



**HAL**  
open science

# Etude des effets immuno-modulateurs du tofacitinib sur le neutrophile ainsi que de l'antigénicité et du rôle pathogène des "neutrophil extracellular traps" dans la polyarthrite rhumatoïde et dans un nouveau modèle expérimental

Eliès Re

## ► To cite this version:

Eliès Re. Etude des effets immuno-modulateurs du tofacitinib sur le neutrophile ainsi que de l'antigénicité et du rôle pathogène des "neutrophil extracellular traps" dans la polyarthrite rhumatoïde et dans un nouveau modèle expérimental. Biologie moléculaire. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2020. Français. NNT : 2020PA131023 . tel-03510140

**HAL Id: tel-03510140**

**<https://theses.hal.science/tel-03510140>**

Submitted on 4 Jan 2022

**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.

**UNIVERSITE PARIS XIII – SORBONNE PARIS CITE  
UFR DE SANTE-MEDECINE-BIOLOGIE HUMAINE**

**ECOLE DOCTORALE GALILEE  
UNITE DE RECHERCHE INSERM UMR1125**

# **Thèse de doctorat**

**Pour l'obtention du diplôme de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13**

**Discipline : Biologie, Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire**

---

**Etude des effets immuno-modulateurs du tofacitinib sur le neutrophile ainsi que de l'antigénicité et du rôle pathogène des "neutrophil extracellular traps" dans la polyarthrite rhumatoïde et dans un nouveau modèle expérimental**

---

**Par**

**Elies RE**

**Soutenue publiquement le 06/03/2020 devant le jury composé de**

<b>Dr Baptiste HERVIER</b> (Université de Paris)	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr Olivier VITTECOQ</b> (Université de Rouen)	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr Valérie BESNARD</b> (Université Sorbonne Paris Nord)	<b>Examineur</b>
<b>Pr Patrice DECKER</b> (Université Sorbonne Paris Nord)	<b>Directeur de thèse</b>



*« Que l'Académie me permette de ne pas abandonner ces curieux résultats sans faire ressortir une de leurs principales conséquences théoriques. Au début de ces recherches, car elles commencent à peine, quoique déjà un monde nouveau s'y révèle, que doit-on demander avec le plus d'insistance ? C'est la preuve péremptoire qu'il existe des maladies transmissibles, contagieuses, infectieuses, dont la cause réside essentiellement et uniquement dans la présence d'organismes microscopiques. »*

*Louis Pasteur*



# Remerciements

Le doctorat signe la fin du cursus universitaire d'un étudiant. Les connaissances que j'ai acquises avant le début du doctorat m'ont été d'une grande utilité. Ainsi j'aimerais remercier les enseignants du primaire et du secondaire qui ont fait germer en moi un intérêt certain pour les sciences. Il me paraît important de remercier les enseignants-chercheurs de l'université de Besançon. Je remercie les chercheurs qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires, le Dr Isabelle LASCOMBE et le Dr Sylvain PERRUCHE.

Je remercie mes parents qui m'ont permis d'étudier dans de bonnes conditions et qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse. Maman, je te remercie d'être venu me voir souvent, de me donner des nouvelles de la famille et de tout ce que tu fais pour moi. Papa, je te remercie de ton soutien et de l'exemple d'abnégation que tu me donnes.

Je voudrais remercier le ministère de l'enseignement supérieur, l'Université Paris 13, l'école doctorale Galilée qui donnent l'opportunité à quelques-uns de se former aux métiers de la recherche.

Je remercie le Pr Marie-Christophe BOISSIER de m'avoir pleinement accueilli dans son laboratoire, de nous proposer de présenter notre travail ou celui des meilleures équipes internationales régulièrement et d'avoir permis à mon petit frère d'effectuer son stage de troisième dans le laboratoire. Je remercie le Pr Patrice DECKER de m'avoir fait confiance, d'avoir contribué à l'amélioration de ma rigueur scientifique et d'avoir corrigé l'essentiel de ce manuscrit.

Je remercie Damarys LOEW et l'équipe de spectrométrie de masse de l'institut Curie pour leur collaboration qui a porté ses fruits.

Je remercie les « ingénieuses ingénieures », avec une spécificité pour Magali. Nous avons beaucoup réalisé d'expériences ensemble, dont les *western blot* n'est-ce pas ? C'était plus agréable de partager les expériences qui « marchent », et les autres ! Je remercie Roxane qui m'a

formé à la microscopie et qui m'a souvent aidé. Je remercie aussi Delphine qui était disponible et qui connaît le laboratoire mieux que quiconque.

Je remercie les anciens étudiants et les actuels. D'abord Matthieu qui a transmis des protocoles qui m'ont permis d'aller plus vite. Je remercie Sarra qui m'a formé rapidement. Je remercie François, compositeur à ses heures perdues qui parle beaucoup comme chacun sait, et qui a m'a apporté ses conseils « significativement statistiques » n'est-ce pas ? Je remercie Emma avec qui nous avons travaillé. Je remercie Gêrôme pour la vision clinique que tu m'as apporté, nos nombreuses conversations sur l'hôpital m'ont permis de mieux le comprendre. Je remercie Johanna qui a contribué à la correction de la partie clinique de ce manuscrit. Je remercie Luca et Mylène qui nous permettent d'avoir les prélèvements des patients. Je remercie Maxime pour tes remarques lors de mes présentations. Je remercie Dyhia avec qui nous avons produits tous ces « bonettes », Lyna et Mégane pour leur coopération, notamment lorsque plusieurs expériences se déroulaient en même temps. Je remercie Gaëlle pour la lecture des lames. Je remercie les autres membres du laboratoire qui ont assisté à mes présentations.

Je remercie Hanna, ma tutrice qui a su me conseiller. Je remercie les autres membres de mon comité de suivi de thèse qu'étaient Éric ASSIER et Baptiste HERVIER qui ont évalué mon travail chaque année. Je remercie l'école doctorale Galilée pour les opportunités de présenter son travail, d'assister à des congrès et de passer le TOEIC.

Je remercie Sylvie pour ton soutien, évidemment. Je remercie Alexe et Mr BACHA qui m'ont beaucoup soutenu.

Je remercie les rapporteurs Baptiste HERVIER, Olivier VITTECOQ et l'examineur Valérie BESNARD qui ont accepté d'évaluer cette thèse.

# Table des matières

Remerciements .....	5
I. Abréviations et figures .....	13
A. Liste des abréviations .....	15
B. Liste des figures de l'introduction et de la discussion.....	19
II. Introduction .....	21
A. Le neutrophile .....	23
1. Un peu d'histoire.....	23
2. Dénomination.....	24
3. Du précurseur à l'effecteur .....	25
a) Origine médullaire.....	25
b) Stades de développement .....	26
c) Formation des granules .....	27
d) Diapédèse .....	28
4. Une cellule majeure de l'immunité.....	29
a) De par son nombre .....	29
b) De par ses fonctions antimicrobiennes vitales .....	29
c) De par son rôle de lanceur d'alerte.....	30
d) De par ses capacités pro-résolutives indirectes .....	31
e) De par leur diversité .....	33
f) De par la capacité à inhiber la prolifération des lymphocytes T .....	35
g) De par leur capacité à acquérir la fonction de présentation d'antigène.....	36
h) De par certains neutrophiles auxiliaires aux lymphocytes B .....	37
i) De par leurs implications dans les maladies auto-immunes .....	38
5. Neutrophil extracellular traps .....	39
a) Découverte .....	39
b) Formation de NET et nétozes in vitro .....	40

c)	Peptidyl-arginine déiminase .....	42
d)	Formation de NET in-vivo .....	44
e)	Focus sur la nétose induite par le PMA.....	45
f)	NET agrégés .....	47
g)	NET et maladies auto-immunes .....	47
B.	La polyarthrite rhumatoïde .....	49
1.	Un rhumatisme inflammatoire chronique d'origine auto-immune .....	49
2.	Diagnostic et évolution .....	50
a)	Signes cliniques précoces.....	50
b)	Signes biologiques précoces.....	51
c)	Signes radiographiques précoces .....	51
d)	Diagnostic différentiel.....	51
e)	Les critères de l'ACR/EULAR .....	52
f)	Evolution .....	53
g)	Le DAS28.....	54
3.	Facteurs de risque .....	55
a)	Facteurs génétiques .....	55
b)	Focus sur le biais sexuel de l'auto-immunité .....	56
c)	Facteurs environnementaux.....	58
4.	La tolérance.....	59
a)	Polly Matzinger et la théorie du danger, une tentative d'explication des maladies auto-immunes .....	59
b)	Des souris scurfy au gène FOXP3 : Les lymphocytes T régulateurs .....	60
c)	La sélection thymique .....	62
d)	Tolérance périphérique.....	64
5.	La rupture de la tolérance.....	66
a)	Rupture de la tolérance dans la PR.....	66
b)	Réponse cellulaire .....	66
c)	Réponse humorale .....	67
6.	Focus sur les ACPA .....	69
a)	Découverte .....	69

b)	Intérêt clinique.....	70
c)	Rôle physiopathologique majeur ?.....	71
d)	ACPA et réponse B .....	71
e)	Modification de l'antigénicité par citrullination .....	73
f)	Hypothèse d'antigénicité des NET.....	74
g)	Hypothèse de citrullination par les PAD des NET.....	75
7.	Les anticorps dirigés contre la peptidyl-arginine déiminase.....	76
a)	Prévalence .....	76
b)	Fonctions .....	76
c)	Réponse T et rôle porteur de PAD4 .....	77
d)	Antigénicité de la peptidyl arginine déiminase .....	78
8.	Atteintes articulaires et chronicité.....	79
a)	Invasion leucocytaire intra-articulaire.....	79
b)	Erosion osseuse .....	79
c)	Poussées et glycosylation .....	80
d)	ACPA et cellules B mémoires.....	81
e)	Focus sur le GM-CSF.....	82
f)	Focus sur les motifs CpG et le TLR9.....	83
g)	Chronicité.....	84
9.	Les traitements de la polyarthrite rhumatoïde.....	85
a)	Le méthotrexate, les biothérapies et les anti-JAK.....	85
b)	Focus sur le tofacitinib .....	86
10.	Quelques modèles murins d'arthrite .....	88
11.	Hypothèses de travail.....	90
III.	Résultats .....	93
A.	Les NET sont antigéniques et arthritogènes dans un modèle murin par l'induction d'anticorps anti-lactoferrine .....	95
1.	Brève réintroduction .....	95
2.	Matériel et méthodes.....	97
a)	Prélèvements humains.....	97
b)	Isolement des neutrophiles .....	97

c)	Isolement des monocytes et différenciation en macrophages .....	97
d)	Immunofluorescence .....	98
e)	Cytométrie .....	98
f)	Production de NET solubles .....	99
g)	Immunsation des souris .....	99
h)	Concentration de NET .....	99
i)	ELISAs .....	100
j)	Western blot .....	100
k)	Spectrométrie de masse .....	102
l)	Tests statistiques .....	102
3.	Résultats .....	102
a)	Production et caractérisation des NET .....	102
b)	Estimation de la présence de PAD4 et 2 dans les NET .....	105
c)	PAD4 est présente dans les cellules myéloïdes .....	107
d)	Les IgG anti-PAD4 et anti-PAD3/4 se lient aussi à PAD2 .....	109
e)	Les sera anti-PAD3/4 reconnaissent légèrement les NET de patients PR .....	111
f)	Les NET sont antigéniques et athritogènes dans un modèle murin .....	112
g)	Les anticorps anti-NET reconnaissent les liquides synoviaux de patients et la lactoferrine .....	116
4.	Conclusion .....	120
B.	Le tofacitinib inhibe les réponses du neutrophile associées au GM-CSF .....	123
1.	Brève réintroduction .....	123
2.	Matériel et méthodes .....	124
a)	Prélèvements humains .....	124
b)	Isolement des neutrophiles et culture .....	124
c)	Cytométrie .....	124
d)	ELISAs .....	125
e)	Production de NET solubles .....	125
f)	Tests statistiques .....	125
3.	Résultats .....	126

a)	Le tofacitinib n'active pas le neutrophile et n'est pas toxique à n'importe quelle dose testée .....	126
b)	L'activation du neutrophile par le GM-CSF est inhibée par le tofacitinib.....	130
c)	Le tofacitinib diminue l'activation du neutrophile induite par la double stimulation GM-CSF puis CpG.....	135
d)	Le tofacitinib diminue seulement en partie l'activation de la co-stimulation GM-CSF puis LPS .....	140
e)	Le tofacitinib diminue l'activation de la co-stimulation GM-CSF puis NET.....	143
f)	Conclusion.....	147
IV.	Discussion .....	151
A.	Les NET sont antigéniques et pro-inflammatoires dans un modèle murin .....	153
1.	Notre purification des NET induits par le PMA .....	153
a)	Nos NET.....	153
b)	Différents stimuli induisent différents NET : relevance ?.....	153
2.	Les NET contiennent très peu ou pas de PAD4.....	154
a)	Nos résultats .....	154
b)	Les résultats de la littérature.....	154
3.	Les anticorps de patients PR anti-PAD4 et 3/4 reconnaissent PAD2 .....	155
a)	Nos résultats .....	155
b)	Résultats de la littérature .....	155
4.	Les sera anti-PAD3/4 reconnaissent les NET .....	156
a)	Nos résultats .....	156
b)	Résultats de la littérature .....	156
5.	L'immunisation par des NET induit des phénomènes inflammatoires proches de l'arthrite.....	156
a)	Nos résultats .....	157
b)	Résultats de la littérature .....	157
6.	Les anticorps anti-lactoferrine sont les principaux responsables de la reconnaissance de nos NET dans notre modèle .....	163
a)	Physiologie de la lactoferrine .....	163
b)	Relevance .....	163
7.	Conclusion .....	165

8.	Perspectives.....	165
a)	NET de souris ?.....	165
b)	NET induits par ionomycine ? .....	165
c)	NET de donneurs sains ou immunisation de lactoferrine seule ?.....	166
B.	Nouveaux effets immunomodulateurs du tofacitinib sur le neutrophile .....	167
1.	Le tofacitinib n'est pas toxique sur le neutrophile .....	167
a)	Nos résultats .....	167
b)	Résultats de la littérature .....	168
c)	Implication physiopathologique.....	168
2.	Nouveaux effets du tofacitinib sur l'activation du neutrophile par le GM-CSF seul .....	168
a)	Nos résultats .....	168
b)	Résultats de la littérature .....	169
c)	Implication physiopathologique.....	170
3.	Démonstration des effets de sensibilisation du GM-CSF à un agoniste du TLR9, du TLR4 et aux NET .....	171
a)	Nos résultats .....	171
b)	Résultats de la littérature .....	172
c)	Implication physiopathologique.....	173
4.	Nouveaux effets du tofacitinib sur les activations associées au GM-CSF.....	173
a)	Nos résultats .....	173
b)	Résultats de la littérature .....	174
c)	Implication physiopathologique.....	174
d)	Aparté sur la sensibilisation et le tofacitinib .....	174
5.	Conclusion .....	176
6.	Perspectives.....	176
C.	Discussion générale.....	177
D.	Conclusion.....	179
V.	Bibliographie.....	181
	Résumé.....	208

# I. Abréviations et figures



# A. Liste des abréviations

Aa : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

ACPA : Anticorps anti-protéines citrullinées

ACR : Collège américain de rhumatologie

ADN : Acide désoxyribonucléique

AID : Cytidine déaminase induite par l'activation

AIRE : Régulateur de l'auto-immunité

ANCA : Anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles

Anti-CCP : Anticorps anti-peptides cycliques citrullinés

Anti-LF : Anticorps anti-lactoferrine

Anti-PAD3/4 : Anticorps anti-PAD4 qui cross-réagit avec PAD3

APC : Cellule présentatrice d'antigène

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

BCR : Récepteur des cellules B pour l'antigène

C1q : composant du complément 1q

CD : cluster de différenciation

CEACAM : Molécule d'adhérence cellulaire liée à l'antigène carcinoembryonnaire

CII : Collagène de type 2

CitH3 : Histone 3 citrullinée

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CpG : oligonucleotide méthylé riche en motifs de cytosine puis de guanine dans le sens 5' vers 3'

CRP : Protéine C réactive

CTLA-4 : Antigène du lymphocyte T cytotoxique

CXCL : Ligand aux motifs cytosine puis un autre nucleotide puis une cytosine

CXCR : Récepteur aux chimiokines à motifs CXC

DAG : Diacylglycérol

DAMP : Motif moléculaire associé aux dégâts

DAS28 : Score d'activité de la PR

DNase : Désoxyribonucléase

EULAR : Ligue européenne contre les rhumatismes

FasL : Ligand de Fas

FLS : Synoviocytes fibroblastiques

fMLP : N-formylméthionine-leucyl-phénylalanine

FOXP3 : Facteur de transcription à motif en tête de fourche P3

FR : Facteurs rhumatoïdes

G-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes

Gld : maladie lymphoproliférative généralisée

GM-CSF : facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophage

GPI : Glucose-6-phosphate isomérase

H3 : Histone 3

HLA : Antigènes des leukocytes humains

HSP : Protéine de choc thermique

IFN-IR : Récepteur d'interférons de type I

Ig : Immunoglobuline

IgG : Immunoglobuline de type G

IgM : Immunoglobuline de type M

IL : Interleukine

ITAM : Motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine

JAK : Janus kinase

kDa : Kilodalton

KO : Inactivé

LDG : Granulocyte de basse densité

LL-37 : peptide antimicrobien de séquence LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPVPTES

Lpr : Syndrome lymphoprolifératif

LPS : Lipopolysaccharide

LTH : Hypercitruination leukotoxique

MMP : Métalloprotéinase matricielle

MPO : Myéloperoxydase

MZ : Zone marginale

N<sub>BH</sub> : Neutrophile auxiliaire au lymphocyte B

N<sub>C</sub> : Neutrophile conventionnel

NDG : Granulocyte de densité normale

NE : Elastase du neutrophile

NET : Pièges extracellulaires à ADN des neutrophiles

Nfc1 : Facteur cytosolique du neutrophile 1

ODN : Oligodéoxynucléotide

PAD : Peptidyl-arginine déiminase

PAMP : Motif moléculaire associé aux pathogènes

PKC : Protéine kinase C

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PHA : Phytohémagglutinine

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate

PPR : récepteur de motifs moléculaires

PR : Polyarthrite rhumatoïde

PR3 : Protéinase 3

RAG : Gène activateur de recombinaison

RANKL : ligand du récepteur activateur du facteur transcriptionnel NFκB

SE : Epitope Partagé

SH2 : Homologie l'oncoprotéine Src

SOCS3 : Suppresseur de la signalisation des cytokines 3

SPA : Spondylarthrite ankylosante

SRY : Région de détermination du sexe du chromosome Y.

STAT : Transducteurs de signaux et activateurs de transcription

STING : Stimulateur de gènes d'interférons

T reg : Lymphocyte T régulateur

TCR : Récepteur des cellules T

Th : Lymphocyte T auxiliaire

TLR : Récepteur de type toll

TNF : Facteur de nécrose tumoral

TPA : 12-O-Tétradécanoylphorbol-13-acétate de tétradécanoyle

TYK2 : Tyrosine kinase 2

USA : Etats-Unis d'Amérique

UTP : Uridine triphosphate

VDJ : Variabilité, diversité et jonction

VS : Vitesse de sédimentation

ZAP-70 : Protéine de 70kDa associée à la chaîne zêta

# B. Liste des figures de l'introduction et de la discussion

Figure 1 : Image de neutrophiles au microscope à fluorescence.....	24
Figure 2 : Représentation schématique des familles de chimiokines .....	26
Figure 3 : Représentation schématique des stades de développement du neutrophile.....	27
Figure 4 : Représentation schématique des mécanismes antimicrobiens du neutrophile.....	30
Figure 5 : Image représentant la commutation de classe à proximité des neutrophiles .....	37
Figure 6 : Image de la nérose induite par le PMA.....	40
Figure 7 : <i>Western blot</i> montrant l'hypercitrullination.....	42
Figure 8 : Représentation schématique topologique de la citrullination.....	43
Figure 9 : Représentation schématique de la formation de NET vitale.....	44
Figure 10 : Représentation schématique des mécanismes de la nérose induite par le PMA.....	45
Figure 11 : Photographie des mains de patients atteints de PR débutante.....	50
Figure 12 : Représentation schématique des critères de l'ACR/EULAR 2010.....	52
Figure 13 : Photographie d'une main de patient atteint de PR avancée.....	54
Figure 14 : Images représentant l'échappement de l'inactivation de l'X .....	57
Figure 15 : Images de T reg en train de trogocyter.....	62
Figure 16 : Représentation schématique des réponses humorales à l'origine des ACPA.....	72
Figure 17 : Représentation schématique de la poche à peptide P4 de HLA-DR.....	74
Figure 18 : Représentation schématique du modèle de la production d'ACPA par immunisation contre le complexe PAD/peptide citrulliné.....	78
Figure 19 : Représentation schématique de la glycosylation des anticorps.....	81
Figure 20 : Représentation schématique des classes d'oligonucléotides CpG.....	83

Figure 21 : Représentation schématique topologique du tofacitinib.....	87
Figure 22 : Représentation schématique de la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde...91	
Figure 23 : Protéines des NET reconnues par les ACPA ou les IgG témoins.....	158
Figure 24 : Comparaison de l'antigénicité des NET dans notre modèle <i>versus</i> celui du groupe de Kaplan.....	160
Figure 25 : Commentaire du groupe d'Andrade portant sur l'article du groupe de Kaplan.....	161
Figure 26 : Concentration plasmatique du tofacitinib chez les patients PR.....	167

# II. Introduction



# A. Le neutrophile

## 1. Un peu d'histoire

Remontons à Louis Pasteur. Au XIX<sup>ème</sup> siècle, il démontre que les micro-organismes ne se forment pas spontanément, à partir de rien, mais à partir d'autres micro-organismes vivants. C'est la réfutation de la génération spontanée.

En conséquence, il conçoit l'asepsie. En même temps, il formule la théorie microbienne, selon laquelle nombre de maladies infectieuses seraient causées par des micro-organismes. Il n'y a aujourd'hui plus aucun doute sur le fait que par exemple le syndrome d'immunodéficience humaine soit dû à son virus éponyme, que la tuberculose soit due au bacille de Koch ou que le paludisme soit dû au plasmodium. La théorie microbienne est aujourd'hui validée.

Dans son sillage, Elie Metchnikoff observa les réactions immunitaires au microscope. A l'institut Pasteur, il aperçut des cellules migrer sur le site de l'inflammation et phagocyter les agents étrangers. Ces découvertes contribuèrent fortement à former le champ d'étude qu'on appelle aujourd'hui l'immunologie, et dont les neutrophiles sont des acteurs majeurs.

## 2. Dénomination

Au carrefour de l'immunologie et de l'histologie, des scientifiques ont cherché à caractériser les cellules sanguines. En absence de coloration, on distingue les globules rouges des globules blancs. Parmi ces derniers, certains donnaient l'impression d'avoir plusieurs noyaux. On les a donc nommés des polynucléaires. C'est une erreur historique puisqu'on sait aujourd'hui qu'il n'y a qu'un seul noyau. Celui-ci est plurilobé, si bien qu'en observant un seul plan au microscope, on a l'impression qu'il y a plusieurs noyaux. On donna aussi le nom de granulocytes, car ces cellules contenaient dans leur cytoplasme des granules spécifiques. En outre, certains polynucléaires fixaient les colorations acides, d'autres les colorations basiques, et enfin la majorité n'en fixait aucune. Ainsi, ils étaient dits acidophiles, basophiles ou neutrophiles respectivement. Aujourd'hui, « neutrophile » est le terme consacré pour parler des granulocytes neutrophiles qui sont synonymes de polynucléaires neutrophiles, et comme environ 98% des polynucléaires sont neutrophiles alors « polynucléaires » fait souvent référence aux neutrophiles. Aujourd'hui encore un peut observer le noyau multilobé des neutrophiles, comme le montre la figure 1.

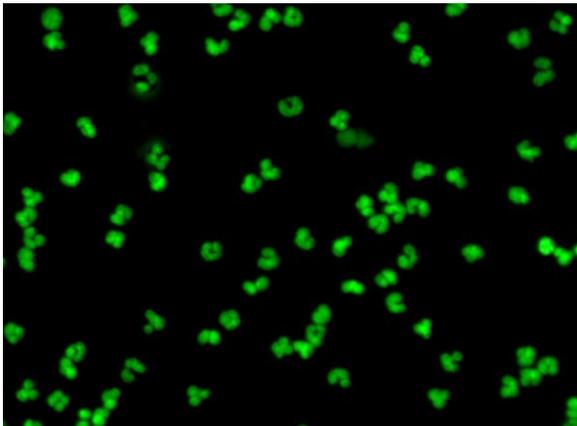


Figure 1 : Image de neutrophiles au microscope à fluorescence. Des neutrophiles humains ont été isolés et déposés au fond d'une lame de verre. Les cellules ont été fixées et on a coloré l'acide désoxyribonucléique (ADN) en vert. On observe cette forme du noyau tout à fait singulière. Les images ont été produites au laboratoire.

### 3. Du précurseur à l'effecteur

#### a) *Origine médullaire*

L'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse. N'importe quel vertébré provient de la cellule-œuf, qui est une cellule souche totipotente. Les cellules souches totipotentes se différencient en cellules souches pluripotentes. Après développement, des cellules souches situées dans la moelle osseuse sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent former plusieurs types de cellules. Les souches multipotentes se divisent, et certaines se différencient en précurseur myéloïde ou lymphoïde. Les précurseurs lymphoïdes donneront les lymphocytes B et T. Les précurseurs myéloïdes donneront les granulocytes neutrophiles, ainsi que les granulocytes éosinophiles, basophiles, les monocytes, les érythrocytes et les plaquettes. Durant la différenciation du neutrophile, le facteur de croissance hématopoïétique granulocytaire humain (G-CSF, de l'anglais *granulocyte-colony stimulating factor*) joue un rôle indispensable<sup>1,2</sup>.

Durant cette phase de différenciation, le neutrophile immature est maintenu dans la moelle osseuse. Les cellules immunitaires ne sont pas disposées au hasard. Des récepteurs de chimiokine se lient à leur ligand. L'emplacement de la cellule est ainsi déterminé par des gradients de chimiokines. On a remarqué que les chimiokines avaient des structures relativement proches. Elles ont une masse moléculaire comprise entre 8 et 12 kilodaltons (kDa), et ont une structure proche<sup>3</sup>. Le récepteur des chimiokines à motif CXC 4 (CXCR4, de l'anglais *chemokine CXC motif receptor 4*) a un rôle indispensable dans le maintien du neutrophile dans la moelle, et donc indirectement à sa différenciation. Le CXCR4 lie le ligand des chimiokines à motif CXC 12 (CXCL12, de l'anglais *chemokine CXC motif receptor 4*) qui est produit par les cellules stromales de la moelle osseuse. La perte de CXCR4 induit le relargage du neutrophile dans le sang<sup>4</sup>. Les structures des familles de chimiokines sont schématisées dans la figure 2.



Figure 2 : Représentation schématique des familles de chimiokines. Les lignes bleues représentent des acides aminés. C représente la cystéine. X représente n'importe quel acide aminé. Les traits rouges représentent des ponts disulfures. Ce sont des interactions chimiques donnent une structure tridimensionnelle à la protéine. De gauche à droite sont représentées les chimiokines de la famille C, CC, CXC et CX3C. L'image provient de l'article de Sahingur<sup>5</sup>.

### b) *Stades de développement*

Parmi les précurseurs myéloïdes se différencient les myéloblastes qui sont les premières cellules souches unipotentes, c'est-à-dire qui ne pourront se différencier qu'en granulocyte. A ce stade le noyau est rond et quelques granules primaires ou azurophiles se sont formées. Le myéloblaste se différencie en promyélocyte. A ce stade, le promyélocyte acquiert de plus en plus de granules primaires. Lorsque la cellule se charge en vésicules secondaires ou spécifiques, alors on est au stade du myélocyte. Le myélocyte est la dernière cellule capable de se diviser. Le myélocyte se différencie en métamyélocyte qui a perdu sa capacité de mitose. Le métamyélocyte se différencie en cellule à noyau en forme de bande (traduit de l'anglais *band cell*) et acquiert des granules tertiaires. Le dernier stade de développement est celui du neutrophile mature. On observe l'expression génique de certains facteurs de transcription clés, notamment ceux associés aux domaines CCAAT (C/EBP, de l'anglais *CCAAT enhancer-binding proteins*), le répresseur transcriptionnel indépendant des facteurs de croissance 1 (Gfi-1, de l'anglais *growth factor independent 1 transcriptional repressor*) ou encore le PU.1 en référence à son domaine de liaison à l'ADN riche en purine. Les récepteurs de type toll (TLR, de l'anglais *toll-like receptor*) et le récepteur au facteur de stimulation des colonies de granulocyte (G-CSF-R, de l'anglais *granulocyte colony-stimulating factor receptor*) apparaissent sur le neutrophile mature. Les stades de développement sont schématisés dans la figure 3.

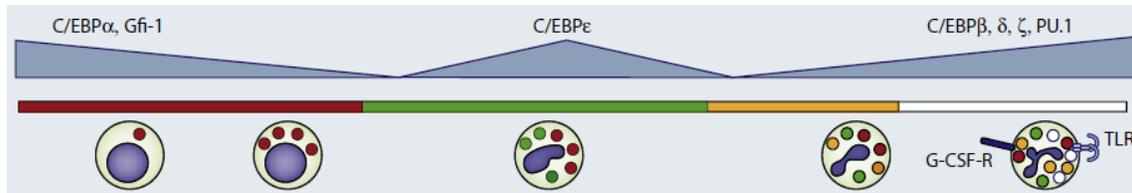


Figure 3 : Représentation schématique des stades de développement du neutrophile. De gauche à droite sont schématisés le myéloblaste, le promélocyte, le myélocyte et le métamyélocyte, la cellule en forme de bande et le neutrophile mature. Les disques bleus représentent le noyau, les disques rouges représentent les granules primaires, les verts les secondaires, les jaunes les tertiaires et les blancs les vésicules sécrétoires. Les expressions géniques relatives des facteurs de transcription C/EBP $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\beta$ ,  $\zeta$ , Gfi-1 et PU.1 sont schématisées.

### c) **Formation des granules**

Il y a quatre types de granules dans un neutrophile. Ces granules se forment successivement durant le développement du neutrophile. Les granules primaires, synonymes d'azurophiles, contiennent de la myéloperoxydase (MPO), de l'élastase (NE, de l'anglais *neutrophil elastase*) de la protéinase 3 (PR3) entre autres. Les granules secondaires sont dits spécifiques au neutrophile ; ils contiennent de la lactoferrine, du lysosome ou encore la cathélicidine qui est le précurseur du peptide antimicrobien LL-37. Les granules tertiaires contiennent la gélatinase ou des métalloprotéases matricielles. Les vésicules sécrétoires forment le quatrième type de granules. Elles n'émanent pas du golgi, mais proviennent de l'endocytose<sup>2,4,6</sup>. On y retrouve de l'albumine par exemple, qui n'est pas produite par le neutrophile et qui est retrouvée dans le sang. Ces granules ne sont pas toujours considérés comme tels, mais comme des vésicules d'endocytose<sup>2,4</sup>. Ces granules contiennent des composants de la membrane des neutrophiles<sup>6</sup>, et fusionnent à la membrane lorsque le neutrophile est activé, par exemple lors de la phase de diapédèse<sup>4</sup> que nous verrons plus loin. Les intégrines font partie de ces protéines membranaires susceptibles de se retrouver dans les vésicules sécrétoires à l'état basal puis de migrer vers la membrane lors de l'activation du neutrophile.

#### d) ***Diapédèse***

Il s'agit du processus par lequel le neutrophile quitte la circulation pour migrer dans un tissu. En situation physiologique, des neutrophiles matures circulent dans notre sang. En cas d'agression locale, une coupure par exemple, une inflammation se développe et des neutrophiles migrent sur site. Ce processus est en partie contrôlé par la cellule endothéliale. En effet, la cellule endothéliale peut exprimer des sélectines. Par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) le facteur de nécrose tumoral (TNF, de l'anglais *tumor necrosis factor*) ou l'interleukine (IL) 1 $\beta$  induisent l'expression des sélectines P et E à la surface des cellules endothéliales. Ces sélectines E et P se fixent aux sélectines L du neutrophile, induisant l'arrêt de sa migration dans le flux sanguin. On parle de capture. Dans un second temps, les intégrines du neutrophile s'activent et se lient aux ligands des intégrines de la cellule endothéliale. Parmi les intégrines, il y a l'intégrine alpha M, synonyme du cluster de différenciation (CD) 11b. La molécule d'adhérence cellulaire liée à l'antigène carcinoembryonnaire 8 (CEACAM8, de l'anglais *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8*), synonyme de CD66b a aussi un rôle dans l'adhérence cellulaire. « CD » désigne « cluster de différenciation », ces clusters sont des molécules de surface que l'on a remarquées et dénombrées afin de différencier les globules blancs. CD11b et CD66b seront étudiés en aval. La phase d'interaction entre les intégrines et leurs ligands est contemporaine d'un roulement du neutrophile contre les cellules endothéliales. Une phase de transmigration désigne le passage du neutrophile vers les tissus. Cette transmigration peut être paracellulaire c'est-à-dire entre deux cellules endothéliales, ou transcellulaire c'est-à-dire au travers d'une cellule endothéliale<sup>1,2,4</sup>.

## 4. Une cellule majeure de l'immunité

### a) ***De par son nombre***

Chez l'homme, les neutrophiles représentent environ 60% des globules blancs, et on estime que plus de  $10^9$  neutrophiles sont produits par jour par homme<sup>4</sup>.

Le neutrophile se développe dans la moelle osseuse puis rejoint le sang. A ce stade il est différencié et ne se divise plus. Le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF, de l'anglais *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) joue un rôle indispensable dans la différenciation du neutrophile.

### b) ***De par ses fonctions antimicrobiennes vitales***

Les neutrophiles sont largement impliqués dans la défense antimicrobienne. La peau ou les muqueuses forment une barrière contre les microorganismes. Une pénétration de ceux-ci, via une coupure par exemple, va induire un afflux massif de neutrophiles qui sont les premiers à arriver sur site. Les neutrophiles sont armés d'une multitude de récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires des pathogènes (PPR de l'anglais *pattern recognition receptor*). Ces récepteurs reconnaissent des composants des microorganismes (PAMP de l'anglais *pathogen-associated molecular pattern*). Par exemple, le LPS est un composant de certaines bactéries dites Gram- parce qu'elles ne sont pas colorées par la coloration de Gram. C'est un PAMP. Il est reconnu par le TLR4, qui est un PPR<sup>7</sup>. La liaison du ligand PAMP à son récepteur PPR va activer les fonctions effectrices du neutrophile. Depuis Metchnikoff, on sait qu'il est capable de phagocyter des microorganismes et de les digérer dans ses vésicules acides. Il est capable de dégranuler ses vacuoles dans le milieu extracellulaire, par exemple la lactoferrine ou les peptides antimicrobiens LL-37. Plus récemment, on a découvert ou redécouvert que les neutrophiles pouvaient extruder leur ADN décoré de protéines des granules, et que ces pièges extracellulaires (NET de l'anglais *neutrophil extracellular traps*) étaient eux aussi antimicrobiens<sup>8</sup>. En outre, plus la neutropénie est marquée plus le risque d'infection agmente<sup>9</sup>. La nétose est un phénomène très

étudié et sera développé plus en amont. Les mécanismes antimicrobiens du neutrophile sont schématisés dans la figure 4.

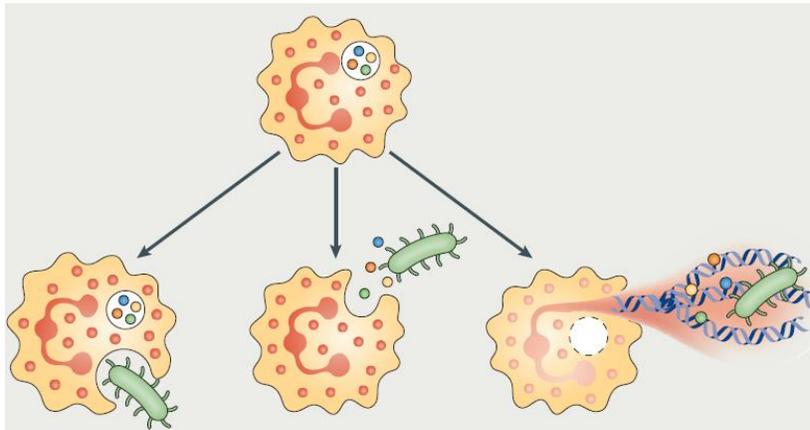


Figure 4 : Représentation schématique des mécanismes antimicrobiens du neutrophile. Un neutrophile mature est représenté en haut. Son noyau multilobé est représenté par les cercles rouges reliés. Un granule est représenté par le disque blanc, les protéines granulaires sont représentées par des points colorés. Une bactérie est représentée en vert. L'ADN est représenté par l'hélice bleue. La phagocytose est représentée à gauche, la dégranulation au centre, la nétose à droite. L'image est adaptée de l'article de Kubes<sup>1</sup>.

### c) ***De par son rôle de lanceur d'alerte***

Les neutrophiles sont les premières cellules à arriver sur site lors qu'une infection<sup>10</sup>, et constituent l'avant-garde du système immunitaire (traduit de l'anglais *first line of defense*)<sup>11</sup>. Un article récent le confirme en observant quatre vagues de cellules immunitaires à arriver sur site infectieux dont les neutrophiles qui constituent la première vague<sup>12</sup>. Les neutrophiles sont aussi les premiers sur site dans le cas d'inflammations stériles, ils sont attirés par des DAMP<sup>13</sup>. Après activation par le LPS par exemple, ils sécrètent des chimiokines telles que l'IL-8. Ces molécules chimiotactiques attirent les autres cellules de l'immunité, les monocytes puis les autres lymphocytes<sup>12</sup>. Afin de passer du sang au tissu, les cellules doivent traverser les cellules endothéliales qui tapissent l'intima des vaisseaux. Soit les PAMP et DAMP eux-mêmes, soit des

médiateurs de l'inflammation activent les cellules endothéliales. Le neutrophile passe du sang au tissu en plusieurs étapes. Premièrement les sélectines des cellules endothéliales se lient à leurs récepteurs situés sur le neutrophile et le maintiennent contre l'endothélium, c'est la phase de roulement ou d'accrochage selon les auteurs. La phase de roulement s'arrête après que le récepteur aux chimiokines des neutrophiles ait lié une chimiokine, ce qui active le neutrophile. Deuxièmement cette activation du neutrophile active les intégrines à sa surface, qui vont lier leur ligand situé sur la cellule endothéliale. C'est la phase d'adhérence ou d'adhérence ferme ou d'activation selon les auteurs<sup>1,2,4</sup>. Certains auteurs décrivent une phase de roulement qui suit la phase d'adhérence<sup>1</sup>. Des intégrines situées à la surface des neutrophiles se lient à leurs ligands à la surface des cellules endothéliales. Le CD11b est une des intégrines situées à la surface du neutrophile. Enfin le neutrophile franchit l'endothélium vasculaire, c'est la diapédèse ou extravasation selon les auteurs<sup>1,2,4</sup>. Le neutrophile peut passer entre deux cellules endothéliales ou travers de l'une d'entre elle. Les diapédèses sont alors dites paracellulaires ou transcellulaires respectivement<sup>1</sup>. Une augmentation du nombre de neutrophile et leur activation sur site oriente la migration des autres cellules immunitaires à cet endroit<sup>1</sup>. En outre, notre laboratoire a montré que le neutrophile activé par de la chromatine extracellulaire sécrète une forme soluble du CD66b<sup>14</sup> qui est susceptible d'avoir un effet chémoattractant sur les lymphocytes.

#### d) ***De par ses capacités pro-résolutives indirectes***

En condition physiologique, l'inflammation est une conséquence induite par une blessure ou une infection<sup>10</sup>. Il s'ensuit une phase d'inflammation aiguë caractérisée par de l'œdème et par le recrutement des neutrophiles. Ensuite on observe une dernière vague constituée des monocytes qui infiltrent le tissu lésé et se différencient en macrophages<sup>15</sup>. En même temps, des processus pro-résolutifs se mettent en œuvre et aboutiront *in fine* à la résolution de l'inflammation, qui est synonyme de retour à l'homéostasie. Parmi ces processus on peut citer le rôle clés des lipoxines, des résolvines, des protectines et des marésines. Ces médiateurs pro-résolutifs sont issus du métabolisme des acides gras<sup>15</sup>. Par exemple, les lipoxines diminuent la perméabilité endothéliale, ce qui diminue la diapédèse décrite plus haut et donc limite le nombre de neutrophiles recrutés dans le tissu<sup>10</sup>. Il a été décrit que les neutrophiles pourraient avoir des effets pro-résolutifs. En effet l'équipe de Serhan a montré que 15% des neutrophiles apoptotiques humains exprimaient le

CCR5, contre environ 2% chez des neutrophiles *ex vivo*. Le CCR5 se lie aux chimiokines CCL3 et CCL5. Dans un modèle murin de péritonite, le déficit en CCR5 induit une augmentation des CCL3 et CCL5 dans les exsudats péritonéaux. Ainsi les neutrophiles pourraient favoriser la résolution en séquestrant ces chimiokines<sup>16</sup>.

En outre, les neutrophiles, comme les macrophages, phagocytent. Cette phagocytose permet la clairance des débris inflammatoires, provenant de cellules mortes, de matrice extracellulaire ou bien de corps étranger. La clairance des débris et des microorganismes est un prérequis au retour à l'homéostasie, à la résolution de l'inflammation. Paul Kubes parle de *rebuilding*<sup>1</sup>.

On a cherché les chimiokines responsables de la migration des phagocytes. On a démontré que les nucléotides adénosine triphosphate (ATP) et uridine triphosphate (UTP) étaient relargués par les cellules apoptotiques, et que ces nucléotides étaient indispensables au recrutement des monocytes et des neutrophiles<sup>17</sup>. Ces nucléotides sont reconnus par le récepteur P2Y<sub>2</sub> situé sur les monocytes<sup>17</sup> et les neutrophiles<sup>18</sup>. Ce processus de clairance est considéré comme efficace et important. En effet on suspecte qu'un défaut de clairance laisserait les cellules apoptotiques relarguer leur contenu, et cela aurait un rôle dans des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique (LES). Ces signaux sont appelés « trouve-moi » et « mange-moi » (traduit de l'anglais *find me* et *eat me*)<sup>19</sup>.

Metchnikoff avait décrit que des phagocytes pouvaient aussi être phagocytés. Plus récemment on a démontré que les neutrophiles sénescents étaient phagocytés par des macrophages. Les neutrophiles étaient marqués radioactivement, cultivés pendant une heure dans un incubateur, puis présentés à des macrophages dérivés de monocytes humains. Après avoir retiré le surnageant, les macrophages adhérents au fond de la plaque de culture furent lysés et leur radioactivité mesurée. Ils montrèrent une corrélation entre la quantité de neutrophiles déposés et la quantité de neutrophiles ingérés. En outre, la quasi-totalité des neutrophiles était phagocytée<sup>20</sup>. Une autre équipe a observé qu'en 24h de culture, les neutrophiles perdaient leur noyau plurilobé pour devenir unilobé. C'est une marque de l'apoptose, et ce sont les neutrophiles apoptotiques qui étaient phagocytés par les macrophages<sup>21</sup>. Ce processus est dénommé « efférocytose »<sup>22</sup>. On a aussi démontré que les macrophages participent à la résolution de l'inflammation en sécrétant des molécules pro-résolutives telles que l'IL-10 après avoir phagocyté des corps apoptotiques<sup>23</sup>. Les corps apoptotiques de ces études ne proviennent pas des neutrophiles mais de lymphocytes T

apoptotiques<sup>24,25</sup>. Néanmoins au vu de leur nombre et puisque leur temps est compté, il paraît probable que ce sont les neutrophiles qui sont les principaux pourvoyeurs de cellules apoptotiques sur le site inflammatoire. En effet, *in vivo* la demi-vie maximum a été estimée à cinq jours dans un article<sup>26</sup>, et plutôt à dix heures dans un article qui se base pourtant sur les mêmes données que le premier<sup>27</sup>. Une étude sur le poisson-zèbre a estimé la durée de vie des neutrophiles à 120 heures<sup>28</sup>. Ces temps sont relativement courts. On peut supposer que l'effet d'un neutrophile apoptotique *in vivo* soit le même que celui des cellules apoptotiques des études citées en amont.

### e) ***De par leur diversité***

Les neutrophiles sont avant tout décrits comme des cellules bien différenciées, bien armées contre beaucoup de microorganismes, qui ne se divisent pas, qui ne sont pas plastiques et qui ne sont pas directement impliquées dans l'immunité adaptative. On se rend aujourd'hui compte de leur diversité. Il ne faut pas confondre la diversité et plasticité. La diversité est le nombre de molécules différentes qu'un même neutrophile peut exprimer en conditions physiologiques en l'état. Des molécules différentes peuvent induire des fonctions différentes. La plasticité est la capacité pour une cellule de modifier ses propres constituants en fonction de l'environnement de façon réversible. Les macrophages sont plastiques, ils expriment des gènes différents selon l'environnement. Dans un modèle murin, le transfert des macrophages péritonéaux dans des poumons induit une modification de 70 % des gènes exprimés. L'expression des gènes spécifiques du péritoine diminue au profit de l'expression des gènes spécifiques du poumon<sup>29</sup>.

Le neutrophile n'est pas considéré comme plastique comme le macrophage. Sa quantité moindre d'acide ribonucléique messager (ARNm) est considérée comme un argument en défaveur de la plasticité. Néanmoins, il existe des centaines de gènes qui sont modulés au cours de la stimulation du neutrophile. Par exemple, la sécrétion d'IL-8 est rapide, ce qui suggère une configuration de l'ADN autour gène *CXCL8* qui facilite sa transcription. En revanche, l'IL-6 est sécrétée plus tardivement, ce qui suggère un remodelage de la chromatine et la mise en place de la machinerie transcriptionnelle, notamment par l'acétylation des histones<sup>30</sup>. Ces modifications épigénétiques confèrent au neutrophile mature une plasticité transcriptionnelle<sup>31</sup>.

Le neutrophile est une cellule hétérogène<sup>31</sup>. En effet, une étude a montré que le transcriptome des neutrophiles de donneurs sains en condition physiologique est très variable<sup>31,32</sup>. Il existe une diversité spécifique à la moelle osseuse. Outre les progéniteurs on y trouve des neutrophiles sénescents. On avait vu en amont que CXCL4 était essentiel au maintien du précurseur dans la moelle osseuse. Les neutrophiles sénescents, c'est-à-dire sanguins cultivés pendant 6h *ex vivo*, réexpriment CXCL4. Cette réexpression de CXCL4 induit un retour des neutrophiles dans la moelle osseuse<sup>33</sup>. L'hétérogénéité des neutrophiles provient aussi de la granulopoïèse d'urgence (de l'anglais *emergency granulopoïesis*). Cette production de neutrophile accélérée a été décrite initialement en condition de choc septique. Une équipe japonaise a notamment montré que la concentration plasmatique du facteur de stimulation des colonies de granulocytes humain (G-CSF, de l'anglais *granulocyte-colony stimulating factor*) augmentait lorsque les patients étaient infectés par divers microorganismes tels que *Escherichia coli*<sup>34</sup>. La particularité des neutrophiles ainsi produits est leur immaturité. En effet, Marini et ses collègues ont montré que l'injection de G-CSF à des sujets sains induisait le relargage de deux sous-types de neutrophiles. En condition physiologique la majorité des neutrophiles sanguins expriment le CD10 et ont une densité normale. Nous avons également observé que la majorité des neutrophiles de densité normale exprimaient le CD10 dans notre laboratoire. Dans les expériences de Marini, après traitement au G-CSF, il apparaît deux populations de neutrophiles, ceux de densité normale (NDG, de l'anglais *normal density granulocyte*) et ceux de densité basse (LDG, de l'anglais *low density granulocyte*). Chez les sujets traités au G-CSF, LDG et NDG ont une expression du CD10 qui diminue par rapport aux sujets non-traités<sup>35</sup>. D'autres papiers se sont intéressés aux neutrophiles immatures et leurs effets sur l'organisme. En effet une équipe australienne a généré des souris qui n'expriment pas le gène suppresseur de la signalisation des cytokines 3 (SOCS3, de l'anglais *suppressor of cytokine signaling 3*). Stimulées avec du G-CSF, les neutrophiles de ces souris avaient un transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3, de l'anglais *signal transducer and activator of transcription 3*) activé de manière prolongée. Stimulés au G-CSF, les neutrophiles déficients en SOCS3 (SOCS3-KO, de l'anglais *knock out*) proliféraient plus avaient une durée de vie plus longue que les neutrophiles normaux. Comme on l'a vu plus haut, en condition physiologique les précurseurs des neutrophiles perdent leur capacité à se diviser lors de la différenciation. En conséquence, les auteurs observaient une polynucléose ainsi qu'une infiltration excessive de neutrophiles dans tous les tissus testés. Une parésie, c'est-à-dire une

faiblesse musculaire, en résultait<sup>36</sup>. Parce que la granulopoïèse d'urgence est spécifique de la septicémie, des auteurs proposent le terme de « granulopoïèse réactive » (de l'anglais *reactive granulopoiesis*) pour décrire les neutrophiles qui apparaissent dans les cas d'inflammation stérile, comme le cancer ou les maladies auto-immunes<sup>37</sup>. Ces degrés divers de maturation soulignent une hétérogénéité des neutrophiles. En outre, une équipe allemande a montré qu'entre 5 et 8% des neutrophiles sanguins expriment un récepteur des cellules T (TCR, de l'anglais *T cell receptor*) qui semblait fonctionnel<sup>38</sup>. En effet, une stimulation du récepteur des cellules T via des billes anti-CD3 induisait une légère augmentation de la sécrétion d'IL-8<sup>38</sup>. Toutes ces données montrent l'hétérogénéité des neutrophiles.

