



HAL
open science

Etude des mécanismes pathogéniques impliquant l'immunité innée dans les spondyloarthrites

Xavier Romand

► To cite this version:

Xavier Romand. Etude des mécanismes pathogéniques impliquant l'immunité innée dans les spondyloarthrites. Virologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. <NNT: 2022GRALV007>. <tel-03767544>

HAL Id: tel-03767544

<https://theses.hal.science/tel-03767544v1>

Submitted on 2 Sep 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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Xavier ROMAND

Thèse dirigée par **Athan BAILLET**, Université Grenoble Alpes

préparée au sein du **Laboratoire Translational Innovation in
Medicine and Complexity**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude des mécanismes pathogéniques impliquant l'immunité innée dans les spondyloarthrites

Study of pathogenic pathways involving innate immunity in spondyloarthritis

Thèse soutenue publiquement le **4 février 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur Athan BAILLET

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Madame Corinne MICELI

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, AP-HP
- Hôpital Cochin , Rapporteuse

Madame Marie-Elise TRUCHETET

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université de Bordeaux , Rapporteuse

Monsieur Daniel WENDLING

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,
université de Franche-Comté, Examineur

Monsieur Philippe GAUDIN

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble Alpes, Examineur

Monsieur Bertrand TOUSSAINT

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble Alpes, Président



REMERCIEMENTS

Comme une thèse ne se fait pas tout seul, je tiens à remercier tous ceux qui y ont contribué par leur présence, leur aide ou leur soutien.

Pour commencer, aux membres du jury :

- *Pr. Corinne Micelli-Richard* et *Pr. Marie-Elise Truchetet*, merci d'avoir accepté et pris de votre temps pour évaluer mon travail. Soyez assuré de ma reconnaissance.

- *Pr. Bertrand Toussaint* et *Pr. Daniel Wendling*, merci de me faire l'honneur d'être membre de ce jury de thèse.

- *Pr. Philippe Gaudin*, merci de ta confiance et ta bienveillance dont je profite depuis plusieurs années maintenant et qui me donnent l'opportunité de m'épanouir professionnellement.

- A mon directeur de thèse, le *Pr. Athan Baillet*, merci pour ton soutien indéfectible qui m'a permis de mener à terme ma thèse de Sciences. Merci également pour tous nos échanges et discussions enrichissantes me permettant de progresser dans la recherche et dans bien d'autres domaines. Soit assuré de ma gratitude.

Par la suite, je tiens à remercier l'ensemble de l'ex-équipe GREPI, maintenant devenue l'équipe « T-RAIG ».

Merci à *Marie-Hélène Palet*, *Bertrand Favier*, *Bernard Lardy*, *Chuong Nguyen* de m'avoir accueilli, facilité mon intégration et pour tous vos conseils fort utiles pour un clinicien. Un grand merci tout particulier à *Aurélie Bozon*, pour ton accompagnement et ton enseignement dans l'expérimentation animale et tout le reste. C'est avec grand plaisir que j'ai travaillé de nouveau à tes côtés. Merci à *Salima Kamche* pour ton aide en expérimentation animale.

Merci à toi *Bertrand Huard* pour tous tes conseils.

Mickael, ça a été un très grand plaisir de t'avoir encadré et d'avoir partagé des moments avec toi au laboratoire. Ta grande curiosité dans de nombreux domaines m'a toujours impressionné !
Sabine, merci pour le soutien que tu m'as apporté pendant cette thèse.

Merci aux équipes de la PHTA, et tout particulièrement à *Laurie* et *Maryline* pour les soins prodigués aux souris SKG et votre vigilance au quotidien.

Merci au *Pr Ranjey Thomas* et son équipe d'avoir accepté de conjuguer leurs efforts aux nôtres et d'avoir apporté leur expertise, ce qui nous a permis de conclure cette collaboration par une publication.

Je tiens également à remercier :

- *Dalil Hannani*, merci de ta gentillesse et de ta disponibilité. Les discussions qu'on a eu ensemble m'ont beaucoup aidé dans ce travail de thèse. Merci de m'avoir transmis une partie de ton savoir. Sache que je suis toujours aussi impressionné par tes qualités en tant que scientifique et que tu es une source d'inspiration pour moi.

- *Clément*, alias Mr Spermidine, ça a été une joie immense de travailler avec toi. Je me souviendrai de ces séances d'analyse de données de cytométrie en flux sur des fichiers « un peu » trop lourd tout en écoutant en fond sonore les JO 2021. Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse et la suite de ta carrière qui, j'en suis sûr, sera brillante.

- *Sylvie Berthier*, sache que je te suis très reconnaissant de toute l'aide que tu m'as apporté pour comprendre et devenir autonome dans l'utilisation du cytomètre en flux. Merci pour ton écoute et tous ces moments d'échanges qui ont été des sources de réconfort pour moi.

Evidemment, je remercie l'ensemble du service de Rhumatologie qui a pris le soin de s'organiser pour me laisser du temps afin de mener à terme cette thèse, avec une pensée toute particulière pour *Caroline*.

Et non je ne t'ai pas oublié *Chloé* ! Merci pour ton soutien durant les débuts de ma thèse ; ta gentillesse et tes bons conseils m'ont été d'une aide inestimable. Je garde pleins de bons souvenirs de notre collaboration et même des séances de ménage en culture cellulaire, c'est dire !!! Je suis heureux de continuer à travailler avec toi et j'espère que ça pourra continuer dans la durée.

A ma famille, merci d'être toujours aussi présent et du soutien que vous m'apportez au quotidien. Je vous dois beaucoup.

Et maintenant mes « trois femmes » :

- Ma puce, sans toi je ne serai jamais arrivé jusque-là. Merci d'être toujours présent à mes côtés, de me soutenir et d'être toujours une source de réconfort pour moi. Je suis tellement heureux de la famille qu'on a pu construire ensemble. Merci pour la relecture de ce travail. Je t'aime.

- Aély, alias Mimi, ton père est si fier de toi. Ta joie de vivre et tes câlins au quotidien me remplissent de joie. Pour l'instant on soigne des peluches ensemble (Mme Dr LaPeluche), peut-être qu'un jour tu deviendras Docteur mais sache que quelle que soit ton choix je serai toujours là pour te soutenir.

- Loélia, ma Nounoune, la dernière venue, ton sourire et tes rires font fondre mon cœur de Papa. Tout comme ta sœur, tu as pu participer à une thèse de ton Papa, qui sera la dernière promis ma Puce. Prends, toi aussi, le temps de bien grandir.

RESUME

Les spondyloarthrites sont des rhumatismes inflammatoires chroniques fréquents et invalidants pouvant amener à des dommages articulaires définitifs difficilement prédictibles. Les mécanismes sous tendant la rupture entre un état sain et le déclenchement de la spondyloarthrite sont à ce jour insuffisamment compris. Les données les plus récentes démontrent que la dysbiose intestinale et l'immunité innée de type 3 occupent une place déterminante dans le développement de cette maladie. Afin d'apprécier cette rupture de tolérance induite par des agents bactériens, nous avons étudié l'arthrite réactionnelle, sous-groupe de spondyloarthrites déclenchées à la suite d'une infection par un agent bactérien spécifique. L'étude du modèle murin SKG d'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia* nous a permis d'identifier que les macrophages sont à la fois impliqués dans le développement de l'arthrite médiée par le TNF- α , IL-17 et IL-23 et dans le transport de *Chlamydia* du tractus génital vers des organes périphériques où l'infection peut persister. Ce travail de thèse met en lumière que l'étude des modèles animaux amène à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans les rhumatismes inflammatoires chroniques. Un des objectifs majeurs des traitements dans la spondyloarthrite est d'améliorer la fonction du patient. Afin de faciliter l'étude de ce paramètre chez le petit animal nous proposons une nouvelle approche innovante qui permet d'évaluer efficacement le retentissement fonctionnel, en limitant les interventions humaines, grâce à des cages digitales connectées.

Il est encore difficile à ce jour de discriminer les patients à risque de développer les formes les plus sévères de SpA. L'avenir sera de mieux identifier ces patients afin de proposer une approche thérapeutique personnalisée. Au vu de l'implication de l'immunité innée dans ces rhumatismes inflammatoires, nous avons étudié l'intérêt de la calprotectine sérique (protéine S100A8/A9), alarmine excrétés par les monocytes et neutrophiles. Nous montrons que la calprotectine sérique est un biomarqueur d'activité dans les spondyloarthrites débutantes, preuve indirecte de l'implication des cellules myéloïdes dans cette pathologie. Cependant la calprotectine sérique échoue à identifier les patients à risque de progression structurale. Nous avons ensuite étudié ce biomarqueur dans les vascularites à anticorps anti-cytoplasme (ANCA) des polynucléaires neutrophiles, pathologie médiée par le neutrophile. Il s'avère que l'augmentation des taux de la calprotectine sérique pendant le traitement de maintenance de la rémission est associé au risque de survenue d'un déclin de la fonction rénal suggérant l'intérêt potentiel de ce biomarqueur dans le suivi des patients atteint par une vascularite à ANCA.

Outre l'atteinte articulaire, des atteintes cardiaques telles que des valvulopathies aortiques et des atteintes myocardiques sont rapportées dans les spondyloarthrites. A travers un travail de méta-analyse nous avons mis en évidence que la prévalence, en échographie trans-thoracique, des valvulopathies dans les spondyloarthrites axiales est comparable aux sujets sains. Il existe cependant une altération de certains paramètres en faveur d'une dysfonction ventriculaire gauche diastolique dont la signification clinique reste à préciser avant de proposer cet examen en routine. Enfin, en utilisant une approche fondée sur les preuves et un consensus d'experts, nous avons défini un ensemble de variables de base à collecter et à rapporter systématiquement après le diagnostic et pendant le suivi des spondyloarthrites axiales en pratique quotidienne.

ABSTRACT

Spondyloarthritis is a frequent and severe chronic inflammatory rheumatic disease that can lead to permanent joint damage which is difficult to predict. The mechanisms underlying the breakdown between a healthy state and the onset of spondyloarthritis are insufficiently understood. The most recent data show that intestinal dysbiosis and type 3 innate immunity play a key role in the development of this disease. In order to study this rupture of tolerance induced by bacterial agents, we studied reactive arthritis, a subgroup of spondyloarthritis triggered by a specific bacterial agent. The study of the SKG mouse model of Chlamydia-induced reactive arthritis allowed us to identify that macrophages are both involved in the development of TNF-, IL-17- and IL-23-mediated arthritis and in the transport of Chlamydia from the genital tract to peripheral organs. This thesis highlights that the study of animal models leads to a better understanding of the mechanisms involved in chronic inflammatory rheumatic diseases. One of the major objectives of treatments in spondyloarthritis is to improve the function of the patient. In order to facilitate the study of this parameter in small animals, we propose a new innovative approach that allows to efficiently evaluate the functional impact, by limiting human interventions, using digital connected cages.

It is still difficult to discriminate patients at risk of developing the most severe forms of SpA. The future will be to better identify these patients in order to propose a personalized therapeutic approach. In view of the involvement of innate immunity in these inflammatory rheumatic diseases, we studied the interest of serum calprotectin (S100A8/A9 protein), a biomarkers excreted by monocytes and neutrophils. We show that serum calprotectin is a biomarker of activity in early spondyloarthritis, providing indirect evidence of myeloid cell involvement in this disease. However, serum calprotectin fails to identify patients at risk of structural progression. We then studied this biomarker in neutrophil anti-cytoplasm antibody (ANCA) vasculitis, a neutrophil-mediated disease. We found that increased serum calprotectin levels during remission maintenance therapy is associated with the risk of a decline in renal function suggesting the potential interest of this biomarker in the follow-up of patients with ANCA vasculitis.

In addition to joint damage, cardiac damage such as aortic valve disease and myocardial injury have been described in spondyloarthritis. Through a meta-analysis, we have shown that the prevalence of valvulopathy on echocardiography in axial spondyloarthritis is comparable to healthy subjects. However, there is an alteration of certain parameters in favor of a left

ventricular diastolic dysfunction. The clinical significance remains to be clarified before proposing this examination in routine. Finally, in order to improve the management of patients with spondyloarthritis, we propose in this thesis a list of variables to be collected and reported systematically after the diagnosis and during the follow-up of axial spondyloarthritis in daily practice.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| REMERCIEMENTS | 2 |
| ABSTRACT | 7 |
| TABLE DES MATIERES | 9 |
| ABREVIATIONS | 12 |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX | 16 |
| INTRODUCTION..... | 18 |
| 1. Les spondyloarthrites, maladie fréquente et handicapante..... | 18 |
| 1.1. Le concept des spondyloarthrites..... | 18 |
| 1.2. L'enthésite, lésion élémentaire dans les spondyloarthrites et présentation clinique | 19 |
| 1.3. Manifestations extra-articulaires dans les spondyloarthrites | 21 |
| 1.3.1. L'uvéite..... | 21 |
| 1.3.2. Le psoriasis | 22 |
| 1.3.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin | 22 |
| 1.4. Spondyloarthrites et comorbidités associées..... | 22 |
| 1.5. Prise en charge des spondyloarthrites | 25 |
| 2. Les spondyloarthrites, rhumatisme inflammatoire à l'étiopathogénie encore | |
| incomplètement comprise..... | 26 |
| 2.1. Le HLA-B27, facteur génétique associé aux spondyloarthrites | 26 |
| 2.1.1. La théorie du peptide arthritogène..... | 27 |
| 2.1.2. Théorie de l'homodimérisation des chaînes lourdes | 28 |
| 2.1.3. Théorie du stress du réticulum endoplasmique | 29 |
| 2.1.4. Théorie de la sélection du microbiote intestinal..... | 31 |
| 2.2. Les spondyloarthrites, maladie auto-immune ? | 32 |
| 2.3. Les spondyloarthrites : une maladie auto-inflammatoire de l'enthèse ?..... | 35 |
| 2.3.1. Le stress mécanique des enthèses dans les spondyloarthrites | 36 |
| 2.3.2. Immunité innée et voie IL-23/IL-17 dans les spondyloarthrites | 38 |
| 2.3.3. Macrophages et spondyloarthrite..... | 41 |
| 2.3.3.1. Macrophage, cellule de l'immunité innée chef d'orchestre dans le processus | |
| inflammatoire..... | 41 |
| 2.3.3.2. Polarisation macrophagique | 42 |
| 2.3.3.3. Macrophages et spondyloarthrites | 44 |
| 2.3.4. Inflammasome et spondyloarthrites..... | 47 |
| 2.4. La calprotectine, protéine de danger aux propriétés bactéricides | 49 |
| 2.4.1. Nomenclature et structure des protéines S100 | 49 |
| 2.4.2. Fonctions extra-cellulaires..... | 51 |
| 2.4.3. Fonctions intra-cellulaires | 54 |
| 2.4.4. Fonctions antimicrobiennes | 54 |
| 2.4.5. La calprotectine dans les spondyloarthrites..... | 54 |
| 2.4.5.1. Calprotectine et inflammation dans les spondyloarthrites..... | 55 |
| 2.4.5.2. Calprotectine et prédiction de progression radiologique dans les | |
| spondyloarthrites | 58 |
| 2.5. Spondyloarthrites et microbiote : axe intestin-articulation..... | 58 |
| 3. L'arthrite réactionnelle modèle d'étude de l'interaction entre bactérie et arthrite..... | 60 |
| 3.1. Historique..... | 60 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.2. | Présentation clinique de l'arthrite réactionnelle..... | 61 |
| 3.3. | Arthrite réactionnelle une maladie rare sous diagnostiquée ?..... | 65 |
| 3.4. | Traitement de l'arthrite réactionnelle..... | 68 |
| 3.5. | Chlamydia..... | 70 |
| 3.6. | <i>Chlamydia</i> , bactérie capable de détourner le système immunitaire pour survivre | 73 |
| 3.7. | Mécanismes pathogéniques au cours de l'arthrite réactionnelle..... | 75 |
| 4. | Les souris SKG, modèle murin d'étude des spondyloarthrites | 77 |
| 4.1. | Découverte du modèle SKG par Sakaguchi..... | 78 |
| 4.2. | La mutation ZAP-70 ^{W163C} dans le modèle SKG..... | 78 |
| 4.3. | La mutation ZAP-70 ^{W163C} entraîne une sélection thymique de lymphocytes Th17 autoréactifs | 81 |
| 4.4. | Souris SKG modèle d'étude de l'impact des facteurs environnementaux sur un terrain de prédisposition génétique | 83 |
| 4.5. | Les souris SKG, modèle d'étude de l'arthrite réactionnelle à <i>Chlamydia</i> | 84 |
| | Axes et Objectifs de travail | 87 |
| | CHAPITRE 1 : LA SOURIS SKG MODELE D'ETUDE D'ARTHRITE REACTIONNELLE | 89 |
| 1. | Etude du rôle du macrophage dans l'arthrite réactionnelle..... | 89 |
| 1.1. | Introduction..... | 89 |
| 1.2. | Article 1 : Mediation of Interleukin-23 and Tumor Necrosis Factor–Driven Reactive Arthritis by Chlamydia-Infected Macrophages in SKG Mice..... | 90 |
| 1.3. | Perspectives..... | 126 |
| 2. | Etude de l'implication du neutrophile dans l'arthrite réactionnelle | 130 |
| 2.1. | Introduction..... | 130 |
| 2.2. | Matériels et méthodes | 132 |
| 2.3. | Résultats..... | 135 |
| 2.4. | Discussion..... | 140 |
| 3. | Retentissement fonctionnel de l'arthrite chez la souris SKG..... | 142 |
| 3.1. | Introduction..... | 142 |
| 3.2. | Matériel et méthodes..... | 144 |
| 3.3. | Résultats..... | 147 |
| 3.4. | Discussion..... | 151 |
| | CHAPITRE 2 : LA CALPROTECTINE SERIQUE, BIOMARQUEUR D'ACTIVITE DANS LES RHUMATISMES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES | 154 |
| 4. | La calprotectine sérique biomarqueur d'activité dans les spondyloarthrites axiales débutantes..... | 154 |
| 4.1. | Introduction..... | 154 |
| 4.2. | Article 2: Serum calprotectin is increased in early axial spondyloarthritis with sacroiliitis and objective signs of inflammation: Results from the DESIR cohort | 156 |
| | Supplementary methods | 164 |
| 5. | Calprotectine sérique et déclin de la fonction rénale dans les vascularites à ANCA. | 167 |
| 5.1. | Introduction..... | 167 |
| 5.2. | Article 3 : Serum calprotectin increase is associated with renal function decline during remission maintenance therapy in ANCA-associated vasculitides..... | 169 |
| | CHAPITRE 3 : PRISE EN CHARGE OPTIMISEE DES SPONDYLOARTHrites EN PRATIQUE CLINIQUE | 187 |
| 6. | Dépistage systématique des atteintes cardiaques dans les spondyloarthrites axiales. | 187 |
| 6.1. | Introduction..... | 187 |
| 6.2. | Article 4 : Systematic assessment of heart valves and cardiac function by echocardiography in axial spondyloarthritis: a systematic review and meta-analysis... | 188 |

| | |
|---|-----|
| 7. Données à collectées dans le cadre d'une prise en charge optimale standardisée des spondyloarthrites axiales | 227 |
| 7.1. Introduction..... | 227 |
| 7.2. Article 5 : Data to be collected for an optimal management of axial spondyloarthritis in daily practice: Proposal from evidence-based and consensual approaches..... | 228 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 246 |
| REFERENCES..... | 256 |

ABBREVIATIONS

- ACR : American College of Rheumatology
- ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease
- AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
- ANCA : Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
- ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain
- ASDAS : Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score
- ASAS : Assessment in SpondyloArthritis international Society
- ATF6 : Activating Transcription Factor 6
- BASDAI : Bath Ankylosing Spondylitis Disease Index
- BCR : B Cell Receptor
- BIP : Binding Immunoglobulin Protein
- BMP : Bone Morphogenetic Protein
- CCL : Chemokine Ligand
- CCR : C-C motif Chemokine Receptor
- CD : Cluster de Différentiation
- CIA : Arthrite Induite par le Collagène
- CAIA : Collagen Antibody-Induced Arthritis
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
- CPAF : Chlamydial Protease-like Activating Factor
- CRP : Protéine C-réactive
- CXCL : C-X-C motif Chemokine Ligand
- Da : Dalton
- DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
- Dectin 1 : Dendritic cell associated C lectin 1
- DESIR : DEvenir des Spondylarthropathies Indifférenciées Récentes
- DMARDs : Disease-Modifying Antirheumatic Drugs
- DVC : Digital ventilated cage
- ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ESSG : European Spondyloarthritis Study Group
- EULAR : European League Against Rheumatism

EVA : Echelle Visuelle Analogique
FACS : Fluorescent-Activated Cell Sorting
FPR2 : Formyl Peptide Receptor 2
GBP : Guanylate-Binding Protein
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GPA : Granulomatose avec Polyangéite
HLA : Human Leucocyte Antigen
HSP : Heat Shock Protein
HSPA 5 : Heat Shock 70 kDa Protein 5
IC95% : Intervalle de Confiance à 95%
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
IDO : Indoleamine-2,3-Dioxygenase
IFN : Interféron
IFU : Inclusion Forming Unit
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ILC : Innate Lymphoid Cells
IP : Intra-Péritonéal
IRE1 α : Inositol-Requiring 1 α
IRG : Immunity Related GTPase
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
JAK : Janus Kinase
KIR3DL2 : Killer cell Immunoglobulin-like Receptor 3DL2
LAT : Linker for Activated T cells
LILR : Leukocyte Immunoglobulin Like Receptors
LPS : Lipopolysaccharides
MCP : Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor
MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MIF : Macrophage migration Inhibitory Factor
MIP : Macrophage Inflammatory Protein
MMP : Matrix MetalloProteinase
MOMP : Major Outer Membrane Protein

MPO : Myéloperoxydase
MRP : Myeloid Related Protein
mSASSS : modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NET : Neutrophil Extracellular Traps
NF- κ B : Nuclear Factor kappa B
NK : Natural Killer
NKs : Natural Killer receptors
NLR : NOD Like Receptor
NLRP3 : NOD-Like Receptor family, Pyrin domain-containing 3
NOG : Noggin
OR : Odds Ratio
PAM : Polyangéite Microscopique
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD-L1 : Programmed cell Death protein Ligand 1
PERK : Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PLC : Phospholipase C
PNN : Polynucléaire Neutrophile
PPM1A : Protein Phosphatase Magnesium-dependant 1A
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
PRR : Pattern Recognition Receptor
PR3 : Protéinase 3
RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor- kappa B ligand
RDI : Regularity Disruption Index
RFX : Regulatory Factor X
ROR γ t : RAR related orphan receptor gamma
RR : Risque Relatif
RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
SA : Spondylarthrite Ankylosante
SH2 : Src Homology 2
SOCS : Suppressor Of Cytokine Signaling
SpA : Spondyloarthrite

SPF : Specific Pathogen Free
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
T3SE : Type III Secreted Effector protein
TACE : TNF Alpha Converting Enzyme
TCR : T Cell Receptor
TDM : Tomodensitométrie
Th : T Helper
TLR : Toll Like Receptor
Treg : lymphocyte T régulateur
UPR : Unfolded Protein Response
USF : Upstream Stimulatory Factor
TGF : Transforming Growth Factor
TNF : Tumor Necrosis Factor
VAA : Vascularite à ANCA
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
ZAP : Zeta-chain Associated Protein

