purified Treg) and then to less than 10% at 72 hours (figure 8A). However, we found out that FoxP3<sup>+</sup> cells frequency reached 40% in the presence of PMN, even after 72 hours of culture. We concluded that PMN help Treg to maintain FoxP3 expression over time.

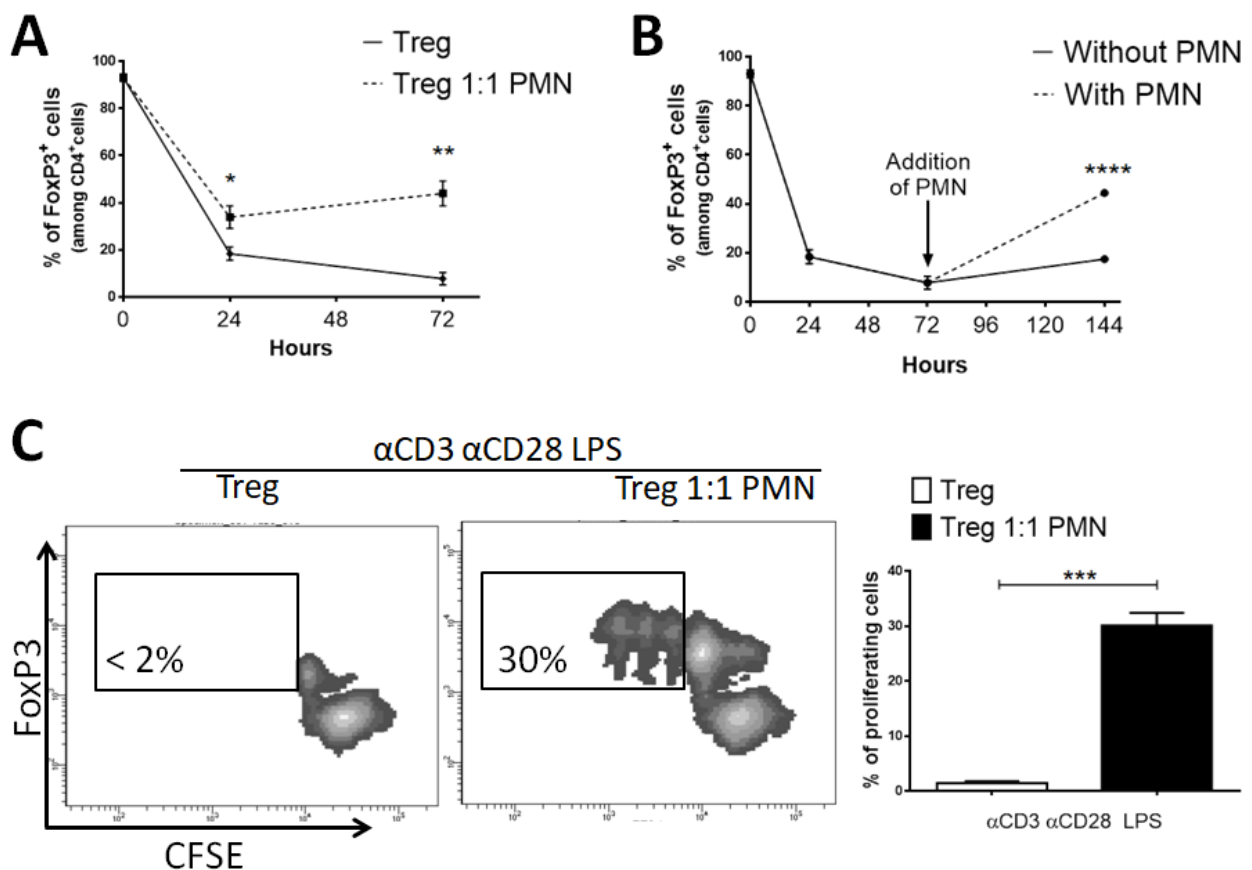
Loss of FoxP3 expression leads to decreased regulatory properties and may favor appearance of effector functions in Treg (Komatsu et al., 2013). This population of former Treg lacking FoxP3 expression is called exTreg *in vivo* and is associated with diverse pathological effects (Komatsu et al., 2013). As PMN were able to sustain FoxP3 expression in Treg, we assessed their capacity to favor FoxP3-expressing Treg over exTreg. *In vitro* exTreg were obtained from purified FoxP3<sup>+</sup> Treg cultured with anti-CD3/anti-CD28 stimulation for 72

hours. At this time point, less than 10% of CD4<sup>+</sup> cells retained FoxP3 expression while the remaining 90% were considered as exTreg. Interestingly, addition of PMN on exTreg increased to 40% the proportion of FoxP3-expressing cell (Figure 8B). These results suggest that PMN can restore Treg frequency in a population with very low FoxP3-expressing cells and limit exTreg expansion.

We then evaluated PMN effect on Treg proliferation. CFSE-labeled Treg were activated with  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 antibodies and cultured with PMN. We observed a strong proliferation of FoxP3<sup>+</sup> cell only in the presence of LPS-activated PMN (Figure 8C). Activated PMN are thus able to induce FoxP3<sup>+</sup> Treg proliferation.

### PMN favor Treg regulatory phenotype both in mouse and in human

Treg phenotype is not limited to FoxP3 expression but also includes a pattern of regulatory molecules

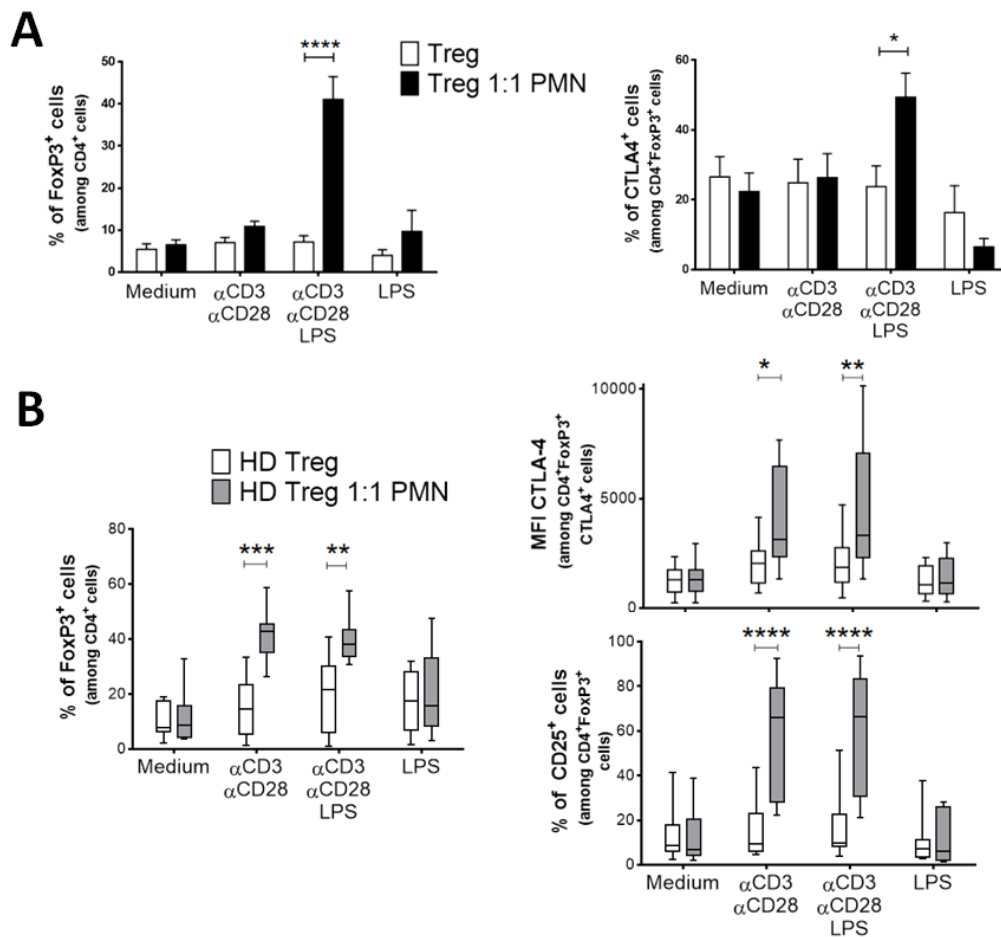


**Figure 8 : Neutrophils help Treg to maintain FoxP3 expression overtime.**

(A)- Treg and PMN were purified from mice. Treg stimulated with  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28 and LPS were cultured alone or with PMN during 72 hours. The percentage of FoxP3<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> cells was followed by flow cytometry. (B) As in A, but PMN were only added after 72 hours. (C) CFSE-labeled Treg were stimulated with  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28 and LPS and cultured with or without PMN for 72 hours. Cell proliferation was quantified by flow cytometry. (A, B, C right panel) Results are presented as mean  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ . Differences between groups were analyzed using unpaired *t*-test.

involved in Treg function and homeostasis like CTLA-4 or CD25. We evaluated the level of regulatory molecules in mouse Treg after 72 hours of coculture with PMN. We detected higher expression of CTLA-4 on Treg in coculture with PMN than on Treg alone (Figure 9A). Interestingly, expressions of other Treg-associated molecules like CD73, CD39 or PD-1 were not influenced by PMN (data not shown). Importantly, FoxP3 and CTLA-4 induction was detected only when both Treg and PMN were activated (with  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28 and LPS condition). Consequently, besides increasing FoxP3 expression on Treg, PMN also favor Treg regulatory phenotype through the induction of CTLA-4 expression.

Cocultures were then performed using human purified Treg and purified PMN from healthy donors.



**Figure 9 : Neutrophils promote FoxP3 expression and regulatory phenotype on Treg both in mice and humans.**

Mouse (A) or healthy donors (HD) (B) Treg were cultured alone or with corresponding PMN in the presence of indicated stimulations. After 72 hours of culture, FoxP3, CTLA-4 and CD25 expressions were measured by flow cytometry. Results for mice cocultures are presented as mean  $\pm$  SEM from at least 7 independent experiments. Results for human cocultures are presented as median, 10-90 percentiles and min to max from 7 different donors. \* p  $\leq$  0.05, \*\* p  $\leq$  0.01, \*\*\* p  $\leq$  0.001, \*\*\*\* p  $\leq$  0.0001. Differences between groups were analyzed using two ways Anova. MFI, mean fluorescence intensity



Human Treg phenotype analysis confirmed PMN capacity to maintain FoxP3 expression in Treg (Figure 9B). Likewise, regulatory markers CTLA-4 and CD25 on human Treg were increased in the presence of human PMN. We noted that human PMN did not need to be LPS-activated to impact Treg phenotype, but Treg still need to be activated by  $\alpha$ CD3 and  $\alpha$ CD28 antibodies. Thus, PMN promote FoxP3 expression and a regulatory phenotype of TCR stimulated Treg both in mouse and in human.

### **PMN are over-activated and acquire an immunoregulatory phenotype upon interaction with Treg**

We next analyzed the consequence of Treg/PMN coculture on PMN. Using mouse cocultures, we showed increased expression of CD11b activation marker on PMN upon interaction with Treg (Figure 10). Recently, a PMN population was shown to suppress Teff proliferation through expression of the regulatory molecule PD-L1 (Wang et al., 2017). Interestingly, we detected a strong induction of PD-L1 on PMN upon coculture with Treg. This induction was also associated with an increased expression of the enzyme CD39 on PMN in the presence of Treg (figure 10). These results indicate that, upon exposure to Treg, neutrophils acquire high expression of CD39 and PD-L1.

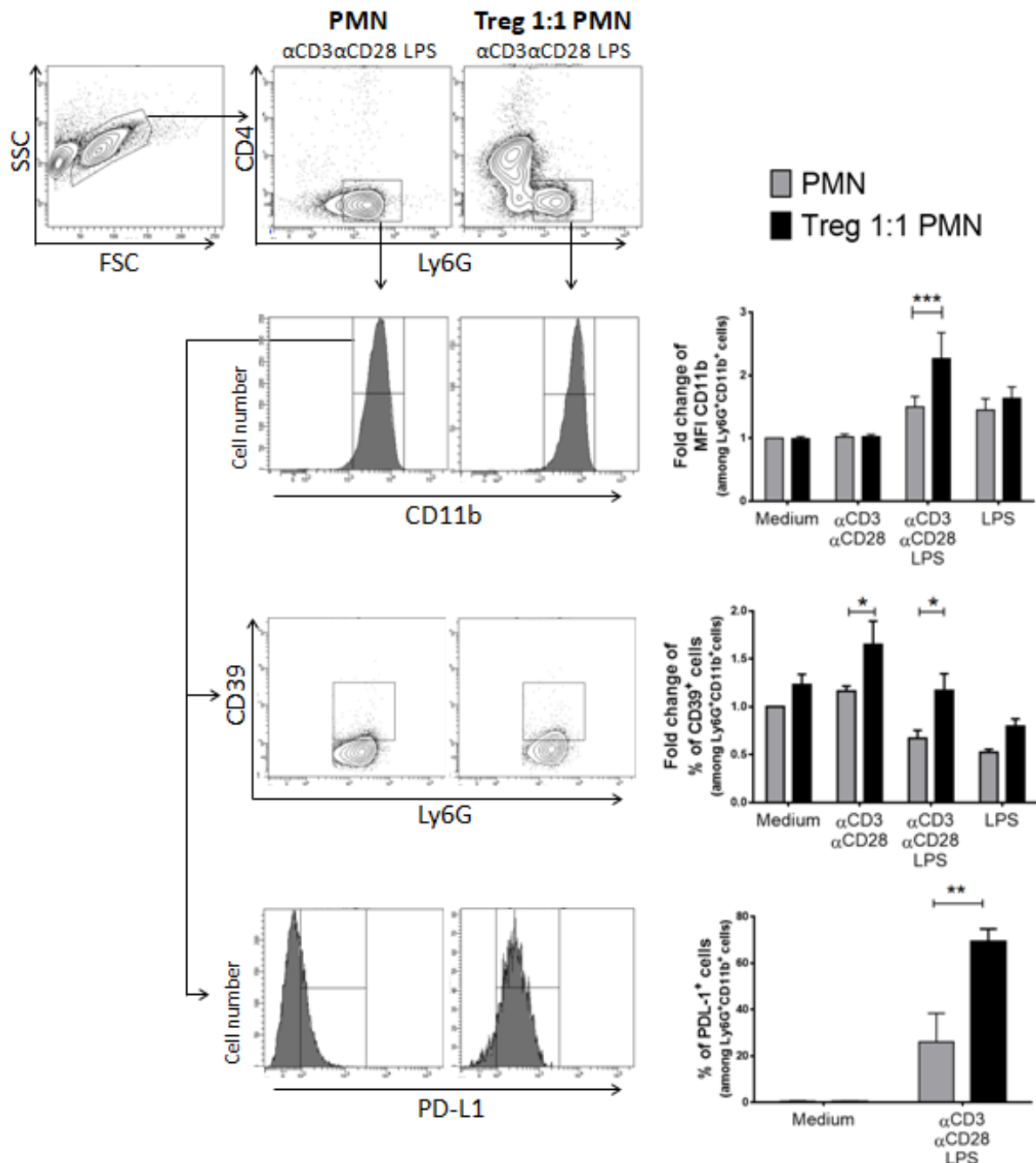
### **MiP-2, IL-6 and IL-17 secretion is induced in mouse coculture.**

In addition to surface and intracellular markers, we also measured cytokine secretion by ELISA at 72 hours of coculture between mouse Treg and PMN. PMN are known to produce of MiP-2 and IL-6 after LPS stimulation. We found that this production was doubled in the presence of TCR-stimulated Treg (Figure 11). As for FoxP3 induction, cooperation between Treg and PMN for cytokine production was also highly dependent on activation of both cell types. While increase in MiP-2 and IL-6 can be attributed to PMN activation upon coculture with Treg, we did not detect cytokines related to Treg like IL-10 or TGF- $\beta$  in our coculture experiments (data not shown). Unexpectedly, among the screened cytokines, we detected high level of IL-17 production in Treg/PMN coculture (Figure 11). IL-17 was only detected when both cell types were activated and cultured together, but neither Treg nor PMN produce IL-17 when cultured alone, even after stimulation. Interestingly, IFN- $\gamma$  was not detected in any condition (data not shown). In contrast, in human settings, IL-8 and IL-6

productions were not affected by coculture and IL-17 was not detected at all in human setting (data not shown).

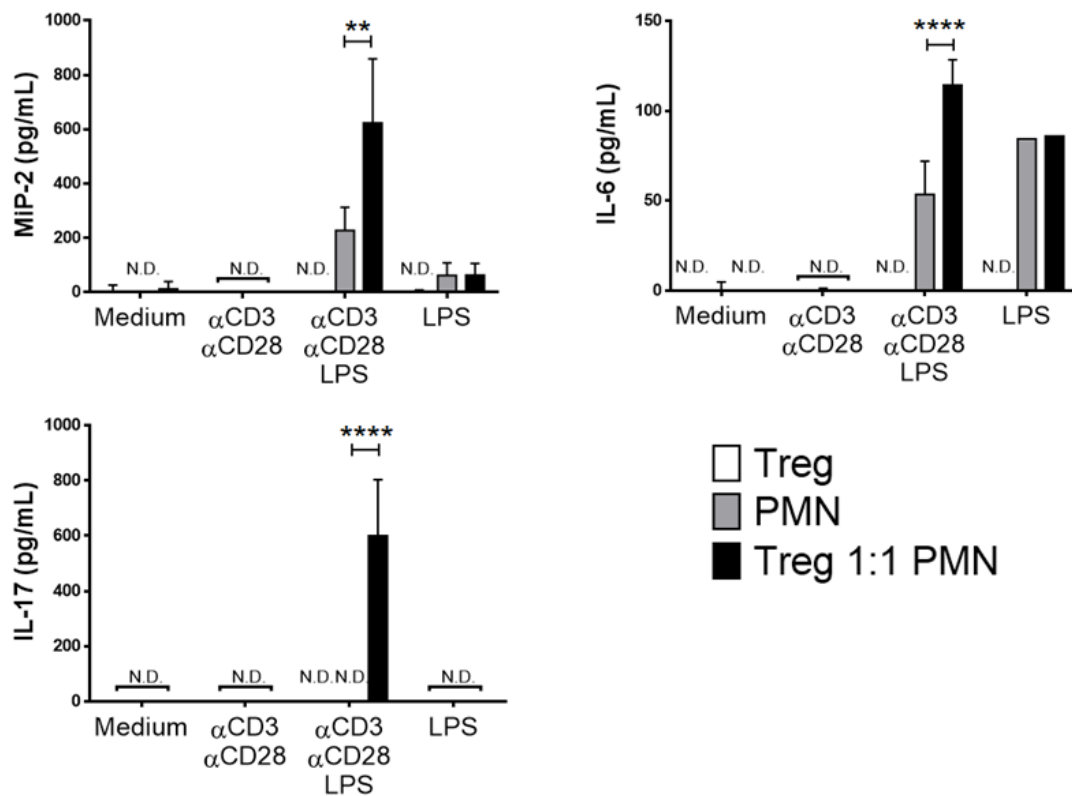
### Treg and PMN crosstalk is dependent on cell contact and JAK/STAT pathway.

To better characterize Treg and PMN interaction, we aimed at deciphering molecular mechanisms involved in this crosstalk. Our first approach was to block cell contact between Treg and PMN using transwell



**Figure 10 : Neutrophils acquire an immunomodulatory phenotype upon interaction with Treg.**

Mouse PMN were cultured alone or with mouse Treg in the presence of indicated stimulations. After 72 hours of culture, CD11b, CD39 and PD-L1 expressions among Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells were measured by flow cytometry. For CD11b and CD39 expression, data were normalized to PMN alone in medium condition. Results are presented as mean  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ . Differences between groups were analyzed using two ways Anova.

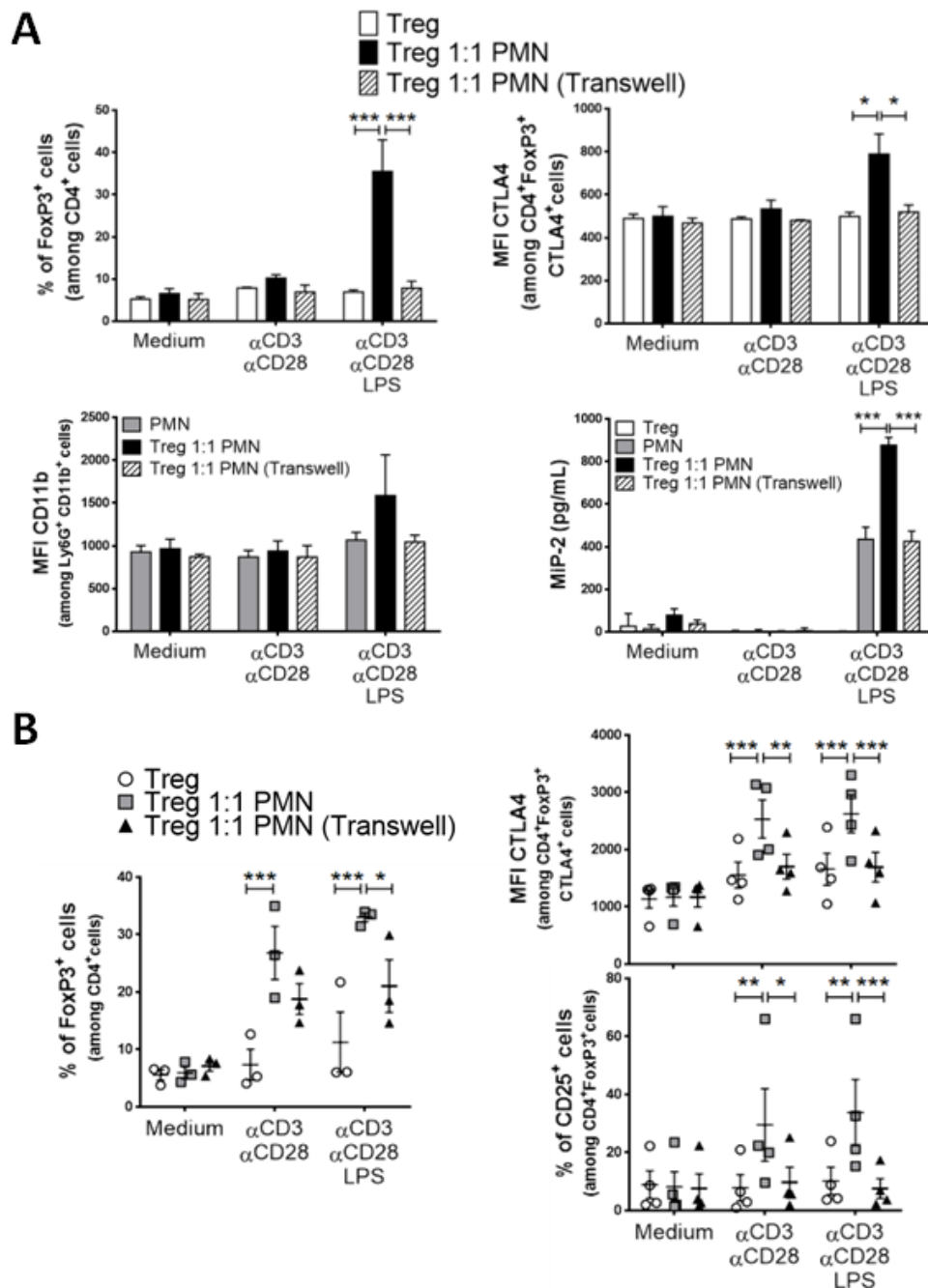


**Figure 11 : Cytokine production is enhanced in coculture of activated Treg and PMN from mouse.** Supernatants were collected after 72 hours of culture and MiP-2, IL-6 and IL-17 secretion was assessed by ELISA. Results are presented as mean  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ . Differences between groups were analyzed using two ways Anova. N.D., not detected.

culture plate. We found that activated mouse Treg and PMN separated by the transwell membrane completely lost their ability to cooperate since no induction of FoxP3 or CTLA-4 on Treg, neither CD11b on PMN was observed (Figure 12A). Similarly, transwell prevented from MiP-2 (Figure 12A), IL-6 and IL-17 (data not shown) induction. The high dependency on cell contact in Treg and PMN interaction was confirmed in healthy donor cocultures (Figure 12B). Although CD25 and CTLA-4 induction on human Treg was completely lost in transwell experiments, FoxP3 induction was only partially decreased. This indicates that, beside cell contact, compensatory mechanisms may exist in PMN-induced FoxP3 maintenance in human Treg.

Our results revealed high induction of secretion for several cytokine upon coculture between Treg and PMN. To go further, despite cell contacts being absolutely required in Terg/PMN crosstalk, we addressed the involvement of cytokine signaling as second signal. Therefore, we blocked the JAK/STAT pathway commonly involved in cytokine signaling using tofacitinib, a JAK1-3 inhibitor, both in mouse and in human coculture. In mice, tofacitinib partially or even completely reduces FoxP3, CTLA-4 (Figure 13A) and IL-17 inductions but MiP-

2, IL-6, CD11b or CD39 remained unaffected (data not shown). Similar results were obtained in healthy donor cocultures since FoxP3 and CD25 but not CTLA-4 induction was inhibited by tofacitinib (Figure 13B). We concluded that Treg/PMN crosstalk is highly dependent on cell contact and that cytokine signaling through JAK/STAT pathway is partially involved as a second and amplification signal.

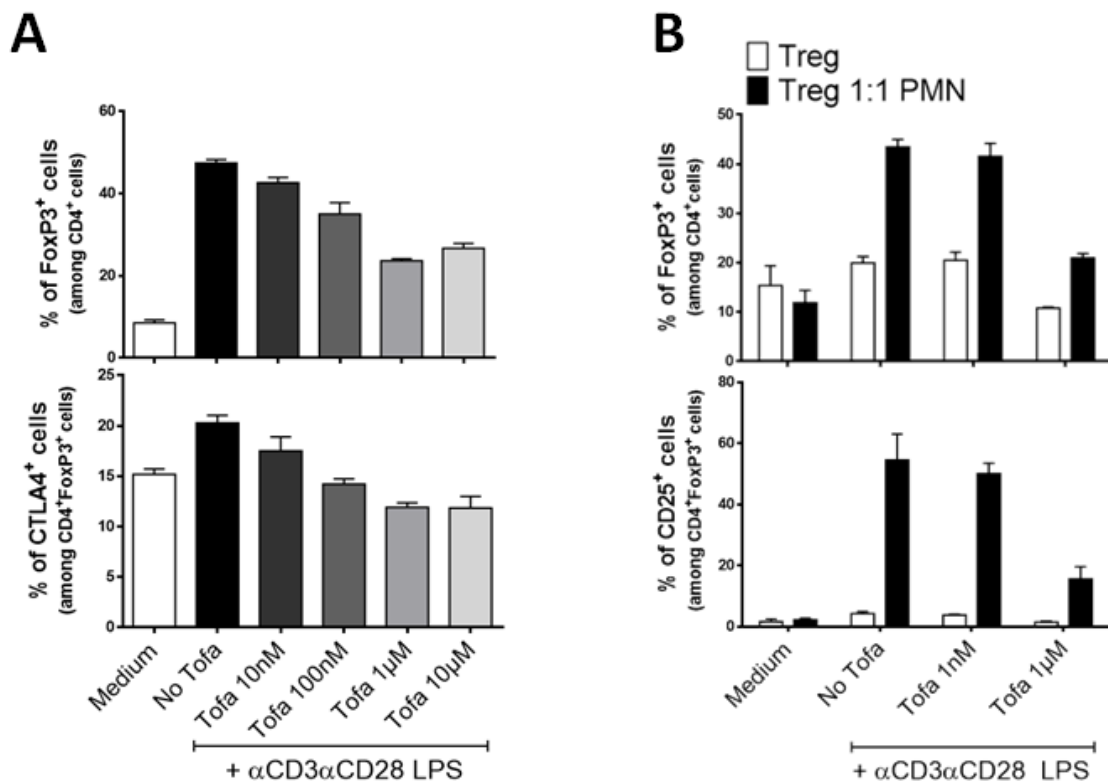


**Figure 12 : Treg and PMN crosstalk is highly dependent on cell contact.**

**(A)** Purified Mouse Treg and mouse PMN were cultured either alone, or in coculture but separated or not by a transwell insert. The coculture lasted 72 hours in the presence of indicated stimulations. **(B)** As in A, but with cells purified from healthy donors. Results are presented as mean ± SEM from at least 2 independent experiments or 3 different HD. \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001. Differences between groups were analyzed using two ways Anova.

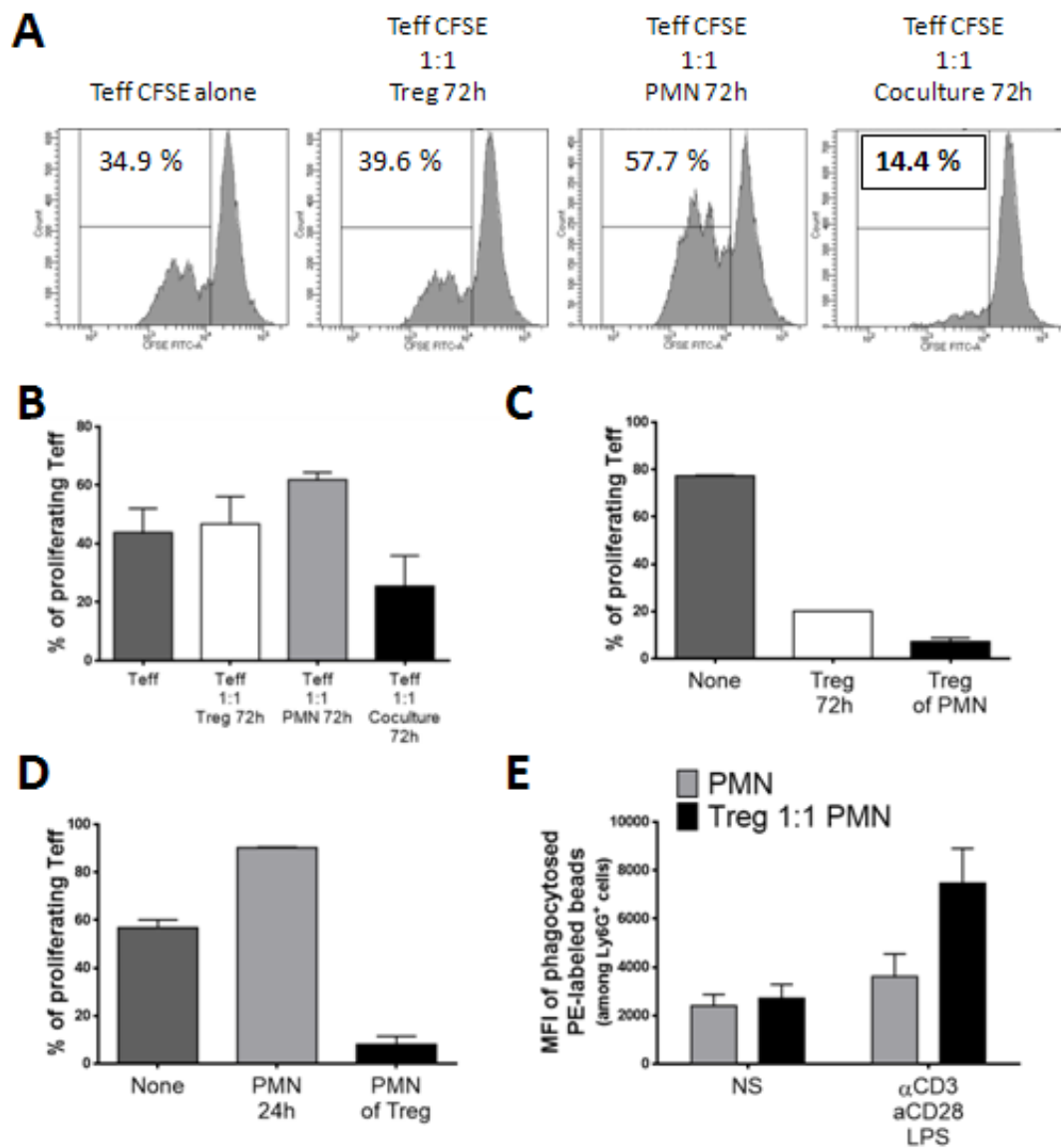
## Both Treg and PMN exert suppressive activity upon interaction

Surface marker analysis revealed that coculture between Treg and PMN highly induces regulatory markers on both cell types. Thus, we aimed to address their capacity to affect Teff proliferation. First, mouse Treg and PMN were cultured alone or cocultured in the presence of  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28 and LPS for 72 hours. Cells were then transferred at 1:1 ratio on proliferating CFSE-labeled Teff. After 72 additional hours, Teff proliferation was assessed by flow cytometry. Treg cultured without PMN have lost their suppressive ability whereas PMN cultured without Treg stimulate Teff proliferation (figure 14A and B). Importantly, cocultured Treg/PMN strongly inhibits Teff proliferation (figure 14A and B) to a level similar to freshly purified Treg (data not shown). We then aimed to dissect the respective contribution of Treg and PMN in inhibition of Teff proliferation by cocultured cells. To do so, CD4<sup>+</sup> and Ly6G<sup>+</sup> cells were cell sorted by flow cytometry after Treg/PMN coculture in presence of  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28 and LPS for 72 hours. Sorted cells were then incubated at 1:1 ratio with proliferating Teff.



**Figure 13 : JAK/STAT signaling pathway is also involved in Treg/PMN crosstalk.**

(A) Mouse Treg and mouse PMN were cocultured in the presence of  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28, LPS and increasing concentrations of tofacitinib (Tofa) for 72 hours. (B) Treg alone or in coculture with PMN purified from HD were cultured in the presence of  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28, LPS and increasing concentrations of Tofa for 72 hours. FoxP3, CTLA4 and CD25 expressions were quantified by flow cytometry. Results are presented as mean  $\pm$  SD.