#### f) ***De par la capacité à inhiber la prolifération des lymphocytes T***

Certains neutrophiles peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T. Revenons sur le papier de Marini qui décrit des neutrophiles immatures<sup>35</sup>. Les auteurs ont testé la capacité de ces neutrophiles à inhiber la prolifération de lymphocytes T *in vitro*. Les neutrophiles des sujets non-traités n'inhibent pas la prolifération. En revanche parmi les patients traités au G-CSF, les NDG inhibent la prolifération, et les LDG inhibent la prolifération uniquement s'ils contiennent plus de 20% de CD10+. En résumé le G-CSF induit des neutrophiles immatures dont certains inhibent la prolifération des lymphocytes T. Les auteurs ont retrouvé de tels neutrophiles dans le sang de patients atteints de tumeur, ce qui fait sens puisqu'il est connu que les tumeurs inhibent le système immunitaire pour survivre. De manière inattendue, les auteurs en ont retrouvé dans le sang de patients lupiques<sup>35</sup>. Une équipe néerlandaise a obtenu des résultats similaires<sup>39</sup>. Les auteurs ont simulé une septicémie chez des donneurs sains en utilisant de l'endotoxine qui est synonyme du LPS mentionné en amont. Ils ont aperçu une sous-population de neutrophiles absente dans la condition contrôle. Cette sous-population inhibait aussi la prolifération des lymphocytes T induite par phytohémagglutinine (PHA). Dans ce modèle, le contact cellulaire entre le neutrophile et le lymphocyte était indispensable à l'inhibition de la prolifération. L'ajout de la catalase diminuait l'effet du neutrophile. La catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène. Il semble qu'une libération de peroxyde d'hydrogène par le neutrophile vers la membrane du lymphocyte joue un rôle clé dans ce processus d'inhibition de la prolifération. Le rôle clé de

l'antigène des macrophages 1 (Mac-1, traduit de l'anglais *macrophage-1 antigen*) a été révélé<sup>39</sup>. Mac-1 est un complexe formé des intégrines CD11b et CD18.

**g) De par leur capacité à acquérir la fonction de présentation d'antigène**

De même, il a été démontré que les neutrophiles pouvaient présenter l'antigène. Une équipe suédoise a isolé les neutrophiles, les cellules dendritiques myéloïdes (MDC, de l'anglais *myeloid dendritic cell*) et les lymphocytes T CD4+ de donneurs portant le cytomégalovirus (CMV)<sup>40</sup>. Les antigènes du CMV étaient cultivés avec les MDC ou les neutrophiles afin de permettre aux cellules d'apprêter l'antigène, c'est-à-dire de la découper et de présenter le peptide. Les détails de l'apprêtement seront développés en amont. Les auteurs ont montré qu'à l'instar des MDC les neutrophiles induisent la prolifération des lymphocytes CD4+. De manière étonnante, c'est le surnageant de lymphocytes CD4+ stimulés par l'antigène qui conférait au neutrophile une surexpression des molécules de costimulation indispensables à la présentation de l'antigène, qui elles aussi seront développées en amont<sup>40</sup>. Cela souligne que dans certaines situations, les neutrophiles peuvent se comporter comme une cellule présentatrice d'antigène (APC, de l'anglais *antigen-presenting cell*).

On a montré des phénomènes comparables chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). En effet, une équipe allemande a remarqué qu'environ 30% des neutrophiles du liquide de synovial de patient PR exprimaient le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), et environ 15% exprimaient le CD83<sup>41</sup>. Le CD83 est considéré comme un marqueur de maturation de la cellule dendritique<sup>42</sup>. De manière intéressante, il était possible d'induire ces deux molécules sur des neutrophiles en les cultivant avec du liquide synovial<sup>41</sup>. Néanmoins, des signaux de costimulation sont nécessaires à la présentation de l'antigène, et n'ont pas été décrit dans le papier. Une démonstration de l'activation de la prolifération des cellules T n'a pas non plus été mise en évidence<sup>41</sup>.

Ces expériences montrent une certaine plasticité du neutrophile, ce qui contredit le dogme du neutrophile qui ne serait absolument pas plastique, comme on l'a décrit en amont. Ces expériences montrent aussi que dans certains cas le neutrophile peut présenter l'antigène. Cela rompt avec un autre dogme, celui du neutrophile qui ne serait absolument pas impliqué dans

l'immunité adaptative. A mon sens, ces expériences tiennent plus de l'exception que de la règle, du moins pour l'instant.

#### h) ***De par certains neutrophiles auxiliaires aux lymphocytes B***

Un autre aspect étonnant est la capacité à se comporter comme auxiliaire au lymphocyte B. Chez la souris, une équipe catalane a montré que des neutrophiles se retrouvaient dans la rate au pourtour de clusters de lymphocytes B. *In vitro*, ces neutrophiles auxiliaires (N<sub>BH</sub>, de l'anglais *neutrophil B helper*) induisent la sécrétion d'anticorps par des lymphocytes B, alors que les neutrophiles conventionnels (N<sub>C</sub>) n'induisent pas cette sécrétion. En outre, les N<sub>BH</sub> induisent le gène de la cytidine déiminase induite par l'activation (AID, de l'anglais *activation-induced cytidine deiminase*) qui est impliquée dans l'hypermutation somatique. De plus, les auteurs ont observé dans les immunoglobulines (Ig) que les chaînes lourdes M étaient remplacées par des chaînes lourdes A ou G, typique de la commutation de classe. Il est possible d'induire *in vitro* des N<sub>BH</sub> à partir de N<sub>C</sub> avec de l'IL-10, elle-même sécrétée *in vivo* par les cellules endothéliales spléniques sinusoidales. Les auteurs rangent cette fonction dans l'immunité innée (*neutrophils may generate an innate layer of antimicrobial immunoglobulin defense by undergoing MZ B cell-helper reprogramming in the spleen*)<sup>43</sup>. Une illustration de la commutation de classe est donnée dans la figure 5.

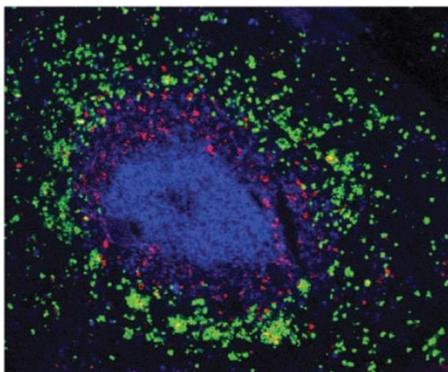


Figure 5 : Image représentant la commutation de classe à proximité des neutrophiles. Une coupe de zone marginale de rate murine a été fixée et perméabilisée. L'élastase des neutrophiles est en vert, les IgA en rouge, les IgD en bleu. L'image provient de l'article de Puga<sup>43</sup>.

i) ***De par leurs implications dans les maladies auto-immunes***

Les neutrophiles sont considérés comme des acteurs majeurs impliqués dans la physiopathologie de maladies auto-immunes ou inflammatoires sans que l'on puisse définir clairement leur rôle. On peut citer la PR, le LES<sup>44,45</sup>, la maladie de Still de l'adulte, la vascularite associée aux anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA, de l'anglais *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)<sup>44</sup>. Notre laboratoire a montré que les neutrophiles sécrétaient de l'interféron (IFN)  $\alpha$  en réponse à de la chromatine extracellulaire<sup>46</sup>. L'implication du neutrophile dans la physiopathologie de la PR sera développée en aval. Il semblerait que ce sont souvent les NET qui sont responsables de l'effet physiopathologique des neutrophiles.

## 5. Neutrophil extracellular traps

### a) *Découverte*

La première découverte des NET pourrait être attribuée à Metchnikoff. A l'Institut Pasteur, il observe des réactions immunitaires au microscope et réalise des croquis. Il lèse la nageoire d'un batracien et écrit : « on constate facilement que chez ces animaux les cellules polynucléaires se transforment d'abord en mononucléaires par l'effet d'une fusion des noyaux, et ensuite en véritables cellules étoilées fixes du tissu conjonctif »<sup>47</sup>.

Le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), synonyme du 12-O-Tétradécanoylphorbol-13-acétate de tétradécanoyle (TPA), a été décrit à l'origine comme pro-tumoral<sup>48</sup>. Le PMA a une structure proche du diacylglycérol (DAG) qui est connu pour activer la protéine kinase C (PKC), elle-même connue comme une protéine clef dans la transduction du signal de nombreux processus physiologiques. C'est Hiroshi Takei et ses collègues qui reportèrent les premiers que le PMA induit chez le neutrophile une mort cellulaire distincte de l'apoptose ou de la nécrose, avec encore cette décondensation du noyau dans le cytoplasme qui précède la rupture de la membrane plasmique<sup>49</sup>. En 2004, Volker Brinkmann et ses collègues de l'équipe supervisée par Arturo Zychlinsky firent une nouvelle découverte. En stimulant aussi le neutrophile avec du PMA, ils observèrent une extrusion de l'ADN du neutrophile décoré de protéines granulaires à l'extérieur de la cellule. Au microscope électronique à balayage, ils s'aperçurent que ces filaments piégeaient les bactéries<sup>50</sup>. C'est après avoir nommé les NET, de l'anglais *neutrophil extracellular traps*, qu'on nomma la mort cellulaire associée, la nétose. Le préfixe « ose » est utilisé en biologie pour désigner un type de mort cellulaire, par exemple « apoptose » ou « nécrose ». On verra par la suite que la formation de NET n'implique pourtant pas forcément la mort du neutrophile, ce qui peut amener de la confusion, et la sémantique a évolué. C'est ce papier de 2004 qui est souvent cité comme le premier décrivant la nétose, c'est ainsi qu'il est décrit par Paul Kubes<sup>1</sup> par exemple. Depuis c'est un sujet très étudié.

## b) ***Formation de NET et nétozes in vitro***

Il est généralement admis que la nétose se caractérise par une décondensation nucléaire dans le cytoplasme avant la rupture de la membrane plasmique, et que les filets d'ADN extrudés contiennent des protéines granulaires comme la NE ou la MPO. Les meilleures méthodes utilisées pour détecter les NET sont ainsi un ELISA en sandwich qui fixe d'un côté l'ADN et de l'autre une protéine granulaire, et/ou une colocalisation de ceux-ci en immunofluorescence, avec ou sans une vidéo des neutrophiles en train de nétoser avec un colorant de l'ADN perméable et un colorant imperméable<sup>51</sup>. Une colocalisation de l'ADN et de la NE est montrée dans la figure 6.

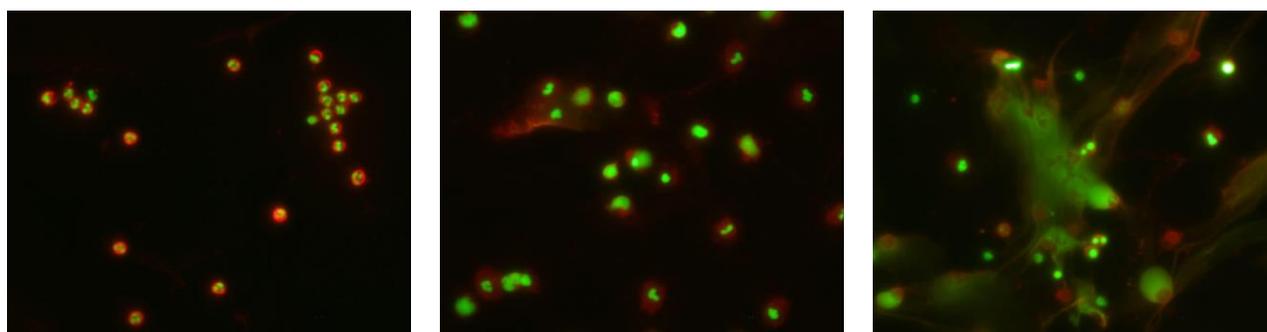


Figure 6 : Image de la nétose induite par le PMA. Des neutrophiles humains ont été isolés et déposés au fond d'une lame de verre. Les cellules ont été fixées et on a coloré l'ADN en vert, et l'élastase des neutrophiles (NE) en rouge. A gauche, les cellules ne sont pas stimulées. Au milieu et à droite, les neutrophiles ont été stimulés avec du PMA. Au milieu on observe une décondensation de l'ADN. A droite, on observe que l'ADN a été extrudé hors de la cellule, et qu'il est co-localisé avec la NE. Les images ont été produites au laboratoire.

Nous n'avons pour l'instant mentionné que la nétose induite par le PMA. Or, il existe beaucoup d'autres nétozes et de formations de NET décrits dans la littérature, avec des inducteurs différents, des caractéristiques biochimiques et même cellulaires différentes. Toutes ces caractéristiques ne seront pas détaillées ici. Brièvement, on peut distinguer la nétose observée *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, une étude récente a montré que la PMA, les ionophores calciques ou certains micro-organismes induisaient des nétozes distinctes par leur nécessité d'avoir un apport

calcique, par la citrullination des histones, par l'implication des espèces réactives de l'oxygène<sup>52,53</sup>. Ces nétozes interviennent après au moins deux heures de culture. Certains considèrent que les ionophores n'induisent pas une véritable nétoze mais une mort spécifique caractérisée par l'hypercitrullination (LTH, de l'anglais *leukotoxic hypercitrullination*)<sup>53</sup>. Shida Yousefi a décrit que les neutrophiles pouvaient extruder en un quart d'heure leur ADN mitochondrial sans que l'enveloppe nucléaire n'en soit affectée<sup>54</sup>. Dans ce cas, il y a production de NET sans nétoze, c'est-à-dire sans mort cellulaire. Aux Etats-Unis, le groupe de Mariana Kaplan a décrit que les LDG de patient lupique sont particulièrement prompts à la nétoze spontanée<sup>55</sup>, de même que l'ensemble des neutrophiles issus de patient atteint de PR<sup>56</sup>. En outre, des auteurs dont Paul Kubes ont montrés un autre type de formation de NET<sup>57</sup>. En effet, ils ont montré qu'en réponse à *Staphylococcus aureus*, les neutrophiles forment des vésicules remplies de chromatine et l'extrude en 5 à 60 minutes. Ce n'est pas de la nétoze puisque le neutrophile ne meurt pas, la membrane plasmique n'est pas lysée. Seule une minorité d'ADN mitochondrial était extrudé<sup>57</sup>, à l'inverse de la formation de NET décrite par Yousefi<sup>54</sup>. En résumé, des mécanismes différents gouvernent ces différentes nétozes ou formations de NET et se produisent selon les stimuli. Parmi ces évènements, l'hypercitrullination des protéines du neutrophile. Le rôle de la citrullination dans la nétoze sera développé en amont. La présence d'hypercitrullination a été estimée selon le stimulus dans la figure 7.

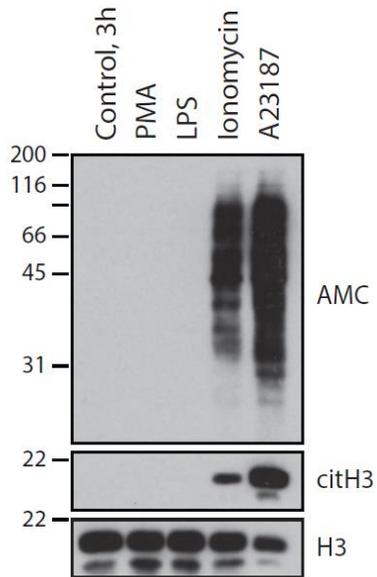


Figure 7: *Western blot* montrant l'hypercitrullination. Des neutrophiles ont été cultivés 3h avec ou sans PMA, LPS, ionomycine (Ionomycin) ou l'ionophore calcique A23187. Ils furent lysés et un western-blot a été réalisé. Les protéines citrullinées ont été détectées (AMC, *anti-modified citrulline*). Les histones citrullinées H3 (citH3) ou non (H3) ont aussi été détectées. L'image provient de l'article de König<sup>53</sup>.

### c) *Peptidyl-arginine déiminase*

L'hypercitrullination comme la citrullination ne sont pas des réactions chimiques qui se produisent seules, au contraire elles ont besoin des peptidyl-arginine déiminases qui sont les enzymes qui catalysent la conversion d'une arginine en citrulline. Toutes les PAD ont besoin de calcium pour exercer leur activité catalytique. La citrullination est représentée dans la figure 8.

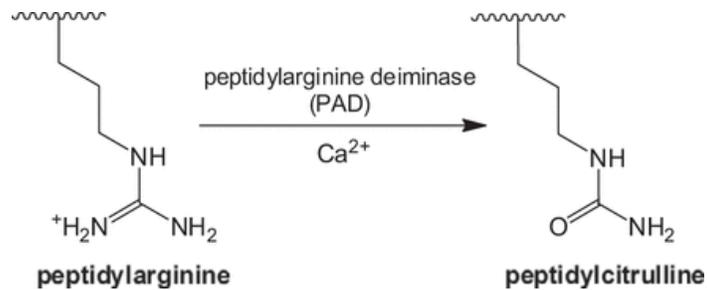


Figure 8 : Représentation schématique topologique de la citrullination. Les ondulations représentent la chaîne peptidique. Les traits représentent des liaisons covalentes entre atomes de carbone de la chaîne latérale de l'arginine qui devient citrulline. N représente l'azote, H l'hydrogène et O l'oxygène. + représente la charge positive.  $\text{Ca}^{2+}$  indique que la PAD a besoin de calcium pour exercer son activité enzymatique. L'image provient de l'article de Hensen<sup>58</sup>.

Abrégées PAD, on en dénombre 5 qui sont la PAD 1, 2, 3, 4 et 6. En effet la PAD 5 a été décrite sans que l'on se rende compte qu'il s'agissait de PAD 4, et pour éviter toute confusion, on ne renomma pas PAD 5. Les gènes de PAD 1, 2, 3, 4 et 6 sont distincts et mesurent entre 29 et 56 kilobases (kb) chacun, regroupés dans une région de 335kb sur le bras court du chromosome 1<sup>59</sup>. Brièvement, PAD1 est exprimé dans l'épiderme et l'utérus, PAD2 dans le système nerveux, le système lymphatique, la moelle osseuse, PAD3 dans les follicules pileux, PAD4 dans les granulocytes, PAD6 dans les ovaires<sup>59</sup>. La citrullination est physiologique. La citrullination pourrait également générer des néo-antigènes en excès, notamment dans la PR. Ces néo-antigènes induiraient une réaction immunitaire, on parle alors d'auto-antigènes. C'est une hypothèse répandue dans la littérature<sup>60,61</sup>. Le tissu synovial<sup>62</sup> tout comme les liquides articulaires<sup>63</sup> de patients atteints de PR contiennent PAD2 et PAD4.

#### d) **Formation de NET in-vivo**

Au Canada, Paul Kubes est le parangon de la visualisation de la formation de NET *in vivo*. Il écrit que cette extrusion de NET doit être de l'ordre de quelques minutes, sinon les microorganismes ont le temps de se multiplier. Lui et son équipe ont montré qu'en condition septique, les plaquettes induisent une extrusion de NET rapide<sup>64</sup>. *In vivo*, il a montré que les neutrophiles extrudaient effectivement leur ADN, mais ne mourraient pas. Au contraire ils conservent des capacité de mobilité et même de phagocytose<sup>65</sup>. Le terme « nétose vitale » est parfois utilisé mais contradictoire, puisque le suffixe « ose » fait référence à la mort cellulaire. Un schéma de la formation de NET vitale est présenté dans la figure 9.

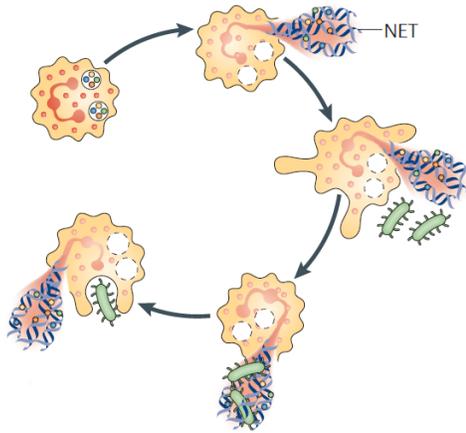


Figure 9 : Représentation schématique de la formation de NET vitale. La première image représente un neutrophile. La deuxième représente la nétose. La troisième représente la migration du neutrophile nétotique vers la bactérie en vert. La quatrième représente des bactéries piégées dans les NET dont l'ADN est en bleu. La cinquième représente la phagocytose de la bactérie. L'image provient de l'article de Kubes<sup>1</sup>.

### e) **Focus sur la nétose induite par le PMA**

Toutes les expériences de ce manuscrit sont *in vitro*, et la majorité des NET a été produite avec le PMA. Je vais donc en détailler les voies biochimiques, qui ont été étudiées par l'équipe d'Arturo Zychlinsky. Le PMA est un activateur de la PKC. Abdul Hakkim a montré qu'en aval, la voie de signalisation Rak-MEK-ERK était impliquée, et qu'ensuite la NADPH oxydase l'était à son tour, générant des espèces réactives de l'oxygène<sup>66</sup>. Encore plus en aval, Venizelos Papayannopoulos avait montré que les espèces réactives de l'oxygène induisait un relargage de NE des granules vers le cytoplasme, puis la NE cytoplasmique migre dans le noyau et clive les histones, permettant une décondensation de l'ADN<sup>67</sup>. Récemment, Gabriel Sollberger montra que la gasdermine D jouait un rôle indispensable dans cette nétose<sup>68</sup>. Encore en aval, la gasdermine D induit à la fois une perméabilisation des granules et de la membrane plasmique. Ces étapes sont schématisées dans la figure 10.

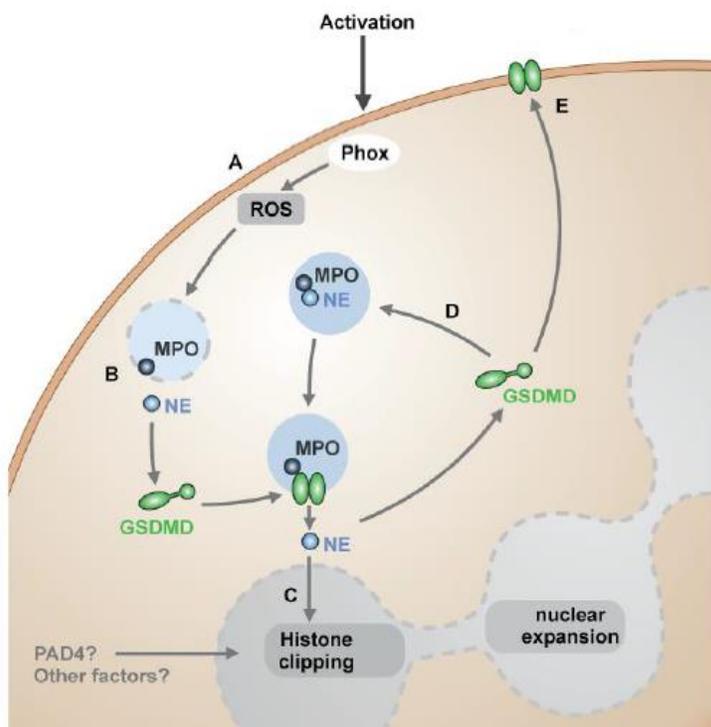


Figure 10 : Représentation schématique des mécanismes de la nétose induite par le PMA. La NADPH oxydase est représentée (Phox, *phagocyte oxidase*). Phox génère des ROS (A). Les ROS induisent le relargage du NE des granules (B). NE clive la gasdermine D en vert, abrégée GSDMD. La GSDMD forme des pores qui augmentent le relargage du NE. NE clive les histones (C). La GSDMD amplifie le relargage du NE (D). La GSDMD forme des pores à la membrane plasmique (E). L'image est tirée de l'article de Sollberger<sup>68</sup>.

De manière importante, chez l'homme, la citrullination des histones a lieu au cours de la nétose, mais ne semble pas indispensable à son déroulement<sup>52</sup>. Certaines expériences chez la souris suggèreraient l'inverse<sup>69,70</sup>. Ces expériences sont basées sur l'utilisation de neutrophiles de souris normales ou PAD4-KO. Les auteurs ont quantifié la nétose en marquant les histones citrullinées et en l'observant au microscope à fluorescence la colocalisation entre ADN extracellulaire et histones citrullinées. L'équipe de Zychlinsky a souligné le fait que les souris PAD4-KO ne pouvaient pas citrulliner les histones. Ainsi, même si les neutrophiles PAD4-KO nétoisent, il est impossible de le quantifier. Zychlinsky suggère d'utiliser d'autres marqueurs plus classiques de la nétose indépendants de la citrullination, comme la NE ou la MPO<sup>52</sup>.

#### f) **NET agrégés**

L'équipe de Herrmann a étudié la nétose dans la crise de goutte qui est une maladie causée par la précipitation des cristaux d'acide urique. Les cristaux d'acide urique activent entre autres les macrophages via l'inflammasome, et de l'IL-1 $\beta$  est sécrétée. Ils ont montré que ces cristaux induisaient la nétose en observant la colocalisation de l'ADN avec la NE au microscope à fluorescence. Ils ont montré que dans ces conditions de concentration des neutrophiles, les NET s'agrégeaient. Ces NET agrégés détruisaient n'importe quelles cytokines co-incubées en 24h. Les souris mutées sur le facteur cytosolique neutrophilique 1 (Ncf1, de l'anglais *neutrophil cytosolic factor 1*) ne sont pas capables de produire de NET. Dans un modèle de goutte, les souris Ncf1-KO ont les articulations qui restent totalement enflées après 46 jours, alors que les souris témoins voyaient un retour à l'homéostasie dès le neuvième jour<sup>71</sup>. Ce cas particulier de la goutte montre l'effet anti-inflammatoire ou pro-résolutif des NET agrégés.

#### g) **NET et maladies auto-immunes**

Les NET sont suspectés de jouer un rôle dans le LES. En effet l'équipe de Mariana Kaplan a montré que des complexes immuns issus de ribonucléoprotéines induisent une relocalisation des mitochondries à la surface des neutrophiles, relarguant de l'ADN mitochondrial oxydé dans le milieu extracellulaire<sup>72</sup>. Ce phénomène se produit spontanément dans des neutrophiles de basse densité issus de patients lupiques. Dans un modèle murin, cet ADN mitochondrial oxydé induit une augmentation des ARNm des gènes stimulés par l'interféron de type I<sup>72</sup>. En outre, il est connu que les patients atteints de LES ont un DNase I déficiente, par exemple à cause d'auto-anticorps anti-DNase I. Selon Zychlinsky, ce défaut de DNase I induirait une exposition prolongée des NET, ce qui pourrait induire des auto-anticorps, et consécutivement de complexes immuns qui participent à la destruction du rein qui est une des caractéristiques cliniques du LES<sup>73</sup>.

Comme pour le LES, les NET sont suspectés de fournir des auto-antigènes dans d'autres maladies rhumatismales, définies par l'inflammation et la destruction des articulations, notamment la PR et les vascularites<sup>73</sup>. Le rôle des NET est suspecté par une autre équipe spécifiquement sur les vascularites à ANCA<sup>45</sup>. Le rôle des NET dans la PR sera développé en aval.



## B. La polyarthrite rhumatoïde

### 1. Un rhumatisme inflammatoire chronique d'origine auto-immune

Les maladies rhumatismales auto-immunes regroupent la PR, le LES, le syndrome de Sjögren, la sclérodermie, la myosite inflammatoire systémique, les vascularites systémiques, ainsi que l'arthrite juvénile idiopathique. Le diagnostic de PR est difficile, jusqu'à 50% des patients l'obtiennent après un an. De nombreuses manifestations cliniques sont partagées<sup>74</sup>.

En tant que maladie auto-immune systémique, la PR partage des manifestations immunologiques communes que sont la présence d'auto-anticorps ainsi qu'une augmentation du nombre de cytokines et chimokines pro-inflammatoires. La PR elle-même est parfois considérée comme un syndrome, un ensemble de manifestations phénotypiques n'ayant pas les mêmes causes biologiques<sup>75</sup>.

La PR est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires. Cette maladie touche le monde entier. La PR débute à tout âge, le plus souvent à cinquante ans. Sa prévalence se situe entre 0,3 et 0,8 % en France<sup>76</sup>.

La PR est caractérisée par une destruction articulaire. Cette atteinte débilite la qualité de vie. La PR a un coût pour la société. Ce coût est réparti entre la baisse de la productivité et la consommation de soins. En effet les biothérapies actuelles ont un prix élevé<sup>77</sup>. En outre, la PR diminue l'espérance de vie. En effet le rapport entre le nombre de décès chez les patients PR sur le nombre de décès attendu dans la population générale est supérieur à 2<sup>78</sup>.

## 2. Diagnostic et évolution

### a) *Signes cliniques précoces*

La PR est souvent évoquée devant des signes cliniques révélateurs. Dans 70% des cas, les premiers signes sont des douleurs et des gonflements des articulations des poignets ou des articulations métacarpo-phalangiennes ou interphalangiennes proximales<sup>78</sup>. Ces signes cliniques sont montrés dans la figure 11. Ces signes cliniques sont bilatéraux et globalement symétriques<sup>76</sup>. Les douleurs sont nocturnes et maximales au réveil, ce qui est typique des douleurs inflammatoires. On note un enraidissement le matin. Les doigts prennent un aspect en fuseau. Dans d'autres cas l'atteinte articulaire commence par les grosses articulations que sont les genoux, les coudes ou les épaules. Les ténosynovites font partie du tableau clinique. Ces inflammations du tendon et de sa gaine synoviale se développent le plus souvent sur les tendons des extenseurs des doigts, des fléchisseurs des doigts, de l'extenseur ulnaire du carpe<sup>78</sup>. Une illustration clinique de la ténosynovite est fournie dans la figure 11. Ces inflammations peuvent induire leur rupture, ce qui cause un handicap fonctionnel majeur. On note souvent de l'amaigrissement et de l'asthénie.

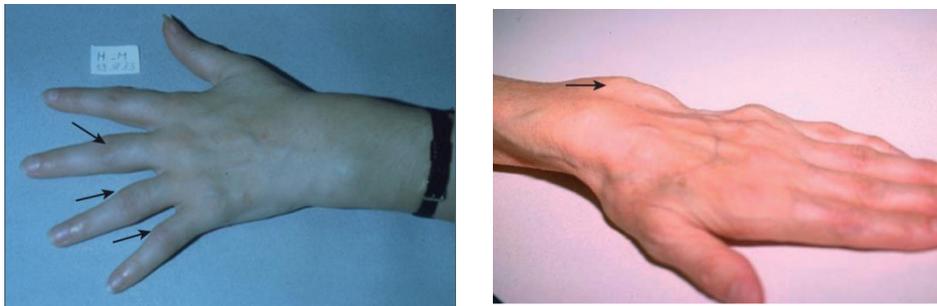


Figure 11 : Photographie des mains de patients atteints de PR débutante. A gauche, des aspects « en fuseau » des doigts sont indiqués par des flèches. A droite, une ténosynovite est indiquée par la flèche. L'image provient de l'article de Combe.<sup>78</sup>

### b) ***Signes biologiques précoces***

Lorsque la PR est suspectée devant ces signes cliniques, un bilan biologique est réalisé. L'inflammation est estimée par la vitesse de sédimentation des érythrocytes (VS) et la protéine C réactive (CRP, de l'anglais *C reactive protein*). Un hémogramme peut montrer une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles<sup>76</sup>. Certains anticorps sont associés à la PR et peuvent être détectés des années avant le début de la maladie. Les facteurs rhumatoïdes (FR) et les anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA, de l'anglais *anti-citrullinated peptide antibodies*) sont titrés. ACPA et FR seront développés plus loin. Les anticorps anti-nucléaires sont également titrés<sup>78</sup>. Certains antinucléaires sont spécifiques d'autres maladies. Par exemple, les anticorps anti-ADN natif sont rares dans la PR, et spécifiques du LES<sup>79</sup>. Une biopsie du liquide articulaire permet d'écarter une origine infectieuse. Dans la PR, de nombreux neutrophiles et macrophages infiltrent la synovie<sup>78</sup>.

### c) ***Signes radiographiques précoces***

Des examens radiographiques sont prescrits, à la recherche de lésions érosives précoces<sup>78</sup>. On observe en général des articulations normales. Parfois, on observe des pincements des interlignes articulaires. Ces examens radiographiques sont répétés tous les six mois la première année puis tous les ans pendant deux ans puis espacés progressivement dans le but de suivre l'évolution de l'érosion osseuse<sup>76</sup>.

### d) ***Diagnostic différentiel***

Cette partie illustre le caractère pléomorphe des rhumatismes inflammatoires. Devant une PR, on élimine plusieurs maladies avant de poser son diagnostic. Il serait fastidieux d'être exhaustif. Ainsi ne seront mentionnés que les grands groupes de maladies à exclure. On élimine les polyarthrites d'origine bactérienne, les polyarthrites d'origine virale, certaines arthrites parasitaires. On élimine les spondyloarthrites, comme la spondylarthrite ankylosante ou le rhumatisme psoriasique. Il existe aussi d'autres rhumatismes inflammatoires comme la pseudo-polyarthrite rhizomélisque. Des connectivites sont à écarter, comme le LES ou le syndrome de Gougeot-Sjödren primitif. Il faut aussi penser aux vascularites, aux arthropathies métaboliques ou encore à l'arthrose qui s'accompagne parfois étonnement de poussées congestives<sup>78</sup>.

### e) **Les critères de l'ACR/EULAR**

Afin de se mettre d'accord sur ce qu'est la PR, le collège américain de rhumatologie (ACR, de l'anglais *american college of rheumatology*) et la ligue européenne contre les rhumatismes (EULAR, de l'anglais *european league against rheumatism*) se sont réunis et ont cherché à définir un score. De manière importante, la PR peut être diagnostiquée si le patient a des érosions radiologiques « typiques » de la PR, même si le score de l'ACR le contredit<sup>78,80,81</sup>. Le score va de 0 à 10, et un score d'au moins 6 est requis pour que le patient soit considéré comme atteint de PR. Ce score a été développé sur des PR débutantes dans le but d'aider le clinicien et classer les patients<sup>78</sup>. Il y a quatre critères. Le premier est l'atteinte articulaire clinique. On compte les articulations gonflées. Le second critère est la sérologie, notamment la présence de FR et d'ACPA qui sont plus ou moins présents. Le troisième critère est la mesure de l'inflammation via la CRP et de la VS définis en amont. Le quatrième et dernier critère est la durée des symptômes. Le détail est donné dans la figure 12.

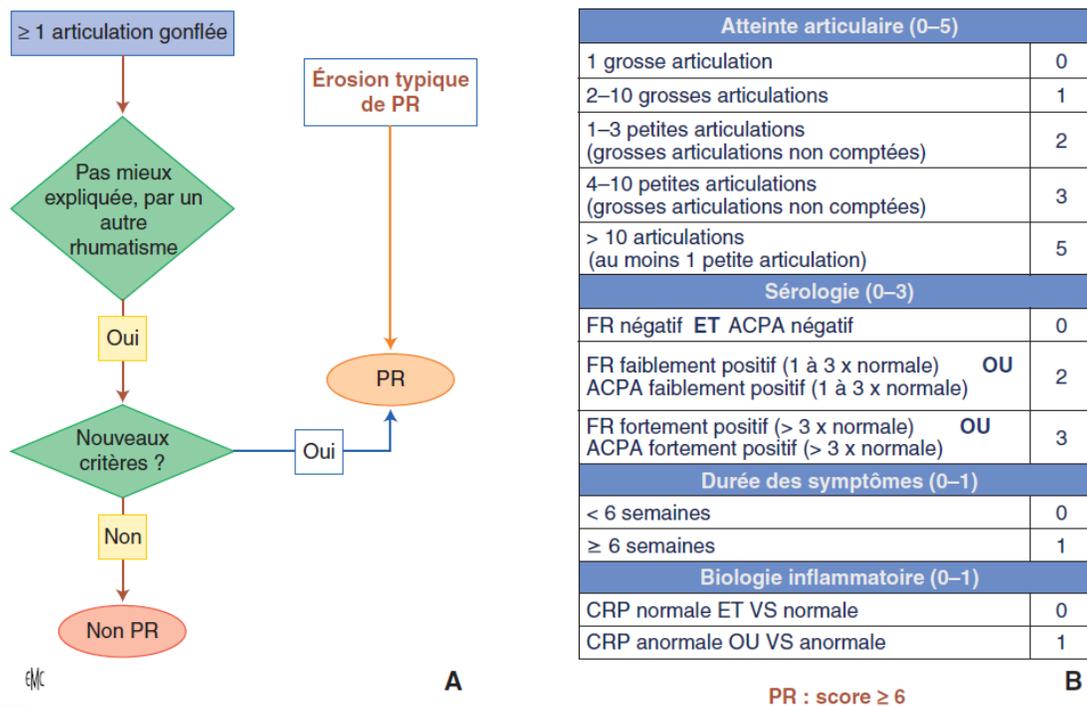


Figure 12: Représentation schématique des critères de l'ACR/EULAR 2010. On observe l'algorithme de décision à gauche (A). A droite, on observe le détail du score (B). L'image provient de l'article de Combe<sup>78</sup>.

Néanmoins, le score de l'ACR/EULAR ne permet pas forcément de détecter toutes les PR précoces, et il n'existe pas de tel test<sup>78</sup>, d'où les études qui visent à trouver d'autres critères pour combler ce manque<sup>82</sup>. Le score de l'ACR/EULAR est une référence utilisée pour beaucoup d'études internationales.

#### f) ***Evolution***

En l'absence de traitements adaptés, la PR évolue vers l'aggravation des érosions et l'augmentation des articulations atteintes, voir des atteintes extra-articulaires<sup>78</sup>. On observe un épaissement de la synoviale, des lésions ligamentaires et ostéo-cartilagineuses. La main prend l'aspect de « coup de vent cubital » caractéristique montré dans la figure 13. Un suivi radiographique est réalisé afin de suivre les érosions osseuses. Chez 10 à 20% des malades, des nodules rhumatoïdes apparaissent. Ces manifestations extra-articulaires sont composées d'une zone centrale de nécrose fibrinoïde, c'est-à-dire de la paroi des vaisseaux. Cette zone de nécrose est entourée de fibroblastes et de macrophages, eux-mêmes entourés de tissu conjonctif infiltré de lymphocytes et de plasmocytes. Il peut y avoir des atteintes cardiaques, notamment des péricardites, des vascularites rhumatoïdes rares, des manifestations pleuropulmonaires comme la pleurésie rhumatoïde c'est-à-dire une inflammation de la plèvre, et de l'ostéoporose. Le risque néoplasique est majoré. On observe des atteintes neuromusculaires comme la myalgie, des manifestations hématologiques comme une anémie inflammatoire, des atteintes oculaires et oto-rhino-laryngologiques comme la sclérite, des atteintes dermatologiques comme l'érythème de vermillon de la paume des mains, des atteintes rénales d'origine iatrogène, c'est-à-dire consécutives aux traitements. On retrouve une amylose dans 15% des autopsies. L'amylose est un dépôt de protéines insolubles dans les tissus. Les biothérapies majorent le risque d'infections sévères<sup>78</sup>, et sont même contre-indiquées en cas de surinfections pulmonaires récurrentes à *P.aeruginosa*. On estime aujourd'hui que la PR diminue l'espérance de vie, le risque cardiovasculaire étant le premier facteur de mortalité, et il est suivi des causes pulmonaires<sup>78</sup>.



Figure 13 : Photographie d'une main de patient atteint de PR avancée.

© Inserm/Cantagrel, Alain

L'objectif du clinicien est aujourd'hui de contrôler l'inflammation le plus rapidement possible afin d'atteindre la rémission. On évite ainsi au patient les complications que sont l'érosion osseuse, le handicap fonctionnel et les complications liées à l'inflammation systémique<sup>78</sup>.

### g) ***Le DAS28***

C'est un score qui mesure l'activité de la maladie sur 28 articulations (DAS28, de l'anglais *disease activity score*). Il est calculé sur des patients qui ont déjà été diagnostiqué comme atteints de PR. Le calcul est assez complexe et ne sera pas détaillé ici. Simplement, il prend en compte la douleur ressentie et le gonflement de 28 articulations, la CRP et un état de santé jugé par le malade lui-même. En s'appuyant sur le DAS28, on définit la PR en rémission, en activité faible, modérée ou élevée<sup>83</sup>. La rémission est ainsi définie par l'absence ou la faiblesse des manifestations clinico-biologiques à un instant donné. La rémission n'est pas synonyme de la guérison.

### 3. Facteurs de risque

Les facteurs de risque sont autant d'indices qui permettent de mieux comprendre la physiologie de la PR.

#### a) ***Facteurs génétiques***

La cause est en partie génétique. Un jumeau monozygote aura une probabilité de 12 à 15% de développer la PR si son jumeau en est atteint, alors qu'on retrouve seulement 1% de PR dans la population générale. 12 à 15% n'est pas 100%, cela souligne que la génétique joue un rôle, mais ne suffit pas à expliquer la maladie.

Parmi les seuls risques génétiques, on estime que 40% sont liés au CMH. Le CMH a d'abord été décrit comme l'ensemble des antigènes majeurs responsables des rejets de greffe par Jean Dausset. Initialement, Jean Dausset réalisait des transfusions. Ces transfusions induisaient chez le receveur des anticorps anti-leucocytes. Les antigènes de leucocytes humains (HLA, de l'anglais *human leukocyte antigen*) furent alors décrits, classés et localisés génétiquement. Le système HLA se décompose en 6 haplotypes, A, B, C, DQ, DR et DP, tous situés sur le sixième chromosome humain. Plus tard, des auteurs comme Peter Doherty ou Rolf Zinkernagel contribuèrent à montrer que ces HLA ont une poche à peptide. Le complexe HLA-peptide est essentiel à l'immunité adaptative comme il sera développé en aval. Ainsi on observe un rôle majeur du système HLA dans l'apparition de maladies auto-immunes, dont la PR. On a identifié, dans la poche à peptides du CMH, une séquence de 5 acides aminés qui était retrouvée à 51% chez les patients atteints de PR contre 37% des sujets sains<sup>84</sup>. Cette séquence s'appelle l'épitope partagé, abrégé « SE » de l'anglais *shared epitope*. Sa séquence est QKRAA. En outre, il est possible que les acides aminés adjacents au SE jouent un rôle. La population qui porte l'haplotype HLA-DR4 a 5 fois plus de chance de déclarer la PR que la population générale. Le SE est situé sur HLA-DR4, mais pas uniquement<sup>75</sup>. Il existe aussi des CMH protecteurs. Ceci montre l'implication du CMH dans la physiologie de la PR.

Sans rentrer dans le détail, les autres facteurs de risque génétiques moins importants indiquent à la fois une implication de l'immunité innée et une implication de l'immunité adaptative<sup>75</sup>. Par

exemple, une équipe nippone a montré qu'un certain haplotype de PADI4 confère une susceptibilité de développer la PR. Les auteurs ont montré que cet haplotype augmentait la stabilité des transcrits de PADI4, et suggèrent que cela induit une augmentation de la production de peptides citrullinés, ce qui augmente le risque de générer des auto-antigènes citrullinés et en conséquence de développer la PR<sup>75,85</sup>.

### b) ***Focus sur le biais sexuel de l'auto-immunité***

On estime qu'environ 3 femmes déclarent la PR pour un homme. Néanmoins, cette différence de genre n'est pas spécifique à la PR mais à plusieurs maladies auto-immunes que sont par exemple le LES, le syndrome de Sjögren, la sclérose en plaque, la maladie de Basedow, la thyroïdite de Hashimoto et la cirrhose biliaire primitive<sup>86</sup>.

Ces phénomènes sont probablement dus en partie à l'inactivation de l'X. Génétiquement, les hommes sont pour la plupart XY et les femmes XX. Le chromosome Y ne contient pas beaucoup de gènes, principalement la région déterminant le sexe (SRY, de l'anglais *sex-determining region of Y chromosome*). Beaucoup plus de gènes sont exprimés sur le chromosome X. Il existe un phénomène d'empreinte qui inactive au hasard un des deux chromosomes X chez la femme. En théorie seulement. En pratique, cette inactivation est incomplète. Ainsi, certains gènes situés sur le chromosome X sont deux fois plus exprimés chez la femme qu'ils ne le sont chez l'homme. Parmi les gènes situés sur le chromosome X, il y a ceux codant TLR7 et 8. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires associés à des pathogènes<sup>87</sup>, mais pourraient aussi reconnaître des motifs du soi<sup>88</sup>. Une partie plus détaillée des TLR sera développée en amont. L'équipe de Jean-Charles Guéry à Toulouse s'est intéressée à cette inactivation partielle de l'X. Ils ont choisi de travailler sur le LES, maladie qui touche neuf femmes pour un homme. Pour évaluer l'expression génique, ils ont réalisé une étude transcriptomique sur cellules individuelles. Sur des cellules immunitaires de femmes, ils ont montré l'inactivation incomplète de l'X. Pour ce faire ils ont étudié la transcription du TLR7 à l'aide de sondes fluorescentes. Souvent, ils ont montré la coexistence de deux sites de transcription produisant deux transcrits du TLR7 dans le noyau d'une même cellule. Dans ce modèle il est possible d'identifier le chromosome X inactivé à l'aide de sondes qui reconnaissent certains transcrits spécifiques. Ils ont montré une colocalisation entre les transcrits du chromosome X inactivé et ceux du TLR7, démontrant que

c'est bien le chromosome X partiellement inactivé qui produit le transcrit du TLR7. Les images sont présentées figure 14.

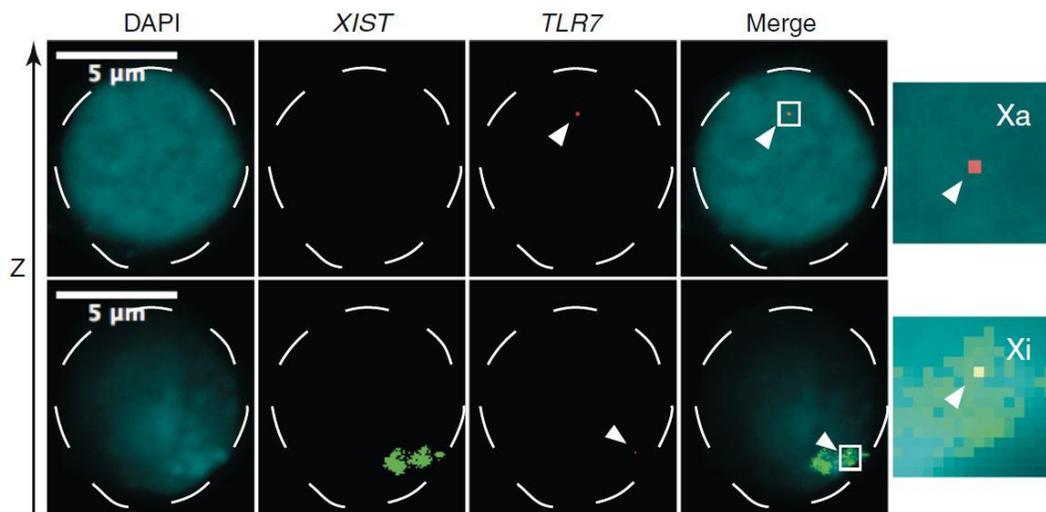


Figure 14 : Images représentant l'échappement de l'inactivation de l'X. Les lymphocytes B de femme ont été fixés. Observées au microscope à fluorescence confocal, les images du dessus montrent un plan, et celles du dessous un autre plan. L'ADN a été coloré avec du DAPI. Des sondes fluorescentes spécifiques le l'ARNm du transcrit spécifique de l'X inactivé (XIST) et de l'ARNm du TRL7 (TLR7) ont été synthétisées et déposées sur les cellules fixées. Ces sondes sont vertes et rouges respectivement, en conséquence la colocalisation est représentée en jaune. Les flèches montrent les transcrits TLR7. Les images ont été fusionnées (*Merge*). Un zoom a été réalisé montrant l'emplacement de l'X actif (Xa) et l'X partiellement inactivé (Xi). De gauche à droite on observe l'ADN nucléaire, l'emplacement du chromosome X inactivé, les sites actifs de transcription du TLR7, une fusion des trois images précédentes et enfin un zoom sur la région de transcription du TLR7. L'image provient de l'article de Guéry<sup>89</sup>.

En conséquence l'expression protéique de TLR7 était augmentée chez les femmes comparées aux hommes. De même, les hommes XXY atteints du syndrome de Klinefelter avaient une expression augmentée du TLR7 par rapport aux hommes XY<sup>89</sup>. Il avait été montré par le groupe de

Medzhitov que les lymphocytes B ont besoin d'être activés par des ligands TLR, la seule stimulation du lymphocyte T auxiliaire n'étant pas suffisante pour développer pleinement une réponse adaptative<sup>90</sup>. Ainsi cette expression accrue du TLR7 sur les lymphocytes B pourrait activer d'avantage les lymphocytes B de femmes, les rendant plus sensibles au développement de maladies auto-immunes.