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Le concept des spondyloarthrites (page 18)

Figure 2. L'enthèse (page 20)

Figure 3. Critères de classification ASAS pour les spondyloarthrites axiales (page 21)

Figure 4. Inositol-requiring protéine 1 α (IRE1 α), Protein R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), Activating transcription factor 6 (ATF6) et stress du réticulum endoplasmique (page 30)

Figure 5 : Implications possibles du HLA-B27 dans la pathogénèse de la spondylarthrite ankylosante (page 32)

Figure 6. L'inflammasome (page 48)

Figure 7. Structure de la protéine S100A8/A9 (page 51)

Tableau 1. Calprotectin fécale et identification de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin associées au spondyloarthrites (page 57)

Tableau 2. Principaux pathogènes retrouvés associés à l'arthrite réactionnelle (liste non exhaustive) (page 63)

Tableau 3. Critères de classification de l'arthrite réactionnelle retenus suite au « 4th International Workshop on Reactive Arthritis » en 1999 par American College of Rheumatology (ACR) (page 65)

Figure 8. Nombre d'articles (tout type) publiés disponibles dans Pubmed sur l'arthrite réactionnelle et la spondylarthrite ankylosante de sa création à 2020 (page 68)

Figure 9. Nombre d'articles de revue de la littérature, revue systématique de la littérature ou de méta-analyse publiés sur l'arthrite réactionnelle et la spondylarthrite ankylosante disponibles dans Pubmed de sa création jusqu'en 2020 (page 68)

Figure 10 : Cycle d'infection du *Chlamydia* (page 72)

Figure 11. ZAP-70 et transduction du signal TCR (page 80)

Figure 12. La mutation ZAP-70W163C est responsable d'une altération de la sélection de lymphocytes T (page 82)

Figure 13. L'infection génitale à *Chlamydia muridarum* induit chez la souris SKG des lésions de sacroiliite, enthésite, synovite, spondylite et de l'inflammation cutanée (page 86)

Figure 14. Les monocytes classiques pro-inflammatoires sont augmentés chez la souris SKG (page 127)

Figure 15. De l'ADN de *Chlamydia muridarum* est détecté 12 semaines après l'infection dans le côlon distal mais pas dans les trompes de Fallope, l'utérus ou la rate (page 129)

Figure 16. Déplétion des neutrophiles in vivo par un anticorps monoclonal anti-Ly6G (page 136)

Figure 17. La déplétion des neutrophiles in vivo ne prévient pas l'apparition de l'arthrite et ne modifie pas la charge bactérienne chez la souris SKG infectée par du *Chlamydia muridarum* (page 137)

Figure 18. Effet de la déplétion des neutrophiles sur la production d'anticorps anti-major outer membrane protein (MOMP) de *Chlamydia muridarum* dans le serum et sur la polarisation monocytaire (page 139)

Figure 19. L'injection de curdlan en intrapéritonéal induit une arthrite précoce et sévère chez les souris SKG (page 148)

Figure 20. Les souris SKG ont une activité nocturne importante (page 149)

Figure 21. L'arthrite induite par le curdlan est responsable d'une perte de fonction importante (page 150)

Figure 22. Les souris SKG avec arthrite induite par le curdlan développent des productions osseuses ab-articulaires (page 151)

Figure 23. Perspective de future recherche visant à évaluer l'intérêt du DVC® et de l'imagerie par contraste de phase dans l'études de modèle préclinique d'arthrite inflammatoire (page 153)

Figure 24. Les macrophages issus de la moelle osseuse des souris SKG ont une polarisation M2 préférentielle (page 248)

Figure 25. Hypothèses des mécanismes physiopathogéniques amenant à l'apparition de l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia* (page 249)

Figure 26. L'inuline stimule l'expansion dans l'intestin des lymphocytes Th17 et des CD8+ producteurs IFN- γ et a tendance à augmenter la sévérité des arthrites dans l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* (page 255)

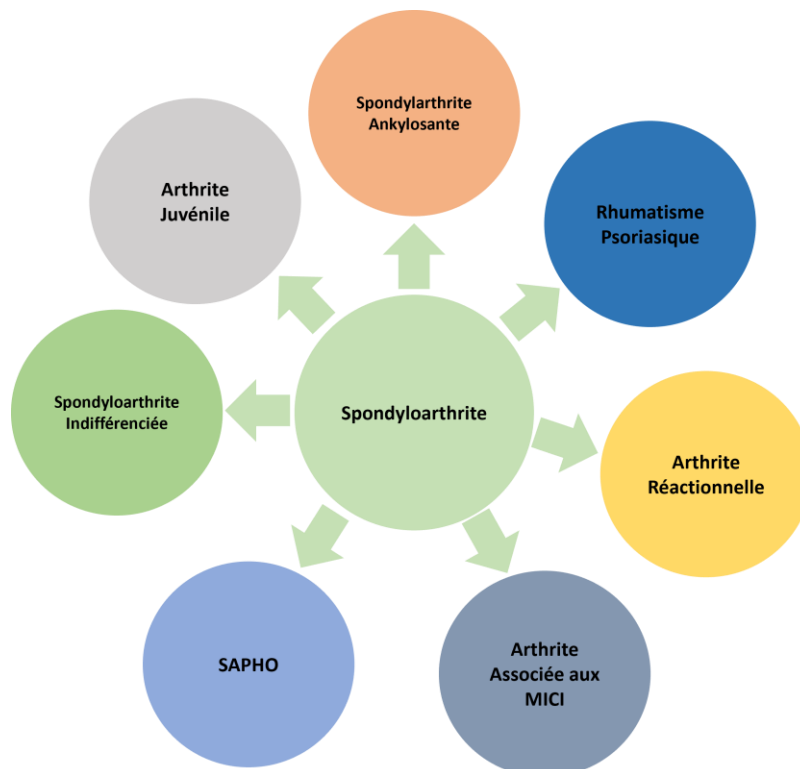
INTRODUCTION

1. Les spondyloarthrites, maladie fréquente et handicapante

1.1. Le concept des spondyloarthrites

Les spondyloarthrites (SpA) sont une entité nosologique regroupant plusieurs rhumatismes inflammatoires chroniques : spondylarthrite ankylosante (SA), rhumatisme psoriasique, arthrites associées aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), arthrite réactionnelle, Synovite Acnée Pustulose Hyperostose Ostéite, spondyloarthrite indifférenciée et un sous-groupe d'arthrite juvénile (**Figure 1**). L'ensemble de ces pathologies a été regroupé sous le terme de SpA car elles partagent des manifestations cliniques communes ainsi qu'un terrain génétique de prédisposition, l'antigène Human Leucocyte Antigen (HLA)-B27 (1). Il s'agit du 2^{ème} rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent avec une prévalence variant de 0.20% à 1.61% selon les zones géographiques d'études (2). La prévalence des SpA est plus forte en Amérique du Nord et en Europe et plus rare en Afrique et en Asie du Sud et Sud-Est (2). Les SpA se déclarent habituellement entre la fin de l'adolescence et l'âge de 45 ans. La moyenne d'âge d'apparition des premiers symptômes est de 26 ans (1).

Figure 1. Le concept des spondyloarthrites.



1.2. L'enthésite, lésion élémentaire dans les spondyloarthrites et présentation clinique

Le terme enthèse dérive du grec ancien ἔνθεσις qui signifie « insertion » (3). Il définit en anatomie la zone d'insertion des tendons et ligaments à l'os. Il existe plus d'une centaine d'enthèses dans le corps humain dont la plupart sont extra-articulaires (3). L'enthèse est une structure anatomique essentielle pour transmettre les forces biomécaniques provenant des muscles vers les os permettant ainsi les mouvements des différentes structures osseuses, base de la locomotion. Elles sont aussi impliquées, via les tendons, dans la stabilisation des structures osseuses au cours du mouvement. Ces structures sont donc fortement sollicitées par les forces biomécaniques. Les enthèses peuvent avoir une zone d'insertion large sur l'os mais ont toujours une épaisseur très limitée de l'ordre de quelques millimètres au maximum.

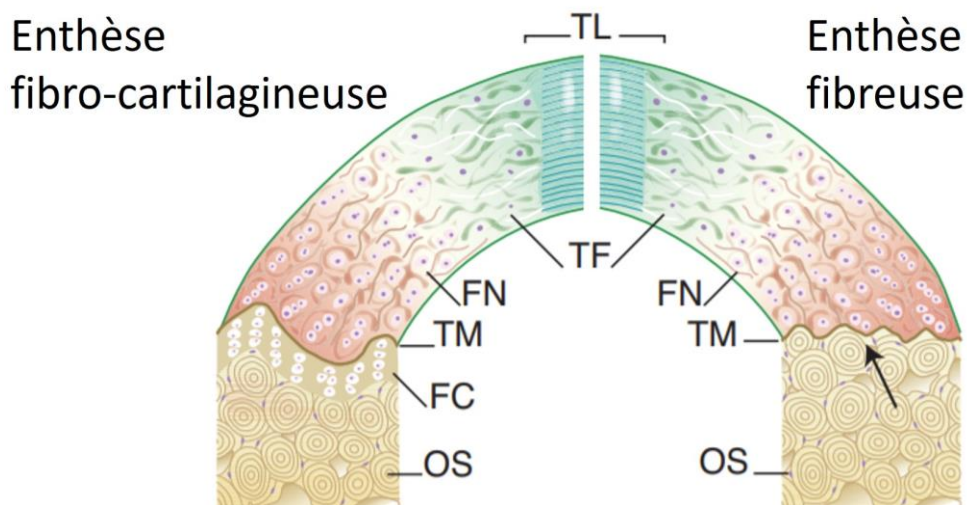
Il existe deux types d'enthèses : les enthèses fibreuses et fibro-cartilagineuses (**Figure 2**).

Les enthèses fibro-cartilagineuses, situées au niveau des épiphyses des os long et des petits os (les os du tarse et du carpe), sont constituées de quatre zones distinctes (du tendon à l'os) (4) :

- Zone fibreuse dense prolongeant le tendon, constituée de fibres de collagène orientées et séparées par un tissu conjonctif plus lâche contenant les ténocytes et un nombre variable de fibres élastiques.
- Zone fibrocartilagineuse non calcifiée, avasculaire où les ténocytes sont progressivement remplacés par des chondrocytes.
- Zone fibrocartilagineuse calcifiée, avasculaire où l'on retrouve des cristaux d'hydroxyapatite. Cette zone est séparée de façon nette de la précédente par une « ligne bleue » basophile dénommée « tidemark ».
- Zone osseuse composée d'os cortical puis trabéculaire.

Les enthèses fibreuses, quant à elles, sont retrouvées au niveau des métaphyses et diaphyses des os longs, et rattachent des muscles puissants tels que le deltoïde et le grand fessier à l'os. Ce type d'enthèse comprend uniquement une zone fibreuse dense prolongeant le tendon qui s'insère directement à l'os.

Figure 2. L'enthèse.



Représentation schématique d'une enthèse fibro-cartilagineuse et fibreuse. TL : Tendon ou Ligament, TF : Tissu conjonctif Fibreux dense, FN : Fibrocartilage Non calcifié, FC : Fibrocartilage Calcifié, OS : tissu Osseux, TM : Tide-Mark. Figures issue et adapté de Kemta Lekpa F. *et al.* (4)

L'atteinte inflammatoire élémentaire dans les SpA siège au niveau de l'enthèse (enthésite), ce qui entraîne des douleurs inflammatoires pour le patient. L'inflammation locale peut entraîner à terme des dommages irréversibles sous la forme d'érosions osseuses ou d'ossification cicatricielle de l'enthèse responsable d'une ankylose de l'articulation, alors source d'handicap pour le patient. Les SpA se caractérisent par des présentations cliniques variées combinant des symptômes pelvi-rachidiens, articulaires et enthésitiques périphériques ainsi que des manifestations extra-articulaires. L'atteinte axiale se manifeste par des dorsolombalgies et des pyralgies d'horaire inflammatoire. Ces manifestations traduisent l'inflammation survenant au niveau de l'articulation sacro-iliaque (sacro-iliite) et au niveau des enthèses du rachis (spondylite). Des oligoarthrites des grosses et moyennes articulations, prédominant aux membres inférieurs, peuvent aussi survenir. Selon le concept « synovio-enthésitique » introduit par McGonagle en 2007, il est possible que l'inflammation survenant au niveau des enthèses se propage secondairement au niveau de la membrane synoviale du fait d'une proximité et d'une interdépendance fonctionnelle de ces deux structures anatomiques (5). Des enthésites sont aussi souvent retrouvées au niveau de l'aponévrose plantaire ou du tendon calcanéen ce qui entraîne des talalgies inflammatoires.

Le diagnostic repose sur la combinaison d'arguments cliniques, biologiques et d'imagerie. La présence d'une sacro-iliite radiologique sur les radiographies standards était auparavant le critère indispensable pour retenir un diagnostic de SA (critères de New York modifiés) (6). La

radiographie standard ne permettait pas de réaliser un diagnostic précoce de la maladie car il fallait attendre que le patient développe après de nombreuses années d'évolution des lésions structurales. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a été une révolution qui a permis de diagnostiquer plus précocement les SpA en mettant en évidence l'œdème inflammatoire de l'os sous chondral survenant au niveau des sacro-iliaques, avant même que des lésions structurales se développent. Les critères de classification des SpA, actuellement utilisés au niveau international et publiés par la société ASAS (Assessment in Spondyloarthritis International Society) en 2009, utilisent l'identification d'une sacro-iliite active en IRM comme critère diagnostic (7) (**Figure 3**).

Figure 3. Critères de classification ASAS pour les spondyloarthrites axiales.

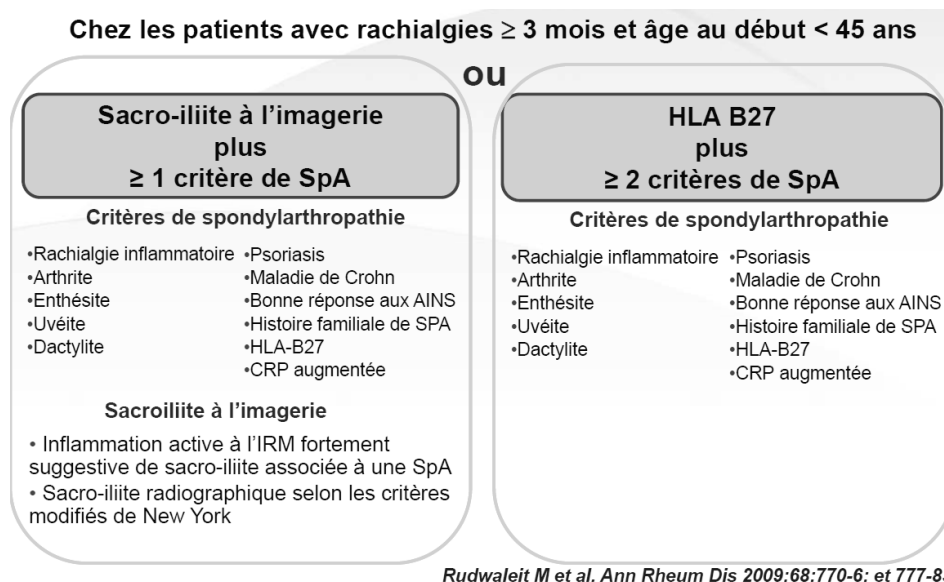


Figure adaptée de l'article de Rudwaleit *et al.* (7).

1.3. Manifestations extra-articulaires dans les spondyloarthrites

L'inflammation dans les SpA ne touche pas uniquement le complexe articulaire et ab-articulaire mais touche aussi des zones dites extra-articulaires comme les yeux (uvéites), la peau (psoriasis) et l'appareil digestif (maladie de Crohn et rectocolite ulcéro-hémorragique).

1.3.1. L'uvéite

L'uvéite est la manifestation extra-articulaire la plus fréquente dans les SpA axiales. Un patient sur quatre environ fera au moins un épisode d'uvéite dans leur vie (8). Il s'agit dans la majorité des cas d'uvéite antérieure aigue unilatérale qui peuvent entrainer à terme une baisse d'acuité visuelle (9).

1.3.2. Le psoriasis

La prévalence du psoriasis dans la SA s'élève à 10.2%. Il s'agit le plus souvent d'un psoriasis en plaque ou du cuir chevelu mais des atteintes plus discrètes comme l'onychopathie psoriasique, l'atteinte du pli interfessier, de l'ombilic ou en rétro-auriculaire ne sont pas rares et doivent être recherchées spécifiquement (8, 10).

1.3.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les patients atteints de SpA axiales sont plus sujet à développer une maladie de Crohn ou une recto-colite ulcéro-hémorragique que la population générale avec un prévalence estimée de 6,8% pour la SA (11). Les MICI sont des maladies handicapantes. Elles se manifestent par des diarrhées chroniques glairo-sanglantes se compliquant de malabsorption digestive, de fistules digestives source d'infection, de sténoses pouvant provoquer des occlusions et d'augmentation du risque de cancer colorectal du fait de l'inflammation chronique.

1.4. Spondyloarthrites et comorbidités associées

De nombreuses comorbidités sont fréquemment associées au SpA. Un travail de méta-analyse a estimé que les 5 comorbidités les plus fréquemment rencontrées dans les SpA étaient : l'hypertension artérielle (22%), les infections (18%), la dyslipidémie (17%), l'obésité (14%) et enfin les maladies cardio-vasculaires (12%) (12). Certaines sont plus fréquemment observées dans les SpA que dans la population générale : l'insuffisance cardiaque (« Odds Ratio » (OR)=1,84 (Intervalle de Confiance à 95% (IC95%) 1,25-2,73), la dépression (OR=1,80 (IC95% 1,45-2,23), l'hypertension artérielle (OR=1,58 (IC95% 1,29-1,92), l'ischémie myocardique (OR=1,51 (IC95% 1,21-1,87), les artériopathies périphériques (OR=1,47 (IC95% 1,10-1,96), les accidents vasculaires cérébraux (OR=1,30 (IC95% 1,04-1,62), le diabète (OR=1,14 (IC 95% 1,001-1,30) et les dyslipidémies (OR 1,18 (IC95% 1,01-1,39). Les comorbidités sont associées avec une maladie plus sévère, une perte de fonction et un handicap plus important, source d'absentéisme au travail et d'une moins bonne qualité de vie (12).

Une augmentation de la mortalité est rapportée dans les SpA (13-15). 30 à 40% des patients décèdent d'une maladie cardio-vasculaire ce qui en fait la première cause de mortalité dans la SA (13-15). Les facteurs de risques cardiovasculaires conventionnels, plus fréquemment observés dans les SpA, n'expliquent qu'en partie l'augmentation du risque cardiovasculaire (16).

En premier lieu, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), très largement utilisés dans les SpA, ont été les premiers suspects pour expliquer l'augmentation des événements cardiovasculaires. Les AINS sont connus pour augmenter le risque de maladie cardiovasculaire

(17-19). L'effet néfaste des AINS est moins évident dans les SpA. Une méta-analyse publiée en 2020 incluant neuf études non randomisées, n'a pas trouvé que les AINS augmentaient le risque d'évènement cardiovasculaire dans la SA. Au contraire les AINS étaient même rapportés comme protecteur de l'accident vasculaire cérébral (20). Dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), une augmentation du risque d'évènements cardio-vasculaires n'est observée qu'avec le rofecoxib, et non avec les autres AINS, médicament qui a été retiré du marché du fait notamment qu'il augmentait le risque d'infarctus du myocarde (21, 22). Les AINS ont un effet anti-inflammatoire systémique en diminuant le taux sérique des cytokines pro-inflammatoires (« Tumor Necrosis Factor » (TNF), Interleukine (IL)-6, IL-17) dans la SA (23). Certaines études retrouvent même, que dans la SA, c'est l'absence d'exposition aux AINS qui est associée à une mortalité accrue (13, 24), indiquant que le meilleur contrôle de l'inflammation systémique sous AINS aurait un effet bénéfique sur le système cardiovasculaire qui surpasserait les effets toxiques de ces médicaments (22). D'autres facteurs sont donc en jeu pour expliquer la prévalence accrue des maladies cardiovasculaires.

Il est reconnu que l'inflammation chronique a un rôle majeur dans l'initiation et l'accélération du processus d'athérosclérose. La dysfonction endothéliale est un terme utilisé pour décrire des altérations initialement réversibles de la fonction endothéliale. Cette dernière est caractérisée par une diminution des capacités de vasodilatations, une augmentation de l'expression endothéliale des molécules d'adhésions telles que « InterCellular Adhesion Molecule 1 » (ICAM-1), « Vascular Cell Adhesion Molecule 1 » (VCAM-1) et la E-selectine et une prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (25). Il s'agit du premier évènement précédant l'athérosclérose. La dysfonction endothéliale dans les rhumatismes inflammatoires chroniques n'est pas expliquée exclusivement par la présence de facteurs de risques cardiovasculaires conventionnels mais aussi par la production accrue d'espèce dérivée de l'oxygène, d'IL-1 β par les monocytes classiques et d'interféron (IFN)- γ , TNF- α et d'IL-2 par un sous type de lymphocytes T Cluster de Différenciation (CD) 4+CD28null (26). A terme, cette dysfonction endothéliale permet d'alimenter la plaque d'athérome en monocytes et lymphocytes T helper (Th) 1 et Th17 responsables de la progression de la plaque mais aussi de sa rupture à la suite de la libération de métalloprotéases déstabilisant cette dernière (27, 28). Il est fréquent de retrouver une athérosclérose infraclinique dans la SA qui pourrait amener à terme à des évènements cardiovasculaires (29). La dysfonction endothéliale ne touche pas uniquement les vaisseaux de gros et moyen calibre mais aussi la microcirculation notamment coronaire qui ne peut pas être évaluée en coronarographie standard. Pourtant les artérioles intramurales qui mesurent moins de 0,1 mm sont essentielles car elles sont responsables en très

grande partie des modulations du flux sanguin nécessaire afin de répondre à la demande métabolique du myocarde. La réserve coronaire représente la capacité maximale d'augmentation du flux sanguin coronarien en situation d'hyperhémie par rapport à l'état basal. L'existence d'une diminution de la réserve coronarienne, évaluée en échocardiographie ou en tomographie à émission de positons, est un facteur de risque important prédictif de survenue d'un évènement cardiovasculaire (respectivement $=4,58$ IC95% 3.58–5.87 et risque relatif (RR)=2.44 (95% CI 1.80–3.30)) (30). Une méta-analyse a montré que la réserve coronarienne était significativement altérée dans les rhumatismes inflammatoires chroniques (Lupus, PR, SA, Behcet, Sclérodémie systémique et Sjogren) (31). Une seule étude a évalué le flux de réserve coronarienne dans la SA par échographie trans thoracique. Dans cette étude une altération du flux coronarien de réserve était mise en évidence dans la SA dont la sévérité était corrélée avec les taux de TNF- α circulant (32). La preuve du lien entre inflammation et survenue d'évènement cardiovasculaire a été démontré dans l'essai thérapeutique CANTOS. Dans cette étude un inhibiteur de l'IL-1 β , le canakinumab, diminuait significativement la survenue d'évènement cardiovasculaire majeur chez des sujets à très haut risque (33). Cet effet de prévention des évènements cardiovasculaires a aussi été observé avec la colchicine (34). L'inflammation chronique provoque une dysfonction endothéliale, première étape amenant au développement de l'athérosclérose, responsable d'une dysfonction microcirculatoire circulaire entraînant une ischémie myocardique. La dysfonction endothéliale au cours du processus inflammatoire pourrait expliquer l'augmentation du risque d'insuffisance cardiaque et d'ischémie myocardique observé dans la SA.