**Figure 14 : Both Treg and neutrophil shows regulatory properties upon coculture.**

(A)- Effector T cells (Teff), Treg and PMN were purified from mice. CFSE-labeled Teff were stimulated with  $\alpha$ CD3  $\alpha$ CD28 in the presence of indicated cell types at 1:1 ratio. Treg 72h, Treg were stimulated with  $\alpha$ CD3  $\alpha$ CD28 and LPS for 72 hours before addition to Teff; PMN 72h, PMN were stimulated with  $\alpha$ CD3  $\alpha$ CD28 and LPS for 72 hours before addition to Teff; Coculture 72h, coculture of Treg and PMN stimulated with  $\alpha$ CD3  $\alpha$ CD28 LPS for 72 hours before addition to Teff. Teff proliferation was assessed by dilution of CFSE, analyzed by flow cytometry and representative histograms are shown. (B) Quantification of Teff proliferation. (C)- Cocultured cells for 72 hours were stained with CD4<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> and sorted by flow cytometry. Sorted CD4<sup>+</sup> cells (Treg of PMN) were then incubated with proliferating Teff for 72 hours. (D) Similarly, cocultured cells for 24 hours were sorted and CD11b<sup>+</sup> cells (PMN of Treg) were then incubated with proliferating Teff for 72 hours. (E) PMN were cultured alone or with Treg for 72 hours in the presence or not of  $\alpha$ CD3  $\alpha$ CD28 and LPS. Phagocytosis ability of PMN was assessed using PE-labeled micro-beads added for 2 hours before analysis by flow cytometry. (B, C, D and E) Results are presented as mean  $\pm$  SD.

As expected, Treg from coculture with PMN show higher suppressive capacity compared to Treg cultured alone (Figure 14C). So, maintenance of Treg phenotype by PMN is associated with maintenance of Treg function. Also, we confirmed that PMN LPS stimulated increased Teff proliferation (Figure 14D). On the contrary, LPS

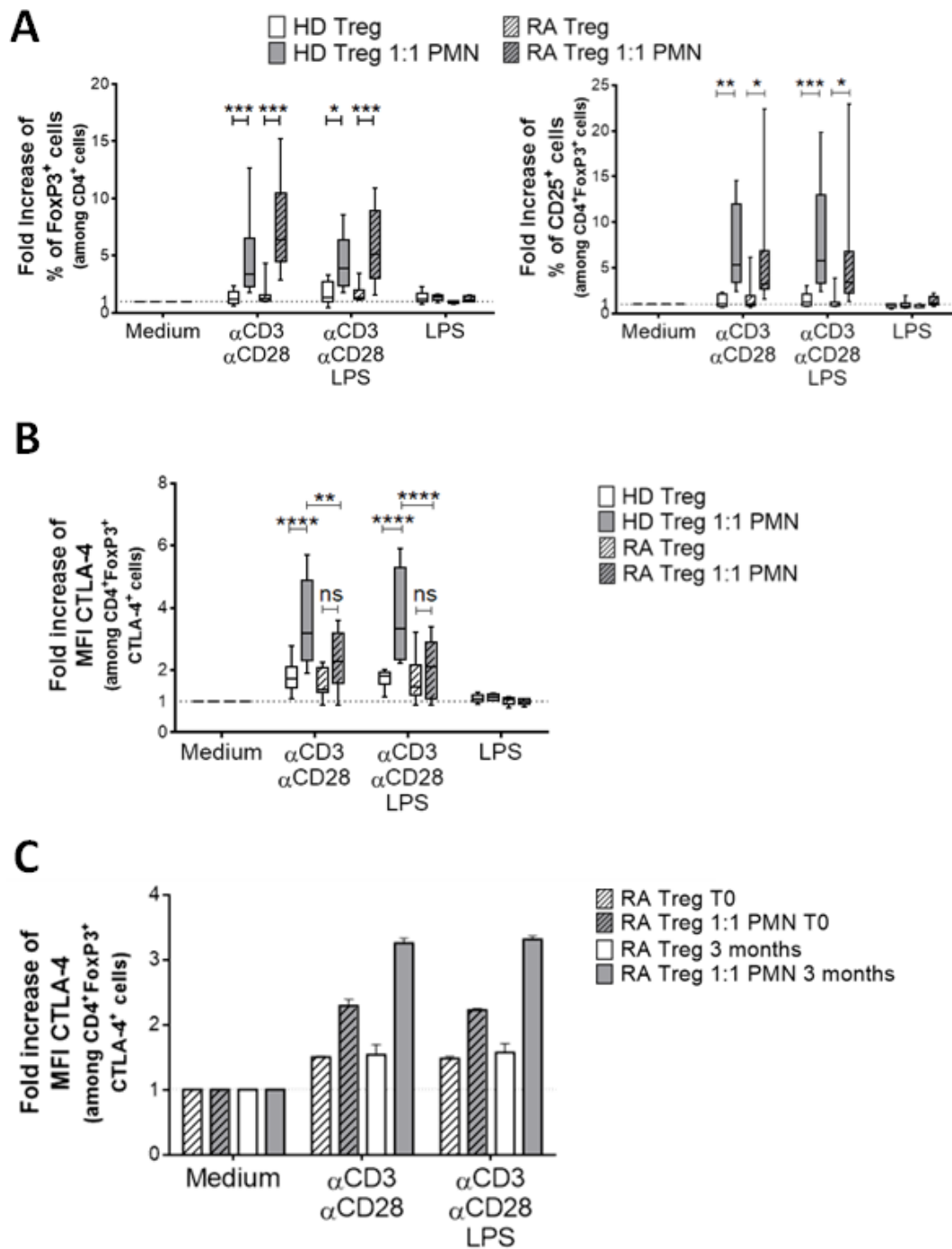
stimulated PMN cultured with activated Treg for 24 hours highly inhibit Teff proliferation (Figure 14D). These results suggest that PMN acquire regulatory properties upon interaction with Treg.

We wondered if these PMN retained phagocytic functions while acquiring immunoregulatory functions. We assessed this function using PE-labeled microbeads. Thus, PE<sup>+</sup> PMN percentage reflect PMN phagocytic activity. We observed that PMN cultured with Treg retained higher phagocytic activity compared to PMN alone.

Finally, we concluded that coculture between Treg and PMN, allow Treg to maintain high regulatory functions and, interestingly, that PMN acquire regulatory properties toward Teff.

### **Treg/neutrophil interplay is defective in RA patients.**

RA is a chronic inflammatory disease associated with strong neutrophil activation (Wright et al., 2014) and a defect in Treg ability to control inflammation (Malemud, 2018). In order to understand mechanisms involved in RA pathogenesis we analyzed the fate of Treg/PMN interaction in this inflammatory condition. We assessed Treg and PMN from RA patients in *in vitro* cocultures and compared them to cocultures from healthy donors by flow cytometry, focusing on regulatory molecules involved in Treg function and maintenance. Upon coculture, stimulated RA Treg increased FoxP3 and CD25 expressions in presence of PMN as in healthy donors (Figure 15A). However, although PMN highly induced CTLA4 expression on Treg in healthy donors, we found out that PMN from RA patients failed to promote CTLA4 expression on Treg (figure 15B). This resulted in a significantly lower expression of CTLA-4 expression by RA Treg compared with healthy donor Treg, following cocultures. Interestingly, a longitudinal study allowed us to track CTLA-4 in Treg/PMN coculture from a RA patient before and after 3 months of adalimumab (TNF- $\alpha$  inhibitor) treatment. We showed that, in this patient, adalimumab treatment restored PMN ability to increase CTLA-4 expression on Treg in this patient (Figure 15C).



**Figure 15: CTLA-4 induction on Treg by PMN is defective in RA but may be reverted by biotherapy.**

**(A and B)** Treg and PMN from 7 RA patients and 9 HD were cocultured at indicated conditions in 16 independent experiments for 72 hours and FoxP3 and CTLA-4 expressions were analyzed by flow cytometry. Data were normalized to medium. Results are presented as mean ± SEM. \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*\*p ≤ 0.0001. NS, not significant. Differences between groups were analyzed using two ways Anova.

**(C)** Coculture of Treg and PMN was assessed for one RA patient before biotherapie (T0) and 3 months after adalimumab treatment. Results are presented as mean ± SD.



# Discussion

Maintenance of Treg phenotype and function in inflammatory context is of great concern (Dominguez-Villar and Hafler, 2018) regarding their importance in controlling inflammation and autoimmunity. In this study, we show for the first time that Treg and PMN interact together and cooperate to sustain regulatory phenotype of Treg. Our results indicate that PMN help Treg to maintain FoxP3 expression and, doing so, prevent exTreg differentiation. As PMN induce the specific proliferation of FoxP3<sup>+</sup> cells, and not of exTreg which have lost FoxP3, we propose that this phenomenon may account for the increase in Treg frequency. However, we do not exclude a possible additive mechanism directly controlling FoxP3 as intensity (MFI) of FoxP3 expression on Treg was also induced upon coculture with PMN (data not shown) and cannot be explained by induction of proliferation. These data indicate that PMN favor the maintenance of FoxP3 expressing Treg *in vitro* and limit the generation of exTreg, partially through an induction of FoxP3<sup>+</sup> cell proliferation. Treg are quite unstable under various conditions and FoxP3 expression can be favored by epigenetic modifications, mainly through promoter and histone demethylation (Zheng et al., 2010). It would be interesting to determine if our data are based on epigenetic phenomena. Linked to this hypothesis, we do not know if a prolonged interaction with PMN is necessary to favor FoxP3 expression or if PMN can induce sustainable FoxP3 levels on Treg after transient interaction. Here again, epigenetic analysis of FoxP3 promoter might unveil mechanisms involved in crosstalk between Treg and PMN. Beside FoxP3, Treg also express higher level of CD25 upon interaction with PMN. As CD25 is the high affinity chain of the IL-2 receptor, we hypothesize that Treg having encountered PMN are more responsive to IL-2. By inducing IL-2 responsiveness, PMN might favor Treg population maintenance *in vivo*, although this assumption needs to be confirmed. To that purpose, it would be interesting to address the interaction between Treg and PMN in CD25 deficient mice.

Treg express a wide array of regulatory molecules involved in their suppressive functions. In Treg/PMN cocultures, we detected a specific induction of CTLA-4 in Treg but not of other regulatory molecules like CD39, CD73, PD-1 or IL-10. CTLA-4 is involved in the inhibition of antigenic presentation and consequently of T cell activation. Indeed, we found that Treg sorted from coculture with PMN are more suppressive than Treg cultured alone in inhibiting Teff proliferation. During inflammation, Treg and PMN are mainly recruited at site of inflammation but, as PMN have been shown to migrate to secondary lymphoid organs (SLOs), we assume that

PMN can interact with Treg both at site of inflammation or in SLOs. T cell activation occurring in both of these sites, we propose that Treg and PMN interaction promotes regulation of Teff proliferation. However, location and involvement of Treg and PMN interaction in control of Teff response still need to be demonstrated *in vivo*. Addressing location of Treg and PMN interaction in mice could be achieved by labeling Treg and PMN with fluorescent markers and using *in vivo* fluorescent microscopy on SLOs or sites of inflammation. Assessing the role of Treg and PMN crosstalk on Teff response requires molecules able to specifically affect this crosstalk, which is under research.

In order to manipulate Treg and PMN interaction, we addressed the molecular mechanisms involved. In transwell experiments, we found that cell contact between Treg and PMN was absolutely required for their cooperation. However the molecules linking Treg and PMN remain to be discovered. Antagonist antibodies against CTLA-4, CD86, CD18, PD-1, Ox40L, TNFR2, MIP2, IL-10, IL-6 or IL-2, were unable to inhibit Treg/PMN interaction (supplementary data S1). Interestingly, the Janus kinase (JAK) inhibitor tofacitinib partially inhibit PMN support on Treg. Cytokine signaling commonly induces the JAK/STAT pathway (Morris et al., 2018). Therefore, we hypothesize that, as second signal induced after cell contact, some secreted cytokines might be important in Treg and PMN crosstalk. Interestingly, tofacitinib affects modifications of Treg phenotype but not PMN phenotype after cocultures. Most likely, cytokine released is involved in PMN support given to Treg but the induction of CD39, PD-L1 and CD11b expression on PMN favored by Treg engages different pathways. Importantly, TCR stimulation of Treg is absolutely required to allow cooperation with PMN both in mouse and in human. It remains unclear whether PMN can fulfill this role of TCR stimulation by the presentation of peptide through their major histocompatibility complex class II (MHC-II). Defining the exact molecular pathways involved in Treg and PMN interaction would be important in order to manage this crosstalk, especially *in vivo* in patient.

Interestingly, we found out that, upon interaction with Treg, PMN express high levels of regulatory molecules PD-L1 and CD39. More importantly, PMN sorted from a coculture with Treg exert suppressive function on Teff proliferation whereas PMN alone tend to favor Teff proliferation. PD-L1-expressing PMN have already been shown to exert potent suppressive functions in the tumoral context (Wang et al., 2017), but in RA, the mechanisms of PMN inhibition remain to be defined. Regulatory PMN is an emerging concept based on the observation of regulatory properties exerted by myeloid cells (myeloid derived suppressor cell: MDSC)(Aarts

and Kuijpers, 2018). We propose that the interaction with Treg might be the missing link between classic PMN and regulatory PMN, but this hypothesis needs to be re-evaluated following regulatory PMN characterization.

Regarding kinetic, PMN favor Treg phenotype as soon as 18 hours of coculture, however the maximum support is detectable at 72 hours. Strikingly, PMN acquiring regulatory phenotype appear only after 72 hours of coculture with Treg. We propose that PMN fate in site of inflammation might occurs in two steps. Firstly, as PMN are being recruited, they quickly exert pro-inflammatory functions like granules release, ROS production or phagocytosis. This known neutrophils capacities can be activated in few hours or even minutes. However, the neutrophils remaining for several hours at site of inflammation might have a chance to interact with other immune cells like Treg, as a second phase. Following this interaction they acquire regulatory functions and may favor resolution of inflammation. In this hypothesis, PMN pursue the two steps of inflammation, first, a strong inflammatory burst quickly generated followed by a resolution phase mediated by regulatory cells.

Finally, we observed a defect of the Treg/PMN interplay in RA patients as PMN failed to induce CTLA-4 expression on Treg. RA is a chronic autoimmune disease defined by uncontrolled inflammation in joints. Several reports indicate that Treg present defective functions in RA. Notably, Treg from RA patients express lower level of CTLA-4 which is associated with a decreased capacity to control Teff activation (Flores-Borja et al., 2008). We presume that lower CTLA-4 expression on RA Treg might be the consequence of the defective cooperation with PMN we observed. This assumption implicates a central role of Treg and PMN interplay in the development and the chronicity of the disease, and managing this interaction might constitute innovative therapeutic treatments. Accordingly, our preliminary results indicate that RA patients responsive to treatments (i.e.: anti-TNF targeted therapies) show a restored CTLA-4 induction upon coculture between Treg and PMN. It would be interesting to confirm these results and expand them to other targeted therapies. This would allow us to assess the potential correlation between disease activity and PMN ability to induce CTLA-4 on Treg.

We concluded from this study that PMN and Treg do interact together and promote Treg phenotype though the induction of FoxP3, CD25 and CTLA-4 but also promote Treg suppressive functions toward Teff. Consequently, PMN harbor a regulatory phenotype characterized by CD39 and PD-L1 expression and acquire suppressive functions toward Teff. Treg and PMN interaction is dependent on cell contact but might also involved cytokine signaling as a second signal. Finally, we show that this interaction is defective in RA since

CTLA-4 induction on RA Treg is abolished and can be restored upon treatments. We assume that further research on Treg and PMN interaction might unveil new therapeutic targets in RA.

## Acknowledgements

We thank Mrs Delphine Lemeiter for expert technical support, Mylène Petit for clinical data collection, Dr. Luca Semerano for sample collection from patients as well as Mrs Laure Aubard and Mrs Elisabetta Dondi for cell sorting assistance.

This work was supported by “Université Paris 13”, INSERM, “Foundation Arthritis” and by a PhD studentship from Galilée doctoral school of “Université Paris 13, Sorbonne Paris-Cité”.

## References

- Aarts, C.E.M., and Kuijpers, T.W. (2018). Neutrophils as myeloid-derived suppressor cells. *European Journal of Clinical Investigation* 48, e12989.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* 27, 68–73.
- Chen, W., Wang, Q., Ke, Y., and Lin, J. (2018). Neutrophil Function in an Inflammatory Milieu of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research* 2018, 1–12.
- Dominguez-Villar, M., and Hafler, D.A. (2018). Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature Immunology* 19, 665–673.
- Flores-Borja, F., Jury, E.C., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2008). Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 19396–19401.
- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162–174.
- Hori, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J.A., and Takayanagi, H. (2013). Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nature Medicine* 20, 62–68.
- Malemud, C. (2018). Defective T-Cell Apoptosis and T-Regulatory Cell Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *Cells* 7, 223.

Marini, O., Costa, S., Bevilacqua, D., Calzetti, F., Tamassia, N., Spina, C., De Sabata, D., Tinazzi, E., Lunardi, C., and Scupoli, M.T. (2017). Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* 129, 1343–1356.

Morris, R., Kershaw, N.J., and Babon, J.J. (2018). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway: Cytokine Signaling via the JAK/STAT Pathway. *Protein Science* 27, 1984–2009.

Pillay, J., Kamp, V.M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J.-W., Ulfman, L.H., Leenen, L.P., Pickkers, P., and Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *Journal of Clinical Investigation* 122, 327–336.

Vyas, S.P., Hansda, A.K., and Goswami, R. (2019). Rheumatoid arthritis: ‘melting pot’ of T helper subsets. *International Reviews of Immunology* 1–20.

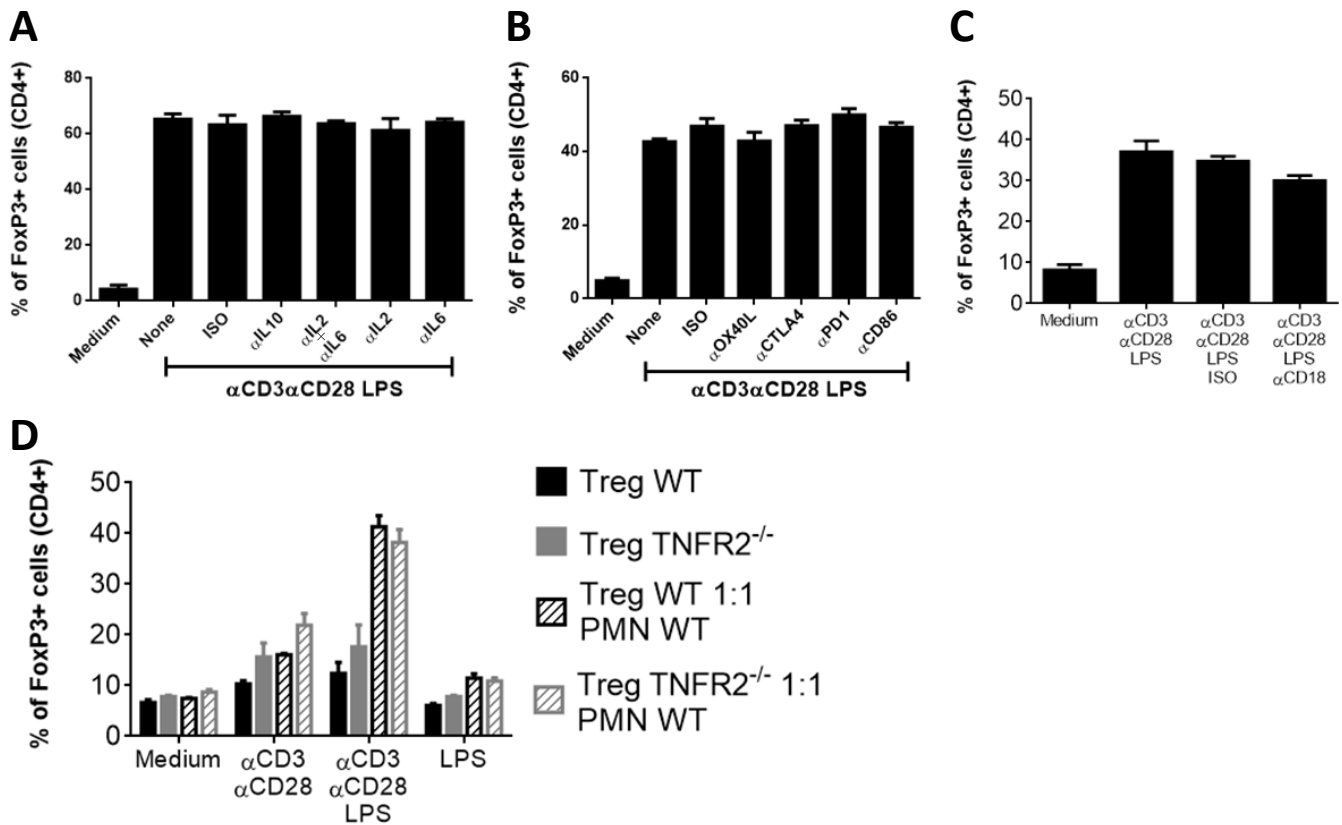
Wang, T., Zhao, Y., Peng, L., Chen, N., Chen, W., Lv, Y., Mao, F., Zhang, J., Cheng, P., Teng, Y., et al. (2017). Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut* 66, 1900–1911.

Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 8, 277–284.

Wright, H.L., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 10, 593–601.

Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808–812.

## Supplementary data :



**Figure S1 : Assesment of molecular partners involved in Treg/PMN interaction**

(A-C) Treg and PMN purified from C57BL/6 mice were cocultured for 72h without stimulation (medium) or in presence of  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28 and LPS. Stimulated cocultures were also performed in presence of blocking antibodies for IL-10, IL-2, IL-6, Ox40L, CTLA-4, PD-1, CD86, CD18 or relevant isotype controls (ISO). None : No blocking antibody added. (D) Treg purified from WT or TNFR2<sup>-/-</sup> mice were cultured alone or cocultured with PMN purified from WT mice in presence of indicated stimulations. Results are presented as mean  $\pm$  SEM.

## Article 2

Dans ce travail nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle d'une sous-population de Treg suppressive exprimant le récepteur de type 2 du TNF- $\alpha$  (TNFR2). L'objectif était de caractériser la fonction de cette population au cours du processus inflammatoire chronique et au cours du traitement par des anti-TNF- $\alpha$ . Nous avons entrepris une étude translationnelle incluant des protocoles *in vitro*, *in vivo* dans des modèles expérimentaux d'inflammation et chez des patients atteints de PR et traités par des anti-TNF- $\alpha$ . Nos résultats montrent que l'expression du TNFR2 confère une stabilité augmentée aux Treg et que cette sous-population est indispensable à la résolution de l'inflammation dans un modèle d'arthrite expérimentale d'une part et de psoriasis d'autre part. De plus, les traitements anti-TNF- $\alpha$  induisent une augmentation de la fréquence des Treg TNFR2<sup>+</sup> chez des patients atteints de PR, alors que ce n'est pas le cas pour d'autres thérapies ciblées (comme le tocilizumab), ou dans d'autres pathologies comme la spondylarthrite ankylosante. En démontrant le rôle prépondérant des treg TNFR2<sup>+</sup> dans la résolution de l'inflammation, ce travail ouvre la voie vers l'élaboration de thérapies ciblant le système TNF- $\alpha$ /TNFR plus spécifiques pour le traitement de la PR et d'autres pathologies dépendantes du TNF- $\alpha$ . J'ai contribué à ce travail par un support technique dans le tri de Treg par tri magnétique et une aide sur les marquages et les analyses de cytométrie, en particulier pour les suivis de patients.

**TNFR2 associates with FoxP3 stability and identifies a subset of regulatory T cells that are specifically expanded by anti-TNF treatments in rheumatoid arthritis.**

François Santinon<sup>a,b</sup>, Maxime Batignes<sup>a,b\*</sup>, Majda Lyna Mebrek<sup>a,b\*</sup>, Jérôme Biton<sup>a,b</sup>, Gaëlle Clavel<sup>a,b, c</sup>, Roxane Hervé<sup>a,b</sup>, Delphine Lemeiter<sup>a,b</sup>, Magali Breckler<sup>a,b</sup>, Florence Busato<sup>d</sup>, Jorg Tost<sup>d</sup>, Marianne Ziol<sup>e,f</sup>, Marie-Christophe Boissier<sup>a,b,g</sup>, Patrice Decker<sup>a,b</sup>, Luca Semerano<sup>a,b,g</sup> and Natacha Bessis<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>UMR 1125 INSERM, Bobigny, France, <sup>b</sup> Sorbonne Paris Cité Université Paris 13, Bobigny, France. <sup>c</sup> Department of Internal Medicine, Fondation Rothschild, Paris, France. <sup>d</sup>Laboratory for Epigenetics and Environment, Centre National de Recherche en Génomique Humaine, CEA-Institut de Biologie François Jacob, Evry, France. <sup>e</sup>Department of pathology, University Hospital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Bondy, France. <sup>f</sup>Unité Mixte de Recherche 1162, Génomique Fonctionnelle des Tumeurs Solides, INSERM, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France. <sup>g</sup>Rheumatology Department, GH Avicenne—Jean Verdier—René Muret, APHP, Bobigny, France.

\*equal contribution

Address for correspondence and reprint requests: Natacha Bessis, INSERM U1125, Sorbonne Paris Cité, Université Paris 13, 1 rue de Chablis, 93000, Bobigny, France.

Telephone: +33 1 48 38 73 02; Fax +33 1 48 38 88 93

E-mail: natacha.bessis@univ-paris13.fr

Short title: Suppressive TNFR2<sup>+</sup>Tregs in arthritis

**COMPETING INTERESTS.**

**LS:** research grants Pfizer. Speaker's fee: Pfizer, MSD, Roche-Chugai. Accomodation fees: BMS, MSD, Roche-Chugai. **MCB:** research grant: Diaccurate. Speaker fees: Novartis, Lilly, Peptinov.

Arthritis and Rheumatology: minor revisions



## ABSTRACT

**Objectives:** To study the involvement of regulatory T cells (Tregs) expressing tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 2 (TNFR2) in control of experimental inflammation and response to treatment in rheumatoid arthritis (RA) and spondyloarthritis (SpA).

**Methods:** The role of TNFR2 in Tregs was explored using a multilevel translational approach. Treg stability was evaluated by analyzing methylation status of the *foxp3* locus by bisulfite sequencing. Two models of inflammation (imiquimod-induced skin inflammation and delayed type hypersensitivity arthritis, DTHA) were induced in TNFR2-deficient (TNFR2<sup>-/-</sup>) mice with or without transfer of purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells from wild-type (*wt*) mice. The evolution of the TNFR2<sup>+</sup> Treg population before and after targeted treatment was monitored in individuals with RA and SpA.

**Results:** *Foxp3* gene methylation was greater in Tregs from TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* mice. In cultured Tregs, TNF- $\alpha$  enhanced *Foxp3* expression maintenance and proliferation through TNFR2 signaling. Imiquimod-induced skin inflammation and DTHA were aggravated in TNFR2<sup>-/-</sup> mice. Adoptive transfer of *wt* Tregs into TNFR2<sup>-/-</sup> mice prevented from arthritis aggravation. TNFR2<sup>+</sup> Treg frequency was increased at 3 months of anti-TNF- $\alpha$  treatments vs. the baseline in RA individuals, but not in those receiving tocilizumab. In contrast, in anti-TNF- $\alpha$  treated SpA individuals, TNFR2<sup>+</sup> Treg frequency was not modified.

**Conclusion:** TNFR2 expression identifies a subset of Tregs characterized by stable expression of *Foxp3* via gene hypomethylation, whose adoptive transfer ameliorates experimental inflammation. Expansion and activation of these TNFR2<sup>+</sup> Tregs may be one of the mechanisms by which anti-TNF- $\alpha$  agents control inflammation in RA but not SpA.

**Key words:** TNF- $\alpha$ , regulatory T cells, TNF receptors, rheumatoid arthritis, TNF inhibitors.

## INTRODUCTION

Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  is a potent proinflammatory cytokine involved in the initiation, coordination and perpetuation of inflammation and immune response (1). TNF- $\alpha$  exerts its effects by binding to two cell membrane TNF- $\alpha$  receptors (TNFRs), TNFR1 (p55) and TNFR2 (p75)(2). Anti-TNF- $\alpha$  agents are effective in a broad spectrum of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (RA), spondyloarthritis (SpA), inflammatory bowel diseases and psoriasis (3–6).

Besides its well-characterized pro-inflammatory role, TNF- $\alpha$  also exerts anti-inflammatory and immunosuppressive effects (7). TNF- $\alpha$  administration delays diabetes recurrence in non-obese diabetic mice (8) and ameliorates lupus in NZB/W mice (9), but anti-TNF- $\alpha$  agents aggravate multiple sclerosis (10).

Most of the pro-inflammatory effects of TNF- $\alpha$  are generally considered to be mediated by TNFR1 (11), whereas the immunosuppressive effect of TNF- $\alpha$  is considered mediated by TNFR2 (12). In particular, the anti-

inflammatory effects of TNF- $\alpha$  may rely in its ability to activate and expand TNFR2-expressing regulatory T cells (Tregs)(13–15). Tregs are essential in the control of a variety of immune responses including allergy, autoimmunity, inflammation, and tumor immunity. Tregs play a vital role in tolerance to self and are defective in a number of autoimmune diseases, including RA (16). Moreover, TNFR2 joint expression has been shown to exert a physiologic role in the resolution of inflammation (17). We and others have shown that anti-TNF- $\alpha$  biologics restore Treg suppressive capacities in a TNF- $\alpha$ -dependent arthritis model (13) and in RA patients (18). In this context, N'Guyen et al. recently showed *in vitro* that adalimumab, an anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody but not the receptor fusion protein etanercept, binds to membrane TNF- $\alpha$  on RA monocytes and promotes Treg expansion via enhanced TNFR2 signaling (19). This result is of paramount interest because it suggests that anti-TNF- $\alpha$  treatments may block the proinflammatory activity of TNF while, in the meantime, promote its immunosuppressive properties.

To further characterize TNFR2-positive Tregs and their involvement in the control of inflammation and response to treatment, we adopted a multilevel translational approach. We first studied *in vitro* the effect of TNFR2 on Treg survival and *foxp3* methylation, then explored *in vivo* the effect of TNFR2 deletion in two experimental models of inflammation. Finally, we longitudinally followed the evolution of TNFR2-positive Treg subpopulations during anti-TNF treatments in individuals with RA and spondyloarthritis (SpA).

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and healthy donors

Individuals meeting the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (EULAR) revised criteria for RA and qualifying for biologic treatment were selected. Eligible participants were required to have a Disease Activity Score in 28 joints (DAS28)  $\geq 3.2$  or evidence of erosive disease on imaging whatever their DAS28 score. Seventeen participants (mean age  $56.8 \pm 12.4$  years [range 29-72], mean disease duration  $15.5 \pm 8.3$  years (range 2-32), sex F/M:16/1) starting anti-TNF- $\alpha$  treatment (8 etanercept, 5 infliximab, 2 golimumab, 1 adalimumab, 1 certolizumab) and 6 starting tocilizumab (TCZ) (mean age  $60.3 \pm 13.3$  years [range 39-73], mean disease duration  $7 \pm 5.2$  years (range 2-13), sex F/M:3/3) were recruited. All treatments were administered according to label dosing recommendation. According to EULAR response criteria, good responders had a DAS28 decrease by  $> 1.2$  points, moderate responders a decrease of 0.6 to 1.2 points, and non-responders a stable, increase or decrease of  $< 0.6$  points.

We also recruited 20 individuals (mean age  $50 \pm 12.6$  years (range 36-84), mean disease duration  $13.8 \pm 13.3$  years (range 12-60 years), sex F/M :11/9) fulfilling the ASAS criteria for axial or peripheral spondyloarthritis and starting anti-TNF- $\alpha$  treatment (4 etanercept, 9 infliximab, 1 adalimumab, 2 certolizumabpegol, 4 golimumab). According to EULAR recommendations, individuals received anti-TNF- $\alpha$  treatment if the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) was  $> 40$  or if they needed daily treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs independent of the BASDAI score. Individuals were considered responders with a decrease in BASDAI score below 40/100.

All patients underwent two blood sample collections: one before the first biologic administration, the second after 3 months of treatment (at the time of first clinical response evaluation). The study was approved by the

local ethics committee (CPP Paris Ile de France, approval no. NI-2016-11-01), and informed consent was obtained from all patients before study entry.

EDTA-blood samples from random healthy individuals (blood bank of Bobigny, France) were also used for *in vitro* culture experiments.

## **Mice**

Homozygous TNFR2<sup>-/-</sup> mice were generated by crossing wild-type (*wt*) C57BL/6 mice (Le Genest-Saint-Isle, France) and double-deficient TNFR1/TNFR2 mice generated and kindly provided by Dr Muazzam Jacobs (20). We obtained TNFR1<sup>+/+</sup> TNFR2<sup>-/-</sup> mice and TNFR1<sup>-/-</sup> TNFR2<sup>+/+</sup> mice but did not obtain any TNFR1<sup>-/-</sup> TNFR2<sup>+/+</sup> mice. The TNFR1<sup>+/+</sup> TNFR2<sup>-/-</sup> and the TNFR1<sup>-/-</sup> TNFR2<sup>+/+</sup> mice were simply renamed as TNFR2<sup>-/-</sup> and TNFR1<sup>-/-</sup> mice, respectively. The genotypes of the different mouse strains were confirmed by PCR of tail biopsies by using the primer sequences listed in table S1. TNFR2<sup>-/-</sup> mice and TNFR1<sup>-/-</sup> mice were inbred, bred and housed in our animal facility (agreement C93-008-01).

In some experiments, we used mice aged 6-12 weeks belonging to the C57BL/6 strain and purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). All procedures were approved by the Animal Care Use Committee of the Paris 13 University and the ethics committee Charles Darwin.

## **Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation**

Psoriasis was induced and evaluated as described in supplementary materials.