### c) ***Facteurs environnementaux***

Comme dans beaucoup de maladies, le second facteur de risque est l'environnement. Une équipe suédoise a étudié la relation entre fumer, porter le SE et développer la PR. Il est intéressant de noter qu'ils n'ont retrouvé aucune relation entre fumer, le SE et la PR sans ACPA. On a vu que les ACPA étaient des anticorps spécifiques de la PR, et feront l'objet d'un focus en aval. Les auteurs se sont concentrés sur le fait de fumer, le SE et le fait de développer une PR avec des ACPA (ACPA+). Ils ont montré que le risque de développer une PR ACPA+ augmente avec le fait de fumer, et plus le nombre de cigarettes fumées est grand plus le risque augmente. Les auteurs ont retrouvé que la présence du SE était également associée au développement de la PR. Considérons les plus gros fumeurs de l'étude. Les fumeurs sans SE avaient une augmentation du risque de développer la PR ACPA+ de 1,9, comparés aux non-fumeurs qui n'ont pas non plus de SE. Ce risque monte à 8,7 chez les porteurs hétérozygotes du SE, et jusqu'à 37,6 pour les homozygotes<sup>91</sup>. Les mêmes stockholmsois avaient montré que l'expression de PAD2 augmentait dans les liquides broncho-alvéolaires de fumeurs, comparé aux non-fumeurs<sup>92</sup>. La PAD2 citrulline les protéines, c'est une modification post-traductionnelle. On pense que ce cette citrullination naît des néo-épitopes qui seraient reconnus par des lymphocytes auto-réactifs. Les auteurs le justifie en argumentant que ces peptides citrullinés ne seraient pas générés pendant la sélection négative thymique<sup>75</sup>, et ne serait donc pas tolérés. La sélection thymique assure en partie la tolérance, comme il sera développé en aval. Cette hypothèse attrayante n'est pas prouvée à ma connaissance. Ces arguments feraient du poumon le lieu du développement des ACPA.

La flore microbienne est le second facteur environnemental. Dans un modèle murin de PR, l'incidence augmente légèrement avec la quantité de bactéries intestinales<sup>93</sup>. On estime que ces bactéries auraient un rôle d'adjuvant, en stimulant le système immunitaire de façon générale. En ce qui concerne la flore orale, on a suspecté le rôle de la bactérie *Porphyromonas gingivalis*,

notamment parce qu'elle exprime une PAD bactérienne. On a montré que cette bactérie était retrouvée chez certains patients atteints de PR, et qu'elle pouvait cliver et citrulliner du fibrinogène humain *ex vivo*. Cette génération de néo-épitopes citrullinés était supposée favoriser la PR ACPA<sup>94</sup>. Néanmoins, on n'observe pas de lien entre cette bactérie en particulier et la PR<sup>75</sup>. Les relations de la flore commensale à la PR ou à d'autres maladies sont étudiées.

## 4. La tolérance

La tolérance consiste en la capacité d'un organisme de ne pas s'autodétruire. On parle de tolérance centrale pour désigner l'ensemble des processus d'élimination des lymphocytes au cours du développement de l'organisme, c'est la sélection thymique<sup>95</sup> qui sera développée en aval. Néanmoins, certains lymphocytes auto-réactifs échappent à cette sélection. On parle de tolérance périphérique pour désigner les mécanismes qui empêchent l'activation de tels lymphocytes auto-réactifs, notamment l'anergie<sup>96</sup>. Les mécanismes de la tolérance sont complexes et encore débattus. Il me paraît indispensable d'en dresser un portrait si l'on veut comprendre comment une maladie auto-immune peut se déclencher.

### a) ***Polly Matzinger et la théorie du danger, une tentative d'explication des maladies auto-immunes***

La théorie du danger se base en grande partie sur la cellule dendritique. En 1973, Ralph Steinman décrit la cellule dendritique<sup>97</sup>. En 1984, il montre que la déplétion des cellules dendritiques par un anticorps prévient le rejet de greffe<sup>98</sup>. Cette expérience démontre leur rôle indispensable dans l'immunité. En 1990, il immunise des souris avec un antigène connu, et souhaite discriminer quelles cellules sont capables de stimuler les lymphocytes T spécifiques de l'antigène. Il démontre que ce sont les cellules dendritiques qui stimulent les réponses T<sup>99</sup>. Cette expérience fût décisive pour comprendre que les cellules dendritiques apprêtent l'antigène, mécanisme essentiel

de l'immunogénicité. La cellule dendritique découpe l'immunogène en peptides, puis les charge sur le CMH I ou II. Le complexe CMH/peptide est présenté au récepteur T du lymphocyte T. Pour qu'un lymphocyte T soit activé, il a besoin de costimulation. La cellule dendritique fournit au lymphocyte cette costimulation. Le cocktail de cytokines présent orientera la différenciation du lymphocyte T. Le lymphocyte T naïf ainsi stimulé se multiplie.

C'est en 1994 que Polly Matzinger publie sa théorie du danger<sup>100</sup>. La théorie dominante était que le système immunitaire reconnaît le soi du non-soi, et que la réaction immunitaire se met en branle contre le non-soi uniquement. Cette théorie ne suffit évidemment pas à expliquer l'auto-immunité. En effet les maladies auto-immunes se manifestent lorsque le système immunitaire d'un organisme attaque et détruit ses propres constituants, son soi. Matzinger détaille les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP de l'anglais *damage-associated molecular pattern*), qui seraient relargués par nos propres cellules lors d'un stress intense dans l'organisme, et les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, de l'anglais *pathogen-associated molecular pattern*) qui seraient les composants des microorganismes. Dans cette théorie, les signaux de danger activent la cellule dendritique, qui se met à exprimer des molécules de costimulation. La cellule dendritique activée devient capable de stimuler les lymphocytes T et par la suite toute l'immunité adaptative. Les peptides présentés peuvent être du soi, ce qui est compatible avec les maladies auto-immunes. Dans le cas d'une infection, la réaction immune s'arrête lorsque la cellule dendritique ne peut plus présenter d'antigène, car le pathogène aura été éliminé. Il pourrait y avoir un risque, la cellule dendritique pourrait présenter un antigène du soi, et activer des lymphocytes auto-réactifs. Ceci serait rendu impossible par l'anergie des lymphocytes auto-réactifs. Cette anergie serait induite par d'autres cellules présentatrices d'antigène dépourvues molécules de costimulation et présentant le même antigène. En effet le CMH I est ubiquitaire sur les cellules nucléées et le CMH II est exprimé essentiellement sur les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les macrophages.

### **b) *Des souris scurfy au gène FOXP3 : Les lymphocytes T régulateurs***

L'histoire commence avec l'explosion d'une bombe atomique. Dans les années 1940, les USA étudient les effets du rayonnement ionisant sur des souris. En 1949, on détecte des souris qui ne

vivent pas plus de trois semaines. On se rendit compte que la mutation affecta le gène FOXP3<sup>101</sup>. En 1995, Shimon Sakagushi démontre que la sous-population de lymphocytes T exposant à leur surface le CD4 (CD4+) et le CD25 (CD25+) est indispensable à la tolérance<sup>102</sup>. En 2003, le groupe d'Alexander Rudensky relie les deux histoires en montrant à l'époque que FOXP3 est spécifiquement exprimé sur cette population CD4+ CD25+<sup>103</sup>. On nomme cette sous-population de lymphocyte T CD4+ CD25+ FOXP3+ les lymphocytes T régulateurs. En février 2019, le groupe d'Ethan Shevach montre que le lymphocyte T régulateur se lie au complexe CMH/peptide de la cellule dendritique, et capte ce complexe par trogocytose. Des images de cette trogocytose sont montrées dans la figure 15.

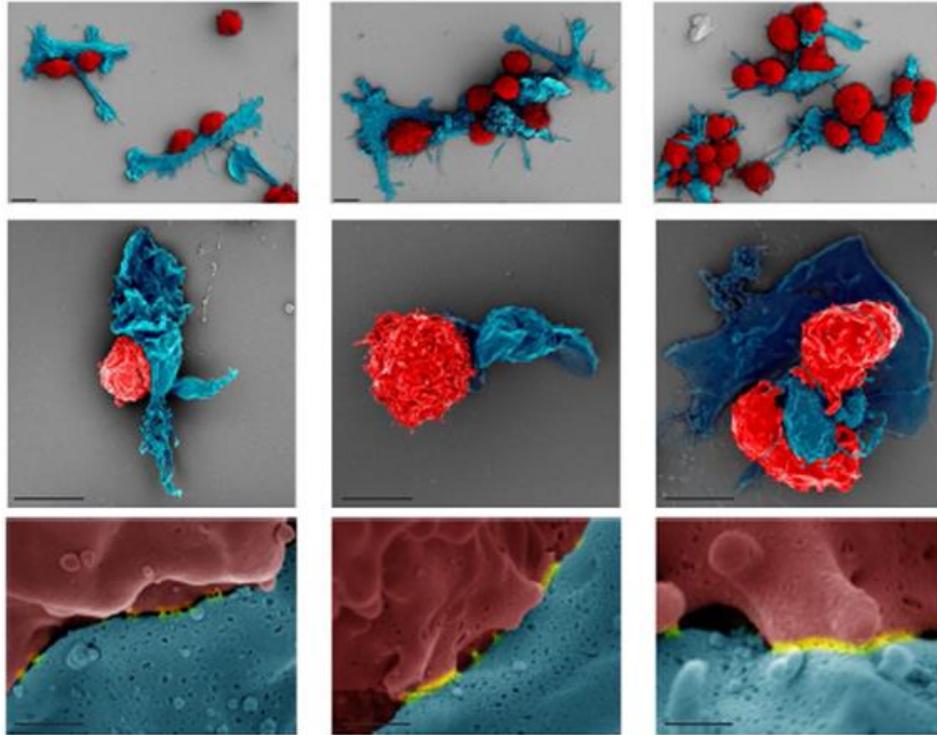


Figure 15 : Images de T reg en train de trogocyter. Des lymphocytes T sont en rouge, les cellules dendritiques en bleu et les zones de fusion des membranes plasmiques sont en jaune. Les cellules dendritiques et les cellules T sont spécifiques du même antigène et les cellules dendritiques ont été chargées avec l'antigène. Les lymphocytes T naïfs sont à gauche, les activés au centre et les T régulateurs sont à droite. Les images sont prises au microscope électronique à balayage, et proviennent de l'article de Shevach<sup>104</sup>.

La cellule dendritique est ainsi dépourvue de son complexe CMH/peptide. Elle ne peut plus stimuler les lymphocytes T spécifiques de ce complexe. Ce mécanisme est également présent chez les lymphocyte T activés, dans une moindre mesure<sup>104</sup>. Les lymphocytes T régulateurs sont parmi les cellules les plus étudiées dans le domaine de l'auto-immunité aujourd'hui.

### c) *La sélection thymique*

Les lymphocytes T et B possèdent des récepteurs des cellules T (TCR, de l'anglais *T cell receptor*) et des récepteurs des cellules B (BCR, de l'anglais *B cell receptor*) respectivement. Ils

sont produits à partir de réarrangements génétiques particuliers de trois groupes de régions que l'on nomme de variabilité, de diversité et de jonction (VDJ). Le TRC est composé de deux chaînes protéiques nommées alpha et beta. Les chaînes alpha sont formées par recombinaisons V et J, et les chaînes beta par les recombinaisons de V, D et J. Il existe plusieurs segments V, D et J. Les gènes activant la recombinaison VDJ (RAG, pour *recombination-activating gene*) produisent les protéines RAG1 et RAG2. Prenons l'exemple de la chaîne beta du TCR. Ces recombinaisons vont découper l'ADN au niveau des segments VDJ aléatoirement, puis les réassocier, de telle façon qu'un seul segment V sera exprimé, un seul segment D et un seul segment J. Pour relier les fragments entre eux, des oligonucléotides sont générés au hasard. La multiplication des combinaisons VDJ possibles et la synthèse d'oligonucléotides au hasard constituent autant de diversité génétique. On estime que cette diversité permet de reconnaître virtuellement n'importe quel oligo-peptide<sup>105</sup>. Cela pose un problème majeur, puisque qu'il ne faudrait pas que nos propres constituants soient détruits par notre propre système immunitaire. On estime que c'est la sélection négative qui joue ce rôle, elle est présentée plus bas.

Les thymocytes sont les précurseurs des lymphocytes T. Durant leur maturation, ils migrent du cortex thymique vers la médulla. Dans le cortex ils sont CD4+ CD8+. Des cellules épithéliales du cortex thymique présentent des complexes CMH/peptide à ces thymocytes, et seuls ceux qui reconnaissent des complexes sont sélectionnés positivement. Dans un second temps, dans la médulla, ce sont les cellules épithéliales de la médullaire thymique qui présentent une large gamme de protéines du soi, théoriquement toutes. Dans une étude, les auteurs ont trouvé que ces cellules produisaient toutes les protéines qu'ils aient pu tester, par exemple de l'insuline<sup>106</sup>. Parmi les mécanismes en jeu, le régulateur de l'auto-immunité (AIRE, de l'anglais *auto-immune regulator*) est prépondérant<sup>107</sup>. On s'est rendu compte que les patients atteints de mutation de AIRE développaient une auto-immunité systémique. Des auteurs ont montré qu'AIRE était principalement exprimée dans le thymus. Les souris déficientes en AIRE (KO, de l'anglais *knock out*) développent la même auto-immunité systémique. Le transfert adoptif de moelle osseuse AIRE-KO à des souris sauvages irradiées induit la maladie. Inversement, le transfert adoptif de moelle osseuse de souris sauvage dans des souris AIRE-KO irradiées n'induit pas la maladie<sup>107</sup>. On estime que 30% des cellules thymiques médullaires expriment AIRE. Sans rentrer dans le détail, AIRE est un complexe protéique indispensable à la production de toutes les protéines du soi<sup>108</sup>.

Reprenons l'exemple de l'insuline produite par les cellules épithéliales de la médullaire thymique. A priori cette insuline n'exerce pas son rôle classique de régulation de la glycémie dans le thymus. L'insuline va plutôt être apprêtée et présentée aux thymocytes, et ceux dont le TCR est activé sont dits auto-réactifs, et vont mourir par apoptose. C'est la sélection négative. De même, des chercheurs qui étudiaient la tolérance ont généré des souris dont le TCR transgénique unique reconnaît l'ovalbumine de poulet. Ils ont montré que comme prévu les lymphocytes périphériques proliféraient en présence d'un peptide issu de l'ovalbumine. Pour tester le potentiel tolérogène de ce peptide, ils l'ont injecté intra-péritonéalement en espérant que le peptide parvienne jusqu'aux thymus. Après 3 jours, ils isolent les thymocytes et remarquent qu'ils sont en apoptose spécifiquement sur les souris qui ont reçu le peptide. Les populations thymiques éliminées étaient les CD4+ CD8+. Cette expérience montre comment un peptide peut induire à la fois une réponse immunitaire sur des cellules matures et une tolérance sur des thymocytes immatures<sup>109</sup>. On note la nécessité de la localisation thymique du peptide, d'où la déclaration hypothétique d'une maladie auto-immune si l'auto antigène est ne s'y retrouve pas. On peut imaginer par exemple une modification post traductionnelle comme la citrullination qui ne se produirait qu'en périphérie. Il est important de préciser que le thymus involue avec l'âge.

Une partie des lymphocytes T régulateurs sont produits par ces mécanismes de sélection positive et négative. Récemment, on a montré que ces T reg d'origine thymique se développaient à partir de deux progéniteurs distincts<sup>110</sup>. On estime que ces mécanismes de sélection laissent échapper quelques lymphocytes auto-réactifs<sup>105,108</sup>. Par exemple, certains lymphocytes reconnaissant des protéines citrullinées pourraient échapper à cette sélection négative. Cet événement serait susceptible d'induire la production d'ACPA.

#### d) ***Tolérance périphérique***

La tolérance périphérique est définie comme l'ensemble des mécanismes qui contrôlent les lymphocytes matures. La protéine Fas en est un exemple. Fas est un récepteur de mort, la liaison à son ligand induit l'apoptose de la cellule. Les souris qui portent une mutation de Fas ont un syndrome lymphoprolifératif auto-immun (lpr) proche du LES<sup>111</sup>. Les souris qui ont une mutation du ligand de Fas (FasL) ou une maladie lymphoproliférative généralisée (gld, de l'anglais *generalized lymphoproliferative disease*)<sup>111,112</sup>. Chez l'homme, une mutation de Fas a également

été retrouvée chez les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif autoimmun<sup>113</sup>. On a montré que Fas et FasL étaient coexprimés par le lymphocyte T activé, alors que le lymphocyte T naïf n'exprime pas de FasL<sup>114</sup>. Ainsi, le lymphocyte T activé peut rentrer en apoptose peu de temps après son activation. Ce système permet de contrôler l'amplitude de la réponse immune. En outre, une équipe californienne a souhaité étudier l'effet de Fas/FasL sur les lymphocytes B autoréactifs. Ils ont développé un système de transfert de cellules T et B spécifiques du même antigène dans une souris receveuse. Les lymphocytes B étaient anergiques, en effet ils provenaient de souris qui exprimaient l'antigène mais qui n'exprimaient pas de lymphocytes T spécifiques du même antigène. Dans la souris receveuse, ces lymphocytes B anergiques rentraient en apoptose en présence des lymphocytes T spécifiques du même antigène. En présence de lymphocyte T muté sur FasL, les lymphocytes B autoréactifs ne rentraient pas en apoptose mais proliféraient. Il en allait de même si le lymphocyte B était muté sur Fas<sup>115</sup>. Ces expériences illustrent que l'élimination des lymphocytes B auto-réactifs ou des lymphocytes T activés est au moins en partie contrôlée par Fas/FasL.

## 5. La rupture de la tolérance

### a) ***Rupture de la tolérance dans la PR***

L'origine de la rupture de la tolérance dans la PR est inconnue<sup>116,117</sup>. On a vu que fumer augmente l'expression de PAD2<sup>92</sup> et le risque de déclarer une PR ACPA+<sup>91</sup>. On pense que fumer induit une citrullination. Les néo-antigènes citrullinés seraient apprêtés préférentiellement par les CMH qui possèdent l'épitope partagé. La réponse commencerait ainsi dans le poumon avant de se propager à l'articulation<sup>116</sup>.

Cette rupture de la tolérance suppose une inflammation locale qui va rendre les cellules dendritiques matures, qui en même temps vont apprêter et présenter les néo-antigènes citrullinés. La cellule dendritique mature présente à la fois le complexe CMH/peptide et la costimulation nécessaire au lymphocyte T. Par exemple, les molécules de costimulation CD80 et CD86 situées à la surface de la cellule dendritique se lient au CD28 à la surface du lymphocyte T<sup>100</sup>. Cela suppose aussi des lymphocytes T ayant échappé à la sélection thymique, spécifiques de ces complexes CMH/peptides citrullinés. Cela suppose aussi des lymphocytes B ayant la même spécificité. Ces lymphocytes sont dits auto-réactifs.

Plusieurs équipes dont la nôtre<sup>118</sup> proposent que les NET puissent jouer un rôle dans la rupture de la tolérance, en particulier dans le cas de la PR ACPA+<sup>73,119</sup>.

### b) ***Réponse cellulaire***

C'est l'affaire des lymphocytes T. Le lymphocyte T auto-réactif sélectionné va se multiplier. Selon la stimulation par la cellule dendritique et l'environnement, le lymphocyte T naïf va orienter sa réponse. Par exemple, en présence d'IL-12 il va se différencier en lymphocyte T auxiliaire de type 1 (Th1, de l'anglais *T helper 1*). Outre le Th1, on dénombre le Th2, Th9, Th17, Th22, les T folliculaires auxiliaires (Tfh) et les T régulateurs « induits »<sup>120</sup>. Dans le cas de la PR, la réponse semble être orientée vers Th1 et Th17, avec un déficit fonctionnel des T reg et une instabilité de ceux-ci<sup>121</sup>. Notre équipe a montré que le TNF agit sur le nombre et les capacités fonctionnelles des T reg dans un modèle murin<sup>122</sup>, que l'instabilité des T reg était au moins en partie liée à la présence du récepteur au TNF de type 2 (TNFR2)<sup>123</sup>, et que les traitements qui

bloquent l'IL-6 augmentent la fréquence de T reg CD39+ fonctionnels<sup>124</sup>. La réponse cellulaire est en effet dépendante des cytokines, ce sont elles qui permettent la communication cellulaire. Les Th1 sécrètent de l'interféron gamma, et les Th 17 sécrètent de l'interleukine 17 et du GM-CSF. Dans les liquides synoviaux de patients, on retrouve justement de l'interféron gamma et de l'IL-17. Néanmoins, ces cytokines sont retrouvées une fois que la réponse immune s'est propagée dans l'articulation, ayant engagé d'autres cellules comme les macrophages, les neutrophiles ou les synoviocytes<sup>125</sup>. Ainsi elles ne renseignent pas forcément sur la réponse T initiale.

### c) **Réponse humorale**

La réponse humorale adaptative suppose que des lymphocytes B auto-réactifs reçoivent de l'aide. On sait depuis les expériences de l'équipe de Jacques Miller dans les années 60 que ce ne sont pas les lymphocytes thymiques qui sécrètent les anticorps. Ils furent ainsi les premiers à différencier les lymphocytes thymiques de certains lymphocytes issus de la moelle osseuse, d'où leurs appellations de T et B issues de l'anglais *thymus* et *bone marrow* respectivement. Dans leur modèle murin, ils induisaient la production d'anticorps via l'immunisation de globules rouges de mouton. Ils montrèrent que ni l'un ni l'autre des types cellulaires n'étaient suffisant pour induire une réponse humorale<sup>126</sup>. Il est amusant de savoir qu'à ce propos, l'école de recherche John Curtin écrivit : « *B and T cells represent only the first and the last letter of the word bullshit* »<sup>126</sup>.

Le lymphocyte B est une cellule présentatrice d'antigène. Il va capter un antigène, l'apprêter et le présenter sur son CMH II. Plusieurs clones de lymphocytes B peuvent reconnaître différents épitopes situés sur un même antigène, et néanmoins apprêter le même peptide. Un seul lymphocyte T peut ainsi aider plusieurs lymphocytes B<sup>100</sup>. Les lymphocytes T folliculaires auxiliaires apportent des signaux de costimulation nécessaires à la division du lymphocyte T. Un exemple de molécule de costimulation est le CD40 situé sur le lymphocyte B qui se lie au ligand du CD40 (CD40L) situé sur le lymphocyte T<sup>100</sup>. Le lymphocyte B a également besoin d'être stimulé par des ligands TLR<sup>90</sup>. Par la suite il se différencie en plasmocyte sécréteur d'anticorps. Cette partie montre que la coopération entre T et B est dépendante de l'antigène et du CD40.

Il faut noter qu'il existe des antigènes T-indépendants de type 1 comme le LPS ou l'ADN bactérien riche en motifs cytidine-phosphate-guanosine déméthylés (CpG) ou de type 2 comme

les antigènes de polysaccharides capsulaires<sup>127</sup>. En effet Krieg et ses collègues ont montré que certains ADN-CpG activaient directement les lymphocytes B. Les souris utilisées étaient soit des DBA/2 qui n'ont jamais rencontré de pathogène, soit des BXSB qui n'ont pas de lymphocyte T. On peut donc exclure toute aide apportée par des lymphocytes T. Les lymphocytes B stimulés par ces ADN-CpG prolifèrent, sécrètent des anticorps, et expriment des molécules de costimulation<sup>128</sup>. Ces résultats peuvent paraître contradictoires avec les expériences de Miller, qui avait démontré que la coopération B et T est indispensable à la production d'anticorps. En détail, les modèles sont différents. Miller immunise avec des globules rouges de mouton, là où Krieg utilise du CpG. Cette stimulation du lymphocyte B au CpG s'apparente plutôt aux réactions immunes innées. Les lymphocytes B ainsi générés après division ne sont pas sélectionnés selon leur BCR. Il n'y a donc pas de formation de centre germinatif, de commutation de classe ou d'augmentation de l'affinité des anticorps envers un éventuel épitope. Les motifs ODN-CpG seront d'avantage développés en aval.

Dans la PR, les auto-anticorps les plus retrouvés sont les ACPA et les facteurs rhumatoïdes<sup>116,125</sup>. Les ACPA sont spécifiques de la PR, et seront développés en aval. Les facteurs rhumatoïdes sont dirigés contre le fragment constant des IgG. Ils ne sont pas spécifiques de la PR, ni même des rhumatismes inflammatoires<sup>129</sup>.

## 6. Focus sur les ACPA

Les ACPA ont été ajoutés aux critères de l'ACR/EULAR en 2010<sup>80</sup>. Ils sont devenus indissociables de la PR.

### a) *Découverte*

Initialement, Young a découvert que plus de la moitié des sérums de patient atteints de PR se liaient à des coupes d'œsophage de rat, contre aucun sérum de donneur sain<sup>130</sup>. Plus tard, l'équipe toulousaine de Guy Serre a démontré que ces anticorps avaient pour cible la filaggrine, et ont proposé une première définition qui fût AFA pour *anti-filaggrin antibody*<sup>131,132</sup>. Étonnement, la filaggrine humaine recombinante produite chez *Esherichia coli* n'était pas reconnue par ces sérums. En effet seule la fillaggrine produite chez l'homme avait subi une modification post-traductionnelle que l'on appelle la citrullination, qui convertit les arginines en citrullines, un acide aminé non-protéinogène. Une équipe néerlandaise produisit des peptides issus de la filaggrine, et montra que seuls les peptides citrullinés étaient ciblés par les AFA<sup>133</sup>. Néanmoins, les patients n'ont pas d'atteinte épithéliale, et la filaggrine n'est pas présente dans leurs membranes synoviales. En suspectant une réaction croisée, on remarqua que ce sont les chaînes alpha et bêta de la fibrine qui étaient reconnues par les « AFA », et celles-ci doivent aussi être citrullinées<sup>134</sup>. Il ne faut pas confondre fibrine et filaggrine. La fibrine est une protéine sérique impliquée dans la coagulation, et son précurseur est le fibrinogène. La filaggrine est une protéine qui agrège les filaments intermédiaires au niveau de la couche cornée de la peau. On découvrit que la vimentine citrullinée était aussi reconnue par 40% des sérums des patients atteints de PR<sup>135</sup>. La vimentine est un filament intermédiaire. De par leur ciblage des protéines citrullinées, on regroupa les AFA, anti-fibrine citrullinée et anti-vimentine citrullinée dans ce qu'on appelle les ACPA. On souhaita alors développer un kit ELISA commercial. En s'inspirant des peptides de la filaggrine, on synthétisa le peptide cyclique citrulliné cfc1. La séquence de ce peptide est HQCHQESTXGRSRGRCSGS, où X représente la citrulline. On nomma le test ELISA « anti-CCP », de l'anglais *cyclic citrullinated peptide*. Pour augmenter la sensibilité du test, des compagnies criblèrent plus de 12 millions de peptides et produisirent un nouveau test contenant plusieurs peptides. Ce test se nomme « anti-CCP2 ». Les sociétés qui l'ont commercialisé sont

Euro-Diagnostica, Axis-Shield et INOVA. La séquence des peptides n'a pas été dévoilée à ma connaissance. L'anti-CCP2 est le test de référence dans le monde pour détecter les ACPA.

### b) *Intérêt clinique*

Puisque les ACPA sont spécifiques de la PR établie, on a voulu déterminer si l'on pouvait les détecter avant l'apparition des signes cliniques et si leur présence pouvait prédire l'évolution de la maladie.

Nielen et ses collègues eurent l'idée de tester les sérums des patients PR qui avaient été donneur de sang, avant qu'ils n'aient de manifestation clinique de la maladie. Ils montrèrent que le pourcentage de sérum ACPA+ augmente de manière continue à mesure que l'on se rapproche du diagnostic de PR<sup>136</sup>. Une étude sur une cohorte suédoise a démontré le même phénomène<sup>137</sup>. En outre, les ACPA sont hautement spécifiques de la maladie. Une détection précoce est donc un signe important qui indique que l'on a de grandes chances de développer la maladie.

Vallbracht et ses collègues ont étudié le pourcentage de sérum anti-CCP2 positifs et ont voulu faire un lien avec l'activité de la maladie et l'érosion osseuse. Ils ont séparé les patients en trois groupes, selon l'érosion osseuse. Le groupe qui avait le plus d'érosion osseuse était aussi celui qui avait le plus grand pourcentage d'ACPA. Ils ont appliqué la méthode à l'activité de la maladie et ont trouvé les mêmes résultats<sup>138</sup>. La présence d'ACPA est donc corrélée à un risque d'érosion osseuse plus important. L'équipe de Schett a également montré un lien entre ACPA et érosion osseuse, ainsi que le rôle pathogène probable de certains ACPA<sup>139</sup>.

Toutefois, tous les patients atteints de PR n'ont pas d'ACPA. Avec le test de référence anti-CCP2, 75,2 % des patients ayant une PR établie sont positifs, et seulement 61,6 % des patients ayant une PR précoce sont positifs<sup>60</sup>. Cette PR sans ACPA est dite séronégative. De même, certains sujets sains ont des ACPA. La prévalence des ACPA a été calculée. Une équipe hollandaise a estimé la proportion de personnes ACPA+ dans la population générale néerlandaise à 1%, en utilisant le test anti-CCP2 et en fixant le seuil de positivité à 6,2 U/ml<sup>140</sup>. Une autre étude suédoise l'a estimé à 2,8% parmi la population suédoise. Dans cette étude, ils ont suivi les donneurs pendant 3 ans. Ils ont diagnostiqué les nouveaux cas de PR via un algorithme qui se base sur plusieurs données cliniques et biologiques. Sur 350 individus ACPA+, 103 avaient déjà

une PR. Sur les 226 restants, 21 ont développé une PR pendant les 3 ans de suivi, soit environ 9,3%. A titre de comparaison, le risque pour la population générale de développer une PR non pas dans les trois ans mais au cours de sa vie est d'environ 1%. Néanmoins, il reste tout de même 205 donneurs ACPA+ qui n'ont pas déclaré de PR pendant les trois ans<sup>82</sup>. La présence d'ACPA n'est donc pas une garantie de diagnostiquer une PR, du moins dans les 3 ans.

### c) ***Rôle physiopathologique majeur ?***

La question est directement en lien avec les assertions précédentes. Si l'on considère la PR séronégative, on pourrait penser que les ACPA ne sont pas déterminants dans la physiopathologie, mais qu'ils ne sont qu'une manifestation particulière chez un sous-groupe de patients qui auraient des prédispositions génétiques et environnementales. La présence d'ACPA serait uniquement associée à une forme plus sévère de la PR comme on l'a vu au dessus<sup>138,139</sup>. En outre la présence d'ACPA seuls n'est apparemment pas suffisante pour induire la maladie, puisqu'environ 1% des sujets sains en ont. Néanmoins, on a vu que deux tiers des patients PR ont des ACPA, et le titre des ACPA augmente avant les premiers signes cliniques de la maladie. Un événement supplémentaire (traduit de l'anglais *second hit*) serait nécessaire pour déclencher la maladie<sup>141</sup>. Ces événements supplémentaires pourraient être causés par les macrophages. En effet Cyril Clavel et ses collègues de l'équipe de Guy Serre ont montré que les macrophages stimulés par des complexes immuns formés d'ACPA et de fibrinogène citrulliné sécrétaient du TNF<sup>142-144</sup>. Un autre paradigme serait que les ACPA, de par leur précocité<sup>136</sup>, auraient un rôle causal. Dans ce cas, la PR séropositive serait tout à fait différente physiopathologiquement de la séronégative, et constitueraient deux maladies distinctes.

### d) ***ACPA et réponse B***

Dans le cadre de la PR séropositive, l'étude des cibles et de l'affinité des ACPA permet de comprendre la réponse B associée. Notamment, il existe une augmentation du nombre d'épitopes reconnus (traduit de l'anglais *epitope spreading*) par les ACPA. En effet, l'équipe de René Toes a généré différents peptides présents sur des protéines cibles des ACPA comme la vimentine ou le fibrinogène citrulliné. Ils ont testé deux sérums des mêmes patients. L'un avait été collecté avant

l'apparition des signes cliniques de la maladie, et l'autre après. Ils ont montré que le nombre de peptides reconnus augmentait uniquement lorsque les patients avaient déclaré la maladie<sup>145</sup>. Néanmoins, l'augmentation de l'avidité des ACPA semble faible. On peut mesurer l'avidité des complexes immuns en utilisant des agents chaotropiques<sup>146</sup>. Cette même équipe a montré que l'avidité des ACPA augmente faiblement avant l'apparition de la maladie<sup>147</sup>. Après les premières manifestations cliniques, l'avidité n'augmente plus. Les ACPA sont ainsi qualifiés d'anticorps de faible affinité, comparé aux anticorps anti-toxine diphtérique par exemple. On observe qu'une commutation de classe a néanmoins eu lieu<sup>148</sup>. Classiquement, la commutation de classe et l'augmentation de l'affinité sont liées. Dans une revue récente, René Toes fait l'hypothèse que la production d'ACPA est ainsi distincte de la réponse humorale classique. En outre, il propose que les ACPA seraient produits dans un premier temps de manière indépendante des cellules T, et dans un second temps de manière T dépendante, ce qui induirait les manifestations cliniques de la maladie<sup>117</sup>. Ces deux types de production d'ACPA sont schématisés dans la figure 16.

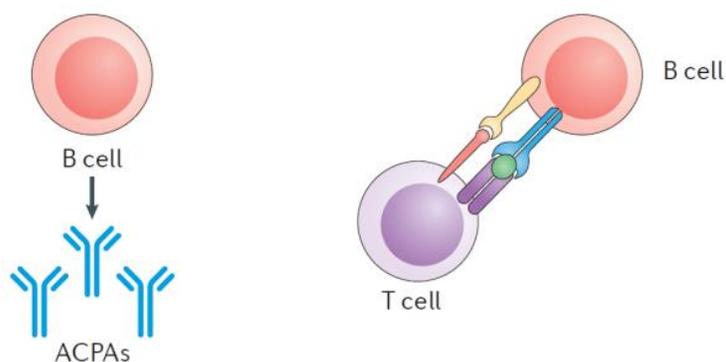


Figure 16 : Représentation schématique des réponses humorales à l'origine des ACPA. Les lymphocytes B (*B cell*) et T (*T cell*) sont représentés. Les molécules de costimulation sont représentées en rouge et jaune. Le BCR est représenté en bleu, le peptide apprêté en vert et le CMH en violet. La production d'ACPA est indépendante de la réponse T à gauche, et dépendante à droite. Adapté de l'article de Toes<sup>117</sup>

On a également remarqué que les domaines hypervariables des ACPA étaient hautement N-glycosylés, comparé à des anticorps de donneurs sains ou de patients atteints d'autres maladies auto-immunes. Lors de la commutation de classe qui est dépendante de la réponse T, les plasmocytes ne sécrètent plus d'IgM au profit d'IgG. Ces glycosylations ont lieu sur les ACPA IgG et pas les ACPA IgM. Ce sont peut-être ces ACPA IgG qui sont pathogènes.

#### e) ***Modification de l'antigénicité par citrullination***

Cette idée suppose que certains lymphocytes T auto-réactifs reconnaissent des peptides citrullinés et montent une réponse immunitaire contre eux. J'ai évoqué en amont que le SE était un facteur de risque de développer des ACPA. On s'est intéressé à cette poche à peptide du CMH, et aux interactions électrostatiques avec le peptide apprêté. Une poche particulière, appelée P4 est chargée positivement. La partie du peptide qui interagit avec cette poche doit être neutre ou chargée négativement. Or l'arginine est chargée positivement. Une modification post-traductionnelle appelée citrullination convertit l'arginine en citrulline. La citrulline a une charge neutre. Ainsi elle peut interagir avec P4, et donc être présentée par le CMH possédant l'épitope partagé, à la différence de l'arginine<sup>149</sup>. Par exemple, la vimentine citrullinée se lie 100 fois plus à HLA-DR avec l'épitope partagé, comparé à HLA-DR sans épitope partagé<sup>150</sup>. Ceci est un exemple qui montre que la citrullination des peptides est susceptible d'induire une réponse adaptative. Ce principe est schématisé dans la figure 17.

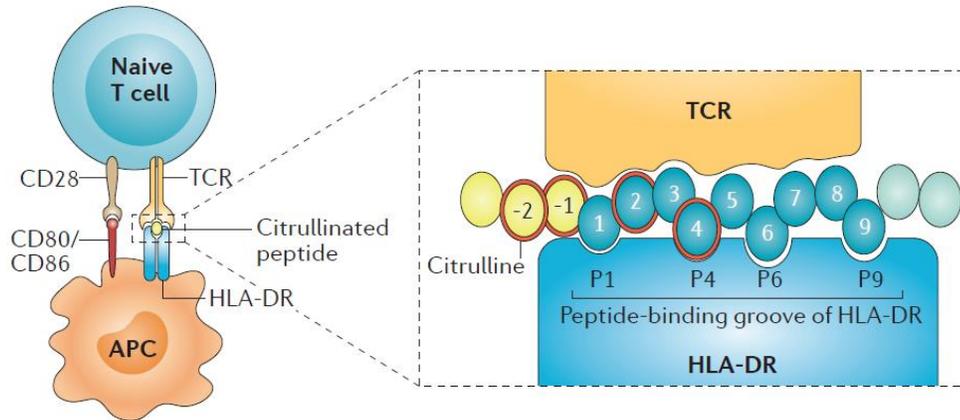


Figure 17: Représentation schématique de la poche à peptide P4 de HLA-DR. La présentation du peptide citrulliné (citrullinated peptide) de la cellule présentatrice d'antigène (APC) au lymphocyte T naïf (naive T cell) est représentée à gauche. A droite, les poches à peptides (*peptide-binding groove of HLA-DR*) sont représentées (P1, P4, P6, P9). Les acides aminés du peptide sont représentés par des disques, et les acides aminés citrullinés sont représentés en rouge. L'image provient de l'article de Klareskog<sup>141</sup>.

Parmi les cibles des ACPA, on a également décrit des peptides citrullinés issus du fibrinogène, des histones, d' $\alpha$ -enolase qui est une enzyme impliquée dans la glycolyse, d'agrécane qui est une protéine du cartilage et de la protéine de la couche intermédiaire du cartilage<sup>141</sup>.

L'idée est que la citrullination s'effectue dans des conditions physiopathologiques non-déterminées, et que les protéines citrullinées générées seraient reconnues comme étrangères/dangereuses, et seraient antigéniques et immunogènes.

#### f) ***Hypothèse d'antigénicité des NET***

Les NET nous ont apparus comme de bons candidats dans l'optique d'induire des ACPA. En effet il a été montré que des ACPA reconnaissent les NET. En effet, leurs histones sont citrullinées plus ou moins en fonction du stimuli<sup>61</sup>. Frederico Pratesi avait montré qu'une partie des sérums de patients atteints de PR ciblaient préférentiellement les histones citrullinées<sup>151</sup>. En

outre, notre laboratoire avait observé que dans 68% des cas, les IgG purifiées de sérums de patients atteints de PR ACPA+ reconnaissaient plus fortement les NET filamenteux que les IgG ACPA<sup>-118</sup>. De plus, Ritika Khandpur avait montré qu'*ex vivo*, les neutrophiles de patients atteints de PR étaient plus prompts à la nétose spontanée<sup>56</sup>.

Par ailleurs, les NET pourraient avoir un rôle d'adjuvant, c'est-à-dire qu'ils favoriseraient l'immunisation contre d'autres antigènes.

### g) ***Hypothèse de citrullination par les PAD des NET***

Les neutrophiles contiennent les PAD2 et 4. Dans un état physiologique non-inflammatoire, les neutrophiles meurent par apoptose. Les macrophages phagocytent les corps apoptotiques avant que les composants intracellulaires n'aient eu le temps d'être relargués. Dans le cas de la nécrose ou de la nétose, ces composants sont au moins en partie relargués. Julia Spengler et ses collègues ont montré que des PAD2 et PAD4 actives étaient retrouvées dans le liquide synovial de patients PR. *In vitro*, ces PAD étaient à la fois relarguées dans le surnageant par des neutrophiles nécrotiques ou nétotiques et étaient contenues sur les NET eux-mêmes<sup>63</sup>. L'équipe de Felipe Andrade a montré que PAD2 était sécrétée spontanément par les neutrophile et même qu'une partie de PAD4 active était retrouvée à leur surface<sup>152</sup>. Cela suggère aussi que la nétose serait un des éléments déclencheurs de la citrullination, et par la suite de la production d'ACPA.

## 7. Les anticorps dirigés contre la peptidyl-arginine déiminase

### a) *Prévalence*

Le groupe d'Anthony Rosen dont Felipe Andrade à Baltimore a montré que 36 à 42% des patients atteints de PR possédaient des anticorps anti-PAD4<sup>153</sup>. L'équipe de Jean Roudier dont fait partie Isabelle Auger a obtenu les mêmes résultats<sup>154</sup>. Ces anticorps étaient très spécifiques de la maladie<sup>153,154</sup>. Parmi ces anti-PAD4, 40% reconnaissent aussi PAD3<sup>155</sup>. Ces anticorps qui reconnaissent à la fois PAD4 et PAD3 ont été nommés anti-PAD3XR4 (de l'anglais PAD3/PAD4 *cross-reactive antibodies*)<sup>155</sup>. Ils seront nommés anti-PAD3/4 dans le reste du manuscrit. Des anti-PAD2 ont également été décrits dans 18,5% des patients atteints de PR, et 1,6% de ces patients avaient à la fois des anti-PAD2 et des anti-PAD3/4<sup>156</sup>.

### b) *Fonctions*

La PAD a besoin de calcium pour exercer son activité catalytique. *In vitro*, la concentration calcique nécessaire est de 5 à 10 mM. Or la concentration calcique dans des cellules humaines primaires telles que le neutrophile n'excède pas 100 $\mu$ M<sup>155</sup>. Cela est cohérent avec l'assertion de Zychlinsky, qui montre que PAD4 n'est pas indispensable à la nérose en fonction du stimulus<sup>52</sup>. La concentration calcique est de 0,49 à 0,98 mM dans le liquide synovial et 1,1 à 1,3 mM dans le plasma. En l'état, PAD4 n'aurait pas la concentration calcique nécessaire à la citrullination. Les auteurs ont montré que les IgG anti-PAD3/4 abaissaient le seuil d'activation de PAD4. En effet, à une concentration calcique de 0,5 mM les IgG anti-PAD3/4 augmentent la citrullination des histones d'un facteur 300, comparé au témoin IgG. L'effet des IgG anti-PAD4 est plus modéré. En même temps, le risque d'érosion osseuse est augmenté chez les patients PR anti-PAD4+ et l'est encore plus chez les patients PR anti-PAD3/4+<sup>155</sup>. Cela souligne le rôle pathogène des anticorps anti-PAD4 et anti-PAD3/4. Il est possible qu'en présence d'anti-PAD3/4, plus de citrullination ait lieu et donc plus d'ACPA produit, et on a décrit que les ACPA étaient associés à plus d'érosion osseuse<sup>138,139,157</sup>. La même équipe avait montré que l'autocitrullination de PAD4 la

rendait inactive<sup>158</sup>. Isabelle Auger et ses collègues avaient montré qu'en concentration supra-physiologique de calcium, les anti-PAD4 de patients avaient des effets différents sur PAD4 puisqu'ils inhibaient la citrullination<sup>159</sup>.

A l'inverse, les anti-PAD2 sont associés avec un risque moindre d'atteintes articulaires et pulmonaires<sup>156</sup>.

### c) ***Réponse T et rôle porteur de PAD4***

Il a été remarqué que l'on ne retrouve pas systématiquement chez les patients PR des lymphocytes T spécifiques de chaque antigène-cible des ACPA<sup>160</sup>. Dans un modèle murin, l'équipe d'Auger a montré que l'immunisation par PAD4 induit des ACPA. Ce phénomène s'explique selon le modèle d'haptène et de porteur. Un haptène est une partie d'un antigène insuffisante à induire une immunisation à elle seule. L'haptène a besoin d'un porteur. L'antigène est ainsi constitué de l'haptène et du porteur. C'est le porteur qui va induire une réponse T. On a vu en amont qu'un lymphocyte T auxiliaire peut activer plusieurs lymphocytes B qui présentent le même complexe CMH/peptide tout en exprimant des BCR différents<sup>100</sup>. Ici, PAD est le porteur et les peptides citrullinés sont les haptènes. Les peptides citrullinés sont les substrats de la PAD. Le lymphocyte T reconnaît le complexe CMH/PAD de plusieurs lymphocytes B qui expriment des BCR spécifiques de PAD ou du peptide citrulliné associé. L'effet de PAD sur l'immunisation contre des antigènes citrullinés est représenté dans la figure 18. Les auteurs ont montré que ce phénomène était spécifique de HLA-DR qui est associé à un risque plus élevé de développer la PR<sup>160</sup>.

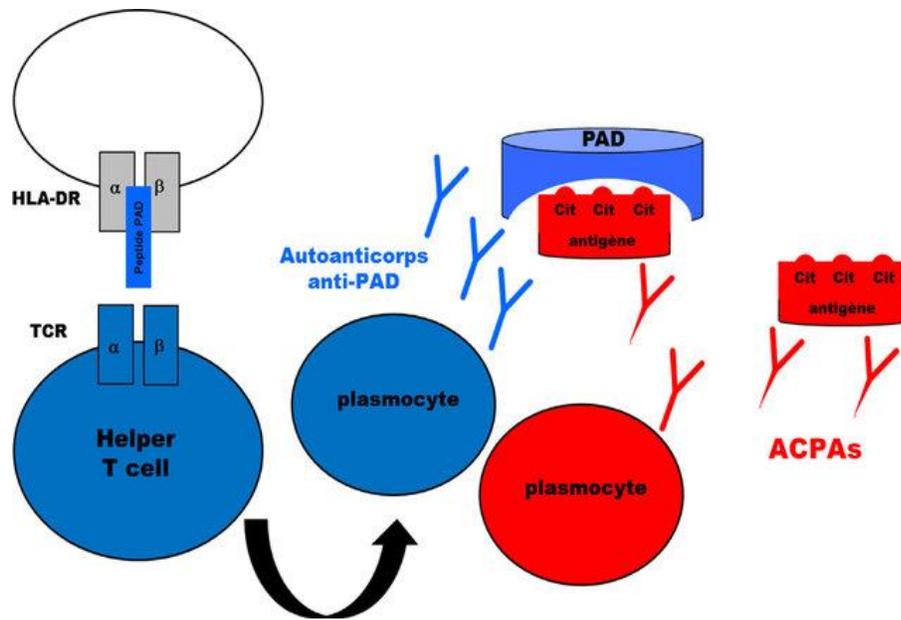


Figure 18: Représentation schématique du modèle de la production d'ACPA par immunisation contre le complexe PAD/peptide citrulliné. Les lymphocytes T auxiliaires (*helper T cell*) activent des lymphocytes B représentés en haut à gauche. Ces lymphocytes B présentent un peptide issu de PAD sur les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de HLA-DR. Cette activation induit la différenciation en plasmocytes des lymphocytes B possédant un BCR reconnaissant la PAD ou le peptide citrulliné associé. Les anticorps reconnaissant PAD sont représentés en bleu et les anticorps reconnaissant le peptide citrulliné (antigène Cit) en rouge. L'image est adaptée de l'article de Auger<sup>160</sup>.

#### d) ***Antigénicité de la peptidyl arginine déiminase***

Comme il a été décrit que les NET contiennent PAD2 et PAD4<sup>63</sup>, nous avons fait l'hypothèse que les NET seraient à l'origine de cette antigénicité. En effet on a vu que PAD2 et 4 étaient relarguées lors de la nérose<sup>63</sup>. En outre les NET pourraient jouer le rôle de porteur, au sens de la relation haptène-porteur nécessaire à l'antigénicité, comme décrit précédemment. Les DAMP des NET pourraient activer les cellules dendritiques.

## 8. Atteintes articulaires et chronicité

La PR est une inflammation systémique. Un effet clinique particulier est le gonflement de l'articulation dans un premier temps, et une atteinte du cartilage et de l'os dans un second temps. L'objectif ici est de détailler ces phénomènes biologiques.

### a) ***Invasion leucocytaire intra-articulaire***

On ne connaît pas exactement l'élément déclencheur<sup>141</sup>. On a montré que les ACPA se liaient aux ostéoclastes, et ainsi augmentaient l'ostéoclastogénèse<sup>139</sup>. Des cellules inflammatoires pourraient être activées par des complexes immuns intra-articulaires. Prenons l'exemple de la fibrine citrullinée, cible préférentielle des ACPA. L'équipe de Guy Serre a montré qu'elle était présente dans les synovites, de manière non spécifique à la PR<sup>161</sup>. Les ACPA sont eux spécifiques de la PR, et lient le fibrinogène citrulliné. Il est probable que de tels complexes immuns se forment. On a vu que dans un modèle *in vitro*, les auteurs ont montré que les macrophages se liaient au fibrinogène citrulliné dans des complexes immuns et sécrétait du TNF<sup>142,143</sup>. Cet événement est peut-être un de ceux qui contribuent à l'inflammation articulaire. Une fois que l'inflammation est exacerbée, un défaut d'efférocytose pourrait induire le relargage de DAMP, d'ADN-CpG par exemple, ce qui amplifierait encore l'inflammation. La nécrose peut intervenir, le relargage d'histones citrullinées est susceptible d'être reconnu par des anticorps anti-histones citrullinées présents dans les sérums de patient PR<sup>151</sup>. Cette explication ne prend pas en compte les PRs ACPA-.

Les neutrophiles sont nombreux à migrer dans la capsule articulaire. Les monocytes migrent également et se différencient en macrophages et ostéoclastes. A ce stade de nombreuses cytokines sont présentes et créent des boucles de rétroaction positives<sup>116</sup>.

### b) ***Erosion osseuse***

La destruction du cartilage et de l'os met en jeu les neutrophiles et les fibroblastes qui sécrètent des enzymes qui dégradent le cartilage. Les ostéoclastes résorbent l'os. Le ligand du récepteur activateur du facteur de transcription kappa-B (RANKL, de l'anglais *receptor activator of*

*nuclear factor kappa-B ligand*) est une des cytokines clés de la différenciation en ostéoclaste<sup>125</sup>. En outre les neutrophiles des liquides synoviaux de patients PR expriment RANK et RANKL<sup>162</sup>.