Au vu de ce constat, il paraît essentiel de dépister et de prendre en charge l'ensemble de ces comorbidités. L'« European League Against Rheumatism » (EULAR) a proposé des points à considérer afin de recueillir efficacement les comorbidités, sans directives claires sur la gestion de ces comorbidités et leurs facteurs de risque, principalement parce que les recommandations nationales divergent dans les pays européens (35). En utilisant une approche fondée sur des données probantes suivies par un consensus d'experts, des lignes directrices spécifiques françaises ont été adaptées à partir des points EULAR afin d'élaborer des recommandations de dépistage et de gestion des comorbidités adaptées au rhumatologue (36). Malgré ces recommandations, l'implémentation en pratique clinique courante reste faible. Nous avons évalué que 97,8% des SpA ont au moins une recommandation non à jour et que 84,4% ont au moins une recommandation, portant sur la prise en charge des pathologies cardiovasculaires, non réalisée (37). Devant ce constat, des programmes de dépistage et de prise en charge

systematique des comorbidités ont été montés en France et notamment au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes. Ces programmes commencent à montrer leur efficacité avec notamment une réduction de près de 50% du nombre d'hospitalisation dans l'année faisant suite à cette prise en charge (38).

Il a été initialement rapporté dans la littérature que les formes anciennes de SA développaient des insuffisances aortiques, des aortites de l'aorte ascendante et des troubles de la conduction (39). A ce jour, l'intérêt du dépistage des valvulopathies et de l'insuffisance cardiaque par la réalisation d'une échographie trans-thoracique systématique n'est pas évoqué dans les recommandations européennes ou françaises (35, 36). Afin de répondre à cette question, et du fait d'une littérature discordante sur ce sujet, j'ai effectué un travail de méta-analyse visant à évaluer la prévalence des dysfonctions systoliques et diastoliques ainsi que des valvulopathies dans la SA, sans antécédent connu de maladie cardio-vasculaire. Ce travail sera présenté dans le **chapitre 3 de la thèse**.

1.5. Prise en charge des spondyloarthrites

L'objectif thérapeutique principal, défini dans les recommandations françaises de prise en charge des SpA, est « d'améliorer la qualité de vie, de contrôler les symptômes et l'inflammation, de prévenir les dommages structuraux, de préserver ou restaurer les capacités fonctionnelles, l'autonomie et la participation sociale des patients » (40) . Afin d'atteindre ces objectifs, de nombreux scores ont été construits afin de juger de l'activité du rhumatisme et son retentissement sur la fonction et la qualité de vie du patient. Les scores composites d'activité (« Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index » (BASDAI), « Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score » (ASDAS)) sont utilisés en recherche et en pratique clinique afin de déterminer l'activité du rhumatisme pouvant amener à des adaptations thérapeutiques.

Les AINS sont le traitement de première ligne des SpA. Dans les formes périphériques un traitement de fond conventionnel synthétique (csDMARDs, « conventional synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs » : méthotrexate, sulfasalazine, léflunomide) et/ou des infiltrations locales articulaires de corticoïdes peuvent être proposés en cas d'inefficacité. Les biothérapies, apparues dans le début des années 2000, ont révolutionné la prise en charge des SpA. Ces anticorps monoclonaux et récepteurs solubles ont été construits pour inhiber initialement le TNF- α puis d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17 et l'IL-23.

Plus récemment, de petites molécules solubles inhibant la voie des Janus Kinase (JAK), ont démontré leur efficacité dans les SpA axiales et ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché peuvent maintenant être utilisées en clinique (41-43). Ces traitements, maintenant bien implémentés dans la pratique quotidienne des rhumatologues, sont prescrits en cas d'échec des traitements précédemment cités.

Outre les scores composites d'activité (ASDAS et BASDAI) qui sont utilisés en pratique courante et mentionnés dans les recommandations de prise en charge des SpA, les rhumatologues ont de nombreux autres outils pour évaluer plusieurs composantes du rhumatisme (interrogatoire, auto-questionnaires, examen physique, imagerie, biologie ...). Ce nombre de paramètres possible à évaluer est important et entraîne donc des divergences dans l'évaluation au diagnostic et pendant le suivi des patients atteint de SpA axiale. La standardisation de la prise en charge du diabète via la réalisation d'une revue systématique de paramètres au moment du diagnostic (« revue systématique initiale ») et au cours du suivi (« revue systématique périodique ») a montré son intérêt et est implémenté depuis des années en pratique clinique. Ces constatations préliminaires ont amené à lancer une initiative visant à proposer une liste de variables à collecter et à rapporter systématiquement juste après le diagnostic et pendant le suivi chez les patients souffrant de SpA axiale dans la pratique quotidienne. J'ai réalisé une revue systématique de la littérature, visant à évaluer l'intérêt des examens d'imagerie et de biologie dans les SpA axiales, qui a été présenté au cours des Rencontres d'Experts en Rhumatologie. Ce travail s'est finalisé par la publication d'un article recensant l'ensemble des variables à recueillir dans la SpA. Cet article sera présenté dans le **chapitre 3 de la thèse**.

2. Les spondyloarthrites, rhumatisme inflammatoire à l'étiopathogénie encore incomplètement comprise

Malgré de nombreuses années de recherche, la physiopathologie exacte des SpA n'est, à ce jour, pas connue. Le modèle physiopathologique expliquant actuellement la survenue des SpA combine des facteurs génétiques, le stress mécanique, des facteurs environnementaux et des modifications du microbiote digestives qui vont influencer l'immunité innée responsable des manifestations rhumatologiques.

2.1. Le HLA-B27, facteur génétique associé aux spondyloarthrites

Très rapidement l'observation de l'agrégation de cas familiaux dans les SpA a fait évoquer une origine génétique à cette maladie. Ainsi, 75,0 % des jumeaux monozygotes développent simultanément une SA contre 12,5% pour des jumeaux dizygotes (44). Une étude menée en Islande a montré qu'il existait un sur-risque de développer une SA pour les descendants au 1^{er} degré (RR=75,5 ; IC95% (60,2-93,9)), 2^{ème} degré (RR=20,2 ; IC95% (15,2-30,2)) et jusqu'au 3^{ème} degré (RR=3,5 ; IC95% (2,2-5,7)) (45). Ces données montrent qu'il existe une héritabilité non négligeable dans les SpA.

En 1973, Caffre et James ont mis en évidence que la SA était fortement associée à un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH), l'antigène HLA-B27 (46, 47). Cet antigène est codé par le locus B de la région du complexe majeur d'histocompatibilité situé sur le chromosome 6 (48). Il est composé d'une chaîne lourde alpha et d'une chaîne légère la β 2 microglobuline et est exprimé dans toutes les cellules nucléées (48). Les domaines α 1 et α 2 de la chaîne lourde forment une poche qui peut contenir un peptide antigénique à présenter aux lymphocytes T cytotoxiques CD8+.

Environ 90% des sujets atteints de SA sont HLA-B27 positifs contrastant avec une prévalence estimée de 8% dans la population caucasienne. L'association entre HLA-B27 et SpA est la plus forte association génétique connue liant un allèle HLA à une pathologie humaine (49). Un patient HLA-B27 positif développera dans 1% à 5% des cas une SpA, ce risque augmentant à 15-20% si un parent du premier degré est affecté. Une étude réalisée en France a estimé que le risque de développer une SpA pouvait même être multiplié par 39 chez les patients HLA-B27+ (50).

Afin d'explorer l'implication du HLA-B27 dans le développement des SpA, des rats transgéniques sur-exprimant le HLA-B27 et la bêta-2 microglobuline humaine ont été produits. Ces rats transgéniques développent des arthrites périphériques, des spondylites et une inflammation chronique de l'intestin prédominant au colon, mimant les manifestations des SpA observées chez les patients (51).

Plusieurs hypothèses physiopathologiques ont donc été avancées pour expliquer la survenue des SpA chez les patients HLA-B27 positifs (52). A ce jour, le rôle exact du HLA-B27 dans la pathogénèse des SpA reste encore incertain.

2.1.1. La théorie du peptide arthritogène

La fonction primaire du HLA-B27 est de présenter des courtes séquences antigéniques aux lymphocytes T cytotoxiques CD8+ permettant de reconnaître le soi du non-soi. Très rapidement

la première hypothèse émise a été la théorie du peptide arthritogène. Cette théorie est basée sur le fait que le HLA-B27 reconnaît spécifiquement des antigènes du soi ou microbien présentant une certaine homologie avec des protéines du soi (mimétisme moléculaire). Ainsi, la présentation de ces antigènes sélectionnerait des lymphocytes T CD8+ spécifiques auto-réactifs qui exerceraient leurs propriétés cytotoxiques directement dans l'articulation, d'où la dénomination de peptide arthritogène.

Plusieurs constatations ont alimenté cette hypothèse. Tout d'abord a été observé que des infections bactériennes intracellulaires digestives (*Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*) ou génito-urinaires (*Chlamydia trachomatis*), survenant chez des patients HLA-B27 positifs, amenaient au développement d'une forme de SpA, l'arthrite réactionnelle. Des lymphocytes CD8+ reconnaissant spécifiquement des antigènes spécifiques de *Chlamydia* ou de *Yersinia* présentés par le HLA-B27 infiltrèrent les articulations des patients atteints d'arthrite réactionnelle (53-55). Au cours de l'infection à *C. trachomatis* un épitope bactérien, l'ADN primase, est appréhendé puis présenté par le HLA-B27. Or, il s'avère que cet épitope partage une forte homologie avec des protéines du soi, elles aussi connues pour être des ligands naturels du HLA-B27, laissant suspecter le déclenchement d'une réaction auto-immune par mimétisme moléculaire (56). Les lymphocytes CD8+ infiltrèrent les enthèses et les articulations des patients atteints de SA (57, 58) et certains ont une auto-réactivité dirigée contre les protéines du soi provenant du cartilage (collagène II, collagène VI) (59, 60).

Cependant, l'inactivation du gène CD8a ou la déplétion de lymphocytes CD8+ dans le modèle de rat transgénique HLA-B27/ β 2microglobuline n'affecte pas l'apparition et la sévérité de la SpA. Cela suggère que les lymphocytes T CD8+ ne sont pas essentiels dans la physiopathogénèse de cette maladie (61, 62). De plus les allotypes HLA-B27 associés à la SA, malgré des changements d'acide aminé dans la poche de liaison à l'antigène, n'ont pas une préférence absolue de liaison pour une séquence peptidique particulière (63).

Une origine bactérienne de ce peptide arthritogène, qui aurait une homologie avec des protéines du soi, semblait donc probable. Malgré de nombreuses études sur le sujet, aucune donnée convaincante n'a établi l'existence d'une séquence peptidique responsable spécifiquement de l'arthrite.

2.1.2. Théorie de l'homodimérisation des chaînes lourdes

Le HLA-B27 a un résidu cystéine en position 67, situé dans la poche B, qui a tendance à donner des versions mal repliées du HLA-B27. Ainsi, au cours de la formation et du recyclage du HLA B-27, des chaînes lourdes libres ou des homodimères de chaîne lourde peuvent se constituer

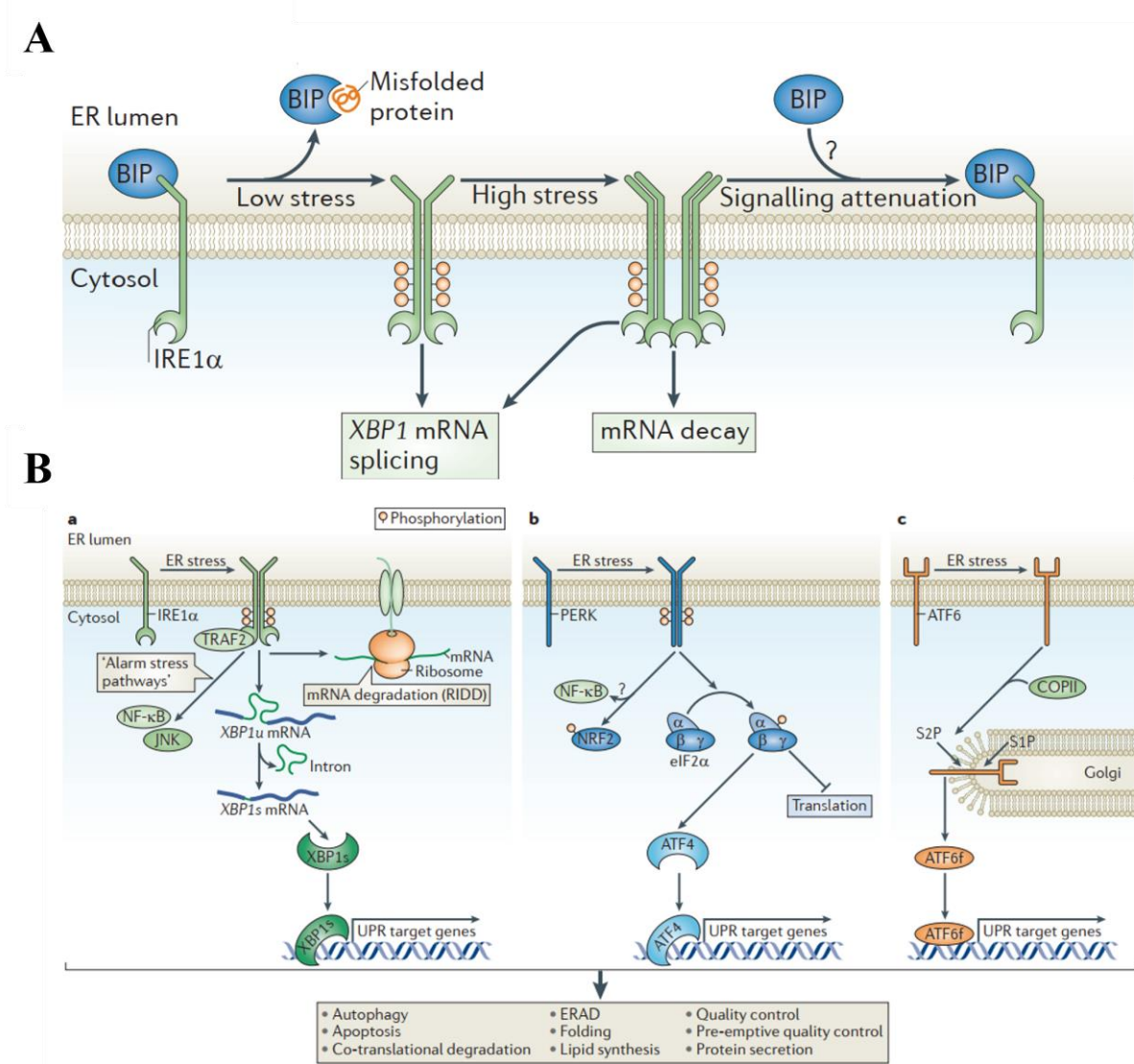
(47, 64). Ces homodimères d'HLA-B27 et les chaînes lourdes libres se retrouvent alors exprimés à la surface de la cellule entraînant une activation de cellules « Natural Killer » (NK) et des lymphocytes Th17 (65, 66). Le récepteur « Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL2 » (KIR3DL2) a une haute affinité pour ces homodimères de HLA-B27 (65). KIR3DL2 est d'ailleurs sur-exprimé par les cellules NK et les lymphocytes CD4+ chez les patients atteints de SpA (67). La majorité des lymphocytes Th17 expriment à leur surface le KIR3DL2, récepteur qui induit une sécrétion d'IL-17, cytokine responsable des manifestations articulaires dans les SpA, une fois lié aux homodimères B27 (68, 69). Les « leukocyte immunoglobulin-like receptors » (LILR) A1, B2 et B5 reconnaissent aussi les homodimères B27 et les chaînes lourdes (49). Ces récepteurs sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires (neutrophiles, éosinophiles, macrophages, cellules dendritiques, NK, lymphocytes T et B...) et sont connus pour être impliqués dans la modulation de nombreuses fonctions immunitaires (production cytokinique et d'anticorps, présentation d'antigène...) (70). Néanmoins, le lien entre l'interaction de LILR avec les homodimères B27 et le déclenchement de la réaction inflammatoire responsable de l'arthrite n'est pas clairement démontré (49).

2.1.3. Théorie du stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est un organite intra-cellulaire des cellules eucaryotes situé à proximité du noyau impliqué dans la synthèse, la modification, le repliement et le contrôle « qualité » des protéines. Les protéines ne répondant pas aux exigences de qualité sont alors dégradées par la voie du protéasome. Le réticulum endoplasmique peut être soumis à un stress s'il voit survenir l'accumulation de protéines en son sein, entraînant le dépassement de ses capacités à répondre à cette sollicitation. Ce stress peut être produit en cas d'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique occasionnant une réponse des protéines mal repliées (« unfolded protein response » (UPR)) visant à ramener la cellule dans des conditions homéostatiques. Le HLA-B27, comparé à d'autres antigènes du CMH, est connu pour se replier lentement amenant à une mauvaise conformation. Par ces propriétés, le HLA-B27 s'accumule en grande quantité dans le réticulum endoplasmique et entraîne une réponse UPR. La réponse UPR est initiée par des capteurs de stress qui sont la protéine « inositol-requiring 1 α » (IRE1 α), la « Protein R-like endoplasmic reticulum kinase » (PERK) et « activating transcription factor 6 » (ATF6). Dans des conditions physiologiques « Binding Immunoglobulin Protein » (BIP, aussi appelée « Heat Shock 70 kDa Protein 5 (HSPA5)») est associé IRE1 α ce qui permet de réprimer son activité. Dans des conditions de stress, BIP se dissocie de IRE1 α pour se fixer à des protéines mal repliées. Ainsi, IRE1 α se dimérise et se

phosphoryle pour induire une cascade d'activation complexe conduisant à la transcription de gènes spécifiques de la réponse UPR (71) (**Figure 4**).

Figure 4. Inositol-requiring protéine 1 α (IRE1 α), Protein R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), Activating transcription factor 6 (ATF6) et stress du réticulum endoplasmique



A-IRE1 α est inactivé quand il est associé à Binding Immunoglobulin Protein (BIP). L'accumulation de protéines mal repliées (« Misfolded protein ») entraîne une dissociation de BIP afin que ce dernier se fixe aux protéines mal repliées. IRE1 α forme des homodimères et est phosphorylé induisant son activation. IRE1 α est ensuite responsable d'un épissage non conventionnel de l'ARNm de « X box-binding protein 1 » (sXBP1), facteur de transcription impliqué dans la réponse UPR.

B- IRE1 α , PERK et ATF6 sont des capteurs de stress entraînant l'activation des facteurs de transcriptions sXBP1, ATF4 et ATF6f impliqués dans la transcription des gènes impliqués dans la réponse aux protéines mal repliées (Unfolded Protein Response, UPR). IRE1 α peut activer le facteur de transcription NF- κ B.

Figure issue de l'article de Claudio Hetz (71).

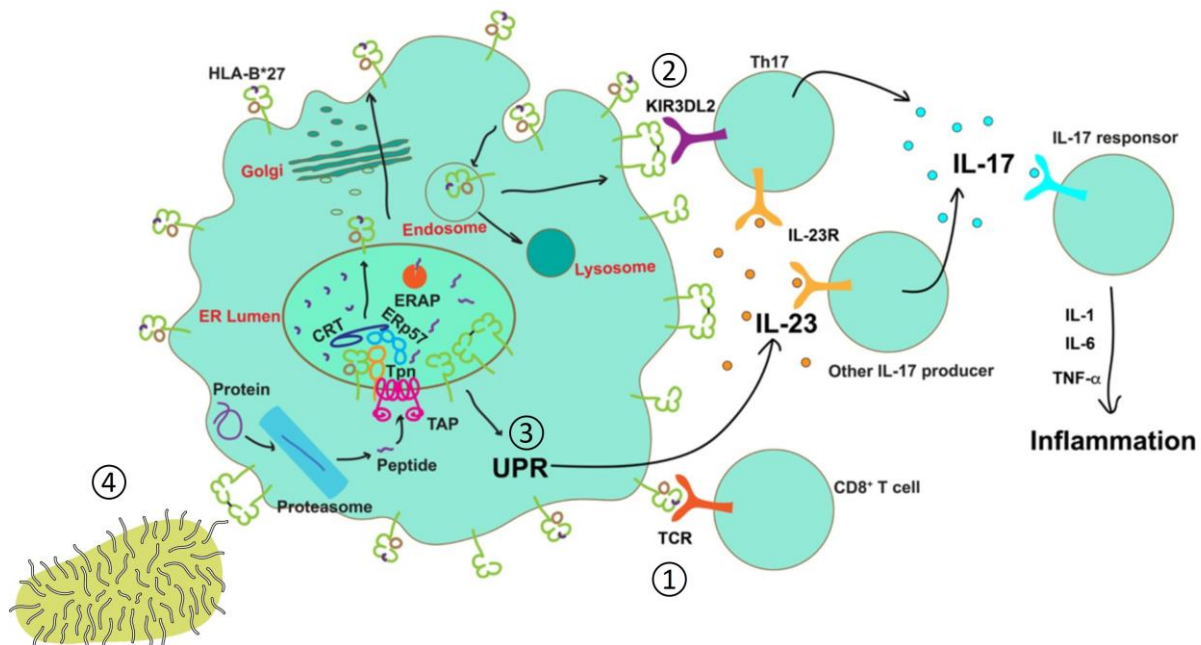
IRE1 α et ATF6 sont capables d'activer notamment le facteur de transcription NF- κ B, impliqué dans la polarisation M1 des macrophages, et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et IL-1 β (72). Le stress du réticulum endoplasmique engendre l'activation de l'inflammasome «NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3» (NLRP3) via la réponse UPR mais aussi via la génération de dérivés réactifs de l'oxygène, de la modification des flux calciques et du métabolisme des stérols (73). Une activation UPR par le mauvais repliement de l'antigène HLA-B27 entraîne une production accrue d'IL-23 par les macrophages dans les modèles animaux de rats transgéniques surexprimant de nombreuses copies d'HLA-B27 et de beta microglobuline humaine (74, 75). La démonstration de l'existence d'un stress du réticulum endoplasmique peine à être démontrée chez l'homme. L'accumulation de protéines HLA B-27 mal repliées dans le réticulum endoplasmique ne semble pas, contrairement à ce qui est observé dans les modèles animaux, induire un stress du réticulum endoplasmique associée à une réponse UPR dans le tissu synovial des patients atteint de SA (76). Le stress du réticulum endoplasmique ou l'activation de la voie UPR n'est pas retrouvée non plus dans les macrophages des patients HLA-B27 et n'explique pas la production accrue de TNF, IL-23, IL-12, IL-10 et de « C-X-C Motif Chemokine Ligand » (CXCL) 9 (77, 78). Certaines données suggèrent même que la production d'IL-23 dans les SpA au niveau de l'intestin est plutôt sous la dépendance de l'autophagie que de la réponse UPR (79).