## **Induction and assessment of delayed-type hypersensitivity arthritis (DTHA)**

On day -7 (d -7), 10-week-old C57BL/6 mice were injected intradermally at the base of the tail with methylated bovine serum albumin 250 µg (mBSA) emulsified in CFA (Difco, Detroit, MI). Four days later (d -3), the mice received 200 µg anti-mouse type II collagen antibody (anti-CII) cocktail (Chondrex, Redmond, WA), containing the clones A2-10 (IgG2a), F10-21 (IgG2a), D8-6 (IgG2a), D1-2G (IgG2b) and D2-112 (IgG2b), intravenously in 100 µl phosphate-buffered saline (PBS) (21). On d0, mice were challenged with 200 µg mBSA subcutaneously in 20 µl PBS in the hind left foot pad. The right foot pad received 20 µl PBS only and was used as a control. Baseline paw and ankle thickness were measured on the left paw on day 0 just before mBSA challenge. Paw and ankle swelling was measured by using an electronic caliper (Miltutoyo, Kawasaki, Japan) and was calculated as the difference between the measure of the left paw or ankle thickness minus baseline measurement. Histological changes in the paws were assessed on sections stained with H&E, and safranin-O as described. The extra-articular infiltration of inflammatory cells (assessed on a scale from 0 to 3) and arthritic changes were assessed separately. Arthritic changes were assessed on ankle and tarsal joints, with synovitis, cartilage destruction, and bone erosion scored on a scale from 0 to 3. The histology sum score is the mean of the four scores (extraarticular infiltration, synovitis, cartilage destruction, bone erosion).

## **Cell and tissue preparation**

Cell and tissue were prepared as described in supplementary methods.

### **Flow cytometry**

Mouse and human cells were stained and analyzed as described in supplementary methods.

### **Lymphocyte purification**

Details are provided in supplementary methods.

### **Adoptive Treg transfer experiments**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells from 12 naïve mouse splenocytes were purified by magnetic separation as described above. An amount of 7.10<sup>5</sup> purified cells (95% purity) was transferred by retro-orbital injection (100µl) in mice 2 days before mBSA challenge in the left footpad of 11 TNFR2<sup>-/-</sup> mice. Control TNFR2<sup>-/-</sup> (n=12) or *wt* littermates (n=12) mice received PBS instead.

### ***In vitro* culture experiments**

Details are provided in supplementary methods.

### **Measurement of Treg proliferation and viability**

Details are provided in supplementary methods.

### **Assessment of Treg suppressive effect on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff cells**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells (Teffs) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tregs) cells were purified as described in supplementary methods from the spleen of mice with DTBA at euthanasia. Teffs were prelabeled with 5 mM CFSE (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 10 min at 37°C. CFSE-labeled Teffs (1 x 10<sup>5</sup>) were cocultured in flat bottom 96-well plates with Tregs (1 x 10<sup>5</sup>) (ratio 1:1) in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mM 2-ME, 1 M HEPES, and 5 µg/ml soluble anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ). Controls were non-CFSE labeled Teff cells (1 x 10<sup>5</sup>) instead of Tregs. Antigen-presenting cells (1x10<sup>5</sup>) (splenocytes of naive C57BL/6 mice, 1 x 10<sup>5</sup>), previously treated with mitomycin (50 µg/ml) for 45 min at 37°C, were added to the culture medium. Cells were then incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 3 days of culture, cells were stained with APC-labeled anti-CD4 antibody (clone RM4-5; Bio Legend, San Diego, CA), and Teffs proliferation was then determined by flow cytometry to measure CFSE dilution. Data were analyzed by using FACS Diva software as described above.

### **DNA methylation analysis by pyrosequencing**

Genomic DNA was extracted from purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells using the All Prep DNA/RNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitative DNA methylation analysis involved pyrosequencing bisulfite-treated DNA (22). DNA (650 ng to 1µg) was bisulfite-converted by using the EpiTect 96 Fast Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. *foxp3* TSDR was amplified by using 30 ng bisulfite-treated mouse genomic DNA and 5 pmol forward and reverse primers, one biotinylated. Sequences

of oligonucleotides for PCR amplification and pyrosequencing are shown in Table S2. Reaction conditions were 1x HotStarTaq buffer supplemented with 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dNTPs and 1.8 U HotStarTaq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) in a 25-μl volume. The PCR program consisted of a denaturing step of 15 min at 95°C followed by 50 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 61°C and 15 s at 72°C, with a final extension of 5 min at 72°C. An amount of 10 to 15 μl PCR product was rendered single-stranded as previously described (22) and 4 pmol of the respective sequencing primer were used for analysis. Quantitative DNA methylation analysis was carried out on a PyroMark Q24 Advanced system with the PyroMark Q24 Advanced CpG Reagent Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and results were analysed by using the PyroMark Q24 Advanced Software v3.0.0.

### Statistical analysis

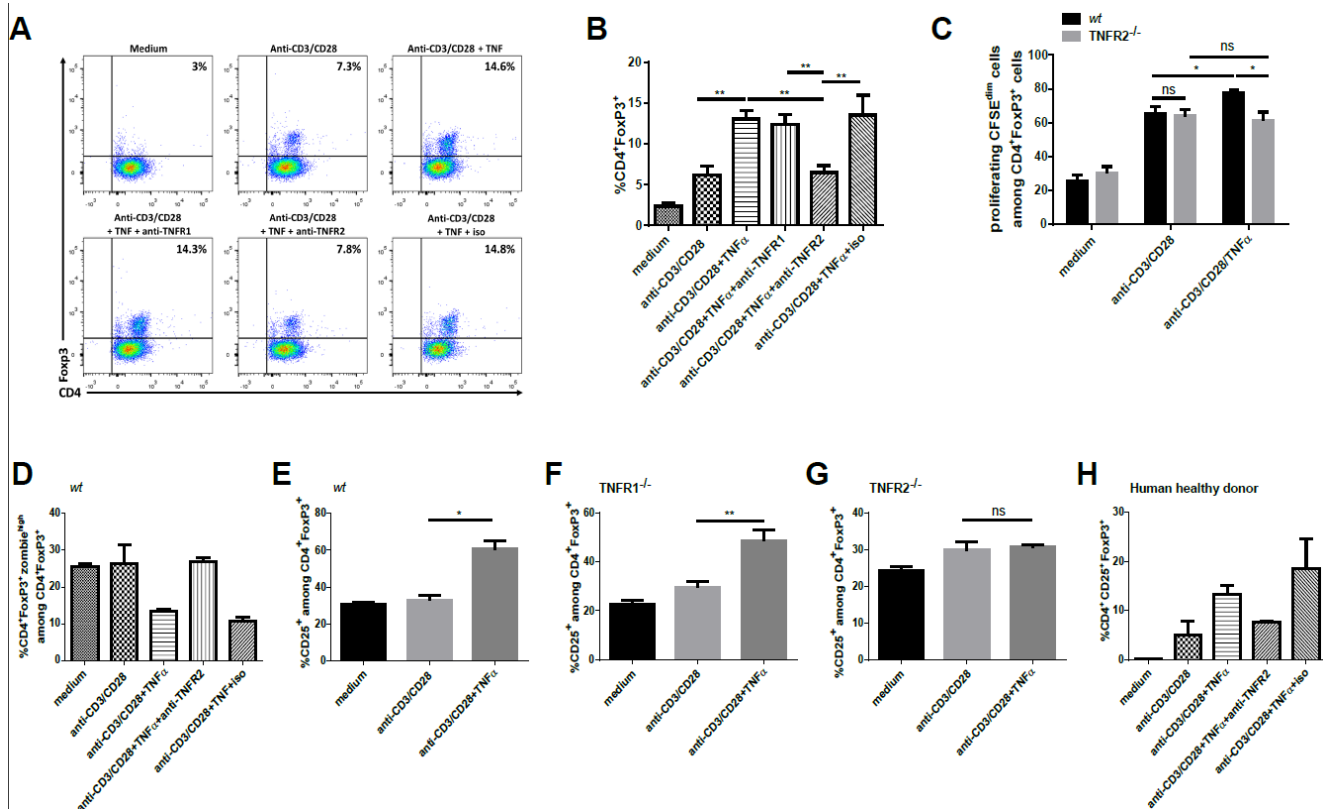
Data distribution was preliminary checked for normality with the Kolmogorov–Smirnov test. For *in vitro* and *in vivo* experiments, according to data distribution and number of groups, a parametric (ANOVA, *t* test) or non-parametric (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney) test was used. For some culture cell experiments, two-way ANOVA was used. For the study of patient parameters (disease activity scores, Treg frequency) before and after biologic treatment, paired T-test (Wilcoxon) was used. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed with Graphpad Prism 6.0.

## RESULTS

### TNF- $\alpha$ induces maintenance of *Foxp3* expression and Treg proliferation *in vitro* via TNFR2 but not TNFR1 signaling.

To assess the effect of TNF- $\alpha$  on the maintenance of *Foxp3* expression, we evaluated the impact of exogenous TNF- $\alpha$  on purified Tregs stimulated with soluble anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Alone TCR and co-stimulation signals were not sufficient to maintain *foxp3* expression after 72 h of culture (fig S1A). In contrast, as previously described (15), the addition of TNF- $\alpha$  partly restored *Foxp3* expression with a dose–response effect (fig S1A). Moreover, TNF- $\alpha$  decreased CD39<sup>+</sup> but not CTLA-4<sup>+</sup> Treg frequency with a dose-dependent effect (fig S1 B-C). We then checked that the TNF- $\alpha$  effect on Tregs was mediated via TNFR2 and not TNFR1 by using anti-TNFR1 or anti-TNFR2 neutralizing antibodies (Abs). TNF- $\alpha$ -induced *Foxp3* expression was abolished by anti-TNFR2 but not anti-TNFR1 Abs (fig1A-B).

To determine whether TNF- $\alpha$  prevented only loss of *Foxp3* expression or if it also induced Treg proliferation, we used a CFSE labeling assay of Tregs from *wt* or TNFR2<sup>-/-</sup> mice stimulated with TNF- $\alpha$  for 96h. TNF- $\alpha$  induced a stronger proliferation of Tregs as compared with only CD3-CD28 mAb in *wt* mice (fig 1C). Moreover, this TNF- $\alpha$ -induced Tregs proliferation was mediated by TNFR2, because we observed no increase in CFSE<sup>dim</sup> Treg frequency in Tregs from TNFR2<sup>-/-</sup> mice (fig1C). TNF- $\alpha$  also protected Tregs against death because it decreased the frequency of Zombie<sup>high</sup> cells among CD4<sup>+</sup> *Foxp3*<sup>+</sup> cells (fig1D).



**Figure 16 : Effect of TNF on cultured mouse and human Tregs.**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified from the spleen of *wt* (A-E), TNFR1<sup>-/-</sup> (F) and TNFR2<sup>-/-</sup> (C, G) mice. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> cells were purified from healthy donor peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (H). In some cases, cells were CFSE-labeled (C). Cells were cultured for 72h (A-B, D-H) or 96h (C), with anti-CD3 + anti-CD28 antibodies (Abs) in the presence of 20 ng/ml rmTNF (A-G), or 400 ng/ml recombinant human TNF- $\alpha$  (rhTNF- $\alpha$ ) (H). In some experiments, 10  $\mu$ g/ml (A, B, D) anti-mouse TNFR1 (mTNFR1), anti-mTNFR2 monoclonal Abs (mAbs) or isotype control, or 40 $\mu$ g/ml anti-human TNFR2 (hTNFR2) mAb or isotype control (H) were added. (A): representative dot plot of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> frequency among total cells in the indicated conditions. (B) CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> frequency among total cells. Data were pooled from three independent experiments. (C) Results are expressed as percentage proliferating CFSE<sup>dim</sup> cells among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> cells; (D) Frequency of dead cells (zombie<sup>high</sup>) among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. (E-G) Frequency of CD25<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. (H) Frequency of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells among total cells. In (D), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified from two spleens pooled from two wild-type (*wt*) mice. Data shown in (D) are representative of 2 independent experiments with similar results. In (H), Tregs were purified from PBMCs of one healthy donor, and data are representative of 3 individuals with similar results. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test (B, E-G) or two-way ANOVA (C) was used for statistical analysis. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

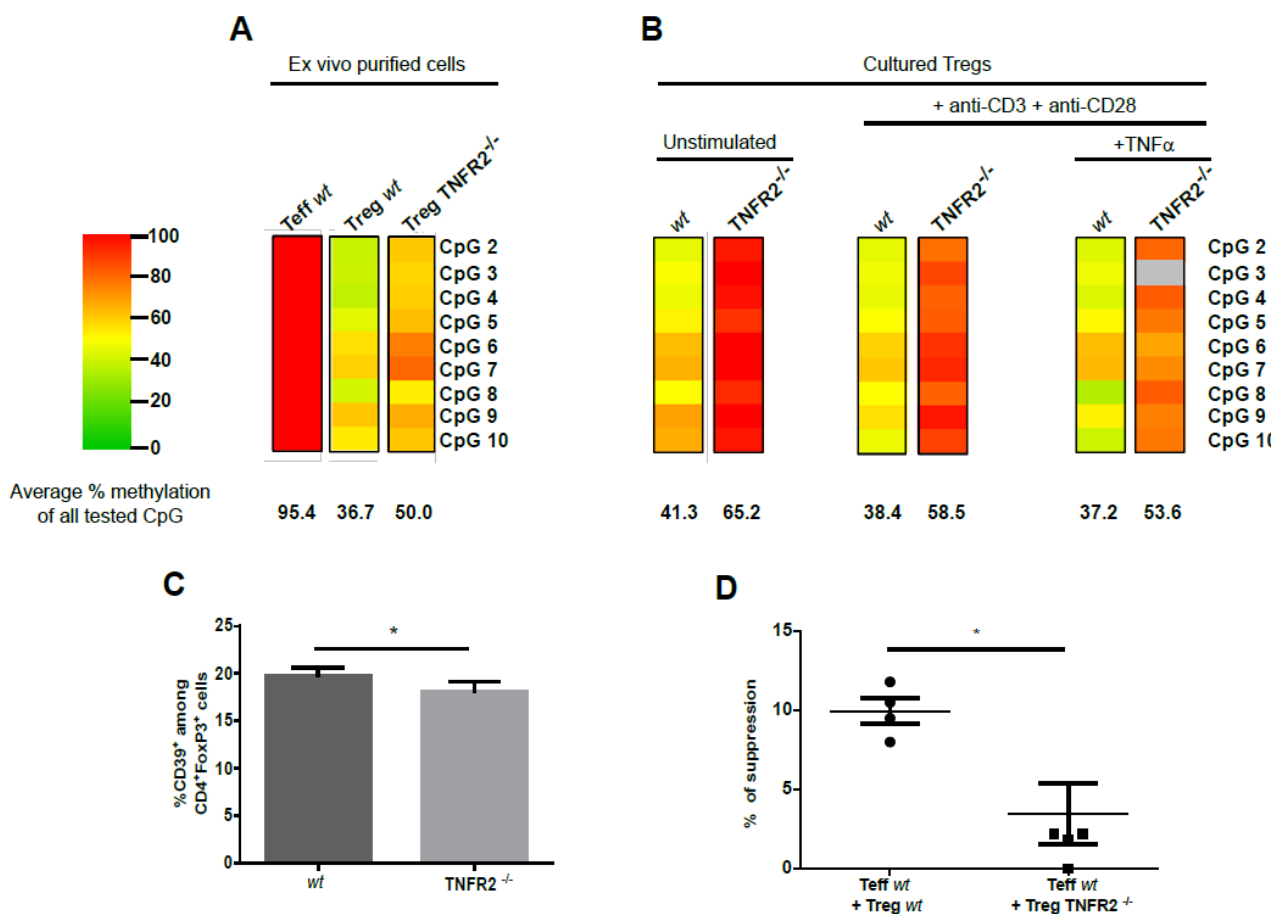
In addition, TNF- $\alpha$  modified CD25 expression by Tregs because it induced almost a doubling of CD25<sup>+</sup> Treg proportion (fig1E). Again, this effect was mediated by TNFR2 because it only occurred in Tregs from *wt* and TNFR1<sup>-/-</sup> mice (fig1F) but not TNFR2<sup>-/-</sup> mice (fig1G).

Of note, TNF- $\alpha$  induced CD25 expression by Tregs (fig 1E) and also increased IL-2-induced CD25 (fig S2A) and STAT5 phosphorylation in Tregs (fig S2B).

Eventually, TNF- $\alpha$  also sustained Foxp3 expression in human Tregs by a TNFR2-dependent pathway (fig1H).

## TNFR2 expression allows for TSDR demethylation, a driver of Foxp3 stability.

Tregs with stable suppressive functions are characterized by an unmethylated *foxp3* Treg-specific demethylated region (TSDR) and stable expression of Foxp3 (23). Because, as shown above, TNFR2 expression affects *foxp3* maintenance and Treg proliferative ability, we investigated the effect of TNFR2 deletion on methylation of the TSDR site. As a control, *foxp3* methylation was 95.4% in isolated CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Teffs versus 36.7% in isolated CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs (fig 2A). Therefore, we compared the methylation state of *foxp3* TSDR of freshly isolated CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs from *wt* and TNFR2<sup>-/-</sup> mice and in various culture conditions. The methylation proportion in *foxp3* TSDR was higher in *ex vivo* Tregs from TNFR2<sup>-/-</sup> mice than *wt* mice (50% vs 36.7%) (fig 2A). This difference was even more pronounced in cultured cells, especially on unstimulated Tregs (41.3% vs 65.2% in *wt* vs TNFR2<sup>-/-</sup> Tregs; fig 2B). These data suggest that TNFR2 expression is essential for optimal *foxp3* TSDR demethylation and highlight its involvement in the stabilization of Foxp3 expression. Of note, greater TSDR



**Figure 2 : TSDR methylation and Treg characterization in *wt* and TNFR2<sup>-/-</sup> mice.**

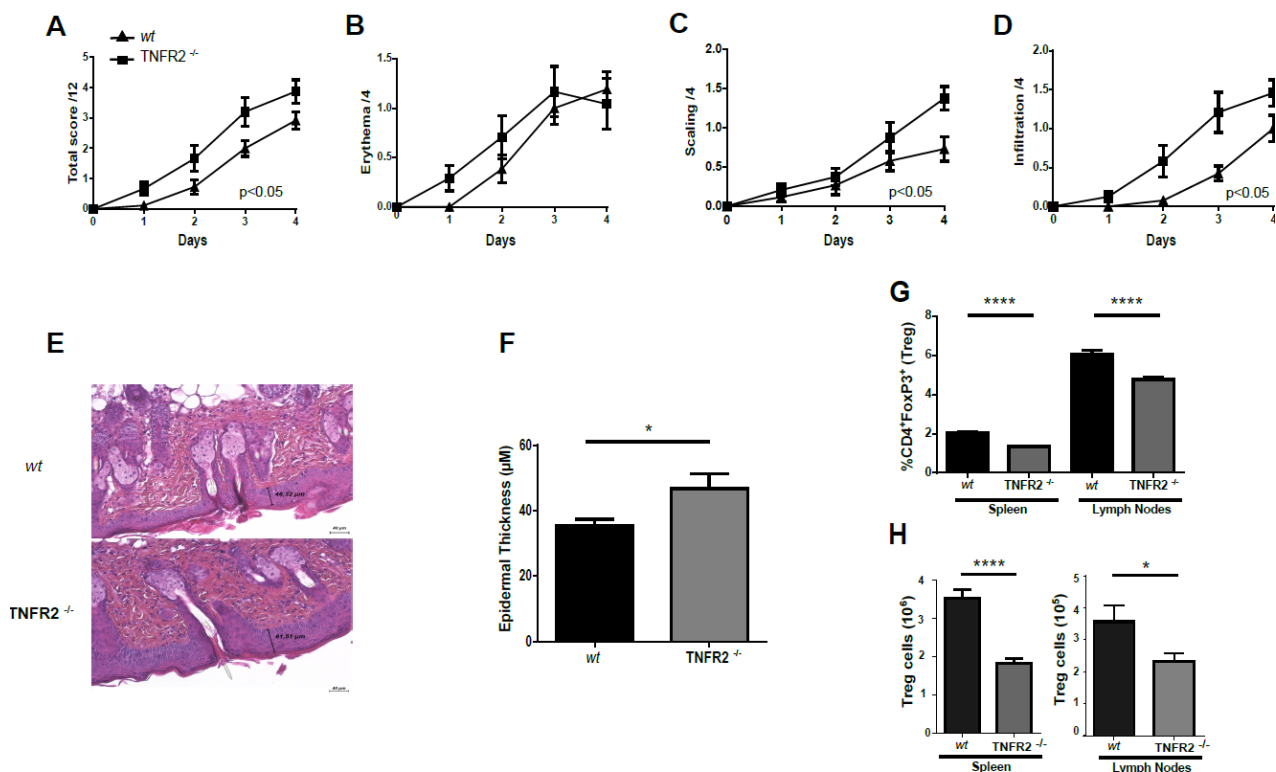
Genomic DNA was extracted from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells isolated from *wt* and TNFR2<sup>-/-</sup> mouse spleen (A) or from Tregs cultured for 72h in the indicated conditions (B). A control was DNA from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff cells isolated from *wt* mouse spleen (A). The amplicons are subdivided by horizontal lines, each representing an individual CpG motif. The methylation status of individual CpG motifs is color coded according to the degree of methylation at that site. The color code ranges from green (0% methylation) to red (100% methylation) according to the color scale on the left. Because of sequencing problems, the CpG motif 3 in the culture condition with anti-CD3 + anti-CD28 Abs + TNF- $\alpha$  from TNFR2<sup>-/-</sup> Treg appears in grey. Average percentage methylation of all tested CpG are indicated at the bottom of each column. One representative of 2 independent experiments is shown. (C) FACS analysis of CD39<sup>+</sup> cell frequency among CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> in *wt* (n= 5) and TNFR2<sup>-/-</sup> (n=5) mice. (D) Suppressive effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> from *wt* (n=5) or TNFR2<sup>-/-</sup> (n=5) mice on *wt* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff-cell proliferation. Two-tailed unpaired *t*-test on (C) and Mann-Whitney (D) test were used. \* *p* < 0.05. NS: non-significant.

methylation in TNFR2<sup>-/-</sup> Tregs was associated with reduced capacity to inhibit Teffs proliferation (fig 2D) and lower CD39<sup>+</sup> expression (fig 2C) as compared with *wt* mice, whereas the expression of CTLA-4 was similar (data not shown).

### TNFR2 deficiency results in aggravated skin inflammation in a model of psoriasis

To assess the role of TNFR2 in the development of *in vivo* inflammation, we first evaluated the effect of TNFR2 deficiency in a short-lasting model of inflammation, namely imiquimod-induced psoriasis. Disease was aggravated in TNFR2<sup>-/-</sup> versus *wt* mice (fig 3A-F). Infiltration score was the most affected factor (fig 3D) and epidermal thickness, quantified on skin histological slides, was also higher in TNFR2<sup>-/-</sup> mice (fig3 E-F), in accordance with the clinical analysis.

Then, we investigated the involvement of Tregs in the exacerbated skin inflammation observed in TNFR2<sup>-/-</sup> mice. Treg frequency and number were decreased in the spleen and lymph nodes (LNs) of TNFR2<sup>-/-</sup> mice as compared with *wt* mice (fig 3 G-H) and was associated with reduced intensity of FoxP3 expression (fig S3A). Regarding Treg activation and/or functionality markers, the proportion of Tregs expressing CD39 was



**Figure 3 : Imiquimod (IMQ)-induced skin inflammation is aggravated in TNFR2<sup>-/-</sup> mice.**

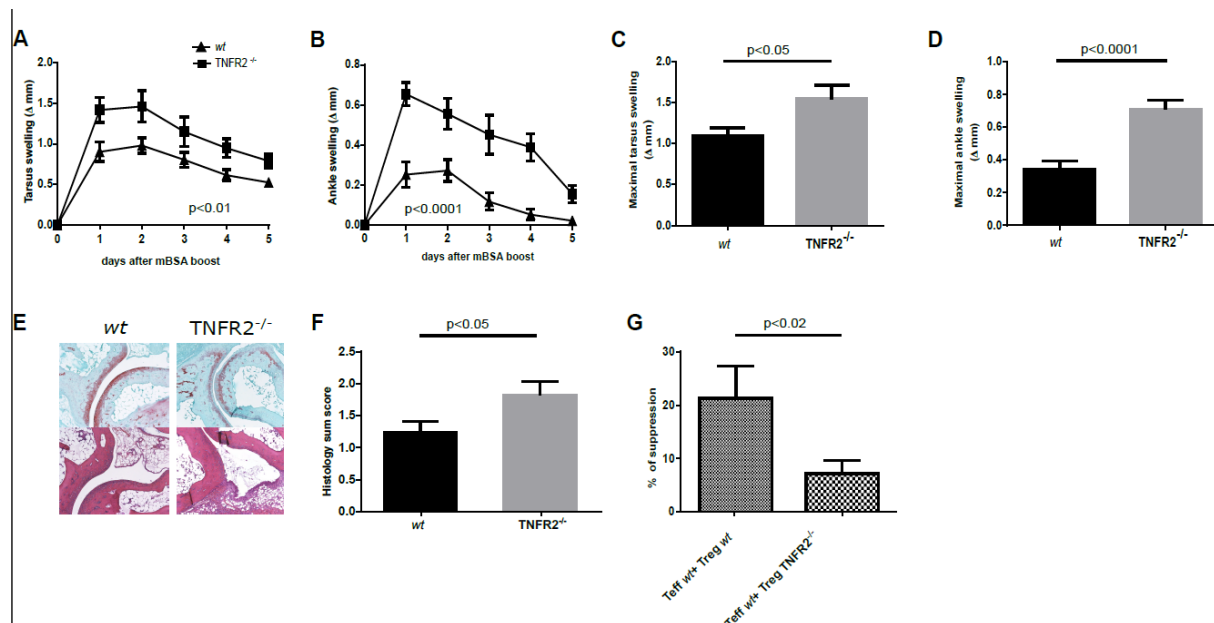
IMQ cream was applied daily to the skin of TNFR2<sup>-/-</sup> (n = 12) and *wt* (n = 13) mice. Erythema, scales, and infiltration of the back skin were scored daily on a scale from 0 to 4 (B-D). The cumulative score (erythema plus scales plus infiltration) is depicted (A). Data are mean ± SEM. Epidermal thickness was measured on histological slides of the skin at day 5. Representative example (x 20) is shown on (E). (F) Mean epidermal thickness for TNFR2<sup>-/-</sup> (n=8) and *wt* (n=8) groups. Data are mean ± SEM. (G) FACS analysis of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg frequency among whole splenocytes and lymph node (LN) cells at day 5 (H). FACS analysis of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg number in spleen and LNs at day 5. All results are representative of 3 independent experiments. For statistical analysis, Student *t* test on area under the curve from each mouse (A, B, C, D) and two-tailed unpaired *t* test (F-H) were used.



significantly lower in TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* mice (fig S3B), whereas the frequency of CTLA-4<sup>+</sup> Tregs was unchanged (fig S3C). Of note, CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg frequency and number were also lower in TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* mice (fig S3D-E). Moreover, CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T helper 1 cell (Th1) frequency was lower in the spleen of TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* mice, (fig S3F). Local skin cell analysis revealed that CD45<sup>+</sup> leukocyte frequency was higher in TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* mice (fig S3G), related to an increased F4/80<sup>+</sup> macrophage proportion, but CD3<sup>+</sup> T-lymphocyte frequency was comparable between the two groups (fig S3H-I).

### Aggravated experimental arthritis in TNFR2<sup>-/-</sup> mice is restored to a normal level after adoptive transfer of *wt* Tregs.

We assessed the effect of TNFR2 deficiency on the development of DTHA. Arthritis developed in all mice of both *wt* and TNFR2<sup>-/-</sup> genotypes as soon as day 1 after mBSA boost in the foot pad, which is usual in the DTHA model (21). Arthritis was aggravated in TNFR2<sup>-/-</sup> mice because both ankle and tarsus swelling were significantly increased as compared with *wt* mice (fig 4A-B). Accordingly, maximum ankle and tarsus swelling were both higher in TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* mice (fig 4C-D). Histopathological analyses were performed to score inflammation and destruction (see Materials and methods and (21)). The histology sum score was higher in TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* mice (fig 4 E-F), thus confirming the clinical evaluation. CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg frequency was similar in spleen and LNs at day 0 in *wt* and TNFR2<sup>-/-</sup> mice. On day 2 (clinical picture of the disease), mean Treg frequency was lower in TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* mice (left LN: 1.61  $\pm$  0.29% vs 2.27  $\pm$  0.26%, *p*<0.02; right LN: 1.75  $\pm$  0.05% vs 2.05  $\pm$  0.1%, *p*<0.05). We then evaluated the impact of TNFR2 deficiency on Treg suppressive functions and found that

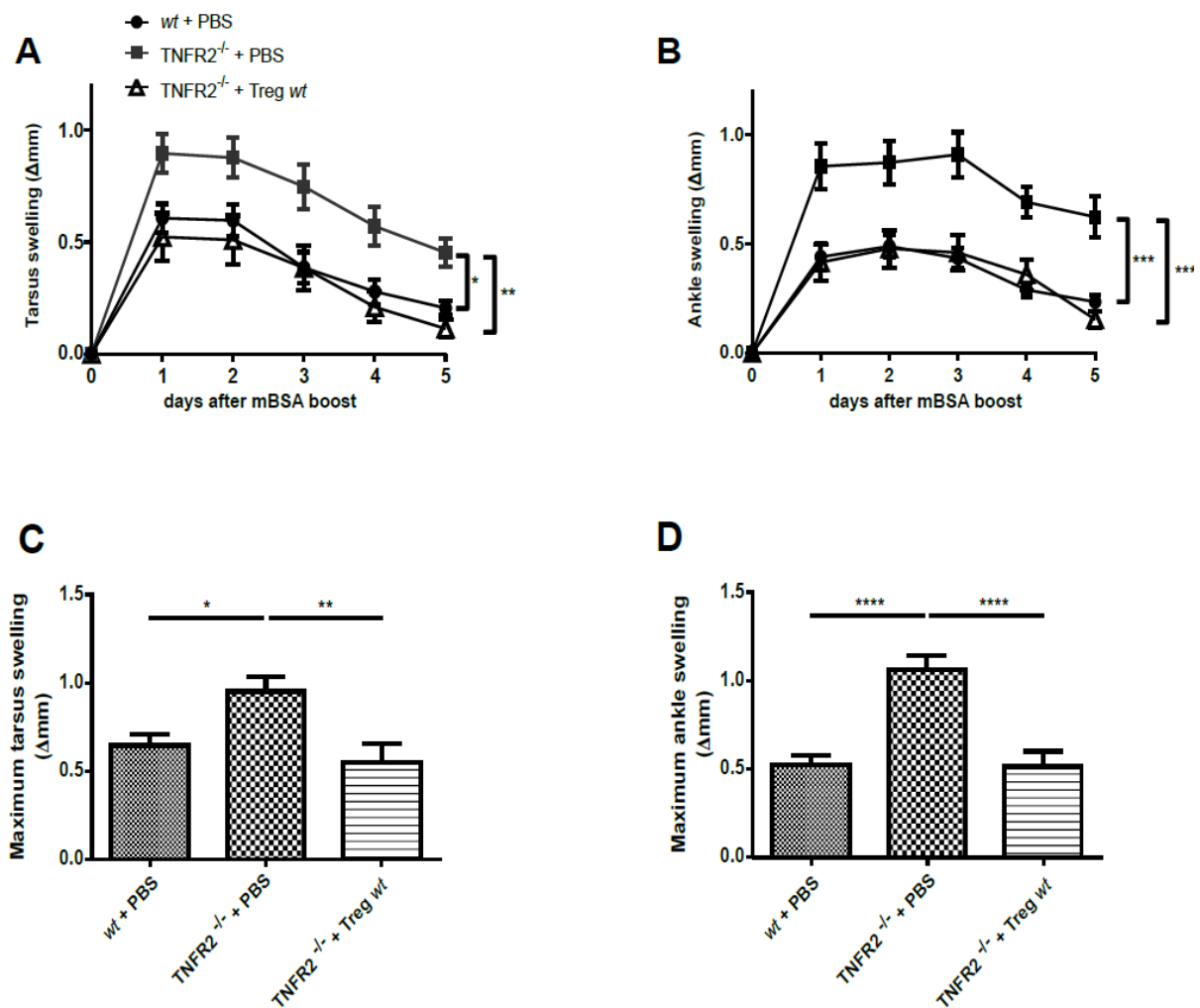


**Figure 4 : Exacerbation of arthritis in TNFR2<sup>-/-</sup> mice.**

DTHA was induced in *wt* (n=15) and TNFR2<sup>-/-</sup> (n=13) mice. Tarsus (A) and ankle (B) swelling was examined over the duration of the study. Maximal tarsus (C) and ankle (D) swelling during the course of the disease for each individual mouse was calculated. (E) Histological slide (x 10) at day 7 of one representative *wt* control mouse and one representative TNFR2<sup>-/-</sup> mouse showing safranin-O (upper) and HE (lower) staining. (F) Histology sum score. (G) Suppressive effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells from *wt* (n=8) or TNFR2<sup>-/-</sup> (n=8) mice on *wt* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Teff cell proliferation. The 8 mice were randomly chosen from *wt* and TNFR2<sup>-/-</sup> groups. Data are mean  $\pm$  SEM. (A-F) Data are representative of 2 similar experiments. Two-tailed unpaired *t* test on area under the curve from each mouse (A, B), two-tailed unpaired *t* test on maximal swelling (C, D), histological scores (F) and Mann-Whitney test on percentage suppression (G) were used for statistical analysis.

the capacity to inhibit *wt* Tregs proliferation was lower for TNFR2<sup>-/-</sup> than *wt* Tregs (fig4G). To assess the deficiency of Tregs in the exacerbation of DTHA observed in TNFR2<sup>-/-</sup> animals, we evaluated the capacity of *wt* Tregs to protect TNFR2<sup>-/-</sup> mice against arthritis. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified from spleen of *wt* mice and transferred into TNFR2<sup>-/-</sup> mice at 5 days after immunization with mBSA/CFA. We repeatedly confirmed that more than 90% of purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells expressed *foxp3*. Thus, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell transfer can be considered a Treg transfer.

As expected, adoptive transfer of *wt* Tregs significantly attenuated arthritis as compared with TNFR2<sup>-/-</sup> mice receiving only PBS (fig 5 A-D).