Les ACPA sont probablement impliqués dans l'érosion osseuse. L'équipe de George Schett a mesuré l'érosion osseuse indirectement via des marqueurs sanguins, et a montré que plus les ACPA étaient concentrés, plus ces marqueurs d'érosion osseuse l'étaient. En outre, ils ont montré que l'ACPA responsable de cette résorption osseuse était un anti-vimentine citrullinée. Or quand ils injectent ces anticorps à des souris, elles ont une érosion osseuse mais ne développent pas d'arthrite au sens clinique<sup>139</sup>. Ceci laisse à penser que l'hyperplasie de l'articulation n'est pas toujours contemporaine de la destruction articulaire, et qu'elle puisse être causée par un autre événement. Les poussées cliniques, c'est-à-dire les articulations enflées, pourraient résulter de la glycosylation des ACPA, qui sera développée en aval. Les neutrophiles pourraient sécréter de l'IL-8 en réponse à différents stimuli intra-articulaires tels que le GM-CSF, les ADN-CpG provenant de cellules mortes. Klareskog suggère l'utilisation d'anticorps thérapeutiques ciblant l'IL-8<sup>141</sup>.

### c) ***Poussées et glycosylation***

La PR évolue par poussée, sans que l'on connaisse l'élément déclencheur. En revanche on sait que la glycosylation des anticorps est variable, et que le simple changement de glycosylation du fragment constant d'un anticorps change complètement son activité. En effet chez l'homme l'ajout de groupements de galactose et d'acide sialique rends les anticorps anti-inflammatoires. Une représentation de la glycosylation des anticorps est présentée dans la figure 19. Dans un modèle murin d'arthrite induite par transfert de sérum, une équipe du Massachussets a montré que l'ajout de galactosyl-transférase et de sialyl-transférase diminuait la sévérité des arthrites<sup>163</sup>. L'équipe de Toes a montré que le pourcentage d'ACPA IgG1 sans résidus galactose corrélait avec l'activité de la PR estimée par la vitesse de sédimentation des érythrocytes. On pense que ces glycosylations modifient l'activation des récepteurs de la partie constante des anticorps<sup>164</sup>, sur les macrophages par exemple.

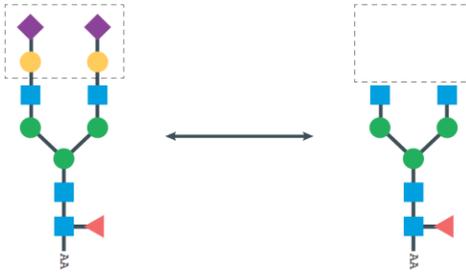


Figure 19 : Représentation schématique de la glycosylation des anticorps. AA représente la chaîne peptidique. Le N-acétylgalactosamine est en bleu, le fucose en rouge, le mannose en vert, le galactose en jaune et l'acide sialique en violet. Les glycanes peuvent devenir anti-inflammatoires à gauche ou pro-inflammatoires à droite. Adapté de l'article de Toes<sup>117</sup>.

#### d) **ACPA et cellules B mémoires**

Alors que la glycosylation change, le titre d'ACPA n'est pas modifié et ne reflète plus la maladie une fois qu'elle est établie. Les traitements au rituximab ont montré une diminution du titre d'ACPA, mais pas une complète inhibition<sup>165</sup>. Le rituximab est un anti CD20 qui élimine les lymphocytes B et leurs précurseurs, mais pas les plasmocytes. La persistance d'ACPA serait le signe de plasmocytes de longue durée de vie<sup>117</sup>.

En outre, la même équipe hollandaise a isolé les lymphocytes B de patients qui étaient spécifiques des peptides citrullinés CCP2. Ils ont analysé les lymphocytes B par cytométrie en flux. Ils ont montré que la majorité de ces lymphocytes B avaient un phénotype mémoire<sup>166</sup>. Une autre équipe a montré qu'en restimulant ces lymphocytes mémoires avec des ODN-CpG, de l'interleukine 21 et du CD40L, ces lymphocytes mémoires sécrétaient des ACPA, très probablement parce qu'ils se seront différenciés en plasmocytes. *In vivo*, il est probable que ce soit de l'ADN extracellulaire qui joue le rôle *in vitro* des ODN-CpG. Cet ADN pourrait provenir de NET partiellement dégradés. En outre, le nombre de lymphocytes mémoires n'était pas corrélé à l'activité de la maladie mesurée par le DAS28. Les auteurs suggèrent que la présence de ces lymphocytes mémoires devrait être un critère pour connaître l'état de la maladie<sup>167</sup>.

### e) ***Focus sur le GM-CSF***

Le GM-CSF est un des acteurs clé de la physiopathologie de la PR. Il a été d'abord décrit comme indispensable à la maturation des neutrophiles à partir de précurseurs dans la moelle osseuse, au cours de l'hématopoïèse. Il a aussi été associé à l'auto-immunité<sup>168</sup>, notamment la PR où il est considéré comme une cible thérapeutique<sup>169,170</sup>. Il est difficile de le classer dans une phase particulière de la PR. Il est produit par les lymphocytes B, T, les cellules myéloïdes, les cellules résidentes telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales ou les chondrocytes. Il a de nombreuses fonctions, parmi lesquelles la diapédèse des cellules myéloïdes comme le neutrophile, ou encore la sensibilisation et l'activation de ce dernier. Ainsi le GM-CSF participe au gonflement et à la destruction articulaire. En outre l'équipe de Shimon Sakaguchi a montré son implication dans un modèle murin de PR<sup>171</sup>. Il a été décrit que son mode d'action passait par la kinase Janus (JAK, de l'anglais *Janus kinase*) 2, STAT3 et 5<sup>172,173</sup>.

Du point de vue de la défense antimicrobienne, il a été montré que le prétraitement du neutrophile par le GM-CSF permettait une meilleure réponse contre beaucoup de ligands TLR<sup>174</sup>.

Les TLR ont été initialement découverts chez la drosophile. Ce serait Christiane Nüsslein-Volhard qui se serait exclamée en allemand « *Das war ja toll* » qu'on peut traduire par « c'est formidable »<sup>175</sup>. Ces TLR reconnaissent une multitude de composants issus de bactéries ou de virus. Il a aussi été montré que le TLR9 peut reconnaître de l'ADN humain dans certaines conditions<sup>88,176,177</sup>. Beaucoup de TLR sont exprimés par le neutrophile, et participent à son activation<sup>87</sup>.

## f) **Focus sur les motifs CpG et le TLR9**

On a vu au-dessus que les ODN-CpG déméthylés sont susceptibles d'activer directement les lymphocytes B. On s'est aperçu que certains ODN-CpG induisaient une activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC, de l'anglais *plasmacytoid dendritic cells*) et des cellules dendritiques myéloïdes (cDC, de l'anglais *conventionnal dendritic cells*)<sup>178</sup>. Par la suite, on a cherché à classer les CpG selon leurs effets. On les a classés en type A qui activent préférentiellement les pDC, en type B qui activent préférentiellement les lymphocytes B et en type C qui combine les propriétés structurales de A et B. Les CpG de type C activent à la fois les lymphocytes B et les pDC. Le CpG 2395 que nous avons utilisé est de type C. Les trois types d'ODN-CpG sont présentés dans la figure 20.

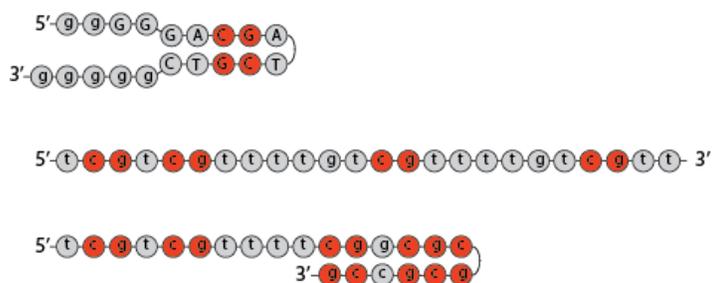


Figure 20 : Représentation schématique des classes d'oligonucléotides CpG. Les minuscules indiquent des liaisons phosphorothioates. Les majuscules indiquent des liaisons phosphodiesters. Les lettres représentent les bases nucléiques. Les dinucléotides CpG sont représentés en rouge. Les classe A est au-dessus, B au milieu et C en dessous.

© Invivogen

C'est le TLR9 qui reconnaît les motifs CpG hypométhylés. Le TLR9 est intracellulaire, sa forme active se situe dans les endosomes, et un clivage est nécessaire à son activation<sup>179</sup>. Conformément à sa fonction canonique antimicrobienne, le TLR9 reconnaît avant tout l'ADN bactérien<sup>87</sup>. On a affirmé que puisque l'ADN de mammifère contenait moins de motifs CpG déméthylés, alors il n'était pas reconnu par le TLR9<sup>180</sup>. Néanmoins, on a démontré le contraire. L'équipe de Ruslan Medzhitov a astucieusement généré un TLR hybride, qui contenait l'ectodomaine du TLR9 et la

partie transmembranaire du TLR4. La localisation est déterminée par le domaine transmembranaire, l'hybride était situé à la membrane. Dans ces conditions, l'hybride reconnaît l'ADN de mammifère. Ainsi, ces auteurs suggèrent que l'étape clé réside dans la capacité des ligands à trouver leur récepteur, et que cette localisation endosomale du TLR9 nous préviendrait d'une reconnaissance de notre ADN extracellulaire<sup>88</sup>. Une autre équipe a montré que si l'ADN de mammifère s'associe avec un peptide antimicrobien particulier de 37 acides aminés (LL-37), alors il stimule le TLR9 des cellules dendritiques plasmacytoïdes<sup>176</sup>. De plus, une autre équipe a montré que si l'ADN du soi contient quelques motifs CpG, alors cela induit l'activation des cellules dendritiques, là aussi via le TLR9<sup>177</sup>. Dans ce modèle l'ADN était complexé à des anticorps, formant des complexes immuns<sup>177</sup>. Il est probable que des conditions inflammatoires intenses puissent dégrader des cellules et induire le relargage d'ADN du soi. En outre, notre laboratoire a montré que le TLR9 est exprimé à la surface du neutrophile et est fonctionnel<sup>181</sup>. On a vu que les NET étaient composés d'ADN du soi. Toutes ces données suggèrent que, sous certaines conditions, l'ADN des NET peuvent être reconnus par le TLR9. En 1999 une équipe suédoise a montré que l'injection intra-articulaire d'ADN bactérien contenant des motifs CpG induit l'arthrite sur plusieurs souches murines. Ils l'ont interprété comme de l'arthrite septique<sup>182</sup>. A la lumière des expériences en amont qui ont suivi ils auraient peut-être modifié leur interprétation. En outre, une équipe russe a rapporté que les patients PR avaient plus de motifs CpG dans leur ADN circulant que les donneurs sains<sup>183</sup>. Il est possible que cet ADN provienne d'un défaut d'efférocytose. Une autre équipe a analysé par spectrométrie de masse les complexes immuns de patients PR et de patients atteints d'arthrose. Ils ont montré que les nucléosomes faisaient partie des complexes immuns uniquement chez les PR<sup>184</sup>. Ces nucléosomes pourraient provenir de NET dégradés. Notre laboratoire a récemment montré que les NET augmentaient la sécrétion d'IL-8 chez les neutrophiles et les macrophages, et que la protéine du complément C1q augmentait cette sécrétion chez le macrophage<sup>118</sup>. Or ici, l'activation semblait indépendante du TLR9.

### g) *Chronicité*

C'est un défaut de résolution de l'inflammation. Dans le cadre d'une infection, Polly Matzinger considère que l'inflammation se résout lorsque la cellule dendritique n'a plus d'antigène à apprêter parce que le pathogène aura été éliminé. Dans le cas de la PR qui est une inflammation

stérile, le ou les antigènes sont des composants du soi, et sont amenés à perdurer. Ainsi la maladie se chronicise. Dans le cadre d'un défaut des lymphocytes T reg, comme une instabilité, celle-ci n'a pas vocation à résoudre seule, et la maladie se chronicise. Un éventuel défaut de clairance n'est pas non plus auto-résolutif. Ces trois scénarios montrent comment l'inflammation et la maladie perdure.

## 9. Les traitements de la polyarthrite rhumatoïde

### a) *Le méthotrexate, les biothérapies et les anti-JAK*

Le méthotrexate est le traitement de première intention de la PR<sup>185</sup>. C'est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN. Ce faisant, il induit une accumulation d'adénosine, un précurseur de nucléotides. Les cellules relarguent cette adénosine qui a un effet anti-inflammatoire, par exemple elle induit l'apoptose sur des monocytes et inhibe le chimiotactisme des neutrophiles<sup>186</sup>. Le méthotrexate bloque aussi la réplication cellulaire. Lors de la phase active de la PR, les cellules du système immunitaire se multiplient. Le méthotrexate l'entrave. De par son effet antiprolifératif il est aussi utilisé comme anti-cancéreux. Le léflunomide est une alternative au méthotrexate, en effet lui aussi est un inhibiteur de la synthèse de l'ADN, en l'occurrence il inhibe la dihydroorotate déshydrogénase<sup>187</sup>.

En deuxième intention viennent les biothérapies<sup>185</sup>. La recherche a identifié de nombreuses cibles, y compris des cytokines ou récepteurs de ces cytokines impliquées dans la physiopathologie de la PR. Par exemple, on a utilisé le rituximab qui est un anticorps anti-CD20. CD20 est exprimé chez les lymphocytes B mais pas les plasmocytes<sup>165</sup>. En outre, on cible le TNF qui est impliqué. Pour le contrer, on peut utiliser l'adalimumab, un anticorps monoclonal humanisé qui va se complexer au TNF et ainsi l'empêcher d'interagir avec son récepteur. On peut utiliser l'etanercept qui est une protéine de fusion entre le deuxième récepteur du TNF et d'un fragment d'IgG1. Ainsi on diminue le TNF libre. On peut cibler d'autres cytokines, comme l'IL-6 avec le tocilizumab qui bloque son récepteur. On peut citer l'abatacept qui bloque l'antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4, de l'anglais *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*

4) qui bloque la costimulation indispensable à l'immunité adaptative. La multiplication des biothérapies permet d'augmenter les chances de rémission. Cependant chaque biothérapie a des effets indésirables, et il est dangereux de les associer.

En troisième intention sont prescrits les anti-JAK. De nombreuses cytokines jouent un rôle dans la PR, et parmi celles-ci beaucoup activent la voie de signalisation JAK-STAT, d'où la volonté de développer de tels médicaments. Citons le tofacitinib, le baricitinib, le perfcitinib, l'upadacitinib, le fligotinib et le decernotinib. Il existe quatre membres de la famille JAK que sont JAK1, JAK2, JAK3 et la plus étonnante tyrosine kinase 2 (TYK2). JAK1, 2 et 3 possèdent à la fois un domaine récepteur extracellulaire et un domaine kinase intracellulaire, avec bien sûr un domaine transmembranaire. TYK2 ne possède pas de domaine récepteur extracellulaire<sup>188</sup>. Ces anti-JAK ciblent une ou plusieurs JAK<sup>185</sup>, et bloquent leur activité kinase<sup>172</sup>. Les JAK phosphorylent les transducteurs de signal et activateurs de transcription (STAT de l'anglais *signal transducers and activators of trnascrition*). On dénombre 7 STAT que sont STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6<sup>172</sup>. Le mécanisme d'activation est classique. La liaison du ligand à son récepteur entraîne la dimérisation des JAK qui se trans-phosphorylent et recrutent les STAT. Il s'ensuit une phosphorylation de STAT, qui induit aussi sa dimérisation via un domaine SH2. STAT dimérisé est alors transloqué dans le noyau où il exercera son activité de facteur de transcription<sup>173</sup>.

Les corticoïdes ne sont pas un traitement de fond de la PR<sup>189</sup>.

### b) ***Focus sur le tofacitinib***

C'est le premier anti-JAK développé<sup>172</sup>. Le tofacitinib a été décrit comme un anti-JAK 1, 2 et 3<sup>172,185</sup>, avec une activité inhibitrice moindre de JAK2<sup>172,190</sup>. Il inhibe l'effet de nombreuses cytokines de la PR, c'est le cas des interférons  $\alpha$ ,  $\beta$ , des interleukines 6, 7, 10, 12, 15, 21, 23, ou encore le GM-CSF. C'est un inhibiteur compétitif. En effet le tofacitinib se lie au site de liaison de l'ATP dans le domaine catalytique de JAK. La structure du tofacitinib mime celle de l'ATP, sans le groupement triphosphate nécessaire à la phosphorylation et la transduction du signal<sup>190</sup>. Lors d'un essai clinique, il s'est révélé plus efficace que le méthotrexate lors d'un traitement en première intention de patients atteints de PR<sup>191</sup>. On a reporté que le tofacitinib induisait une diminution modérée du nombre de lymphocytes, de cellules NK et de neutrophiles. Les anti-JAK

sont associés à un risque augmenté de contracter des infections opportunistes<sup>188</sup>. De manière étonnante, on peut noter que le nombre de lymphocytes B augmente, ce qui est aussi le cas chez des sujets JAK3-/-<sup>190</sup>. Une autre étude a également montré une neutropénie chez une minorité de patients et une augmentation des infections chez les traités comparés aux témoins<sup>192</sup>. Aucune étude sur l'effet précis du tofacitinib sur le neutrophile n'avait été publiée au début de cette thèse. Les articles traitant du tofacitinib et du neutrophile publiés après le début de l'étude seront abordés dans la partie discussion. Il avait été démontré que le tofacitinib diminuait la sécrétion d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4+ de patients PR. Les lymphocytes T CD4+ étaient purifiés à partir du sang ou du liquide synovial<sup>193</sup>. D'autres auteurs ont obtenus les mêmes résultats et ont montré que le tofacitinib diminuait la sévérité de l'arthrite dans un modèle murin<sup>194</sup>. La formule topologique du tofacitinib est donnée dans la figure 21.

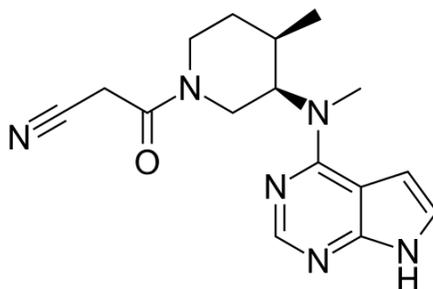


Figure 21 : Représentation schématique topologique du tofacitinib. Image libre de droits.

## 10. Quelques modèles murins d'arthrite

Pour comprendre profondément une maladie, il est nécessaire d'en maîtriser les mécanismes physiopathologiques. Pour des raisons éthiques évidentes, on n'induit pas de telles maladies à des humains. D'un point de vue évolutionniste, la souris est proche de l'homme. On peut donc considérer que dans un grand nombre de cas, la physiopathologie murine est une approximation de ce qui se déroulerait chez l'homme.

On découvrit que 3,3% des patients atteints de PR avaient des anticorps anti-collagène de type 2 (CII)<sup>195</sup>. Le collagène est un composant essentiel du cartilage et des os. Sa reconnaissance par des anticorps peut induire sa destruction. On a alors voulu développer une immunisation contre ce collagène de type 2, d'abord chez le rat puis chez la souris. On utilise le CII émulsionné dans de l'adjuvant complet de Freund, un composé destiné à stimuler le système immunitaire. Cet adjuvant contient des mycobactéries. Les souris développent des signes d'arthrite, c'est-à-dire un gonflement des articulations, une destruction de l'os et du cartilage. On a lui a donné le nom d'arthrite expérimentale au collagène (CIA de l'anglais *collagen-induced arthritis*)<sup>196</sup>. La CIA est un modèle très utilisé. Les souris CIA développent parfois des anti-CII, et récemment l'équipe de Pitzalis a montré la présence d'ACPA, et ces taux d'ACPA diminuent en déplétant les macrophages. Les macrophages exprimaient et relarguaient PAD4<sup>197</sup>.

Un modèle proche est celui de l'arthrite induite par transfert de sérum de souris atteintes de CIA. Cela prouve que les anticorps sont au moins en partie responsables de l'arthrite<sup>198</sup>. Puisqu'il n'y a pas eu de réponse adaptative, l'arthrite se résout rapidement. Parmi les modèles de transfert de sérum on peut citer le modèle très utilisé<sup>199</sup> K/BxN qui génère des anticorps anti-glucose-6-isomérase<sup>200</sup>, une enzyme impliquée dans la glycolyse.

Un autre modèle est issu d'un dérèglement de la sélection thymique. L'équipe de Sakaguchi a développé une souche de souris SKG qui développait spontanément de l'arthrite. Le transfert adoptif de lymphocytes CD4+ SKG dans des souris athymiques BALB/c induit l'arthrite. Ils se sont rendu compte que la mutation touchait le gène ZAP-70. Cette protéine est essentielle à la transduction du signal associé au TCR. Il avait été montré qu'une mutation du domaine kinase induit une absence de sélection positive et donc une absence de lymphocytes T. Dans l'article de

Sakaguchi, la mutation touche le domaine SH2. En conséquence la phosphorylation de ZAP-70 est très faible dans les thymocytes, mais pas absente. Les thymocytes sont plus immatures car expriment moins de TCR. Le transfert de thymocytes immatures induit l'arthrite, pas celui de thymocytes matures. Il semblerait qu'en modifiant la maturation des lymphocytes, des cellules T autoréactives ne soient plus éliminées par la sélection négative, ni éventuellement converties en T reg. Les motifs d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITAM de l'anglais *immunoreceptor tyrosine-based activating motif*) sont aussi essentiels à la signalisation du TCR, et en amont de ZAP-70. Les auteurs estiment à 2,5% les mutations touchant ITAM chez les patients atteints de PR<sup>201</sup>.

Il existe un modèle murin étonnant de polyarthrite induit par une un défaut de dégradation de l'ADN couplé à un défaut du récepteur de l'interféron de type I (IFN-IR)<sup>202</sup>. Au départ l'équipe de Nagata a étudié des souris déficientes en DNase II. Les macrophages de ces souris avaient de l'ADN non digéré, et il s'en suivait une sécrétion d'interféron  $\beta$  et de TNF par le macrophage. La sécrétion d'interféron  $\beta$  est létale *in utero*. Il a fallu générer des mutations sur le gène de l'IFN-IR pour que les souris survivent mais déclarent l'arthrite<sup>13</sup>. Le même groupe a montré que le méthothrexate, les anti-TNF, IL-1 ou IL-6 protégeaient de la polyarthrite. Cela souligne les ressemblances avec la PR<sup>203</sup>.

Un modèle relativement proche de PR ACPA+ est l'arthrite induite par peptide citrulliné. Une équipe anglaise a essayé d'induire l'arthrite chez des souris qui possédaient le domaine de reconnaissance du CMH humain DR4 et le reste du CMH de souris IE (DR4-IE). Ces souris ne possèdent pas de CMH murin fonctionnel, alors que le CMH DR4 humain l'est<sup>204</sup>.

L'immunisation avec du fibrinogène citrulliné humain induit environ 35% d'arthrite, contre aucun avec du fibrinogène humain natif. Dans les infiltrats synoviaux, il y avait peu de neutrophiles. Les protéines citrullinées étaient détectées dans les synoviocytes fibroblastiques<sup>205</sup>. Néanmoins, l'inflammation était faible et le modèle n'a pas été reproduit à ma connaissance.

On peut également citer le modèle étonnant d'arthrite à l'adjuvant qui se limite au rat. L'adjuvant complet de Freund est suffisant pour induire une arthrite. Cela s'explique par un mimétisme moléculaire entre la protéine de choc thermique (HSP, de l'anglais *heat choc protein*) 65 et les protéoglycanes du cartilage<sup>199</sup>.

Ce bref aperçu souligne que des mécanismes différents induisent tous les mêmes manifestations cliniques de l'arthrite. Ainsi, les leçons des modèles animaux d'arthrite ne doivent pas être confondues avec la PR. Chaque modèle permet d'approximer certains mécanismes à certaines phases de la maladie<sup>199</sup>.

## 11. Hypothèses de travail

Un schéma indiquant les étapes clé de la physiopathologie de la PR est donné dans la figure 22.

Nous avons produit plusieurs objectifs que nous avons regroupés en deux grandes hypothèses de travail qui suivent le déroulement de la physiopathologie de la PR décrite.

La première hypothèse est que les NET ont un rôle majeur dans la physiopathologie de la PR. On suspecte que les NET participent à la physiopathologie de la PR en activant d'autres cellules immunitaires, en contribuant à la rupture de la tolérance qui induit la production d'autoanticorps comme les ACPA et à l'inflammation articulaire chronique. Nous avons déterminé si les NET étaient de grands pourvoyeurs de PAD4 et 2 et donc s'ils pourraient contribuer à l'autocitrullination. En conséquence les anticorps de patients anti-PAD4 et 3/4 auraient dû se lier aux NET via PAD4, nous avons testé cela. Nous avons mis en place un modèle murin afin de déterminer si les NET pouvaient induire des autoanticorps comme les ACPA ainsi qu'une maladie proche de la PR.

La deuxième hypothèse est que l'effet thérapeutique du tofacitinib est en partie médié par son action sur le neutrophile. Plus précisément, nous avons fait l'hypothèse que le tofacitinib diminue l'état d'activation du neutrophile, notamment la sécrétion d'IL-8 ou la surexpression de CD11b ou CD66b. Un objectif supplémentaire était de déterminer si les neutropénies observées chez les patients PR traités par tofacitinib pouvait s'expliquer par une cytotoxicité directe.

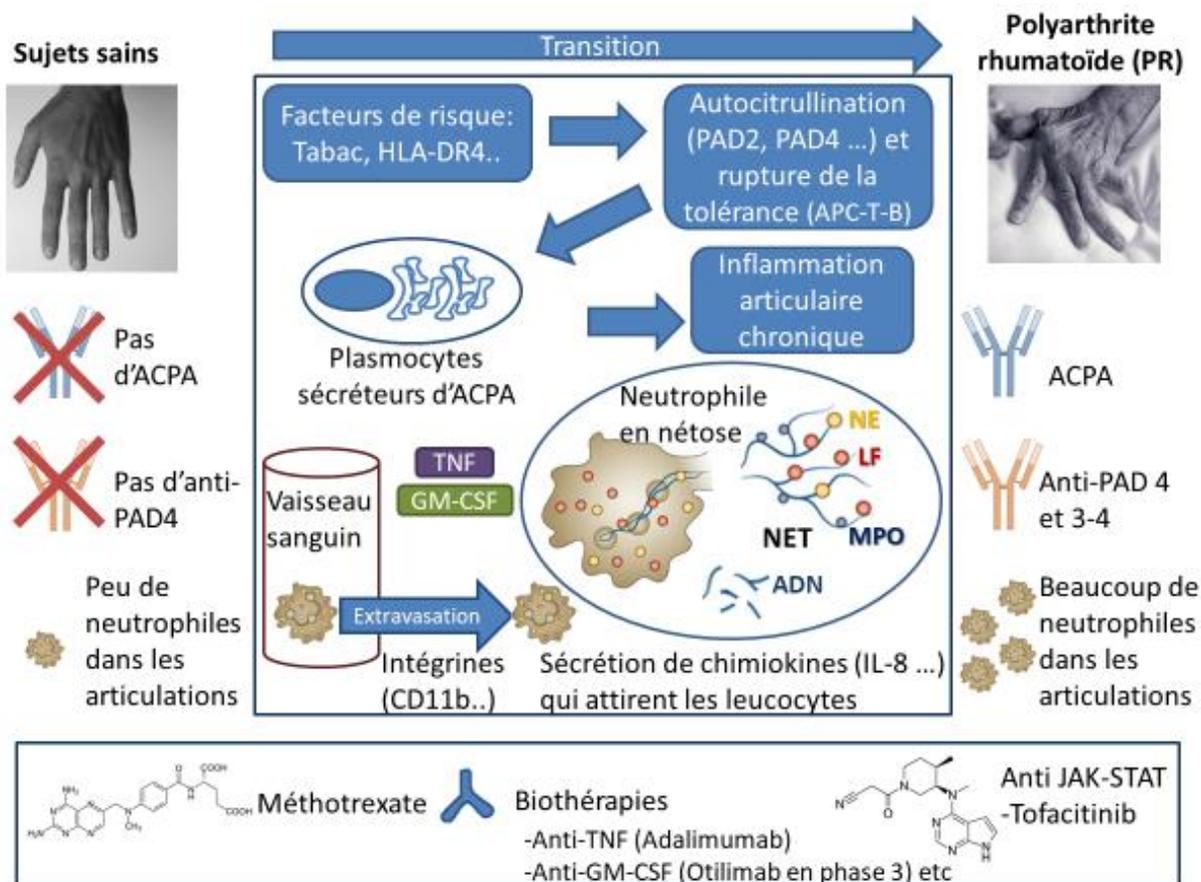


Figure 22 : Représentation schématique des étapes clés de la physiopathologie de la PR. A gauche, une main de personne saine. A droite, une main de patient atteint de polyarthrite rhumatoïde. Au milieu, les encadrés à fond bleu représentent les étapes de la physiopathologie qui se succèdent selon l'ordre indiqué par les flèches. L'encadré ovale met l'accent sur la nétose dont l'implication dans la physiologie de la PR reste discutée. L'encadré en bas représente l'arsenal thérapeutique.



# III. Résultats



# A. Les NET sont antigéniques et arthritogènes dans un modèle murin par l'induction d'anticorps anti-lactoferrine

## 1. Brève réintroduction

Les NET sont régulièrement suspectés de participer à la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires, dont la PR. Dans les maladies auto-immunes telles que les vascularites par exemple, les NET sont supposés être les antigènes à partir desquels se développent des auto-anticorps. Ils pourraient aussi être immunogènes et/ou pro-inflammatoires. Le rôle NET comme inducteurs d'ACPA est suspecté mais n'avait pas été démontré au début de cette thèse à ma connaissance. Comme vu en introduction, la citrullination est une des étapes menant à la production d'ACPA. Cette citrullination est réalisée par les PAD. Les acteurs favorisant cette citrullination sont insuffisamment compris. Parmi les cibles des ACPA, de nombreuses protéines sont extracellulaires. Or les PAD dont PAD4 et 2 sont intracellulaires. Une grande question est donc de savoir comment ces PAD dans le milieu extracellulaire. PAD4 et 2 sont exprimées chez le neutrophile, qui représente plus de la moitié des globules blancs chez l'homme. L'équipe de Julia Spengler a montré que PAD4 et 2 étaient retrouvées dans les NET et relarguées dans les surnageants de cellules nécrotiques, et que ces PAD étaient présentes et actives dans les liquides synoviaux de patients atteints de PR<sup>63</sup>. Or il a été décrit que les concentrations calciques extracellulaires étaient insuffisantes à l'activité catalytique des PAD, y compris la concentration calcique du liquide synovial<sup>155</sup>. On a découvert que les anticorps anti-PAD 3/4, c'est-à-dire des anticorps qui réagissent de manière croisée à PAD4 et 3, se lient à la PAD4 et diminue son seuil

d'activation, de telle sorte que les concentrations calciques extracellulaires sont suffisantes à son activation<sup>155</sup>. Les anticorps anti-PAD3/4 ont été découverts par l'équipe d'Anthony Rosen à Baltimore. Ces anticorps sont spécifiques de la PR. Les auteurs ont montré que la présence de ces anticorps étaient associés à des érosions osseuses plus importantes. Pris ensemble ces résultats suggèrent un rôle clé de la nétose dans la citrullination, à savoir que les NET seraient les pourvoyeurs de PAD4 qui, avec les anti-PAD3/4, permettraient une citrullination accrue et éventuellement une production d'ACPA supplémentaire. Ceci expliquerait l'érosion osseuse plus importante, parce que le lien entre ACPA et érosion osseuse a été démontré. L'équipe de Auger a proposé un modèle qui explique à la fois l'apparition des anti-PAD4 et des ACPA<sup>160</sup>. Puisque PAD2 est aussi retrouvé dans les liquides synoviaux de patients PR, nous avons voulu déterminer si les anti-PAD4 et 3/4 pourraient se lier à PAD2. En effet si les anti-PAD4 et/ou 3/4 se lient à PAD2 alors peut être qu'ils diminuent le seuil d'activation calcique de PAD2, comme les anti-PAD3/4 le font pour PAD4. Nous avons voulu estimer la quantité de PAD4 et PAD2 qui passe de l'intérieur du neutrophile au NET pour évaluer l'hypothèse selon laquelle les NET seraient les pourvoyeurs majeurs de PAD4 et PAD2 extracellulaire. Puisque PAD4 a été décrit à la surface des neutrophiles<sup>152</sup> nous avons voulu déterminer si les anti-PAD4 et 3/4 s'y liaient. Une telle liaison pourrait ainsi activer cette PAD4 membranaire. Afin de tester la capacité des NET à induire des auto-anticorps comme les ACPA et induire la polyarthrite rhumatoïde, nous avons mis en place un nouveau modèle murin. Pour cela nous avons immunisé des souris avec des NET de patients atteints de PR. Après immunisation, nous avons injecté des NET dans l'articulation des souris pour étudier l'effet inflammatoire dans l'articulation. Nous avons démontré que les NET étaient antigéniques et inflammatoires dans l'articulation dans notre modèle. Nous avons déterminé les protéines-cibles des anticorps induits, et estimé leur présence dans les liquides articulaires de maladies inflammatoires comme la PR.

## 2. Matériel et méthodes

### a) ***Prélèvements humains***

Un total de 19 patients provenant du service de rhumatologie de l'hôpital Avicenne et 30 donneurs sains de l'établissement français du sang de Bobigny ont été prélevés. Le sang a été collecté dans des tubes contenant de l'EDTA. Le diagnostic de PR a été déterminé selon les critères de *l'American college of rheumatology* et de *l'European league against rheumatism* de 2010. Ces patients n'étaient pas sous biothérapie. Ils étaient soit sans traitement, soit sous méthotrexate, soit sous léflunomide, avec ou sans corticoïdes oraux. Le liquide synovial de l'articulation du genou a été prélevé chez deux patients atteints de PR, un patient lupique et un patient atteint de pseudo-polyarthrite rhizomélique provenant aussi du service de rhumatologie de l'hôpital Avicenne.

### b) ***Isolement des neutrophiles***

Les neutrophiles ont été fraîchement isolés par sédimentation du sang sur un gradient de densité de dextran (Axis Shield). Les globules rouges contaminants ont été lysés en utilisant du tampon ACK (composé de NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, et EDTA). Les anticorps utilisés étaient l'anti-CD66b (clone G10F5) conjugué au FITC (BD Pharmingen) et l'anti-CD11b (clone ICRF44) conjugué au PE (BD Pharmingen) ou leurs isotypes contrôle. Ils étaient dilués dans du tampon de marquage composé de PBS, de sérum de veau fœtal inactivé filtré 5%, de gammaglobuline humaine à 100µg/ml (Calbiochem) et de 0,02% d'azide de sodium. Les cellules ont été marquées avec les anticorps pendant 30min à 4°C. La pureté a été estimée par cytométrie en flux, le pourcentage de cellules CD66b<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> était supérieur à 95%.

### c) ***Isolement des monocytes et différenciation en macrophages***

Les PBMC ont été isolés comme décrit ci-dessus. Un tri des monocytes a été réalisé avec des microbilles anti-CD14 (Miltenyi) selon les instructions du fournisseur. Les monocytes ont été

cultivés pendant une semaine dans des puits en Téflon (Savillex) dans du milieu X-vivo (Lonza) avec 100ng/ml de M-CSF (Immunotools).

#### d) ***Immunofluorescence***

$50.10^3$  neutrophiles fraîchement isolés ont été déposés sur une lame de verre borosilicate (NUNC) sur laquelle on avait déposé de la poly-L-lysine pendant 15min et que l'on a lavée au PBS. Les neutrophiles ont été stimulés par du PMA à 50nM. Après 4h, le surnageant a été jeté, les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 4%. On a saturé avec 2% d'albumine bovine (Sigma-Aldrich), 2% de sérum de chèvre décomplémenté (Eurobio), 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Un anticorps anti-histone (clone H11-4, Sigma-Aldrich) a été utilisé à 2,5 $\mu$ g/ml. L'anticorps secondaire anti-IgG de souris est couplé à l'Alexa-Fluor 568 (Invitrogen, 4 $\mu$ g/ml). Les plasmas de souris immunisées ont également servi d'anticorps primaires et ont été révélés avec le même anticorps secondaire. L'ADN a été marqué par du SytoxGreen (Invitrogen). Les lames ont été analysées sur un microscope à fluorescence Zeiss Axioskop.

Les sera de patients ont été dilués au centième dans du PBS BSA 2% Triton X-100 0,2%. Un anticorps secondaire anti-IgG humain conjugué à l'AlexaFluor568 (Life Technologies) a été utilisé au 400<sup>ème</sup>. Après lavage, le noyau des cellules a été coloré avec du Sytox Green (Life Technologies) et analysé avec un microscope à fluorescence Zeiss Axioskop.

#### e) ***Cytométrie***

Pour vérifier la pureté, les anticorps utilisés étaient l'anti-CD66b (clone G10F5) conjugué au FITC (BD Pharmingen) et l'anti-CD11b (clone ICRF44) conjugué au PE (BD Pharmingen) ou leurs contrôles isotypiques. Ils étaient dilués dans du tampon de marquage composé de PBS, de sérum de veau fœtal inactivé filtré 5%, de gammaglobuline humaine à 100 $\mu$ g/ml (Calbiochem) et de 0,02% d'azide de sodium. Les cellules ont été marquées avec les anticorps pendant 30min à 4°C. Pour tester la réactivité des sera, ils ont été dilués au centième dans le même tampon, et un anticorps secondaire anti-IgG humaines couplé au PE (Southern Biotech) a été utilisé au 50<sup>ème</sup>. Pour le marquage des monocytes un F(ab')<sub>2</sub> biotinylé anti IgG murines (Santacruz, 2 $\mu$ g/ml) a été dilué au et couplé à de la streptavidine-PE (Invitrogen, 2 $\mu$ g/ml). L'acquisition a été faite avec le Calibur (BD). L'analyse a été réalisée avec CellQuest (BD).

#### f) ***Production de NET solubles***

La nétose a été induite *in vitro*. Des neutrophiles adhérents au fond d'une lame de verre recouverte de poly-L-lysine ont été cultivés dans du milieu de culture RPMI 1640 (Gibco) et stimulés par du PMA à 50nM. Après 4h de culture, le surnageant a été jeté, les chambres ont été lavées deux fois avec du PBS et les NET ont été détachés par ajout de désoxyribonucléase 1 (Sigma-Aldrich, 5U/ml, 15min) dans du PBS. La réaction fût stoppée par 3mM d'EDTA. Les surnageants ont été centrifugés 300g 10min pour retirer les cellules intactes. Le surnageant a été récupéré et recentrifugé à 16 000g 10min pour retirer les débris. La même procédure a été réalisée sans neutrophile, et le surnageant correspondant constitue le contrôle que l'on nomme tampon (TP). La quantité d'ADN double brin a été mesurée par mesure de la DO à 595nm en présence de picogreen (Sigma-Aldrich) et l'ADN total a été mesuré par spectrophotométrie (NanoDrop technology). Le contenu en protéines a été estimé via un gel SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide et les tailles des brins d'ADN a été estimé via un gel d'agarose à 1,5%.

#### g) ***Immunisation des souris***

Des souris de fond génétique C57BL/6 ont été utilisées. Le sang a été collecté une première fois à J0 et les premiers plasmas ont été préparés. Une émulsion a été réalisée à partir de NET à 21µg/ml de patients et d'adjuvant complet de Freund volume à volume et injecté en sous-cutanée à la base de la queue. En contrôle une souris a reçu du TP et de l'adjuvant complet de Freund. Un rappel a été réalisé 14 jours après la première injection. Le sang a été collecté au 21<sup>ème</sup> jour. Au 28<sup>ème</sup> jour, une injection de NET de patient PR a été réalisée dans la capsule articulaire du genou, et une injection témoin de tampon a été réalisée dans le genou opposé de la même souris. Au 41<sup>ème</sup> jour, le plasma est à nouveau préparé, les souris sont euthanasiées, les pattes ont été prélevées, décalcifiées et incluses en paraffine puis des coupes histologiques du genou sont réalisées et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

#### h) ***Concentration de NET***

Les NET ont été concentrés à l'aide de filtres Amicon Ultra laissant passer les molécules de poids moléculaire inférieur à 10kDa (Millipore). Les tubes étaient centrifugés à 4000g pendant une

heure. La phase supérieure est appelée « NET concentré » et la phase inférieure « filtrat ». Le témoin (TP) a été centrifugé dans les mêmes conditions.

### i) **ELISAs**

Les NET ou le contrôle ont été dilués au demi dans du PBS, et 50µl ont été déposés par puits dans une plaque ELISA (Fisher Scientific) à 4°C sur la nuit. Dans une autre expérience, les liquides synoviaux de patients sont dilués dans du PBS et déposés. Dans une autre expérience la lactoferrine purifiée humaine (Biorad) est diluée à 500 ng/ml dans du PBS. Dans d'autres expériences, de la PAD4 recombinante (Sigma-Aldrich) à 3µg/ml ou de la PAD2 (Cayman Chemicals) à 3µg/ml ont été déposées pendant la nuit.

Après saturation avec du PBS-Tween 0,05% BSA 0,5% pendant 2h, les plasmas de chaque souris, avant ou après immunisation, ont été déposés au 500<sup>ème</sup> pendant 1h à température ambiante (TA). Dans une autre expérience, un anti-lactoferrine (clone 2B8) commercial (Abcam) est utilisé à 2µg/ml dans 50µl de PBS-Tween 0,05% BSA 0,5% à TA. Après 1h, les anticorps secondaires anti-IgG murine (Jackson) couplé à la HRP ont été ajoutés au 5000<sup>ème</sup> à TA. Dans les expériences ayant attrait directement à PAD2 et 4 les plasmas de souris anti-NET ont été déposés au 500<sup>ème</sup> comme témoins de l'adsorption des NET. Les sérums ou les IgG purifiées de sérums de patients PR anti-PAD4 et anti-PAD3/4 ont été diluées à 30µg/ml. Ces sérums ou IgG purifiées de sérum ont été fournies par de groupe du Dr. Anthony Rosen à Baltimore. Après 1h, les anticorps secondaires anti-IgG murine ou humaine (Jackson) ont été ajoutés au 5000<sup>ème</sup> ou 40 000<sup>ème</sup> respectivement.

La révélation a été réalisée en utilisant du TMB (Sigma). La DO à 450nm a été mesurée en utilisant le lecteur de microplaque 680 (Biorad). Chaque mesure a été prise en duplicat ou triplicat.

### j) **Western blot**

Des NET ont été séparés sur gel SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide, ont migré puis ont été transférés sur membrane en PVDF. Nous avons utilisé un puits unique, puis nous avons découpé plusieurs bandelettes de 4mm de large. Dans d'autres expériences un million de neutrophiles ont

été lysés avec du tampon RIPA (PMSF 200mM, orthovanadate 100mM). La totalité du lysat, 40µl de NET, la 40µl des NET concentrés ou du filtrat correspondant, 40µl de surnageant correspondant concentré ou non et 400ng de PAD4 recombinante (Sigma-Aldrich) ont été déposés sur SDS-PAGE à 12,5%, ont migré et ont été transférés après migration sur membrane en PVDF. Après saturation dans du TBS lait 5%, la réactivité de chaque plasma a été testée individuellement, en diluant au 500<sup>ème</sup> sur la nuit. Dans une autre expérience, nous avons déposé différents NET dans des puits uniques et incubé la membrane avec un seul plasma. L'anticorps secondaire anti-IgG murin (Jackson) couplé à la HRP a été ajouté au 5000<sup>ème</sup>. Le substrat utilisé était de l'ECL du kit de détection pour *western blot* selon les instructions du fournisseur (GE Healthcare). Les images ont été prises avec le système d'imagerie ChemiDoc (Biorad).

### k) ***Spectrométrie de masse***

Des NET ont migré dans un gel SDS-PAGE comme décrit précédemment. La bande de gel correspondant à environ 75kDa a été découpée et analysée en spectrométrie de masse via une collaboration avec l'Institut Curie.

### l) ***Tests statistiques***

Pour comparer les quantités d'ADN contenues dans les préparations NET, le tampon ou les neutrophiles contrôles cultivés sans PMA, un test de Mann-Whitney a été utilisé.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour déterminer si les IgG purifiées issues des sera de patients PR anti-PAD4 et 3/4 reconnaissaient les NET à partir des DO mesurées.

Pour déterminer si les IgG purifiées de patients PR anti-PAD4 et 3/4 reconnaissaient PAD4 ou PAD2, le test statistique non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé avec la correction de Geisser-Greenhouse. Une fois qu'il fût statistiquement significatif, nous avons comparé la moyenne du rang de chaque groupe avec la moyenne du rang du groupe PAD4 ou PAD2 versus le groupe PBS, avec la correction de Dunn.

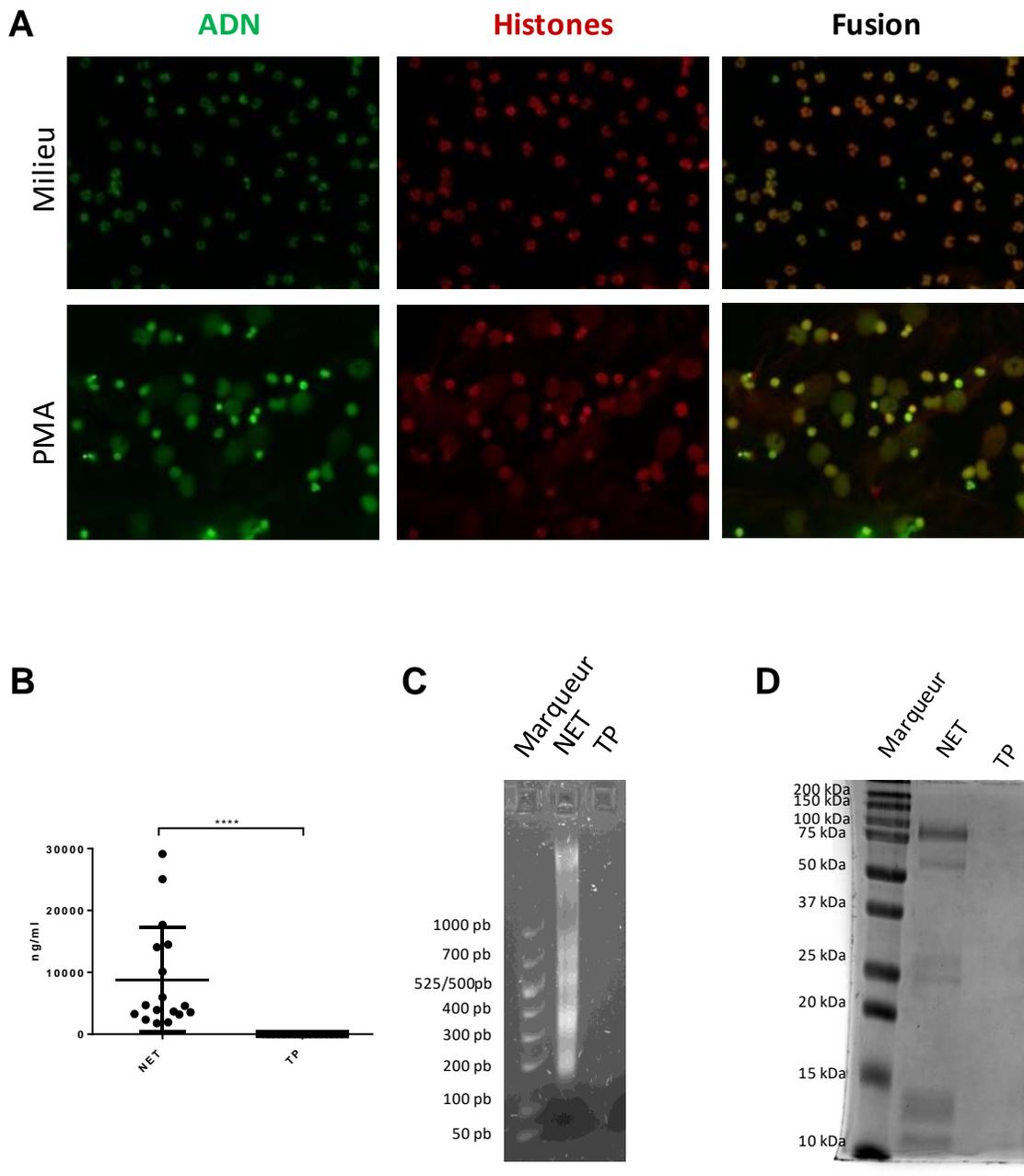
Un résultat est considéré significatif si la probabilité p est inférieure à 0,05. Si  $p < 0,05$  on note \*. Si  $p < 0,01$  on note \*\*. Si  $p < 0,005$  on note \*\*\*. Si  $p < 0,001$  on note \*\*\*\*.

## 3. Résultats

### a) ***Production et caractérisation des NET***

Afin de nous assurer que nous produisions des NET nous avons voulu les visualiser. Pour cela nous avons stimulés des neutrophiles avec du PMA et réalisé un marquage immunofluorescent. Nous avons observé une décondensation des noyaux, l'ADN et les histones des neutrophiles qui étaient extrudés par les neutrophiles après activation (Figure 1A). Nous avons ensuite utilisé un protocole développé dans notre laboratoire pour isoler des NET solubles, et nous les avons

quantifiés en mesurant la concentration d'ADN double brin en utilisant le picogreen (Figure 1B). En parallèle nous avons produit un contrôle sans NET. Pour ce faire, nous avons réalisé la même procédure sans neutrophiles. Cette condition a en effet une concentration en ADN de 0 (Figure 1B) donc ne contient aucun NET. La taille des fragments d'ADN des NET a été estimée en les faisant migrer sur un gel d'agarose (Figure 1C). La composition en protéines des NET a également été estimée par SDS-PAGE (Figure 1D). En résumé cette partie caractérise les NET que nous avons produits.