2.1.4. Théorie de la sélection du microbiote intestinal

Une des dernières hypothèses à mentionner est que le HLA-B27 pourrait favoriser la sélection d'un microbiote intestinal qui favoriserait le déclenchement de la SpA. Les rats transgéniques HLA-B27 ne déclenchent pas d'arthrite dans un environnement dépourvu de germes (« germ free »). Dans des conditions d'élevages exemptes de pathogènes spécifiques (« Specific Pathogen Free » (SPF)), ces rats développent spontanément des manifestations de SpA avec une inflammation colique associée à une altération de leur composition de leur microbiote cœcal (80). Les résultats de plusieurs équipes suggèrent que le HLA-B27 influence la sélection du microbiote digestif chez les sujets sains ce qui pourrait expliquer la dysbiose observée dans la

SA (81, 82). Les mécanismes reliant l'existence d'une dysbiose et les SpA sont développées dans **la partie 2.5**

Figure 5 : Implications possibles du HLA-B27 dans la pathogénèse de la spondylarthrite ankylosante.



1- Théorie du peptide arthritogène : le HLA-B27, chargé de néoantigènes présentant une homologie avec des protéines du soi, est acheminé à la surface des cellules et induit l'activation des cellules T CD8+. 2- Théorie de l'homodimérisation des chaînes lourdes : des chaînes lourdes libres ou des homodimères de HLA-B27 se retrouvent exprimés à la surface des cellules durant le recyclage des molécules de HLA-B27 par la voie endocytaire. Les homodimères d'HLA-B27 entraînent l'activation des récepteurs KIR3DL2 à la surface des cellules Th17, mais aussi des NK, amenant à une production accrue d'IL-17 responsable de l'inflammation articulaire. 3- Théorie du stress du réticulum endoplasmique (RE) : le mauvais repliement des protéines dans le RE engendre un stress conduisant à l'activation de la voie de la réponse aux protéines non pliées (UPR) responsable d'une production accrue d'IL-23 (activation de l'axe IL-23/IL-17). 4- Théorie de la sélection du microbiote intestinale : le HLA-B27 participe à la sélection intestinale d'agents bactériens entraînant un dysbiose responsable de l'activation locale de cellules de l'immunité innée sécrétrices d'IL-17 (ILC3, lymphocytes T $\gamma\delta$) et d'une perméabilité accrue intestinale responsable de translocation de produits bactériens.

Figure adaptée de l'article Chengappa G. Kavadihanda *et al.* (49)

2.2. Les spondyloarthrites, maladie auto-immune ?

L'association entre les SpA et des facteurs génétiques impliqués dans la présentation des antigènes laisse penser que les SpA sont une maladie auto-immune.

Les maladies auto-immunes se caractérisent par une réponse inappropriée du système immunitaire adaptatif dirigée contre des antigènes du soi. Des lymphocytes B et T,

reconnaissant spécifiquement des antigènes du soi, présents dans certains organes, vont exercer leurs fonctions effectrices dans ces derniers ou produire des auto-anticorps ce qui entrainera des dommages tissulaires. La présence d'auto-anticorps peut être retrouvée plusieurs années avant le développement de la maladie.

Contrairement à d'autres rhumatismes inflammatoires chroniques, comme la PR, aucun auto-anticorps n'est actuellement recherché dans les SpA en pratique clinique. Le terme de « spondyloarthrites séronégatives » est d'ailleurs utilisé dans la littérature afin de les différencier des autres rhumatismes inflammatoires chroniques, reconnus comme étant d'origine auto-immune (PR, Lupus érythémateux systémique, Sjögren...). Néanmoins, ces dernières années, des auto-anticorps ont été identifiés dans cette maladie. De nombreux anticorps ont été décrits comme étant retrouvés dans les SpA : anticorps dirigés contre les agents microbiens (anticorps anti-*Saccharomyces cerevesiae*, anticorps anti-*Escherichia coli* outer membrane porin C, anticorps anti-flagelline (anti-CBir1)), contre la β 2 microglobuline qui est associée au CMH de type 1, anticorps anti- « heat shock protein » (HSP) 65, anti-14-3-3 η , anti-vimentine citrullinée ... (83). Cependant, le nombre d'études est limité avec, parfois, des études contradictoires. Aussi, il s'avère que ces auto-anticorps sont retrouvés dans d'autres maladies auto-immunes que les SpA, ce qui laisse difficilement entrevoir que ces auto-anticorps jouent un rôle pathogénique responsable de l'enthésite.

En revanche, certains auto-anticorps retrouvés dans les SpA sont dirigés contre des protéines majeures régulatrices de l'ostéogénèse laissant penser qu'ils pourraient avoir un rôle pathogénique en favorisant l'ossification des enthèses (syndesmophytes). L'expression de sclérostine, antagoniste de la voie Wnt/ β -catenin, est diminuée dans les ostéocytes et le sérum des patients avec une SA ou une SpA. La sclérostine est également associée au risque de développer de nouveaux syndesmophytes ou des lésions structurales au niveau des sacro-iliaques (84, 85). Luchetti *et al.* ont démontré que les SpA avec des manifestations axiales (SA ou SpA axiale associée aux MICI) développaient des immunoglobulines G anti-SOST qui se liaient à la sclérostine libre dans le sérum, diminuant la fraction libre impliquée dans l'inhibition de la formation osseuse (86). Néanmoins ces auto-anticorps sont aussi retrouvés à des taux plus faibles chez le sujet sains (87). Des taux élevés d'IgG anti Noggin, antagoniste de la voie signalisation des « Bone morphogenetic protein » (BMP), sont aussi présent dans la SA (87). La « Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1A » (PPM1A) est une phosphatase qui régule les voies de signalisation du BMP et de Wnt. Quand PPM1A est sur-exprimé, comme

observé dans la membrane synoviale des patients avec une SA, il favorise la différenciation ostéoblastique des ostéoprogéniteurs induisant la minéralisation de matrice (88, 89). Des niveaux élevés d'anticorps anti-PPM1A sont observés dans deux cohortes de SA et sont associés au risque de développement de lésions structurales au rachis (88, 89). Ces auto-anticorps diminuaient sous traitement anti-TNF (89). Cette réaction humorale pourrait expliquer le développement de syndesmophytes au rachis chez ces patients.

Les auto-anticorps les plus décrits dans la littérature restent néanmoins les anti CD74. Une méta-analyse récente montre que le taux sérique des immunoglobulines (Ig) G et IgA anti-CD74 est significativement augmenté dans les SpA, comparé à des sujets sains. Ces anticorps ont une sensibilité modérée et une haute spécificité pour le diagnostic de SpA (90). Le CD74, aussi appelé chaîne invariante du CMH de classe II, permet d'adresser ce dernier du réticulum endoplasmique rugueux vers les endosomes contenant des peptides antigéniques apprêtés destinés à être présentés par le CMH. Le CD74, empêche la fixation prématurée d'un peptide au CMH de classe II en cours de formation. Le CD74 est connu pour avoir une haute affinité pour le « macrophage migration inhibitory factor » (MIF) qui est augmenté dans le sérum des patients avec une SA et dont les taux sont associés au risque de progression structurale (91, 92). MIF stimule la production de TNF par les monocytes et la minéralisation osseuse par les ostéoblastes en agissant sur la voie Wnt/ β -caténine (91). Des anticorps anti-CD74 sont capables de se lier au CD74, de l'activer et provoquer l'activation de la voie « nuclear factor-kappa B » (NF- κ B), la prolifération et la survie des lymphocytes B (93). Le CD74 est aussi un antigène reconnu spécifiquement par les lymphocytes CD4⁺ des patients avec une SpA, entraînant une réponse Th1 et Th17 accrue (94). L'ensemble de ces études laissent suggérer une implication des anticorps anti-CD74 dans la physiopathogénèse des SpA.

Très récemment, Wilbrink *et al.* ont identifié dans le sang de patients atteints de SpA axiale une expansion des plasmablastes et des cellules B CD27⁺CD38^{low}CD21^{low}. Cette dernière population est connue pour être associée à des maladies auto-immunes mais dans ce travail aucune association avec l'activité du rhumatisme n'était démontré (95).

Cependant, les anticorps anti-CD20 (Rituximab), entraînant une déplétion des lymphocytes B effecteurs mais pas des plasmocytes, sont très peu efficaces dans les SpA (96, 97). Ces données suggèrent, pour l'instant, que les lymphocytes B ne jouent pas un rôle prépondérant dans l'inflammation articulaire contrairement à la PR.

Il existe une expansion des lymphocytes Th17 dans le sang périphérique des patients atteints de SA alors que les lymphocytes T régulateurs sont diminués comparativement à des sujets sains, indiquant un déséquilibre de la balance Th17/Treg (T régulateurs) (98). Il est bien reconnu que l'IL-17 est une cytokine clef dans la pathogénèse des SpA et une excellente cible thérapeutique. Néanmoins, les lymphocytes Th17 ne sont pas l'unique source de l'IL-17 dans les SpA car de nombreuses cellules immunitaires innées sont capables de produire cette cytokine.

Comme discuté dans la **partie 2.1**, malgré l'association forte entre le HLA-B27 et les SpA, il y a actuellement peu d'arguments convaincants qui sous entendent que des lymphocytes CD8+ auto-réactifs soient responsables des manifestations inflammatoires dans les SpA.

Les preuves de l'implication du système immunitaire adaptatif sont limitées mais laissent quand même suggérer une certaine contribution dans la pathogénèse de cette maladie.

2.3. Les spondyloarthrites : une maladie auto-inflammatoire de l'enthèse ?

De plus en plus de preuves amènent à penser que les SpA sont des maladies auto-inflammatoires plutôt que des maladies auto-immunes (99). Le concept de maladie auto-inflammatoire a été introduit en 1999 par McDermott *et al.* afin de regrouper des maladies initialement rares se caractérisant par la survenue d'épisodes incontrôlés d'inflammation systémique. Les maladies auto-inflammatoires regroupent des maladies caractérisées par une activation aberrante du système immunitaire inné sans que soit mis en évidence des titres élevés d'auto-anticorps ou de lymphocytes T spécifiques d'auto-antigènes (100, 101). Un continuum peut exister entre les maladies auto-inflammatoires et auto-immunes. En effet, le système immunitaire inné joue un rôle important dans l'activation du système immunitaire adaptatif grâce notamment à ses fonctions de cellule présentatrice d'antigène. Ainsi, il peut déclencher une réponse B et T pouvant induire à terme des lymphocytes T auto-réactifs et/ou la production d'auto-anticorps répondant aux critères de maladie auto-immune (100, 102).

Les maladies auto-inflammatoires systémiques ont des présentations cliniques très hétérogènes mais partagent des symptômes communs. L'atteinte du système musculosquelettique avec les arthralgies et arthrites en fait partie, tout comme des atteintes extra-articulaires telle que la fièvre fluctuante et les éruptions cutanées. Il est observé dans certaines maladies auto-inflammatoires des lésions de psoriasis, manifestation extra-articulaire des SpA (103). Les maladies auto-inflammatoires systémiques peuvent être d'origine monogénique (fièvre

méditerranéenne familiale (mutation du gène MEFV), syndrome périodique associé à la cryopyrine (mutation du gène NLRP3 codant la cryopyrine), syndrome périodique associé au récepteur du TNF (mutation du gène TNFR1...) ou polygénique (maladie de Behçet, arthrite juvénile idiopathique systémique, maladie de Still, syndrome de Schnitzler, maladie de Crohn, Synovite Acné Pustulose Hyperostose Ostéite ...)

Les principaux mécanismes pathogéniques responsables des maladies auto-inflammatoires incluent :

- L'activation de l'inflammasome, complexe important dans la détection et la réponse aux pathogènes intra-cellulaires et molécules de danger, amenant à la production de l'IL-1 β par l'activation de la caspase-1,
- L'activation de la voie de l'IFN de type I
- L'activation des facteurs de transcription NF- κ B.

Les SpA ne se caractérisent cependant pas par la survenue d'un syndrome inflammatoire important : près de 40% des patients ont un niveau de protéine C-réactive (CRP) normal (104), contrastant avec ce qui est observé dans d'autres maladies auto-inflammatoires chroniques. Il sera développé ci-dessous les arguments suggérant que les SpA pourraient être des maladies à composante auto-inflammatoire localisée au niveau de l'enthèse et de l'intestin.

2.3.1. Le stress mécanique des enthèses dans les spondyloarthrites

Le stress mécanique est un facteur central dans le développement des enthésites. Des sur-sollicitations de groupes musculaires sont connues pour entraîner des tendinites avec enthésites (exemple « tennis elbow » ou « golfer's elbow »). Une proportion non négligeable d'athlètes et militaires (105, 106) ou de femmes qui viennent d'accoucher (106, 107), développent des sacro-iliites inflammatoires magnétiques comme dans les SpA. Ceci apporte une preuve supplémentaire que les contraintes mécaniques peuvent induire une réaction inflammatoire localisée. Cependant cette inflammation localisée de l'os sous chondral s'améliore spontanément dans l'année après l'accouchement sans que des érosions se développent, laissant suggérer un défaut de résolution de l'inflammation dans les SpA (107, 108). Il est aussi possible que le seuil de stimulation mécanique nécessaire au développement d'une réponse inflammatoire au niveau des enthèses soit diminué dans les SpA. Ce phénomène est d'ailleurs déjà décrit dans le psoriasis (phénomène de Koebner).

La prostaglandine E2, produit par la cyclooxygénase, est un médiateur sécrété localement dans l'enthèse par les cellules résidentes mésenchymateuses. La prostaglandine E2 ainsi produite

agit comme agent vasodilatateur au niveau des vaisseaux transcorticaux de l'os provoquant un recrutement de cellules immunitaires directement de l'os sous chondral qui vont se diriger vers la zone fibrocartilagineuse de l'enthèse auparavant avasculaire. Les données en IRM mettent d'ailleurs très souvent en évidence un œdème inflammatoire de l'os sous chondral en regard de la zone d'insertion de l'enthèse.

Des travaux sur des modèles animaux ont permis de préciser le lien entre stress mécanique et arthrites et enthésites. Les souris atteintes d'arthrite induite par le collagène (CIA), ne déclenchent pas d'arthrites aux pattes arrière quand les contraintes mécaniques sont supprimées (suspension par la queue). Au contraire, les mêmes souris soumises à des contraintes mécaniques augmentées déclenchent une arthrite plus précoce. Ces observations ont été confirmées dans le modèle $TNF^{\Delta ARE}$ (109, 110). Fait très intéressant, les souris $Rag2^{-/-}$ déficientes en cellules T et B croisées avec des souris $TNF^{\Delta ARE}$ (109) ou utilisées dans le modèle d'arthrite induite par des anticorps au collagène (CAIA) (110) répondent de la même façon au stress mécanique, mettant en avant l'impact prépondérant du système immunitaire inné dans la phase d'initiation de l'arthrite (110). Le stress mécanique permet la chronicisation de l'inflammation en outrepassant les capacités de résolution de l'inflammation des lymphocytes Treg entretient la destruction articulaire sur les zones de contraintes sans influencer la production d'auto-anticorps (110, 111). L'absence d'augmentation du taux circulant des cytokines pro-inflammatoires suggère que la contrainte mécanique a un effet localisé à l'articulation (111). Les cellules mésenchymateuses des tendons sont capables de détecter les stimuli mécaniques et de sécréter localement en réponse du « chemokine ligand » (CCL) 2. Le CCL2 favorisent le recrutement de monocytes classiques pro-inflammatoires, principal précurseur des ostéoclastes responsables des érosions articulaires (110). Enfin, les lésions locales causées par le stress mécanique sont responsables de la libération de plusieurs motifs moléculaires associés aux dégâts ou alarmines (« Damage Associated Molecular Pattern » (DAMP)), telles que des protéines du choc thermique et des composants de dégradation de la matrice extra-cellulaire, dans les tendons qui peuvent perpétuer l'inflammation locale et entraîner sa chronicisation (111). L'ensemble de ces phénomènes met en évidence que les contraintes mécaniques favorisent le recrutement de cellules de l'immunité innée et entretiennent l'inflammation locale.

2.3.2. Immunité innée et voie IL-23/IL-17 dans les spondyloarthrites

Des études d'association pangénomique ont révélé une association entre les SpA et plusieurs polymorphismes nucléotidiques dans des gènes directement impliqués dans la signalisation de l'IL-17 : l'IL17-A, IL-17RA, les sous unités IL-23 p19 et IL-12 p40, le récepteur IL-23, « Tyrosine Kinase 2 » (TYK2), « TRAF3 Interacting Protein 2 » (TRAF3IP2) et « Signal transducer and activator of transcription » (STAT) 3 (112). Une augmentation des taux d'IL-17 et d'IL-23 est retrouvé dans le sang périphérique des patients atteints de SA (113, 114).

L'IL-23 est une cytokine composée de deux sous unités, l'IL-23p19 spécifique de l'IL-23 et l'IL-12/23p40, sous unité partagée avec IL-12. Les principales cellules productrices d'IL-23 sont les macrophages activés et les cellules dendritiques (115). L'IL-23 est connu pour être impliqué dans la génération de cellules Th17 à partir de cellules T CD4+ naïves (Th0), via la transduction du facteur de transcription « RAR-related orphan receptor gamma » (ROR γ t). L'IL-6 et le « Transforming Growth Factor » (TGF) β , eux aussi produits par le macrophage, induisent des Th17 à partir de Th0, permettant l'expression du récepteur de l'IL-23 (116). L'IL-23 stabilise cette différenciation et induit une expansion de cette population (117). Les Th17 synthétisent de l'IL-17, IL-21 et IL-22. Dans les SpA peuvent survenir, à la fois des érosions, et des productions osseuses sur différents sites anatomiques. L'IL-17A est impliqué à la fois dans ces deux phénomènes même si son implication dans la formation osseuse est plus sujet à controverse. L'IL-17 est capable de stimuler la production du ligand « receptor activator of nuclear factor- κ B » (RANKL) et inhibe dans le même temps la voie Wnt dans les ostéoblastes (112). Ce mécanisme est responsable d'une augmentation locale des ostéoclastes qui sont responsables des érosions. Dans le même temps l'IL-17A augmente la différenciation locale en ostéoblastes des cellules mésenchymateuses et stimule l'activité ostéoblastique par la signalisation JAK2/STAT3 (112, 118). L'efficacité de l'inhibition par anticorps monoclonal de l'IL-17A (secukinumab, ixekizumab) et de la sous unité p19 de l'IL-23 (guselkumab) dans la SpA axiale ou le rhumatisme psoriasique a permis de confirmer l'implication centrale de cette cytokine dans la SpA (119). Très naturellement, la production accrue d'IL-17 a été mise sur le compte d'une expansion des Th17 (98) mais de nombreuses cellules de l'immunité innée semblent capables de produire de l'IL-17 et expriment le récepteur à l'IL-23 faisant rediscuter les cellules qui sont à l'origine de cette cytokine (120).

L'étude du processus inflammatoire survenant dans les enthèses des patients atteints de SpA est difficile car il n'est pas possible de réaliser des prélèvements locaux sans provoquer des lésions irréversibles pour le patient. La plupart des travaux menés porte donc sur l'étude

d'enthèses provenant de pièces opératoires de patients souffrant d'arthrose ou de biopsies synoviales. Ces dernières années plusieurs travaux ont été réalisés afin d'identifier les cellules responsables d'une production accrue d'IL-17 localement dans l'enthèse. Il s'avère qu'il s'agit essentiellement de cellules de l'immunité innée.

En 2012, Sherlock *et al.* ont démontré que la sur-expression d'IL-23 par la technologie ADN minicircle était suffisante pour induire le développement de manifestations de SpA telle que des enthésites, des enthésophytes, des arthrites, du psoriasis et une aortite chez la souris. Ces manifestations étaient expliquées par la présence de lymphocytes IL23R⁺ROR γ T⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ résidents dans l'enthèse et dans l'aorte. Ces cellules en réponse à l'IL-23 produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 impliqués dans la formation d'enthésophytes (121). Une étude ultérieure a permis de mieux caractériser ces lymphocytes résidents qui s'avèrent être des lymphocytes T $\gamma\delta$ qui sont la source principale d'IL-17A dans l'enthèse (122). Ces lymphocytes T $\gamma\delta$ résidents dans les enthèses sont aussi retrouvés chez l'homme avec deux sous-groupes capables de produire de l'IL-17 en réponse à l'IL-23 (V δ 2) ou non (V δ 1) (123). La plupart des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez la souris sont produits au cours du développement embryonnaire et de la période néonatale. Ils se développent au niveau du thymus puis migrent dans les muqueuses (intestin, poumon, derme, appareil reproducteur) où ils résident. Ces cellules expriment les récepteurs pour l'IL-1, IL-6, IL-18, IL-23 et le TGF- β mais aussi le TLR2, le « Dendritic cell associated C lectin 1 » (dectin 1) et les « natural killer receptors » (NKR) leur permettant de répondre à de nombreux signaux de danger et d'être activés par l'environnement cytokinique local (120, 124). Le « T cell receptor » (TCR) $\gamma\delta$, à la différence du $\alpha\beta$, est plus restreint et reconnaît de nombreux antigènes sans qu'une présentation par le CMH soit nécessaire. Ces cellules sont programmées pour produire de l'IL-17, d'ailleurs elles partagent des caractéristiques phénotypiques avec les Th17 : expression facteur transcription ROR γ T et STAT3 ainsi que des récepteurs de surface (récepteur IL-23, « C-C Motif Chemokine Receptor » (CCR) 6) (120).

Les cellules lymphoïdes innées de type 3 (« innate lymphoid cells » (ILC) 3) sont produits dans la moelle osseuse à partir du progéniteur commun lymphocytaire, mais à la différence des lymphocytes T et B, ils n'expriment pas de TCR ou de « B Cell Receptor » (BCR). Ils colonisent ensuite les tissus lymphoïdes mais aussi le derme, l'intestin, le poumon et le foie. Les ILC3 résident dans les tissus et sont impliqués dans la défense des infections bactériennes et fongiques extra-cellulaires. Ils sont activés par l'IL-1 β et l'IL-23 et produisent de l'IL-17 et

IL-22 responsables du recrutement de neutrophiles et de production de peptides antimicrobiens par les muqueuses. Cuthbert *et al.* ont identifié que des ILC3 résidents dans les enthèses saines des ligaments interépineux chez l'Homme. Dans ce travail, la costimulation par de l'IL-23 et de l'IL1 β des cellules résidentes dans l'enthèse était responsable d'une augmentation de l'expression de l'*IL17* et à moindre mesure de l'*IL22* sans que ce travail n'aborde l'origine cellulaire de ce phénomène (125). De façon intéressante, la proportion d'ILC3 résidente dans l'enthèse (0,25% des lymphocytes) est inférieure à ce qui est observé dans l'intestin et la peau ce qui laisse suggérer que l'exposition à des facteurs environnementaux pourrait être responsable d'une expansion de cette population (125).