**Figure 5 : Adoptive transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *wt* Treg attenuates arthritis in TNFR2<sup>-/-</sup> mice.**

DTHA was induced in *wt* (n=12) and TNFR2<sup>-/-</sup> mice (n=23). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells (7x10<sup>5</sup>) from *wt* mice without DTHA were intravenously transferred to TNFR2<sup>-/-</sup> mice (n=11) at 5 days after subcutaneous immunization with mBSA/CFA; control DTHA TNFR2<sup>-/-</sup> mice (n=12) received only PBS. mBSA/PBS boost in the footpad was performed 2 days later in all mice. Tarsus (A) and ankle (B) swelling was examined over the duration of the study. Maximal tarsus (C) and ankle (D) swelling during the course of the disease for each individual mouse was calculated. One-way ANOVA on area under the curve from each mouse (A, B), and one-way ANOVA on maximal swelling (C, D) were used for statistical analysis. \* p< 0.05; \*\* p< 0.02; \*\*\* p< 0.01; \*\*\*\* p< 0.001

### **TNFR2-expressing Treg frequency was increased in RA but not SpA individuals, only during anti-TNF- $\alpha$ treatment.**

Some anti-TNF agents have been suggested to promote TNF immunosuppressive activity, so we studied the evolution on TNFR2<sup>-/-</sup> Tregs in individuals with RA and SpA receiving anti-TNF- $\alpha$  agents. Anti-TNF- $\alpha$ -treated RA individuals showed significantly increased peripheral-blood Treg frequency among CD4<sup>+</sup> T cells (fig 6A), more specifically, the TNFR2-positive subpopulation (fig 6B, D and E), after 3 months of treatment as compared with baseline. Of the 17 treated individuals, 2 were classified as non-responders, 1 had stable low disease activity, 9 were good responders and 5 were moderate responders (fig 6C). We found no clear association between clinical response and Treg frequency modification or expression of TNFR2 by Tregs (data not shown); nevertheless, the number of non-responders was probably too low to detect a difference. Importantly, the fold increase in TNFR2<sup>+</sup> Treg frequency did not differ between individuals receiving etanercept (n=8) and anti-TNF monoclonal antibody (mAb) (n=9) (mean  $1.92 \pm 0.53$  vs  $1.58 \pm 0.25$ , from baseline to month 3, respectively).

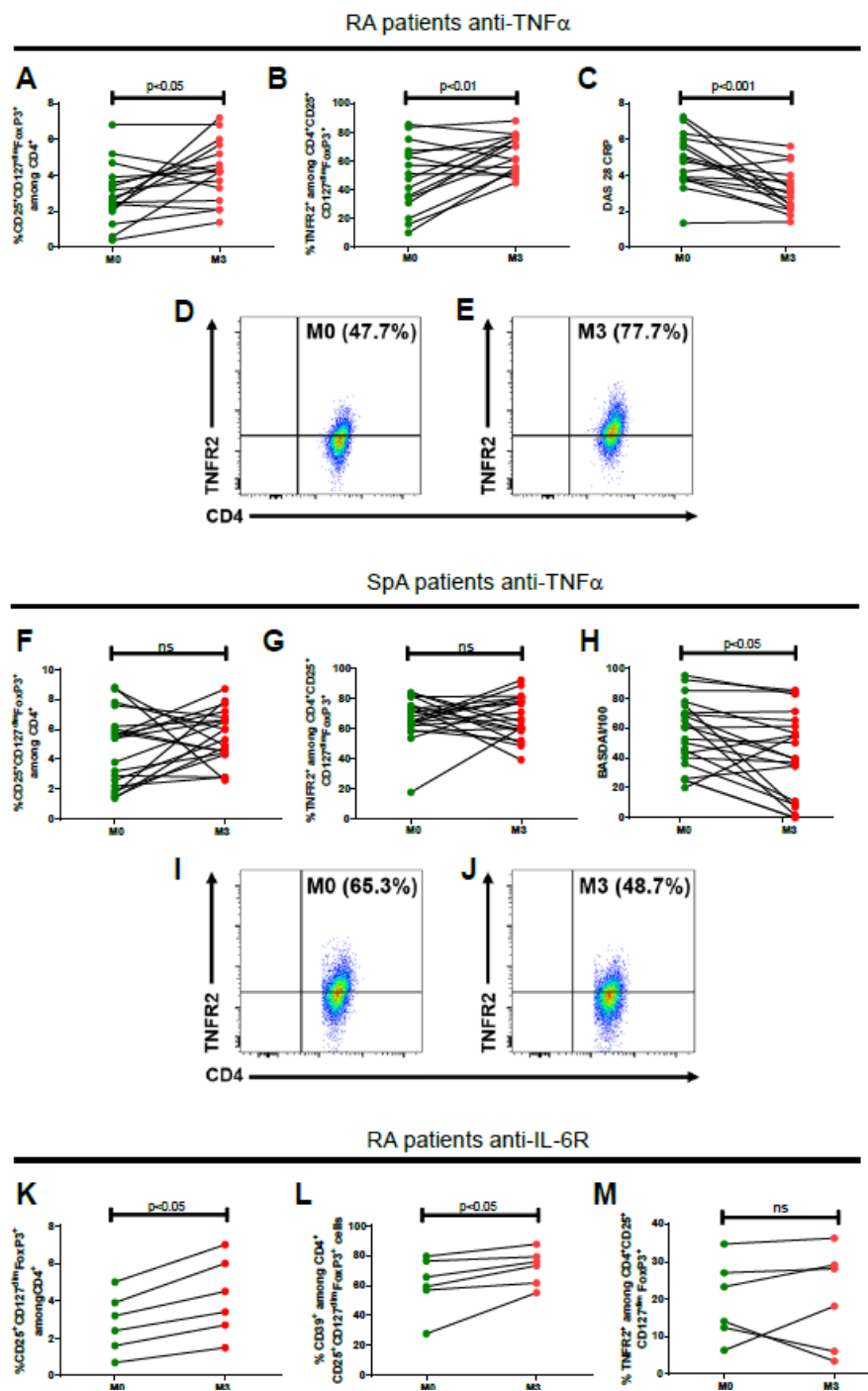
In RA individuals receiving tocilizumab, Treg frequency was significantly increased at 3 months of treatment (fig 6K), with a specific increase in the subpopulation of Tregs expressing CD39 (fig 6L), which confirms our previous results (24). Importantly, TNFR2<sup>+</sup> Tregs were not affected by tocilizumab treatment (fig 6M), which suggests that the increase in this Treg subpopulation in RA may be specific to TNF- $\alpha$  inhibitors.

In SpA versus RA individuals, anti-TNF- $\alpha$  treatment was not associated with significant modification of Tregs percentage or frequency of Tregs expressing TNFR2 (fig 6 F, I, J and G). The clinical response was variable (fig 6H) and was not associated with Treg frequency (data not shown).

## **DISCUSSION**

TNFR2<sup>+</sup> Tregs are a highly suppressive subpopulation of Tregs that are expanded by anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody treatment in RA. Among our novel data is that this phenomenon, in RA, is not restricted to monoclonal antibodies but is common to the entire class of anti-TNF- $\alpha$  agents. Conversely, this cell subpopulation is not affected by anti-TNF- $\alpha$  treatment in SpA, another disease that responds to TNF- $\alpha$  blockade. This work also integrates multilevel data that support the relevance of TNFR2<sup>+</sup> Tregs to control inflammation by showing that their adoptive transfer is sufficient to ameliorate experimental arthritis. Finally, we describe for the first time an epigenetic change that may underlie the suppressive capacity of this Treg subset.

In line with previous studies in mice and human, we showed that TNF- $\alpha$  protected against loss of Foxp3 expression and induced Tregs proliferation via TNFR2 *in vitro* (14,15). Moreover, TNF- $\alpha$ -TNFR2 signaling was associated with enhanced expression of CD25 (the  $\alpha$  subunit of IL-2 receptor) by Tregs in mice. Because Tregs co-expressing CD25 and TNFR2 were found as the most suppressive Treg subpopulation both in mice (25) and humans (26), we aimed to determine whether this membrane phenotype is linked to the expression of the master Treg transcription factor *foxp3*. Indeed, how TNFR2 signaling mediates *foxp3* expression is unclear. The most likely hypothesis is that TNF- $\alpha$ , via TNFR2 and in concert with IL-2, upregulates CD25 expression on Tregs, and consequently increases phospho-STAT5 level. Yet, STAT5 is required for optimal induction of *foxp3* and binds



**Figure 6 : Evolution of peripheral-blood Treg subpopulations with anti-TNF or anti-IL-6R treatment in RA and SpA patients.**

Flow cytometry was used to analyse cells at baseline and 3 months after anti-TNF (A-J) treatment [etanercept (n=8), infliximab (n=5), golimumab (n=2), adalimumab (n=1), certolizumab (n=1)] in RA (n=16) or SpA (n=20) patients or after tocilizumab (TCZ) (K-M) treatment of RA patients (n=6). Percentage Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) among CD4<sup>+</sup> cells (A, F, K), TNFR2<sup>+</sup> cells among Tregs (B, G, M), CD39<sup>+</sup> cells among Tregs (L) from RA or SpA patients with different degrees of clinical response to treatment (C, H). Representative dot plot of TNFR2<sup>+</sup> cells among Treg frequency in RA (D, E) or SpA (I, J) patients at baseline (D, I) and 3 months (E, J) after treatment initiation. Gating strategy is depicted in figure S4. (A-C; F-H and K-M). Each green dot (M0) linked to a red dot (M3) by a black line represents an individual patient. Paired T-test (Wilcoxon) was used for statistical analysis. ns: not significant.

directly to the *foxp3* gene (27). Furthermore, STAT5/STAT3 balance controls the fate of CD4<sup>+</sup> T cells. A predominance of STAT5 leads to Tregs, whereas higher STAT3 level triggers Thelper 17 cell (Th17) differentiation (27). Hence, increased CD25 and phospho-STAT5 level via TNFR2 signaling may upregulate

Treg proliferation in the presence of IL-2 and decrease Th17 differentiation within a control loop of TNF- $\alpha$ -mediated inflammation. Treg stability is regulated by numerous microenvironment inputs, including transcriptional and epigenetic programs and posttranslational modifications (28). In our study, we show that TNFR2 expression is associated with TSDR hypomethylation and consequently increased Treg stability.

Moreover, we showed that TNF- $\alpha$  induced CD25 expression in Tregs and also increased IL-2-induced CD25 and STAT5 phosphorylation in Tregs. Phosphorylated STAT5 binds to demethylated CNS2, containing the TSDR (29), and thus may stabilize Foxp3 expression, leading to high suppressive activity of the TNFR2<sup>+</sup> Treg subset (30).

After establishing the connection between membrane TNFR2 and Foxp3 expression, we wanted to study the functional relevance of TNFR2 signaling on Tregs in the control of inflammation. Our results show an exacerbation of skin inflammation and arthritis in TNFR2<sup>-/-</sup> mice. The anti-inflammatory role of TNF- $\alpha$  signaling via TNFR2 was also demonstrated in other disorders such as experimental allergic encephalomyelitis (31,32), TNF-induced arthritis (33), allergic airway inflammation (34) and *Mycobacterium tuberculosis* infection (20). However, TNFR2 signaling can also mediate pro-inflammatory signals, as shown in a model of colitis (35), central nervous system-induced inflammation (36), experimental cerebral malaria (37), idiopathic pneumonia syndrome (38), smoke-induced pulmonary inflammation (39) or experimental glomerulonephritis (40). This apparent discrepancy raises the question of which TNFR2-expressing cell type responds to TNF- $\alpha$ . In this work, we used adoptive transfer of *wt* Tregs to TNFR2<sup>-/-</sup> mice, which ameliorated the experimental arthritis. This finding suggests an anti-inflammatory effect of TNF- $\alpha$  via TNFR2 on Tregs. The relevance of TNFR2 signaling on Tregs was shown in other experimental models. In graft versus host disease, a blocking antibody against TNFR2 abolished disease control by Tregs (41), whereas TNFR2 agonists could protect against graft versus host disease (42) and ameliorate collagen-induced arthritis by promoting Treg expansion (43). TNFR2 expression in other immunomodulatory cells such as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) could also be associated with protection against inflammation because TNFR2<sup>-/-</sup> MDSCs are less suppressive (44,45). Thus, the pro- and anti-inflammatory effect of TNFR2 signaling features a delicate balance depending on the cell type involved. Although the action of TNF- $\alpha$  via TNFR2 can expand Tregs and confer higher suppressive effect to MDSCs, the same does not apply to all cells. Non-myeloid cells expressing TNFR2 such as endothelial cells can mediate an inflammatory signal upon TNF- $\alpha$  stimulation (37). Eventually, TNFR2 expression by Tregs is essential for full development of experimental colitis (46).

Although TNF- $\alpha$  boosts Treg expansion and function via TNFR2, anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibodies also restore Treg function in RA (18,47) and in experimental arthritis (13). The apparent paradox that both TNF- $\alpha$  and anti-TNF- $\alpha$  treatments can boost Tregs suggests that at least in some circumstances, anti-TNF- $\alpha$  treatments may block the proinflammatory activity of TNF- $\alpha$  while preserving, or even promoting, its anti-inflammatory action.

Because TNFR2 is crucial for TNF- $\alpha$ -mediated Treg expansion, we assessed whether and how TNFR2<sup>+</sup>Tregs are modified by anti-TNF- $\alpha$  biologics in RA and SpA. In RA individuals, we observed an increased frequency of TNFR2<sup>+</sup>Tregs between day 0 and 3 months of anti-TNF- $\alpha$  treatment. The effect on TNFR2<sup>+</sup>Tregs may be treatment-specific, because tocilizumab did not affect this specific cell subpopulation. In line with our previous results (24), we observed an increase in frequency of Tregs expressing CD39 on tocilizumab treatment. This

finding suggests that in the same disease, different targeted treatments may modulate different subsets of Tregs. In contrast, the effect of anti-TNF- $\alpha$  treatments on Tregs may be at least in part disease-specific, because we showed for the first time that these treatments had no effect on total Tregs or TNFR2<sup>+</sup> subpopulations in SpA. Hence, anti-TNF- $\alpha$  treatments may exert their therapeutic effect by activating different mechanisms of immune regulation depending on the treated condition.

N'Guyen et al. showed that *in vitro*, adalimumab but not etanercept expands Tregs from responder RA patients (19). Adalimumab binds to membrane TNF- $\alpha$  on RA monocytes to promote Treg expansion via enhanced TNFR2 signaling (19). In that work, only adalimumab and not etanercept was associated with an expansion of Tregs *in vivo*. In our work, all anti-TNF- $\alpha$  agents, including etanercept, induced an expansion of Tregs and TNFR2<sup>+</sup>Tregs as compared with baseline. This discrepancy may be explained by the fact that we longitudinally evaluated the evolution of Treg frequency by using each patient before and after treatment, as their own control. This approach is justified by the fact that baseline Treg frequency, and more importantly, proportion of TNFR2-expressing Tregs, show high variations between individual patients. Therefore, the frequency of these cells must be compared before and after treatment, within each patient. This move may have allowed us to detect subtle differences in the evolution of Tregs subpopulations that may not be detected by comparing final Treg frequency in patients after treatment with different anti-TNF- $\alpha$  agents. This result suggests that mechanisms other than membrane TNF- $\alpha$  upregulation on monocytes may be involved in etanercept-mediated Treg expansion. Actually, anti-TNF- $\alpha$  mAbs and etanercept may both induce Treg expansion via different mechanisms that remain to be explored. A major limitation of the study is that the number of RA individuals that did not respond to anti-TNF treatment was too low to correlate the TNFR2<sup>+</sup> Treg modifications and clinical response. These data are critical to establish the real importance of TNFR2<sup>+</sup> Treg expansion for proper response to anti-TNF- $\alpha$  treatment in RA.

TNFR2 signaling may be an interesting potential therapeutic target in RA. However, given the complexity of TNFR2 signaling on other cell types, such as conventional T cells or endothelial cells, further studies to dissect TNFR2-dependent pathways on cells involved in the resolution of inflammation are necessary.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sonia Varela (animal facilities, University of Paris 13, Paris, France) for outstanding technical assistance. This work received unrestricted research grants from Pfizer (within the “projet Passerelle 2016”), Sandoz, the French society for rheumatology, and the “Institut Fédératif de Recherche Biomédicale (IFRB)” of Paris 13 University.

## REFERENCES

1. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:49–62.
2. Rothe J, Gehr G, Loetscher H, Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptors--structure and function. *Immunol Res* 1992;11:81–90.
3. Deng Y, Chang C, Lu Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2016;50:377–389.
4. Sieper J, Heijde D van der, Dougados M, Mease PJ, Maksymowych WP, Brown MA, et al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebo-controlled trial (ABILITY-1). *Annals of the Rheumatic Diseases* 2013;72:815–822.
5. Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Assche GV, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology* 2002;97:2000.
6. Zampeli E, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum. *Journal of Autoimmunity* 2015;65:1–18.
7. Liu J, Marino MW, Wong G, Grail D, Dunn A, Bettadapura J, et al. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nature Medicine* 1998;4:78.
8. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Rajotte RV, Power RF. TNF-alpha down-regulates type 1 cytokines and prolongs survival of syngeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *The Journal of Immunology* 1997;159:6298–6303.
9. Jacob CO, McDevitt HO. Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune "lupus" nephritis. *Nature* 1988;331:356–358.
10. Kemanetzoglou E, Andreadou E. CNS Demyelination with TNF- $\alpha$  Blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017;17:36.
11. Rickard JA, Anderton H, Etemadi N, Nachbur U, Darding M, Peltzer N, et al. TNFR1-dependent cell death drives inflammation in Sharpin-deficient mice. *eLife Sciences* 2014;3:e03464.
12. Fischer R, Proske M, Duffey M, Stangl H, Martinez GF, Peters N, et al. Selective Activation of Tumor Necrosis Factor Receptor II Induces Antiinflammatory Responses and Alleviates Experimental Arthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)* 2018;70:722–735.
13. Biton J, Semerano L, Delavallée L, Lemeiter D, Laborie M, Grouard-Vogel G, et al. Interplay between TNF and Regulatory T Cells in a TNF-Driven Murine Model of Arthritis. *The Journal of Immunology* 2011;186:3899–3910.
14. Chen X, Baumel M, Mannel DN, Howard OMZ, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* 2007;179:154–161.
15. Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OMZ, Netea MG, Oppenheim JJ. TNFR2 Is Critical for the Stabilization of the CD4+Foxp3+ Regulatory T Cell Phenotype in the Inflammatory Environment. *The Journal of Immunology* 2013;190:1076–1084.
16. Behrens F, Himsel A, Rehart S, Stanczyk J, Beutel B, Zimmermann SY, et al. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1151–1156.
17. McCann FE, Perocheau DP, Ruspi G, Blazek K, Davies ML, Feldmann M, et al. Selective tumor necrosis factor receptor I blockade is antiinflammatory and reveals immunoregulatory role of tumor necrosis factor receptor II in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014;66:2728–2738.

18. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF $\alpha$  Therapy. *The Journal of Experimental Medicine* 2004;200:277–285.
19. Nguyen DX, Ehrenstein MR. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF–TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *The Journal of Experimental Medicine* 2016;213:1241–1253.
20. Keeton R, Allie N, Dambuza I, Abel B, Hsu N-J, Sebesho B, et al. Soluble TNFRp75 regulates host protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 2014;124:1537–1551.
21. Atkinson SM, Usher PA, Kvist PH, Markholst H, Haase C, Nansen A. Establishment and characterization of a sustained delayed-type hypersensitivity model with arthritic manifestations in C57BL/6J mice. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R134.
22. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2007;2:2265–2275.
23. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 2008;38:1654–1663.
24. Thiolat A, Semerano L, Pers YM, Biton J, Lemeiter D, Portales P, et al. Interleukin-6 Receptor Blockade Enhances CD39<sup>+</sup> Regulatory T Cell Development in Rheumatoid Arthritis and in Experimental Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2014;66:273–283.
25. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OMZ, Mannel DN, Oppenheim JJ. Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* 2008;180:6467–6471.
26. Chen X, Subleski JJ, Hamano R, Howard OMZ, Wiltout RH, Oppenheim JJ. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in human peripheral blood: Immunomodulation. *European Journal of Immunology* 2010;40:1099–1106.
27. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity* 2007;26:371–381.
28. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol* 2017;17:703–717.
29. Rainbow DB, Yang X, Burren O, Pekalski ML, Smyth DJ, Klarqvist MDR, et al. Epigenetic analysis of regulatory T cells using multiplex bisulfite sequencing. *European Journal of Immunology* 2015;45:3200–3203.
30. Alvarez Salazar EK, Cortés-Hernández A, Alemán-Muench GR, Alberú J, Rodríguez-Aguilera JR, Recillas-Targa F, et al. Methylation of FOXP3 TSDR Underlies the Impaired Suppressive Function of Tregs from Long-term Belatacept-Treated Kidney Transplant Patients. *Front Immunol* 2017;8:219.
31. Madsen PM, Motti D, Karmally S, Szymkowski DE, Lambertsen KL, Bethea JR, et al. Oligodendroglial TNFR2 Mediates Membrane TNF-Dependent Repair in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Promoting Oligodendrocyte Differentiation and Remyelination. *Journal of Neuroscience* 2016;36:5128–5143.
32. Tsakiri N, Papadopoulos D, Denis MC, Mitsikostas D-D, Kollias G. TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3<sup>+</sup> Treg-cell function and disease suppression in EAE: Immunomodulation. *European Journal of Immunology* 2012;42:403–412.
33. Blüml S, Binder NB, Niederreiter B, Polzer K, Hayer S, Tauber S, et al. Antiinflammatory effects of tumor necrosis factor on hematopoietic cells in a murine model of erosive arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:1608–1619.
34. Li X-M, Chen X, Gu W, Guo Y-J, Cheng Y, Peng J, et al. Impaired TNF/TNFR2 signaling enhances Th2 and Th17 polarization and aggravates allergic airway inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2017;313:L592–L601.



35. Holtmann MH, Douni E, Schütz M, Zeller G, Mudter J, Lehr H-A, et al. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur J Immunol* 2002;32:3142–3151.
36. Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L. Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:709–714.
37. Stoelcker B, Hehlgans T, Weigl K, Bluethmann H, Grau GE, Männel DN. Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 2002;70:5857–5859.
38. Hildebrandt GC, Olkiewicz KM, Corrion L, Clouthier SG, Pierce EM, Liu C, et al. A role for TNF receptor type II in leukocyte infiltration into the lung during experimental idiopathic pneumonia syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:385–396.
39. D'hulst AI, Bracke KR, Maes T, De Bleecker JL, Pauwels RA, Joos GF, et al. Role of tumour necrosis factor-alpha receptor p75 in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema. *Eur Respir J* 2006;28:102–112.
40. Pfeifer E, Polz J, Griebel S, Mostböck S, Hehlgans T, Männel DN. Mechanisms of immune complex-mediated experimental glomerulonephritis: possible role of the balance between endogenous TNF and soluble TNF receptor type 2. *Eur Cytokine Netw* 2012;23:15–20.
41. Leclerc M, Naserian S, Pilon C, Thiolat A, Martin GH, Pouchy C, et al. Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* 2016;128:1651–1659.
42. Chopra M, Biehl M, Steinfatt T, Brandl A, Kums J, Amich J, et al. Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *Journal of Experimental Medicine* 2016;jem.20151563.
43. Fischer R, Proske M, Duffey M, Stangl H, Martinez GF, Peters N, et al. Selective activation of tumor necrosis factor receptor 2 induces anti-inflammatory responses and alleviates experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol*:n/a-n/a.
44. Hu X, Li B, Li X, Zhao X, Wan L, Lin G, et al. Transmembrane TNF- $\alpha$  Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2. *The Journal of Immunology* 2014;192:1320–1331.
45. Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest* 2012;122:4094–4104.
46. Chen X, Nie Y, Xiao H, Bian Z, Scarzello AJ, Song N-Y, et al. TNFR2 expression by CD4 effector T cells is required to induce full-fledged experimental colitis. *Sci Rep* 2016;6:32834.
47. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF- $\alpha$  therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- $\beta$ . *J Exp Med* 2007;204:33–39.

## SUPPLEMENTARY METHODS

### **Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation induction and evaluation**

Psoriasis was induced with commercially imiquimod (IMQ) cream (5%; Aldara Cream; MEDA AB, Solna, Sweden). Male mice, 9 to 11 weeks of age received a daily topical application of 32.2 mg of IMQ cream on the shaved back skin for 5 consecutive days. A blinded procedure was used to monitor psoriasis-like skin inflammation induced on mouse shaved back skin. Every day, clinical scoring of psoriasis was done based on the human clinical Psoriasis Area and Severity Index (PASI). Three parameters were evaluated including erythema, scaling, and thickening and were scored independently on a scale from 0 to 4: 0, none; 1, slight; 2, moderate; 3, marked; 4, very marked. The cumulative score was done by addition of the three previous parameters with a scale from 0 to 12. For histological assessment, skin samples from back skin were fixed in 10% formalin for at least 24 h at room temperature and embedded in paraffin. Four  $\mu\text{m}$  deparaffinised sections were stained with HES before microscopic observation (optical microscopy). Epidermal thickness was evaluated with Archimed software (Microvision, Les Ulis, France) and by averaging the 5 to 10 values of independent fields of skin for each mouse.

### **Cell and tissue preparation**

#### *Mice*

Spleen leukocytes were prepared using a 70 $\mu\text{m}$  cell strainer, and red blood cells (RBC) were lysed in hemolysis buffer (NH<sub>4</sub>CL, KHCO<sub>3</sub>, and EDTA). Afferent popliteal and axillary lymph nodes were dissected out of the limbs, and node leukocytes were prepared using a 70 $\mu\text{m}$  cell strainer. Blood was collected by heart puncture, and for cell analysis, RBCs were lysed in hemolysis buffer.

For skin cell preparation, mouse back skin was collected and the subdermal fat was removed in order to quench autofluorescence during FACS analysis. Tissue was kept on ice, cut into small pieces and then incubated in digestion medium containing 400U/ml collagenase (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), 100 U/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 0.5U/ml DNase1 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) in RPMI for 2.5 h at 37 °C in a thermo shaker (1,300 rpm). Single-cell suspension was prepared by pushing the mixture through a 70- $\mu\text{m}$  cell strainer. Cells were then washed with 10 ml PBS containing 2 mM EDTA and spun down for 7 min at 400g. Cell pellet was then resuspended in FACS buffer (PBS 1X, 5% FCS, 0.02% sodium azide and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  human  $\gamma$ -globulin) and transferred to FACS tube for staining.

***Patients.*** Blood samples from RA and SpA patients and healthy donors were collected as described above. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were freshly isolated by dextran sedimentation (Axis Shield, Dundee, United Kingdom).

### **Lymphocyte purification**

CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells from mouse spleen were purified using the Regulatory T Cell Isolation Kit according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) as previously described [1]. Flow cytometry analysis showed that purity of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell-enriched fractions was 90–95% (data not shown).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg cells from healthy donors PBMC were purified using the Regulatory T Cell Isolation Kit II human according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Flow cytometry analysis showed that purity of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> cell-enriched fractions was 90–95% (data not shown).

### ***In vitro* culture experiments**

Treg were purified from indicated strain of mice and seeded ( $5 \times 10^4$ ) in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mM 2-ME, 1 M HEPES, 5 µg/ml soluble anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) and 2 µg/ml anti-CD28 (clone 37.51; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) mAbs, in U-bottom 96-well plates. Cells were incubated for 72h or 96h with or without rmTNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN) or rmIL-2 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) at indicated concentrations at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In some experiments, antagonist anti-TNFR1 (clone 55R-170; BioLegend, San Diego, CA) and anti-TNFR2 (clone TR.75.35-4; BioLegend, San Diego, CA) antibodies or isotype controls (clone RTK.2071; BioLegend, San Diego, CA) were added at indicated concentrations. Human Treg were cultured using the same conditions with rhTNF- $\alpha$  (Immunotools, Friesoythe, Germany) and an antagonist anti-TNFR2 antibody (clone 367A02; BioLegend, San Diego, CA) and its isotype control (clone RTK2758; BioLegend, San Diego, CA).

### **Flow cytometry**

**Mice.** Cell surfaces were stained with: PE-labeled anti-CD25 (clone 7D4; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), APC-Cy7-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ), PE-Cy7-labeled anti-CD39 (clone Duha59; BioLegend, San Diego, CA). PE-labeled anti-F4/80 (clone CI.A3.1, Biolegend, San Diego, CA), PercP-Cy5.5-labeled anti-CD3 (clone 17.A2; BD Biosciences Franklin Lake, NJ), APC-labeled anti-CD45 (clone 30F-11; BioLegend San Diego, CA), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CTLA-4 (clone UCD10-489; BioLegend San Diego, CA) and PerCP-labeled anti-CD8 (clone 53-6.7; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) . Cells were stained at 4°C in PBS containing 5% heat-inactivated FCS, 0.02 M sodium azide and 100µg/mL human immunoglobulin (Merck Millipore, Burlington, MA), and incubated for 30 min with appropriate dilutions of various mAbs (monoclonal antibodies) or corresponding isotype controls coupled to PE, APC-Cy7, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, APC and PerCP. For intranuclear Foxp3 staining, cells were fixed and permeabilized with eBioscience Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The stainings were performed with eFluor450-labeled anti-Foxp3 (clone FJK.16s; Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA) or corresponding isotype control coupled to eFluor450 and incubated for 30 min at 4°C in permeabilization buffer with appropriate dilution.

For pSTAT5 staining on Treg, cells were fixed with pre-warmed Lyse/Fix Buffer (Phosflow, BD Bioscience) at 37°C for 10 minutes, washed with PBS containing 5% FCS, permeabilized with pre-chilled Perm Buffer III (Phosflow, BD Bioscience) for 30 minutes on ice, washed two additional times with PBS containing 5% FCS, and finally stained for 60 minutes at room temperature with APC-Cy7-labeled anti-CD4 (clone GK1.5; BD Bioscience), PE-labeled anti-CD25 (clone 7D4; BD Bioscience), eFluor450-labeled anti-FoxP3 (clone FJK.16s; eBioscience), and AlexaFluor488-labeled anti-Stat5(pY694) (clone 47; BD Bioscience), or corresponding isotype control coupled to PE, eFluor450 and AlexaFluor488 in PBS containing 5% FCS, 0.02 M sodium azide and 100µg/mL human immunoglobulin (Calbiochem).

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 4 h with PMA and ionomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and Brefeldin A (BD Biosciences). Surface CD4 was stained. First, cells were incubated with PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BioLegend, San Diego, CA) for 30 min at 4°C in the dark, then washed. The cells were then permeabilized using Fixation/Permeabilization solution and stained with APC-labeled anti-IFN $\gamma$  (clone XMG1.2; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) for 30 min at 4°C in the dark.

**Patients and healthy donors.** For assessment of Treg from RA or SpA patients and from healthy donors, we used antibodies to surface markers: APC-H7-labeled anti-CD3 (clone SK7; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ), BV510-labeled anti-CD4 (clone RPA.T4; BioLegend, San Diego, CA), BV421-labeled anti-CD39 (clone A1; BioLegend, San Diego, CA), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD25 (clone M-A251; BioLegend, San Diego, CA), APC-labeled anti-TNFR2 (clone 3G7A02; BioLegend, San Diego, CA) and PE-Cy7-labeled anti-CD127 (clone A019D5; BioLegend, San Diego, CA).

For intranuclear Foxp3 staining, cells were fixed and permeabilized with Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The staining was performed with PE-labeled anti-Foxp3 (clone PCH 101; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) or corresponding isotype control coupled to PE and incubated for 30 min at 4°C in dark with appropriate dilution.

Flow cytometry gating strategy used to study TNFR2 expression by Tregs from peripheral blood of RA and SPA patients is shown on fig S4.

All flow cytometry experiments were performed on a BD FACS CANTO II flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Dead cells were excluded based on forward and side scatter characteristics. Reported statistical data are based on at least 1,000 events gated on the population of interest. Results were analyzed using FACS Diva software (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ).

### **Measurement of Treg proliferation and viability**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified as described above from spleen of mice. Treg were pre-labeled with 5mM CFSE (Invitrogen; Carlsbad, CA) for 10 min at 37°C. CFSE-labeled Treg (5x10<sup>4</sup>) were cultured in U bottom 96-well plates in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 50 mM 2-ME, 1 M HEPES,

5µg/ml anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) and 2 µg/ml anti-CD28 (clone 37.51; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) mAbs. Cells were incubated with or without 20 ng/ml rmTNF- $\alpha$  (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). After 4 days, Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) were stained as described above. Treg proliferation was then determined using flow cytometry by measuring CFSE dilution. Data were analyzed using FACS Diva software as described above.

For Treg viability assessment, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified as described above from spleen of mice. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells ( $5 \times 10^4$ ), stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs as for proliferation measure described above, were incubated with or without 20 ng/ml rmTNF- $\alpha$  (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) for 72h. Viability measurement was performed with Zombie Green (BioLegend, San Diego, CA) before surface staining. Cells were incubated with Zombie Green in PBS 1X for 20 min at room temperature in the dark. Cells were then washed twice with surface staining buffer as describe above. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells were stained as described above.