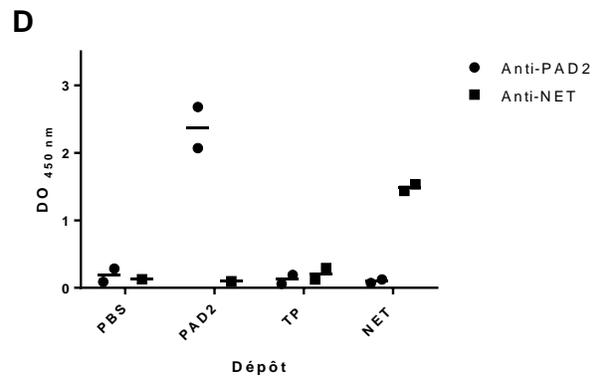
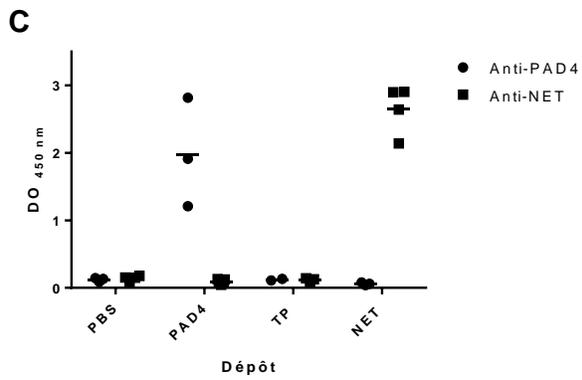
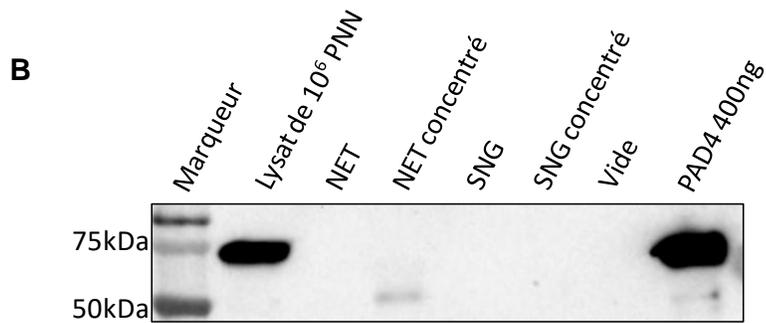
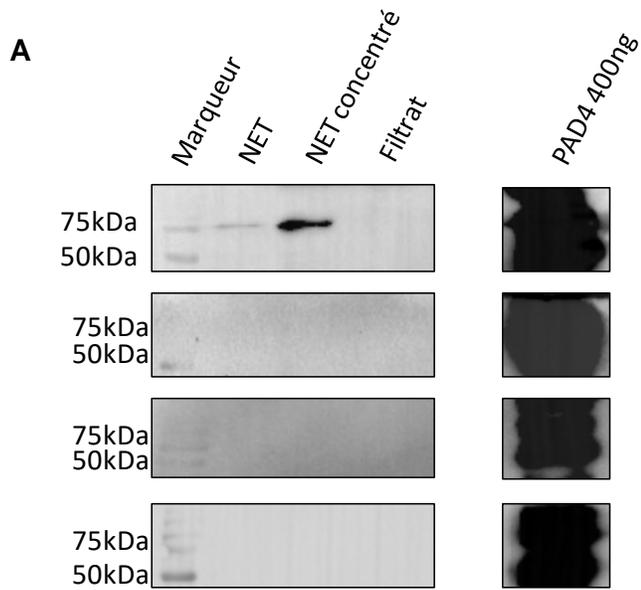


**Figure 1 : Mise en évidence de la nétose et isolement des NET.** Des neutrophiles de donneur sain fraîchement isolés ont été déposés sur lame, en présence ou absence de PMA pour induire la nétose puis fixés et perméabilisés et leur ADN et leurs histones ont été immunomarquées. Les panneaux de gauche et du centre montrent les canaux de fluorescence individuels et les panneaux de droite montre la fusion des deux signaux (A). Des NET solubles ont été produits à partir des neutrophiles de 17 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ont été préparés et la concentration d'ADN double brin a été mesurée (B). En contrôle, le même protocole a été suivi sans cellule. La

taille des fragments d'ADN des NET a été estimée par gel d'agarose (C), et le contenu en protéine a été estimé par SDS-PAGE (D). Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la quantité d'ADN dans les NET à la quantité dans le contrôle TP.

### b) ***Estimation de la présence de PAD4 et 2 dans les NET***

Nous avons voulu estimer la quantité de PAD4 dans les NET. Pour ce faire nous avons préparé des NET que nous avons concentrés. Les NET étaient concentrés d'un facteur 5 à 13, volume à volume. La concentration était vérifiée par gel d'agarose, dosage de l'ADN double brin à l'aide du picogreen et SDS-PAGE (Figure S1). Nous avons déposé les NET et les NET concentrés et avons estimé la présence de PAD4 en *western blot*. On observe que sur quatre expériences, nous avons observé PAD4 une seule fois, après avoir surexposé la membrane avec le révélateur le plus sensible (Figure 2A). Puisque PAD4 est présente dans le neutrophile, nous avons voulu avoir une idée de la quantité relative de PAD4 dans le neutrophile comparée à celle contenue dans les NET. Pour ce faire, nous avons réalisé des NET en stimulant des neutrophiles avec du PMA, et sur le même donneur nous avons lysé 1 million de neutrophiles. Nous avons déposé la totalité du lysat, 40µL de NET, 40µL de NET concentrés, 40µL de surnageant, 40µL du surnageant restant concentré et de la PAD4 recombinante comme témoin. En prenant en compte la concentration volume à volume, les NET concentrés déposés contiennent l'équivalent des NET produits par 4 millions de neutrophiles. Quant au surnageant, c'est l'équivalent 3,5 millions de neutrophiles. On observe que la PAD4 présente dans un million de neutrophiles n'est pas retrouvée dans les NET issus de 4 millions de neutrophiles (Figure 2B). Nous avons voulu confirmer ce résultat en réalisant un test ELISA. Pour cela nous avons déposé des NET et PAD4 comme contrôle positif. Nous avons utilisé le même anticorps commercial anti-PAD4. On observe un fort signal avec le contrôle positif, alors que PAD4 n'est pas détecté dans les NET (Figure 2C). Les anti-NET ont servi de contrôle positif de bon dépôt des NET. En utilisant la même méthode, nous avons voulu déterminer si l'on pouvait détecter PAD2 dans les NET. Là aussi, nous n'avons pas détecté de PAD2 dans les NET (Figure 2D). En résumé cette partie montre que les NET ne semblent pas porter la majorité de PAD2 et 4 des neutrophiles.

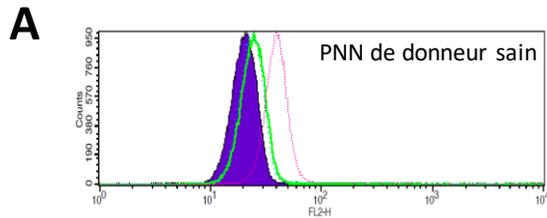


**Figure 2 : PAD4 et PAD2 sont très peu ou pas détectées dans les NET induits par le PMA.**

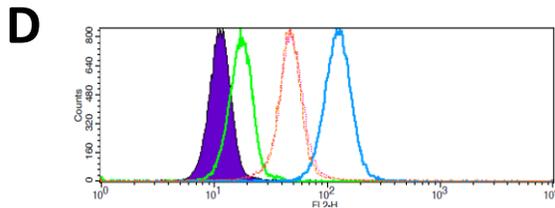
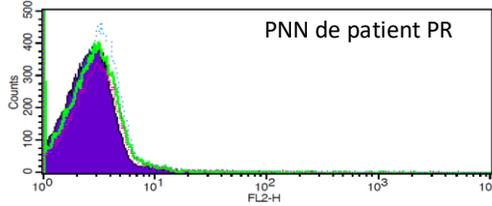
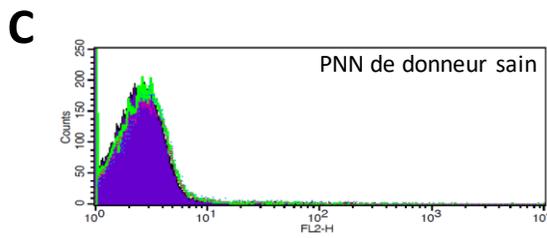
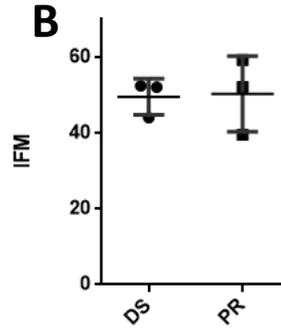
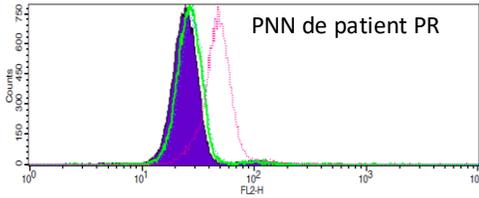
Des NET, des NET concentrés ou le filtrat correspondant ont été déposés et la présence de PAD4 a été estimée via un anti-PAD4 commercial par *western blot* ; les quatre expériences sont montrées (A). Dans les mêmes conditions ont été déposés un lysat d'un million de neutrophiles de donneur sain, 40µL des NET concentrés ou non-concentrés et des surnageants concentrés ou non-concentrés du même donneur (B). Du PBS, de la PAD2, des NET ou du TP ont été déposés sur plaque ELISA. La présence de PAD4 a été estimée avec un anticorps commercial et celle des NET avec les anti-NET (C). Ces anti-NET ont été produits au laboratoire (voire partie 2 des résultats). Les mêmes expériences ont été menées avec PAD2 (D).

c) ***PAD4 est présente dans les cellules myéloïdes***

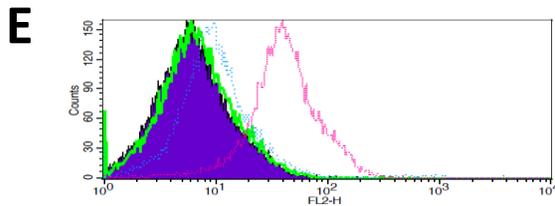
Nous savions que PAD4 était présent dans les neutrophiles. Nous avons voulu déterminer si cette protéine pourrait être d'avantage présente dans les neutrophiles de patients atteints de PR. Pour cela nous avons marqué PAD4 en intracellulaire par cytométrie (Figure 3A). On observe que les neutrophiles de donneurs sains semblent exprimer la même quantité de PAD4 que ceux des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Figure 3B). Cela souligne que la physiopathologie de la PR ne découle pas d'une simple surexpression de PAD4. Nous avons voulu déterminer si PAD4 pourrait être exprimée à la surface chez les patients PR, nous ne l'avons pas observé (Figure 3C). Nous avons également détecté PAD4 dans les monocytes de donneurs sains (Figure 3D) et dans les monocytes issus de macrophages de donneurs sains cultivés une semaine (Figure 3E). Chez un patient atteint de PR, nous avons aussi observé PAD4 dans les monocytes et les macrophages issus de monocytes après une semaine de culture. En résumé, cette partie montre notre modèle permet une détection très claire de PAD4 dans les cellules myéloïdes.



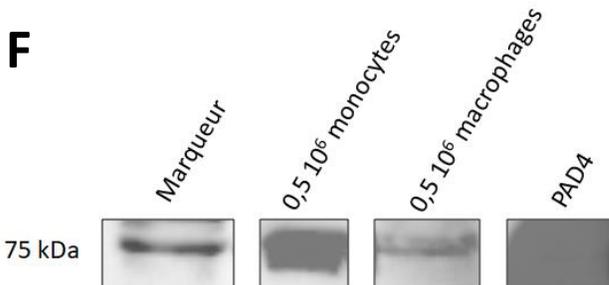
NM  
 Anti-IgG-PE  
 Anti-PAD4 + anti-IgG-PE  
 Isotype + anti-IgG-PE



NM  
 SAPE  
 F(ab')<sub>2</sub>-biot + SAPE  
 Anti-PAD4 + F(ab')<sub>2</sub>-biot + SAPE  
 Isotype + F(ab')<sub>2</sub>-biot + SAPE



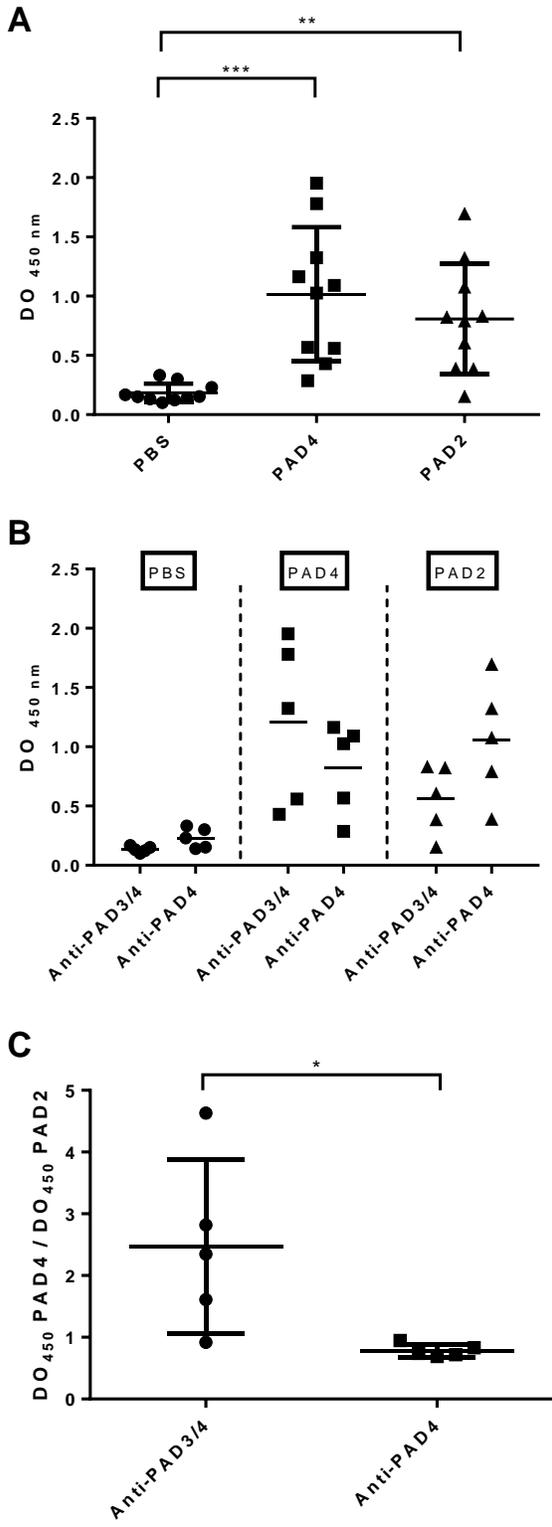
NM  
 Anti-IgG-PE  
 Anti-PAD4 + anti-IgG-PE  
 Isotype + anti-IgG-PE



**Figure 3 : Expression de PAD4 dans les neutrophiles, les monocytes et les macrophages.** Des neutrophiles de donneurs sains et de patients PR ont été fixés/perméabilisés et incubés avec des anti-PAD4 commerciaux (A). La quantité de PAD4 dans les neutrophiles de donneurs sains et de patients a été comparée (B). La présence de PAD4 membranaire a été estimée, et deux histogrammes représentatifs de deux donneurs sains et deux patients PR sont montrés (C). Des monocytes de donneurs sains ont été triés, perméabilisés et marqués *ex vivo* pour PAD4 (D). Des macrophages issus de monocytes de donneurs sains ont été marqués (E). Des monocytes et des macrophages issus des mêmes monocytes de patient PR ont été lysés, et la présence de PAD4 a été estimée par WB (F). IFM : intensité moyenne de fluorescence, NM : non marqué, SAPE : streptavidine couplée à la phycoérythrine.

d) ***Les IgG anti-PAD4 et anti-PAD3/4 se lient aussi à PAD2***

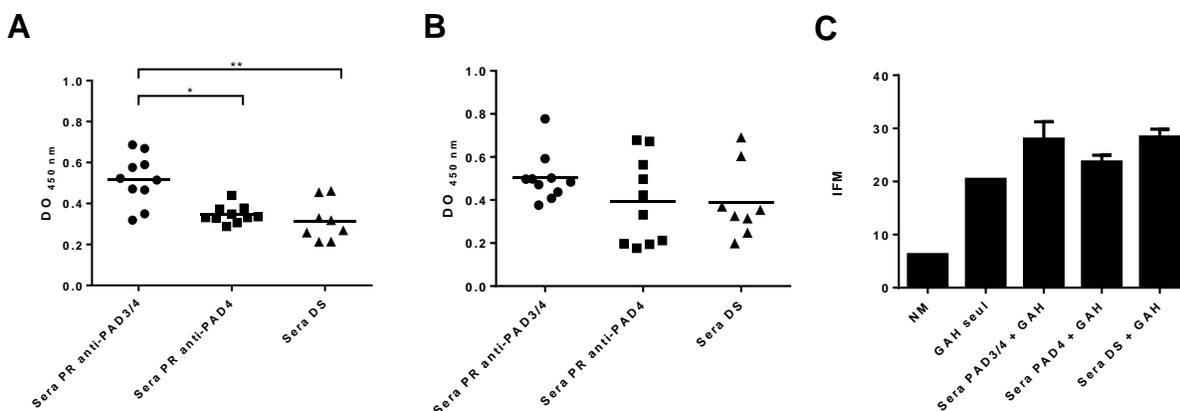
Il a été montré que les anticorps anti-PAD3/4 se lient à PAD4, abaissant le seuil calcique d'activation, mais rien n'a été décrit de tel concernant PAD2. Puisque les neutrophiles expriment PAD2 et 4 nous avons voulu vérifier si les IgG anti-PAD4 et 3/4 se lieraient aussi à PAD2. Pour ce faire nous avons déposé PAD2 au fond d'une plaque ELISA, nous avons déposé la même quantité de PAD4 comme contrôle positif, puis nous avons testé la réactivité des anti-PAD4 et 3/4. On observe que les anticorps anti-PAD4 et 3/4 se lient à PAD2 de manière semblable à PAD4 (Figure 4A). Si l'on dichotomise les anticorps anti-PAD4 des anticorps anti-PAD3/4, on n'observe pas de différence statistiquement significative entre ces deux groupes (Figure 4B). On observe néanmoins que les anticorps anti-PAD3/4 se lient en moyenne mieux à PAD4 que les anticorps anti-PAD4, et qu'en même temps ces anticorps anti-PAD3/4 se lient moins bien à PAD2 que les anticorps anti-PAD4. On peut mettre en évidence ce phénomène en calculant le rapport entre le signal induit par la reconnaissance de PAD4 sur celui induit par la reconnaissance de PAD2. Comme les anticorps anti-PAD3/4 reconnaissent bien PAD4 et moins bien PAD2, alors le rapport est élevé. Les rapports sont différents de manière statistiquement significative entre les anticorps anti-PAD3/4 et les anticorps anti-PAD4 (Figure 4C). En résumé cette partie montre que les anti-PAD4 et 3/4 se lient à PAD2 comme à PAD4 et ce de manière différente.



**Figure 4 : Les IgG purifiées anti-PAD4 et anti-PAD3/4 reconnaissent aussi PAD2.** Du PBS, de la PAD4 ou PAD2 ont été déposés sur plaque ELISA sur la nuit puis la réactivité des 5 IgG purifiées de PR anti-PAD4 et 5 IgG purifiées de PR anti-PAD3/4 a été testée. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé avec la correction de Geisser-Greenhouse. Une fois qu’il fût statistiquement significatif, nous avons comparé la moyenne du rang de chaque groupe avec la moyenne du rang du groupe PAD4 ou PAD2 versus le groupe PBS, avec la correction de Dunn (A). Les réactivités des IgG anti-PAD4 et anti-PAD3/4 ont été représentées distinctement sur le PBS, PAD2 et PAD4 (B). Le ratio des DO<sub>450</sub> mesurées sur PAD4 et PAD2 a été calculé pour les anti-PAD3/4 *versus* les anti-PAD4. Le test de Mann-Whitney a été utilisé (C).

### e) *Les sera anti-PAD3/4 reconnaissent légèrement les NET de patients PR*

Nous avons voulu tester si les anticorps de patients anti-PAD3/4 et 4 reconnaissent les NET. Pour cela nous avons déposé les NET et testé la réactivité des sera par ELISA. On observe une augmentation faible statistiquement significative de la reconnaissance des NET par les anti-PAD3/4 chez les NET de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Figure 5A). En sachant que PAD4 est très peu ou pas sur nos NET, et que les anti-PAD4 ne reconnaissent pas les NET, alors il y a peu de chances que PAD4 soit la cible antigénique des sera anti-PAD3/4, qui contiennent de nombreux autres anticorps. On n'observe pas de différence statistiquement significative sur les NET de donneurs sains, mais la moyenne du signal induit par les anti-PAD3/4 est tout de même supérieure aux sera anti-PAD4 et de donneurs sains (Figure 5B). Nous avons voulu déterminer si ces sera se lient à la surface des neutrophiles. Nous ne l'avons pas observé (Figure 5C). En résumé cette partie montre que les sera qui contiennent des anticorps anti-PAD3/4 se lient faiblement aux NET de patients atteints de PR probablement indépendamment de PAD4.

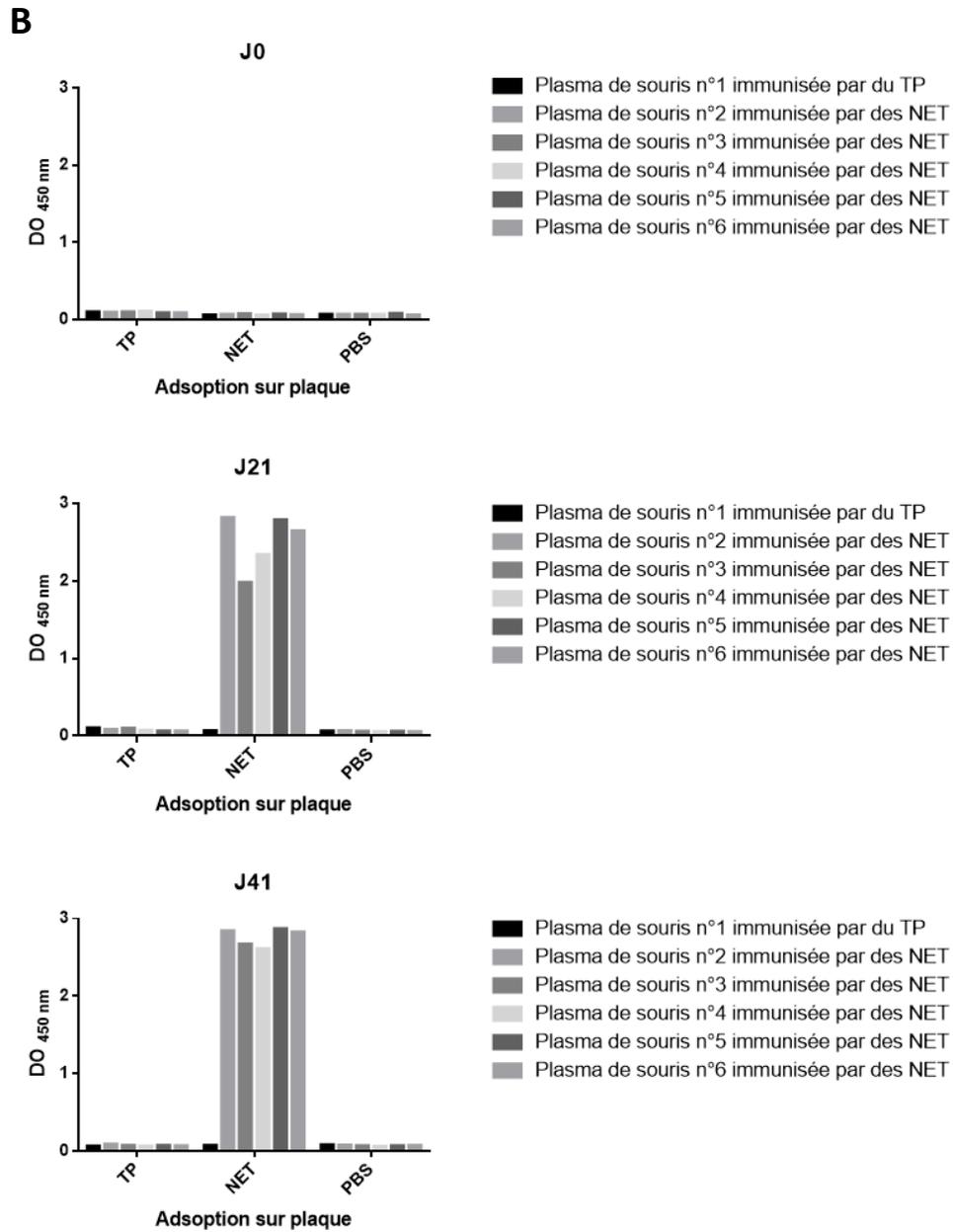
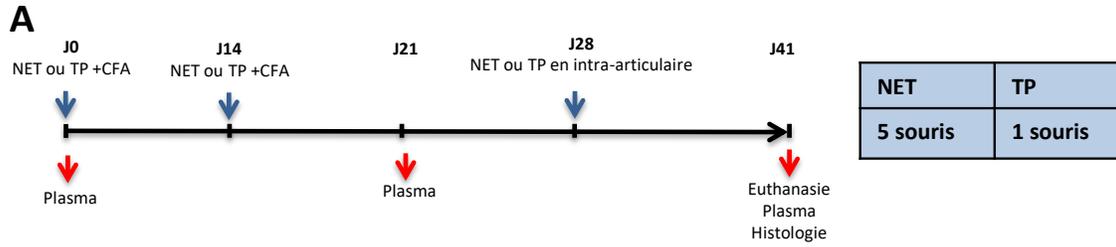


**Figure 5 : Les sera anti-PAD3/4 se lient aux NET de patients PR.** Des NET ont été préparés, purifiés et déposés au fond d'une plaque ELISA. La réactivité des sera a été testée sur des NET de patients PR (A) ou de donneurs sains (B). La réactivité des sérums a été testée en cytométrie sur des neutrophiles de donneurs sains *ex vivo* non-perméabilisés et quantifiée (C). IFM : intensité moyenne de fluorescence, NM : non marqué.

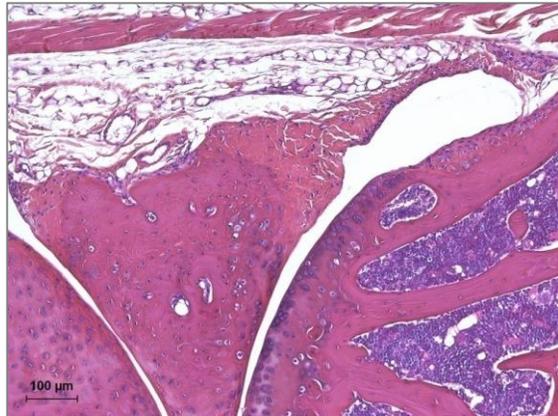
f) ***Les NET sont antigéniques et athritogènes dans un modèle murin***

Pour étudier l'effet des NET, nous avons immunisé des souris en sous-cutanée à J0 et à J14 avec des NET ou du TP, puis nous avons injectés des NET ou du TP dans l'articulation du genou à J28 (Figure 6A). Les NET ont été produits à partir de neutrophiles de patients atteints de PR. Ce protocole a été réalisé une fois. Les souris ne développent pas d'arthrite clinique dans ce modèle. Nous avons préparé les plasmas des souris, et avons développé un ELISA pour savoir si les souris avaient généré des anticorps contre les NET. En effet, toutes les souris qui ont été immunisées avec des NET développent des anticorps anti-NET à partir du 21<sup>ème</sup> jour, contrairement à celle qui a été immunisée avec le contrôle TP (Figure 6B). A partir de cet instant, nous avons appelé les plasmas qui reconnaissent les NET des « anti-NET ». En outre, seulement chez les souris qui ont été immunisées par des NET à J0 et J14, on observe une infiltration de cellules dans le genou qui a reçu des NET, mais pas dans l'articulation controlatérale qui a reçu du TP (Figure 6C). De plus, on observe un début d'érosion du cartilage et/ou de l'os. Cela suggère que dans l'articulation, les anticorps anti-NET se lient aux NET et que ces complexes immuns induisent le recrutement de cellules dans l'articulation. En résumé cette partie montre que les NET sont antigéniques et induisent une inflammation dans l'articulation des souris immunisées en présence de NET.

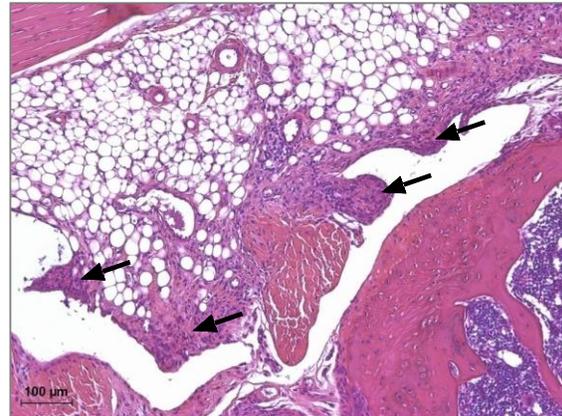




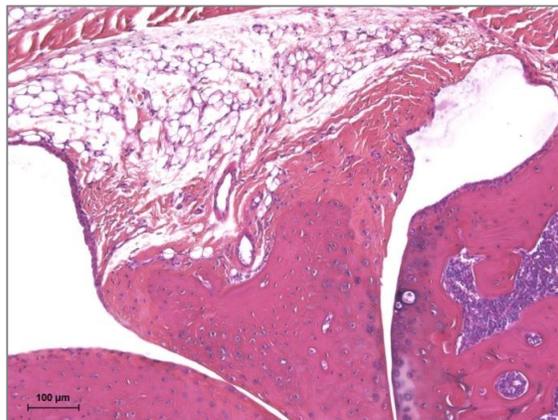
C



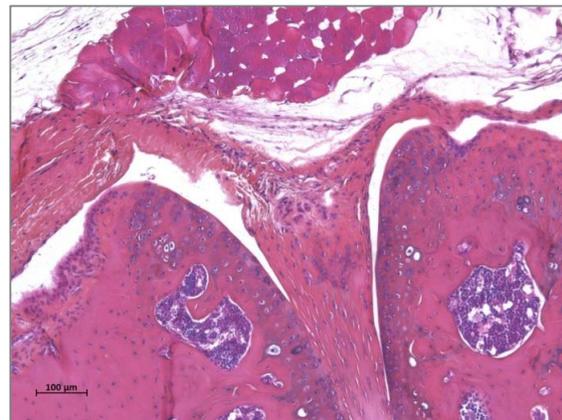
Souris immunisée par des NET  
Injection intra-articulaire de TP



Souris immunisée par des NET  
Injection intra-articulaire de NET



Souris immunisée par du TP  
Injection intra-articulaire de TP



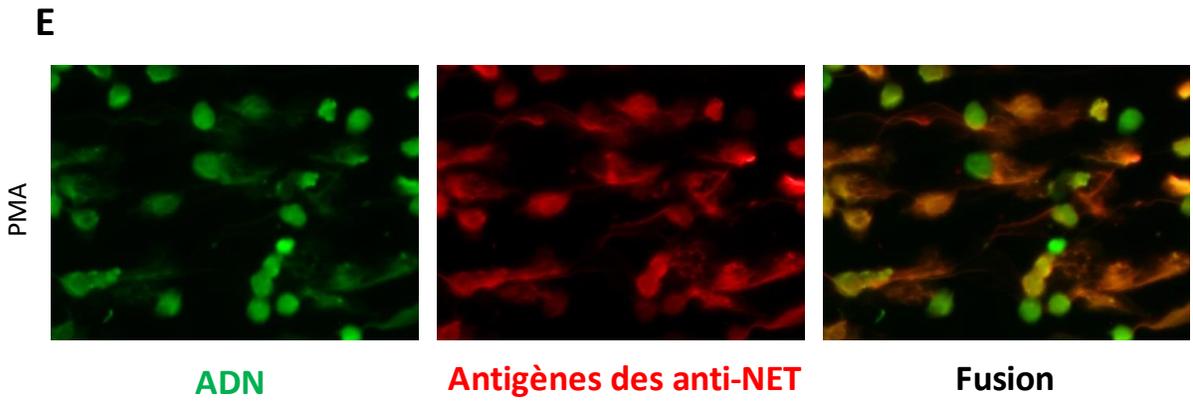
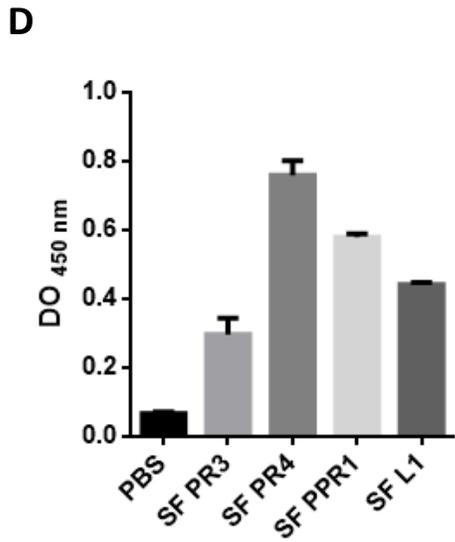
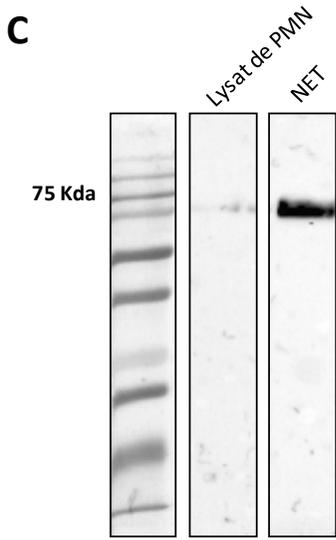
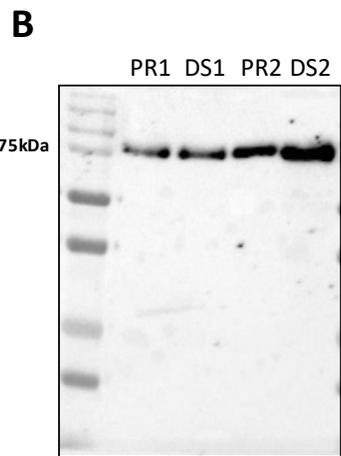
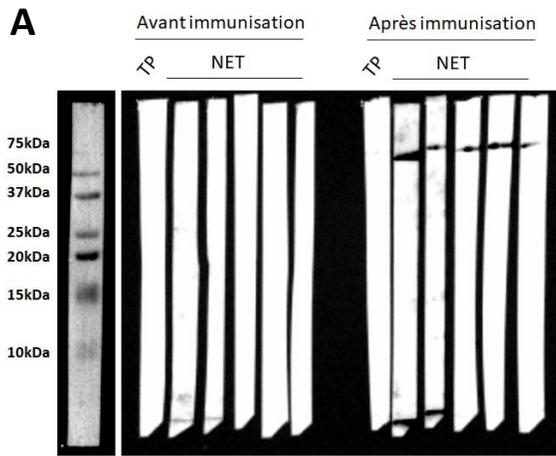
Souris immunisée par du TP  
Injection intra-articulaire de NET

**Figure 6 : Les NET sont antigéniques et arthritogènes.** Protocole d'immunisation (A). Les NET ou leur contrôle TP ont été injectés par voie sous-cutanée au jour 0 et au jour 14, puis en intra-articulaire dans le genou à J28. Le sang a été prélevé et le plasma a été isolé. Un ELISA a été développé afin de détecter la présence d'anticorps anti-NET dans les plasmas des souris (B). Des coupes des genoux ont été réalisées et marquées à l'hématoxyline et à l'éosine afin d'observer l'infiltration de cellules dans l'articulation ainsi que l'atteinte articulaire. Les cellules infiltrées sont montrées par des flèches (C).

### **g) *Les anticorps anti-NET reconnaissent les liquides synoviaux de patients et la lactoferrine***

Nous avons voulu identifier parmi les NET les cibles reconnues par les anticorps induits. Pour cela nous avons réalisé un *western blot* avec un puits de dépôt unique dans lequel nous déposés des NET. Après migration, nous avons découpé des bandes de 4 mm sensées contenir la même quantité et la même composition de protéine, et nous avons incubé chaque bande avec un sérum de souris différent. On n'observe qu'aucun des plasmas de souris avant immunisation n'a détecté de protéine. Parmi les plasmas après immunisation à J41, celui de la souris qui a été immunisée par du tampon n'a rien détecté clairement, alors que les plasmas des souris immunisées par les NET reconnaissent tous une bande d'environ 75kDa (Figure 7A). Cette bande est retrouvée lors de *western blot* sur des NET de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde comme sur ceux de plusieurs autres donneurs sains (Figure 7B). Afin de déterminer si les antigènes-cibles des anti-NET étaient enrichis dans les NET, nous avons réalisé à partir de neutrophiles de donneurs sains des NET et des lysats de neutrophile, et déposés la même quantité de protéine lors d'un *western blot*. Les plasmas anti-NET induisent un signal plus fort sur les NET comparé au lysat de neutrophiles du même donneur (Figure 7C). La quantité de protéine déposée était faible, si bien que la protéine de 75kDa est très peu ou pas détectée dans le lysat, alors qu'elle est détectée dans les NET car elle y est concentrée. Nous avons voulu savoir si on pouvait retrouver les antigènes-cibles des anticorps anti-NET dans les liquides synoviaux de diverses maladies inflammatoires. En réalisant un ELISA, on observe que les antigènes-cibles des anti-NET sont présents dans les liquides synoviaux de deux patients atteints de PR, d'un patient atteint de pseudo-polyarthrite rhizomélique et d'un patient lupique (Figure 7D). Nous avons voulu déterminer si les plasmas de nos souris immunisées contre des NET reconnaissent des structures particulières des NET. Pour cela, nous avons de nouveau stimulé des neutrophiles avec du PMA afin de visualiser la nétose, nous avons coloré l'ADN et ajouté un sérum de souris anti-NET, ainsi qu'un anticorps secondaire pour permettre leur détection. On observe une colocalisation entre l'ADN et les cibles des anti-NET (Figure 7E). Nous avons voulu caractériser les cibles potentielles de ces plasmas. Afin de connaître la ou les protéines reconnues dans cette bande unique, nous avons de nouveau fait migrer les NET sur un SDS-PAGE et nous avons découpé une bande de gel afin d'isoler les protéines de masse moléculaire proche de 75 kDa. Nous avons ensuite analysé ce morceau de gel par spectrométrie de masse. Un score a été développé par Ishihama afin d'estimer la quantité de

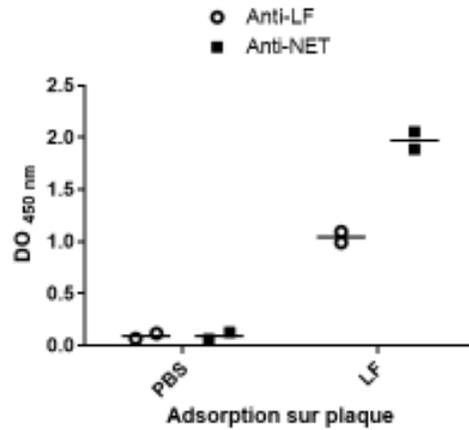
protéines dans un échantillon après spectrométrie de masse, ce score se nomme emPAI et de façon simplifiée plus il est élevé plus la protéine est présente<sup>208</sup>. Le score emPAI a estimé que 95% de ces protéines étaient de la lactoferrine, qui est synonyme de lactotransferrine (Figure 7F). Il est connu que la lactoferrine soit à la fois un composant des NET et une protéine sécrétée par les neutrophiles<sup>209,210</sup>. Afin de montrer expérimentalement que la lactoferrine est effectivement une cible des anti-NET, nous avons déposé sur plaque ELISA de la lactoferrine ou du PBS comme contrôle, puis après saturation nous avons testé la réactivité des anti-NET et ajouté un anticorps anti-lactoferrine commercial comme contrôle positif. On observe que les anti-NET reconnaissent la lactoferrine (Figure 7G). Pour déterminer si la lactoferrine était bien présente dans nos NET, nous avons déposé des NET et après saturation utilisé un anti-lactoferrine commercial, et nos anti-NET comme contrôle positif. On observe que la lactoferrine est présente dans les NET (Figure 7H). Nous avons voulu nous assurer que les souris n'étaient pas naturellement immunisées contre la lactoferrine avant l'injection de NET. Pour ce faire nous avons déposé de la lactoferrine au fond d'une plaque ELISA et après saturation nous avons testé en parallèle les plasmas d'une même souris avant et après immunisation. On observe que les plasmas avant immunisation ne reconnaissent pas la lactoferrine, alors que les plasmas après immunisation la reconnaissent (Figure 7I). Les différents contrôles utilisés ont été schématisés et permettent de montrer que les anti-NET reconnaissent aussi des protéines sécrétées par les neutrophiles, probablement la lactoferrine qui peut être excrétée (Figure S2).



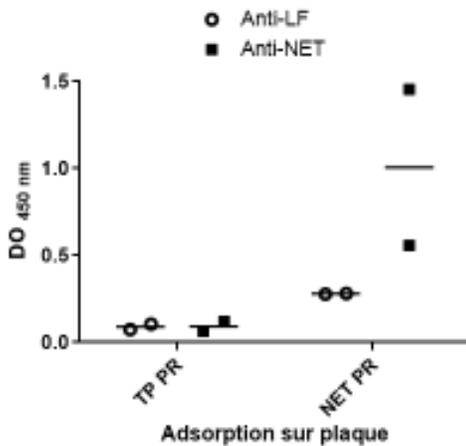
F

Protéine selon Uniprot	Description	Score emPAI (Mol %)
P02788	Lactoferrine	94,90

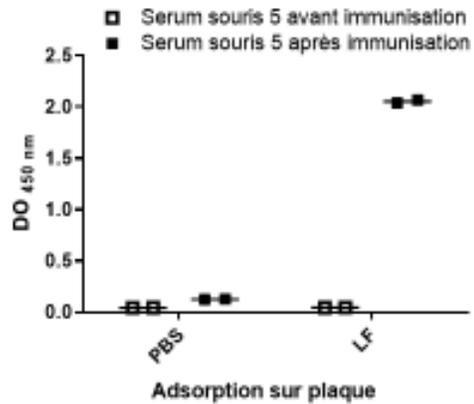
I



J



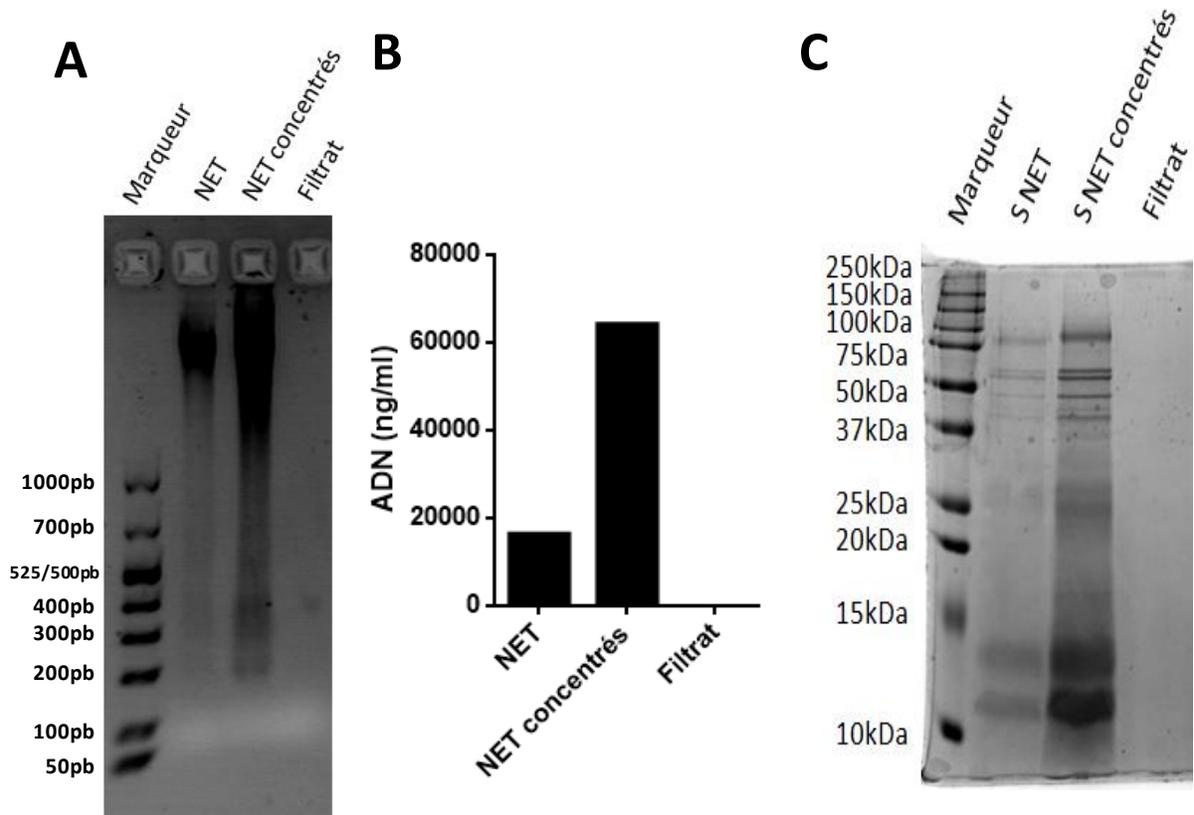
K



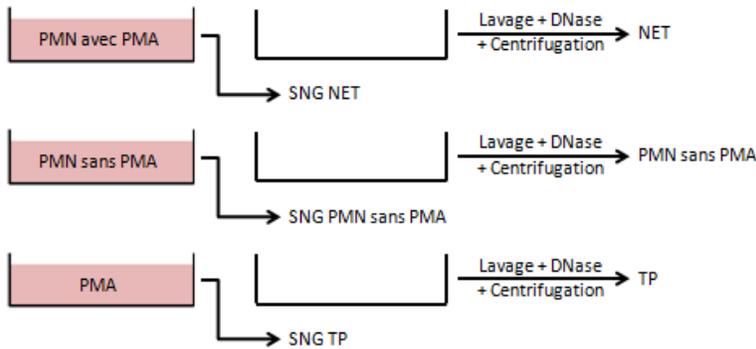
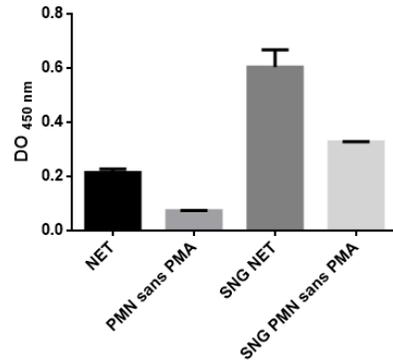
**Figure 7 : Les plasmas de souris anti-NET reconnaissent des liquides synoviaux de patients atteints de maladies inflammatoire et la lactoferrine contenue dans les NET.** Les protéines des NET ont été séparées sur SDS-PAGE dans un puits unique puis transférées sur membrane, les bandes ont été découpées et la réactivité de chaque plasma de souris a été testée, avant et après immunisation (A). Des NET de donneurs sains et de patients atteints de PR ont été déposés et la réactivité d'un même plasma anti-NET a été testée (B). La même quantité de protéine issu d'un lysat de neutrophile ou des NET du même donneur sain a été déposée et la réactivité des anti-NET a été testée (C). La réactivité de nos anti-NET sur des liquides synoviaux de différentes maladies inflammatoires a été testée par ELISA (D). Des NET ont été visualisés en immunofluorescence. L'ADN a été marqué et les NET ont été incubés avec les plasmas anti-NET puis avec un anticorps IgG murine couplé à l'AF568. Des anti-NET ont été marqués et une fusion des images a été effectuée (E). Afin de déterminer la ou les protéine(s) reconnue(s), des NET ont été déposés dans un SDS-PAGE puis les protéines de masse molaire voisine de 75kDa ont été isolées et analysées par spectrométrie de masse (F). La lactoferrine a été déposée et les réactivités des anticorps anti-lactoferrine commerciaux et des anti-NET ont été testées simultanément par ELISA (G). Des NET ont été déposés et les réactivités des anti-lactoferrine commerciaux et des anti-NET ont été testées par ELISA (H). De la lactoferrine a été déposée et les réactivités des plasmas de la même souris avant et après immunisation ont été testées par ELISA (I).

## 4. Conclusion

Nous avons montré que PAD4 et PAD2 étaient très peu ou pas retrouvées dans les NET et qu'en même temps notre système permet la détection de PAD4 dans d'autres cellules myéloïdes comme le monocyte ou le macrophage. Nous avons montré que les IgG purifiées des sera anti-PAD4 et 3/4 se lient à PAD2, ce qui pourrait l'activer comme les anti-PAD3/4 activent PAD4. Nous avons montré que certains anticorps des sera anti-PAD3/4 reconnaissent faiblement les NET de patients PR, même si en même temps nous n'avons pas détecté de PAD4 ou 2 dans les NET. Nous avons développé un nouveau modèle murin d'immunisation de NET de patients atteints de PR. Dans ce modèle la présence de NET dans le genou induit une infiltration et une destruction de l'articulation spécifiquement chez les souris immunisées. Les plasmas contenant les anticorps anti-NET reconnaissent les liquides synoviaux de patients atteints de diverses maladies inflammatoires. La lactoferrine est une cible majeure de ces anti-NET.



**Figure S1 : Concentration des NET.** Une partie des NET a été prélevée, et le reste a été filtré au travers d'une membrane dont les pores ont un diamètre permettant le passage des protéines de poids moléculaire inférieur à 10kDa. NET, NET concentré et filtrats ont été déposés sur gel d'agarose à 1,5% avec un intercalant de l'ADN (A), dosés au picogreen (B), et déposés sur gel SDS-PAGE à 12,5% avec coloration des protéines (C).