L'os sous chondral des articulations zygapophysaires du rachis des patients atteints de SA établie est infiltré par des cellules productrices d'IL-17 qui s'avèrent être très majoritairement des précurseurs myéloïdes Myéloperoxydase (MPO) + et des neutrophiles CD15+ et non des lymphocytes CD3+ Th17 (126). Ces données sont néanmoins sujet à controverse depuis que Tamassia *et al.* ont décrit grâce à l'utilisation de plusieurs techniques (RT-qPCR, ELISA, immunohistochimie, immunofluorescence, cytométrie en flux, « western blot » et de immunoprécipitation de la chromatine) que les neutrophiles humains ne produisaient pas d'IL-17A, B et F. De plus, ils ont mis en évidence que certains anticorps du commerce ciblant l'IL-17A se fixent à des protéines intracellulaires dans le neutrophile qui ne sont pas de l'IL-17 (127).

L'analyse histologique des biopsies des sacro-iliaques de patients, présentant un œdème inflammatoire en IRM dans le cadre d'une SpA, mettent en évidence la présence d'un infiltrat de CD68+ macrophages et de lymphocytes CD3+ contrastant avec la quasi-absence de cellules B CD20+ (128). En 2019, Bridgwood *et al.* ont identifié la présence de cellules myéloïdes CD14+ HLADR+ CD11c+ comme source principale d'IL-23 dans l'enthèse chez l'Homme (129). Malgré une caractérisation incomplète, ces cellules myéloïdes pourraient être des macrophages. En effet, il a été montré précédemment que la zone fibrocartilagineuse de l'enthèse au cours de l'enthésite dans les SpA est le siège d'une néovascularisation et d'une infiltration par des macrophages CD68+ (130). Ces données confirment l'étude menée par Appel *et al.* qui ont constaté que les précurseurs myéloïdes MPO+ étaient la source principale d'IL-23 au niveau des articulations zygapophysaires du rachis de patients atteints de SA, suivi par les macrophages CD163+ et macrophages CD68+ (131). Aucun neutrophile MPO+ CD15+ ne produisait de l'IL-23 dans cette étude. Ces données laissent suggérer un rôle prépondérant

des macrophages dans l'initiation et l'entretien de l'inflammation dans l'enthèse des patients atteint de SpA via la production d'IL-23.

2.3.3. Macrophages et spondyloarthrite

2.3.3.1. Macrophage, cellule de l'immunité innée chef d'orchestre dans le processus inflammatoire

Les macrophages résident dans de nombreux tissus. Ils ont une double origine, embryonnaire et hématopoïétique.

Durant la vie embryonnaire, des progéniteurs érythro-myéloïde du sac-vitellin vont se différencier en macrophage et vont coloniser le système nerveux central pour donner la microglie mais aussi d'autres tissus comme le foie, l'intestin et les poumons. Il s'avère que ces macrophages ont la capacité de s'auto-renouveler localement de façon indépendante de la moelle osseuse (132, 133).

La majorité des macrophages tissulaires proviennent des monocytes circulants issus de la moelle osseuse qui vont migrer dans les tissus pour se différencier en macrophages.

Durant l'hématopoïèse, les cellules souches hématopoïétiques vont se différencier en cellules myéloïdes progénitrice (CFU-GEMM pour « Colony Forming Unit-Granulocytaire Erythrocytaire Monocytaire Megacaryocytaire ») puis sous l'action du GM-CSF (« Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor ») en CFU-GM (« Colony Forming Unit-Granuleuse Macrophage Megacaryocyte »). Enfin, sous l'action du M-CSF (« Macrophage-Colony Stimulating Factor ») des monoblastes puis pro-monocytes vont se former pour enfin donner des monocytes qui seront relâchés dans le sang circulant.

Chez la souris, deux populations de monocytes circulants également répartis sont décrits. Les monocytes dits classiques pro-inflammatoires : $Ly6C^{hi}CCR2^{hi}CX3CR1^{low}$ qui vont migrer dans les tissus pour renouveler les macrophages résidents à la suite d'une agression ou être recrutés via le processus inflammatoire. Et les monocytes dit « résidents » $Ly6C^{low}CCR2^{low}CX3CR1^{hi}$ qui patrouillent dans le sang contribuant au maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale et qui participent au renouvellement des macrophages résidents en condition physiologique (134). Chez l'homme, la répartition est différente avec 90% de monocytes « classiques » circulants $CD14^{hi}CD16^{-}$ (134).

Les macrophages sont des cellules sentinelles qui résident dans les tissus. Ce sont les premières cellules immunitaires à être en contact avec les agents pathogènes agressant les tissus. Ils sont équipés de plusieurs récepteurs à leur surface impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes, la phagocytose, la présentation des antigènes et la reconnaissance de cytokines et

molécules de danger leur permettant de développer leur activité antimicrobienne. Les macrophages expriment des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (« Pattern recognition receptor » (PRR)) qui sont capables de reconnaître des molécules simples avec une structure moléculaire régulière spécifique des pathogènes aussi appelées motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (« Pathogen-associated molecular pattern » (PAMP)) (lipopolysaccharides, peptidoglycanes...) ou provenant des tissus endommagés, les motifs moléculaires associées aux dommages (DAMP). Les récepteur toll-like (TLR) exprimés à la membrane et des récepteur intracellulaire tels les récepteurs NOD like (NLR) appartiennent à la famille des PRR. Les macrophages identifient aussi les bactéries par l'intermédiaire des récepteurs Fc reconnaissant le fragment Fc des anticorps opsonisant les bactéries, par les récepteurs du complément et par des récepteurs éboueurs ou « scavenger ». L'ensemble de cet arsenal leur permet de reconnaître rapidement, et sans nécessairement l'intervention d'autres cellules immunitaires, les agents pathogènes afin de les phagocyter. L'agent bactérien, ainsi reconnu par les récepteurs de surface des macrophages, va être englobé dans la membrane plasmique afin de former une phagosome. Ce phagosome fusionnera ensuite avec des lysosomes formant ainsi des phagolysosomes qui ont un contenu acide, riche en peptides antimicrobiens et en radicaux libres entraînant la destruction de l'agent pathogène.

Les macrophages sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les agents pathogènes sont transformés en peptides pour être ensuite présentés au système immunitaire adaptatif via le CMH I après un traitement par la voie de l'autophagie ou par le CMH II (135). Outre leurs fonctions immunitaires consistant à répondre aux molécules de danger et aux agressions microbiennes pour défendre l'hôte et leur fonctions présentatrice d'antigènes, les macrophages ont des fonctions indispensables au maintien de l'homéostasie tissulaire. Ils sont impliqués dans l'élimination des globules rouges en fin de vie, dans l'élimination des débris cellulaires générés lors des remodelages tissulaires et des cellules rentrant en apoptose. Ils sont essentiels également dans la résolution de l'inflammation et la réparation des tissus, permettant au tissu de revenir à la normale dans les suites d'une agression (134). Ce mécanisme de régulation est primordial car la non-résolution de l'inflammation entraîne l'accumulation de dommages tissulaires chroniques et de signaux de danger entretenant ainsi une inflammation prolongée.

2.3.3.2. Polarisation macrophagique

Le concept de polarisation macrophagique s'inspire des travaux menés pour décrire les lymphocytes T effecteurs selon leur fonction immunologique (Th1, Th2, Th17...). Deux types

de polarisation représentant deux extrêmes ont été introduits pour décrire l'état d'activation des macrophages : la polarisation M1 des macrophages classiques activés pro-inflammatoire et M2 pour les macrophages alternatifs aux propriétés anti-inflammatoires. Ces états différents d'activation sont induits par des stimuli spécifiques entraînant une expression dirigée de marqueurs de surface, de cytokines et chimiokines responsables des fonction pro et anti-inflammatoires des macrophages. Le macrophage est une cellule très plastique et peut passer d'un état de polarisation à l'autre. Les polarisations M1 et M2 ont été définies in vitro. In vivo, la polarisation macrophagique doit plutôt être vue comme un continuum d'états d'activation du macrophage évoluant de façon dynamique dans le temps, influencé par le micro-environnement tissulaire, naviguant entre ces deux conditions extrêmes M1 et M2 définis in vitro. Les macrophages M1 surviennent dans un environnement pro-inflammatoire, médié principalement par les TLR et l'IFN- γ , et sont impliqués dans l'immunité dirigée contre les bactéries et les agents pathogènes intracellulaires. Les macrophages M2, en hommage à la réponse Th2, ont quant à eux un rôle dans l'immunité dirigée contre les helminthes mais aussi l'asthme et les allergies (136).

In vitro, la polarisation M1 résulte de l'activation de macrophages par des agonistes des TLR tels que les lipopolysaccharides (LPS) en association avec l'IFN- γ . Les macrophages M1 sont caractérisés par l'expression du TLR-2 et 4, CD80, CD86, iNOS et le CMH II et la production de cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1- α , IL1 β , IL-6, IL-12, IL-23, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5 (137). STAT1 et NF- κ B sont les deux voies intracellulaires principales impliquées dans la polarisation M1. Les macrophages M1 sont pro-inflammatoires et ont une activité antimicrobienne forte ainsi qu'antitumorale.

Les macrophages M2 sont considérés comme anti-inflammatoires. Ils expriment à leur surface le CD163, CD206, CD209, FIZZ1 et Ym1/2 et le récepteur au mannitol, et, produisent des cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10 et le TGF- β , ainsi que de nombreuses chimiokines parmi lesquelles le CCL1, CCL17, CCL18, CCL22 et CCL24 mais aussi le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) impliqué dans l'angiogenèse (137). Ces macrophages M2 ont une fonction anti-inflammatoire, de résolution de l'inflammation, de néo-angiogenèse, de réparation tissulaire et ils favorisent la formation et le développement des tumeurs. La voie principale de cet état d'activation passe par STAT6. Quatre sous-groupes de macrophage M2 sont décrits (137) :

- Les macrophages M2a : activés par l'IL-4 et/ou IL-13, ils expriment l'IL-10, le TGF- β et des chimiokines telles que CCL17, CCL18 et CCL22.
- Les macrophages M2b : induits par les complexes immuns, les ligands du TLR et l'IL-1 β , ils produisent des cytokines à la fois pro et anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TNF- α , l'IL-1 β , IL-6. Ces macrophages contrôlent la réaction immunitaire.
- Les macrophages M2c : induits par l'IL-10 ou TGF- β ou les glucocorticoïdes, ils sécrètent de l'IL-10, TGF- β , CCL16 et CCL18. Ces macrophages sont impliqués dans la phagocytose des corps apoptotiques.
- Les macrophages M2d : survenant à la suite d'une costimulation par les agonistes des TLR et des agonistes du récepteur à l'adénosine, ils relâchent dans leur micro-environnement de l'IL-10 et du VEGF favorable à la néo angiogenèse.

2.3.3.3. Macrophages et spondyloarthrites

Les premières études sur les macrophages dans les SpA se sont concentrées à décrire les populations retrouvées dans la membrane synoviale au cours de l'arthrite. Ces études ont laissé penser qu'une polarisation prépondérante M2 caractérisait les SpA.

Les macrophages CD163⁺ s'accumulent dans la couche bordante ou intima (« synovial lining ») et dans la couche sous intima (« synovial sublining ») de la membrane synoviale des patients atteints de SpA, mais aussi dans la lamina propria des colons (138). Cette infiltration par les macrophages CD163⁺ est plus importante dans la SpA que dans la PR et corrèlent avec les marqueurs de l'inflammation systémique (138, 139). Les anti-TNF permettent, par ailleurs, de diminuer l'infiltrat de macrophages CD163⁺ (138, 140). Parmi plusieurs paramètres histologiques, le nombre de CD68⁺ macrophages dans la sous intima et le nombre de CD163⁺ macrophages dans l'intima de la membrane synoviale aide à identifier un sous-groupe de patients ayant une activité de la maladie élevée, et ce indépendamment du sous-type de SpA, de la durée de la maladie ou du traitement entrepris (141). Ces données supportent un rôle prépondérant des macrophages dans le processus inflammatoire survenant dans les SpA (141). Le récepteur CD163 ou récepteur éboueur (« scavenger »), est un marqueur connu de polarisation M2 (IL-10). Il est probable que le micro-environnement articulaire, plutôt que l'existence d'une prédisposition monocyttaire à une polarisation M2, est impliqué dans la polarisation des macrophages articulaires. D'ailleurs, le liquide synovial des patients atteints de SpA dirige in vitro la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 (sur-expression CD163 et CD200R). Cette différence d'environnement local au niveau articulaire pourrait expliquer la présence accrue des macrophages sur-exprimant le CD163 dans la SpA (142). Le

CD206 (récepteur du mannose) soluble, marqueur de polarisation M2a, contrairement au CD163 soluble (sCD163), est significativement augmenté, même si l'association reste faible, chez les patients présentant une SpA axiale avec des dommages structuraux aux sacro-iliaques. Cela suggère que les macrophages M2 alternatifs sont impliqués dans la physiopathogénèse des SpA axiales (143). Il existe également, comme observé dans l'articulation, une accumulation de macrophages polarisés M2 dans l'intestin des patients avec une SpA. Ainsi, contrairement à ce qui est observé dans la maladie de Crohn, il existe une augmentation concomitante des macrophages impliqués dans la résolution de l'inflammation (iNOS+, IL-10+), des macrophages polarisés M2 (CD163+CCL24+) et une absence de CD14+ macrophages pouvant expliquer que l'inflammation digestive observée dans la SA reste infraclinique du fait d'un environnement local tissulaire anti-inflammatoire (144).

Néanmoins, la présence du CD163+ n'est pas suffisant à lui seul pour définir un phénotype M2 (145, 146). Un potentiel facteur confondant doit être soulevé qui pourrait expliquer la différence de proportion de macrophages CD163+ observée dans la SpA *vs.* PR décorrélant ce marqueur de l'état de polarisation macrophagique. Le CD163 membranaire peut se retrouver sous forme soluble à la suite du clivage par la métalloprotéase « A Disintegrin And Metalloprotease 17 » (ADAM17), aussi appelée « TNF Alpha Converting Enzyme » (TACE), protéase impliquée dans le clivage du TNF transmembranaire le rendant ainsi soluble (139, 147). Il existe une diminution de l'activité d'ADAM17 dans les synoviocytes et cellules mononuclées périphériques des patients avec une SpA, comparativement aux patients avec un PR, entraînant une expression plus élevée de TNF transmembranaire dans la synovite des patients SpA et une diminution du CD163 soluble dans le liquide synovial des patients SpA comparativement à la PR (148). Une autre étude plus récente a d'ailleurs révélé, qu'excepté le CD163+, les autres marqueurs de surface de polarisation macrophagique n'étaient pas différents dans les SpA comparés aux PR (149). Aussi, les macrophages dérivés des monocytes des patients avec SpA, dans des expériences *ex vivo*, n'avaient pas de prédisposition à se polariser préférentiellement vers un type de macrophages en présence d'IFN- γ , IL-4 et IL-10 (149).

Depuis, de nombreuses recherches ont mis en lumière que les monocytes et macrophages dans les SpA ont une propension à produire des quantités plus importantes de cytokines pro-inflammatoires, ce qui est en faveur d'une polarisation préférentielle M1. Il existe une augmentation des monocytes classiques (CD14++CD16-) circulant dans les SpA (150, 151) contrastant avec les résultats d'une précédente étude (149). Les macrophages et les monocytes sont dans un état de pré-activation dans la SpA responsable d'une production accrue d'IL-1 β et d'IL-23. Des expérimentations, chez les rats transgéniques sur-exprimant l'HLA-B27 et la beta-

2-microglobuline humaine, démontrent que le stress du réticulum endoplasmique induit par le mauvais repliement du HLA-B27, entraîne une expression accrue d'*IL-23p19* dans les macrophages en réponse à une stimulation par le LPS (74). De nombreux travaux rapportent des capacités augmentées des macrophages des patients atteints de SpA à produire de l'*IL-23* (78, 152-155) sans qu'un lien avec le stress du réticulum endoplasmique ait été confirmé (78). Des DAMPs, tel l'adénosine, sont aussi capables d'augmenter la production d'*IL-23* par les macrophages en se liant spécifiquement au récepteur adénosine A2A2 (155).

Les monocytes des patients atteints de SpA sont caractérisés par un état de pré-activation *in vivo* entraînant aussi une production accrue d'*IL-1 β* , à la suite d'une stimulation par le « Muramyl Dipeptide » (MDP, activateur de NOD2), et de « Fibroblast Stimulating Lipopeptide 1 » (FSL-1, activateur TLR 2/6), alors que les capacités de production de l'*IL-10* sous stimulation par LPS sont diminuées (150). De façon intéressante, les monocytes des patients avec une SpA, même sans stimulation, produisent plus d'*IL-1 β* comparés à ceux de sujets sains (150). La production de cytokines par les monocytes est d'ailleurs associée à une activité BASDAI plus élevée (150). La préactivation des macrophages est donc responsable d'une production locale d'*IL-23* et d'*IL-1* accrue, entraînant l'activation des cellules immunitaires innées résidentes dans les enthèses (ILC3, lymphocytes T $\gamma\delta$). Ces dernières produisant en réponse de l'*IL-17* et *IL-22* impliqués dans l'enthésite et les productions osseuses (129, 131). Cet état de pré-activation monocyttaire pourrait être induit par une augmentation du LPS circulant, du fait d'une perméabilité intestinale accrue (156), ou par une production accrue de molécule de dangers. Ces macrophages pré-activés pourraient aussi avoir une origine digestive. Une augmentation de la fréquence des monocytes CD14++CD16+CX3CR1+CD59+CCR9+IL-23+TL1A+ est retrouvée dans le sang et le liquide synovial des patients atteints de SA (157). Ces monocytes présentent des facultés de phagocytose augmentée, une signature pro-inflammatoire en analyse transcriptomique et la présence du CCR9, marqueur du « homing » intestinal suggèrent une origine intestinale. Les macrophages CX3CR1+ migrent de l'intestin vers les ganglions mésentériques du fait d'une sécrétion tissulaire accrue de CX3CL1 favorisée lorsqu'il existe une dysbiose intestinale. Ils sont capables, chez la souris, de transporter des *Salmonelles* non invasives et de migrer vers les ganglions mésentériques et d'engager une réponse immunitaire T par la surexpression de CD80 (158).

Récemment, a été montré dans le modèle murin SKG de SpA l'existence d'une dysrégulation de la myélopoïèse favorisant la production de progéniteurs des granulocytes-monocytes. Ce phénomène est expliqué par une synthèse accrue de GM-CSF entraînant, de façon assez

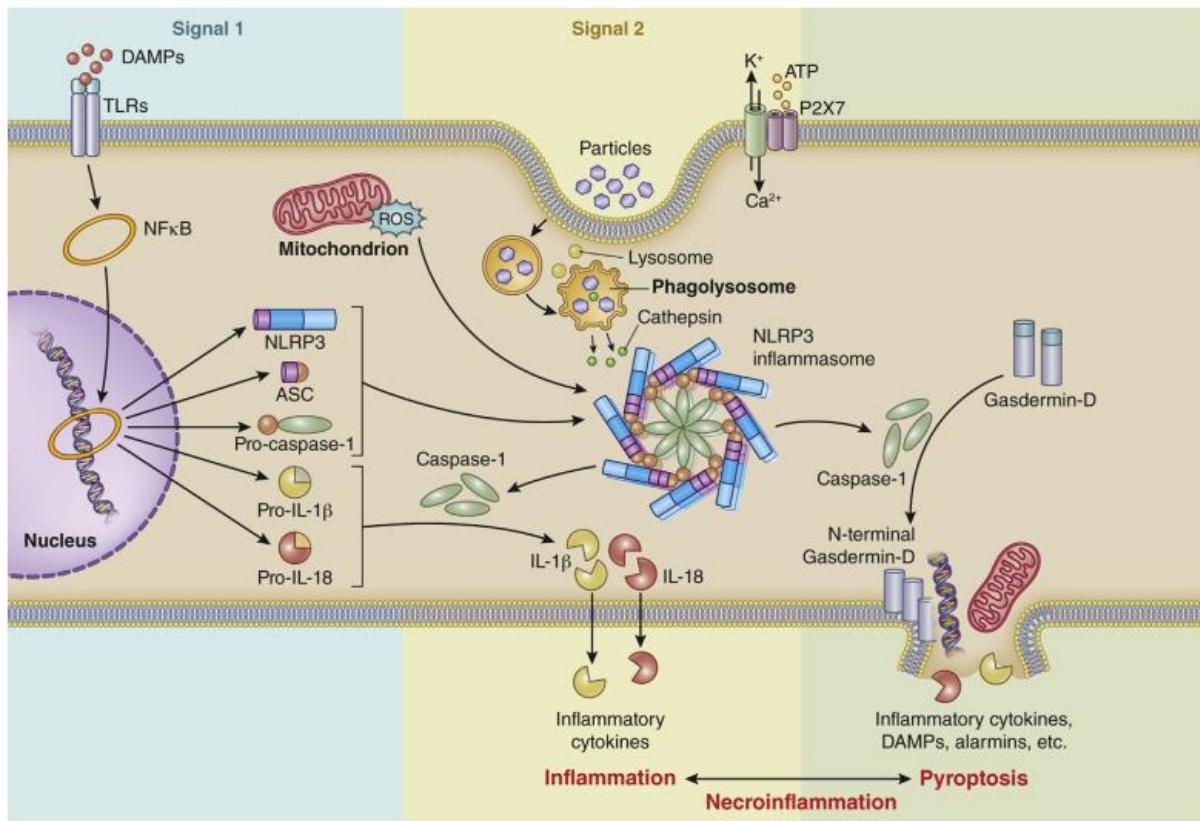
surprenante, la formation des zones de myélopoïèse extramédullaire dans les articulations de ces souris ce qui permet de fournir en continu des monocytes/macrophages et des neutrophiles ce qui entretient l'arthrite. Chez l'homme, la proportion de monocytes, comparativement aux lymphocytes, est augmentée (ratio lymphocyte/monocyte) et associée à des formes plus sévères (sacro-iliite grade IV) (159), signe potentiel indirect de l'existence d'une dysrégulation de l'hématopoïèse.

Enfin dans la SA, les concentrations sériques de « Monocyte chemoattractant protein 1 » (MCP-1, aussi dénommée CCL2), puissant facteur chimiotactique pour les monocytes, sont augmentées par rapport à des patients souffrant de lombalgies chroniques (160). Comme déjà présenté, le CCL2 peut être sécrété par les cellules mésenchymateuses des tendons à la suite d'un stimulus mécanique entraînant l'attraction de nombreux monocytes dans l'enthèse. Ainsi, il est envisageable que des monocytes pré-activés par des produits bactériens provenant de l'intestin ou transportant des bactéries soient attirés dans l'enthèse par une voie CCL2 dépendante. En sécrétant de l'IL-23 localement ces derniers activent les ILC3 et lymphocytes $T\gamma\delta$ responsable de l'enthésite.