1 . Biton J, Khaleghparast Athari S, Thiolat A, *et al.* In Vivo Expansion of Activated Foxp3+ Regulatory T Cells and Establishment of a Type 2 Immune Response upon IL-33 Treatment Protect against Experimental Arthritis. *J Immunol* 2016;**197**:1708–19. doi:10.4049/jimmunol.1502124

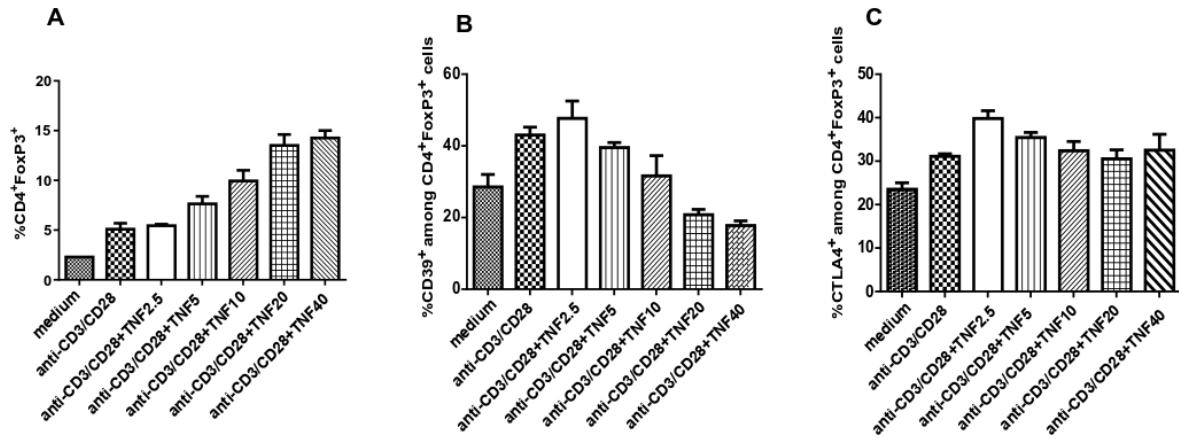
**SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES**

Gene	Orientation	Primer (5'-3')	Size amplicon
TNFR1 WT	Forward	TGTGGAAAGGGCACCTTTACGGC	470bp
	Reverse	GGCTGCAGTCCACGCACTGG	
TNFR1 <sup>-/-</sup>	Forward	TGTGGAAAGGGCACCTTTACGGC	300bp
	Reverse	ATTCGCCAATGACAAGACGCTGG	
TNFR2 WT	Forward	AGCTCCAGGCACAAGGGCGGG	200bp
	Reverse	CCTCTCATGCTGTCCCGGAAT	
TNFR2 <sup>-/-</sup>	Forward	GCCCTGAATGAACTGCAGGACG	500bp
	Reverse	CACGGGTAGCCAACGCTATGTC	

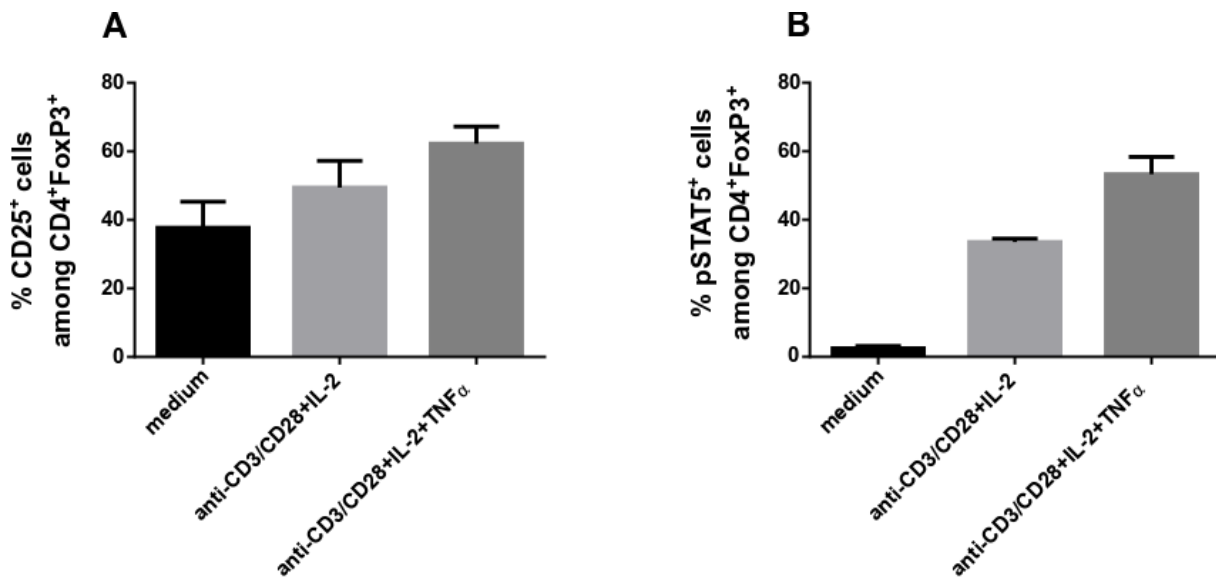
**Table S1 : Primer sequences used to genotype TNFR1<sup>-/-</sup> TNFR2<sup>-/-</sup> mice**

Gene	Size	PCR primer forward	PCR primer reverse	Pyrosequencing primers	CpGs
<i>Foxp3</i> (NM_054039.2) chrX:7583912-7584196	285	GGTTTTGTTGTT ATAATTTGAATT TG	Biotin- CAACCTTA AACCCCTC TAACATC	TGTTGTTATAATTTG AATTT	2,3,4
				GGGGTAGATAATTT ATTTTA	5,6,7
				GGTGATGTGGGTGT TAG	8,9,10

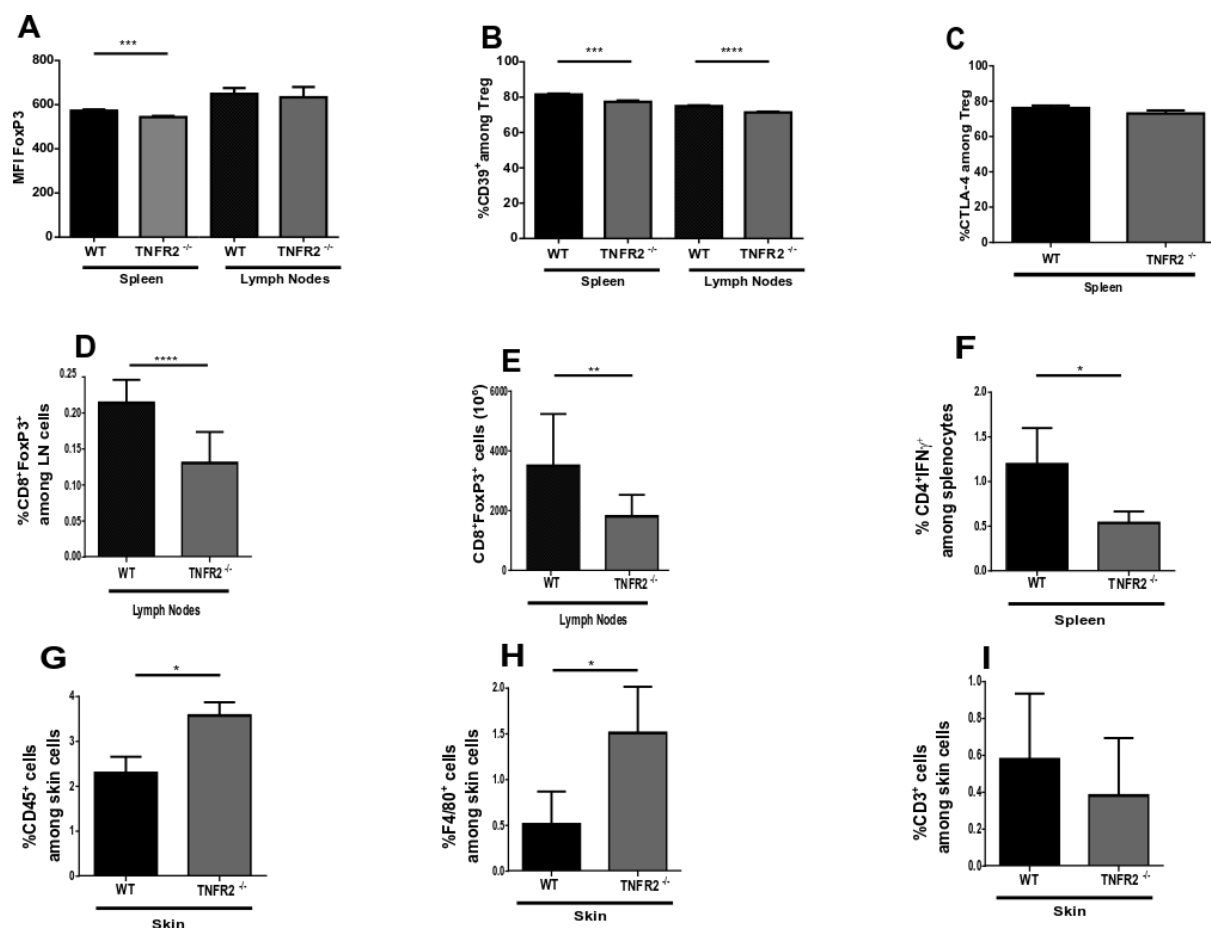
**Table S2 : Oligonucleotide sequences for PCR amplification and pyrosequencing**



**Figure S1 : Effect of TNF on cultured mouse Treg.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified from the spleen of *wt* mice. Cells were cultured for 72h with anti-CD3 + anti-CD28 Abs in presence of increasing (0 to 40 ng/ml) concentrations of rmTNF- $\alpha$ . (A) CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> frequency among total cells. (B) CD39<sup>+</sup> cells frequency among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. (C) CTLA-4<sup>+</sup> cells frequency among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified from two spleens pooled from two *wt* mice. Data shown are representative of 2 independent experiments with similar results.

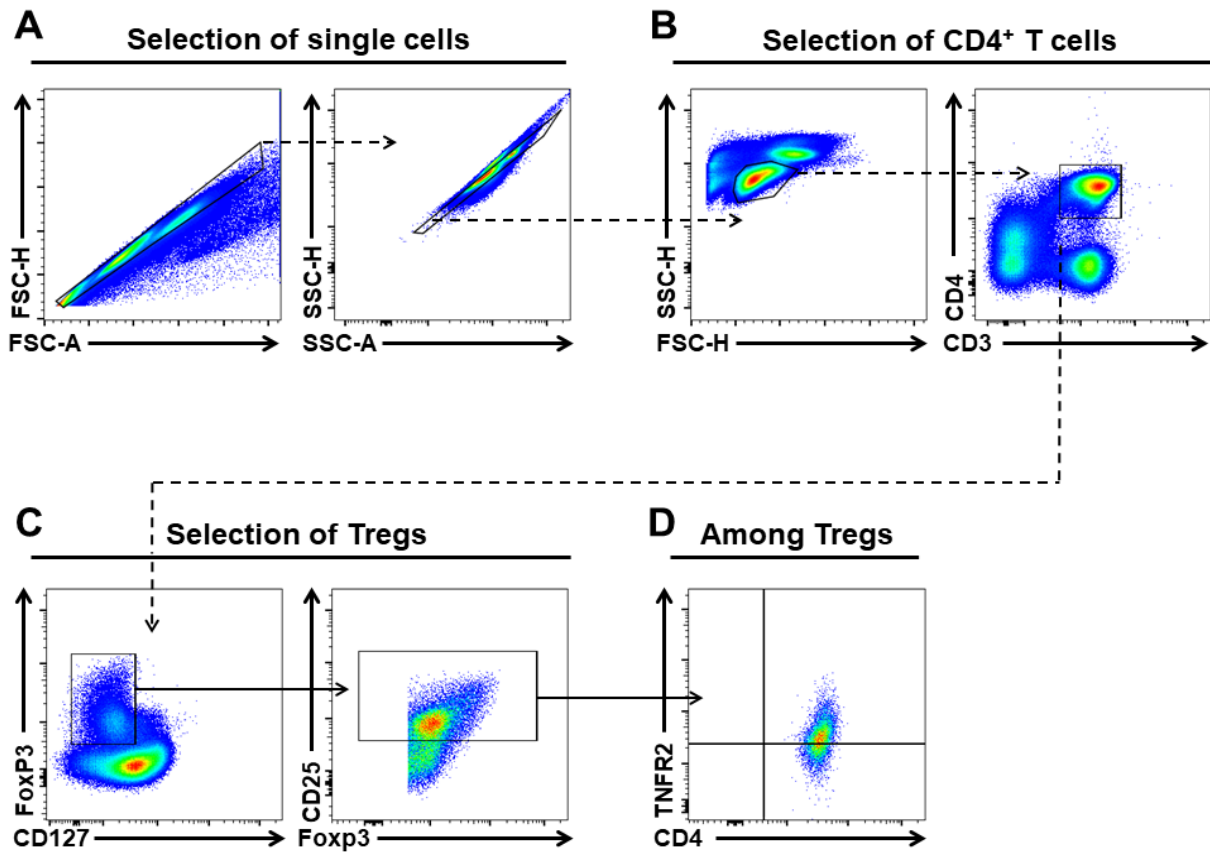


**Figure S2 : TNF increases IL-2-mediated CD25 expression and phosphorylation of STAT5 by Treg.** CD4<sup>+</sup> T cells were purified from *wt* C57Bl/6 mice by magnetic separation and cultured for 6h with medium, or anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml), anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml), IL-2 (0.1 ng/ml) with or without TNF- $\alpha$  (40 ng/ml). (A) Percentage of CD25<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg. (B) Percentage of pSTAT5<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg. Data are representative of 2 independent experiments.



**Figure S3 : TNFR2 deficiency is related to altered splenic Treg, CD39<sup>+</sup> Treg and skin macrophage frequencies during IMQ-induced skin inflammation.** Cell frequency was analysed by FACS on spleen, LN or skin of TNFR2<sup>-/-</sup> and *wt* mice 5 days after the first application of IMQ cream. Splenocytes and/or LN cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-CD8, anti-FoxP3, anti-CD39, anti-CTLA-4, anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-17 (A-F) antibodies. Skin cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD45, anti-CD3 and anti-F4/80 (G-I) antibodies. (A) FoxP3<sup>+</sup> mean fluorescence intensity (MFI) on CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells. (B) Percentage of CD39<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg cells. (C) Percentage of CTLA-4<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> splenic Treg cells. (D) Percentage of CD8<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells among whole LN cells. (E) Number of CD8<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells in the LN. (F) Percentage of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells among all splenocytes. Percentage of CD45<sup>+</sup> (G), F4/80<sup>+</sup> (H) and CD3<sup>+</sup> (I) cells among skin cells. Data are given as mean  $\pm$  SEM for each group. Two-tailed unpaired student *t*-test was used for statistical analysis. \*\*\*\* p < 0.0001; \*\*\* p < 0.001; \*\* p < 0.01; \* p < 0.05.





**Figure S4 : Flow cytometry gating strategy used to study TNFR2 expression by Tregs from peripheral blood of RA and SPA patients.** (A) Doublet cells were excluded and (B) total CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were identified based on SSC/FSC and on the co-expression of CD3 and CD4. (C) Tregs were identified as CD25<sup>+</sup> CD127<sup>dim</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells and (D) the frequency of TNFR2<sup>+</sup> cells was determined among Tregs.

# Discussion et perspectives

Les Treg ont un rôle crucial dans la tolérance immunitaire et le contrôle de l'inflammation. Un des enjeux pour cette cellule est de conserver sa fonction et son phénotype régulateur au cours du temps et en conditions inflammatoires, par des mécanismes encore mal connus. Dans la PR, ce rôle est altéré et l'incapacité des Treg à contrôler le système immunitaire participe au développement et à la persistance de la pathologie. Sur le site inflammatoire, de nombreux partenaires sont mis en jeu, et les plus représentés sont sans doute les neutrophiles. Bien qu'étant un effecteur important du processus inflammatoire, la littérature la plus récente accorde à cette cellule de nouvelles propriétés, en particulier immunorégulatrices. Néanmoins, la relation entre neutrophiles et Treg n'a jamais été étudiée. Ainsi, le but de ce projet était de caractériser l'interaction Treg/neutrophiles et de définir les conséquences de cette interaction sur le phénotype et la fonction des cellules. Enfin, il était question d'étudier cette interaction dans la PR afin de mieux comprendre la mise en place et la persistance de la pathologie. Ce travail a pour ambition d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles et innovantes.

## **Le maintien du phénotype des Treg**

En premiers lieu, nous avons démontré que les neutrophiles augmentent fortement le maintien du phénotype régulateur des Treg en coculture, comparés aux Treg cultivés seuls. Cela a été observé par l'expression de FoxP3, le facteur de transcription caractéristique des Treg. *In vitro*, sous stimulation adéquate, les Treg perdent spontanément au cours du temps l'expression de FoxP3, en même temps que leur activité suppressive. Le pourcentage de cellules exprimant FoxP3 étant nettement supérieur en présence de neutrophiles, nous avons émis deux hypothèses non exclusives: soit de nouveaux Treg FoxP3<sup>+</sup> sont générés à partir des cellules FoxP3<sup>-</sup>, soit la stabilité de l'expression du facteur de transcription FoxP3 est augmenté en présence de neutrophiles. La coculture de neutrophiles avec des CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> a montré que les neutrophiles sont incapables de générer des cellules CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> à partir de cellules T non FoxP3 (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>). Ainsi, nous supposons que les neutrophiles favorisent la stabilité de l'expression de FoxP3 dans les cellules exprimant déjà ce facteur de transcription, se traduisant par une augmentation du maintien du phénotype des Treg.

*In vivo*, l'homéostasie du compartiment régulateur dépend de la capacité de prolifération des Treg (Pierson et al., 2013). Pierson *et al* ont utilisé des souris exprimant le récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de FoxP3. Ces souris étant chimériques, seule la moitié du compartiment T régulateur

comprend cette construction. Ainsi, après injection de toxine diphtérique aux souris, la moitié des Treg a été éliminée. Les auteurs ont montré que l'organisme est alors capable de détecter cette déplétion et de la combler en induisant la prolifération des Treg restants. Récemment, une équipe de chercheurs a montré que, la prolifération des Treg était aussi importante en condition inflammatoire (Ouyang et al., 2019). Cette prolifération est alors modulée par l'expression des molécules Akt-1 et Akt-2 chez les Treg. Nous avons voulu déterminer l'effet des neutrophiles sur la capacité des Treg à proliférer. Par cytométrie en flux, nous avons observé une forte induction de la prolifération, spécifiquement des cellules FoxP3<sup>+</sup>, en présence de neutrophiles. Nous proposons que cette prolifération soit responsable, au moins en partie, du maintien du pourcentage de cellules FoxP3<sup>+</sup> parmi les CD4<sup>+</sup>. Nous n'excluons cependant pas que le neutrophiles puissent directement influencer l'expression de FoxP3 puisque l'intensité de son expression est aussi augmenté en présence de neutrophiles et cela ne peut pas s'expliquer par un phénomène de prolifération. L'étude de l'expression des molécules Akt-1 et Akt-2 dans les Treg en présence de neutrophiles pourrait nous donner plus de renseignements quant au rôle des neutrophiles dans la prolifération des Treg précédemment décrite.

La stabilité de l'expression de FoxP3 chez les Treg est cruciale puisque directement liée à leur activité suppressive. *In vivo*, les mécanismes permettant le maintien de la population FoxP3<sup>+</sup> sont encore méconnus, en revanche nous savons que la stabilité de l'expression de FoxP3 est liée au taux de méthylation de deux séquences dans le promoteur du gène, appelées CNS1 et CNS2 (Zheng et al., 2010). Afin de statuer sur la capacité des neutrophiles à augmenter la stabilité de l'expression de FoxP3 sur les Treg, nous pourrions analyser le niveau de méthylation du CNS1 et du CNS2 de FoxP3 en présence de neutrophiles. Nous pouvons nous attendre à ce que ces niveaux de méthylation soient plus faibles chez les Treg en coculture avec des neutrophiles comparés aux Treg seuls, puisqu'une faible méthylation de ces régions se traduit par une meilleure stabilité de l'expression de FoxP3. D'autres facteurs épigénétiques comme les modification post-traductionnelles des histones, les miRNA ou l'implication de séquences génomiques distales influencent les cellules dans leur capacité à exprimer FoxP3 (Samstein et al., 2012), or les neutrophiles sont incapables d'induire FoxP3 dans des cellules T ne possédant pas les bonnes modifications épigénétiques comme les T<sub>eff</sub>. Par conséquent, nous nous somme demandé si les neutrophiles sont capables d'induire FoxP3 dans des cellules CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> mais possédant une empreinte génétique propre aux Treg, comme par exemple des lymphocytes T ayant perdu FoxP3 (ex-Treg). Pour tester cela, nous avons mis en culture des Treg pendant 72h en présence

d'anticorps  $\alpha$ CD3 et  $\alpha$ CD28, le temps d'observer une perte quasi-totale de l'expression de FoxP3 sans modification importante de la viabilité cellulaire. A l'obtention de ces ex-Treg, nous avons rajouté des neutrophiles activés par le LPS pour observer après 72h additionnelles l'expression de FoxP3. Les neutrophiles permettent une restauration de près de 40% de l'expression de FoxP3. Ce résultat peut cependant toujours s'expliquer par une prolifération spécifique du peu de cellules FoxP3<sup>+</sup> présentes au moment de l'ajout des neutrophiles. Pour appuyer ce résultat il faudrait trier par cell sorting les ex-Treg, pour éliminer tout contaminant FoxP3<sup>+</sup>, avant d'ajouter les neutrophiles. La stabilité de FoxP3 dans les Treg est une considération importante de la recherche en immunologie et trouve des applications dans beaucoup de pathologies où la capacité suppressive des Treg est altérée comme la sclérose en plaques (Bebo et al., 2001), le lupus érythémateux systémique (Mao et al., 2014), ou la polyarthrite rhumatoïde (Komatsu et al., 2013).

La caractérisation phénotypique des Treg ne s'arrête pas à l'expression de FoxP3. Nous avons choisi d'étudier d'autres molécules impliquées dans la fonction des Treg. Ainsi, suivant celle de FoxP3, l'expression des molécules CTLA-4 et CD25 est augmentée en présence de neutrophiles. Il a été montré que FoxP3 régule directement l'expression de ces marqueurs, donc l'augmentation observée peut être, au moins en partie, due à l'augmentation de FoxP3. Cela nous indiquerait que le marquage FoxP3 observé est associé à une molécule biologiquement active. Nous ne pouvons cependant pas exclure que les neutrophiles puissent induire CTLA-4 et CD25 sur les Treg de façon indépendante de FoxP3. Ces protéines sont étroitement impliquées dans la régulation du système immunitaire par les Treg (figure 6), cela conforte donc la conclusion que les neutrophiles favorisent le maintien du phénotype régulateur des Treg.

Nous avons étudié ici le rôle des neutrophiles sur des Treg purifiés. Cependant, nous pouvons nous demander si les neutrophiles sont aussi capables de favoriser la différenciation des Treg. De par l'absence de neutrophiles dans le thymus, nous pensons plutôt à la différenciation des pTreg. Ces derniers se différencient dans les SLOs à partir de Tconv et en présence de TGF- $\beta$ , d'IL-2 et d'acide rétinoïque (Chen et al., 2003; Mucida et al., 2007). Ce processus peut être reproduit *in vitro* (Chen et al., 2003) et il serait intéressant de voir si des neutrophiles peuvent influencer cette différenciation.

L'interaction Treg/neutrophiles reste à être décrite *in vivo*, et dans ce contexte nos résultats *in vitro* suggèrent un rôle important des neutrophiles dans le maintien de cette population T régulatrice.

## L'activation des neutrophiles par les Treg

Les neutrophiles aussi sont influencés par la coculture avec les Treg. Nous avons observé une augmentation de l'expression de l'intégrine CD11b, un marqueur du niveau d'activation des neutrophiles. Lorsqu'ils s'activent les neutrophiles surexpriment cette intégrine notamment pour diminuer leur potentiel migratoire et interagir avec les cellules endothéliales, favorisant leur transmigration vers le site inflammatoire (Chavakis et al., 2004). Nous avons été surpris d'observer à la surface des neutrophiles une augmentation de l'expression de molécules immuno-modulatrices comme PD-L1 et CD39. PD-L1 n'est pas exprimé par les neutrophiles à l'état basal, mais son expression est induite après activation. L'ajout de Treg aux neutrophiles stimulés décuple cette expression de PD-L1. Sachant que son ligand le PD-1 est exprimé par les Treg (bien que non influencé par la coculture), il constitue un candidat idéal comme médiateur du dialogue Treg/neutrophiles (discuté plus bas). Le couple PD-1/PD-L1 est considéré comme un « immune checkpoint » de par son importance dans la régulation du système immunitaire. PD-L1 est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes et participe à la fine régulation de l'activation des lymphocytes Teff. Suite à cette activation, les Teff surexpriment PD-1, les rendant d'autant plus sensibles à la régulation négative par PD-L1. La rupture de cette régulation se traduit par un emballement du système immunitaire et l'aggravation de maladies auto-immunes comme le lupus (Nishimura et al., 1999), la polyarthrite rhumatoïde (Raptopoulou et al., 2010) ou le diabète (Keir et al., 2006). Parallèlement, nous avons mesuré une augmentation de l'expression de CD39 sur les neutrophiles en présence de Treg. Cette molécule, classiquement associée aux Treg, catalyse la dégradation de l'ATP extracellulaire (alarmine) en ADP, une molécule aux propriétés anti-inflammatoires (figure 6). Il reste cependant à déterminer si le CD39 à la surface des neutrophiles conserve son activité enzymatique qui lui est associée à la surface des Treg. Ainsi nous avons conclu que, suite à la coculture avec les Treg, les neutrophiles adoptent un phénotype immuno-régulateur chez la souris: Ly6G<sup>+</sup> CD11b<sup>high</sup> CD39<sup>high</sup> PD-L1<sup>high</sup>. Nous pourrions envisager de trier, par cytométrie, cette population de neutrophiles induite par les Treg pour en décortiquer les modifications fonctionnelles associées.

## La production cytokinique de la coculture Treg/neutrophiles

Les cellules en coculture peuvent aussi être étudiées selon leur capacité à produire des médiateurs solubles tels que des cytokines. Chez la souris, nous avons détecté par ELISA une production accentuée de MiP2

et d'IL-6 en coculture. Ces cytokines sont classiquement associées aux neutrophiles, si bien que les Treg seuls n'en produisent pas. Cependant, par ELISA nous détectons des cytokines produites dans le surnageant et nous ne pouvons pas affirmer quelles cellules les produisent dans les conditions en coculture. Le plus probable est que suite à l'activation des neutrophiles par les Treg, que nous avons déjà observée par l'expression de CD11b, leur production en MIP2 et IL-6 est accentuée. Cela devra être confirmé par une analyse en cytométrie en flux avec un marquage intracellulaire des cytokines.

De façon surprenante, nous avons détecté une forte concentration d'IL-17 dans les surnageants de coculture, alors que ni les Treg, ni les neutrophiles, ne produisent cette cytokine dans nos conditions en simple culture, même après activation. Dans certains cas les neutrophiles sont capables d'exprimer l'IL-17 (Taylor et al., 2013). Les Treg aussi peuvent produire de l'IL-17. Il a été montré que les Treg peuvent exprimer des marqueurs associés aux populations T effectrices. Ces Treg expriment alors RoRyT en même temps que FoxP3 et certaines cytokines comme l'IL-17. Cette déviation phénotypique peut aller jusqu'à une perte totale de FoxP3, associée à une perte de l'activité suppressive. Cela engendre une instabilité du phénotype Treg au profit de fonctions effectrices Th17 (Komatsu et al., 2013). A l'inverse, d'autres études soutiennent que cette population de Treg exprimant RoRyT possède une capacité suppressive supérieure envers les Th17 (Yang et al., 2016a). Dans nos cocultures nous n'avons pas détecté d'expression de RoRyT chez nos Treg FoxP3<sup>+</sup>. De plus, l'expression de FoxP3 n'est pas diminuée en coculture mais bien au contraire, fortement induite. Enfin, hormis l'IL-17 nous ne détectons pas d'autres cytokines effectrices comme l'IFN- $\gamma$  dans nos cocultures. Cette expression d'IL-17 ne semble donc pas associée à une déviation phénotypique des Treg en Teff. Parmi ses effets, l'IL-17 participe au recrutement des neutrophiles en stimulant indirectement leur différenciation (Schwarzenberger et al., 2000). Nous pourrions alors attribuer à cette IL-17 générée par l'interaction Treg/neutrophiles un rôle dans l'homéostasie de la population neutrophilique. Nous avons voulu observer lequel de ces deux type cellulaires produit l'IL-17 en coculture. Nous n'avons pas pu détecter, par cytométrie en flux, la population à l'origine de cette production d'IL-17. Définir cela, dans des expériences futures, permettrait de mieux comprendre le rôle de cette IL-17 produite suite à l'interaction Treg/neutrophiles.

Contrairement aux autres phénomènes liés à la coculture, ces résultats sur la production cytokinique chez la souris ne sont pas confirmés chez l'homme. La coculture de Treg et de neutrophiles humains n'entraîne pas de production d'IL-17 ou d'IL6. Nous détectons bien de l'IL-8 (analogue humain de MIP2) mais cette

production n'est pas influencée par la coculture. De façon intéressante, cette IL-8 est notamment produite par les Treg humains dans nos cultures. Himmel *et al.* ont pu montrer que, par cette sécrétion d'IL-8, les Treg sont capables d'induire le recrutement des neutrophiles (Himmel et al., 2011). Nous proposons que ce chimiotactisme puisse largement favoriser l'interaction Treg/neutrophiles, en particulier *in vivo*.

## La fonction des Treg

La coculture entre Treg et neutrophiles favorise l'expression de molécules inhibitrices comme CTLA-4, PD-L1 ou CD39. En conséquence nous avons observé une capacité inhibitrice de la coculture Treg/neutrophiles sur la prolifération de Teff. De plus, alors que les Treg seuls perdent progressivement leurs capacités suppressives en même temps que FoxP3, les Treg isolés de cocultures avec des neutrophiles maintiennent leurs propriétés inhibitrices. La perte du pouvoir régulateur des Treg en condition inflammatoire est un problème majeur et peut expliquer notamment l'échec de certaines thérapies cellulaires utilisant des transferts de Treg dans le but de réprimer des symptômes inflammatoires dans des modèles murin de PR (Komatsu et al., 2013) ou de lupus (Bagavant and Tung, 2005). Nos résultats indiquent que préparer les Treg en présence de neutrophiles pourrait favoriser leur maintien lors du transfert. De plus, la préparation des Treg peut impliquer une prolifération induite par l'IL-2 afin de générer un nombre suffisant de cellules disponibles pour le transfert. Cependant, ce protocole peut engendrer des impuretés représentées par l'expansion de Teff (Battaglia et al., 2006). Dans nos expériences, les neutrophiles induisent la prolifération spécifiquement des cellules FoxP3<sup>+</sup> et augmentent leur expression du CD25, ce qui pourrait favoriser leur réponse à l'IL-2. Les neutrophiles en coculture avec des Treg pourraient constituer une amélioration du protocole d'expansion des Treg ex-vivo par l'IL-2.

Nous ne savons pas si la stabilité des Treg favorisée par les neutrophiles est durable, notamment après rupture de l'interaction. Pour définir cela, nous pourrions envisager d'étudier les modifications épigénétiques des locus associés à l'expression de FoxP3 après interaction avec les neutrophiles. Une déméthylation augmentée de ces séquences ADN et des histones associées en présence de PMN pourrait favoriser une stabilité de l'expression de FoxP3 durable. Autrement, il faudrait favoriser l'interaction Treg/neutrophiles directement *in vivo*. Pour cela il faut bien comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ce dialogue, ce qui devra être défini par des études supplémentaires.



## Le neutrophile régulateur

Suite à la coculture Treg/neutrophiles, nous qualifions les neutrophiles de régulateurs de par leurs fonctions suppressives envers les Teff mais aussi leur capacité à maintenir le phénotype et la fonction des Treg. Ce message est démontré pour la première fois dans ce travail de thèse. Nous pouvons cependant le mettre en relation avec des données de la littérature portant sur des fonctions suppressives accordées aux neutrophiles.

Le concept de cellules myéloïdes régulatrices a été évoqué il y a plus de trente ans dans un environnement tumoral (Young et al., 1987). Cette régulation a été retrouvée dans des maladies infectieuses (Pan et al., 2013) ou auto-immunes (Zhu et al., 2007), mais elle est impossible à détecter en condition homéostatique. Ce phénomène peut être attribué à une population hétérogène de cellules macrophagiques, monocytaires, dendritiques ou granulocytaires, dont la composition varie selon le contexte étudié. Afin de clarifier les résultats obtenus sur cette thématique les cellules myéloïdes régulatrices ont été regroupées sous l'acronyme MDSC pour « Myeloid Derived Suppressor Cells » (Gabrilovich et al., 2007). L'hétérogénéité de cette population cellulaire rend son étude difficile puisque elle a pour seule caractéristique d'inhiber la prolifération de cellules T, mais n'exprime aucun marqueur permettant son identification ou son isolement. Cela signifie que selon le contexte étudié, on regroupe sous l'acronyme MDSC des populations très différentes ce qui complexifie la mise en relation des découvertes. Ainsi, la terminologie MDSC doit être dépassée pour définir des populations homogènes précises aux propriétés régulatrices. Des neutrophiles de ce type ont déjà été décrits chez l'homme par Pillay *et al.*, chez des patients souffrant d'inflammation systémique (Pillay et al., 2012). Ces neutrophiles sont caractérisés par le phénotype CD11c<sup>bright</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD16<sup>bright</sup>. Ces molécules sont exprimées à des taux variables par tous les neutrophiles et ce profil d'expression particulier est à associer à un fort niveau d'activation des cellules. Cela corrèle avec une inflammation importante et persistante. Dans cet article, les auteurs observent que la prolifération de cellules T totales en présence de ces neutrophiles est diminuée comparée à la condition sans neutrophiles. Cela leur permet de conclure que les neutrophiles CD11c<sup>bright</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD16<sup>bright</sup> inhibent la prolifération des lymphocytes T (Pillay et al., 2012). Parmi ces cellules T, il y a 1 à 5% de Treg, ainsi il pourrait être intéressant d'étudier le rôle de l'interaction Treg/neutrophiles dans leurs observations. En effet, à la lumière de nos résultats, une part de l'inhibition de la prolifération que les auteurs observent peut être attribuée aux Treg activés par la présence des neutrophiles.