**A****B**

**Figure S2 : Les cibles des anti-NET peuvent aussi être excrétées.** Les NET sont produits à partir de neutrophiles stimulés par du PMA pendant 4h. Le surnageant est récolté. Les NET adhèrent au fond de la chambre de culture, ils sont lavés puis récupérés en les détachant avec de la DNase, puis avec des aspirations-refoulement. Les débris sont éliminés par centrifugations, les NET sont solubles. Pour observer une éventuelle nétose spontanée, les neutrophiles sont cultivés sans PMA. Toutes les autres étapes sont identiques. Pour obtenir un contrôle sans NET, on n'utilise pas de neutrophiles mais on ajoute la PMA et la DNase (A). Les mêmes volumes ont été déposés sur plaque ELISA, et la réactivité d'un des plasma anti-NET a été testé (B).

# B. Le tofacitinib inhibe les réponses du neutrophile associées au GM-CSF

## 1. Brève réintroduction

Le tofacitinib est un traitement de troisième intention de la polyarthrite rhumatoïde. Au vu de son efficacité clinique, il pourrait devenir un traitement de seconde intention au même titre que les biothérapies. Nous avons vu que le tofacitinib était un inhibiteur de la voie JAK-STAT. Néanmoins aucune étude sur son effet sur les neutrophiles *ex vivo* n'avait été publiée au début de cette thèse, or les neutrophiles sont des effecteurs importants et nombreux de la PR. En particulier aucune étude sur les conséquences phénotypiques et fonctionnelles d'une telle inhibition n'avait été publiée. Nous avons voulu combler ce vide. Certaines études<sup>191,192,206</sup> montraient des neutropénies chez les patients traités par tofacitinib. Pour cela nous avons étudié la toxicité du tofacitinib sur des neutrophiles *ex vivo*. Par la suite, nous avons étudié sur quelles cytokines le tofacitinib pourrait avoir un effet. Nous avons choisi le GM-CSF et le TNF, qui sont des cytokines ayant un rôle physiopathologique dans la PR<sup>125,169</sup>. Nous avons découvert que le tofacitinib inhibait certains effets pro-inflammatoires du GM-CSF, notamment l'expression du CD11b, CD66b et la sécrétion de la chimiokine IL-8. En outre, le GM-CSF a été décrit comme indispensable à la sensibilisation du neutrophile à certains ligands TLR<sup>174</sup>. Cette sensibilisation est nécessaire pour que le neutrophile réponde pleinement aux ligands TLR. Par exemple, de l'ADN riche en motifs CpG déméthylés se lie au TLR9. Physiopathologiquement, l'ADN-CpG pourrait provenir d'ADN extracellulaire, suite à la mort cellulaire par exemple. Dans un second temps donc, nous avons testé si l'activation induite par la combinaison GM-CSF + CpG était inhibée par le tofacitinib. Par la suite, nous avons testé son effet sur la combinaison GM-CSF + LPS, le ligand du TLR4, puis GM-CSF + NET afin d'estimer comment se comporte le neutrophile sur différents stimuli et quel est l'effet du tofacitinib sur ces stimulations.

## 2. Matériel et méthodes

### a) ***Prélèvements humains***

Un total de 13 patients atteints de PR et 5 atteints de spondylarthrite ankylosante (SPA) provenant du service de rhumatologie de l'hôpital Avicenne et 28 donneurs sains de l'établissement français du sang de Bobigny ont été prélevés. Le sang a été collecté dans des tubes contenant de l'EDTA. Le diagnostic de PR a été déterminé selon les critères de *l'American college of rheumatology* et de *l'European league against rheumatism* de 2010. Ces patients n'étaient pas sous biothérapie. Ils étaient soit sans traitement, soit sous méthotrexate, soit sous léflunomide, avec ou sans corticoïdes oraux.

### b) ***Isolement des neutrophiles et culture***

Les neutrophiles ont été fraîchement isolés par sédimentation du sang sur un gradient de densité de dextran (Axis Shield). Les globules rouges contaminants ont été lysés en utilisant du tampon ACK (composé de NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, et EDTA). La pureté a été estimée par cytométrie en flux, le pourcentage de cellules CD66b+ CD11b+ était supérieur à 95%. 2.10<sup>5</sup> neutrophiles ont été cultivés dans 200µl dans du milieu de culture RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et filtré (Biowest). Les neutrophiles étaient cultivés avec ou sans GM-CSF (Immunotools) à 100 ng/ml, du tofacitinib (Pfizer) à entre 1 mM et 10 µM, de l'ODN-CpG 2395 (Invivogen) à 2 µM ou du LPS de *S.thyphimurium* (Sigma) à 5 ng/ml pendant 4 à 16 heures.

### c) ***Cytométrie***

Pour le marquage membranaire, les anticorps utilisés étaient l'anti-CD66b (clone G10F5) conjugué au FITC (BD Pharmingen) et l'anti-CD11b (clone ICRF44) conjugué au PE (BD Pharmingen) ou leurs contrôles isotypiques. Ils étaient dilués dans du tampon de marquage composé de PBS, de sérum de veau fœtal inactivé filtré 5%, de gamma-globuline humaine à 100 µg/ml (Calbiochem) et de 0,02 % d'azide de sodium. Pour le marquage intracellulaire, les cellules ont été fixées-perméabilisées en utilisant le kit de fixation-perméabilisation (BD) pendant 30 min à 4°C. Un anti-TLR9 (clone 5G5) non conjugué (Abd serotech) puis un anticorps

secondaire conjugué au PE (BD) a été utilisé. Les cellules ont été marquées avec les anticorps pendant 30 min à 4°C. La survie, l'apoptose précoce et tardive ont été mesurées avec incubation d'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium (IP) selon les instructions du fournisseur (BD). Chaque mesure a été prise en triplicat ou duplicat. L'acquisition a été faite avec le Calibur (BD). L'analyse a été réalisée avec CellQuest (BD).

#### d) ***ELISAs***

Les surnageants de culture ont été récupérés. Leur contenu en IL-8 et IL-10 ont été dosés par le kit ELISA IL-8 ou IL-10 contenant un anticorps de capture, un anticorps de détection couplé à la biotine et de la streptavidine couplée à la peroxydase (HRP) selon les instructions du fabricant (BD OptEIA et Invitrogen respectivement). La révélation a été réalisée en utilisant du TMB (Sigma). La DO à 450 nm a été mesurée en utilisant le lecteur de microplaque 680 (Biorad). Chaque mesure a été prise en duplicat ou triplicat.

#### e) ***Production de NET solubles***

La nétose a été induite *in vitro*. Des neutrophiles adhérents au fond d'une lame de verre recouverte de poly-L-lysine ont été cultivés dans du milieu de culture RPMI 1640 (Gibco) et stimulés par du PMA à 50 nM. Après 4h de culture, le surnageant a été jeté, les chambres ont été lavées deux fois avec du PBS et les NET ont été détachés par ajout de désoxyribonucléase 1 (Sigma-Aldrich, 5U/ml, 15 min) dans du PBS. La réaction fût stoppée par 3 mM d'EDTA. Les surnageants ont été centrifugés 300 g pendant 10 min pour retirer les cellules intactes. Le surnageant a été récupéré et recentrifugé à 16 000 g pendant 10min pour retirer les débris. La même procédure a été réalisée sans neutrophile, et le surnageant correspondant constitue le contrôle que l'on nomme tampon (TP). La quantité d'ADN double brin a été mesurée par mesure de la DO à 595 nm en présence de picogreen (Sigma-Aldrich) et l'ADN total a été mesuré par spectrophotométrie (NanoDrop technology). Le profil protéique a été estimé via un gel SDS-PAGE à 12,5 % d'acrylamide et les tailles des brins d'ADN a été estimé via un gel d'agarose à 1,5 %.

#### f) ***Tests statistiques***

Pour étudier en même temps l'effet du GM-CSF sur le neutrophile et l'effet inhibiteur associé du tofacitinib, un test de normalité de d'Agostino et Pearson a été calculé. Si les données étaient normales alors une ANOVA sur mesures répétées a été calculée avec la correction de Geisser-Greenhouse. Une fois qu'il fût statistiquement significatif, nous avons utilisé le test de comparaisons multiples de Holm-Sidak. Si les données n'étaient pas normales, alors le test de Friedman était calculé avec la correction de Geisser-Greenhouse. Une fois qu'il fût significatif le test de comparaisons multiples de Dunn a été utilisé.

Le même test de normalité a été utilisé pour comparer l'effet de sensibilisation et l'effet du tofacitinib sur les doubles-stimulations associées au GM-CSF. Si les données étaient normales alors un test t de Student apparié a été utilisé. Si les données n'étaient pas normales alors le test de Wilcoxon a été utilisé.

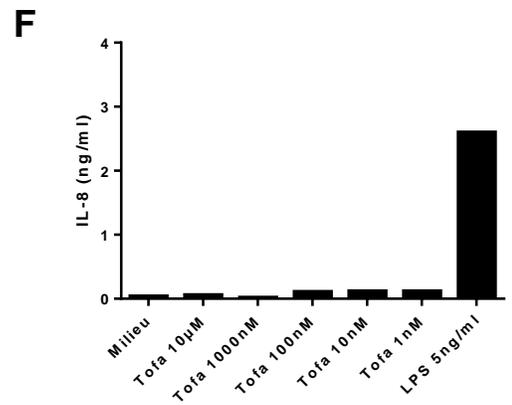
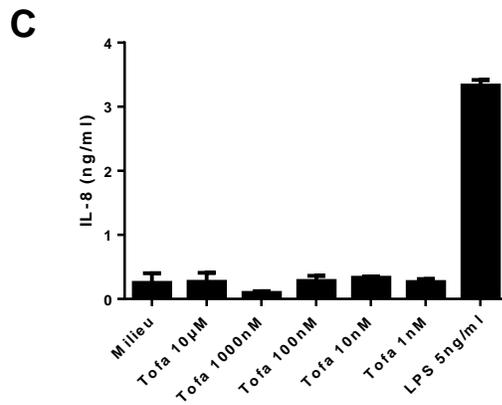
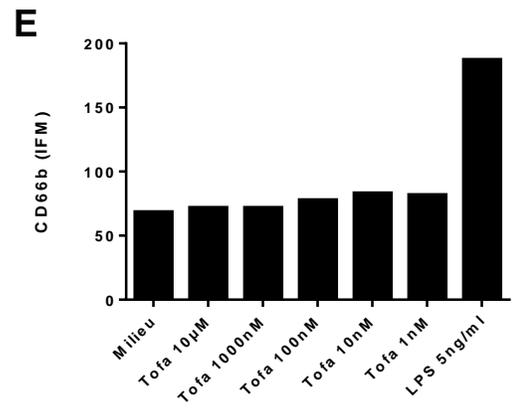
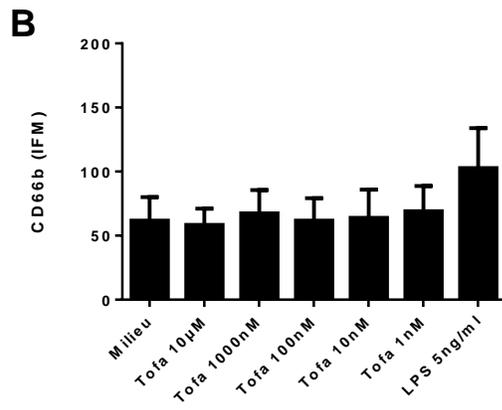
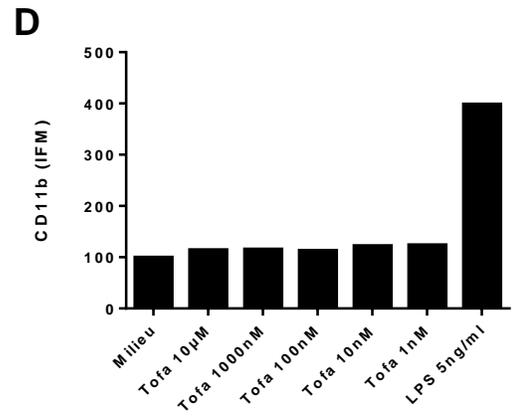
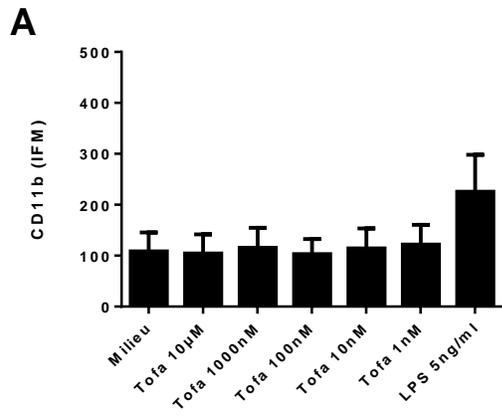
Un résultat est considéré significatif si la probabilité p est inférieure à 0,05. Si  $p < 0,05$  on note \*. Si  $p < 0,01$  on note \*\*. Si  $p < 0,005$  on note \*\*\*. Si  $p < 0,001$  on note \*\*\*\*.

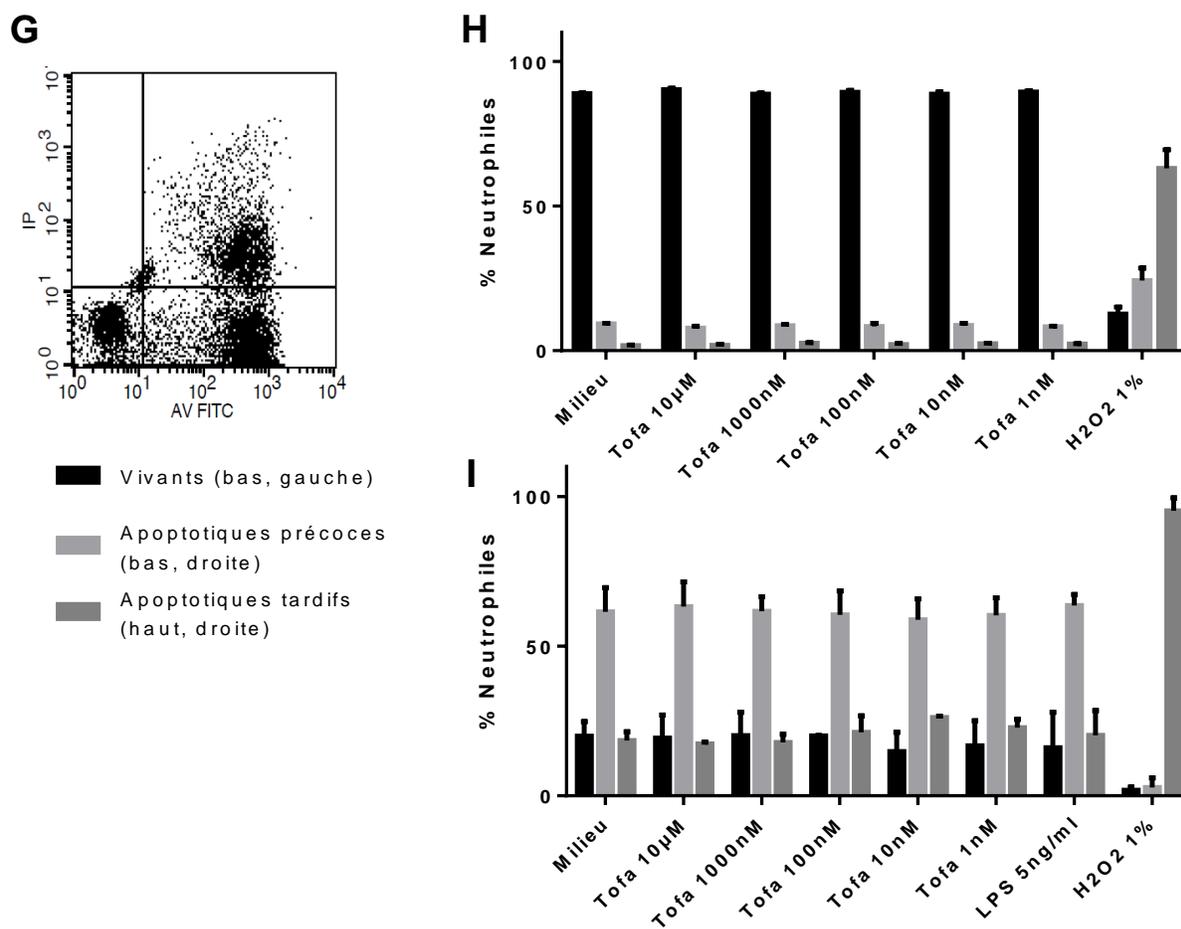
### 3. Résultats

#### a) ***Le tofacitinib n'active pas le neutrophile et n'est pas toxique à n'importe quelle dose testée***

Nous avons voulu nous assurer que le tofacitinib n'était pas toxique et qu'il n'activait pas le neutrophile aux doses utilisées en clinique. Il a été estimé qu'aux doses cliniques, la concentration de tofacitinib dans le sang variait entre 10 nM et 300 nM<sup>207</sup>. Nous avons réalisé une gamme allant de 1 nM à 10  $\mu$ M qui correspond aux concentrations utilisées *in vitro* dans la littérature. Nous avons cultivé les neutrophiles pendant 4 heures (h) en présence ou absence des doses de tofacitinib, et avons mesuré l'état d'activation des neutrophiles en mesurant leur quantité de CD66b et de CD11b à la surface. Nous avons utilisé le LPS, un agoniste du TLR4, comme contrôle positif d'activation. On observe qu'à aucune concentration, le tofacitinib n'induit de surexpression membranaire du CD11b (Figure 1A) ou du CD66b (Figure 1B), contrairement au contrôle positif LPS chez des neutrophiles de donneurs sains. De même, le tofacitinib n'induit

aucune sécrétion d'IL-8 (Figure 1C), comparé au contrôle positif LPS. Les neutrophiles de patients atteints de PR réagissent de la même façon (Figure 1D, E et F). En outre, des études cliniques ont montré que le tofacitinib induisait une neutropénie<sup>191,192,206</sup>. Nous avons voulu nous assurer que le tofacitinib n'était pas toxique directement sur le neutrophile. Pour cela, nous avons cultivé des neutrophiles de donneurs sains ou de patients PR à différents temps puis avons réalisé un marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium afin de discriminer les cellules vivantes des cellules apoptotiques précoces et des apoptotiques tardives (Figure 1G). Les cellules vivantes sont celles qui ne sont marquées ni à l'annexine V ni à l'iodure de propidium, les apoptotiques précoces sont celles qui sont positives à l'annexine V et négatives à l'iodure de propidium et les cellules apoptotiques tardives sont celles double positives. Nous avons utilisé le peroxyde d'hydrogène comme contrôle positif. A 4 h, on observe que le tofacitinib ne modifie pas le pourcentage de cellules vivantes qui reste au-dessus de 90%, alors que le peroxyde d'hydrogène abaisse ce pourcentage à moins de 10% (Figure 1H). On observe le même phénomène après 16 h, à une différence de degré près. Il est bien connu que les neutrophiles meurent rapidement en culture *ex vivo* en absence de stimulation. On observe une viabilité d'environ 20%, avec une majorité de cellules apoptotiques précoces. Le tofacitinib ne modifie pas ce pourcentage à n'importe quelle dose (Figure 1I). En résumé, le tofacitinib n'active pas le neutrophile et n'est pas toxique aux doses cliniques et au-delà.





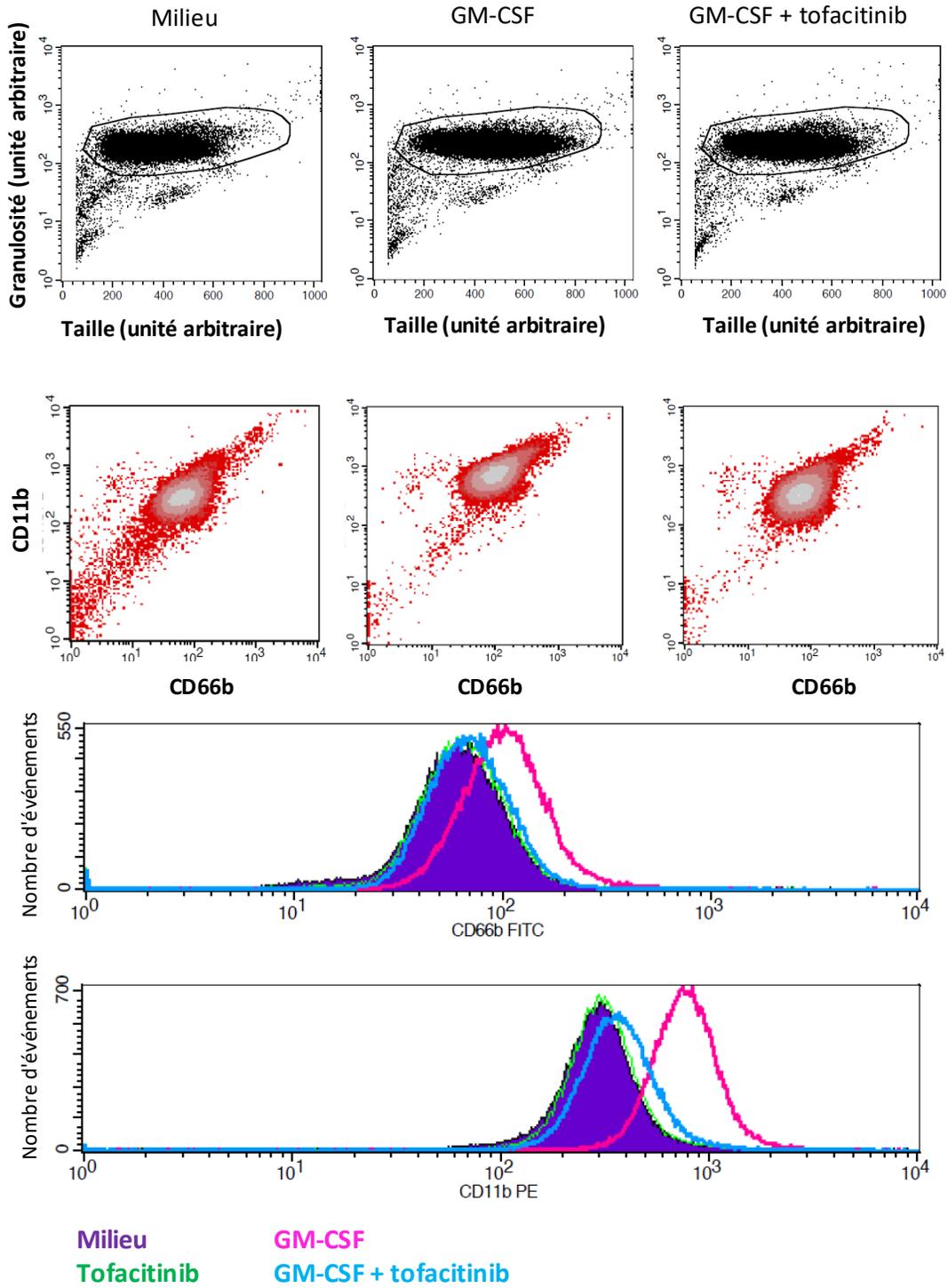
**Figure 1 : Le tofacitinib n'active pas le neutrophile et n'est pas toxique.** Plusieurs doses de tofacitinib ont été testées sur les neutrophiles de 3 donneurs sains pendant 4h, l'expression membranaire du CD11b (A) et du CD66b (B) ainsi que la sécrétion d'IL-8 (C) ont été mesurées par cytométrie en flux et ELISA, respectivement. Les mêmes paramètres ont été mesurés sur les neutrophiles d'un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde (D, E et F). Afin de d'estimer la viabilité un marquage annexine V et iodure de propidium a été réalisé, et une image représentative des neutrophiles d'un patient PR cultivés 16 h est montrée (G). La viabilité a été estimée sur les neutrophiles d'un donneur sain en triplicat à 4 h de culture (H) et sur deux donneurs sains après 16 h (I). Les écarts-types sont représentés et ont été calculés sur les moyennes de chaque triplicat ou duplicat de chaque donneur. IFM signifie « intensité moyenne de fluorescence ».

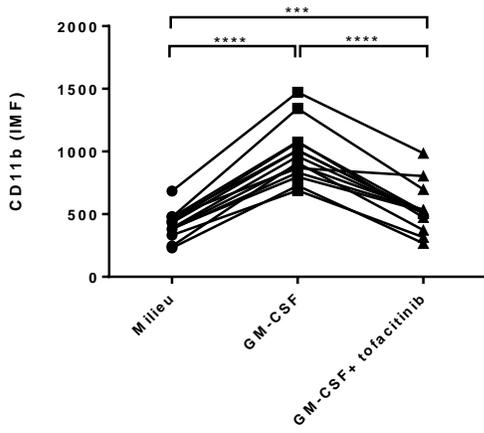
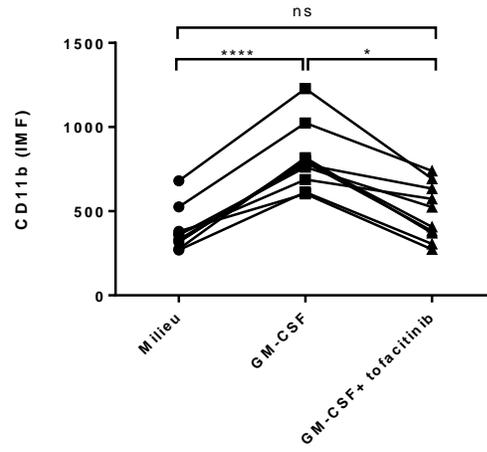
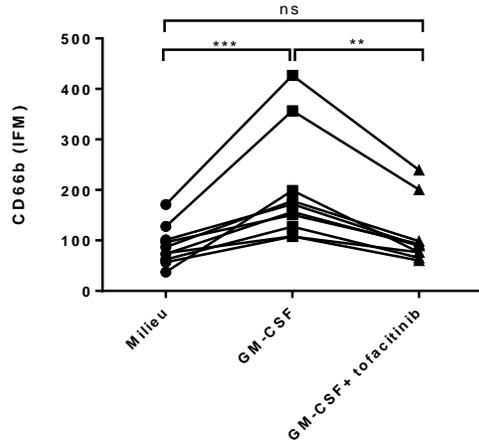
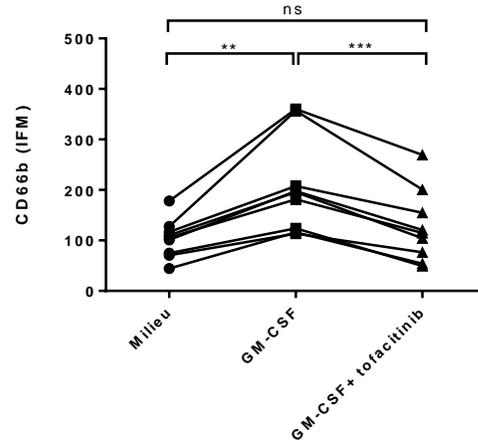
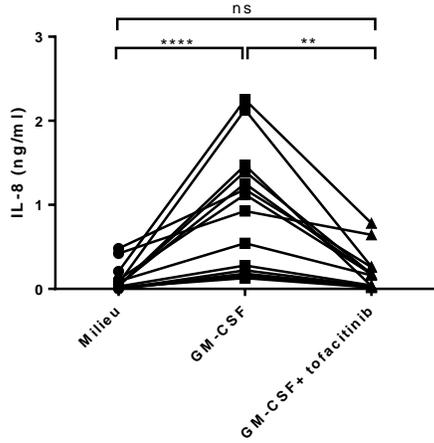
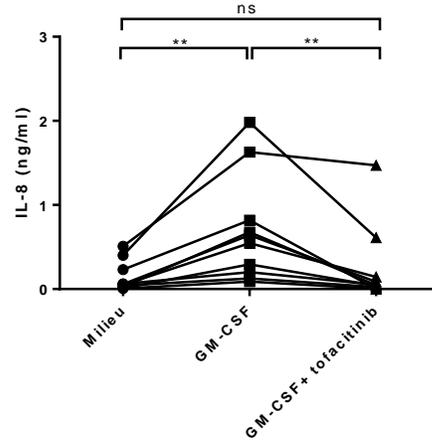
## **b) *L'activation du neutrophile par le GM-CSF est inhibée par le tofacitinib***

Le tofacitinib a été décrit comme un anti-JAK. Ainsi, le tofacitinib bloque la stimulation induite par des cytokines dont les effets passent par JAK. Parmi elles, le GM-CSF a un rôle clé dans la physiologie de la PR. Nous avons testé les effets du tofacitinib sur l'activation induite par le GM-CSF. En parallèle, nous avons testé l'effet du tofacitinib sur l'activation induite par le TNF, qui est une autre cytokine clé de la PR mais qui n'a pas été décrite comme induisant une signalisation passant directement par JAK. En même temps, nous avons testé l'effet du tofacitinib sur l'activation induite par le LPS qui ne signale pas via JAK-STAT. Plusieurs doses de tofacitinib ont été testées simultanément. Nous avons observé que le tofacitinib inhibait spécifiquement l'effet du GM-CSF avec un effet dose-dépendant (Figure S1). Nous avons répété les expériences avec le GM-CSF dont l'effet seul semblait être inhibé par la tofacitinib. Nous avons choisi la plus haute dose de tofacitinib car il nous semblait qu'elle seule bloquait complètement l'effet du GM-CSF. Après 4 h de culture, nous avons de nouveau mesuré les changements de l'expression de surface du CD11b et du CD66b sur les neutrophiles. La stratégie de fenêtrage est montrée, on discrimine les neutrophiles des débris (Figure 2A). Nous avons répété les expériences et observé que le GM-CSF induisait une augmentation de l'expression de CD11b à la surface du neutrophile de donneur sain (Figure 2B). Dans le même temps, le tofacitinib inhibe cette activation de façon statistiquement significative. Le GM-CSF augmente aussi la quantité de CD66b chez les neutrophiles de donneurs sains (Figure 2C), ainsi que la sécrétion d'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire de la PR (Figure 2D). Ces effets sont aussi inhibés par le tofacitinib de façon statistiquement significative (Figure 2C et D). Chez les neutrophiles de patients atteints de PR, on note une activation similaire par le GM-CSF ainsi que les mêmes effets d'inhibition du tofacitinib, que ce soit en observant l'expression du CD11b (Figure 2E), du CD66b (Figure 2F) ou la sécrétion d'IL-8 (Figure 2G). A l'inverse, la sécrétion d'IL-10 qui est une cytokine plutôt anti-inflammatoire n'a pas été observée en réponse au GM-CSF, et n'est donc pas montré. Cette partie montre que le tofacitinib inhibe les effets pro-inflammatoires du GM-CSF sur le neutrophile de patient PR et de donneur sain.



**A**



**B****C****D****E****F****G**



**Figure 2 : Le tofacitinib bloque l'activation des neutrophiles de donneurs sains et de patients PR par le GM-CSF.** Des neutrophiles de patient PR ont été cultivés 4 h puis le CD11b et CD66b membranaires ont été mesurés par cytométrie. Une fenêtre a été utilisée pour discriminer les neutrophiles des cellules mortes. Les résultats sont présentés en deux dimensions et une dimension (A). L'expression du CD11b (B), du CD66b (C), et la sécrétion d'IL-8 (D) sont montrées sur les neutrophiles de donneurs sains. Les mêmes protéines sont mesurées dans les mêmes conditions sur des neutrophiles de patients atteints de PR (E, F et G). Dans chaque expérience, le test de normalité de D'Agostino et Pearson a été utilisé. Si la distribution de chaque groupe était normale, alors un test ANOVA à une voie sur mesures répétées a été réalisé. Si l'hypothèse de normalité était rejetée, alors le test de Friedman a été effectué. La correction de Geisser-Greenhouse a été appliquée. Chaque point représente un donneur. IFM signifie « intensité moyenne de fluorescence ». Le GM-CSF est dilué à 100ng/ml et le tofacitinib à 1µM.

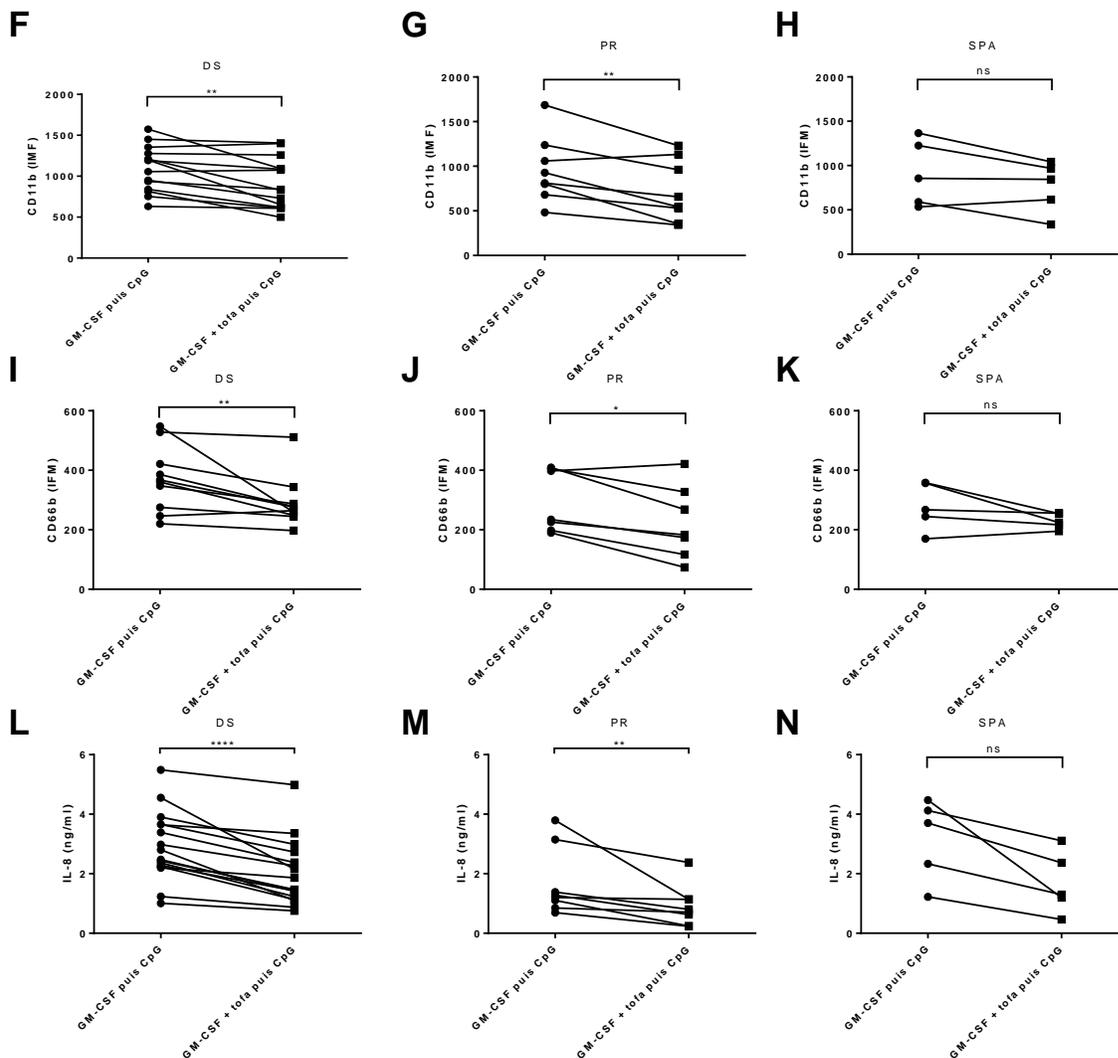
c) ***Le tofacitinib diminue l'activation du neutrophile induite par la double stimulation GM-CSF puis CpG***

Il avait été décrit que le GM-CSF sensibilise le neutrophile à répondre à différents ligands TLR dont le TLR9. Nous avons utilisé un de ses agonistes, les oligonucléotides CpG, pour le stimuler. Nous avons voulu étudier si le tofacitinib diminuait l'activation du neutrophile par le CpG sur des neutrophiles sensibilisés par le GM-CSF. Pour cela nous avons cultivé les neutrophiles pendant 4 heures avec GM-CSF avec ou sans tofacitinib, puis nous les avons stimulés par du CpG pendant 4 h supplémentaires, et avons estimé l'état d'activation des neutrophiles de donneurs sains comme précédemment (Figure 3A). Les neutrophiles de 16 donneurs sains ont été isolés, et 200 000 neutrophiles ont été cultivés pour chaque condition. Nous avons retenu la sécrétion d'IL-8 qui reflétait le mieux le phénomène de sensibilisation. La sécrétion d'IL-8 chez les neutrophiles de donneurs sains est représentative des autres expériences (Figure 3B). Nous nous sommes attachés à démontrer l'effet de sensibilisation du neutrophile au CpG par le GM-CSF avec un test statistique, ce qui n'avait pas été réalisé à notre connaissance. Pour cela, nous avons souhaité comparer la sécrétion d'IL-8 induite par le CpG sur des neutrophiles sensibilisés ou non par le GM-CSF. Pour connaître la sécrétion d'IL-8 induite par le CpG sur des neutrophiles sensibilisés au GM-CSF, il est nécessaire d'y retrancher la sécrétion d'IL-8 induite par le GM-CSF seul, ce qui a été fait. Les neutrophiles de 16 donneurs sains ont été isolés, et 200 000 neutrophiles ont été cultivés selon les conditions décrites dans la figure 3A. On observe que la sécrétion d'IL-8 est plus élevée de manière statistiquement significative sur les neutrophiles de donneurs sains

sensibilisés par le GM-CSF, comparé à ceux qui n'ont pas été sensibilisés (Figure 3B). Cet effet de sensibilisation est un effet synergique et s'oppose à l'effet additif (Figure S2A). Les neutrophiles de 8 patients atteints de PR et 5 patients atteints de SPA ont été isolés. On observe une tendance similaire sur les neutrophiles de patients atteints de PR (Figure 3C) ainsi que sur les neutrophiles de patients atteints de spondylarthrite ankylosante (Figure 3D). Lorsqu'on observe l'effet du tofacitinib sur la double stimulation GM-CSF puis CpG, on aperçoit qu'il diminue l'expression du CD11b sur les neutrophiles de donneur sain (Figure 3E) et de patients PR (Figure 3F) de manière statistiquement significative. Cette tendance est retrouvée chez les neutrophiles de patients atteints de SPA (Figure 3G). De même, le tofacitinib induit une diminution de l'expression du CD66b chez les neutrophiles de donneurs sains (Figure 3H) et de patients atteints de PR (Figure 3I) de manière statistiquement significative, et de manière non-significative sur les neutrophiles de patients atteints de SPA (Figure 3J). De même, le tofacitinib diminue la sécrétion d'IL-8 induite par la double-stimulation GM-CSF puis CpG sur les neutrophiles de donneurs sains (Figure 3K) et de patients atteints de PR (Figure 3L) de manière statistiquement significative, ainsi que sur les neutrophiles de patients atteints de SPA de manière non-significative (Figure 3M). Il est intéressant de noter que l'expression du CD11b, du CD66b et la sécrétion d'IL-8 diminuent toutes en présence de tofacitinib. Dans tous les cas cette inhibition est partielle, allant de 31 à 46% sur la sécrétion d'IL-8 et 17 à 24% sur l'expression du CD11b et CD66b, selon les groupes de donneurs sains, patients PR ou SPA. Ces données ne démontrent pas que le tofacitinib bloque complètement la sensibilisation du GM-CSF. En effet même en présence de tofacitinib, on observe très clairement un effet sensibilisation persistant du GM-CSF au CpG (Figure S2B). Il avait été décrit que le GM-CSF augmentait l'expression du TLR9 chez le neutrophile<sup>174</sup>. Après non pas 8 h mais 16 h de culture, on observe que le tofacitinib diminue l'expression du TLR9 en présence de GM-CSF (Figure S2C). On peut souligner le fait que les niveaux d'activation des neutrophiles sanguins sont similaires qu'ils proviennent de donneur sain, de patient PR ou SPA. Ce ne seraient donc pas les neutrophiles sanguins qui contribueraient en l'état à la maladie, mais plutôt les neutrophiles qui auront migré dans les articulations, siège d'un environnement pro-inflammatoire<sup>116,125</sup>. En résumé cette partie montre que le tofacitinib diminue l'activation du neutrophile induite par les stimulations successives GM-CSF puis CpG.







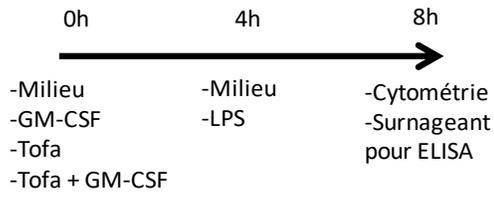
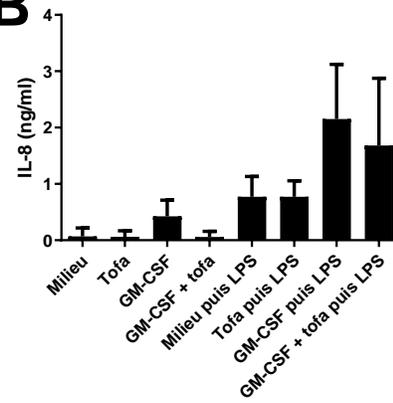
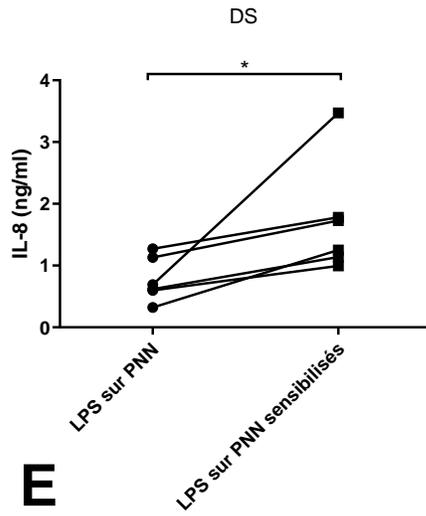
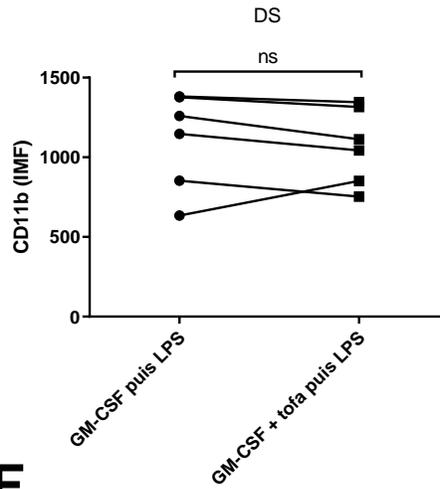
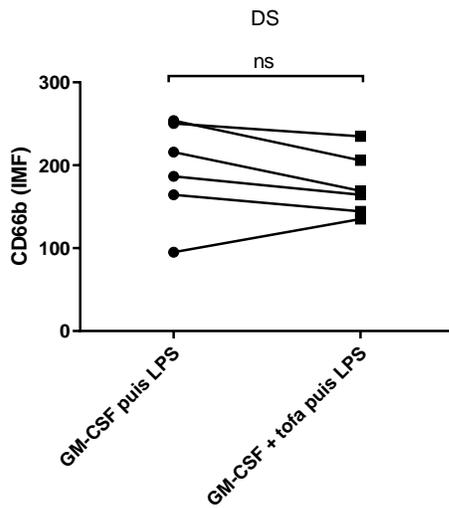
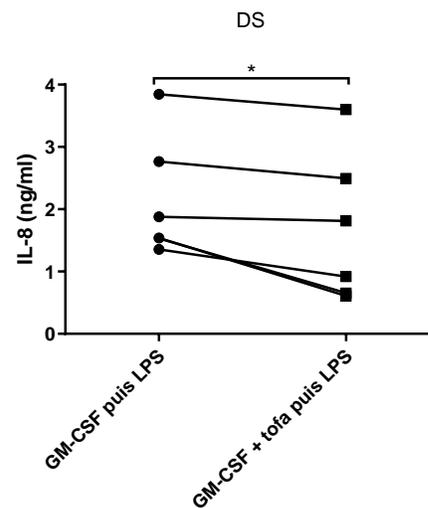
**Figure 3 : Le tofacitinib diminue l'activation du neutrophile de donneur sain et de patient atteint de PR à la combinaison GM-CSF et CpG.** Les neutrophiles ont été cultivés deux fois 4h, avec du GM-CSF et/ou du tofacitinib (tofa) les quatre premières heures et du CpG les quatre heures suivantes (A). La sécrétion d'IL-8 chez les donneurs sains est montrée et est représentative des patients PR et SPA (B). On a comparé la sécrétion d'IL-8 induite par le CpG sur des neutrophiles sensibilisés ou non au GM-CSF. La sécrétion d'IL-8 induite par le CpG sur des neutrophiles sensibilisés par le GM-CSF a été calculée simplement en retranchant la sécrétion d'IL-8 dans la condition GM-CSF à la condition GM-CSF puis CpG chez (C). L'effet de sensibilisation a été aussi estimé sur les neutrophiles de patient PR (D) et de patient atteint de SPA (E). L'effet du tofacitinib sur cette double-stimulation GM-CSF puis CpG a été estimé chez les neutrophiles de 16 donneurs sains en estimant la quantité de CD11b (F), de CD66b (G), et d'IL-8 (H). Cet effet du tofacitinib a aussi été estimé sur 8 patients atteints de PR selon les mêmes critères (I, J, K) ainsi que sur des neutrophiles de 5 patients atteints de SPA (L, M, N).

*Suite de la figure 3* Dans chaque expérience, le test de normalité de D'Agostino et Pearson a été utilisé. Si la distribution de chaque groupe était normale, alors un test de Student apparié a été réalisé. Si l'hypothèse de normalité était rejetée, alors le test de Wilcoxon a été effectué. Chaque point représente un donneur. IFM signifie « intensité moyenne de fluorescence ». Le GM-CSF est dilué à 100ng/ml, le tofacitinib à 1 $\mu$ M et le CpG à 2 $\mu$ M. DS : donneur sain ; PR : patient atteint de polyarthrite rhumatoïde ; SPA : patient atteint de spondylarthrite ankylosante.

d) ***Le tofacitinib diminue seulement en partie l'activation de la co-stimulation GM-CSF puis LPS***

Par analogie, nous avons voulu observer si le tofacitinib diminuerait aussi l'activation du neutrophile induite par le GM-CSF puis le LPS, un ligand du TLR4, pour voir si le mécanisme était spécifique au TLR9. Pour cela, nous avons cultivé les neutrophiles comme précédemment avec du GM-CSF avec ou sans tofacitinib, puis nous les avons stimulés par du LPS pendant 4h supplémentaires (Figure 4A). L'ensemble des conditions est montré (Figure 4B). Comme dans la figure 3, on observe que les neutrophiles sensibilisés par le GM-CSF répondent mieux au LPS que ceux qui n'ont pas été sensibilisés, ce qui est synonyme d'effet synergique (Figure 4C). Sur des neutrophiles de donneurs sains, nous n'avons pas pu montrer que le tofacitinib diminuait l'expression du CD66b et du CD11b parce que chez un donneur sur six le tofacitinib a étonnement augmenté leur expression (Figure 4D et E). Le tofacitinib diminue de manière statistiquement significative la sécrétion d'IL-8 suite aux stimulations successives GM-CSF puis LPS (Figure 4F). Cette inhibition est partielle, elle est de 22% pour la sécrétion d'IL-8, seulement 3% pour l'expression du CD11b et 10% pour le CD66b. En résumé, le tofacitinib diminue l'activation du neutrophile stimulé par GM-CSF puis LPS.