2.3.4. Inflammasome et spondyloarthrites

Les inflammasomes sont des complexes oligomériques qui s'assemblent dans le cytosol en réponse à la détection de motifs bactériens ou de molécules de danger, conduisant à l'activation par protéolyse des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 sous l'effet de la caspase 1. L'inflammasome est composé de plusieurs unités protéiques : le détecteur, la caspase 1 et l'adaptateur les reliant. Il existe de nombreux types d'inflammasomes, caractérisés par plusieurs détecteurs différents, permettant d'identifier un large panel de signaux activateurs. La plupart des détecteurs sont de la famille des NLRs dont le plus connu est le NLRP3. L'inflammasome NLRP3 est exprimé notamment dans les macrophages et les neutrophiles. NLRP3 est activé par de nombreux signaux (acide urique, diminution concentration intra-cellulaire en potassium, cristaux de cholestérol, dérivés réactifs de l'oxygène...) ce qui entraîne l'agrégation de plusieurs molécules de NLRP3 qui vont se combiner à la protéine adaptatrice « apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain » (ASC) qui en retour va se lier avec la pro-caspase 1. Cette agrégation va entraîner le clivage de la pro-caspase 1 en caspase 1 qui va ainsi être activée. La caspase 1 ainsi libérée va donc cliver la pro-IL-1 β et pro-IL-18 en leur forme active et peut induire un phénomène de pyroptose (161). Cette voie se retrouve souvent activée dans les maladies auto-inflammatoires (**Figure 6**).

Figure 6. L'inflammasome



L'activation des recpeteurs toll like (TLR) par des protéines de danger (DAMPs) induit l'activation du facteur de transcription NF-κB impliqué dans la transduction des composants de l'inflammasome (NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC), pro-caspase 1) et de la pro-IL-1β et pro-IL-18. Un deuxième signal (acide urique, diminution concentration intra-cellulaire en potassium, cristaux de cholestérol, dérivés réactifs de l'oxygène...) entraine l'agrégation de plusieurs molécules de NLRP3 qui vont se combiner à la protéine adaptatrice (ASC) qui en retour va se lier avec la pro-caspase 1. Ainsi l'inflammasome NLRP3 est activé conduisant au clivage de la pro-caspase 1 en caspase 1 qui s'active. La caspase 1 ainsi libérée clive la pro-IL-1β et pro-IL-18 en leur forme active. La caspase-1 clive également la Gasdermin-D en N-terminal Gasdermin-D impliqué dans le phénomène de mort cellulaire, la pyroptose, entrainant une libération massive de DAMPs en extra-cellulaire.

Figure issue de l'article de Mulay *et al.* (161)

Les cellules mononucléées périphériques sanguines des patients atteints de SA expriment nativement et en réponse au LPS une quantité accrue des composants de l'inflammasome (NLRP3, ASC) et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-23 et l'IL-17A par rapport aux témoins sains (153, 162). In vitro, les macrophages polarisés en M1 (stimulation par IFN-γ et LPS) expriment et produisent plus d'IL-1β, que des patients contrôles, confirmant une dysrégulation de la voie de l'inflammasome dans la SA (154). Ceci explique

l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β et IL-18 observée dans les sérums de ces patients (153). Une activation de l'inflammasome survient dans l'iléon des patients atteints de SA, conduisant à une production accrue d'IL-1 β , IL-18 et une augmentation du phénomène de pyroptose (153). Cette activation de l'inflammasome est aussi retrouvée chez les rats transgéniques HLA-B27 et se corrige à la suite d'un traitement par antibiotiques (vancomycine et méropénem), faisant suggérer un rôle du microbiote dans l'activation locale de l'inflammasome (153). L'inhibition de l'activation de NLRP3 par un inhibiteur pharmacologique (MCC950) entraîne une suppression de l'inflammation digestive et retarde l'apparition de l'arthrite dans le modèle SKG induit par le curdlan. Ceci indique que l'inflammasome peut être impliqué dans la phase initiale de développement de l'arthrite et dans l'inflammation digestive (153). Enfin l'inflammasome, par un mécanisme dépendant de l'IL-1 β , est capable de stimuler la production d'IL-23 par les monocytes et cellules dendritiques, cytokine importante impliquée dans l'enthésite dans les SpA (153, 163).

2.4. La calprotectine, protéine de danger aux propriétés bactéricides

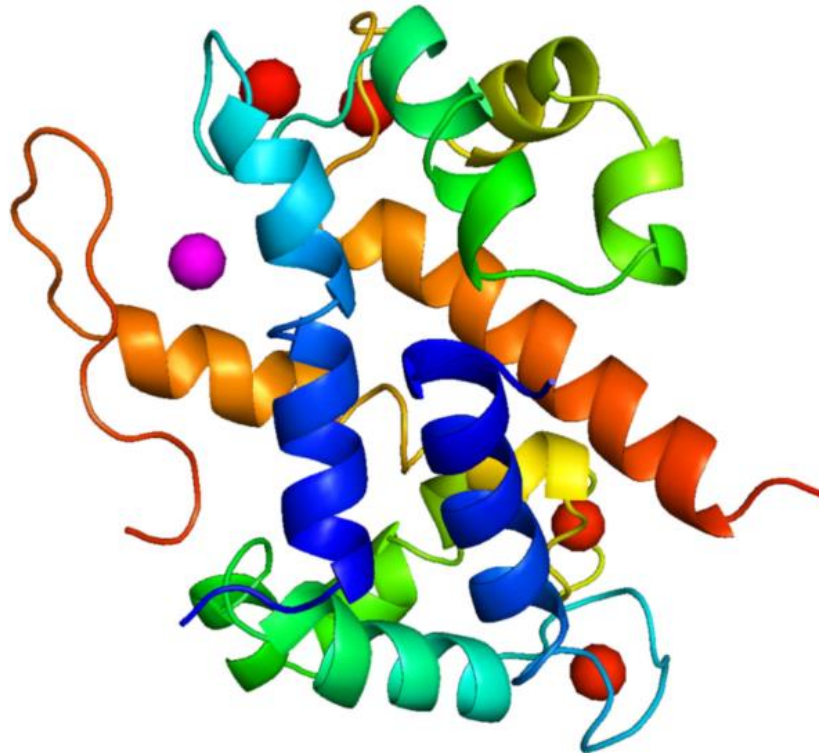
Les monocytes des patients atteints de SA sont préactivés, attirés au niveau de l'enthèse via le CCL2 entraînant une sécrétion accrue locale d'IL-1 β et d'IL-23. Ceci est responsable du déclenchement et de l'entretien de l'inflammation via l'activation de cellules immunitaires résidentes dans l'enthèse. Les motifs moléculaires associés aux dommages aussi appelés alarmines, sont des molécules endogènes, rapidement libérées dans le milieu extra-cellulaire de façon passive par les cellules à la suite de lésion tissulaire ou de façon active en réponse à un stress cellulaire. Les alarmines contribuent à la fois à l'initiation, l'amplification et l'entretien de l'inflammation articulaire au cours des rhumatismes inflammatoires chroniques. Elles sont à la fois impliquées dans l'activation de l'immunité innée en stimulant directement les phagocytes, et dans la modulation de l'immunité adaptative par l'engagement des cellules dendritiques. Ces cellules présentatrices d'antigène migrent dans les organes lymphoïdes secondaires pour activer des lymphocytes T naïf et diriger la polarisation des lymphocytes (164). Nous développerons ici l'implication d'une alarmine, les protéines S100, dans les SpA.

2.4.1. Nomenclature et structure des protéines S100

Les protéines S100 ont été identifiées pour la première fois dans le cerveau de bovin en 1965 (165). Le nom S100 a été donné à ces protéines du système nerveux car elles sont partiellement solubles dans du sulfate d'ammonium à 100% de saturation (165). Vingt-cinq protéines S100

différentes sont à ce jour identifiées. Elles ont toutes une structure commune composée de deux motifs main-EF leur conférant la capacité de fixer des cations divalents de calcium (**Figure 7**). Les protéines humaines S100A8 (aussi dénommée « Myeloid Related Protein » (MRP) 8 ou Calgranuline A) et les protéines S100A9 (MRP 14 ou Calgranuline B) sont des protéines constituées respectivement de 93 et 113 acides aminés leur conférant un poids moléculaire bas de, respectivement, 10,8KDa et 12,7KDa (166). Le gène codant les protéines S100A8 et S100A9 chez l'Homme se situe sur le chromosome 1 (région 1q21) (167). Ces protéines représentent 40% des protéines cytosoliques du neutrophile et 5% du monocyte (168). Elles sont aussi exprimées dans les premières étapes de différenciation des macrophages (169) et dans les cellules épithéliales et kératinocytes en condition inflammatoire. Les protéines S100A8 et S100A9 forment le plus souvent un hétérodimère S100A8/A9, stable in vitro et in vivo, dénommé calprotectine. Ces hétérodimères fixent avec une haute affinité d'autres cations divalents que le calcium, notamment le zinc et le magnésium. Dans sa forme finale, la calprotectine est capable de se lier avec 8 Ca²⁺ et 4 Zn²⁺ (166). Des formations de tétramères sont rapportées (S100A8/A9)₂. La fixation de cations divalents influence l'oligomérisation, la conformation et le repliement des protéines et donc, au final, la fonction des protéines S100A8 et S100A9

Figure 7. Structure de la protéine S100A8/A9



Représentation de la protéine S100A8/A9 sous la forme d'un diagramme en ruban liée à des ions manganèse (sphères bleues) et calcium (sphères roses). Les hélices I (bleu) et IV (orange) interagissent entre elles et forment une interface hydrophobe pour stabiliser l'hétérodimère. Les hélices II et III sont représentées en vert.

Figure issue de l'article Pruenster *et al.* (166)

2.4.2. Fonctions extra-cellulaires

La sécrétion extracellulaire de la calprotectine par les neutrophiles et monocytes fait intervenir à la fois des mécanismes passifs et actifs. La libération passive de protéines S100A8/A9 survient en cas de nécrose cellulaire ou durant le processus de nérose. La sécrétion active de calprotectine est, quant à elle, régulée par le Ca^{2+} .

La calprotectine extra-cellulaire a des propriétés pro-inflammatoires. Elle entraîne une libération rapide des neutrophiles de la moelle osseuse dans le sang périphérique (170). Le neutrophile circulant « roule » (« rolling ») sur la paroi endothéliale entraînant une interaction entre la « P-selectin glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1) et la E-sélectine. Cette interaction conduit à une sécrétion de calprotectine par le neutrophile qui va stimuler le TLR4 de ce dernier (mécanisme autocrine) conduisant à l'expression de l'alpha 2 intégrine ce qui favorise le ralentissement de son roulement (« rolling ») sur la paroi endothéliale (171). La calprotectine sécrétée par les cellules myéloïdes va ensuite se fixer avec une haute affinité aux héparanes

sulfate des cellules endothéliales (172). La calprotectine a de nombreux effets sur les cellules endothéliales (166):

- Stimulation de ICAM-1 favorisant la diapédèse des neutrophiles et monocytes (173)
- Augmentation de la perméabilité endothéliale par l'activation des TLR4 et « Receptor for advanced glycation endproducts » (RAGE) entraînant la diminution de l'expression de protéines de jonction (VE-cadhérine, l'occludine, zonula occludens 1) (173, 174)
- Altération de l'intégrité de la monocouche de cellules endothéliales par l'induction d'une mort cellulaire par des programmes dépendant ou non des caspases (175).
- Promotion de la thrombogénèse et de la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, CCL2, CXCL8) permettant la chimio-attraction des neutrophiles et monocytes vers les tissus (173, 176).

L'ensemble de ces mécanismes induit le recrutement des monocytes et neutrophiles sur le site de l'inflammation.

La calprotectine extracellulaire exerce ses effets pro-inflammatoires en se liant à RAGE et aux TLR-4 des cellules myéloïdes, lymphocytes et cellules endothéliales (176, 177).

La production locale de protéines S100A8/A9 dans l'articulation entraîne un recrutement de monocyte classique Ly6C^{high} pro-inflammatoire chez la souris (178). L'augmentation de l'expression du CD11b des monocytes, induit par la calprotectine, favorise l'adhésion de ces derniers au fibrinogène, contribuant à l'accumulation de monocytes sur le site de l'inflammation (179). Les monocytes sécrétant des protéines S100A8 et S100A9 peuvent être recrutés par les ténocytes qui subissent des dommages via la production de CCL2. La production locale de calprotectine stimule en retour la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, CCL2, CCL20 et CXCL10) ainsi que les « matrix metalloproteinase-3 » (MMP3) par le ténocyte entretenant l'inflammation locale (180). La calprotectine amplifie la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par l'activation de la voie NF- κ B et « p38 mitogen-activated protein kinase » (p38MPAK) (181). La protéine S100A8 stimule la production d'IL-1 β , TNF- α et d'IL-6 par les monocytes via l'activation du TLR4 et entretient leur survie en induisant l'expression de protéines anti-apoptotiques (cIAP-1, Bcl-x_L) (182). Le TNF- α et l'IL-1 β induit une amplification de la production de calprotectine par le monocyte par une boucle de rétroaction positive (183). La calprotectine induit également une augmentation de l'expression des MMP 3, 9 et 13 par les macrophages, amenant à la dégradation de la matrice cartilagineuse (184). Un environnement enrichi en protéine S100A9

permet la différenciation des monocytes en ostéoclastes responsables d'une résorption osseuse accrue (185).

Aussi, la calprotectine extra-cellulaire exerce des effets pro-inflammatoires sur les neutrophiles. L'IL-17 induit la libération de protéines S100A8/A9 par le neutrophile (186). Le blocage de la protéine S100A9 diminue la phosphorylation de ERK1/2 et p65 et réduit la sécrétion de chimiokines (CCL2, CCL3, CCL5), la production de NO, de MPO, l'activité MMP9 et la migration des neutrophiles polarisés N1 (pro-inflammatoire), ce qui n'est pas observé avec les neutrophiles N2 (187). La protéine S100A8/A9 active l'inflammasome NLRP3 via le TLR4 induisant l'augmentation de l'expression d'IL-1 β par le neutrophile. Ce dernier va stimuler la myélopoïèse en activant le récepteur à l'IL-1 des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques, entraînant alors une production accrue de neutrophiles (188). La calprotectine joue donc un rôle important dans les fonctions effectrices pro-inflammatoires des neutrophiles.

Wang *et al.* ont rapporté que la stimulation des monocytes par la calprotectine entraîne une production accrue de CXCL10 par activation du TLR4. CXCL10 induit la chimio-attraction de lymphocytes CXCR3+ sur le site de l'inflammation (189). Il a été démontré que la calprotectine est impliquée dans l'expansion des lymphocytes CD8+ autoréactifs dans le modèle de souris sur-exprimant le CD40 ligand (souris transgéniques Cd40lg), ce qui est responsable des manifestations systémiques (auto-anticorps, néphrite, dermatite auto-immune) dans ce modèle (190). Cet effet observé passe par la stimulation du TLR4 par la calprotectine qui induit l'expansion des lymphocytes CD8+ producteur d'IL-17 dans ce modèle. Ces résultats ont été répliqués chez l'Homme. En effet, la stimulation de lymphocytes CD8+ de patients atteints par le lupus érythémateux systémique permet une production accrue d'IL-17 (190).

Les protéines S100A8 et S100A9 n'exercent pas uniquement des fonctions pro-inflammatoires mais elles sont aussi impliquées dans la régulation de l'inflammation (191). Une stimulation prolongée des monocytes par la calprotectine pendant 24h induit un état d'hyporéactivité au stimulus du TLR4 par le LPS, comme ce qui est observé dans la tolérance aux endotoxines (192). Le CD69, capable de se lier à la calprotectine, favorise la conversion de lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocytes Treg, en augmentant l'expression de « Suppressor of cytokine signaling 3 » (SOCS3) impliqués dans l'inhibition de STAT3 permettant la promotion de lymphocytes Treg au dépend des Th17 (193).

Ces données montrent le lien entre l'expression locale de molécules de danger par le système immunitaire inné et le développement et l'entretien d'un processus d'auto-immunité.

2.4.3. Fonctions intra-cellulaires

La calprotectine joue aussi un rôle en intracellulaire essentiel pour les neutrophiles. La protéine S100A8/A9 est impliquée dans l'activation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, complexe enzymatique multiprotéique permettant la production de dérivés réactifs de l'oxygène dans le phagosome du neutrophile dont les anions superoxydes O_2^- qui sont essentiels pour causer la mort des bactéries pathogènes. La protéine S100A8/A9 est capable d'activer la NADPH oxydase par une interaction directe avec le cytochrome b558 et par une augmentation de l'affinité de p67phox pour le cytochrome b558 (194). La protéine S100A8 a aussi des interactions avec p67phox et Rac qui sont des partenaires de la NADPH oxydase (195). Par ailleurs, la protéine S100A8/A9 a la capacité de se lier à des acides gras polyinsaturés. Ainsi, elle transporte et transfère l'acide arachidonique au complexe NADPH oxydase permettant son activation (195) Sous sa forme hétérotétramérique (S100A8/A9)₂, induite par l'augmentation intracellulaire de calcium, la calprotectine permet la polymérisation et le réarrangement rapide de la tubuline du cytosquelette qui est essentiel au processus de phagocytose et de migration cellulaire (196).

2.4.4. Fonctions antimicrobiennes

L'expression de calprotectine par les cellules épithéliales leur procurent une résistance accrue aux infections bactériennes, telle que *Porphyromonas gingivalis*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (197, 198). In vitro, la calprotectine possède la capacité d'inhiber la croissance de nombreuses espèces bactériennes telles que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, et *Listeria monocytogenes* (199). Un des effets anti-microbiens de la calprotectine est expliqué par sa capacité à chélater dans le milieu extra-cellulaire les ions zinc et manganèse empêchant l'accès aux bactéries à ces nutriments qui sont essentiels à leur survie et leur prolifération (200). En plus de son action chimiotactique permettant d'attirer des neutrophiles et des monocytes sur le site siège de l'infection, la protéine S100A9 améliore l'efficacité de la phagocytose de bactéries comme *E.Coli* par les neutrophiles par une voie rééquilibrant l'activation de Erk1/2, Akt, et Syk (201). Enfin, la calprotectine favorise le mécanisme d'autophagie qui est impliqué notamment dans la lutte contre les micro-organisme intra-cellulaire (202).

2.4.5. La calprotectine dans les spondyloarthrites

La calprotectine est un biomarqueur d'activité et pronostique dans de nombreuses pathologies inflammatoires telles que les rhumatismes inflammatoires chroniques, les maladies

inflammatoires chroniques de l'intestin, les infections, les paradontopathies... (199, 203). Dans la PR, le taux de calprotectine sérique reflète l'inflammation articulaire et permet de prédire la progression radiologique à 3 ans (204, 205). En pratique clinique, la calprotectine fécale est utilisée en gastro-entérologie comme un biomarqueur fiable reflétant l'inflammation intestinale. Elle permet d'évaluer l'activité, la réponse au traitement et le risque de rechute dans les MICI mais elle aide aussi à différencier, avec une bonne valeur prédictive négative, les MICI des pathologies fonctionnelles (syndrome de l'intestin irritable) (206, 207).

2.4.5.1. Calprotectine et inflammation dans les spondyloarthrites

Les macrophages sécrétant des protéines S100A8 et S100A9 infiltrent la membrane synoviale au cours des SpA, entraînant une production intra-articulaire locale de calprotectine dix fois supérieure aux taux retrouvés dans le sang (208). Le taux de calprotectine sérique et fécale est augmenté dans la SpA (209). Néanmoins, le niveau de calprotectine sérique ne permet pas d'identifier avec une sensibilité et spécificité suffisante les patients qui ont une SpA axiale parmi des patients avec des lombalgies chronique inflammatoires aspécifiques (210). Le taux de calprotectine sérique et fécale est corrélé positivement avec l'activité de la maladie (BASDAI) et des paramètres inflammatoires (vitesse de sédimentation, CRP) (209, 211).

La calprotectine fécale est intéressante pour exclure une MICI chez les patients consultant pour des troubles fonctionnels digestifs. Plusieurs études ont regardé si dans les SpA le dosage de la calprotectine fécale permettrait d'identifier les patients avec une MICI, d'autant que cette pathologie est souvent associée au SpA. En fonction des études, 21,2 à 70,7% des patients avec une SpA ont des taux élevés de calprotectine fécale. La présence de symptômes gastro-intestinaux est fréquente dans la SA mais sans qu'aucune association avec le niveau de calprotectine fécale soit identifiée (212, 213). 11 à 80% des patients ont à la fois des taux de calprotectine fécale élevés et des lésions digestives inflammatoires macroscopiques, alors que des lésions microscopiques sont retrouvés chez 41,7 à 100% de ces patients (211). Klingberg *et al.* ont identifié qu'un seuil de calprotectine fécale fixé à 266 mg/kg permettait de prédire la survenue d'une MICI dans les 5 ans avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 78,7% (212). Kopylov *et al.* ont décrit qu'un seuil plus bas de calprotectine fécale à 132 mg/kg permettait d'identifier la présence d'une inflammation de l'intestin grêle, diagnostiqué à l'aide d'une capsule vidéo-endoscopique avec des propriétés métrologiques plus limitées (sensibilité 66,7%, spécificité 76,9%) (213). Cypers *et al.* rapportent qu'un seuil fixé à 85 mg/kg est associé à l'existence d'une inflammation digestive (sensibilité 64,3%, spécificité 73,3%). Enfin

Ostgard *et al.* ont établi qu'un seuil fixé à 100 mg/kg a une sensibilité de 92% et une spécificité de 82% pour identifier les patients avec des lésions intestinales (214). Plusieurs facteurs peuvent expliquer les résultats hétérogènes de ces études. Tout d'abord, toutes les études n'ont pas utilisé les mêmes kits de dosage de la calprotectine fécale. D'autre part, les AINS semble augmenter le taux de calprotectine fécale. Arrêter les AINS trois semaines avant le dosage de la calprotectine fécale permet de réduire le taux moyen de calprotectine fécale de 116 mg/kg (212). Les critères d'inclusion et d'exclusion dans les études diffèrent concernant l'utilisation des AINS (**Tableau 1**). Enfin, la méthode d'évaluation de l'inflammation digestive n'était pas identique dans les études, certaines utilisant une vidéocapsule et/ou une iléocoloscopie. Près de 60% des patients avec une SpA ont une inflammation microscopique infraclinique, ce qui peut expliquer les taux élevés de calprotectine observés dans cette population. Cette inflammation microscopique pourrait être le signe précurseur de développement d'une MICI. Néanmoins, ce lien n'est pas clairement établi et actuellement la découverte d'une inflammation microscopique digestive n'est, à ce jour, pas suivi d'une prise en charge thérapeutique spécifique. D'autres études sont nécessaires avant que la calprotectine fécale soit utilisée en pratique clinique courante.