D'une façon similaire, Marini *et al.* ont montré que chez des patients traités avec du G-CSF il était possible d'isoler une population de neutrophiles CD10<sup>+</sup> possédant une activité immunosuppressive envers les lymphocytes T dépendante de CD18 et ARG-1 (Marini et al., 2017). Cette population CD10<sup>+</sup> est aussi présente chez les sujets sains mais ne possède alors pas de capacité suppressive. Ces cellules présentent un niveau d'activation élevé et un phénotype mature de part la présence d'un noyau hyper-segmenté et du CD10 qui est un marqueur de maturation des neutrophiles dans la moelle osseuse. Comme pour l'étude précédente, les expériences d'inhibition de la prolifération ont été réalisées par des cocultures de neutrophiles avec des lymphocytes T totaux, comprenant donc un pourcentage de Treg. Donc à nouveau, chez ces patients traités par le G-CSF, il pourrait être intéressant d'analyser le rôle de l'interaction Treg/neutrophiles sur l'inhibition observée.

Par ailleurs, Wang *et al.* ont découvert une population de neutrophiles induite par le GM-CSF et qui se retrouve infiltrée dans les tumeurs chez l'homme. Ces cellules expriment PD-L1 et sont capables d'inhiber la prolifération des Teff de façon PD-L1 dépendante (Wang et al., 2017). Les tumeurs génèrent souvent un environnement très immunosuppresseur afin de se protéger du système immunitaire dont la fonction est de l'éliminer. Ainsi, on retrouve un fort infiltrat de Treg dans les tumeurs (Liyanage et al., 2002; Woo et al., 2001). Nous pouvons nous demander si l'apparition de cette population de neutrophiles immunosuppresseurs qui exprime PD-L1 est favorisée par l'interaction avec les Treg pro-tumoraux infiltrés. En effet, les neutrophiles issus de coculture avec les Treg que nous présentons, possèdent des caractéristiques tout à fait semblables (phénotype mature activé et PD-L1<sup>high</sup>). A l'inverse, la présence des neutrophiles pourrait influencer le comportement des Treg infiltrés dans les tumeurs. L'étude de l'interaction Treg/neutrophiles dans des modèles de cancers pourrait donc révéler de nouvelles cibles thérapeutiques contre ces pathologies.

Une forme différente d'inhibition du système immunitaire par les neutrophiles a été décrite par Nadkarni *et al.* Des neutrophiles exposés aux hormones sexuelles progestérone et estriol sont capables d'induire un phénotype régulateur sur des Teff lors de la gestation (Nadkarni et al., 2016). Ces neutrophiles transmettent le facteur Foxo1 par des vésicules apoptotiques, entraînant l'expression de FoxP3 dans les Teff. Les auteurs ont montré que ce phénomène est essentiel dans le maintien de la tolérance fœto-maternelle puisque son altération entraîne des pré-éclampsies chez la souris comme chez la femme. Ce mécanisme semble assez éloigné de ce que nous observons puisque le maintien des Treg dans notre modèle est contact dépendant, n'est

pas associé à l'apoptose des neutrophiles et ne se traduit pas par l'expression de FoxP3 sur des Teff mais uniquement sur des Treg. Cela rappelle, tout de même, que les Treg n'ont pas qu'un rôle de contrôle des phénomènes inflammatoires liés aux infections et autres pathologies mais ont aussi la lourde tâche de maintenir la tolérance immunitaire. Au vu de l'importance des neutrophiles et des Treg dans le maintien de la tolérance fœto-maternelle, la pré-éclampsie constitue un modèle prometteur pour continuer l'étude de l'interaction entre ces deux types cellulaires.

Ces publications sur les neutrophiles régulateurs possèdent des similitudes. En effet, il semblerait que ces neutrophiles soient indétectables chez des sujets sains ou en condition physiologique. Leur apparition est conditionnée par différents contextes inflammatoires tels que cancer, infection ou certaines pathologies auto-immunes. Dans chacun des cas présentés, les neutrophiles régulateurs se distinguent par une forte expression de molécules liées à leur maturation ou leur activation (CD11b, Cd11c, CD16, CD62L, CD10). Cela est potentiellement dû aux stimuli qui favorisent l'émergence de cette population de neutrophiles (LPS, GM-CSF ou G-CSF), puisqu'ils sont tous des facteurs de maturation et d'activation des neutrophiles. Ainsi, aucun marqueur unique ne permet de différencier des neutrophiles matures activés mais non régulateurs, des neutrophiles possédant une activité régulatrice. Il est perturbant d'observer que des molécules connues pour stimuler les fonctions antibactériennes et proinflammatoires des neutrophiles sont les mêmes qui participent à l'apparition des neutrophiles régulateurs. Pillay *et al.* proposent alors deux hypothèses quant à leur origine. Le neutrophile régulateur peut être un stade de maturation supplémentaire du neutrophile classique. C'est à dire que, au-delà du stade de neutrophile à noyau hyper-segmenté, il existerait un stade de maturation aux propriétés anti-inflammatoires, atteignable dans certaines conditions. Cela laisse supposer que tout neutrophile a la capacité d'acquérir un phénotype régulateur. Une autre hypothèse proposée est qu'une sous-population de neutrophile est conditionnée pour être anti-inflammatoire dès le processus de différenciation des neutrophiles dans la moelle osseuse. Notre modèle de neutrophile régulateur se heurte au même dilemme et se place aussi bien dans l'une que dans l'autre des hypothèses. Dans nos cultures, seule une partie des neutrophiles surexprime CD39 et PD-L1 après interaction avec les Treg. Cela peut s'expliquer en supposant que seule la sous-population de neutrophiles capable de présenter un phénotype régulateur a répondu. Cependant nous pouvons aussi imaginer que l'apparition de ce phénotype régulateur est conditionnée par des facteurs limitant, tels que l'accès aux Treg ou aux molécules de signalisation, ne permettant qu'à une partie des neutrophiles de répondre. A

l'inverse, il est envisageable que seule une sous-population de Treg encore indéterminée ne soit capable d'interagir avec les neutrophiles. En plus de cette incertitude sur l'origine du neutrophile régulateur, les signaux responsables de leur apparition restent aussi indéterminés. Il semblerait que ceux-ci n'apparaissent qu'en condition inflammatoire, mimé dans nos cultures par une stimulation du TCR et du TLR4, mais aucune étude n'a réussi à générer ces cellules *in vitro*. Nous montrons ici que des neutrophiles activés au LPS possèdent une activité régulatrice en favorisant le maintien des Treg. De plus, suite à cette interaction, les neutrophiles acquièrent un potentiel suppresseur envers les Teff. L'absence de marqueur unique et spécifique du neutrophile régulateur est un frein certain à son étude et doit concentrer la recherche future sur ce domaine. En attendant, nous ne pouvons savoir avec certitude si les neutrophiles régulateurs présentés ci-dessus, comme ceux de ce travail de thèse, appartiennent à une seule et même population induite de différentes façons ou s'il existe des sous-populations de neutrophiles régulateurs différenciables fonctionnellement et phénotypiquement.

### **Mécanismes de l'interaction Treg/neutrophiles**

Suite à notre découverte de l'interaction Treg/neutrophiles, nous nous sommes demandé par quels mécanismes ces deux cellules pouvaient communiquer. Les premières expériences réalisées à ce sujet sont basées sur l'utilisation de transwell. Nous avons démontré qu'en absence de contact cellulaire il y avait une perte totale de la coopération Treg/neutrophiles. Nous nous sommes alors concentré sur l'étude de partenaires membranaires exprimés par les neutrophiles et possédant un ligand sur les Treg. Il a été montré que les neutrophiles ont la capacité de présenter des peptides antigéniques aux cellules T par leur CMH (Abi Abdallah et al., 2011; Beauvillain et al., 2007). Mon modèle est antigène indépendant, donc le couple CMH/TCR a été écarté. En revanche, nous avons tenté de bloquer les molécules de costimulation associées à la présentation antigénique que sont le CD86 exprimé par les neutrophiles et qui peut interagir avec le CD28 ou le CTLA-4 des Treg. Dans la même logique, nous avons aussi bloqué l'interaction OX40L (neutrophiles)/OX40 (Treg). Le blocage de ces molécules n'a pas affecté l'interaction Treg/neutrophiles. Nous avons vu plus haut que les neutrophiles surexpriment PD-L1 en présence de Treg. Or la signalisation par le PD-1, ligand du PD-L1, peut induire FoxP3 sur les Treg (Francisco et al., 2009). Cependant, le blocage de ces molécules n'a pas non plus affecté l'interaction Treg/neutrophiles. L'interaction des neutrophiles avec d'autres populations cellulaires nécessite la reconnaissance entre molécules d'ancrage. Par exemple, Marini *et al.* ont mis en évidence une interaction entre

neutrophiles et lymphocytes T dépendante du CD18 (Marini et al., 2017). Afin de déterminer si l'interaction entre neutrophiles et Treg obéit au même mécanisme, nous avons bloqué la reconnaissance de la molécule CD18 (neutrophiles) par son ligand ICAM (Treg). A nouveau, le blocage de ces molécules n'a pas affecté l'interaction Treg/neutrophiles. Nous avons finalement montré que le Tofacitinib, un inhibiteur de la voie de signalisation JAK/STAT, diminue la coopération Treg/neutrophiles. Cette voie de signalisation est principalement utilisée par les cytokines. Il faut alors expliquer comment le transwell inhibe l'interaction Treg/neutrophiles alors que celle-ci est contrôlée par des cytokines. Notre hypothèse est qu'un contact primaire entre neutrophiles et Treg est nécessaire pour induire une production cytokinique servant comme second messenger dans les effets observés. Ceci est conforté par le fait que les concentrations en cytokines IL-6, MiP2 et IL-17 sont plus importantes suite à l'interaction Treg/neutrophiles et que cette induction est inhibée par le transwell. Il est probable que l'interaction par contact favorise la signalisation cytokinique par la libération, localement, de faibles quantités de cytokines. La concentration de ces cytokines au point de contact permet leurs effets même à de très faibles niveaux de production. Nous n'avons pas réussi à bloquer cette interaction, peut être parce que nous n'avons pas ciblé les bons couples de molécules, ou peut être que l'interaction Treg/neutrophiles fait intervenir plusieurs partenaires redondants. Dans ce cas, il faudrait tenter de bloquer plusieurs couples moléculaires à la fois, ce qui n'a pas été testé dans cette étude.

## Régulation de l'interaction Treg/neutrophiles

Il est important de noter que tous les effets liés à la coculture chez la souris ne sont observables que si les deux populations cellulaires sont activées, les Treg par leur TCR avec  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 et les PMN via le TLR4 avec le LPS. Cela nous donne une indication cruciale quant au mode de régulation de l'interaction Treg/neutrophiles. Ainsi, les neutrophiles activés sont incapables d'influencer le maintien ou l'activation d'un Treg non activé. Si on se place dans un processus inflammatoire, seul les Treg activés par cette inflammation seront affectés par les neutrophiles. L'interaction entre Treg et neutrophiles est donc restreinte aux Treg activés et à pour conséquence d'inverser le comportement des neutrophiles envers les autres lymphocytes, de pro-inflammatoire à suppresseur. Nous proposons que cette coopération soit importante dans la fine régulation de la balance immunitaire entre signaux proinflammatoires et régulateurs. Le LPS n'est pas la seule molécule

pouvant activer les neutrophiles, d'autres ligands de TLR, le G-MCSF ou le TNF- $\alpha$  le peuvent aussi. Il serait intéressant de tester si ces molécules sont aussi capables de favoriser l'interaction Treg/neutrophiles.

Nous avons aussi remarqué que, bien qu'absolument nécessaire, des stimulations très faibles du TCR des Treg étaient suffisantes pour induire les effets de coculture. La stimulation classique des Treg *in vitro* comprend 2 $\mu$ g/ml ou plus d' $\alpha$ CD3 et d' $\alpha$ CD28 absorbé sur une plaque de culture (Park et al., 2019), ou des concentrations bien plus élevées d'anticorps solubles (5 $\mu$ g/ml d'  $\alpha$ CD3 et 2 $\mu$ g/ml d' $\alpha$ CD28). Pour l'interaction Treg/neutrophiles, 0,5 $\mu$ g/ml d'anticorps solubles permettent d'obtenir un effet optimal, si bien que stimuler plus fortement le TCR n'augmente pas les effets de la coculture. Nous sommes donc dans des conditions de faible stimulation du TCR. De plus, les effets des neutrophiles sur les Treg sont les plus importants à 72h de culture. Les neutrophiles n'influencent pas le phénotype des Treg *ex-vivo*. Il faut attendre une perte du phénotype régulateur des T, pour observer le maintien apporté par les neutrophiles. Ainsi, nous pensons que l'importance de l'interaction Treg/neutrophiles se joue dans un environnement restrictif pour les Treg, où le contexte inflammatoire défavorise le maintien de leur phénotype. Gao *et al.* nous donnent un indice de l'importance de ce phénomène *in vivo*. Les auteurs montrent que dans un modèle murin de la maladie de Sjögren, la déplétion totale en neutrophiles entraîne une augmentation des populations T effectrices associée à une diminution de la population de Treg et une aggravation de la pathologie (Gao et al., 2015). A la lumière de nos résultats nous pouvons nous demander si cette chute du maintien de la population Treg en absence de neutrophiles peut être due à la rupture de l'interaction Treg/neutrophiles. Il serait possible de confirmer et d'étudier plus précisément le devenir de la population Treg dans ce genre de modèles murin présentant une délétion en neutrophiles. Le moyen le plus classique pour l'élimination de la population de neutrophiles chez la souris, est l'utilisation d'un anticorps anti-Ly6G comme utilisé par Gao *et al.* Ce genre de modèle pourrait nous fournir des informations sur le rôle de l'interaction Treg/neutrophiles *in vivo*. Pour répondre à cela chez l'homme il serait aussi intéressant d'étudier la population de Treg dans des pathologies associées à un défaut majeur des neutrophiles comme les neutropénies congénitales, cycliques ou liées à l'X (Skokowa et al., 2017). Un exemple est la granulomatose septique chronique où les neutrophiles présentent plusieurs défauts fonctionnels liés à une mutation de l'enzyme NOX.

Chez l'homme nous avons observé que les neutrophiles ne nécessitent pas d'activation *in vitro* par le LPS pour influencer le phénotype des Treg. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les neutrophiles humains

sont pré-activés dans le sang et qu'ils ne nécessitent alors pas de réactivation *in vitro*. Cette différence avec les neutrophiles de souris peut s'expliquer par l'environnement. En effet, les souris de laboratoire vivent en animalerie dans un espace confiné et contrôlé ce qui les expose très faiblement aux pathogènes. A l'inverse, l'homme est largement exposé à ces agents pathogènes qui circulent dans l'air ou la nourriture. Ceci nous expose à de nombreuses infections, bien souvent asymptomatiques car rapidement éliminées par le système immunitaire. Il est envisageable que le système immunitaire fortement sollicité de l'homme présente une activation basale des ses cellules circulantes plus élevée que celles des souris de laboratoire, expliquant la pré-activation de nos neutrophiles. Les différences observées entre les cocultures humaines et murines peuvent aussi être expliquées par la provenance des neutrophiles. En effet, dans nos expériences chez la souris, les neutrophiles proviennent de la moelle osseuse alors que ceux de l'homme proviennent du sang. Il est plus difficile chez la souris de récupérer les neutrophiles du sang où ils sont plus faiblement représentés que chez l'homme. Ainsi, récupérer les neutrophiles de la moelle osseuse permettrait de sacrifier moins de souris que si nous aurions dû les purifier du sang. Nous pouvons cependant nous demander si les neutrophiles de la moelle osseuse et ceux du sang présentent des activités différentes. Il est probable que les neutrophiles de la moelle concentrent des populations immatures, puisque ce compartiment est le lieu de leur maturation (figure 1). Pour éviter ce biais, nous avons pré-incubé des neutrophiles murins avec du G-CSF pour induire la maturation de potentielles populations immatures avant de les placer en coculture avec les Treg. Les neutrophiles de la moelle osseuse traités par le G-CSF se comportent de façon identique aux neutrophiles non traités, suggérant qu'il n'y a pas de défaut de maturation des neutrophiles isolés de la moelle osseuse. De plus, nous avons observé par microscopie que les neutrophiles isolés de la moelle osseuse présentent majoritairement un noyau multilobé, caractérisant un stade de maturation avancé. Dans l'idéal, il faudrait comparer les effets de la coculture Treg/neutrophiles du sang et Treg/neutrophiles de la moelle osseuse pour une même souris enfin de déterminer l'importance de la compartimentation des neutrophiles dans leur rôle de maintien du phénotype des Treg. Hormis cette différence, l'interaction Treg/neutrophiles est tout à fait comparable entre la souris et l'homme, ce qui nous permet de valider le modèle murin pour cette étude. Cela nous indique aussi que la coopération entre ces deux cellules est un phénomène conservé.

## Place de l'interaction Treg/neutrophiles dans la PR

La PR est une pathologie auto-immune, inflammatoire et chronique. Elle présente des atteintes importantes au niveau des articulations mais aussi en systémique. Les neutrophiles jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et le maintien du processus inflammatoire. En parallèle, les Treg ont pour rôle de contrôler tout phénomène inflammatoire. Cependant, leur fonction est altérée dans la PR car l'inflammation n'est pas contrôlée et entraîne une destruction du cartilage puis de l'os. Comprendre pourquoi les Treg sont impuissants dans ce contexte permettrait de mettre en évidence des mécanismes impliqués dans la mise en place et le maintien de la PR et de suggérer de nouvelles cibles thérapeutiques. De part leur rôle respectif dans la pathologie, nous avons choisi d'étudier l'interaction Treg/neutrophiles chez des patients PR. Les neutrophiles de patients PR sont toujours capables d'induire FoxP3 ou CD25 sur les Treg autologues. En revanche nous montrons que l'expression de CTLA-4 sur les Treg de patients n'est pas augmentée en présence de neutrophiles, alors que chez les donneurs sains cette expression est fortement induite par la coculture. Ainsi, en coculture après activation, les Treg de patients expriment moins fortement CTLA-4, une molécule importante dans leur activité suppressive. Il a été montré que le niveau d'expression de CTLA-4 des Treg chez les patients est, de base, inférieur à celui des Treg de donneurs sains. En effet, Flores-Borka *et al.* ont publié que ce défaut d'expression de CTLA-4 sur les Treg de patients PR été associé à un défaut de la capacité des Treg à inhiber la production cytokinique des Teff (Flores-Borja et al., 2008). Chez certains patients atteints de PR, la protéine de fusion CTLA-4-Ig (abatacept) est un traitement efficace (Schiff et al., 2014), ce qui démontre l'importance de la signalisation via le CTLA-4 dans cette pathologie. Au vu des résultats de nos cocultures chez les patients, nous proposons qu'une partie du défaut d'expression de CTLA-4 des Treg chez les patients soit due à une rupture de l'interaction Treg/neutrophiles. Nous ne pouvons pas encore déterminer si ce sont les neutrophiles qui ont perdu la capacité à induire CTLA-4 sur les Treg ou si ce sont les Treg qui deviennent insensibles aux neutrophiles, mais nous pouvons affirmer que le contexte particulier de la PR altère l'interaction entre ces cellules. Ceci pourrait en partie expliquer le déficit fonctionnel des Treg dans la PR.

Il existe plusieurs biothérapies utilisables chez les patients PR. Ainsi, les patients ne répondant pas au méthotrexate se voient prescrire des CTLA-4-Ig, des  $\alpha$ CD20 ou des inhibiteurs du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 ou de la voie de signalisation JAK/STAT. Ces thérapies sont efficaces chez certains patients. Il pourrait être intéressant d'étudier le devenir de l'interaction Treg/neutrophiles chez ces patients répondeurs. Pour avoir les résultats les



plus convainquant possible, il faudrait effectuer une coculture Treg/neutrophiles chez des patients sans biothérapie, puis renouveler l'expérience 3 mois après le début d'une biothérapie afin de pouvoir observer un effet sur l'interaction Treg/neutrophils. Cette étude longitudinale serait composée d'autant de groupes qu'il y a de biothérapies administrables aux patients et devrait donc rassembler beaucoup d'échantillons afin d'obtenir des données interprétables. Les résultats obtenus nous donneraient des indications quant aux mécanismes pouvant influencer l'interaction Treg/neutrophiles *in vivo* chez l'homme. Nos données préliminaires indiquent que, en effet, un patient répondeur présente une restauration de la coopération Treg/neutrophiles suite à un traitement par l'adalimumab. Ces données doivent cependant être confirmée et élargies à d'autres thérapies ciblées.

Afin de rendre l'interaction possible, les Treg et les neutrophiles doivent être co-localisés dans le même compartiment. Dans le contexte de la PR, il existe plusieurs possibilités pour cela. De part leur fonction promotrice de l'inflammation, les neutrophiles représentent la grande majorité des cellules immunitaires infiltrées dans les articulations des patients (60 à 90% des cellules). De même, afin de tenter de réguler l'inflammation mise en place, les Treg sont aussi retrouvés dans les articulations des patients en grand nombre (10-20% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>). De part la forte concentration cellulaire dans les articulations de patients, le liquide synovial et le tissu synovial constituent des compartiments privilégiés pour favoriser l'interaction Treg/neutrophiles.

Un autre lieu majeur d'interactions leucocytaires se situe dans les organes lymphoïdes secondaires. De par leur structure interne et leur localisation au niveau des embranchements de la circulation sanguine et lymphatique, les organes lymphoïdes secondaires sont conçus pour faciliter les interactions entre les cellules du système immunitaire. Il a été montré que les neutrophiles ont la capacité de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires (Abadie, 2005). Ces cellules pourraient avoir pour fonction de moduler la réponse T, notamment par la présentation d'antigènes, la production de cytokines polarisantes (Matsushima et al., 2013) ou l'expression de PD-L1 (Castell et al., 2019) chez la souris comme chez l'homme (Oehler et al., 1998). Les Treg quant à eux, participent à l'inhibition de la réponse T, notamment en modulant l'interaction entre les DC et les Teff (figure 6). Pour cela, les Treg se localisent dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires. Compte tenu de ces observations, nous supposons qu'en condition d'activation du système immunitaire, les organes lymphoïdes secondaires constituent un des lieux probables de l'interaction Treg/neutrophiles.

Enfin, la majorité des leucocytes circulent dans le sang. Etant donné que dans nos expériences *in vitro* chez l'homme nos cellules proviennent de ce compartiment, nous savons que les neutrophiles et les Treg qui y affluent ont la possibilité d'interagir entre eux. Cependant, la pression sanguine et l'environnement liquide ne favorisent pas les interactions cellulaires. De plus, bien que les neutrophiles soient largement retrouvés dans le sang, ce n'est pas le cas des Treg qui représentent 0,1 à 0,8% des PBMC. Il faut ajouter à cela la taille du système circulatoire et sa répartition à travers tout l'organisme. Pour ces raisons, nous pensons que la circulation sanguine constitue un compartiment probable mais non optimal pour l'interaction Treg/neutrophiles.

Ainsi, le site inflammatoire et les organes lymphoïdes secondaires constituent les compartiments les plus probables d'interaction entre Treg et neutrophiles dans un contexte de PR. Il est à noter que ce raisonnement est aussi valable pour d'autres contextes inflammatoires avec pour acteurs les neutrophiles et les Treg.

## Conclusion

Le but de ce travail de thèse était de caractériser l'interaction encore inconnue entre les neutrophiles et les Treg. Nous avons étudié les conséquences phénotypiques et fonctionnelles de cette interaction par des cocultures *in vitro* de cellules purifiées provenant de souris ou de prélèvements sanguins humains. Au regard du rôle respectif des neutrophiles et des Treg dans la physiopathologie de la PR, nous avons étudié le devenir de leur interaction dans ce contexte inflammatoire auto-immun grâce à des prélèvements sanguins de patients.

Nous avons montré, pour la première fois, qu'une coopération existe entre neutrophiles et Treg pour promouvoir la régulation de la réponse immune. En coculture, les Treg maintiennent plus efficacement leur phénotype régulateur représenté par l'expression de FoxP3, CTLA-4 ou CD25. Parallèlement, les neutrophiles acquièrent un phénotype immuno-modulateur par l'expression de PDL-1 et CD39. Chez la souris, la production cytokinique est accentuée en coculture en particulier pour l'IL-6, MiP2 ou l'IL-17. De façon importante, nos études fonctionnelles chez la souris indiquent que les Treg provenant de coculture avec les neutrophiles maintiennent des capacités suppressives supérieures comparés aux Treg n'ayant pas interagi avec les neutrophiles. De plus, les neutrophiles eux mêmes acquièrent des propriétés régulatrices après leur interaction avec les Treg. Ceci fait que la coopération entre Treg et neutrophiles génère un environnement fortement

immunosuppresseur. Lors de l'étude des mécanismes impliqués dans le dialogue entre ces cellules, nous avons mis en évidence la nécessité d'un contact direct entre les cellules et une dépendance des Treg à la stimulation de leur TCR. Comme messager secondaire, nous avons aussi observé une implication partielle de la voie de signalisation JAK/STAT. Nous proposons que l'interaction entre Treg et neutrophiles soit importante pour le bon contrôle de l'inflammation. Cette hypothèse est confortée par nos résultats chez les patients atteints de PR qui prouvent une rupture de la coopération entre Treg et neutrophiles dans ce contexte auto-immun. Cette rupture se traduit par un défaut d'induction de la molécule régulatrice CTLA-4 sur les Treg en présence neutrophiles, chez ces patients. De surcroît, nos données préliminaires provenant d'une étude longitudinale de patients atteints de PR laissent supposer qu'une rémission de la pathologie, favorisée par un traitement anti-TNF- $\alpha$ , restaure la capacité des neutrophiles à induire le CTLA-4 sur les Treg. Le comportement de ce couple cellulaire est donc étroitement lié au contexte inflammatoire de la PR mais sa manipulation nécessite une caractérisation approfondie des mécanismes moléculaires qui ont été présentés dans ce travail. Nous proposons que l'interaction entre Treg et neutrophiles, nouvellement caractérisée dans cette étude, puisse constituer une cible thérapeutique innovante dans la PR.

# Références

Abadie, V. (2005). Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 106, 1843–1850.

Abi Abdallah, D.S., Egan, C.E., Butcher, B.A., and Denkers, E.Y. (2011). Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int. Immunol.* 23, 317–326.

Adrover, J.M., del Fresno, C., Crainiciuc, G., Cuartero, M.I., Casanova-Acebes, M., Weiss, L.A., Huerga-Encabo, H., Silvestre-Roig, C., Rossaint, J., Cossío, I., et al. (2019). A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity* 50, 390–402.e10.

Aiuti, A., Tavian, M., Cipponi, A., Ficara, F., Hoxie, J., Peault, B., and Bordignon, C. (1999). Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lymphohematopoietic progenitors. *Eur J Immunol* 29, 9.

Akkaya, B., Oya, Y., Akkaya, M., Al Souz, J., Holstein, A.H., Kamenyeva, O., Kabat, J., Matsumura, R., Dorward, D.W., Glass, D.D., et al. (2019). Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nat. Immunol.* 20, 218–231.

Aletaha, D., Nell, V.P., Stamm, T., Uffmann, M., Pflugbeil, S., Machold, K., and Smolen, J.S. (2005). Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res. Ther.* 7, R796.

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

Al-Khafaji, A.B., Tohme, S., Yazdani, H.O., Miller, D., Huang, H., and Tsung, A. (2016). Superoxide induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR-4 and NOX-Dependent Mechanism. *Mol. Med.* 22, 621–631.

Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat. Immunol.* 4, 168–174.

Almeida, A.R.M., Zaragoza, B., and Freitas, A.A. (2006). Indexation as a Novel Mechanism of Lymphocyte Homeostasis: The Number of CD4+CD25+ Regulatory T Cells Is Indexed to the Number of IL-2-Producing Cells. *J. Immunol.* 177, 192–200.

Anderson, M.S. (2002). Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298, 1395–1401.

Anderson, K.E., Chessa, T.A.M., Davidson, K., Henderson, R.B., Walker, S., Tolmachova, T., Gryns, K., Rausch, O., Seabra, M.C., Tybulewicz, V.L.J., et al. (2010). PtdIns3P and Rac direct the assembly of the NADPH oxidase on a novel, pre-phagosomal compartment during FcR-mediated phagocytosis in primary mouse neutrophils. *Blood* 116, 4978–4989.

Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O’Shea, J.J., and Shevach, E.M. (2008). CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- $\beta$ -dependent manner. *J. Exp. Med.* 205, 1975–1981.

Assi, L.K., Wong, S.H., Ludwig, A., Raza, K., Gordon, C., Salmon, M., Lord, J.M., and Scheel-Toellner, D. (2007). Tumor necrosis factor  $\alpha$  activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* 56, 1776–1786.

Atibalentja, D.F., Byersdorfer, C.A., and Unanue, E.R. (2009). Thymus-Blood Protein Interactions Are Highly Effective in Negative Selection and Regulatory T Cell Induction. *J. Immunol.* 183, 7909–7918.

- Atkinson, S.M., Usher, P.A., Kvist, P.H., Markholst, H., Haase, C., and Nansen, A. (2012). Establishment and characterization of a sustained delayed-type hypersensitivity model with arthritic manifestations in C57BL/6J mice. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R134.
- Bagavant, H., and Tung, K.S.K. (2005). Failure of CD25+ T Cells from Lupus-Prone Mice to Suppress Lupus Glomerulonephritis and Sialoadenitis. *J. Immunol.* *175*, 944–950.
- Bank, U., Reinhold, D., Schneemilch, C., Kunz, D., Synowitz, H.-J., and Ansorge, S. (1999). Selective Proteolytic Cleavage of IL-2 Receptor and IL-6 Receptor Ligand Binding Chains by Neutrophil-Derived Serine Proteases at Foci of Inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.* Vol 19, NO. 11.
- Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., Horejs-Hoeck, J., Kaupper, T., and Roncarolo, M.-G. (2006). Rapamycin Promotes Expansion of Functional CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells of Both Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients. *J. Immunol.* *177*, 8338–8347.
- Beauvillain, C., Delneste, Y., Scotet, M., Peres, A., Gascan, H., Guermonprez, P., Barnaba, V., and Jeannin, P. (2007). Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* *110*, 2965–2973.
- Bebo, B.F., Fyfe-Johnson, A., Adlard, K., Beam, A.G., Vandenbark, A.A., and Offner, H. (2001). Low-Dose Estrogen Therapy Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Two Different Inbred Mouse Strains. *J. Immunol.* *166*, 2080–2089.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* *27*, 20–21.
- Beriou, G., Costantino, C.M., Ashley, C.W., Yang, L., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., and Hafler, D.A. (2009). IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* *113*, 4240–4249.
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* *200*, 79–87.
- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., and Seed, B. (1989). Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1: An Inducible Receptor for Neutrophils. *Science* *7*.
- Bidkar, M., Vassallo, R., Luckey, D., Smart, M., Mouapi, K., and Taneja, V. (2016). Cigarette Smoke Induces Immune Responses to Vimentin in both, Arthritis-Susceptible and -Resistant Humanized Mice. *PLOS ONE* *11*, e0162341.
- BIRAC Consortium, YEAR Consortium, Stahl, E.A., Raychaudhuri, S., Remmers, E.F., Xie, G., Eyre, S., Thomson, B.P., Li, Y., Kurreeman, F.A.S., et al. (2010). Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat. Genet.* *42*, 508–514.
- Bjerregaard, M.D. (2003). The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood* *101*, 4322–4332.
- Blüml, S., Bonelli, M., Niederreiter, B., Puchner, A., Mayr, G., Hayer, S., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., Smolen, J., and Redlich, K. (2011). Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* *63*, 1281–1288.
- Boissier, M.C., Feng, X.Z., Carlioz, A., Roudier, R., and Fournier, C. (1987). Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *46*, 691–700.
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Heßling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., et al. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1303–1310.

Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33, 657–670.

Borregaard, N., Sehested, M., Nielsen, B.S., and Sengel, H. (1995). Biosynthesis of Granule Proteins in Normal Human Bone Marrow Cells. Gelatinase Is a Marker of Terminal Neutrophil Differentiation. *Blood* 85, 7.

Bradfield, P.F., Amft, N., Vernon-Wilson, E., Exley, A.E., Parsonage, G., Rainger, G.E., Nash, G.B., Thomas, A.M.C., Simmons, D.L., Salmon, M., et al. (2003). Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 48, 2472–2482.

Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303, 1532–1535.

Brouwer, N., Dolman, K.M., van Houdt, M., Sta, M., Roos, D., and Kuijpers, T.W. (2008). Mannose-Binding Lectin (MBL) Facilitates Opsonophagocytosis of Yeasts but Not of Bacteria despite MBL Binding. *J. Immunol.* 180, 4124–4132.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68–73.

Bruynesteyn, K. (2004). Radiography as primary outcome in rheumatoid arthritis: acceptable sample sizes for trials with 3 months' follow up. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1413–1418.

Buono, M., Facchini, R., Matsuoka, S., Thongjuea, S., Waithe, D., Luis, T.C., Giustacchini, A., Besmer, P., Mead, A.J., Jacobsen, S.E.W., et al. (2016). A dynamic niche provides Kit ligand in a stage-specific manner to the earliest thymocyte progenitors. *Nat. Cell Biol.* 18, 157–167.

Burmester, G.R., Mariette, X., Montecucco, C., Monteagudo-Saez, I., Malaise, M., Tzioufas, A.G., Bijlsma, J.W.J., Unnebrink, K., Kary, S., Kupper, H., et al. (2007). Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 732–739.

Campbell, I.K., Rich, M.J., Bischof, R.J., Dunn, R., Grail, D., and Hamilton, J.A. (1998). Protection from Collagen-Induced Arthritis in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Deficient Mice. *J. Immunol.*

Campbell, J.J., Pan, J., and Butcher, E.C. (1999). Cutting Edge: Developmental Switches in Chemokine Responses During T Cell Maturation. 6.

Cao, D., Vollenhoven, R. van, Klareskog, L., Trollmo, C., and Malmström, V. (2004). CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.* 6, R335.

Caron, E. (1998). Identification of Two Distinct Mechanisms of Phagocytosis Controlled by Different Rho GTPases. *Science* 282, 1717–1721.

Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Munoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R.A., and Mauri, C. (2011). Mice Lacking Endogenous IL-10-Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 186, 5569–5579.