**A****B****C****D****E****F**

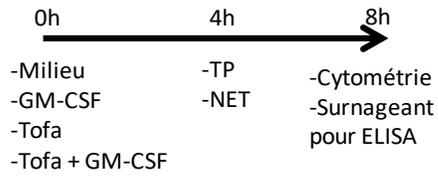
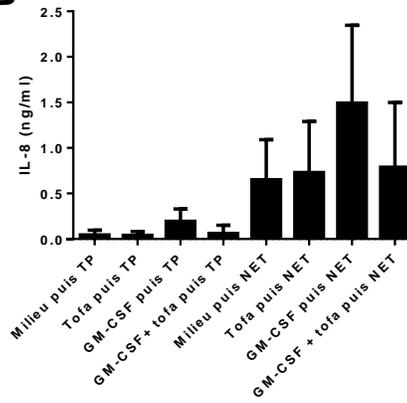
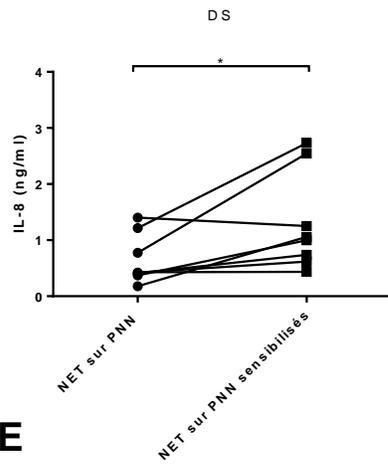
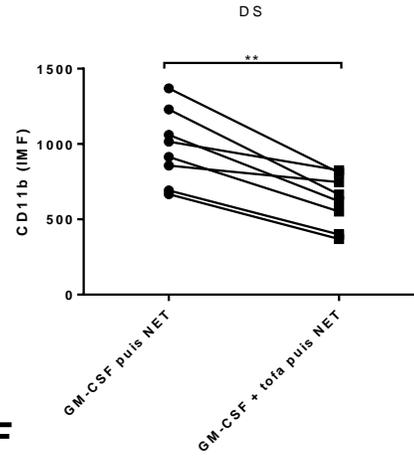
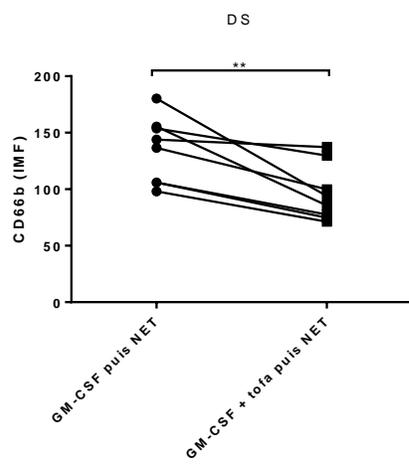
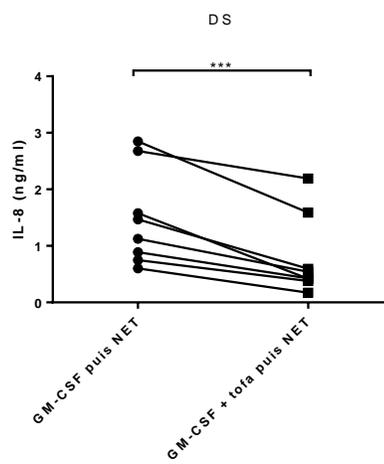
**Figure 4 : Le tofacitinib diminue la stimulation des neutrophiles à la combinaison GM-CSF puis LPS.** Des neutrophiles de 6 donneurs sains ont été cultivés deux fois 4h, avec du GM-CSF et/ou du tofacitinib les quatre premières heures et du LPS ou son contrôle les quatre heures suivantes (A). La sécrétion d'IL-8 a été mesurée par ELISA (B). On a comparé la sécrétion d'IL-8 induite par le LPS sur des neutrophiles sensibilisés ou non au GM-CSF. La sécrétion d'IL-8 induite par le LPS sur des neutrophiles sensibilisés par le GM-CSF a été mesurée par ELISA et calculée simplement en retranchant la sécrétion d'IL-8 dans la condition GM-CSF à la condition GM-CSF puis LPS (C). L'effet du tofacitinib sur cette double-stimulation GM-CSF puis LPS a été estimée en mesurant l'expression du CD11b (D), du CD66b (E) par cytométrie et la sécrétion d'IL-8 (F). Dans chaque expérience, le test de normalité de D'Agostino et Pearson a été utilisé. Si la distribution de chaque groupe était normale, alors un test apparié de Student a été réalisé. Si l'hypothèse de normalité était rejetée, alors le test apparié de Wilcoxon a été effectué. Chaque point représente un donneur. IFM signifie « intensité moyenne de fluorescence ». Le GM-CSF est dilué à 100ng/ml, le tofacitinib à 1µM et le LPS à 5ng/ml.

e) ***Le tofacitinib diminue l'activation de la co-stimulation GM-CSF puis NET***

Les NET sont probablement impliqués dans la physiopathologie de la PR, et leur effet sur le neutrophile a été montré par notre laboratoire<sup>118</sup>. Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des NET sont incertains. Nous avons d'abord estimé si le GM-CSF sensibilisait le neutrophile à répondre aux NET. En même temps nous avons analysé si le tofacitinib diminuerait aussi l'activation du neutrophile induite par les stimulations successives GM-CSF puis NET. Pour cela, nous avons cultivé des neutrophiles de donneurs sains comme précédemment avec du GM-CSF avec ou sans tofacitinib, puis nous les avons re-stimulés avec des NET pendant 4h supplémentaires (Figure 5A). L'ensemble des conditions est montré (Figure 5B). Comme dans les figures 3 et 4, on observe que les neutrophiles sensibilisés par le GM-CSF répondent mieux aux NET que ceux qui n'ont pas été sensibilisés ce qui montre un effet synergique (Figure 5C). Nous avons montré que le tofacitinib diminuait l'expression du CD66b et du CD11b sur les neutrophiles stimulés avec du GM-CSF puis des NET de manière statistiquement significative (Figure 5D et E). Le tofacitinib diminue aussi de manière statistiquement significative la sécrétion d'IL-8 suite à la co-stimulation GM-CSF puis NET (Figure 5F). Cette inhibition est partielle, elle est de 47% pour la sécrétion d'IL-8, 36% pour le CD11b et 27% pour le CD66b. Si l'on regarde les figures 3B, 4B et 5B alors on peut avoir l'impression que le tofacitinib a plus

d'effet sur la combinaison GM-CSF puis NET qu'il n'en a sur GM-CSF puis CpG ou GM-CSF puis LPS, sur les donneurs sains. En effet les pourcentages d'inhibition sont de 47 contre 32 et 28 respectivement. Cela souligne que le tofacitinib agirait différemment sur les voies de signalisation activées soit par les NET soit par les ligands des TLR4 et 9. En résumé, le GM-CSF sensibilise le neutrophile à répondre aux NET et le tofacitinib diminue l'activation du neutrophile stimulé par GM-CSF puis NET.

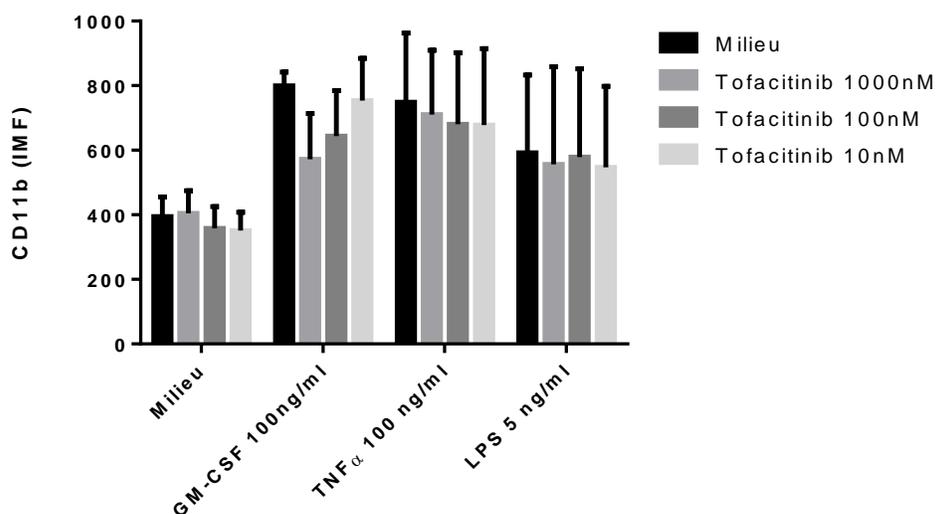


**A****B****C****D****E****F**

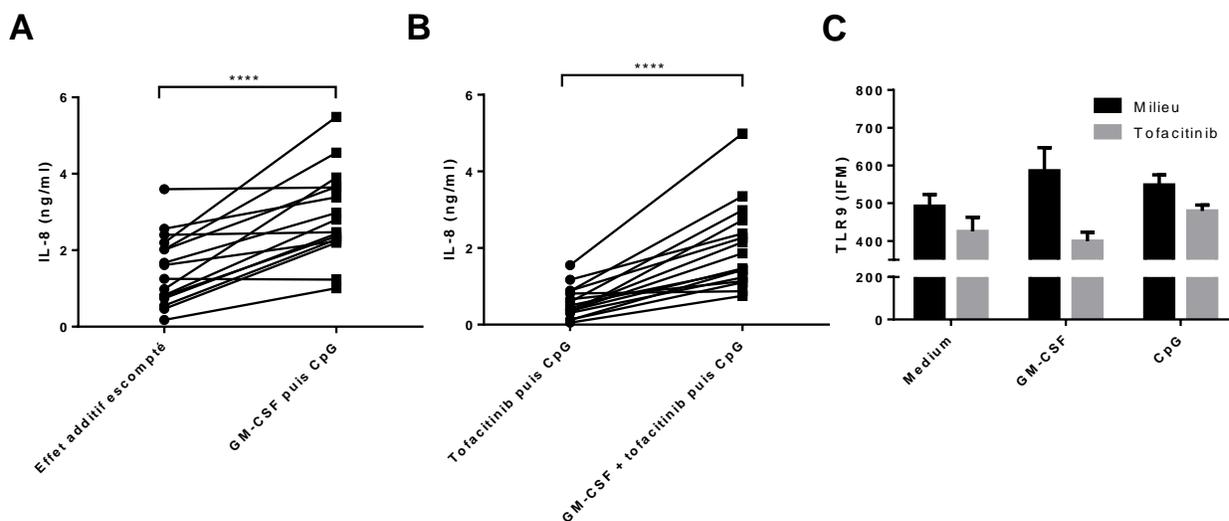
**Figure 5 : Le tofacitinib diminue la stimulation des neutrophiles à la combinaison GM-CSF puis NET.** Des neutrophiles de 8 donneurs sains ont été cultivés deux fois 4h, avec du GM-CSF et/ou du tofacitinib les quatre premières heures et des NET ou son contrôle les quatre heures suivantes (A). La sécrétion d'IL-8 a été mesurée par ELISA (B). On a comparé la sécrétion d'IL-8 induite par les NET sur des neutrophiles sensibilisés ou non au GM-CSF. La sécrétion d'IL-8 induite par les NET sur des neutrophiles sensibilisés par le GM-CSF a été calculée simplement en retranchant la sécrétion d'IL-8 dans la condition GM-CSF à la condition GM-CSF puis NET (B). L'effet du tofacitinib sur cette double-stimulation GM-CSF puis NET a été estimée en mesurant l'expression du CD11b (C), du CD66b (D) par cytométrie et par la sécrétion d'IL-8 (E). Dans chaque expérience, le test de normalité de D'Agostino et Pearson a été utilisé. Si la distribution de chaque groupe était normale, alors un test apparié de Student a été réalisé. Si l'hypothèse de normalité était rejetée, alors le test apparié de Wilcoxon a été effectué. Chaque point représente un donneur. IFM signifie « intensité moyenne de fluorescence ». Le GM-CSF est dilué à 100ng/ml et le tofacitinib à 1 $\mu$ M.

#### f) *Conclusion*

Ces expériences ont montré que le tofacitinib n'était pas toxique sur le neutrophile de donneur sain et de patient atteint de PR. De plus nous avons montré que le tofacitinib bloque l'effet probablement pro-inflammatoire du GM-CSF sur les neutrophiles de donneur sains et de patient PR, et il semble en aller de même pour les patients atteints de SPA. Nous avons démontré l'effet de sensibilisation au CpG du GM-CSF sur le neutrophile. Nous avons montré que le GM-CSF sensibilise aussi le neutrophile à répondre au LPS et aux NET. Enfin nous avons montré que le tofacitinib diminuait l'activation des neutrophiles stimulés par du GM-CSF puis du CpG, du LPS ou des NET.



**Figure S1 : Effet-dose du tofacitinib sur la stimulation du neutrophile.** Des neutrophiles de 3 donneurs sains ont été isolés puis cultivés 4h avec ou sans GM-CSF, TNF et LPS. En même temps, de l'effet du tofacitinib à différentes doses a été estimé sur chaque type de stimulation. La quantité de CD11b a été mesurée en cytométrie en flux et utilisée comme marqueur d'activation. Les écarts-types sont représentés et ont été calculés sur les moyennes du triplicat de chaque donneur. IMF signifie « intensité moyenne de fluorescence ».



**Figure S2 : Le tofacitinib semble diminuer l’expression du TLR9 sur le neutrophile à 16h.**

A partir des données de sécrétion d’IL-8 par les neutrophiles de donneurs sains de la figure 3, il a été calculé pour chaque donneur la somme de la sécrétion induite par le GM-CSF seul plus la sécrétion induite par le CpG seul (effet additif escompté). Cette somme a été comparée à la sécrétion d’IL-8 de neutrophiles qui ont reçu consécutivement du GM-CSF puis du CpG. Le test de Wilcoxon a été utilisé (A). Dans l’optique de déterminer si le tofacitinib bloque la sensibilisation au GM-CSF, il a été comparé la sécrétion d’IL-8 induite par le CpG sur des neutrophiles non-sensibilisés avec la sécrétion d’IL-8 induite par le CpG sur des neutrophiles stimulés par du GM-CSF et du tofacitinib. Le test de Wilcoxon a été utilisé (B). Des neutrophiles de donneurs sains ont été cultivés 16h en présence ou en absence de GM-CSF ou CpG, avec ou sans tofacitinib et l’expression du TLR9 a été mesurée sur cellules perméabilisées en par cytométrie. IFM signifie « intensité moyenne de fluorescence ». Le GM-CSF est dilué à 100ng/ml et le tofacitinib à 1µM.



# IV. Discussion



# A. Les NET sont antigéniques et pro-inflammatoires dans un modèle murin

## 1. Notre purification des NET induits par le PMA

### a) *Nos NET*

Notre méthode d'isolement des NET est à mon sens une des meilleures décrites dans la littérature. Le fait que les NET adhèrent à la lame de culture permet de les laver de tous les composants non-spécifiques qui sont relargués conjointement à la nétose. L'utilisation de notre contrôle TP, que nous sommes les seuls à utiliser à ma connaissance, permet de s'assurer que les effets observés sont bien dus aux NET et pas à du PMA résiduel.

### b) *Différents stimuli induisent différents NET : relevance ?*

Le PMA n'est pas un constituant physiologique, il est isolé à partir d'huile de croton<sup>211</sup>. Néanmoins de par son homologie avec le diacyl-glycérol, il mime l'activation de la PKC. On peut considérer que l'activation au PMA mime certaines formes d'activation du neutrophile en contexte pro-inflammatoire. De par la quantité de nétose induite, le PMA est le composé le plus utilisé pour induire la nétose dans la littérature, et est considéré comme contrôle positif d'induction de nétose. Dernièrement, c'est avec le PMA que l'équipe d'Arturo Zychlinsky étudie la nétose<sup>68</sup>, comme nous.

L'équipe d'Arturo Zychlinsky a montré que différents stimuli induisent des NET différents<sup>52</sup>. Une différence notable réside dans la citrullination des protéines, les ionophores induisent une citrullination plus importante que le PMA. Un exemple d'ionophore est l'ionomycine, qui est produite chez la bactérie *Streptomyces conglobatus*. Ce type de mort cellulaire est parfois appelée

hypercitrullination leukotoxique (LTH). Maximilian Konig a montré que ce type de mort cellulaire, proche de la NETose, induisait une citrullination des protéines plus importante que la nétose induite par le PMA<sup>53</sup>. Dans l'optique d'induire des ACPA, la LTH est peut-être plus pertinent que la nétose induite par PMA, et pourrait compléter notre étude. En résumé, nous utilisons une des meilleures méthodes pour produire des NET.

## 2. Les NET contiennent très peu ou pas de PAD4

### a) *Nos résultats*

Dans la majorité des expériences que nous avons menées, nous n'avons pas retrouvé de PAD4 dans les NET. Dans le même temps nous avons facilement détecté PAD4 dans le lysat d'un million de neutrophiles, alors que nous n'avons rien détecté sur les NET provenant de l'équivalent de 4 millions de neutrophiles du même donneur. La raison pour laquelle on a retrouvé une fois PAD4 dans les NET est inconnue.

### b) *Les résultats de la littérature*

En 2015 une équipe anglaise publie un travail portant sur l'origine de la citrullination dans la PR. Ils étudient le neutrophile qui exprime PAD4 et PAD2. Ils montrent que PAD4 et PAD2 sont retrouvées à la fois dans les NET et dans les surnageants de cellules nécrotiques<sup>63</sup>. Ces résultats sont plutôt différents des nôtres. En effet, nous avons observé une seule fois de la PAD4 dans les NET, mais la plupart du temps nous n'en avons pas observé. Nous avons facilement observé un signal en lysant 1 million de neutrophiles alors que nous n'avons rien observé dans les NET issus de l'équivalent de 4 millions de neutrophiles. Cela sous-entend que, dans l'hypothèse selon laquelle PAD4 est relarguée par les neutrophiles, ce ne sont pas les NET qui sont les principaux pourvoyeurs de PAD4. On n'observe pas non plus de PAD4 dans les surnageants. PAD4 pourrait être séquestrée dans les neutrophiles et n'être relarguée qu'après une nécrose tardive suite à un

défaut d'efférocytose. En résumé, Spengler *et al.* ont montré qu'il était possible de retrouver PAD4 dans les NET, sans en estimer la quantité.

D'autres auteurs de l'équipe d'Arturo Zychlinsky se sont attachés à décrire la composition protéique des NET. Pour ce faire, ils ont produit des NET en stimulant des neutrophiles humains avec du PMA, de façon très proche de notre méthode ou de celle de Spengler. Ils ont analysé la composition par spectrométrie de masse et ont quantifié les protéines selon une méthode originale, en réalisant un *western blot* avec à la fois une gamme de la protéine recombinante et les échantillons de NET. Si l'on additionne les histones, on arrive à 69,15 % de quantité de protéines totales exprimée en mole. Les protéines granulaires comme la NE, la lactoferrine ou la MPO sont présentes à 5,84%, 2,74%, et 1,01% respectivement. Sur les 24 protéines associées aux NET, ni PAD4 ni PAD2 n'ont été détectées<sup>209</sup>. En résumé, l'équipe d'Arturo Zychlinsky n'a pas non plus décrit de PAD4 ou 2 dans les NET. D'autres auteurs<sup>152</sup> ont observé que PAD2 et dans une moindre mesure PAD4 étaient sécrétées par les neutrophiles *ex vivo* en absence de stimulation. Ces PAD étaient actives. En outre, les auteurs ont décrit PAD4 à la surface des neutrophiles<sup>152</sup>.

### 3. Les anticorps de patients PR anti-PAD4 et 3/4 reconnaissent PAD2

#### a) ***Nos résultats***

Nous avons montré que les IgG purifiées des sera de patients atteints de PR anti-PAD4 et 3/4 reconnaissent PAD2 à une intensité comparable à PAD4.

#### b) ***Résultats de la littérature***

Erika Darrah et ses collègues de l'équipe d'Anthony Rosen ont montré que la liaison des anti-PAD3/4 à la PAD4 baissait le seuil calcique nécessaire à son activation<sup>155</sup>. Ainsi, ces anticorps augmenteraient la citrullination au niveau des sites inflammatoires, ce qui augmenterait le nombre d'antigènes citrullinés et les ACPA sont liés aux érosions osseuses. Ainsi, ces anti-PAD4 et 3/4 agiraient de la même façon sur PAD2 qu'ils agissent sur PAD4.

Récemment, Erika Darrah a publié un nouvel article traitant des anti-PAD2<sup>156</sup>. Chez les patients atteints de PR, la présence des anti-PAD2 n'est pas associée à une PR plus sévère, ce serait plutôt le contraire. 1,6% des patients PR a à la fois des anti-PAD2 et des anti-PAD3/4. Aucune explication n'est donnée du pourquoi de l'effet protecteur des anti-PAD2. Il serait intéressant de savoir si les anti-PAD2 inhiberaient PAD2. Dans un objectif de clarification, on pourrait suggérer de renommer les anti-PAD3/4 qui reconnaissent aussi PAD2 anti-PAD2/3/4, ou bien des anti-PAD de neutrophiles.

## 4. Les sera anti-PAD3/4 reconnaissent les NET

### a) *Nos résultats*

Nous avons montré pour la première fois que les sérums de patients PR anti-PAD3/4 reconnaissent les NET. Cela ne signifie pas que PAD4 soit la protéine-cible responsable de cette reconnaissance. En effet, de nombreux autres anticorps que les anti-PAD4 sont présents dans les sera qualifiés d'« anti-PAD3/4 » que nous avons utilisés. Par exemple, il y a de grande chance de retrouver des ACPA dans ces sera anti-PAD3/4.

### b) *Résultats de la littérature*

La présence d'anticorps anti-nucléaires est retrouvée dans de nombreuses maladies inflammatoires y compris la polyarthrite rhumatoïde<sup>78</sup>. Des anticorps anti-H4 ont été décrits chez les patients atteints de PR<sup>151</sup>, et H4 a été décrit dans les NET<sup>209</sup>. La reconnaissance des NET par des IgG contenant des ACPA comme des IgG de donneurs sains a été montrée en amont<sup>119</sup>. En résumé, les sera anti-PAD3/4 reconnaissent les NET différemment des anti-PAD4.

## 5. L'immunisation par des NET induit des phénomènes inflammatoires proches de l'arthrite

### a) ***Nos résultats***

Nous avons montré que l'injection de NET de patients atteints de PR et d'adjuvant complet de Freund à des souris induisait une immunisation très claire contre les NET. Ces sérums ont une spécificité marquée contre la lactoferrine. En outre l'injection de NET dans la cavité articulaire à des souris pré-immunisées induit un recrutement de cellules dans cette articulation. Ce modèle est proche des rhumatismes inflammatoires aigus, où un grand nombre de cellules immunitaires migrent dans la cavité articulaire. A ma connaissance ce modèle particulier d'immunisation contre les NET de patient PR est un unique.

### b) ***Résultats de la littérature***

#### **“Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis”**

C'est le titre d'un article publié par Carmelo Carmona-Rivera du laboratoire de Mariana Kaplan<sup>119</sup>. L'article a été publié en avril 2017, après le début de cette thèse et de notre projet d'étude du potentiel arthritogénique des NET dans un modèle murin. Les auteurs avaient le même projet.

Ils ont commencé par vouloir vérifier que les ACPA se lient spécifiquement aux NET. Ils n'ont pas démontré que les ACPA se liaient spécifiquement aux NET, mais seulement que les protéines reconnues étaient différentes en comparant un seul lot d'ACPA et un seul lot d'IgG contrôle. Cela suggérerait que chez l'homme, les NET sont antigéniques pour les ACPA comme pour d'autres IgG de patients PR. Le *western blot* correspondant est montré dans la figure 23.

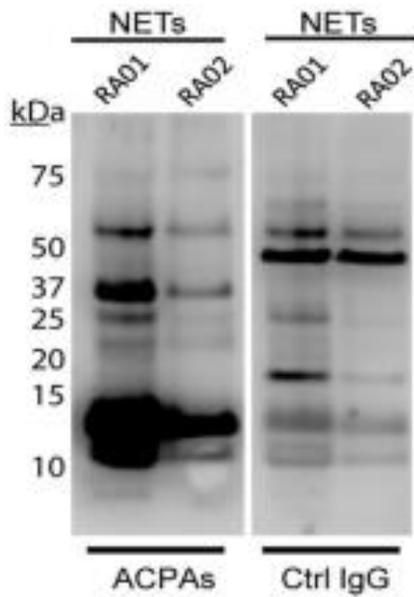


Figure 23 : Protéines des NET reconnues par les ACPA ou les IgG témoins. Cette figure provient de l'article de Carmona-Rivera<sup>119</sup>. Les auteurs ont déposé des NET de patients atteint de polyarthrite (RA pour *rheumatoid arthritis* en anglais), on fait migrer les protéines, ont transféré les protéines sur une membrane et ont incubé des ACPA ou les IgG contrôle, afin de déterminer si des protéines étaient reconnues par ces anticorps.

Ils ont ensuite voulu étudier l'effet arthritogène des NET. Pour ce faire, ils n'ont pas administré directement les NET humains aux souris. A la place, ils ont isolé des synoviocytes fibroblastiques humains (FLS de l'anglais *fibroblast-like synoviocyte*) et ont observé que les synoviocytes internalisaient les NET humains. Les auteurs ont démontré que l'internalisation des NET en même temps que l'internalisation de l'IL-17 augmentait l'expression du CMH II des synoviocytes, leur conférant des propriétés de présentation d'antigène. Ils ont voulu démontrer que les synoviocytes activaient les lymphocytes T, comme une cellule présentatrice d'antigène professionnelle. Ils ont montré que la protéine associée aux NET MPO était colocalisée avec le CMH II dans les synoviocytes. De manière étonnante, ce ne sont pas des lymphocytes spécifiques pour la MPO qu'ils ont utilisés, mais des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> anti-vimentine. La vimentine est un composant des filaments intermédiaires, et est retrouvée sur les NET. Le même laboratoire avait montré en 2013 que la vimentine était présente dans les NET<sup>56</sup>. Dans l'article de 2017, les auteurs ont montré que ce sont les clones de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de la vimentine citrullinée qui sont activés par des synoviocytes ayant internalisé des NET. En résumé, la vimentine serait un des antigènes clé présent dans les NET et responsable d'une immunisation.

Ce sont des synoviocytes murins chargés de NET humains qu'ils ont injecté aux souris. Le contrôle était l'injection de synoviocytes murins qui n'ont pas internalisés de NET. Les souris

étaient génétiquement modifiées, elles n'exprimaient pas le CMH murin, mais plutôt le CMH humain contenant le fameux épitope partagé, qui augmente le risque de développer une PR ACPA+. Ces souris étaient précisément HLA DRB1\*04 :01. 100 000 synoviocytes ont été injectés 7 fois dans le genou en 7 semaines. En recherchant si les sérums reconnaissaient des peptides citrullinés, les auteurs ont estimé que des ACPA étaient retrouvés chez uniquement les souris injectées avec des synoviocytes chargés en NET. Ils ont montré que les splénocytes de ces souris augmentaient leur production d'IL2 murine en réponse à des peptides citrullinés, ce qui suggère qu'une réponse immunitaire adaptative avait déjà été montée contre ces peptides citrullinés. Ils n'ont pas montré de scores d'arthrite, et je doute fort qu'ils ne les aient pas mesurés. A la place, ils ont montré une érosion du cartilage dans les genoux des souris qui ont reçu les synoviocytes chargés en NET. Ils n'ont pas montré d'infiltration articulaire. Ces résultats vont dans le même sens que les nôtres, à savoir que les NET humains sont pro-inflammatoires et sont antigéniques dans un modèle murin. Je ne compare pas ici l'étendue de nos travaux respectifs.

Un point intéressant est un de leurs contrôles. Comme nous, ils ont montré que les sérums de souris injectées avec des synoviocytes non-chargés se liaient à une protéine d'environ 75kDa, comme le montre la figure 24. Il serait intéressant de savoir quelle est cette protéine, et si c'est la même que la nôtre, c'est-à-dire la lactoferrine. Les auteurs considèrent que cette protéine d'environ 75kDa n'est pas spécifique des NET mais des FLS. En effet, qu'ils aient injecté à des souris des synoviocytes murins qui ont reçu ou pas des NET, la bande protéique est présente dans les deux cas. Il y a un argument à présenter qui va contre cette hypothèse ; il est possible que la protéine soit à la fois présente dans les synoviocytes et dans les NET. En résumé les travaux de Carmona-Rivera montrent comme nous que les NET sont antigéniques dans un autre modèle murin.

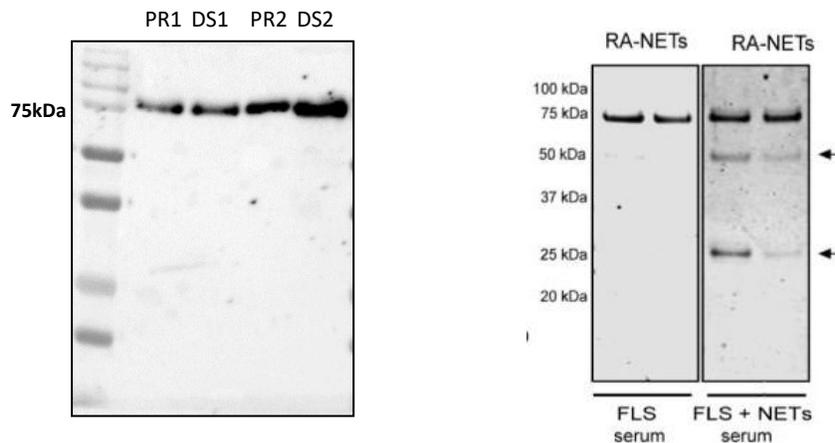


Figure 24 : Comparaison de l’antigénicité des NET dans notre modèle *versus* celui du groupe de Kaplan. L’image de gauche provient de notre travail. L’image de droite provient de l’article de Carmona-Rivera<sup>119</sup>. A gauche, nous avons déposé des NET de patients atteints de polyarthrite (PR) ou de donneur sains (DS), et nous les avons incubés avec un sérum de souris qui a reçu des NET. A droite, les auteurs ont déposé des NET de patients atteints de polyarthrite (RA, de l’anglais *rheumatoid arthritis*) qu’ils ont incubés soit avec du sérum de souris ayant reçus des synoviocytes (FLS serum) ou des synoviocytes ayant internalisé des NET (FLS + NETs serum). Les flèches montrent l’emplacement des bandes difficiles à voir.

**“Comment on “Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis””**

Le sujet de cette partie est le lien entre l’immogénicité des NET et les ACPA. L’équipe de Felipe Andrade connaît bien les différents degrés de citrullination des NET<sup>53</sup>. Dans une réponse à l’article de Carmona-Rivera, il explique que la méthode utilisée pour détecter les ACPA n’est pas bonne. En effet, comme écrit en introduction de ce manuscrit, l’importance de la citrullination a été découverte en comparant du fibrinogène non-citrulliné qui n’était pas reconnu à du fibrinogène citrulliné qui était reconnu<sup>133,134</sup>. L’équipe de Kaplan n’a déposé que des peptides

citrullinés, pas des peptides non-citrullinés contrôles. Il est donc impossible de savoir si les anticorps reconnaissent spécifiquement les épitopes citrullinés, ce qui est pourtant la définition même des ACPA, ou bien si les anticorps reconnaissent des épitopes non-citrullinés. Le commentaire de l'équipe<sup>212</sup> est résumé dans la figure 25.

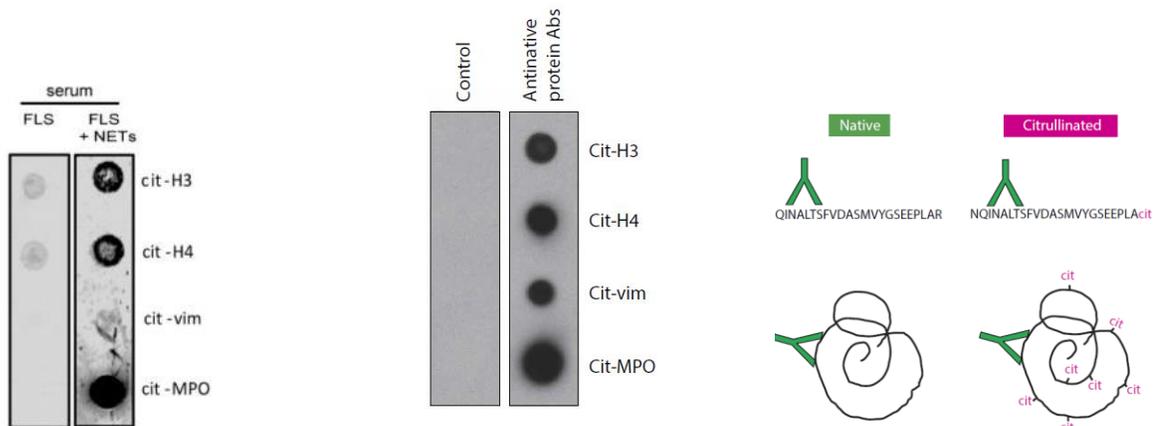


Figure 25 : Commentaire du groupe d'Andrade portant sur l'article du groupe de Kaplan. Les images au milieu et à droite proviennent de l'article de Shi<sup>212</sup> en réponse à celui de Carmona-Rivera<sup>119</sup>, duquel l'image de gauche provient. A gauche, les auteurs ont déposé des peptides citrullinés, puis ont incubé avec les sérums de souris injectés par des synoviocytes ayant internalisé des NET (*FLS* + *NETs* sur la figure). Les auteurs ont conclu à la présence d'ACPA. Au milieu, Shi et Andrade ont déposé les mêmes peptides citrullinés, mais ont incubé avec des anticorps commerciaux reconnaissant la forme non-citrullinée du peptide (*Antinative protein Abs* sur la figure). A droite, ils ont réalisé un schéma montrant qu'un anticorps peut très bien reconnaître une protéine citrullinée, mais qu'il ne doit pas pour autant être confondu avec un ACPA.

« cit » est l'abréviation de citrulliné, H3et H4 désignent les histones H3 et H4. « vim » désigne la vimentine. « MPO » désigne la myéloperoxydase.

**“Response to comment on “Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis””**

Dans leur réponse, Carmona-Rivera et ses collègues n’ont pas remis en cause l’argument de Shi et Andrade présenté ci-dessus<sup>213</sup>. Ils auraient peut-être pu tester les sérums de leur souris à la fois sur des peptides citrullinés et sur les versions non-citrullinés.

Ils ont plutôt rappelé qu’en stimulant les neutrophiles avec des facteurs rhumatoïdes, ou en stimulant les neutrophiles de faible densité avec de l’IFN- $\alpha$ , on obtient des NET contenant des protéines citrullinées. Ils ont aussi montré un sérum de patient atteint de PR qui reconnaissait spécifiquement la MPO citrullinée<sup>213</sup>.

Toutes ces données montrent que le lien entre NET et ACPA ou aux autres anticorps associés à la PR ne sont pas parfaitement établis. Nos expériences montrent le lien entre NET, anticorps anti-lactoferrine et inflammation, de manière indépendante des ACPA.

En outre, une équipe de Stanford<sup>214</sup> a étudié la capacité des histones citrullinés H2B (cH2B, de l’anglais *citrullinated H2B*) à induire la PR. Dans un modèle murin proche du nôtre, ils ont immunisé les souris avec des cH2B. Ils ont observé des anticorps anti-cH2B mais n’ont pas observé de développement d’arthrite. Selon eux, l’absence de cH2B dans l’articulation des souris empêche la formation de complexes immuns et donc l’inflammation et l’infiltration articulaire. L’immunisation de souris à la fois avec les cH2B et le collagène bovin induit une arthrite robuste. Selon les auteurs, le collagène bovin induit une réponse immunitaire systémique nécessaire. Dans notre modèle, c’est l’injection de NET dans l’articulation qui permet la formation de complexes immuns. Ces complexes immuns induisent inflammation et infiltration articulaire. Dans l’article californien, les complexes immuns anti-cH2B/cH2B induisent une sécrétion de TNF par des macrophages en stimulant conjointement le TLR4 et le récepteur Fc gamma. Les macrophages M1 sécrètent du TNF. Ces résultats sont assez proches des résultats de l’équipe chinoise<sup>215</sup> qui a montré que les anticorps lactoferrine/anti-lactoferrine polarisent les macrophages vers le phénotype M1. Il est intéressant de noter que notre laboratoire a montré que les NET contiennent des histones citrullinées<sup>118</sup>, même si nous n’avons pas montré une immunisation contre ceux-ci. En

résumé ces résultats montrent que la production d'ACPA pourrait provenir d'histones citrullinées et souligne le rôle majeur des complexes immuns dans l'initiation de l'inflammation articulaire.

## 6. Les anticorps anti-lactoferrine sont les principaux responsables de la reconnaissance de nos NET dans notre modèle

Nous avons montré que les NET sont antigéniques et pro-inflammatoires dans un modèle murin, et que la lactoferrine était une cible des anticorps générés, et probablement la protéine-cible principale contenue dans les NET dans notre modèle. L'injection des NET dans la cavité articulaire du genou des souris préalablement immunisées induit un recrutement de cellules immunitaires dans l'articulation. Les plasmas de souris immunisées reconnaissent des cibles présentes dans les liquides articulaires de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies inflammatoires.

### a) *Physiologie de la lactoferrine*

La lactoferrine est synonyme de lactotransferrine.

La lactoferrine est une protéine qui tient son nom de sa localisation et de sa fonction. Cette protéine a d'abord été découverte dans le lait. On l'a par la suite retrouvée dans la salive ou les larmes. La lactoferrine fait partie de la famille des transferrines qui sont des molécules qui transportent le fer. La lactoferrine est sécrétée par les neutrophiles dans le sang et les tissus inflammatoires<sup>216</sup>. La lactoferrine a un rôle antimicrobien, en séquestrant le fer et en déstabilisant la membrane plasmique bactérienne, et un rôle immunomodulateur<sup>217</sup>.

### b) *Relevance*

On a retrouvé de la lactoferrine dans le liquide synovial de patients atteints de PR, et on a montré qu'elle induit une survie prolongée du neutrophile due à une résistance à l'apoptose<sup>218</sup>. On peut

ainsi imaginer qu'une sécrétion excessive de lactoferrine contribue au maintien d'un nombre trop important de neutrophiles dans l'articulation, ce qui est un marqueur des maladies rhumatismales auto-immunes.

Il est amusant de noter qu'en 1978, soit 26 ans avant la redécouverte de la nétose par Brinkmann *et al.*, des auteurs ajoutaient du PMA sur des neutrophiles pas au-delà de 2h, afin de conserver des cellules viables. Ils ne pouvaient ainsi pas observer la nétose qui a lieu à partir de deux heures. En revanche ils observaient une sécrétion importante de lactoferrine<sup>219</sup>. La lactoferrine est aussi une protéine associée aux NET<sup>67,119</sup>. En outre, nos données ont aussi montré que la lactoferrine est présente dans les NET.

Dans la PR, on a démontré qu'il y avait de la lactoferrine dans les liquides synoviaux de patients PR et qu'il y en avait d'autant plus qu'il y avait de neutrophiles<sup>220</sup>. Une étude nipponne a montré que des anticorps anti-lactoferrine étaient présents chez 16,8% des patients PR<sup>221</sup>. Plus récemment, une équipe chinoise<sup>215</sup> a montré que les complexes immuns formés entre la lactoferrine et ses anticorps associés induisait un changement de phénotype des macrophages du type M2 pro-résolutif au type M1 pro-inflammatoire. Ils suggèrent que ces complexes immuns pourraient exacerber l'inflammation dans la PR.

Une étude a montré que les anticorps anti-lactoferrine ont été retrouvés dans 41% des cas d'arthrite réactionnelle, et 16% des patients atteints de spondylarthrite ankylosante<sup>222</sup>. L'arthrite réactionnelle est un rhumatisme inflammatoire particulier où la maladie se développe de manière systémique, suite à une infection localisée. Une autre étude plus récente a montré que 6,2% des patients atteints de vascularites avaient développé des anticorps anti-lactoferrine, et parmi ces vascularites seuls ceux atteints de granulomatose éosinophile avec polyangéite développaient des anticorps anti-lactoferrine. Les titres d'anti-lactoferrine étaient corrélés à la CRP et au score d'activité des vascularites de Birmingham<sup>223</sup>.

Ces données suggèrent que les anticorps anti-lactoferrine sont spécifiques de l'inflammation plutôt que de la polyarthrite rhumatoïde, à l'inverse des ACPA. Les NET pourraient être à l'origine de tous ces anticorps anti-lactoferrine dans ces maladies auto-immunes.

## 7. Conclusion

Nous avons montré que la majorité de PAD4 du neutrophile n'est pas retrouvée sur les NET. Nos NET ne contiennent pas de PAD4 ou PAD2. En outre nous avons montré que les IgG purifiées de patients anti-PAD4 et 3/4 reconnaissent PAD2 et que les anti-PAD3/4 reconnaissent aussi les NET de patients issus de patients PR. Dans notre nouveau modèle murin nous avons montré que des NET de patients PR sont antigéniques et induisaient spécifiquement des anticorps dirigés contre la lactoferrine. Nous avons montré qu'une injection intra-articulaire de NET consécutive induisait une inflammation de l'articulation spécifiquement chez les souris immunisées. Ces résultats suggèrent un lien entre NET et anticorps anti-LF chez les patients atteints de PR et d'autres maladies inflammatoires.

## 8. Perspectives

### a) *NET de souris ?*

Une limite de notre étude est que nos NET sont humains et que nous les avons injectés à des souris de fond génétique murin. Il est admis que plus une espèce est différente d'une autre, plus les protéines sont différentes et susceptibles de produire une immunisation. Néanmoins parmi toutes les bandes protéiques de nos NET visibles en SDS-PAGE, une seule a été à minima beaucoup plus immunogène que les autres. L'explication simple, basique, selon laquelle l'immunisation est uniquement due à la différence d'espèce ne saurait donc être suffisante. Néanmoins, il reste possible que les souris et les humains réagissent différemment aux NET murins et humains, et donc que les NET humains se seraient peut-être pas immunogènes chez l'homme dans ces conditions. Le plus proche de la réalité humaine serait peut-être d'utiliser des souris humanisées, pourquoi pas possédant l'épitope partagé comme l'on fait l'équipe de Kaplan<sup>119</sup>.

### b) *NET induits par ionomycine ?*

Une autre possibilité serait de changer de NET. L'équipe de Andrade a démontré que des ionophores induisaient l'hypercitruination leukotoxique, et que les neutrophiles ayant subi cette LTH relarguent ce qui s'apparente à des NET. Ils ont récemment montré<sup>224</sup> que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) est retrouvée dans la flore orale de patients PR et qu'elle induit une hypercitruination chez les neutrophiles. En effet Aa sécrète la leucotoxine A qui forme des pores dans la membrane des neutrophiles et induit l'LTH. Les auteurs ont montré que les sera de patient PR reconnaissent les NET issus de cette LTH. Ainsi l'LTH pourrait participer à l'étiologie de certaines PR<sup>224-226</sup>. L'hypercitruination augmenterait à mon sens la probabilité de voir des ACPA se développer.

**c) *NET de donneurs sains ou immunisation de lactoferrine seule ?***

Il serait intéressant de déterminer si les NET de donneurs sains induisent les mêmes phénomènes que les NET de patients PR, ou même les NET provenant de patients atteints d'autres maladies comme les vascularites ou le lupus. L'utilisation des NET provenant de neutrophiles issus des liquides synoviaux serait pertinent, une comparaison avec les NET issus de neutrophiles sanguins pourrait révéler des différences. Dans ce cas, utiliser des NET issus de nétose spontanée serait aussi pertinent. Il serait intéressant de tester l'immunisation par la lactoferrine seule et la comparer à l'immunisation de NET.

## B. Nouveaux effets immunomodulateurs du tofacitinib sur le neutrophile

### 1. Le tofacitinib n'est pas toxique sur le neutrophile

#### a) *Nos résultats*

Nous avons montré que le tofacitinib n'est pas toxique et qu'il n'active pas le neutrophile, dans une large gamme de concentrations qui encadrent largement les concentrations plasmatiques déterminées par les études pharmacocinétiques montrées dans la figure 26. En effet les neutrophiles meurent par apoptose, qu'ils aient reçu du tofacitinib ou non. Les neutropénies décrites ne sont donc pas dues à une cytotoxicité directe du tofacitinib sur le neutrophile.

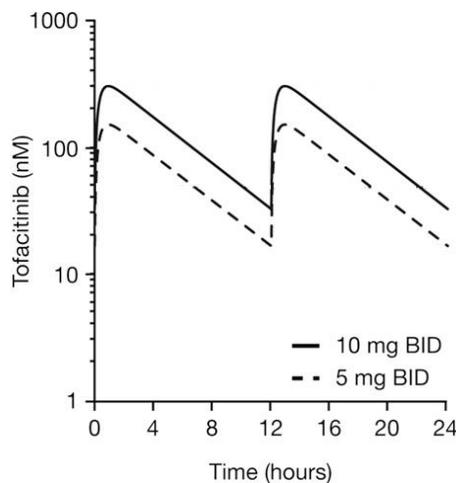


Figure 26 : Concentration plasmatique du tofacitinib chez les patients PR. A partir des données cliniques, les auteurs ont proposé ce modèle pharmacocinétique de la concentration plasmatique du tofacitinib chez des patients qui le prennent deux fois par jour, selon la dose de 5 ou 10mg. BID provient du latin *bis in die* qui signifie « deux fois par jour ». Cette figure est adaptée de l'article de Dowty<sup>207</sup>.

### b) *Résultats de la littérature*

Un article de 2017 s'est intéressé aux changements hématologiques chez les patients atteints de PR traités par tofacitinib. Cet essai regroupait les données issues de plus de 4000 patients au cours d'essais cliniques randomisés de phase 3. On observe clairement une diminution du nombre de neutrophiles sanguins, sans qu'une distinction existe entre les posologies de 5 ou 10 mg deux fois par jour. Les auteurs n'ont énoncé aucune hypothèse sur le mécanisme à l'origine de la neutropénie<sup>206</sup>. La même neutropénie est retrouvée dans deux autres essais de phase 3 publiés dans le *New England Journal of Medicine* qui comparaient les effets cliniques du tofacitinib au méthotrexate<sup>191</sup> ou à l'adalimumab<sup>192</sup>.

### c) *Implication physiopathologique*

Nous avons montré que le tofacitinib n'est pas directement toxique pour le neutrophile. Il est toutefois indiscutable que le neutrophile induise des neutropénies<sup>191,192,206</sup>. Il apparaît probable que c'est en bloquant la différenciation du neutrophile que le tofacitinib induit une neutropénie. Or comme on l'a vu en introduction, le neutrophile se différencie à partir de précurseurs dans la moelle osseuse. Ainsi, cette neutropénie pourrait être évitée en appliquant le tofacitinib de façon localisée directement dans l'articulation. Sans neutropénie le risque infectieux<sup>227,228</sup> serait fortement diminué sur le long terme. Une telle approche est néanmoins difficile étant donné l'atteinte polyarticulaire de la PR.

## 2. Nouveaux effets du tofacitinib sur l'activation du neutrophile par le GM-CSF seul

### a) *Nos résultats*

Nous avons montré que le tofacitinib bloquait l'activation du neutrophile par le GM-CSF. Avant de montrer une inhibition, il a fallu mettre en place des expériences qui reproduisent que le GM-CSF active bien le neutrophile. Nous avons bien observé que le GM-CSF induisait une sécrétion d'IL-8 du neutrophile, ainsi qu'une augmentation de l'expression membranaire des CD66b et CD11b. Sur des neutrophiles stimulés avec du GM-CSF, nous avons montré que le tofacitinib

inhibait la sécrétion d'IL-8, la surexpression membranaire du CD11b et du CD66b. Tous ces phénomènes ont été observés à la fois sur le neutrophile de donneur sains et de patient PR.

### b) ***Résultats de la littérature***

Il a été décrit dans la littérature qu'une fois que le GM-CSF se lie à son récepteur, sa voie de signalisation passe par JAK2 et STAT5<sup>173,188</sup>. Précisément sur le neutrophile, Al-Shami a montré que le GM-CSF induisait la phosphorylation de JAK2, STAT3 et STAT5b. Les autres JAK-STAT n'étaient pas phosphorylées<sup>229</sup>. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec les nôtres, en effet puisque le tofacitinib est un anti-JAK2, alors il était probable que le tofacitinib bloquât l'effet du GM-CSF.

Lorsque notre étude a commencé en 2016, aucun papier n'avait étudié l'effet du tofacitinib sur le neutrophile. On ne savait donc pas comment les neutrophiles de patients atteints de PR réagissent au tofacitinib, ni si l'effet du médicament pourrait passer par les neutrophiles, qui représentent environ 60% des leucocytes sanguins et qui sont abondamment retrouvés dans les articulations de patients. L'équipe de Helen Wright<sup>230</sup> a montré que GM-CSF retardait l'apoptose chez les neutrophiles, et que le tofacitinib tout comme le baricitinib inhibait cet effet du GM-CSF. Ces résultats montrent comme les nôtres que le tofacitinib bloque l'effet du GM-CSF sur le neutrophile de donneur sain et de patient PR. En outre, ils ont montré que le baricitinib inhibait la migration des neutrophiles au travers d'une membrane poreuse<sup>230</sup>. L'effet de sensibilisation sera discuté en aval. Makiko Furuya et ses collègues ont publié en août 2018 la première étude à s'intéresser à l'effet du tofacitinib sur le neutrophile. Ils ont montré que le GM-CSF induisait en 24h la sécrétion d'interleukine 1 *beta* (IL-1 $\beta$ ) et que le tofacitinib bloquait cette sécrétion. Ils ont montré que le GM-CSF induisait la phosphorylation de JAK2, STAT5 mais aussi STAT3, et le tofacitinib abrogeait ces phosphorylations<sup>231</sup>. Ces résultats complètent les nôtres, ils décrivent d'autres paramètres biologiques permettant de mesurer l'état d'activation du neutrophile par le GM-CSF et son inhibition par le tofacitinib. Pris ensemble, ces résultats montrent que le tofacitinib bloque évidemment l'action du GM-CSF. En outre, ce papier n'a utilisé que des neutrophiles issus de donneurs sains. Les neutrophiles de patients PR sont différents de ceux des donneurs sains, en effet l'environnement inflammatoire n'est pas le même. Nous avons pensé que tester l'effet du tofacitinib sur des neutrophiles de patients PR serait plus relevant. Nous avons

montré que les neutrophiles de patients PR réagissent pour l'essentiel de la même manière que les neutrophiles de donneurs sains.

### c) ***Implication physiopathologique***

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans le sang et l'articulation des patients atteints de PR. Une sécrétion accrue d'IL-8 induira une migration de beaucoup de leucocytes. Il est connu que de nombreux leucocytes restent dans l'articulation de patients PR. Le GM-CSF est retrouvé dans les articulations inflammées y compris celles de patient PR<sup>232</sup>. Par ce seul fait, le GM-CSF participe donc au maintien d'un nombre anormalement élevé de leucocytes dans l'articulation. Le GM-CSF joue un rôle dans la PR, et est sécrété par des cellules lymphoïdes, myéloïdes et résidentes dans l'articulation telles les fibroblastes. Physiopathologiquement il est tout à fait envisageable que le GM-CSF articulaire active les neutrophiles articulaires. Nos résultats suggèrent comment le tofacitinib pourrait limiter l'infiltration intra-articulaire. Si l'on transposait les conclusions de notre étude *in vitro* au plan clinique, alors on en déduirait que le tofacitinib donné aux patients diminue la sécrétion d'IL-8 des neutrophiles dans l'articulation, et donc une diminution du nombre et de l'activation de leucocytes, ce qui participerait à la diminution de l'inflammation, du gonflement articulaire et en conséquence une amélioration de l'état clinique. En outre, nous avons montré que le tofacitinib bloquait la surexpression membranaire du CD66b et CD11b. Ce sont des molécules d'adhérence nécessaires à la transmigration du sang vers les tissus, donc vers la capsule articulaire. Par exemple, le CD11b forme avec le CD18 Mac-1. Mac-1 joue un rôle dans la transmigration<sup>1</sup>. On peut imaginer que le GM-CSF articulaire soit retrouvé au niveau des vaisseaux sanguins environnants, augmentant la transmigration des neutrophiles, amplifiant encore la quantité de leucocytes articulaires. Là aussi le tofacitinib limiterait cette accumulation lymphocytaire intra-articulaire.