Tableau 1. Calprotectin fécale et identification de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin associées au spondyloarthrites

| Etudes | Type d'étude | Population | Evaluation inflammation digestive | Résultats |
|------------------------|----------------------------------|---|---|---|
| Cypers H et al. 2016 | Etude transversale Cohorte GIANT | 44 ASAS+ | SpA Iléocoloscopie avec biopsies (4-14 de l'iléon terminal et colon sur muqueuse pathologique et macroscopiquement saine) Arrêt AINS 7 jours avant pour seulement 41% des SpA | Pas d'arrêt AINS pour CF (ELISA Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) Seuil CF > 85 mg/kg pour diagnostic MICI Se = 64,3%, Sp = 73,3% AUC = 68,8 |
| Klingberg et al. 2017 | Etude longitudinale (5 ans) | 204 mNY+ | SA Iléocoloscopie avec biopsies Arrêt AINS 3 semaines | Pas d'arrêt AINS pour CF (ELISA Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) Seuil CF > 266 mg/kg prédit développement Crohn chez SA à 5 ans Se = 100%, Sp = 78,7% AUC = 0,913 |
| Kopylov U et al. 2018 | Etude transversale | 64 ESSG ou mNY+ | SpA Vidéo capsule endoscopique (Lewis score) Iléocoloscopie Exclusion des patients sous AINS dans les 4 semaines précédentes | Exclusion des patients sous AINS dans les 4 semaines précédentes (Quantum Blue semiquantitative assay, Bühlmann) Seuil CF > 132 mg/kg pour diagnostic Crohn chez SA (avec capsule endoscopique) Se = 66,7%, Sp = 76,9% AUC = 0,75 |
| Østgård RD et al. 2018 | Etude transversale | 30 ASAS+ (15 CF<50mg/kg et 15 CF>100 mg/kg) | SpA (15 endoscopique score) 15 Iléocoloscopie biopsies) Arrêt AINS 4 semaines avant | Arrêt AINS 4 semaines avant CF (ELISA Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) Seuil CF > 100 mg/kg pour détection lésions inflammatoires intestinales Se 92%, Sp 82% |

CF : Calprotectine fécale, ASAS : Assessment of SpondyloArthritis international Society, GIANT : Ghent Inflammatory Arthritis and Spondylitis, ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay, AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens, MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin, AUC : Area Under the Curve AS : Ankylosing Spondylitis, mNY : modified New York, ESSG : European Spondyloarthropathy Study Group, Se : sensibilité, Sp : Spécificité

2.4.5.2. Calprotectine et prédiction de progression radiologique dans les spondyloarthrites

La calprotectine sérique est indépendamment associée à la présence de dommages structuraux périphériques dans le rhumatisme psoriasique (215). Turina *et al.* ont identifié que la calprotectine sérique permet d'identifier les patients atteints par une SA établie qui sont à risque de développer de nouvelles lésions structurales au rachis à 2 ans (aggravation du score « modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score » (mSASSS) ≥ 2 points). En définissant un seuil de calprotectine sérique à $> 0,5 \mu\text{g/mL}$, la calprotectine permet de prédire le risque d'aggravation du score mSASSS avec une sensibilité de 80%, une spécificité de 62% (216). Cependant, l'intérêt du dosage de la calprotectine sérique n'a pas été évalué dans les SpA débutantes. Nous avons donc mené une étude (**article 2**) pour répondre à cette question, en utilisant les données de la cohorte DEvenir des Spondylarthropathies Indifférenciées Récentes (DESIR), cohorte multicentrique prospective française (217).

2.5. Spondyloarthrites et microbiote : axe intestin-articulation

Une inflammation digestive microscopique infraclinique est retrouvée chez 46% à 57% des patients avec une SA (218-220). Environ 7% des patients avec une SpA axiale développent une MICI (11). Il existe deux types de présentation histologique de l'inflammation microscopique intestinale dans la SpA (221). La forme aiguë de présentation histologique similaire à ce qui est retrouvé en cas d'infection digestive, avec une entérobactérie entéro-invasive, caractérisée par une infiltration de la lamina propria avec de nombreux neutrophiles. Et la forme chronique, ressemblant à ce qui est observé dans la maladie de Crohn, où est retrouvée une distorsion des cryptes, associée à une atrophie villositaire et une infiltration de cellules mononucléaires, au niveau de la lamina propria, accompagnées de la formation de follicules lymphoïdes. Les patients avec une inflammation digestive chronique ont une sacro-iliite plus étendue en IRM, faisant un lien entre l'inflammation survenant au niveau de la muqueuse intestinale et l'articulation (222). 90% des SA ont une dysbiose intestinale qui les différencient des patients sains (223). Le microbiome iléal des patients avec une SpA est modifié, comparativement à des sujets sains, avec une augmentation des *Lachnospiraceae*, *Ruminococcace*, *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae*, et *Bacteroidaceae* et une diminution des *Veillonellaceae* et *Prevotellaceae* (224). Les bactéries adhérentes et invasives, retrouvées dans l'iléon lors de la SpA, sont responsables de l'induction de la production locale de zonuline par les cellules épithéliales digestives. La zonuline est une protéine impliquée dans le contrôle de la perméabilité digestive via le contrôle des jonctions serrées (156). La zonuline réprime dans les

SpA l'expression des protéines impliquées dans les jonctions serrées des cellules épithéliales digestives (claudin 1, claudin 4, occludin et zonula occludens) mais aussi des cellules endothéliales (occludine, VE-cadherine). Cela entraîne une perméabilité accrue de la barrière épithéliale et endothéliale responsable d'une translocation de produit bactériens (LPS, protéine de liaison aux LPS, protéines de liaison aux acides gras) et autres antigènes (153, 156). Ces altérations de la barrière intestinale sont aussi observées chez les rats transgéniques HLA-B27 et sont réduites à la suite d'un traitement par antibiotiques, faisant suspecter une implication du microbiote (156). L'hyperperméabilité intestinale empêche la séparation entre le contenu de la lumière intestinale et l'espace sous-épithéliale occasionnant une activation incontrôlée des cellules immunitaires résidentes dans la muqueuse digestive. Ces cellules ainsi activées vont recirculer pour rejoindre l'articulation et entraîner le développement de l'arthrite (225). Les ILC3 produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 se développent dans l'intestin des patients avec une SA et sont aussi retrouvés dans le sang, le liquide synovial et la moelle osseuse de ces patients (226). Les ILC3 retrouvées sur-expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ ce qui laisse suggérer une origine digestive à ces cellules. L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est impliquée dans l'adressage (« homing ») des lymphocytes au tissu lymphoïde associé au tube digestif (« gut-associated lymphoid tissue » ou GALT) en interagissant avec « mucosal addressin cell adhesion molecule-1 » (MAdCAM-1) qui est aussi sur-exprimé dans l'intestin et la moelle osseuse des patients avec SA (226). Une augmentation du nombre de lymphocytes circulants, dont des $\gamma\delta$ exprimant $\alpha 4\beta 7$ et sur-exprimant le TLR2 et le TLR4, est aussi observé dans le sang de patients avec une SpA axiale apportant des arguments supplémentaires pour l'existence d'un axe intestin-articulation (227). Récemment, Tajik *et al.* ont démontré dans le modèle d'arthrite induite au collagène, en utilisant des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente photoconvertible Kaede, que des lymphocytes T CD4⁺ originaires de l'intestin grêle sont recrutés dans l'articulation au cours du développement de l'arthrite (228). Cette migration est bloquée par un traitement antagoniste de la zonuline qui atténue le développement de l'arthrite. Ces données confirment donc que des cellules immunitaires sont capable de migrer de l'intestin vers les articulations pendant le développement de l'arthrite à la suite d'une augmentation de la perméabilité digestive médiée par la zonuline (228).

Le métabolisme des bactéries est une source de production de petites molécules (<1-1,5 KDa) appelées métabolites telles que les acides gras à chaîne courte, la vitamine B et les dérivés du tryptophane qui ont des propriétés immunorégulatrices locales et systémiques (225). Le métabolome intestinal est d'ailleurs modifié dans la SA comparé à des sujets sains, avec

notamment une altération dans la voie du tryptophane (229) et une diminution du butyrate, métabolite connu pour ses propriétés anti-inflammatoires (230).

Ainsi, la dysbiose intestinale survenant durant les SpA influencées par le terrain génétique, est responsable d'une augmentation de la perméabilité intestinale, de la production de métabolites microbiens qui influencent la polarisation immunitaire locale et systémique et de l'activation de cellules immunitaires résidentes appartenant à l'immunité de type 3 qui migrent secondairement dans l'articulation pour déclencher l'initiation de l'arthrite.

3. L'arthrite réactionnelle modèle d'étude de l'interaction entre bactérie et arthrite

Un nombre croissant de preuves indique que la composition et la fonction du microbiote intestinal, notamment les métabolites dérivés des bactéries, ont un impact sur l'immunité et le métabolisme de l'hôte par le biais de processus de dialogues directs et indirects. L'étude des mécanismes impliqués dans une maladie rhumatismale inflammatoire déclenchée par une bactérie identifiée (par exemple *Chlamydia*) est une occasion unique d'améliorer notre compréhension du mécanisme immunologique induit par les bactéries qui font basculer le système immunitaire dans un état inflammatoire responsable de l'apparition de l'arthrite.

3.1. Historique

La première description d'arthrite réactionnelle retrouvée remonte au 4^{ème} siècle avant J.C. lorsque qu'Hippocrate a reporté dans ses rapports que « des jeunes hommes souffrent de la goutte qu'après un rapport sexuel » sans que le lien avec une infection sexuellement transmissible soit évoqué (231, 232). Le terme « goutte » à cette époque est utilisé pour définir toute arthrite aiguë. Christophe Collomb est probablement le premier européen à contracter une arthrite réactionnelle durant l'un de ses voyages aux Antilles. En septembre 1494, il est atteint d'une fièvre associée à une confusion et des arthrites sévères des membres inférieurs. Quatre ans plus tard est relatée une rechute avec une arthrite associée à une inflammation oculaire qui s'est chronicisée et l'a rendu infirme jusqu'à la fin de sa vie en 1506 (231, 232). D'autres descriptions de cas d'arthrite réactionnelle sont retrouvées dans la littérature jusqu'au début du XX^{ème} siècle (232). En 1916, les Français Noel Fiessinger et Edgar Leroy ont décrit, à la suite d'une épidémie, le développement d'arthrites associées à des urétrites et des conjonctivites. Ils nomment cette manifestation « Syndrome conjonctivo-uréthro-synovial »

(232). Dans la même année, Hans Reiter a publié le cas d'un lieutenant de l'armée prussienne qui a présenté, huit jours après une dysentérie, des polyarthralgies des genoux, chevilles, coudes, poignets et des articulations-interphalangiennes associées à une urétrite et des conjonctivites (232). Tout comme Leroy et Fiessinger, il a identifié le lien entre la dysentérie et le développement de l'arthrite. Il a donné son nom à ce syndrome, « le syndrome de Reiter », nom qui fut longtemps utilisé par la communauté médicale et scientifique. Ce terme est ensuite tombé en désuétude et certains médecins se sont opposés à son emploi à la suite de la mise en lumière des activités de recherche du Dr. Reiter pendant la seconde guerre mondiale, période où il a notamment autorisé des expériences médicales sur des prisonniers des camps de concentration.

Aujourd'hui, le terme d'arthrite réactionnelle est utilisé et plus adapté car seulement un sous-ensemble de patients présente le tableau clinique du syndrome conjonctivo-uréthro-synovial. Le terme « arthrite réactionnelle » est introduit par Ahvonen *et al.* en 1969 pour décrire une arthrite survenant à la suite d'une infection bactérienne extra-articulaire (urogénitale ou digestive) avec impossibilité de mettre en évidence en culture l'agent bactérien causal dans l'articulation (233, 234). Il s'avère que, des années plus tard, des antigènes, de l'ADN et de l'ARN bactériens sont retrouvés dans les articulations. Il existe même des bactéries actives métaboliquement dans un état de persistance (*C. trachomatis*) qui empêchent leur identification par des techniques de culture. Deux formes d'arthrite réactionnelle peuvent être retenues (234):

- Une arthrite se développant de façon « réactionnelle » à la présence d'une bactérie persistante viable, métaboliquement active mais non cultivable dans l'articulation (arthrite réactionnelle à *C. trachomatis*)
- Une arthrite déclenchée uniquement à la suite d'une infection extra-articulaire (arthrite réactionnelle induite par des entéropathogènes) où seulement des fragments d'antigènes bactériens peuvent être identifiés dans les articulations.

3.2. Présentation clinique de l'arthrite réactionnelle

L'arthrite réactionnelle est un rhumatisme inflammatoire, appartenant au spectre des SpA, se caractérisant par la survenue d'arthrites inflammatoires déclenchées dans les suites d'infections génito-urinaires, gastro-intestinales et parfois pulmonaires. Il est communément admis que l'arthrite dans cette maladie est aseptique. De nombreux agents infectieux peuvent être responsables d'arthrite réactionnelle (235). Les principaux agents dits « historiques », responsables d'arthrite réactionnelle, sont *Chlamydia trachomatis*, bactéries

responsables d'infections génito-urinaire, *Salmonella enterica* (*S. Typhimurium enteritidis*, *S. Paratyphi B et C*), *Shigella spp.* (*S. dysenteriae* , *S. flexneri*, *S. sonnei*) , *Campylobacter spp.* (*C. jejuni*, *C. coli*) et *Yersinia spp* (*Y. enterocolitica* (O3, O9), *Y. pseudotuberculosis*) qui sont des entéropathogènes (235). Depuis, le tableau des agents infectieux responsables d'arthrite réactionnelle s'est considérablement agrandi (**Tableau 2**).

Tableau 2. Principaux pathogènes retrouvés associés à l'arthrite réactionnelle (liste non exhaustive).

| Infection urogénitale | Infection digestive | Infection respiratoire | Autre |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | <i>Salmonella enterica</i> (Typhimurium enteritidis, S. | <i>Chlamydia pneumoniae</i> | VIH |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | Paratyphi B et C) | Streptocoque hémolytique du groupe A | Parvovirus B19 |
| <i>Mycoplasma genitalum</i> | <i>Shigella spp.</i> (S. flexneri, S. sonnei) | | <i>Borellia burgdorferi</i> |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | <i>Campylobacter spp.</i> (C. jejuni, C. coli) | | <i>Brucella abortus</i> |
| <i>Garneralla vaginalis</i> | <i>Yersinia spp.</i> (Y. enterocolitica (O3, O9), Y. pseudotuberculosis) | | Bacille Calmette-Guérin |
| | <i>Clostridium difficile</i> | | Arboviroses |
| | <i>Escherichia Coli</i> | | SARS-Cov2 |
| | <i>Bacillus cereus</i> | | |
| | <i>Amoeabae</i> | | |
| | <i>Cryptosporidium</i> | | |
| | <i>Giardia lamblia</i> | | |
| | <i>Hélicobacter pylori</i> | | |
| | <i>Strongyloides spp</i> | | |
| | <i>Tropheryma whippelii</i> | | |

Tableau adapté de García-Kutzbach *et al.* (236)

L'arthrite réactionnelle touche préférentiellement les adultes jeunes entre 30-40 ans (237). La présentation clinique associe :

- Des symptômes liés à l'agent causal survenant dans les quatre semaines avant l'apparition des manifestations musculosquelettiques : urétrite et diarrhées.
- Des symptômes articulaires : le plus souvent des oligoartrites asymétriques (72% des cas) non destructrices touchant principalement les articulations des membres inférieurs comme le genou (62% des cas), l'articulation talo-crurale (58% des cas) et les métatarso-phalangiennes (48.5% des cas) (238). Les patients peuvent aussi déclencher des enthésites et des dactylites (239). Les lombalgies inflammatoires ne sont pas rares dans cette population et des sacro-iliites radiographiques et des syndesmophytes sont aussi rapportés (240).
- Des manifestations extra-articulaires qui touchent à la fois la peau (kératodermie blennorragique, balanite circinée, érythème noueux), les yeux (conjonctivite le plus souvent et plus rarement des kératites, épisclérite et uvéite antérieure aiguë), le tractus génito-urinaire (urétrite, prostatite, cervicite, cystite, salpingite,...) et le tube digestif (diarrhées) (237). Des manifestations cardiaques, à type d'insuffisance aortique, sont aussi décrites (241).

La triade classique combinant la présence d'une urétrite, arthrite et conjonctivite (syndrome uréthro-oculo-synovial), quant à elle, serait retrouvée dans uniquement un tiers des cas (235).

L'évolution de l'arthrite réactionnelle est très variable d'un patient à l'autre dépendant à la fois du terrain génétique et de l'agent causal. La durée d'une arthrite réactionnelle aiguë est de 3 à 5 mois mais environ 25% des patients développent une forme chronique (242). 30 à 50% des arthrites réactionnelles sont HLA-B27 positives (243). En 2005, une épidémie de dysenterie à *Salmonella enteritidis* a touché 592 individus en Ontario à la suite de la consommation de germes de haricots contaminés. 62,5% des patients atteints, qui ont répondu à un questionnaire envoyé par mail, ont déclaré avoir des symptômes évocateurs d'arthrite réactionnelle. Le HLA-B27 est associé au risque de contracter une infection à salmonelle et de développer une arthrite réactionnelle chronique (244).

En 2009, l'« American College of Rheumatology » (ACR) a proposé pendant le 4^{ème} « International Workshop on Reactive Arthritis » des critères de classification qui pourraient être utilisés pour définir l'arthrite réactionnelle (245-247) (**Tableau 3**). Au final, ces critères de classification ne sont pas appliqués en pratique clinique courante ou dans la littérature. Le

principal problème dans l'arthrite réactionnelle est de pouvoir identifier l'agent causal qui ne peut pas être isolé dans la plupart des cas (surtout pour les entéropathogènes) quand les manifestations rhumatologiques surviennent, soit plusieurs semaines après l'infection initiale. Cette dernière peut se résoudre en l'absence de toute antibiothérapie du fait de l'intervention du système immunitaire rendant impossible son identification. Ces critères sont adaptés aux arthrites réactionnelles « historiques » mais pas aux nombreuses bactéries émergentes qui donnent des arthrites réactionnelles. Tous ces paramètres expliquent la sous-utilisation de ces critères de classification.

Tableau 3. Critères de classification de l'arthrite réactionnelle retenus suite au « 4th International Workshop on Reactive Arthritis » en 1999 par American College of Rheumatology (ACR).

| | |
|-------------------------|--|
| Critères majeurs | 1) Arthrite : $\geq 2/3$ critères parmi <ul style="list-style-type: none"> • Arthrite asymétrique • Mono ou oligoarthrite • Atteinte des membre inférieurs |
| | 2) Arthrite précédée par une infection symptomatique : 1 critère parmi <ul style="list-style-type: none"> • Entérite (diarrhée de durée ≥ 1 jour, survenu 3 à 6 semaines avant le début de l'arthrite) • Urétrite (Dysurie ou trouble urinaire de durée ≥ 1 jour, survenu 3 à 6 semaines avant le début de l'arthrite) |
| Critères mineurs | Mise en évidence de l'infection causale <ul style="list-style-type: none"> - Ligase chain reaction (LCR) sur un écouvillonnage urétral/cervical positif pour <i>Chlamydia trachomatis</i> - coproculture positive pour un entéropathogène connu pour être associé avec l'arthrite réactionnelle - Mise en évidence d'une infection synoviale persistante par immunohistologie ou par PCR <i>Chlamydia</i>. |

Arthrite réactionnelle certaine : deux critères majeurs et un critère mineur

Arthrite réactionnelle probable : deux critères majeurs sans critères mineurs ou un critère majeur avec un ou plusieurs critères mineurs. Tableau adapté de Selmi *et al.* (247)

3.3. Arthrite réactionnelle une maladie rare sous diagnostiquée ?

L'arthrite réactionnelle est une maladie relativement rare dont la prévalence et l'incidence annuelle est incertaine. En effet, les études sur le sujet sont très hétérogènes avec des résultats dépendant grandement de la région où l'étude est menée, de la définition d'arthrite réactionnelle utilisée (identification ou non du pathogène responsable) et de la taille des études. L'incidence annuelle en Europe de l'arthrite réactionnelle induite par tous les agents microbiens confondus est estimée entre 0,9 à 9,3 cas pour 100 000 habitants (235). Il existe une prédominance

masculine 9:1 de l'arthrite réactionnelle induite à *C. trachomatis* (5 :1 à 10 :1) ce qui n'est pas le cas pour les entéropathogènes (1 :1) (235). Une méta-analyse en 2013 a estimé le risque de développer une arthrite réactionnelle dans les suites d'une infection à *Campylobacter*, *Salmonella* ou *Shigella*, respectivement à 9, 12 et 12 pour 1000 patients infectés (248). L'incidence de l'arthrite réactionnelle acquise après infection uro-génitale à *Chlamydia trachomatis* est plus élevée et estimée entre 3,0 à 8,1% (249). Il est probable que l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* soit sous-diagnostiquée étant donnée la forte prévalence des infections génitales asymptomatiques. L'incidence de l'arthrite réactionnelle est aussi très variable d'un pays à l'autre car dépendant des conditions environnementales et sanitaires qui influencent l'incidence des infections susceptibles d'engendrer cette pathologie.

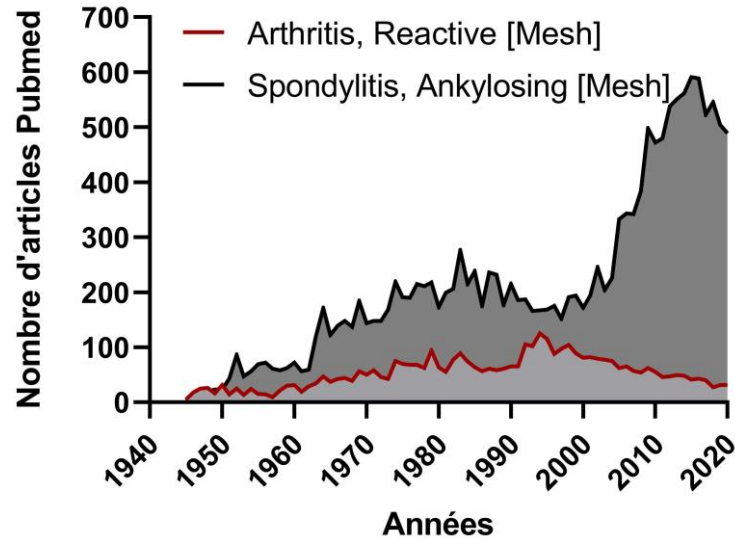
L'incidence de l'arthrite réactionnelle diminue dans les pays développés comme la Finlande (250) et l'Australie alors que le nombre d'infections génitales à *Chlamydia* est en progression (251). La raison expliquant cette déconnexion entre le nombre d'infection à *Chlamydia* et l'évolution de l'incidence de l'arthrite réactionnelle est inconnue. Une hypothèse soulevée est celle d'un meilleur dépistage et d'une prise en charge précoce par une antibiothérapie adaptée. Néanmoins, il n'est pas prouvé avec certitude que le traitement antibiotique de l'infection à *Chlamydia trachomatis*, avant l'apparition des premiers symptômes d'arthrite réactionnelle, permet de réduire la probabilité de cette dernière. Une étude prospective menée au Japon rapporte que l'incidence observée d'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia trachomatis* est plus faible (1 patient sur 123) que ce qui est observé dans la littérature (252). Ces auteurs suggèrent, comme tous les patients sont traités par une dose unique d'un gramme d'azithromycine avec confirmation de la guérison de l'infection par « Polymerase Chain Reaction » (PCR), que le traitement précoce de l'infection pourrait diminuer l'incidence de l'arthrite réactionnelle. Cependant, la durée supposée de l'infection à *Chlamydia trachomatis* avant le début du traitement par antibiotique n'est pas évaluée. L'incidence en augmentation de ce type d'infection, le dépistage qui concerne moins de 10% de la population jeune en Australie, et le fait que cette infection est souvent asymptomatique laisse penser que de nombreux patients ne sont pas traités précocement et que d'autres facteurs, à ce jour inconnus, entrent en compte (251). Près de la moitié des rhumatologues Canadien, membres de la « Canadian Rheumatology Association », ayant répondu à une enquête, considèrent que l'incidence et la sévérité de l'arthrite réactionnelle diminuent au Canada. Pour eux, ces constatations s'expliquent par un meilleur contrôle sanitaire de l'alimentation et de l'eau et d'un traitement plus précoce des infections sexuellement transmissibles (253). Malgré ces précédents résultats, une étude bi-

centrique conduite en France montre que l'incidence de l'arthrite réactionnelle est stable avec plus de formes chroniques retrouvées (254).