Casanova-Acebes, M., Nicolás-Ávila, J.A., Li, J.L., García-Silva, S., Balachander, A., Rubio-Ponce, A., Weiss, L.A., Adrover, J.M., Burrows, K., A-González, N., et al. (2018). Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. *J. Exp. Med.* 215, 2778–2795.

Castell, S.D., Harman, M.F., Morón, G., Maletto, B.A., and Pistoiresi-Palencia, M.C. (2019). Neutrophils Which Migrate to Lymph Nodes Modulate CD4+ T Cell Response by a PD-L1 Dependent Mechanism. *Front. Immunol.* 10, 105.

- Chakravarti, A., Raquil, M.-A., Tessier, P., and Poubelle, P.E. (2009). Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* *114*, 1633–1644.
- Chang, H.-H., Dwivedi, N., Nicholas, A.P., and Ho, I.-C. (2015). The W620 Polymorphism in PTPN22 Disrupts Its Interaction With Peptidylarginine Deiminase Type 4 and Enhances Citrullination and NETosis: PTPN22 INHIBITS CITRULLINATION. *Arthritis Rheumatol.* *67*, 2323–2334.
- Chang, H.-H., Liu, G.-Y., Dwivedi, N., Sun, B., Okamoto, Y., Kinslow, J.D., Deane, K.D., Demoruelle, M.K., Norris, J.M., Thompson, P.R., et al. (2016). A molecular signature of preclinical rheumatoid arthritis triggered by dysregulated PTPN22. *JCI Insight* *1*.
- Chantry, D., Romagnani, P., Raport, C.J., Wood, C.L., Epp, A., Romagnani, S., and Gray, P.W. (1999). Macrophage-Derived Chemokine Is Localized to Thymic Medullary Epithelial Cells and Is a Chemoattractant for CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>low</sup> Thymocytes. *Blood* *94*, 10.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells Control TH17 Responses in a Stat3-Dependent Manner. *Science* *326*, 986–991.
- Chauvin, N., and Doria, A. (2017). Ultrasound imaging of synovial inflammation in juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Radiol* *47*.
- Chavakis, T., Keiper, T., Matz-Westphal, R., Hersemeyer, K., Sachs, U.J., Nawroth, P.P., Preissner, K.T., and Santoso, S. (2004). The Junctional Adhesion Molecule-C Promotes Neutrophil Transendothelial Migration *in Vitro* and *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* *279*, 55602–55608.
- Chen, N.-J., Mirtsos, C., Suh, D., Lu, Y.-C., Lin, W.-J., McKerlie, C., Lee, T., Baribault, H., Tian, H., and Yeh, W.-C. (2007). C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature* *446*, 203–207.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Naive T Cells to CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing *Foxp3* and *Bcl-6* suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* *17*, 983–988.
- Clancy, R.M., Rediske, J., Tang, X., Nijher, N., Frenkel, S., Philips, M., and Abramson, S.B. (1997). Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A/focal adhesion kinase signaling complex. *J. Clin. Invest.* *100*, 1789–1796.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* *13*, 463–469.
- Coffelt, S.B., Wellenstein, M.D., and de Visser, K.E. (2016). Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 431–446.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., and Sozzani, S. (1992). Modulation of Granulocyte Survival and Programmed Cell Death by Cytokines and Bacterial Products. *Blood* *80*, 10.
- Contis, A., Mitrovic, S., Lavie, J., Douchet, I., Lazaro, E., Truchetet, M.-E., Goizet, C., Contin-Bordes, C., Schaefferbeke, T., Blanco, P., et al. (2017). Neutrophil-derived mitochondrial DNA promotes receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B and its ligand signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* *56*, 1200–1205.



Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A., and Mosedale, B. (1980). Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283, 666–668.

Cowland, J.B., and Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* 273, 11–28.

Cribbs, A.P., Kennedy, A., Penn, H., Read, J.E., Amjadi, P., Green, P., Syed, K., Manka, S.W., Brennan, F.M., Gregory, B., et al. (2014). Treg Cell Function in Rheumatoid Arthritis Is Compromised by CTLA-4 Promoter Methylation Resulting in a Failure to Activate the Indoleamine 2,3-Dioxygenase Pathway: Defective Treg Cell Function in RA and the IDO Pathway. *Arthritis Rheumatol.* 66, 2344–2354.

Cross, A. (2006). Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *J. Leukoc. Biol.* 80, 521–528.

Cross, A., Bucknall, R.C., Cassatella, M.A., Edwards, S.W., and Moots, R.J. (2003). Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis: Inducible Expression of Class II MHC in Inflammatory Neutrophils. *Arthritis Rheum.* 48, 2796–2806.

Crotty, S. (2019). T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. *Immunity.* 50 1132-1148

Dahl, R., Walsh, J.C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S.R., Singh, H., and Simon, M.C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP $\alpha$  ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* 4, 1029–1036.

Dancey, J.T., Deubelbeiss, K.A., Harker, L.A., and Finch, C.A. (1976). Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.* 58, 705–715.

Davey, M.S., Lin, C.-Y., Roberts, G.W., Heuston, S., Brown, A.C., Chess, J.A., Toleman, M.A., Gahan, C.G.M., Hill, C., Parish, T., et al. (2011). Human Neutrophil Clearance of Bacterial Pathogens Triggers Anti-Microbial  $\gamma\delta$  T Cell Responses in Early Infection. *PLoS Pathog.* 7, e1002040.

Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- $\beta$ -Mediated Induction of Foxp3+ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* 178, 4022–4026.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204, 1257–1265.

Denny, M.F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S.G., Anderson, M., Sandy, A.R., McCune, W.J., and Kaplan, M.J. (2010). A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *J. Immunol.* 184, 3284–3297.

Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., and Rothstein, D.M. (2011). Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3645–3656.

Dixon, G., Elks, P.M., Loynes, C.A., Whyte, M.K.B., and Renshaw, S.A. (2012). A Method for the *In Vivo* Measurement of Zebrafish Tissue Neutrophil Lifespan. *ISRN Hematol.* 2012, 1–6.

Duffy, D., Perrin, H., Abadie, V., Benhabiles, N., Boissonnas, A., Liard, C., Descours, B., Reboulleau, D., Bonduelle, O., Verrier, B., et al. (2012). Neutrophils Transport Antigen from the Dermis to the Bone Marrow, Initiating a Source of Memory CD8+ T Cells. *Immunity* 37, 917–929.

DuPage, M., Chopra, G., Quiros, J., Rosenthal, W.L., Morar, M.M., Holohan, D., Zhang, R., Turka, L., Marson, A., and Bluestone, J.A. (2015). The Chromatin-Modifying Enzyme Ezh2 Is Critical for the Maintenance of Regulatory T Cell Identity after Activation. *Immunity* 42, 227–238.

Edmonds, S.E., Winyard, P.G., Guo, R., Kidd, B., Merry, P., Langrish-Smith, A., Hansen, C., Ramm, S., and Blake, D.R. (1997). Putative analgesic activity of repeated oral doses of vitamin E in the treatment of rheumatoid arthritis. Results of a prospective placebo controlled double blind trial. *Ann. Rheum. Dis.* 56, 649–655.

Edwards, J.C.W., Szechinski, J., Emery, P., and Shaw, T. (2004). Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 10.

Eggleton, P., Wang, L., Penhallow, J., Crawford, N., and Brown, K.A. (1995). Differences in oxidative response of subpopulations of neutrophils from healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 54, 916–923.

Engler, A., Niederer, F., Klein, K., Gay, R.E., Kyburz, D., Camici, G.G., Gay, S., and Ospelt, C. (2014). SIRT6 regulates the cigarette smoke-induced signalling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J. Mol. Med.* 92, 757–767.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 1206–1212.

Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C., and Bozzoni, I. (2005). A Minicircuitry Comprised of MicroRNA-223 and Transcription Factors NFI-A and C/EBP $\alpha$  Regulates Human Granulopoiesis. *Cell* 123, 819–831.

Fehling, H.J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., and von Boehmer, H. (1995). Crucial role of the pre-T-cell receptor  $\alpha$  gene in development of  $\alpha\beta$  but not  $\gamma\delta$  T cells. *Nature* 375, 795–798.

Filer, A., Parsonage, G., Smith, E., Osborne, C., Thomas, A.M.C., Curnow, S.J., Rainger, G.E., Raza, K., Nash, G.B., Lord, J., et al. (2006). Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: Site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils. *Arthritis Rheum.* 54, 2096–2108.

Flores-Borja, F., Jury, E.C., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2008). Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19396–19401.

Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell* 99, 23–33.

Foxman, E.F., Campbell, J.J., and Butcher, E.C. (1997). Multistep Navigation and the Combinatorial Control of Leukocyte Chemotaxis. *J. Cell Biol.* 139, 1349–1360.

Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206, 3015–3029.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.

Friedline, R.H., Brown, D.S., Nguyen, H., Kornfeld, H., Lee, J., Zhang, Y., Appleby, M., Der, S.D., Kang, J., and Chambers, C.A. (2009). CD4<sup>+</sup> regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J. Exp. Med.* 206, 421–434.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241.

Furtado, G.C., de Lafaille, M.A.C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. (2002). Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cell Function. *J. Exp. Med.* 196, 851–857.

- Furze, R.C., and Rankin, S.M. (2008). The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J.* 22, 3111–3119.
- Gabrilovich, D.I., Bronte, V., and Chen, S.-H. (2007). The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 67, 2.
- Galkina, E., Florey, O., Zarbock, A., Smith, B.R.E., Preece, G., Lawrence, M.B., Haskard, D.O., and Ager, A. (2007). T lymphocyte rolling and recruitment into peripheral lymph nodes is regulated by a saturable density of L-selectin (CD62L). *Eur. J. Immunol.* 37, 1243–1253.
- Gao, Y., Min, K., Zhang, Y., Su, J., Greenwood, M., and Gronert, K. (2015). Female-Specific Downregulation of Tissue Polymorphonuclear Neutrophils Drives Impaired Regulatory T Cell and Amplified Effector T Cell Responses in Autoimmune Dry Eye Disease. *J. Immunol.* 195, 3086–3099.
- Geng, S., Zhong, Y., Zhou, X., Zhao, G., Xie, X., Pei, Y., Liu, H., Zhang, H., Shi, Y., and Wang, B. (2017). Induced Regulatory T Cells Superimpose Their Suppressive Capacity with Effector T Cells in Lymph Nodes via Antigen-Specific S1p1-Dependent Egress Blockage. *Front. Immunol.* 8, 663.
- Gery, S. (2004). C/EBP interacts with retinoblastoma and E2F1 during granulopoiesis. *Blood* 103, 828–835.
- Ginzberg, H.H., Cherapanov, V., Dong, Q., Cantin, A., McCulloch, C.A.G., Shannon, P.T., and Downey, G.P. (2001). Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G705–G717.
- van Gisbergen, K.P.J.M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201, 1281–1292.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 150.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J. Immunol.* 174, 1783–1786.
- Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., and Cheers, C. (1994). Mice Lacking Granulocyte Colony-Stimulating Factor Have Chronic Neutropenia, Granulocyte and Macrophage Progenitor Cell Deficiency, and Impaired Neutrophil Mobilization. *Blood* 84, 11.
- Granger, N., and Smith, C.W. (1993). P-Selectin Mediates Spontaneous Leukocyte Rolling In Vivo. *Blood* 10.
- Grassinger, J., Haylock, D.N., Storan, M.J., Haines, G.O., Williams, B., Whitty, G.A., Vinson, A.R., Be, C.L., Li, S., Sorensen, E.S., et al. (2009). Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with  $\alpha 9 \beta 1$  and  $\alpha 4 \beta 1$  integrins. *Blood* 114, 49–59.
- Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H., and Flavell, R.A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF- $\beta$  receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10878–10883.
- Gregersen, P.K., Silver, J., and Winchester, R.J. (1987). The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30, 1205–1213.
- Grigorieva, D.V., Gorudko, I.V., Sokolov, A.V., Kostevich, V.A., Vasilyev, V.B., Cherenkevich, S.N., and Panasenko, O.M. (2016). Myeloperoxidase Stimulates Neutrophil Degranulation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 161, 495–500.

- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity* 21, 589–601.
- Groux, H., O’Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 6.
- Hacbarth, E., and Kajdacsy-Balla, A. (1986). Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* 29, 1334–1342.
- Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607–609.
- Harms Pritchard, G., Hall, A.O., Christian, D.A., Wagage, S., Fang, Q., Muallem, G., John, B., Glatman Zaretsky, A., Dunn, W.G., Perrigoue, J., et al. (2015). Diverse Roles for T-bet in the Effector Responses Required for Resistance to Infection. *J. Immunol.* 194, 1131–1140.
- Harre, U., Georgess, D., Bang, H., Bozec, A., Axmann, R., Ossipova, E., Jakobsson, P.-J., Baum, W., Nimmerjahn, F., Szarka, E., et al. (2012). Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* 122, 1791–1802.
- Heineke, M.H., van der Steen, L.P.E., Korthouwer, R.M., Hage, J.J., Langedijk, J.P.M., Benschop, J.J., Bakema, J.E., Slootstra, J.W., and van Egmond, M. (2017). Peptide mimetics of immunoglobulin A (IgA) and Fc $\alpha$ RI block IgA-induced human neutrophil activation and migration. *Eur. J. Immunol.* 47, 1835–1845.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.
- Henderson, R.B., Lim, L.H.K., Tessier, P.A., Gavins, F.N.E., Mathies, M., Perretti, M., and Hogg, N. (2001). The Use of Lymphocyte Function–associated Antigen (LFA)-1–deficient Mice to Determine the Role of LFA-1, Mac-1, and  $\alpha$ 4 Integrin in the Inflammatory Response of Neutrophils. *J. Exp. Med.* 194, 8.
- Herrath, J., Müller, M., Amoudruz, P., Janson, P., Michaëlsson, J., Larsson, P.T., Trollmo, C., Raghavan, S., and Malmström, V. (2011). The inflammatory milieu in the rheumatic joint reduces regulatory T-cell function. *Eur. J. Immunol.* 41, 2279–2290.
- Hetland, M.L., Ejbjerg, B., Horslev-Petersen, K., Jacobsen, S., Vestergaard, A., Jurik, A.G., Stengaard-Pedersen, K., Junker, P., Lottenburger, T., Hansen, I., et al. (2009). MRI bone oedema is the strongest predictor of subsequent radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Results from a 2-year randomised controlled trial (CIMESTRA). *Ann. Rheum. Dis.* 68, 384–390.
- Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., and Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977–987.
- Hill, J.A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A.M., Bell, D.A., and Cairns, E. (2003). Cutting Edge: The Conversion of Arginine to Citrulline Allows for a High-Affinity Peptide Interaction with the Rheumatoid Arthritis-Associated HLA-DRB1\*0401 MHC Class II Molecule. *J. Immunol.* 171, 538–541.
- Hill, J.A., Bell, D.A., Brintnell, W., Yue, D., Wehrli, B., Jevnikar, A.M., Lee, D.M., Hueber, W., Robinson, W.H., and Cairns, E. (2008). Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J. Exp. Med.* 205, 967–979.
- Himmel, M.E., Crome, S.Q., Ivison, S., Piccirillo, C., Steiner, T.S., and Levings, M.K. (2011). Human CD4+FOXP3+ regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 41, 306–312.

- Hinterberger, M., Aichinger, M., Prazeres da Costa, O., Voehringer, D., Hoffmann, R., and Klein, L. (2010). Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4+ T cell tolerance. *Nat. Immunol.* *11*, 512–519.
- Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Traver, D., Bronson, R.T., Cameron, S., and Orkin, S.H. (2003). Intrinsic Requirement for Zinc Finger Transcription Factor Gfi-1 in Neutrophil Differentiation. *Immunity* *18*, 109–120.
- Hong, C., Kidani, Y., A-Gonzalez, N., Phung, T., Ito, A., Rong, X., Ericson, K., Mikkola, H., Beaven, S.W., Miller, L.S., et al. (2012). Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 337–347.
- Hori, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* *299*, 1057–1061.
- 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*, 5.
- Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* *21*, 503–513.
- Humby, F., Bombardieri, M., Manzo, A., Kelly, S., Blades, M.C., Kirkham, B., Spencer, J., and Pitzalis, C. (2009). Ectopic Lymphoid Structures Support Ongoing Production of Class-Switched Autoantibodies in Rheumatoid Synovium. *PLoS Med.* *6*, e1.
- Huter, E.N., Punkosdy, G.A., Glass, D.D., Cheng, L.I., Ward, J.M., and Shevach, E.M. (2008). TGF- $\beta$ -induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1814–1821.
- Igarashi, H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N., and Kincade, P.W. (2002). Transcription from the RAG1 Locus Marks the Earliest Lymphocyte Progenitors in Bone Marrow. *Immunity* *17*, 117–130.
- Iking-Konert, C. (2005). Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1436–1442.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
- Jack, R.S., Fan, X., Bernheiden, M., Rune, G., Ehlers, M., Weber, A., Kirsch, G., Mentel, R., Füll, B., Freudenberg, M., et al. (1997). Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature* *389*, 742–745.
- Janson, P.C.J., Winerdal, M.E., Marits, P., Thörn, M., Ohlsson, R., and Winqvist, O. (2008). FOXP3 Promoter Demethylation Reveals the Committed Treg Population in Humans. *PLoS ONE* *3*, e1612.
- Janusz, M.J., and Doherty, N.S. (1991). Degradation of cartilage matrix proteoglycan by human neutrophils involves both elastase and cathepsin G. *J. Immunol.* *8*.
- Jaswal, S., Mehta, H.C., Sood, A.K., and Kaur, J. (2003). Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin. Chim. Acta* *338*, 123–129.
- Johnson, M.B., and Criss, A.K. (2013). *Neisseria gonorrhoeae* phagosomes delay fusion with primary granules to enhance bacterial survival inside human neutrophils: Gonococcal survival in neutrophil phagosomes. *Cell. Microbiol.* *15*, 1323–1340.

- Jones, A., Bourque, J., Kuehm, L., Opejin, A., Teague, R.M., Gross, C., Hawiger, D. (2016) Immunomodulatory functions of BTLA and HVEM govern induction of extrathymic regulatory T cells and tolerance by dendritic cells. *Immunity* 45 1066-1077.
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Hohenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2, 301–306.
- Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 482, 395–399.
- Jung, H., Jung, S.M., Rim, Y.A., Park, N., Nam, Y., Lee, J., Park, S.-H., and Ju, J.H. (2017). Arthritic role of *Porphyromonas gingivalis* in collagen-induced arthritis mice. *PLOS ONE* 12, e0188698.
- Karmakar, M., Katsnelson, M.A., Dubyak, G.R., and Pearlman, E. (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP. *Nat. Commun.* 7, 10555.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., and Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10, 4025–4031.
- Keir, M.E., Liang, S.C., Guleria, I., Latchman, Y.E., Qipo, A., Albacker, L.A., Koulmanda, M., Freeman, G.J., Sayegh, M.H., and Sharpe, A.H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 203, 883–895.
- Kennedy, A.D., Willment, J.A., Dorward, D.W., Williams, D.L., Brown, G.D., and DeLeo, F.R. (2007). Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 37, 467–478.
- Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., et al. (2013). NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. *Sci. Transl. Med.* 5, 178ra40-178ra40.
- Kim, C.H., Pelus, L.M., White, J.R., and Broxmeyer, H.E. (1998). Differential Chemotactic Behavior of Developing T Cells in Response to Thymic Chemokines. *Blood* 91, 11.
- Kim, M.-H., Granick, J.L., Kwok, C., Walker, N.J., Borjesson, D.L., Curry, F.-R.E., Miller, L.S., and Simon, S.I. (2011). Neutrophil survival and c-kit+ progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds promote resolution. *Blood* 117, 3343–3352.
- Kim, Y.G., Lee, C.-K., Nah, S.-S., Mun, S.H., Yoo, B., and Moon, H.-B. (2007). Human CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 1046–1052.
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., Kidani, Y., Vandenbon, A., Hirota, K., Kawakami, R., Yasuda, K., Motooka, D., Nakamura, S., Kondo, M., et al. (2017). Guidance of regulatory T cell development by *Satb1*-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* 18, 173–183.
- Klebanoff, S.J. (1968). Myeloperoxidase-Halide-Hydrogen Peroxide. *J. Bacteriol.* 8.
- de Kleijn, S., Langereis, J.D., Leentjens, J., Kox, M., Netea, M.G., Koenderman, L., Ferwerda, G., Pickkers, P., and Hermans, P.W.M. (2013). IFN- $\gamma$ -Stimulated Neutrophils Suppress Lymphocyte Proliferation through Expression of PD-L1. *PLoS ONE* 8, e72249.
- Kleyer, A., Krieter, M., Oliveira, I., Faustini, F., Simon, D., Kaemmerer, N., Cavalcante, A., Tabosa, T., Rech, J., Hueber, A., et al. (2016). High prevalence of tenosynovial inflammation before onset of rheumatoid arthritis and its link to progression to RA—A combined MRI/CT study. *Semin. Arthritis Rheum.* 46, 143–150.

- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* *10*, 595–602.
- Kohler, A., De Filippo, K., Hasenberg, M., van den Brandt, C., Nye, E., Hosking, M.P., Lane, T.E., Mann, L., Ransohoff, R.M., Hauser, A.E., et al. (2011). G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* *117*, 4349–4357.
- Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J.A., and Takayanagi, H. (2013). Pathogenic conversion of Foxp3<sup>+</sup> T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* *20*, 62–68.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* *261*, 1171–1175.
- Kondo, M., Yamaoka, K., Sonomoto, K., Fukuyo, S., Oshita, K., Okada, Y., and Tanaka, Y. (2013). IL-17 Inhibits Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* *8*, e79463.
- Korganow, A.-S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.-L., et al. (1999). From Systemic T Cell Self-Reactivity to Organ-Specific Autoimmune Disease via Immunoglobulins. *Immunity* *10*, 451–461.
- Kouskoff, V., Korganow, A.-S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organ-Specific Disease Provoked by Systemic Autoimmunity. *Cell* *87*, 811–822.
- Kreisel, D., Nava, R.G., Li, W., Zinselmeyer, B.H., Wang, B., Lai, J., Pless, R., Gelman, A.E., Krupnick, A.S., and Miller, M.J. (2010). In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 18073–18078.
- Krishnamoorthy, N., Douda, D.N., Brüggemann, T.R., Ricklefs, I., Duvall, M.G., Abdulnour, R.-E.E., Martinod, K., Tavares, L., Wang, X., Cernadas, M., et al. (2018). Neutrophil cytoplasts induce T<sub>H</sub> 17 differentiation and skew inflammation toward neutrophilia in severe asthma. *Sci. Immunol.* *3*, eaao4747.
- Kuschert, G.S.V., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E.I., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., and Wells, T.N.C. (1999). Glycosaminoglycans Interact Selectively with Chemokines and Modulate Receptor Binding and Cellular Responses. *Biochemistry* *38*, 12959–12968.
- Lam, J., Takeshita, S., Barker, J.E., Kanagawa, O., Ross, F.P., and Teitelbaum, S.L. (2000). TNF- $\alpha$  induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J. Clin. Invest.* *106*, 1481–1488.
- Laslo, P., Spooner, C.J., Warmflash, A., Lancki, D.W., Lee, H.-J., Sciammas, R., Gantner, B.N., Dinner, A.R., and Singh, H. (2006). Multilineage Transcriptional Priming and Determination of Alternate Hematopoietic Cell Fates. *Cell* *126*, 755–766.
- Lebre, M.C., Jongbloed, S.L., Tas, S.W., Smeets, T.J.M., McInnes, I.B., and Tak, P.P. (2008). Rheumatoid Arthritis Synovium Contains Two Subsets of CD83–DC-LAMP– Dendritic Cells with Distinct Cytokine Profiles. *Am. J. Pathol.* *172*, 940–950.
- Lefèvre, S., Knedla, A., Tennie, C., Kampmann, A., Wunrau, C., Dinsler, R., Korb, A., Schnäker, E.-M., Turner, I.H., Robbins, P.D., et al. (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* *15*, 1414–1420.
- Lefrançais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.-P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 1673–1678.

- Lekstrom-Himes, J.A., Dorman, S.E., Kopar, P., Holland, S.M., and Gallin, J.I. (1999). Neutrophil-specific Granule Deficiency Results from a Novel Mutation with Loss of Function of the Transcription Factor CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\epsilon$ . *J. Exp. Med.* *189*, 1847–1852.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal Malefyt, R., and Roncarolo, M.-G. (2001). IFN- and IL-10 Induce the Differentiation of Human Type 1 T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *166*, 5530–5539.
- Ley, K., Gaehtgens, P., Fennie, C., Singer, M.S., Lasky, L.A., and Rosen, S.D. (1991). Lectin-Like Cell Adhesion Molecule 1 Mediates Leukocyte Rolling in Mesenteric Venules In Vivo. *Blood* *4*.
- Li, X., Tian, F., and Wang, F. (2013). Rheumatoid Arthritis-Associated MicroRNA-155 Targets SOCS1 and Upregulates TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in PBMCs. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 23910–23921.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J. Immunol.* *180*, 5916–5926.
- Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping Precursor Movement through the Postnatal Thymus Reveals Specific Microenvironments Supporting Defined Stages of Early Lymphoid Development. *J. Exp. Med.* *194*, 127–134.
- Lio, C.-W.J., and Hsieh, C.-S. (2008). A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* *28*, 100–111.
- Liu, C., Jiang, J., Gao, L., Wang, X., Hu, X., Wu, M., Wu, J., Xu, T., Shi, Q., and Zhang, X. (2015). Soluble PD-1 aggravates progression of collagen-induced arthritis through Th1 and Th17 pathways. *Arthritis Res. Ther.* *17*, 340.
- Liu, G., Ma, H., Qiu, L., Li, L., Cao, Y., Ma, J., and Zhao, Y. (2011). Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells in mice. *Immunol. Cell Biol.* *89*, 130–142.
- Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.-G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S., et al. (2002). Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *J. Immunol.* *169*, 2756–2761.
- Lohoff, M., Mittrucker, H.-W., Pechtl, S., Bischof, S., Sommer, F., Kock, S., Ferrick, D.A., Duncan, G.S., Gessner, A., and Mak, T.W. (2002). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 11808–11812.
- Lu, L.-F., Thai, T.-H., Calado, D.P., Chaudhry, A., Kubo, M., Tanaka, K., Loeb, G.B., Lee, H., Yoshimura, A., Rajewsky, K., et al. (2009). Foxp3-Dependent MicroRNA155 Confers Competitive Fitness to Regulatory T Cells by Targeting SOCS1 Protein. *Immunity* *30*, 80–91.
- Lukácsi, S., Nagy-Baló, Z., Erdei, A., Sándor, N., and Bajtay, Z. (2017). The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes. *Immunol. Lett.* *189*, 64–72.
- Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B.A., Wegner, N., Wait, R., Charles, P., Mikuls, T.R., and Venables, P.J. (2008). Antibodies to citrullinated  $\alpha$ -enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* *58*, 3009–3019.
- Lünemann, J.D., Frey, O., Eidner, T., Baier, M., Roberts, S., Sashihara, J., Volkmer, R., Cohen, J.I., Hein, G., Kamradt, T., et al. (2008). Increased Frequency of EBV-Specific Effector Memory CD8<sup>+</sup> T Cells Correlates with Higher Viral Load in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* *181*, 991–1000.



- Ma, Q., Jones, D., and Springer, T.A. (1999). The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for the Retention of B Lineage and Granulocytic Precursors within the Bone Marrow Microenvironment. *Immunity* *10*, 463–471.
- Malawista, S.E., Van Blaricom, G., and Breitenstein, M.G. (1989). Cryopreservable neutrophil surrogates. Stored cytoplasts from human polymorphonuclear leukocytes retain chemotactic, phagocytic, and microbicidal function. *J. Clin. Invest.* *83*, 728–732.
- Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. (2002). CD4 Regulatory T Cells Prevent Lethal Autoimmunity in IL-2R<sup>α</sup>-Deficient Mice: Implications for the Nonredundant Function of IL-2. *Immunity* *17*, 12.
- Maletto, B.A., Ropolo, A.S., Alignani, D.O., Liscovsky, M.V., Ranocchia, R.P., Moron, V.G., and Pistoiresi-Palencia, M.C. (2006). Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* *108*, 3094–3102.
- Malmberg, K.-J., Arulampalam, V., Petersson, M., Seki, K., Andersson, T., Lenkei, R., Masucci, G., and Pettersson, S. (2001). Inhibition of Activated/Memory (CD45RO+) T Cells by Oxidative Stress Associated with Block of NF-κB Activation. *J. Immunol.* *167*, 8.
- Manavalan, J.S., Rossi, P.C., Vlad, G., Piazza, F., Yarilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., and Suci-Foca, N. (2003). High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl. Immunol.* *11*, 245–258.
- Mankan, A.K., Dau, T., Jenne, D., and Hornung, V. (2012). The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1β processing in neutrophils. *Eur. J. Immunol.* *42*, 710–715.
- Mansour, A., Abou-Ezzi, G., Sitnicka, E., W. Jacobsen, S.E., Wakkach, A., and Blin-Wakkach, C. (2012). Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J. Exp. Med.* *209*, 537–549.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.
- Mao, X., Wu, Y., Diao, H., Hao, J., Tian, G., Jia, Z., Li, Z., Xiong, S., Wu, Z., Wang, P., et al. (2014). Interleukin-6 promotes systemic lupus erythematosus progression with Treg suppression approach in a murine systemic lupus erythematosus model. *Clin. Rheumatol.* *33*, 1585–1593.
- Marchesi, V.T., and Gowans, J.L. (1964). The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *159*, 283–290.
- Marini, O., Costa, S., Bevilacqua, D., Calzetti, F., Tamassia, N., Spina, C., De Sabata, D., Tinazzi, E., Lunardi, C., and Scupoli, M.T. (2017). Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* *129*, 1343–1356.
- Marinova-Mutafchieva, L., Gabay, C., Funa, K., and Williams, R.O. (2006). Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor-β expression in the joint. *Clin. Exp. Immunol.* *146*, 287–293.
- Martin, T.J., and Sims, N.A. (2005). Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol. Med.* *11*, 76–81.
- Mathias, J.R., Perrin, B.J., Liu, T.-X., Kanki, J., Look, A.T., and Huttenlocher, A. (2006). Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 1281–1288.
- Mathur, A.N., Chang, H.-C., Zisoulis, D.G., Stritesky, G.L., Yu, Q., O'Malley, J.T., Kapur, R., Levy, D.E., Kansas, G.S., and Kaplan, M.H. (2007). Stat3 and Stat4 Direct Development of IL-17-Secreting Th Cells. *J. Immunol.* *178*, 4901–4907.

Matsushima, H., Geng, S., Lu, R., Okamoto, T., Yao, Y., Mayuzumi, N., Kotol, P.F., Chojnacki, B.J., Miyazaki, T., Gallo, R.L., et al. (2013). Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* 121, 1677–1689.

McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387–395.

McDonald, J.U., Rosas, M., Brown, G.D., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2012). Differential Dependencies of Monocytes and Neutrophils on Dectin-1, Dectin-2 and Complement for the Recognition of Fungal Particles in Inflammation. *PLoS ONE* 7, e45781.

McKinstry, W.J., Li, C.-L., Rasko, J.E.J., Nicola, N.A., Johnson, G.R., and Metcalf, D. (1997). Cytokine Receptor Expression on Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood* 89, 8.

Menegazzi, R., Decleva, E., and Dri, P. (2012). Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood* 119, 1214–1216.

Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H.J., Waldmann, H., Huehn, J., and Hori, S. (2012). Plasticity of Foxp3<sup>+</sup> T Cells Reflects Promiscuous Foxp3 Expression in Conventional T Cells but Not Reprogramming of Regulatory T Cells. *Immunity* 36, 262–275.

Mohrs, M., Ledermann, B., Köhler, G., Dorfmueller, A., Gessner, A., and Brombacher, F. (1999). Differences Between IL-4- and IL-4 Receptor  $\alpha$ -Deficient Mice in Chronic Leishmaniasis Reveal a Protective Role for IL-13 Receptor Signaling. *J. Immunol.* 162, 7302.

Mombaerts, P., Clarke, A.R., Rudnicki, M.A., Iacomini, J., Itohara, S., Lafaille, J.J., Wang, L., Ichikawa, Y., Jaenisch, R., Hooper, M.L., et al. (1992). Mutations in T-cell antigen receptor genes  $\alpha$  and  $\beta$  block thymocyte development at different stages. *Nature* 360, 225–231.

Morgan, M.E., Flierman, R., van Duivenvoorde, L.M., Witteveen, H.J., van Ewijk, W., van Laar, J.M., de vries, R.R.P., and Toes, R.E.M. (2005). Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* 52, 2212–2221.

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science* 317, 256–260.

Nadkarni, S., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2007). Anti-TNF- $\alpha$  therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- $\beta$ . *J. Exp. Med.* 204, 33–39.

Nadkarni, S., Smith, J., Sferruzzi-Perri, A.N., Ledwozyw, A., Kishore, M., Haas, R., Mauro, C., Williams, D.J., Farsky, S.H.P., Marelli-Berg, F.M., et al. (2016). Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E8415–E8424.

Naegelen, I., Beaume, N., Plançon, S., Schenten, V., Tschirhart, E.J., and Bréchar, S. (2015). Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–15.

Naik, E., and Dixit, V.M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production: Figure 1. *J. Exp. Med.* 208, 417–420.

Nakano, K., Whitaker, J.W., Boyle, D.L., Wang, W., and Firestein, G.S. (2013). DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 110–117.

Nam, J.L., Takase-Minegishi, K., Ramiro, S., Chatzidionysiou, K., Smolen, J.S., van der Heijde, D., Bijlsma, J.W., Burmester, G.R., Dougados, M., Scholte-Voshaar, M., et al. (2017). Efficacy of biological disease-modifying

antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1113–1136.

Nandakumar, K.S., Andrén, M., Martinsson, P., Bajtner, E., Hellström, S., Holmdahl, R., and Kleinau, S. (2003). Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory FcγRIIB. *Eur. J. Immunol.* 33, 2269–2277.

Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen, P., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., Haury, M., Nedospasov, S.A., et al. (2010). Signaling via the MyD88 Adaptor Protein in B Cells Suppresses Protective Immunity during *Salmonella typhimurium* Infection. *Immunity* 33, 777–790.

Nguyen, D.X., and Ehrenstein, M.R. (2016). Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF–TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* jem.20151255.

Nie, H., Zheng, Y., Li, R., Guo, T.B., He, D., Fang, L., Liu, X., Xiao, L., Chen, X., Wan, B., et al. (2013). Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-α in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 19, 322.

Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., and Mitchison, T.J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459, 996–999.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* 11, 141–151.

Nishimura, K., Sugiyama, D., Kogata, Y., Tsuji, G., Nakazawa, T., Kawano, S., Saigo, K., Morinobu, A., Koshiba, M., Kuntz, K.M., et al. (2007). Meta-analysis: Diagnostic Accuracy of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Rheumatoid Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Intern. Med.* 146, 797–808.

Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.

Norment, A.M., Bogatzki, L.Y., Gantner, B.N., and Bevan, M.J. (2000). Murine CCR9, a Chemokine Receptor for Thymus-Expressed Chemokine That Is Up-Regulated Following Pre-TCR Signaling. *J. Immunol.* 164, 639–648.

Oehler, L., Majdic, O., Pickl, W.F., Stöckl, J., Riedl, E., Drach, J., Rappersberger, K., Geissler, K., and Knapp, W. (1998). Neutrophil Granulocyte-committed Cells Can Be Driven to Acquire Dendritic Cell Characteristics. *J. Exp. Med.* 187, 1019–1028.

Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., et al. (2012). T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity* 37, 785–799.

Okada, M., Kobayashi, T., Ito, S., Yokoyama, T., Abe, A., Murasawa, A., and Yoshie, H. (2013). Periodontal Treatment Decreases Levels of Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and Citrulline in Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *J. Periodontol.* 84, e74–e84.

Ollert, M.W., David, K., Bredehorst, R., and Vogel, C.W. (1995). Classical complement pathway activation on nucleated cells. Role of factor H in the control of deposited C3b. *J. Immunol.* 9.

Olson, A.L., Swigris, J.J., Sprunger, D.B., Fischer, A., Fernandez-Perez, E.R., Solomon, J., Murphy, J., Cohen, M., Raghu, G., and Brown, K.K. (2011). Rheumatoid Arthritis–Interstitial Lung Disease–associated Mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 372–378.

Oosting, M., Cheng, S.-C., Bolscher, J.M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T.S., Verschuieren, I.C., Arts, P., Garritsen, A., van Eenennaam, H., Sturm, P., et al. (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E4478–E4484.

Otsuji, M., Kimura, Y., Aoe, T., Okamoto, Y., and Saito, T. (1996). Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3  $\zeta$  chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* *6*.

Ouyang, S., Zeng, Q., Tang, N., Guo, H., Tang, R., Yin, W., Wang, A., Tang, H., Zhou, J., Xie, H., et al. (2019). Akt-1 and Akt-2 Differentially Regulate the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Controlling Proliferation of Thymus-Derived Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *202*, 1441–1452.

Pan, W., Zhou, H.-J., Shen, Y.-J., Wang, Y., Xu, Y.-X., Hu, Y., Jiang, Y.-Y., Yuan, Z.-Y., Ugwu, C.E., and Cao, J.-P. (2013). Surveillance on the Status of Immune Cells after *Echinococcus granulosus* Protoscoleces Infection in Balb/c Mice. *PLoS ONE* *8*, e59746.

Park, Y.-J., Ryu, H., Choi, G., Kim, B.-S., Hwang, E.S., Kim, H.S., and Chung, Y. (2019). IL-27 confers a protumorigenic activity of regulatory T cells via CD39. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201810254.

Patakas, A., Ji, R.-R., Weir, W., Connolly, S.E., Benson, R.A., Nadler, S.G., Brewer, J.M., McInnes, I.B., and Garside, P. (2016). Abatacept Inhibition of T Cell Priming in Mice by Induction of a Unique Transcriptional Profile That Reduces Their Ability to Activate Antigen-Presenting Cells: EFFECT OF ABATACEPT ON T CELLS AND APCs DURING PRIMARY IMMUNE RESPONSES. *Arthritis Rheumatol.* *68*, 627–638.

Paust, S., Lu, L., McCarty, N., and Cantor, H. (2004). Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 10398–10403.

Peach, R., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J., and Linsley, P. (1994). Complementarity determining region 1 (CDRI). and CDR3-malicious regions in CTLA4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J. Exp. Med.* *180*.

Pellmé, S., Mörgelin, M., Tapper, H., Mellqvist, U.-H., Dahlgren, C., and Karlsson, A. (2006). Localization of human neutrophil interleukin-8 (CXCL-8) to organelle(s) distinct from the classical granules and secretory vesicles. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 564–573.

Person, R.E., Li, F.-Q., Duan, Z., Benson, K.F., Wechsler, J., Papadaki, H.A., Eliopoulos, G., Kaufman, C., Bertolone, S.J., Nakamoto, B., et al. (2003). Mutations in proto-oncogene GF11 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat. Genet.* *34*, 308–312.

Pierson, W., Cauwe, B., Policheni, A., Schlenner, S.M., Franckaert, D., Berges, J., Humblet-Baron, S., Schönefeldt, S., Herold, M.J., Hildeman, D., et al. (2013). Antiapoptotic Mcl-1 is critical for the survival and niche-filling capacity of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *14*, 959–965.

Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* *116*, 625–627.

Pillay, J., Kamp, V.M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J.-W., Ulfman, L.H., Leenen, L.P., Pickkers, P., and Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* *122*, 327–336.

Pillay, J., Tak, T., Kamp, V.M., and Koenderman, L. (2013). Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 3813–3827.

Pilsczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H.Y., Surette, M.G., Sugai, M., et al. (2010). A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* *185*, 7413–7425.

Plenge, R.M., Padyukov, L., Remmers, E.F., Purcell, S., Lee, A.T., Karlson, E.W., Wolfe, F., Kastner, D.L., Alfredsson, L., Altshuler, D., et al. (2005). Replication of Putative Candidate-Gene Associations with Rheumatoid Arthritis in >4,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am. J. Hum. Genet.* *77*, 1044–1060.

Pratesi, F., Tommasi, C., Anzilotti, C., Chimenti, D., and Migliorini, P. (2006). Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *54*, 733–741.

Prevo, M.L.L., Van't Hof, M.A., Kuper, H.H., Van Leeuwen, M.A., Van De Putte, L.B.A., and Van Riel, P.L.C.M. (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis: MODIFIED DISEASE ACTIVITY SCORE. *Arthritis Rheum.* *38*, 44–48.

Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., Richmond, A., Graham, G.J., Segerer, S., Nibbs, R.J.B., et al. (2009). The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat. Immunol.* *10*, 101–108.

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2012). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* *13*, 170–180.

Pulikkan, J.A., Dengler, V., Peramangalam, P.S., Peer Zada, A.A., Muller-Tidow, C., Bohlander, S.K., Tenen, D.G., and Behre, G. (2010). Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* *115*, 1768–1778.

Qin, A., Wen, Z., Zhou, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, J., Ren, T., and Xu, L. (2013). MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 252–264.

Ramiro, S., Sepriano, A., Chatzidionysiou, K., Nam, J.L., Smolen, J.S., van der Heijde, D., Dougados, M., van Vollenhoven, R., Bijlsma, J.W., Burmester, G.R., et al. (2017). Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 1101–1136.

Rapp, M., Wintergerst, M.W.M., Kunz, W.G., Vetter, V.K., Knott, M.M.L., Lisowski, D., Haubner, S., Moder, S., Thaler, R., Eiber, S., et al. (2019). CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes. *J. Exp. Med.* *216*, 1170–1181.

Raptopoulou, A.P., Bertias, G., Makrygiannakis, D., Verginis, P., Kritikos, I., Tzardi, M., Klareskog, L., Catrina, A.I., Sidiropoulos, P., and Boumpas, D.T. (2010). The inhibitory pathway PD-1/PD-1 ligands is upregulated in rheumatoid synovium and regulates peripheral T cell responses in human and murine arthritis. *Arthritis Rheum.* n/a-n/a.

Rees, M.D., Hawkins, C.L., and Davies, M.J. (2004). Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. *Biochem. J.* *381*, 175–184.

Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G.M., Bolsover, S., Gabella, G., and Warley, A. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> ux. *Nature* *416*, 7.

Ribon, M., Seninet, S., Mussard, J., Sebbag, M., Clavel, C., Serre, G., Boissier, M.-C., Semerano, L., and Decker, P. (2019). Neutrophil extracellular traps exert both pro- and anti-inflammatory actions in rheumatoid arthritis that are modulated by C1q and LL-37. *J. Autoimmun.* *98*, 122–131.

Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The Small GTP-Binding Protein rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth Factors. *Cell* *70*.

Rivas-Fuentes, S., García-García, E., Nieto-Castañeda, G., and Rosales, C. (2010). Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell. Immunol.* 263, 114–121.

Robb, R.J., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Wilson, Y.A., Raffelt, N.C., Olver, S.D., Varelias, A., Alexander, K.A., Teal, B.E., Sparwasser, T., et al. (2012). Identification and expansion of highly suppressive CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 119, 5898–5908.

Robins, H.S., Campregher, P.V., Srivastava, S.K., Wacher, A., Turtle, C.J., Kahsai, O., Riddell, S.R., Warren, E.H., and Carlson, C.S. (2009). Comprehensive assessment of T-cell receptor  $\alpha$ -chain diversity in T cells. *Blood* 114, 4099–4107.

Robinson, J.J., Watson, F., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (1994). Role of Fcγ receptors in the activation of neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates isolated from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 6.

Rodriguez, P.C., Zea, A.H., Culotta, K.S., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., and Ochoa, A.C. (2002). Regulation of T Cell Receptor CD3 $\zeta$  Chain Expression by L-Arginine. *J. Biol. Chem.* 277, 21123–21129.

Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., and Ochoa, A.C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Immunobiology* 109, 7.

Rodriguez, P.C., Ernstoff, M.S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R., and Ochoa, A.C. (2009). Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer Res.* 69, 1553–1560.

Roesler, J., Curnutte, J.T., Rae, J., Barrett, D., Patino, P., Chanock, S.J., and Goerlach, A. (2000). Recombination events between the p47-phox gene and its highly homologous pseudogenes are the main cause of autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Blood* 95, 8.

de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2480–2488.

Rosenbauer, F., and Tenen, D.G. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 105–117.

Rosloniec, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Whittington, K.B., Zaller, D.M., Woods, A., Stuart, J.M., and Kang, A.H. (1998). Induction of Autoimmune Arthritis in HLA-DR4 (DRB1\*0401) Transgenic Mice by Immunization with Human and Bovine Type II Collagen. *J. Immunol.* 7.

Ruddy, M.J., Shen, F., Smith, J.B., Sharma, A., and Gaffen, S.L. (2004). Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J. Leukoc. Biol.* 76, 135–144.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor  $\alpha$ -Chains (CD25). *J. Immunol.* 15.

Samstein, R.M., Arvey, A., Josefowicz, S.Z., Peng, X., Reynolds, A., Sandstrom, R., Neph, S., Sabo, P., Kim, J.M., Liao, W., et al. (2012). Foxp3 Exploits a Pre-Existent Enhancer Landscape for Regulatory T Cell Lineage Specification. *Cell* 151, 153–166.

Santos, L.L., Morand, E.F., Hutchinson, P., Boyce, N.W., and Holdsworth, S.R. (1997). Anti-neutrophil monoclonal antibody therapy inhibits the development of adjuvant arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 107, 248–253.

Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., et al. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.* 203, 2673–2682.

- Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., et al. (2008). T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 7797–7802.
- Scally, S.W., Petersen, J., Law, S.C., Dudek, N.L., Nel, H.J., Loh, K.L., Wijeyewickrema, L.C., Eckle, S.B.G., van Heemst, J., Pike, R.N., et al. (2013). A molecular basis for the association of the *HLA-DRB1* locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* *210*, 2569–2582.
- Schauer, C., Janko, C., Munoz, L.E., Zhao, Y., Kienhöfer, D., Frey, B., Lell, M., Manger, B., Rech, J., Naschberger, E., et al. (2014). Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* *20*, 511–517.
- Schiff, M., Weinblatt, M.E., Valente, R., van der Heijde, D., Citera, G., Elegbe, A., Maldonado, M., and Fleischmann, R. (2014). Head-to-head comparison of subcutaneous abatacept versus adalimumab for rheumatoid arthritis: two-year efficacy and safety findings from AMPLE trial. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 86–94.
- Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., and Ueno, H. (2016). Molecular Mechanisms Regulating T Helper 1 versus T Follicular Helper Cell Differentiation in Humans. *Cell Rep.* *16*, 1082–1095.
- Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2004). Maintenance of T Cell Specification and Differentiation Requires Recurrent Notch Receptor–Ligand Interactions. *J. Exp. Med.* *200*, 469–479.
- Schwab, S.R., Pereira, J.P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., and Cyster, J.G. (2005). Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. *Science* *309*, 1735.
- Schwarz, B.A., and Bhandoola, A. (2004). Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat. Immunol.* *5*, 953.
- Schwarzenberger, P., Huang, W., Ye, P., Oliver, P., Manuel, M., Zhang, Z., Bagby, G., Nelson, S., and Kolls, J.K. (2000). Requirement of Endogenous Stem Cell Factor and Granulocyte-Colony-Stimulating Factor for IL-17-Mediated Granulopoiesis. *J. Immunol.* *164*, 4783–4789.
- Schwenzer, A., Jiang, X., Mikuls, T.R., Payne, J.B., Sayles, H.R., Quirke, A.-M., Kessler, B.M., Fischer, R., Venables, P.J., Lundberg, K., et al. (2016). Identification of an immunodominant peptide from citrullinated tenascin-C as a major target for autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 1876–1883.
- Scott, D.G.I., and Bacon, P.A. (1984). Intravenous cyclophosphamide plus methylprednisolone in treatment of systemic rheumatoid vasculitis. *Am. J. Med.* *76*, 377–384.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zanders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., et al. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *203*, 8.
- Seo, S.M., McIntire, L.V., and Smith, C.W. (2001). Effects of IL-8, Gro- $\alpha$ , and LTB<sub>4</sub> on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *281*, C1568–C1578.
- Shi, J. (2001). Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* *98*, 1226–1230.
- Shikama, Y., Cao, M., Ono, T., Feng, X., Noji, H., Kimura, H., Ogawa, K., Suzuki, Y., Ikeda, K., Takeishi, Y., et al. (2016). Reduction of c-Fos via Overexpression of miR-34a Results in Enhancement of TNF- Production by LPS in Neutrophils from Myelodysplastic Syndrome Patients. *PLOS ONE* *11*, e0158527.
- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., and Nathan, C. (1999). Phenotype of Mice and Macrophages Deficient in Both Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase. *Immunity* *10*, 29–38.

- Shinkai, Y. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867.
- Sidney, J., Becart, S., Zhou, M., Duffy, K., Lindvall, M., Moore, E.C., Moore, E.L., Rao, T., Rao, N., Nielsen, M., et al. (2017). Citrullination only infrequently impacts peptide binding to HLA class II MHC. *PLOS ONE* 12, e0177140.
- Silman, A.J., Newman, J., and Macgregor, A.J. (1996). Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis: Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum.* 39, 732–735.
- Skokowa, J., and Welte, K. (2009). Dysregulation of Myeloid-specific Transcription Factors in Congenital Neutropenia: Rescue by NAMPT/NAD<sup>+</sup>/SIRT1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1176, 94–100.
- Skokowa, J., Dale, D.C., Touw, I.P., Zeidler, C., and Welte, K. (2017). Severe congenital neutropenias. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17032.
- Sleckman, B.P., Bassing, C.H., Hughes, M.M., Okada, A., D'Auteuil, M., Wehrly, T.D., Woodman, B.B., Davidson, L., Chen, J., and Alt, F.W. (2000). Mechanisms that direct ordered assembly of T cell receptor  $\alpha$  locus V, D, and J gene segments. *PNAS* 97, 6.
- Smolen, J.S., Breedveld, F.C., Schiff, M.H., Kalden, J.R., Emery, P., Eberl, G., van Riel, P.L., and Tugwell, P. (2003). A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology* 42, 244–257.
- Sokolove, J., Johnson, D.S., Lahey, L.J., Wagner, C.A., Cheng, D., Thiele, G.M., Michaud, K., Sayles, H., Reimold, A.M., Caplan, L., et al. (2014). Rheumatoid Factor as a Potentiator of Anti-Citrullinated Protein Antibody-Mediated Inflammation in Rheumatoid Arthritis: Interaction Between RF and ACPAs in RA. *Arthritis Rheumatol.* 66, 813–821.
- van de Stadt, L.A., de Koning, M.H.M.T., van de Stadt, R.J., Wolbink, G., Dijkmans, B.A.C., Hamann, D., and van Schaardenburg, D. (2011). Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 3226–3233.
- Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., and Ley, K. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22, 285–294.
- Stuart, J.M., and Dixon, F.J. (1983). Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* 158, 378–392.
- Sun, W., Zhang, H., Wang, H., Chiu, Y.G., Wang, M., Ritchlin, C.T., Kiernan, A., Boyce, B.F., and Xing, L. (2017). Targeting Notch-Activated M1 Macrophages Attenuates Joint Tissue Damage in a Mouse Model of Inflammatory Arthritis: NOTCH ACTIVE M1 MACROPHAGES CONTRIBUTE TO INFLAMMATORY ARTHRITIS. *J. Bone Miner. Res.* 32, 1469–1480.
- Sundd, P., Gutierrez, E., Koltsova, E.K., Kuwano, Y., Fukuda, S., Pospieszalska, M.K., Groisman, A., and Ley, K. (2012). 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature* 488, 399–403.
- Suri-Payer, E., and Cantor, H. (2001). Differential Cytokine Requirements for Regulation of Autoimmune Gastritis and Colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T Cells. *J. Autoimmun.* 16, 115–123.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 100, 655–669.
- Szczepura, K.R., Ruparelia, P., Solanki, C.K., Balan, K., Newbold, P., Summers, C., Chilvers, E.R., and Peters, A.M. (2011). Measuring whole-body neutrophil redistribution using a dedicated whole-body counter and ultra-low doses of 111Indium: WHOLE BODY 111IN PROFILING. *Eur. J. Clin. Invest.* 41, 77–83.



- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., et al. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 3516–3521.
- Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4<sup>+</sup> T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *203*, 505–511.
- Tak, P.P., Rigby, W.F., Rubbert-Roth, A., Peterfy, C.G., van Vollenhoven, R.F., Stohl, W., Hessey, E., Chen, A., Tyrrell, H., Shaw, T.M., et al. (2011). Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: the IMAGE trial. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 39–46.
- Tak, T., Wijten, P., Heeres, M., Pickkers, P., Scholten, A., Heck, A.J.R., Vrisekoop, N., Leenen, L.P., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., et al. (2017). Human CD62L<sup>dim</sup> neutrophils identified as a separate subset by proteome profiling and in vivo pulse-chase labeling. *Blood* *129*, 3476–3485.
- Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., and Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* *163*, 975–987.
- Takahashi, H., Kanno, T., Nakayamada, S., Hirahara, K., Sciumè, G., Muljo, S.A., Kuchen, S., Casellas, R., Wei, L., Kanno, Y., et al. (2012). TGF- $\beta$  and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nat. Immunol.* *13*, 587–595.
- Tanaka, D., Kagari, T., Doi, H., and Shimozato, T. (2007). Administration of anti-type II collagen antibody sustains footpad swelling of mice caused by a delayed-type hypersensitivity reaction and induces severe arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* *148*, 360–367.
- Tarbell, K.V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., and Steinman, R.M. (2004). CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T Cells, Expanded with Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide, Suppress Autoimmune Diabetes. *J. Exp. Med.* *199*, 1467–1477.
- Taylor, P.C., Keystone, E.C., van der Heijde, D., Weinblatt, M.E., del Carmen Morales, L., Reyes Gonzaga, J., Yakushin, S., Ishii, T., Emoto, K., Beattie, S., et al. (2017). Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* *376*, 652–662.
- Taylor, P.R., Roy, S., Leal, S.M., Sun, Y., Howell, S.J., Cobb, B.A., Li, X., and Pearlman, E. (2013). Activation of neutrophils by autocrine IL-17A–IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR $\gamma$ t and dectin-2. *Nat. Immunol.* *15*, 143–151.
- Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Blüthmann, H., and von Boehmer, H. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the  $\alpha\beta$  T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* *335*, 229–233.
- Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-expressing Dendritic Cells: Mediation of Suppression by Tryptophan Metabolites. *J. Exp. Med.* *196*, 447–457.
- Thiolat, A., Denys, A., Petit, M., Biton, J., Lemeiter, D., Herve, R., Lutomski, D., Boissier, M.-C., and Bessis, N. (2014a). Interleukin-35 gene therapy exacerbates experimental rheumatoid arthritis in mice. *Cytokine* *69*, 87–93.
- Thiolat, A., Semerano, L., Pers, Y.M., Biton, J., Lemeiter, D., Portales, P., Quentin, J., Jorgensen, C., Decker, P., Boissier, M.-C., et al. (2014b). Interleukin-6 Receptor Blockade Enhances CD39<sup>+</sup> Regulatory T Cell Development in Rheumatoid Arthritis and in Experimental Arthritis: Effects of IL-6R Blockade on CD39<sup>+</sup> Treg Cells in Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* *66*, 273–283.

- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *184*, 3433–3441.
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D.L. (2001). Lipopolysaccharide-Activated B Cells Down-Regulate Th1 Immunity and Prevent Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol.* *167*, 1081–1089.
- Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., and Sospedra, M. (2012). T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J. Immunol.* *188*, 3150–3159.
- Tofts, P.S., Chevassut, T., Cutajar, M., Dowell, N.G., and Peters, A.M. (2011). Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* *117*, 6050–6052.
- Toker, A., Engelbert, D., Garg, G., Polansky, J.K., Floess, S., Miyao, T., Baron, U., Duber, S., Geffers, R., Giehr, P., et al. (2013). Active Demethylation of the Foxp3 Locus Leads to the Generation of Stable Regulatory T Cells within the Thymus. *J. Immunol.* *190*, 3180–3188.
- Trop, S., Rhodes, M., Wiest, D.L., Hugo, P., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2000). Competitive Displacement of pT by TCR- During TCR Assembly Prevents Surface Coexpression of Pre-TCR and TCR. *J. Immunol.* *165*, 5566–5572.
- Vahl, J.C., Drees, C., Heger, K., Heink, S., Fischer, J.C., Nedjic, J., Ohkura, N., Morikawa, H., Poeck, H., Schallenberg, S., et al. (2014). Continuous T Cell Receptor Signals Maintain a Functional Regulatory T Cell Pool. *Immunity* *41*, 722–736.
- VAN DEN STEEN, P.E., PROOST, P., GRILLET, B., BRAND, D.D., KANG, A.H., VAN DAMME, J., and OPDENAKKER, G. (2002). Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis. *FASEB J.* *16*, 379–389.
- Velu, C.S., Baktula, A.M., and Grimes, H.L. (2009). Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood* *113*, 4720–4728.
- Verhagen, J., and Wraith, D.C. (2010). Comment on “Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells.” *J. Immunol.* *185*, 7129–7129.
- Vermeulen, M. (1998). Role of Adhesion Molecules in the Homing and Mobilization of Murine Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood* *92*, 8.
- Visnjic, D. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* *103*, 3258–3264.
- Voo, K.S., Wang, Y.-H., Santori, F.R., Boggiano, C., Wang, Y.-H., Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., et al. (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 4793–4798.
- Wang, R., Wan, Q., Kozhaya, L., Fujii, H., and Unutmaz, D. (2008). Identification of a Regulatory T Cell Specific Cell Surface Molecule that Mediates Suppressive Signals and Induces Foxp3 Expression. *PLoS ONE* *3*, e2705.
- Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuza, I.M., Mahdi, R.M., Dolinska, M.B., Sergeev, Y.V., Wingfield, P.T., Kim, S.-H., and Egwuagu, C.E. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat. Med.* *20*, 633.
- Wang, T., Zhao, Y., Peng, L., Chen, N., Chen, W., Lv, Y., Mao, F., Zhang, J., Cheng, P., Teng, Y., et al. (2017). Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut* *66*, 1900–1911.

- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., et al. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* *184*, 205–213.
- Wang, Y., Su, M.A., and Wan, Y.Y. (2011). An Essential Role of the Transcription Factor GATA-3 for the Function of Regulatory T Cells. *Immunity* *35*, 337–348.
- Wassenberg, S., Rau, R., Steinfeld, P., Zeidler, H., and Low-Dose Prednisolone Therapy Study Group (2005). Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* *52*, 3371–3380.
- Wehrens, E.J., Mijnheer, G., Durland, C.L., Klein, M., Meerding, J., van Loosdregt, J., de Jager, W., Sawitzki, B., Coffey, P.J., Vastert, B., et al. (2011). Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood* *118*, 3538–3548.
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3<sup>+</sup> T reg cells. *J. Exp. Med.* *209*, 1723–1742.
- Wheeler, M.A., Smith, S.D., García-Cardeña, G., Nathan, C.F., Weiss, R.M., and Sessa, W.C. (1997). Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* *99*, 110–116.
- Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* *8*, 277–284.
- Wilson, A. (1994). Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J. Exp. Med.* *179*, 1355–1360.
- Wipke, B.T., and Allen, P.M. (2001). Essential Role of Neutrophils in the Initiation and Progression of a Murine Model of Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* *167*, 1601–1608.
- Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R., and June, C.H. (2001). Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells in Tumors from Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer and Late-Stage Ovarian Cancer. *Cancer Res.* *61*, 8.
- Woodfin, A., Voisin, M.-B., Beyrau, M., Colom, B., Caille, D., Diapouli, F.-M., Nash, G.B., Chavakis, T., Albelda, S.M., Rainger, G.E., et al. (2011). The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat. Immunol.* *12*, 761–769.
- van der Woude, D., Houwing-Duistermaat, J.J., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Thomson, W., Worthington, J., van der Helm-van Mil, A.H.M., and de Vries, R.R.P. (2009). Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 916–923.
- Wright, H.L., Chikura, B., Bucknall, R.C., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2011). Changes in expression of membrane TNF, NF- $\kappa$ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 537–543.
- Wu, D., Zeng, Y., Fan, Y., Wu, J., Mulatibieke, T., Ni, J., Yu, G., Wan, R., Wang, X., and Hu, G. (2016). Reverse-migrated neutrophils regulated by JAM-C are involved in acute pancreatitis-associated lung injury. *Sci. Rep.* *6*.
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. (2007). Cutting Edge: Regulatory T Cells Induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T Cells or Are Self-Induced to Become Th17 Cells in the Absence of Exogenous TGF- $\beta$ . *J. Immunol.* *178*, 6725–6729.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* *209*, 1713–1722.

- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* 28, 639–650.
- Yang, B.-H., Hagemann, S., Mamareli, P., Lauer, U., Hoffmann, U., Beckstette, M., Föhse, L., Prinz, I., Pezoldt, J., Suerbaum, S., et al. (2016a). Foxp3+ T cells expressing RORyt represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 9, 444–457.
- Yang, J., Lu, Y., and Guo, A. (2016b). Platelet-rich plasma protects rat chondrocytes from interleukin-1 $\beta$ -induced apoptosis. *Mol. Med. Rep.* 14, 4075–4082.
- Yang, K., Puel, A., Zhang, S., Eidenschenk, C., Ku, C.-L., Casrouge, A., Picard, C., von Bernuth, H., Senechal, B., Plancoulaine, S., et al. (2005). Human TLR-7-, -8-, and -9-Mediated Induction of IFN- $\alpha/\beta$  and - $\lambda$  Is IRAK-4 Dependent and Redundant for Protective Immunity to Viruses. *Immunity* 23, 465–478.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., et al. (2001). Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung Cxc Chemokine and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense. *J. Exp. Med.* 194, 519–528.
- Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N.V., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* 18, 1386–1393.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., et al. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunol.* 175, 2851–2858.
- Young, M.R., Newby, M., and Wepsic, H.T. (1987). Hematopoiesis and Suppressor Bone Marrow Cells in Mice Bearing Large Metastatic Lewis Lung Carcinoma Tumors. *Cancer Res.* 47.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., and Simon, H.U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 16, 1438–1444.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009a). The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity* 31, 457–468.
- Yu, X., Harden, K., C Gonzalez, L., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C.J., Clark, H., et al. (2009b). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 48–57.
- Zaiss, M.M., Axmann, R., Zwerina, J., Polzer, K., Gückel, E., Skapenko, A., Schulze-Koops, H., Horwood, N., Cope, A., and Schett, G. (2007). Treg cells suppress osteoclast formation: A new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum.* 56, 4104–4112.
- Zaiss, M.M., Frey, B., Hess, A., Zwerina, J., Luther, J., Nimmerjahn, F., Engelke, K., Kollias, G., Hunig, T., Schett, G., et al. (2010). Regulatory T Cells Protect from Local and Systemic Bone Destruction in Arthritis. *J. Immunol.* 184, 7238–7246.
- Zanin-Zhorov, A., Ding, Y., Kumari, S., Attur, M., Hippen, K.L., Brown, M., Blazar, B.R., Abramson, S.B., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2010). Protein Kinase C- Mediates Negative Feedback on Regulatory T Cell Function. *Science* 328, 372–376.
- Zarebski, A., Velu, C.S., Baktula, A.M., Bourdeau, T., Horman, S.R., Basu, S., Bertolone, S.J., Horwitz, M., Hildeman, D.A., Trent, J.O., et al. (2008). Mutations in Growth Factor Independent-1 Associated with Human Neutropenia Block Murine Granulopoiesis through Colony Stimulating Factor-1. *Immunity* 28, 370–380.

- Zarek, P.E., Huang, C.-T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G., and Powell, J.D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* *111*, 251–259.
- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J.J., Burk, R.D., Kunisaki, Y., Jang, J.-E., Scheiermann, C., et al. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* *525*, 528–532.
- Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* *464*, 104–107.
- Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2009). Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity* *31*, 761–771.
- Zhang, X., Liu, X., Zhang, M., Li, T., Muth, A., Thompson, P.R., Coonrod, S.A., and Zhang, X. (2016). Peptidylarginine deiminase 1-catalyzed histone citrullination is essential for early embryo development. *Sci. Rep.* *6*, 38727.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* *89*, 587.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.-T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature* *458*, 351–356.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* *463*, 808–812.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J.A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* *10*, 1000–1007.
- Zhu, B., Bando, Y., Xiao, S., Yang, K., Anderson, A.C., Kuchroo, V.K., and Khoury, S.J. (2007). CD11b<sup>+</sup> Ly-6C<sup>hi</sup> Suppressive Monocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* *179*, 5228–5237.
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D’Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* *207*, 365–378.
- Zwerina, J., Redlich, K., Polzer, K., Joosten, L., Kronke, G., Distler, J., Hess, A., Pundt, N., Pap, T., Hoffmann, O., et al. (2007). TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 11742–11747.





Le but de ce travail de thèse était de caractériser l'interaction entre deux populations immunitaires que sont les lymphocytes T régulateur (Treg) et les neutrophiles (PNN). Les PNN participent activement au processus inflammatoire. A l'inverse, les Treg ont un rôle suppresseur et contrôlent l'inflammation. Une perte du contrôle de l'inflammation peut mener à des pathologies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde (PR). Dans la PR, alors que les PNN sont fortement activés et participent à l'inflammation, les Treg présentent un défaut fonctionnel et échouent à contrôler cette réponse. Nous avons montré, pour la première fois, que les Treg et les PNN sont capables d'interagir. Leurs interactions résultent en un maintien du phénotype régulateur des Treg, représenté par l'expression du « forkhead box P3 » (FoxP3) et du «cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4» (CTLA-4), et un maintien de leurs capacités suppressives. Parallèlement, les molécules inhibitrices «programmed death ligand 1» (PD-L1) et CD39 sont induites sur les PNN leur octroyant des capacités suppressives envers les lymphocytes T. Nous avons observé que l'interaction entre les Treg et les PNN était dépendante d'un contact cellulaire direct et implique la voie de signalisation JAK/STAT. Enfin, cette interaction est altérée dans la PR puisque les PNN de patients sont incapables d'induire l'expression du CTLA-4 par les Treg. De façon intéressante, la capacité des PMN à induire CTLA-4 sur les Treg peut être restaurée par une thérapie ciblée chez ces patients. Nous proposons que l'interaction entre les Treg et les PMN puisse constituer une cible thérapeutique innovante dans la PR.

### **Interaction between regulatory T cells (Treg) and polymorphonuclear neutrophils (PMN) in physiological and rheumatoid arthritis situations.**

In this study, we aim to characterize regulatory T cells (Treg) and polymorphonuclear neutrophils (PMN) interaction. PMN are known for their pro-inflammatory properties and pathogen killing. On the contrary, Treg are suppressive cells responsible for immune system regulation. Diverse events may favor loss of immune system control leading to inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis (RA). In this context, while PMN are highly activated and aggravate the disease, Treg are defective and fail to control inflammation. We show for the first time that Treg and PMN do interact and that this interaction helps to maintain forkhead box P3 (FoxP3) expression and promotes Treg phenotype notably through induction of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) expression. The interaction with PMN also favors maintenance of Treg suppressive functions. Meanwhile, PMN express regulatory molecules programmed death ligand 1 (PD-L1) and CD39 upon interaction. Consequently, PMN acquire suppressive functions toward T lymphocytes. We found out that Treg and PMN crosstalk is dependent on cell contact but might also involve JAK/STAT signaling pathway as second signal. Finally, this cooperation is lost in RA context as PMN fail to induce CTLA-4 on Treg from patients. Interestingly, this defect can be reverted by biotherapy. We propose that Treg and PMN interplay might constitute a relevant and innovative therapeutic target in RA.

Discipline: Biologie, mention biologie moléculaire et cellulaire

Mots clé: Immunologie, neutrophile, lymphocyte T régulateur, polyarthrite rhumatoïde

UMR INSERM 1125, Université Paris 13, USPC, 1 rue de Chablais 93017 BOBIGNY