### 3. Démonstration des effets de sensibilisation du GM-CSF à un agoniste du TLR9, du TLR4 et aux NET

#### a) *Nos résultats*

Nous avons montré que le tofacitinib diminuait l'activation des neutrophiles à l'association du GM-CSF et d'un agoniste du TLR9. On peut noter que le tofacitinib ne modifie en rien la réponse au CpG seul, excluant l'hypothèse de boost de la voie de signalisation des TLR au détriment de JAK-STAT. Dans nos expériences, les ODN-CpG induisent une sécrétion faible et parfois absente, cela dépend du donneur. En revanche après prétraitement au GM-CSF, nous avons observé une forte sécrétion d'IL-8. Nous avons voulu mesurer formellement la sensibilisation, c'est-à-dire si le CpG induit une sécrétion d'IL-8 plus importante sur les neutrophiles sensibilisés par GM-CSF comparés aux neutrophiles non-sensibilisés. Rappelons la méthode : nous avons retranché la sécrétion d'IL-8 induite par le GM-CSF seul à la condition GM-CSF puis CpG. Nous avons pour cela répété les expériences et réalisé un test statistique, qui nous a permis de le démontrer. Une telle démonstration est nouvelle. C'est également la première fois que cette expérience est menée sur des neutrophiles de patients atteints de PR. On a montré que les neutrophiles cultivés sur la nuit avec du GM-CSF expriment plus de TLR9 que les témoins. Puisque le tofacitinib semble bloquer cette surexpression du TLR9, on aurait pu s'attendre à ce que l'effet du tofacitinib sur la condition GM-CSF puis CpG ait été plus grande.

De la même manière nous avons démontré que le GM-CSF sensibilise le neutrophile à répondre au LPS, un des agonistes du TLR4. Pour le démontrer, nous avons mesuré la sécrétion d'IL-8 induite par des neutrophiles stimulés pendant 4h avec du GM-CSF et l'avons comparé à des neutrophiles non-stimulés, et avons montré que les neutrophiles stimulés au GM-CSF sécrétaient plus d'IL-8 en réponse au LPS que les neutrophiles témoins. Nous avons là aussi pris soin de retrancher la quantité d'IL-8 induite par le GM-CSF seul. Cela ne veut pas dire que le LPS seul n'active pas le neutrophile. En effet on a observé que le LPS seul activait bien le neutrophile. La

sensibilisation n'est donc pas absolue mais relative. Le GM-CSF n'est pas indispensable à l'activation du neutrophile par le LPS, en revanche il augmente l'intensité de cette activation.

Nous avons également montré que le GM-CSF sensibilise les neutrophiles à répondre aux NET, de la même façon qu'il le fait pour les ligands du TLR9 et du TLR4. Ces résultats sont nouveaux.

### b) **Résultats de la littérature**

L'équipe de Hayashi<sup>174</sup> avait montré que le GM-CSF sensibilisait le neutrophile à répondre à plusieurs ligands TLR. Ils ont prétraité les neutrophiles avec du GM-CSF pendant 90min avant d'ajouter du CpG pendant une heure. Ils ont mesuré la sécrétion d'IL-8. Leurs résultats sont très proches des nôtres. Une différence mineure subsiste dans la stimulation du neutrophile par le CpG seul. Les auteurs n'ont pas montré que leur CpG seul induisait une sécrétion d'IL-8, alors que nous montrons une sécrétion fréquente et faible. Cette différence mineure peut s'expliquer par les conditions de cultures différentes ; 100ng/ml de GM-CSF pendant 4h puis 4h de CpG à 2µM pour nos conditions, contre 50ng/ml de GM-CSF pendant 90min puis 1h de CpG à 7,09 µM. En outre, Hayashi et ses collègues ont montré une augmentation de l'expression protéique du TLR9 suite à la stimulation au CpG. Néanmoins, selon leurs propres termes, l'augmentation protéique du TLR9 est faible (traduit de l'anglais *modest increase*) et ils n'ont réalisé aucun test statistique.

On peut imaginer d'autres mécanismes de signalisation. Le TLR9 est un ligand décrit comme intracellulaire, comme le TLR3, 7, et 8. Les autres TLR sont situés à la membrane plasmique<sup>87</sup>. L'effet du GM-CSF pourrait venir d'une augmentation de l'endocytose du CpG. En outre, il a été décrit que le TLR9 doit être clivé pour reconnaître le CpG dans les compartiments endosomaux<sup>179</sup>. L'hypothèse serait alors que le GM-CSF modulerait indirectement le clivage du TLR9, le rendant sensible au CpG. Une autre possibilité serait une implication d'une autre protéine de signalisation. Par exemple, une équipe a montré que le GM-CSF sensibilisait les monocytes au LPS, mais que cet effet ne passait pas par une augmentation du TLR4. A la place, le GM-CSF augmente l'expression de la kinase associée au récepteur de l'IL-1 (IRAK, de l'anglais *interleukin 1 receptor associated kinase*)<sup>233</sup>. Ainsi il apparaît hypothétique que le GM-CSF augmente ou active certaines protéines de signalisation nécessaires à la transduction du signal TLR.

Concernant le TLR4, les auteurs ont également observé que le GM-CSF sensibilisait les neutrophiles à répondre à son agoniste, au moins sur une expérience, sans le mentionner dans le corps du texte. Si l'on regarde la figure 6 de l'article, on observe que le GM-CSF induit une sécrétion d'IL-8 de moins de 5 ng/ml, quand en même temps la différence entre GM-CSF et GM-CSF puis LPS est d'environ 20 ng/ml. On peut noter qu'ils détectent beaucoup plus d'IL-8 que nous dans toutes les conditions, cela peut être expliqué en partie par des conditions différentes, et à mon avis en partie parce nous utilisons du matériel différent. En revanche les variations vont dans le même sens, nous observons les mêmes phénomènes.

De manière intéressante l'équipe d'Helen Wright<sup>230</sup> a aussi montré que le GM-CSF sensibilise les neutrophiles à répondre au N-formylméthionine-leucyl-phénylalanine (fMLP, de l'anglais *N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*). Le critère d'activation était la production de ROS. Les neutrophiles sanguins de patients PR semblaient déjà sensibilisés à la production de ROS.

### c) ***Implication physiopathologique***

Comme vu en introduction l'ADN du soi peut contenir des motifs CpG, et les patients atteints de PR ont de l'ADN circulant qui contient plus de motifs CpG que l'ADN circulant des donneurs sains<sup>183</sup>. Le GM-CSF pourrait rendre les neutrophiles de patients sensibles à l'ADN du soi riche en motifs CpG, ce qui augmenterait l'inflammation et pourrait contribuer à la rupture de la tolérance.

## 4. Nouveaux effets du tofacitinib sur les activations associées au GM-CSF

### a) ***Nos résultats***

Nous avons montré que le tofacitinib diminuait l'activation des neutrophiles aux associations GM-CSF puis aux ODN-CpG qui sont agonistes du TLR9, GM-CSF puis LPS qui est agoniste du TLR4 et GM-CSF puis NET. Ces résultats sont nouveaux. En outre nous avons montré que le tofacitinib diminue l'expression du TLR9 induite par le GM-CSF.

### b) **Résultats de la littérature**

L'équipe d'Helen Wright<sup>230</sup> a montré que le tofacitinib et le baricitinib bloquaient la sensibilisation des neutrophiles par le GM-CSF au fMLP en se basant sur la production de ROS. En outre, les auteurs ont essayé d'inverser la sensibilisation (traduit de l'anglais *re-prime*) induite par le GM-CSF. De manière étonnante, seul le baricitinib inversait cette sensibilisation, pas le tofacitinib alors que celui-ci bloquait la sensibilisation comme on vient de le voir, ce qui peut paraître contradictoire. Une description fine des mécanismes de sensibilisation et de désensibilisation me paraîtrait éclairante. En même temps, le baricitinib n'inversait pas la sensibilisation des neutrophiles de patients PR. Les auteurs proposent que cette sensibilisation *in vivo* soit due à des stimulants indépendants de JAK-STAT, sans préciser lesquels. Néanmoins on peut imaginer qu'au bout d'un certain temps la sensibilisation devienne irréversible. En résumé la production de ROS semble se comporter différemment de la sécrétion d'IL-8, de la surexpression du CD11b et du CD66b dans notre modèle.

### c) **Implication physiopathologique**

Etant donné qu'on a retrouvé plus de motifs CpG dans l'ADN libre dans le sang des patients PR comparé aux donneurs sains<sup>183</sup>, et que le GM-CSF est aussi présent et important dans cette pathologie<sup>125,169,232</sup>, alors il est possible que l'effet du tofacitinib passe par une diminution de l'activation des neutrophiles à la combinaison GM-CSF puis CpG. Le tofacitinib diminue aussi la réponse du neutrophile à l'association GM-CSF puis NET. Ainsi, puisqu'il a été décrit que les neutrophiles de patients PR nétoaient<sup>56</sup>, il est probable que le GM-CSF diminue l'activation des neutrophiles à la combinaison GMCSF puis NET *in vivo*.

Il est important de rappeler que le tofacitinib ne bloque pas complètement la sensibilisation des neutrophiles par le GM-CSF au CpG, LPS ou aux NET. Chez les patients traités par le tofacitinib, on observerait une diminution de l'inflammation plutôt qu'une abrogation.

### d) **Aperté sur la sensibilisation et le tofacitinib**

De manière étonnante, la présence de tofacitinib ne bloquait pas totalement cette sensibilisation. En effet en présence de tofacitinib, le GM-CSF conserve un effet de sensibilisation. On aurait pu s'attendre à ce que le tofacitinib bloquât totalement cette sensibilisation, puisqu'il bloque JAK2 et que l'effet du GM-CSF passe par JAK2. Plusieurs hypothèses sont envisageables.

Il est possible que le tofacitinib ne bloque pas complètement l'effet du GM-CSF. On peut le voir dans nos expériences. Si l'on regarde l'expression du CD11b et CD66b, il semble que les neutrophiles en expriment légèrement plus dans la condition GM-CSF puis tofacitinib que dans la condition milieu ou tofacitinib. En outre, le GM-CSF augmente la taille des neutrophiles, là aussi les données n'ont pas été montrées. Là aussi les neutrophiles apparaissent plus grands dans la condition GM-CSF + tofacitinib que dans la condition milieu ou tofacitinib. Dans l'article de Furuya, le GM-CSF induisait une augmentation de la transcription de l'ARNm de l'IL1 $\beta$ . Selon leurs propres termes, le tofacitinib ne pouvait pas bloquer complètement l'effet du GM-CSF (traduit de l'anglais *tofacitinib could not completely prevent GM-CSF-induced pro-IL1 $\beta$  mRNA expression*). Cet aperçu n'a pas été d'avantage discuté dans le papier<sup>231</sup>. On a vu en introduction que le tofacitinib inhibait JAK1 et 3 mieux que JAK2. Des auteurs ont souhaité étudier l'effet de l'inhibition de JAK2 sur l'hématopoïèse. Les souris JAK2 KO ne sont pas viables. En utilisant le système Cre-Lox, les auteurs ont montré que l'inhibition de plus de 90% de l'ARNm de JAK2 induit la mort de la souris. Or les anti-JAK n'induisent pas de tels événements. Le tofacitinib inhibe donc probablement partiellement JAK2. Cette inhibition partielle permettrait à certains phénomènes dépendants de JAK2 d'avoir lieu et pas d'autres. Cela expliquerait pourquoi dans nos expériences, le tofacitinib bloque la sécrétion d'IL-8 mais pas complètement la sensibilisation au CpG. En résumé, bien que l'effet du tofacitinib sur l'activation induite par le GM-CSF soit indiscutable, ces expériences soulignent que le tofacitinib ne bloque pas complètement les activations induites par le GM-CSF sur le neutrophile.

Une autre hypothèse selon moi est que le GM-CSF agirait via une autre voie de signalisation que JAK2 en parallèle, et le tofacitinib ne bloquerait que JAK2 mais pas l'autre voie de signalisation. On peut imaginer une nouvelle protéine qui s'associerait au récepteur du GM-CSF et induirait une autre voie de signalisation que JAK2. Cela reste hypothétique.

On peut noter que contrairement au tofacitinib, le baricitinib qui est un autre anti-JAK/STAT inhibe plus spécifiquement JAK2<sup>234</sup>. Il pourrait être intéressant de tester la capacité du baricitinib à bloquer la sensibilisation par le GM-CSF. En outre des expériences au laboratoire ont montrées que les neutrophiles du liquide synovial de patient PR sont plus activés que les neutrophiles sanguins. Il serait intéressant de tester directement l'effet des anti-JAK sur ces neutrophiles préactivés.

## 5. Conclusion

Nous avons montré que le tofacitinib bloque la sécrétion d'IL-8 et la surexpression membranaire du CD11b et du CD66b induites par le GM-CSF sur le neutrophile de sujet sain et de patient atteint de PR. Nous avons montré que le tofacitinib diminue la sécrétion d'IL-8 sur des neutrophiles stimulés par du GM-CSF puis des oligonucléotides riches en CpG, ainsi que l'expression du TLR9. Nous avons montré que le tofacitinib n'est pas toxique pour le neutrophile. Pris ensemble ces résultats contribuent à expliquer l'effet thérapeutique du tofacitinib sur la PR.

## 6. Perspectives

Trouver la totalité des mécanismes de la sensibilisation des neutrophiles par le GM-CSF au CpG, au LPS ou aux NET me semble la première étape. Il serait intéressant d'observer si ce mécanisme est différent entre les patients atteints de PR, les personnes saines ou d'autres maladies auto-immunes.

Sur le plan clinique, on peut réfléchir à des moyens de délivrer le tofacitinib ou même un autre traitement directement dans l'articulation. Cela permettrait de s'affranchir d'une libération systémique du tofacitinib et des effets secondaires indésirables associés, notamment la neutropénie associé à un risque accru d'infections<sup>227,228</sup>.

## C. Discussion générale

Après avoir discuté chaque partie résultats séparément, une description globale a pour objectif de souligner l'impact de ce travail de thèse sur la compréhension de la physiopathologie de la PR comme décrite dans la figure 22.

Commençons par l'autocitrullination. Cette thèse montre que les NET ne sont pas de grands pourvoyeurs de PAD4 et 2. Ces PAD se retrouvent en extracellulaire par d'autres moyens<sup>63,152</sup>. Nous avons décrit que le GM-CSF activait le neutrophile. Il est probable qu'en activant le neutrophile, le GM-CSF induise l'exposition de PAD4 à la surface du neutrophile, comme il a été montré avec d'autres stimulants<sup>152</sup>. Si tel était le cas il serait probable que le tofacitinib inhibe cette exposition à la surface de PAD4 et donc l'autocitrullination.

La question de l'autocitrullination est liée à la rupture de la tolérance dans la physiologie de la PR. Cette rupture de la tolérance induit précisément la sélection de lymphocytes T et B reconnaissant les néo-épitopes citrullinés, ce qui induit la production d'ACPA et d'anti-PAD selon le modèle de Auger<sup>160</sup>. Nous avons montré dans un modèle murin que l'immunisation par des NET induisait des anticorps anti-lactoferrine. Nous n'avons pas observé d'anticorps anti-PAD4 ou 2. Ces résultats apparaissent cohérents, puisqu'il est très peu probable qu'un organisme développe des anticorps dirigés contre un peptide auquel il n'a pas été exposé. On peut citer comme contre-argument les réactions croisées. A la suite de la lecture de l'article de Spengler qui affirmait que PAD4 et 2 étaient sur les NET, nous avons pensé que les NET pourraient induire une immunisation anti-PAD4 et 2. Nous avons un instant pensé que c'était le cas, puisque la bande reconnue était d'environ 75kDa ce qui est la taille des PAD4 et 2. La lactoferrine mesure 78kDa. Comme ces anticorps reconnaissent la lactoferrine, on peut conclure que ce ne sont pas des ACPA, puisque par définition les ACPA ne reconnaissent que les peptides citrullinés<sup>235</sup>. Le fait que les anti-lactoferrine induits par les NET dans notre modèle ne sont pas spécifiques à la PR est un argument qui va contre l'exclusivité des NET et de la PR. A mon sens on pourrait conclure à la lecture de cette thèse que ce ne sont pas les NET seuls qui induisent la production d'ACPA ou d'anti-PAD. Le fait que plusieurs types de complexes immuns activent les macrophages soutient l'hypothèse selon laquelle ce sont ces complexes immuns qui initient l'inflammation articulaire. L'état de glycosylation du fragment constant de ces complexes immuns pourraient plus ou moins activer les cellules myéloïdes.

Une fois que la polyarthrite rhumatoïde est apparue, on peut se poser la question se pose de l'action du tofacitinib. S'il a été montré que le tofacitinib bloque la communication cellulaire via de nombreuses cytokines, nous montrons son effet sur les neutrophiles. Cet effet suffirait à expliquer un effet clinique, puisque l'inhibition de la sécrétion d'IL-8 induirait une baisse de l'infiltration cellulaire, et donc une amélioration clinique. On pourrait se demander si le tofacitinib bloque la nétose. Des expériences au laboratoire non-montrés ont permis de confirmer

que le tofacitinib ne modifie pas la nétose *in vitro* induite par l'activateur de PKC, le PMA. Or *in vivo* il y a une voie de signalisation en amont de la PKC. On peut supposer que le GM-CSF ait un rôle dans l'activation au préalable du neutrophile avant une seconde stimulation physiologique induisant la nétose. Dans ce cas, le tofacitinib serait aussi un inhibiteur indirect de nétose. Cela reste hypothétique. Si l'on peut dire que le tofacitinib améliore souvent l'état clinique, il est pour l'instant difficile de dire s'il inhibe les causes l'autocitrullination ou la rupture de la tolérance.

## D. Conclusion

Pour conclure, cette thèse améliore les connaissances sur la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. Elle traite de phénomènes fondamentaux de la PR que sont l'autocitrullination. En premier lieu nous avons mis à l'épreuve l'hypothèse selon laquelle les NET contiennent suffisamment de PAD2 et 4 pour jouer un rôle dans l'autocitrullination. Nous avons montré que la quantité de PAD4 et 2 dans les NET était à minima faible, en comparant de manière originale les quantités contenues naturellement dans le neutrophile à celles qui se retrouvent sur les NET. Suite à une collaboration avec l'équipe de Baltimore nous avons montré que les anticorps de patients PR anti-PAD3/4 se lient à PAD2 et aux NET pour la première fois. Après l'autocitrullination le système immunitaire des patients atteints de PR rompt la tolérance. Puisque les NET sont souvent associés au développement des maladies auto-immunes alors nous avons testé leur antigénicité et leur arthritogénicité dans un modèle murin. Nous avons montré que les souris immunisées développent des anticorps qui reconnaissent les NET, en particulier des anticorps anti-lactoferrine. Pour cela nous avons développé un nouvel ELISA et collaboré avec la plateforme de spectrométrie de masse de l'Institut Curie. Ces anticorps sont présents dans certaines vascularites et les aggravent. Ce travail souligne le lien pour la première fois à notre connaissance entre NET et anticorps anti-lactoferrine. Une fois la maladie installée, le tofacitinib est donné aux patients en ayant fait preuve de son efficacité clinique mais sans qu'il y ait d'effet décrit sur les neutrophiles, qui constituent pourtant la majorité des leucocytes. Nous avons montré que le tofacitinib bloquait l'activation des neutrophiles par le GM-CSF, cytokine-clé de la physiopathologie de la PR. Or le neutrophile est exposé à d'autres stimulants que le seul GM-CSF, et le GM-CSF sensibilise le neutrophile à certains d'entre eux. Nous avons démontré statistiquement l'effet de sensibilisation du GM-CSF pour la première fois. En outre nous avons montré de manière novatrice que le tofacitinib inhibe l'action du GM-CSF et de ses combinaisons avec les ligands du TLR4 et 9 et des NET, expliquant en partie son efficacité thérapeutique.



# V. Bibliographie



1. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
2. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489 (2012).
3. Miller, M. & Mayo, K. Chemokines from a Structural Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2088 (2017).
4. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
5. Sahingur, S. E. & Yeudall, W. A. Chemokine Function in Periodontal Disease and Oral Cavity Cancer. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
6. Borregaard, N., Sørensen, O. E. & Theilgaard-Mönch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* **28**, 340–345 (2007).
7. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **34**, 637–650 (2011).
8. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
9. Bodey, G. P. Quantitative Relationships Between Circulating Leukocytes and Infection in Patients with Acute Leukemia. *Ann. Intern. Med.* **64**, 328 (1966).
10. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
11. Uhl, B. *et al.* Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood* **128**, 2327–2337 (2016).
12. Janela, B. *et al.* A Subset of Type I Conventional Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGF $\alpha$ -Mediated Recruitment of Neutrophils. *Immunity* **50**, 1069-1083.e8 (2019).

13. Nagata, S. & Tanaka, M. Programmed cell death and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 333–340 (2017).
14. Ribon, M., Mussard, J., Semerano, L., Singer, B. B. & Decker, P. Extracellular Chromatin Triggers Release of Soluble CEACAM8 Upon Activation of Neutrophils. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
15. Chiang, N. & Serhan, C. N. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol. Aspects Med.* **58**, 114–129 (2017).
16. Ariel, A. *et al.* Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat. Immunol.* **7**, 1209–1216 (2006).
17. Elliott, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282–286 (2009).
18. Chen, Y. *et al.* ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science* **314**, 1792–1795 (2006).
19. Ravichandran, K. S. Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways. *Immunity* **35**, 445–455 (2011).
20. Newman, S. L. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J. Exp. Med.* **156**, 430–442 (1982).
21. Savill, J. S. *et al.* Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* **83**, 865–875 (1989).
22. Saas, P., Bonnefoy, F., Toussiot, E. & Perruche, S. Harnessing Apoptotic Cell Clearance to Treat Autoimmune Arthritis. *Front. Immunol.* **8**, (2017).

23. Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C. & Kalten, J. R. Immunosuppressive effects of apoptotic cells.pdf. *Nature* **390**, 350–351 (1997).
24. Chung, E. Y. *et al.* Interleukin-10 Expression in Macrophages during Phagocytosis of Apoptotic Cells Is Mediated by Homeodomain Proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* **27**, 952–964 (2007).
25. Bonnefoy, F. *et al.* Factors Produced by Macrophages Eliminating Apoptotic Cells Demonstrate Pro-Resolutive Properties and Terminate Ongoing Inflammation. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
26. Pillay, J. *et al.* In vivo labeling with  $^2\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**, 625–627 (2010).
27. Tofts, P. S., Chevassut, T., Cutajar, M., Dowell, N. G. & Peters, A. M. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **117**, 6050–6052 (2011).
28. Dixon, G., Elks, P. M., Loynes, C. A., Whyte, M. K. B. & Renshaw, S. A. A Method for the *In Vivo* Measurement of Zebrafish Tissue Neutrophil Lifespan. *ISRN Hematol.* **2012**, 1–6 (2012).
29. Lavin, Y. *et al.* Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* **159**, 1312–1326 (2014).
30. Zimmermann, M. *et al.* Chromatin remodelling and autocrine TNF $\alpha$  are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
31. Ng, L. G., Ostuni, R. & Hidalgo, A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 255–265 (2019).
32. Chen, L. *et al.* Genetic Drivers of Epigenetic and Transcriptional Variation in Human Immune Cells. *Cell* **167**, 1398-1414.e24 (2016).

33. Martin, C. *et al.* Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence. *Immunity* **19**, 583–593 (2003).
34. Kawakami, M. *et al.* Levels of Serum Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients With Infections. *Blood* **76**, 1962–1964 (1990).
35. Marini, O. *et al.* Mature CD10<sup>+</sup> and immature CD10<sup>-</sup> neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* **129**, 1343–1356 (2017).
36. Croker, B. A. *et al.* SOCS3 Is a Critical Physiological Negative Regulator of G-CSF Signaling and Emergency Granulopoiesis. *Immunity* **20**, 153–165 (2004).
37. Manz, M. G. & Boettcher, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
38. Puellmann, K. *et al.* A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14441–14446 (2006).
39. Pillay, J. *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327–336 (2012).
40. Vono, M. *et al.* Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4<sup>+</sup> T cells in vitro and ex vivo. *Blood* **129**, 1991–2001 (2017).
41. Iking-Konert, C. 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 (2005).
42. Li, Z. *et al.* CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
43. Puga, I. *et al.* B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* **13**, 170–250 (2012).

44. Zhao, Y., Marion, T. N. & Wang, Q. Multifaceted Roles of Neutrophils in Autoimmune Diseases. *J. Immunol. Res.* **2019**, 1–2 (2019).
45. Németh, T. & Mócsai, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* **143**, 9–19 (2012).
46. Lindau, D. *et al.* TLR9 independent interferon  $\alpha$  production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 2199–2207 (2014).
47. Metchnikoff, E. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. *Libr. Académie Médecine* (1892).
48. Castagnag, M., Kaibuchi, K., Kikkawa, U. & Nishizukag, Y. Direct Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters. *J. Biol. Chem.* **257**, 7847–7851 (1982).
49. Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A. & Sendo, F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 229–240 (1996).
50. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science* **303**, 1532–1535 (2004).
51. Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C. & Zychlinsky, A. Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. *J. Vis. Exp.* (2010) doi:10.3791/1724.
52. Kenny, E. F. *et al.* Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife* **6**, (2017).

53. Konig, M. F. & Andrade, F. A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
54. Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I. & Simon, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* **16**, 1438–1444 (2009).
55. Villanueva, E. *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 538–552 (2011).
56. Khandpur, R. *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5**, 178ra40 (2013).
57. Pilszczek, F. H. *et al.* A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 7413–7425 (2010).
58. Hensen, S. M. M. & Pruijn, G. J. M. Methods for the Detection of Peptidylarginine Deiminase (PAD) Activity and Protein Citrullination. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 388–396 (2014).
59. Vossenaar, E. R., Zendman, A. J. W., van Venrooij, W. J. & Pruijn, G. J. M. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays* **25**, 1106–1118 (2003).
60. van Venrooij, W. J., van Beers, J. J. B. C. & Pruijn, G. J. M. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 391–398 (2011).
61. Corsiero, E., Pratesi, F., Prediletto, E., Bombardieri, M. & Migliorini, P. NETosis as Source of Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **7**, (2016).

62. Foulquier, C. *et al.* Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum.* **56**, 3541–3553 (2007).
63. Spengler, J. *et al.* Release of active peptidyl arginine deiminases by neutrophils can explain production of extracellular citrullinated autoantigens in RA synovial fluid. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* (2015) doi:10.1002/art.39313.
64. Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* **13**, 463–469 (2007).
65. Yipp, B. G. *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**, 1386–1393 (2012).
66. Hakkim, A. *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 75–77 (2011).
67. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **191**, 677–691 (2010).
68. Sollberger, G. *et al.* Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* **3**, eaar6689 (2018).
69. Martinod, K. *et al.* Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 8674–8679 (2013).
70. Li, P. *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **207**, 1853–1862 (2010).
71. Schauer, C. *et al.* Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* (2014) doi:10.1038/nm.3547.

72. Lood, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* **22**, 146–153 (2016).
73. Apel, F., Zychlinsky, A. & Kenny, E. F. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 467–475 (2018).
74. Goldblatt, F. & O’Neill, S. G. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. *The Lancet* **382**, 797–808 (2013).
75. Firestein, G. S. & McInnes, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* **46**, 183–196 (2017).
76. Polyarthrite rhumatoïde COFER cours complet. <http://www.lecofer.org/item-cours-1-19.php>.
77. Fautrel, B. & Gaujoux-Viala, C. Aspects médico-économiques de la polyarthrite rhumatoïde. *Bull. Académie Natl. Médecine* **196**, 1295–1306 (2012).
78. Combe, B., Lukas, C. & Morel, J. Polyarthrite rhumatoïde de l’adulte : épidémiologie, clinique et diagnostic. *EMC - Appar. Locomoteur* **10**, 1–16 (2015).
79. Steiner, G. & Smolen, J. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. **4**, 5.
80. Aletaha, D. *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* **69**, 1580–8 (2010).
81. Gaujoux-Viala, C. *et al.* Recommandations de la Société française de rhumatologie pour la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum.* **81**, 303–312 (2014).
82. Hensvold, A. H. *et al.* How well do ACPA discriminate and predict RA in the general population: a study based on 12 590 population-representative Swedish twins. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 119–125 (2017).

83. Prevoo, M. L. *et al.* Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**, 44–48 (1995).
84. Balandraud, N. *et al.* HLA-DRB1 genotypes and the risk of developing anti citrullinated protein antibody (ACPA) positive rheumatoid arthritis. *PloS One* **8**, e64108 (2013).
85. Suzuki, A. *et al.* Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **34**, 395–402 (2003).
86. Ngo, S. T., Steyn, F. J. & McCombe, P. A. Gender differences in autoimmune disease. *Front. Neuroendocrinol.* **35**, 347–369 (2014).
87. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135–145 (2001).
88. Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49–56 (2006).
89. Souyris, M. *et al.* TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. *Sci. Immunol.* **3**, eaap8855 (2018).
90. Pasare, C. & Medzhitov, R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* **438**, 364–368 (2005).
91. Kallberg, H. *et al.* Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 508–511 (2011).

92. Makrygiannakis, D. *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1488–1492 (2008).
93. Liu, X. *et al.* Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
94. Wegner, N. *et al.* Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 2662–2672 (2010).
95. Hogquist, K. A., Baldwin, T. A. & Jameson, S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 772–782 (2005).
96. Mueller, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **11**, 21–27 (2010).
97. Steinman, R. M. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.* **137**, 1142–1162 (1973).
98. Faustman, D. L. *et al.* Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 3864–3868 (1984).
99. Crowley, M. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J. Exp. Med.* **172**, 383–386 (1990).
100. Matzinger, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991–1045 (1994).
101. Ramsdell, F. & Ziegler, S. F. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 343–349 (2014).
102. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown

- of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151–64 (1995).
103. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).
104. Akkaya, B. *et al.* Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nat. Immunol.* **20**, 218–231 (2019).
105. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
106. Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. & Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* **2**, 1032–1039 (2001).
107. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* **298**, 1395–1401 (2002).
108. Takaba, H. & Takayanagi, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* **38**, 805–816 (2017).
109. Murphy, K. M., Heimberger, A. B. & Loh, D. Y. Induction by Antigen of Intrathymic Apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TCR Thymocytes in Vivo. *Science* **250**, 1720–1723 (1990).
110. Owen, D. L. *et al.* Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nat. Immunol.* **20**, 195–205 (2019).
111. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314–317 (1992).

112. Takahashi, T. *et al.* Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the fas ligand. *Cell* **76**, 969–976 (1994).
113. Fisher, G. H. *et al.* Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935–946 (1995).
114. Ju, S.-T. *et al.* Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**, 444–448 (1995).
115. Rathmell, J. C. *et al.* CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4<sup>+</sup>T cells. *Nature* **376**, 181–184 (1995).
116. McInnes, I. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2205–2224 (2011).
117. Scherer, H. U., Huizinga, T. W. J., Krönke, G., Schett, G. & Toes, R. E. M. The B cell response to citrullinated antigens in the development of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 157–169 (2018).
118. Ribon, M. *et al.* 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 (2019).
119. Carmona-Rivera, C. *et al.* Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Immunol.* **2**, eaag3358 (2017).
120. Knochelmann, H. M. *et al.* When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 458–469 (2018).
121. Notley, C. & Ehrenstein, M. The yin and yang of regulatory T cells and inflammation in RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, (2010).
122. Biton, J. *et al.* Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 3899–3910 (2011).

123. Santinon, F. *et al.* TNFR2 associates with FoxP3 stability and identifies a subset of regulatory T cells that are specifically expanded by anti-TNF treatments in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* (2019) doi:10.1002/art.41134.
124. Thiolat, A. *et al.* Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39<sup>+</sup> regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 273–283 (2014).
125. McInnes, I. B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 429–442 (2007).
126. Miller, J. How the thymus shaped immunology and beyond. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 299–304 (2019).
127. Vos, Q., Lees, A., Wu, Z.-Q., Snapper, C. M. & Mond, J. J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol. Rev.* **176**, 154–170 (2000).
128. Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546–549 (1995).
129. Ingegnoli, F., Castelli, R. & Gualtierotti, R. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. *Dis. Markers* **35**, 727–734 (2013).
130. Young, B. J. J., Mallya, R. K., Leslie, R. D. G., Clark, C. J. M. & Hamblin, T. J. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.* **2**, 97–99 (1979).
131. Simon, M. *et al.* The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called ‘antikeratin antibodies,’ autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **92**, 1387–1393 (1993).
132. Sebbag, M. *et al.* The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **95**, 2672–2679 (1995).

133. Schellekens, G. A., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., van de Putte, L. B. & van Venrooij, W. J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **101**, 273–281 (1998).
134. Masson-Bessière, C. *et al.* The Major Synovial Targets of the Rheumatoid Arthritis-Specific Antifilaggrin Autoantibodies Are Deiminated Forms of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -Chains of Fibrin. *J. Immunol.* **166**, 4177–4184 (2001).
135. Vossenaar, E. R. *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res. Ther.* **6**, 142–150 (2004).
136. Nielen, M. M. J. *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* **50**, 380–386 (2004).
137. Rantapää-Dahlqvist, S. *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis: Anti-CCP Antibody and IgA-RF Predict RA. *Arthritis Rheum.* **48**, 2741–2749 (2003).
138. Vallbracht, I. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 1079–1084 (2004).
139. Harre, U. *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* **122**, 1791–1802 (2012).
140. van Zanten, A. *et al.* Presence of anticitrullinated protein antibodies in a large population-based cohort from the Netherlands. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1184–1190 (2017).
141. Malmström, V., Catrina, A. I. & Klareskog, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 60–75 (2017).

142. Clavel, C. *et al.* Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fc $\gamma$  receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* **58**, 678–688 (2008).
143. Clavel, C., Ceccato, L., Anquetil, F., Serre, G. & Sebbag, M. Among human macrophages polarised to different phenotypes, the M-CSF-oriented cells present the highest pro-inflammatory response to the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing ACPA. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 2184–2191 (2016).
144. Laurent, L. *et al.* IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 1425–1431 (2015).
145. van der Woude, D. *et al.* Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1554–1561 (2010).
146. Dandliker, W. B. *et al.* The Effect of Chaotropic Ions on the Dissociation of Antigen-Antibody Complexes \*. *Biochemistry* **6**, 1460–1467 (1967).
147. Suwannalai, P. *et al.* Avidity maturation of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1323–1328 (2012).
148. Suwannalai, P. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies have a low avidity compared with antibodies against recall antigens. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 373–379 (2011).
149. Scally, S. W. *et al.* A molecular basis for the association of the *HLA-DRB1* locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **210**, 2569–2582 (2013).
150. Hill, J. A. *et al.* 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 (2003).

151. Pratesi, F. *et al.* Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann. Rheum. Dis.* (2013)  
doi:10.1136/annrheumdis-2012-202765.
152. Zhou, Y. *et al.* Spontaneous Secretion of the Citrullination Enzyme PAD2 and Cell Surface Exposure of PAD4 by Neutrophils. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
153. Harris, M. L. *et al.* Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 1958–1967 (2008).
154. Auger, I. *et al.* New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268 protein arrays with sera from patients with RA. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 591–594 (2009).
155. Darrah, E. *et al.* Erosive rheumatoid arthritis is associated with antibodies that activate PAD4 by increasing calcium sensitivity. *Sci. Transl. Med.* **5**, 186ra65 (2013).
156. Darrah, E. *et al.* Autoantibodies to Peptidylarginine Deiminase 2 Are Associated With Less Severe Disease in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
157. Krishnamurthy, A. *et al.* Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 721–729 (2016).
158. Andrade, F. *et al.* Autocitrullination of human peptidyl arginine deiminase type 4 regulates protein citrullination during cell activation. *Arthritis Rheum.* **62**, 1630–1640 (2010).
159. Auger, I., Martin, M., Balandraud, N. & Roudier, J. Rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to peptidyl arginine deiminase type 4 inhibit citrullination of fibrinogen. *Arthritis Rheum.* **62**, 126–131 (2010).

160. Arnoux, F. *et al.* Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E10169–E10177 (2017).
161. Chapuy-Regaud, S. *et al.* Fibrin Deimination in Synovial Tissue Is Not Specific for Rheumatoid Arthritis but Commonly Occurs during Synovitides. *J. Immunol.* **174**, 5057–5064 (2005).
162. Poubelle, P. E., Chakravarti, A., Fernandes, M. J., Doiron, K. & Marceau, A.-A. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 1–12 (2007).
163. Pagan, J. D., Kitaoka, M. & Anthony, R. M. Engineered Sialylation of Pathogenic Antibodies In Vivo Attenuates Autoimmune Disease. *Cell* **172**, 564–577.e13 (2018).
164. Scherer, H. U. *et al.* Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* **62**, 1620–1629 (2010).
165. Edwards, J. C. W., Szechinski, J., Emery, P. & Shaw, T. Efficacy of B-Cell–Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2572–2581 (2004).
166. Kerkman, P. F. *et al.* Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1170–1176 (2016).
167. Pelzek, A. J. *et al.* Persistence of Disease-Associated Anti–Citrullinated Protein Antibody–Expressing Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis in Clinical Remission. *Arthritis Rheumatol.* **69**, 1176–1186 (2017).

168. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 533–544 (2008).
169. Cornish, A. L., Campbell, I. K., McKenzie, B. S., Chatfield, S. & Wicks, I. P. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **5**, 554–559 (2009).
170. Huizinga, T. W. J. *et al.* Phase 1b randomized, double-blind study of namilumab, an anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor monoclonal antibody, in mild-to-moderate rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, (2017).
171. Hirota, K. *et al.* Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis. *Immunity* **48**, 1220-1232.e5 (2018).
172. Schwartz, D. M., Bonelli, M., Gadina, M. & O’Shea, J. J. Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 25–36 (2016).
173. Rawlings, J. S. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 1281–1283 (2004).
174. Hayashi, F., Means, T. K. & Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**, 2660–2669 (2003).
175. Eckle, T. & Eltzschig, H. K. Toll-like Receptor Signaling during Myocardial Ischemia: *Anesthesiology* **114**, 490–492 (2011).
176. Lande, R. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **449**, 564–569 (2007).
177. Yasuda, K. *et al.* Requirement for DNA CpG Content in TLR9-Dependent Dendritic Cell Activation Induced by DNA-Containing Immune Complexes. *J. Immunol.* **183**, 3109–3117 (2009).

178. Krug, A. *et al.* Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha/\beta$  in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2154–2163 (2001).
179. Park, B. *et al.* Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* **9**, 1407–1414 (2008).
180. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
181. Lindau, D. *et al.* Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur. J. Immunol.* (2013) doi:10.1002/eji.201142143.
182. Deng, G. M., Nilsson, I. M., Verdrengh, M., Collins, L. V. & Tarkowski, A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* **5**, 702–5 (1999).
183. Veiko, N. N. *et al.* Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bull. Exp. Biol. Med.* **142**, 313–316 (2006).
184. Monach, P. A. *et al.* A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15867–15872 (2009).
185. Semerano, L., Decker, P., Clavel, G. & Boissier, M.-C. Developments with investigational Janus kinase inhibitors for rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Investig. Drugs* **25**, 1355–1359 (2016).
186. Cutolo, M. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **60**, 729–735 (2001).
187. Greene, S., Watanabe, K., Braatz-Trulson, J. & Lou, L. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 861–867 (1995).

188. Winthrop, K. L. The emerging safety profile of JAK inhibitors in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 234–243 (2017).
189. Polyarthrite rhumatoïde COFER points clefs. <http://www.lecofer.org/item-cours-2-19.php>.
190. Hodge, J. A. *et al.* The mechanism of action of tofacitinib – an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **34**, 318–328 (2016).
191. Lee, E. B. *et al.* Tofacitinib versus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2377–2386 (2014).
192. van Vollenhoven, R. F. *et al.* Tofacitinib or Adalimumab versus Placebo in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 508–519 (2012).
193. Maeshima, K. *et al.* The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon- $\gamma$  and interleukin-17 production by human CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Rheum.* **64**, 1790–1798 (2012).
194. Ghoreschi, K. *et al.* Modulation of Innate and Adaptive Immune Responses by Tofacitinib (CP-690,550). *J. Immunol.* **186**, 4234–4243 (2011).
195. Beard, H. K., Ryvar, R., Skingle, J. & Greenbury, C. L. Anti-collagen antibodies in sera from rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Pathol.* **33**, 1077–1081 (1980).
196. Courtenay, J. S., Dallman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A. & Mosedale, B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* **283**, 666–668. (1980).
197. El Shikh, M. E. M. *et al.* Extracellular traps and PAD4 released by macrophages induce citrullination and auto-antibody production in autoimmune arthritis. *J. Autoimmun.* 102297 (2019) doi:10.1016/j.jaut.2019.06.008.
198. Stuart, J. M. Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* **158**, 378–392 (1983).

199. Bessis, N., Decker, P., Assier, E., Semerano, L. & Boissier, M.-C. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin. Immunopathol.* **39**, 469–486 (2017).
200. Monach, P. A., Mathis, D. & Benoist, C. The K/BxN arthritis model. *Curr. Protoc. Immunol. Ed. John E Coligan AI Chapter 15*, Unit 15.22 (2008).
201. Sakaguchi, N. *et al.* Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* **426**, 454–60 (2003).
202. Kawane, K. *et al.* Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* **443**, 998–1002 (2006).
203. Kawane, K., Tanaka, H., Kitahara, Y., Shimaoka, S. & Nagata, S. Cytokine-dependent but acquired immunity-independent arthritis caused by DNA escaped from degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 19432–19437 (2010).
204. Ito, K. HLA-DR4-IE chimeric class II transgenic, murine class II-deficient mice are susceptible to experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **183**, 2635–2644 (1996).
205. Hill, J. A. *et al.* Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J. Exp. Med.* **205**, 967–979 (2008).
206. Schulze-Koops, H. *et al.* Analysis of haematological changes in tofacitinib-treated patients with rheumatoid arthritis across phase 3 and long-term extension studies. *Rheumatology* **56**, 46–57 (2017).
207. Dowty, M. E. *et al.* Preclinical to Clinical Translation of Tofacitinib, a Janus Kinase Inhibitor, in Rheumatoid Arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **348**, 165–173 (2014).
208. Ishihama, Y. *et al.* Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein\*□S. 8.

209. Urban, C. F. *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **5**, e1000639 (2009).
210. Okubo, K. *et al.* Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine* **10**, 204–215 (2016).
211. Pagani, A., Gaeta, S., Savchenko, A. I., Williams, C. M. & Appendino, G. An improved preparation of phorbol from croton oil. *Beilstein J. Org. Chem.* **13**, 1361–1367 (2017).
212. Shi, J. & Andrade, F. Comment on “Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis”. *Sci. Immunol.* **3**, eaao6234 (2018).
213. Carmona-Rivera, C. *et al.* Response to comment on “Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis”. *Sci. Immunol.* **3**, eaar3701 (2018).
214. Sohn, D. H. *et al.* Local Joint Inflammation and Histone Citrullination in a Murine Model of the Transition From Preclinical Autoimmunity to Inflammatory Arthritis: LOCAL CITRULLINATION FACILITATES ONSET OF INFLAMMATORY ARTHRITIS. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2877–2887 (2015).
215. Gao, C.-H., Dong, H.-L., Tai, L. & Gao, X.-M. Lactoferrin-Containing Immunocomplexes Drive the Conversion of Human Macrophages from M2- into M1-like Phenotype. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
216. Siqueiros-Cendón, T. *et al.* Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**, 557–566 (2014).
217. Valenti, P. & Antonini, G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2576–2587 (2005).

218. Wong, S. H. *et al.* Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid. *Rheumatology* **48**, 39–44 (2008).
219. Wang-Iverson, P. & Cooney, M. H. Bactericidal Capacity of Phorbol Myristate Acetate-Treated Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Infect Immun* **22**, 11 (1978).
220. Bennett, R. M. & Skosey, J. L. Lactoferrin and lysozyme levels in synovial fluid. *Arthritis Rheum.* **20**, 84–90 (1977).
221. Kida, I. *et al.* Antineutrophil cytoplasmic antibodies against myeloperoxidase, proteinase 3, elastase, cathepsin G and lactoferrin in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* **21**, 43–50 (2011).
222. Loch, Skogh & Kihlstrom. Anti-lactoferrin antibodies and other types of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.* **117**, 568–573 (1999).
223. Shida, H. *et al.* The Presence of Anti-Lactoferrin Antibodies in a Subgroup of Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis Patients and Their Possible Contribution to Enhancement of Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
224. Konig, M. F. *et al.* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **8**, 369ra176-369ra176 (2016).
225. Volkov, M. *et al.* Comment on “*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* –induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis”. *Sci. Transl. Med.* **10**, ean8349 (2018).
226. Konig, M. F., Giles, J. T., Teles, R. P., Moutsopoulos, N. M. & Andrade, F. Response to comment on “*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* –induced hypercitrullination links

- periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis". *Sci. Transl. Med.* **10**, eao3031 (2018).
227. Cohen, S. *et al.* Analysis of Infections and All-Cause Mortality in Phase II, Phase III, and Long-Term Extension Studies of Tofacitinib in Patients With Rheumatoid Arthritis: All-Cause Mortality and Infection Rates in Studies of Tofacitinib. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2924–2937 (2014).
228. Winthrop, K. L. *et al.* Tuberculosis and other opportunistic infections in tofacitinib-treated patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1133–1138 (2016).
229. Al-Shami, A. & Naccache, P. H. INVOLVEMENT OF Jak2 IN THE STIMULATION OF PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE. **7**.
230. Mitchell, T. S., Moots, R. J. & Wright, H. L. Janus kinase inhibitors prevent migration of rheumatoid arthritis neutrophils towards interleukin-8, but do not inhibit priming of the respiratory burst or reactive oxygen species production: Effect of JAK inhibitors on neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.* **189**, 250–258 (2017).
231. Furuya, M. Y. *et al.* Tofacitinib inhibits granulocyte–macrophage colony-stimulating factor-induced NLRP3 inflammasome activation in human neutrophils. *Arthritis Res. Ther.* **20**, (2018).
232. Wicks, I. P. & Roberts, A. W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 37–48 (2015).
233. Adib-Conquy, M. & Cavaillon, J.-M. Gamma Interferon and Granulocyte/Monocyte Colony-stimulating Factor Prevent Endotoxin Tolerance in Human Monocytes by Promoting Interleukin-1 Receptor-associated Kinase Expression and Its Association to MyD88 and Not by Modulating TLR4 Expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 27927–27934 (2002).

234. Taylor, P. C. Clinical efficacy of launched JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **58**, i17–i26 (2019).
235. Vincent, C., Nogueira, L., Clavel, C., Sebbag, M. & Serre, G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity* **38**, 17–24 (2005).

## Résumé

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie débilitante. Biologiquement, elle est inflammatoire, auto-immune, associée à la production d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) spécifiquement, à l'infiltration dans l'articulation de globules blancs dont les neutrophiles. Sa physiopathologie est complexe et pas tout à fait déterminée, mais les données acquises ont permis de développer des traitements qui ont une efficacité certaine. Parmi eux, le tofacitinib qui inhibent les kinases Janus impliquées dans la signalisation de cytokines, impliquant de nombreuses cellules. Au début de cette thèse aucune étude sur l'effet précis du tofacitinib sur le neutrophile n'avait été publiée à ma connaissance. Nous avons comblé ce vide. Nous avons montré que le tofacitinib n'est pas toxique pour le neutrophile. Nous avons montré que le tofacitinib bloque l'activation pro-inflammatoire du neutrophile par le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF). De la même façon, le tofacitinib bloque l'activation induite par la combinaison du GM-CSF et des oligonucléotides riches en sites cytosine-phosphate-guanine déméthylés (CpG). Par ailleurs les *neutrophil extracellular traps* (NET) sont suspectés de jouer un rôle dans la physiopathologie des rhumatismes inflammatoires. Dans un modèle murin, nous avons montré que les NET de patients PR étaient antigéniques et que les anticorps générés liaient la lactoferrine. Enfin il avait été décrit que certains patients PR avaient des anticorps dirigés contre les peptidyl-arginine déiminase (PAD) 4, dont certains réagissent de manière croisée avec PAD3. Nous avons montré que ces anticorps reconnaissent aussi PAD2.

## Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a debilitating disease. Biologically, it is inflammatory, autoimmune and associated with the production of antibodies against citrullinated proteins (ACPA) specifically. Also, the disease is characterized by the infiltration of white blood cells, including neutrophils, into the joint. Its physiopathology is complex and not completely determined, but the progress done permits treatments that are definitely effective. One of them is tofacitinib, which inhibits the Janus kinases involved in cytokine signalling, involving many cells. At the beginning of this thesis, no study on the precise effect of tofacitinib on neutrophils had been published to my knowledge. We filled this gap. We showed that tofacitinib is not toxic to neutrophil. We have shown that tofacitinib blocks the pro-inflammatory activation of the neutrophil by granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). Similarly, tofacitinib blocks activation induced by the combination of GM-CSF and oligonucleotides rich in demethylated cytosine-phosphate-guanine (CpG) sites. In addition, extracellular neutrophil traps (NET) are suspected to play a role in the etiology of inflammatory rheumatism. In a mouse model, we showed that NET in RA patients is antigenic and that the antibodies generated bound to lactoferrin. Finally, it had been described that some RA patients had antibodies directed against peptidyl-arginine deiminase (PAD) 4, some of which cross-react with PAD3. We have shown that these antibodies also recognize PAD2.