La diminution de l'incidence rapportée pourrait être expliquée par un sous-diagnostic de cette pathologie. L'identification dans le sérum d'anticorps anti-bactériens dirigés contre des bactéries responsables d'arthrite réactionnelle n'est pas rare dans les SpA et SA (255, 256). Il faut tout de même mettre en lumière que les tests sérologiques utilisés manquent de spécificité étant soumis à des réaction croisées (257). De l'ADN de *Chlamydia trachomatis* est retrouvé dans le tissu synovial de 62% de patients souffrant de SpA chronique indifférenciée (258). Une étude menée en Inde a même retrouvé que des patients avec une SpA indifférenciée, sans symptôme urogénital, ont des corps élémentaires de *Chlamydia trachomatis* (forme viable) dans le liquide articulaire (259). Ces données suggèrent une prévalence non négligeable d'infections bactériennes arthritogéniques dans les SpA indifférenciées qui devraient être classées dans les arthrites réactionnelles (260).

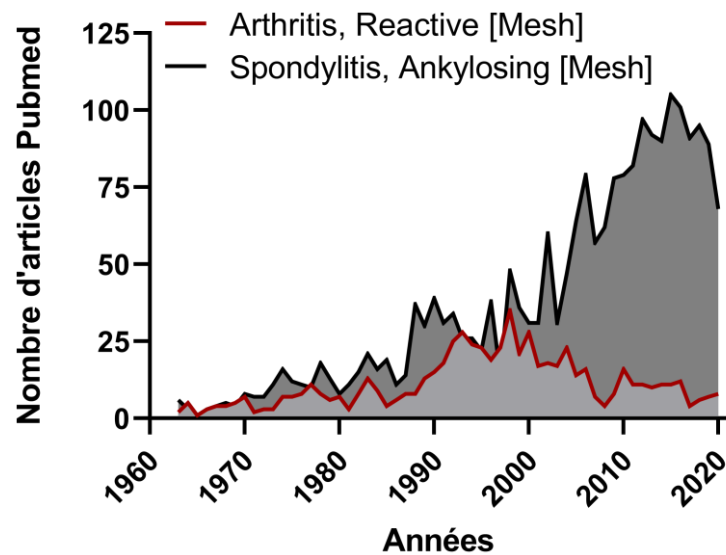
La recherche sur l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* est en franche diminution ces dernières années au vu du nombre déclinant d'articles publiés révélant la diminution de l'intérêt de la communauté scientifique pour cette pathologie (257). Une analyse de la base de données Pubmed montre un déclin des publications sur ce sujet depuis la fin des années 1990 comparativement à la SA (**Figure 8 et 9**).

Figure 8. Nombre d'articles (tout type) publiés disponibles dans Pubmed sur l'article réactionnelle et la spondylarthrite ankylosante de sa création à 2020.



Recherche effectuée dans Pubmed le 01/08/2021 avec les mots Mesh Arthritis, Reactive [Mesh] et Spondylitis, Ankylosing [Mesh].

Figure 9. Nombre d'articles de revue de la littérature, revue systématique de la littérature ou de méta-analyse publiés sur l'arthrite réactionnelle et la spondylarthrite ankylosante disponibles dans Pubmed de sa création jusqu'en 2020.



Recherche effectuée dans Pubmed le 01/08/2021 avec les mots Mesh Arthritis, Reactive [Mesh] et Spondylitis, Ankylosing [Mesh] et l'application des filtres Meta-Analysis, Review et Systematic Review.

3.4. Traitement de l'arthrite réactionnelle

L'efficacité d'un traitement antibiotique sur les manifestations d'arthrite réactionnelle reste controversée. Une étude en 2010, de bonne qualité méthodologique (multicentrique, randomisée, contrôlée contre placebo et en double aveugle), a été conduite pour évaluer l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques dans l'arthrite réactionnelle chronique (évolution ≥ 6 mois) (261). Les patients inclus devaient répondre aux critères de SpA de l'European Spondyloarthritis Study Group (ESSG), avoir une durée d'évolution de la maladie supérieure à 6 mois et avoir une PCR positive à *C. trachomatis* ou *C. pneumoniae* dans les cellules mononuclées sanguines périphériques et/ou le tissu synovial. La randomisation était stratifiée selon l'âge et la durée de la maladie et trois bras de traitement maintenu pendant 6 mois ont été testés : doxycycline 100mg x2/j per os + rifampicine 300mg x1/j per os vs. azithromycine 500mg x1/j per os pendant 5 jours puis 500 mg 2 fois par semaine associé à de la rifampicine 300mg/j per os et un groupe contrôle. Le critère d'évaluation principal était d'avoir une amélioration d'au moins 20% de 4 variables sur 6 parmi : nombre d'articulations gonflées (/76), nombre d'articulations douloureuses (/78), durée de la raideur lombaire matinale, échelle visuelle analogique (EVA) de la douleur lombaire, EVA des douleurs intéressant les articulations périphériques et EVA globale à 6 mois. Au total 42 patients étaient recrutés et inclus. La durée moyenne de l'arthrite réactionnelle était élevée (>10 ans). Finalement 63% des patients sous antibiotiques avaient une amélioration de l'arthrite réactionnelle selon le critère principal défini contre 20% pour le placebo ($p=0,01$). 70% des sujets sous antibiotiques voyaient une négativation de la PCR dans les cellules mononuclées sanguines périphériques et le tissu synovial contre 27% pour le groupe placebo à 6 mois. Sur les 12 patients qui avaient des cellules mononuclées sanguines périphériques PCR négatives à 6 mois sous antibiotiques, 83% restaient négatives à 3 mois de l'arrêt de l'antibiothérapie. Néanmoins, le nombre de sujets inclus était restreint et ne permettait pas de comparer les différentes stratégies d'antibiothérapies. Aussi, cette étude se limitait aux patients qui présentaient une infection à *Chlamydia* persistante identifiée par PCR, tests qui ne sont pas couramment utilisés en pratique clinique. Enfin, aucune évaluation clinique n'a été réalisée à distance de l'arrêt de ce traitement pour savoir si l'amélioration clinique perdurait dans le temps.

A la suite de ce travail, une méta-analyse en 2013 a été réalisée (262). Ce travail a combiné les résultats de 7 essais thérapeutiques (375 patients), dont celui de 2010, et n'a pas montré que les antibiotiques augmentaient la rémission ou diminuaient le nombre d'articulations atteintes, la douleur ou l'activité de la maladie. Cependant, les résultats sont à nuancer du fait d'une hétérogénéité importante des études qui était inévitable : certaines études étaient en aveugle et

d'autres non, les schémas thérapeutiques étaient très différents d'une étude à l'autre (choix de molécule, monothérapie ou combinaison d'antibiotiques, posologies et durées différentes), de divergences dans les critères d'inclusions (définition de l'arthrite réactionnelle), certains contrôles avaient reçu initialement une antibiothérapie et d'autres non, des définitions de la rémission différentes, l'inclusion dans certaines études des arthrites réactionnelles induites par *Chlamydia* ou par des entéropathogènes ou par les deux, et des durées d'évolution de la maladie différentes (aiguë vs. chronique). Les analyses en sous-groupes ne mettaient pas en évidence non plus d'effet positif des antibiotiques sans corriger complètement les problèmes d'hétérogénéité.

Des essais thérapeutiques en ouvert et non contrôlés montrent que les anti-TNF sont efficaces dans l'arthrite réactionnelle ne répondant pas aux traitements conventionnels, sans événements secondaires préoccupants rapportés, notamment infectieux (263-266).

Il n'existe pas à proprement parler de recommandations de prise en charge thérapeutique de l'arthrite réactionnelle. Globalement, en pratique courante, la prise en charge est comparable à celle des autres SpA (40). La stratégie thérapeutique actuellement utilisée est de proposer des AINS en 1^{ère} intention et de réaliser des infiltrations de corticoïdes en intra-articulaire pour cibler les arthrites persistantes. En cas d'inefficacité, l'introduction d'un traitement de fond conventionnel synthétique peut être envisagé. Il y a, à ce jour, uniquement des données sur l'efficacité de la sulfasalazine suggérant une efficacité modeste de ce traitement dans l'arthrite réactionnelle résistante aux AINS (267). En cas d'arthrite réactionnelle chronique en échec de tous ces traitements, un traitement par anti-TNF peut être proposé. Il n'y a actuellement pas assez de preuves pour recommander une antibiothérapie combinée prolongée dans l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia* vu que l'efficacité à long terme n'est pas connue d'autant plus que cette stratégie n'est pas dénuée du risque de favoriser l'émergence de bactéries multirésistantes.

3.5. Chlamydia

Les *Chlamydia* sont des bactéries à Gram négatifs à développement intracellulaire obligatoire qui prolifèrent au sein des vacuoles des cellules hôtes eucaryotes. La famille des *Chlamydiaceae* est divisée en deux genres : *Chlamydia* et *Chlamydophila*. On retrouve dans le genre *Chlamydophila* deux espèces engendrant des pathologies chez l'homme : *C. pneumoniae*

(pneumonie, bronchite) et *C.psittaci* (zoonose d'origine aviaire entraînant des pneumonies chez l'homme). Le genre *Chlamydia*, quant à lui, comprend une seule espèce chez l'homme, *C. trachomatis*, les deux autres étant retrouvées uniquement chez l'animal : *Chlamydia muridarum* (souris), *Chlamydia suis* (porc). 115 millions de nouveaux cas d'infection à *Chlamydia* surviennent chaque année dans le monde (231). L'infection urogénitale à *C. trachomatis* est la première cause d'arthrite réactionnelle et d'infection bactérienne sexuellement transmissible contrastant avec les infections à *C. pneumoniae* qui sont beaucoup moins pourvoyeuses de cette maladie (231, 268). L'origine de cette différence d'incidence dépendant de l'espèce de *Chlamydia* n'est pas connue. 70-90% des infections génito-urinaires à *Chlamydia* sont asymptomatiques et se chronicisent (269, 270). Il existe plusieurs serovars de *C. trachomatis* responsables de manifestations cliniques différentes. Ces sérovars sont définis selon les antigènes retrouvés sur la « Major Outer Membrane Protein » (MOMP) (270) :

- Serovars A, B, Ba et C responsables du trachome, kératoconjonctivite chronique pouvant entraîner une cécité. Le trachome est d'ailleurs la 7^{ème} cause de cécité dans le monde (271).
- Serovars D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J et K responsables d'infections urogénitales (infection sexuellement transmissible) engendrant urétrite chez l'homme et cervicite chez la femme, le plus souvent de façon silencieuse. L'infection peut s'étendre et donner des salpingites chroniques responsables d'infertilité tubaire.
- Sérovars L1, L2, L2a et L3 responsables de la lymphogranulomatose vénérienne

C. trachomatis est retrouvée sous deux formes : la forme infectieuse extra-cellulaire non répliquative appelée corps élémentaire (diamètre de 0,2 μm) ; et la forme adaptée à la survie intra-cellulaire qui est métaboliquement active et répliquative mais qui ne peut pas infecter de nouvelles cellules, le corps réticulé (diamètre de 0,8 μm).

Un cycle d'infection dure entre 48 et 72h (**Figure 10**) (272) :

- Initialement *C. trachomatis* est sous sa forme infectieuse extracellulaire : le corps élémentaire.
- Il s'attache alors à une cellule hôte par les héparanes sulfates puis se fixe à la membrane plasmique de la cellule et infecte cette dernière (0-2h).
- Une inclusion cytoplasmique se forme ensuite et *C. trachomatis* devient corps réticulé (2-12h)

- S'ensuit une multiplication par fission binaire (12-18h)
- A la fin de son cycle de réplication, elle reprend sa forme infectieuse (corps élémentaire) (24-40h) puis est libérée dans le milieu extra-cellulaire soit en provoquant une lyse de la cellule hôte soit par libération des inclusions (48-72h).

L'infection se propage ensuite aux cellules avoisinantes et un nouveau cycle démarre.

Figure 10 : Cycle d'infection du *Chlamydia*.

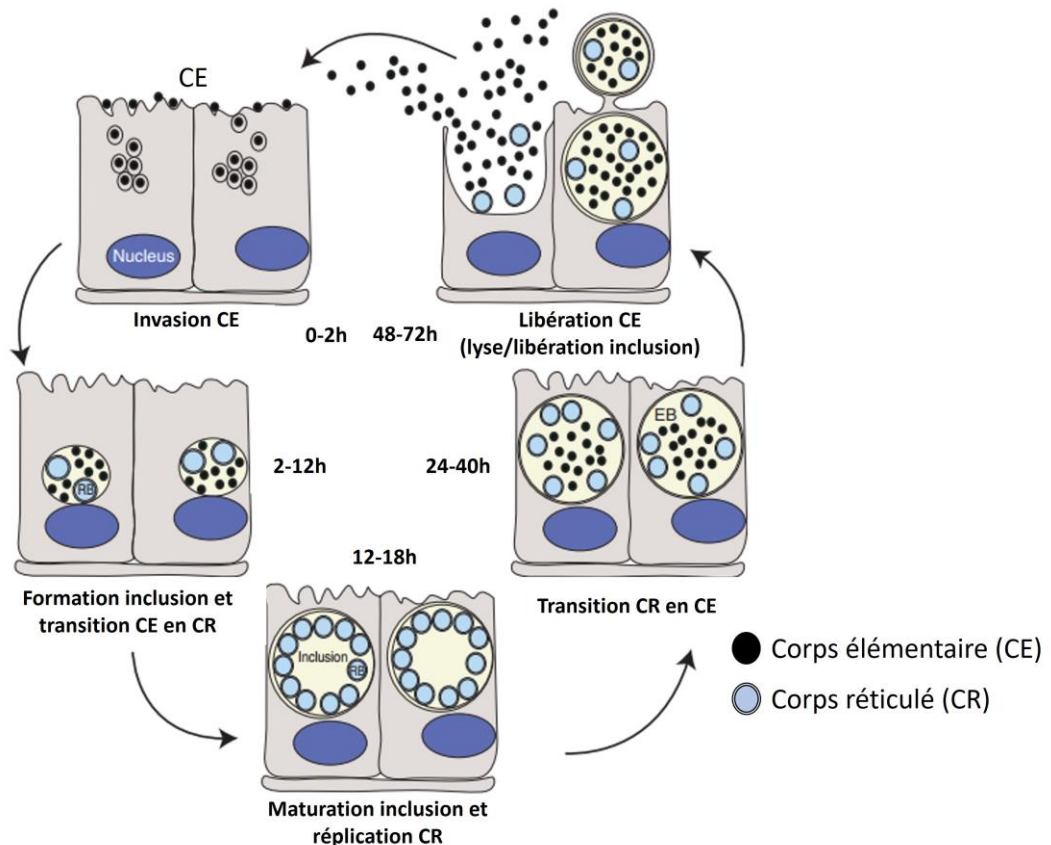


Figure issue et adaptée de l'article Bastidas *et al.* (272)

L'IFN- γ est une cytokine clé connue pour avoir un effet-anti microbien sur la *Chlamydia*. Elle induit l'expression de l'enzyme Indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) dans la cellule hôte infectée (273). Ainsi, IDO va convertir le L-tryptophane en L-kynurénine privant le *Chlamydia* de tryptophane, acide aminé essentiel pour son métabolisme, alors qu'il est incapable d'en produire. L'IFN- γ induit aussi l'expression de « Immunity Related GTPases » (IRG) et de « Guanylate-binding Proteins » (GBP) dans les cellules hôtes permettant de limiter la réplication de *C. trachomatis* (270).

En condition de stress (exposition à des antibiotique, IFN- γ , privation de nutriments (acides aminés, glucose...) ...) *Chlamydia* peut entrer dans un état dit de persistance, comme ce qui est observé avec des mycobactéries comme *Mycobacterium tuberculosis*, en prenant la forme de corps réticulés élargis aberrants non réplicatifs (et donc non cultivables). Sous cette forme *Chlamydia* exprime des gènes similaires à ceux observés dans les infections persistantes à *Mycobacterium tuberculosis* (274). *Chlamydia* sous cet état reste capable de revenir à l'état de corps réticulé classique pour de nouveau se répliquer quand il ressent des conditions environnementales plus favorables (270). *Chlamydia* dans son état de persistance continue à transcrire des gènes, ralentit sa réplication de l'ADN et arrête le processus de division cellulaire l'empêchant alors de donner de nouveaux progéniteurs infectieux. Les gènes fortement surexprimés dans l'état de persistance sont impliqués dans la synthèse des tryptophanes (trpR, trpA and trpB) et des phospholipides (ct156, ct158, ct284, lipA, et pgsA.2), dans la traduction (gènes codant pour les ribosomes) et dans la réparation et la recombinaison de l'ADN (recA et yqgF). Alors que les gènes, régulés à la baisse, intéressent ceux impliqués dans la division cellulaire, dans l'expression des protéines de la membrane externe de *Chlamydia* (ompA) et dans la différenciation des corps réticulés en corps élémentaires (hctA, hctB, ompB et ompC) (275). Cet état de persistance induit par des antibiotiques *in vitro* a été confirmé *in vivo* chez des souris BALB/c infectées par *C. muridarum* traitées par amoxicilline. Dans ce modèle, *Chlamydia* sous sa forme persistante est résistante à l'azithromycine, traitement antibiotique utilisé en première intention, et est capable d'engendrer de nouveaux progéniteurs infectieux une fois qu'elle sort de cet état à l'arrêt de l'amoxicilline (276, 277). *C. trachomatis*, sous leur forme de corps aberrants, sont aussi identifiés dans des prélèvements humains (278). A la différence de *C. suis*, aucune souche de *C. trachomatis* ou de *C. pneumoniae* ne présente une résistance homotypique aux antibiotiques, même dans des populations où la pression antibiotique est forte ou chez des patients ayant un échec d'une antibiothérapie bien menée (279). Ces données indiquent que l'infection persistante pourrait expliquer les échecs des traitements antibiotiques observés dans 5-8% des cas chez la femme et pouvant aller jusqu'à 21% des cas chez l'homme (280). Cet état de persistance entraîne une infection chronique, source de réinfection locale (281).

3.6. *Chlamydia*, bactérie capable de détourner le système immunitaire pour survivre

Chlamydia développe de nombreuses stratégies afin d'échapper au système immunitaire pour survivre (282).

La cellule épithéliale est la cellule hôte du *Chlamydia*. Une fois infectée, cette dernière sécrète de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et chimiokines dont le CCL2, CCL3, IL-8 impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes circulant sur le site de l'infection (283-285). Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées. Ils sont particulièrement connus pour leurs fonctions antimicrobiennes, ce qui en fait la première ligne de défense du système immunitaire contre les micro-organismes invasifs. Les neutrophiles activés induisent des lésions tubaires sévères, lors de l'infection à *Chlamydia*, responsables à terme de lésions chroniques (hydrosalpinx et fibrose) secondaires à la sécrétion de MMP-9 (286, 287). En revanche, le neutrophile n'est pas essentiel dans la clairance de l'infection à *C. trachomatis* (286-288). *C. trachomatis* paralyse les neutrophiles en clivant le « formyl peptide receptor 2 » (FPR2) et probablement les TLR, via une protéase qu'elle sécrète, « Chlamydial protease-like activating factor » (CPAF). La dégradation de ces récepteurs bloque l'activation des neutrophiles en inhibant la dégranulation, la production de « Neutrophil Extracellular traps » (NETs) et la libération des espèces réactives de l'oxygène. *C. trachomatis* peut ainsi survivre pendant de longues périodes (36 heures au moins) dans les neutrophiles et se répliquer pour produire d'autres progéniteurs infectieux (289, 290). CPAF a la capacité de dégrader les protéines pro-apoptotiques à un seul domaine BH3 (BH3 only) : Bik, Puma, et Bim qui activent la voie mitochondriale de l'apoptose (291, 292). Par ce mécanisme, *Chlamydia* augmente la survie de la cellule hôte indispensable pour son expansion. Cet effet est néanmoins limité et actuellement remis en question (293). *C. pneumoniae* utilise les neutrophiles pour attirer des macrophages en stimulant la sécrétion de « macrophage inflammatory protein 1 beta » (MIP-1 β) par ces derniers. Par la suite, les neutrophiles ainsi infectés libèrent des corps apoptotiques contenant du *Chlamydia*. Les macrophages, ainsi recrutés, les phagocytent par un mécanisme d'efferocytose connu pour entraîner un signal de résolution de l'inflammation (294). Ainsi, *C. pneumoniae* infectent silencieusement les macrophages (290). En réponse, ces derniers augmentent leur production de TGF- β en se polarisant en macrophage M2 laissant la liberté à *Chlamydia* de proliférer dans cette nouvelle cellule hôte (290, 295). Les macrophages alternatifs polarisés M2 surexpriment le récepteur du mannose (CD163) qui rend cette cellule plus susceptible à l'infection à *C. trachomatis*, probablement du fait d'une interaction avec le MOMP de *Chlamydia* (283, 296). Une infection directe du macrophage par *Chlamydia* a un effet inverse entraînant une polarisation pro-inflammatoire M1, situation défavorable pour sa survie (290, 295). En effet, les corps élémentaires libres de *Chlamydia* activent préférentiellement le TLR2 des monocytes/macrophages mais aussi l'inflammasome d'une manière dépendante de NLRP3, AIM2 et MyD88 responsables d'une sécrétion accrue de

cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ...) et chimiokines pro-inflammatoires (CCL2, CXCL1, CXCL5, CXCL10, GM-CSF, G-CSF) (283). Les macrophages polarisés M2 sont donc une niche cellulaire pour *Chlamydia* lui permettant de proliférer, de survivre et d'entrer dans son état de persistance (295, 297).

C. trachomatis est capable de survivre au stress oxydatif des phagocytes. Elle inhibe la fusion du phagolysosome et l'activation de la NADPH oxydase en séquestrant dans la membrane de l'inclusion, Rac, une sous unité régulatrice de cette dernière (298, 299). CPAF, sécrété par le corps réticulé en intracytoplasmique, et le « type III secreted effector proteins » (T3SE), en collaborant, inhibent la translocation de la sous-unité p65 de NF- κ B permettant l'inhibition de la sécrétion des IFN et des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 (300). L'IFN- γ , induisant l'expression d'IDO, prive *C. trachomatis* de tryptophane. Pour faire face à ces conditions défavorables, cette bactérie a développé un mécanisme adaptatif lui permettant de synthétiser du tryptophane à partir de l'indole glycerol 3-phosphate grâce à sa tryptophane synthase (301). Ainsi, *Chlamydia* lutte contre la réponse pro-inflammatoire du système immunitaire inné.

Les cellules mononuclées exprimant le CMH II sont essentielles dans la résolution de l'infection à *Chlamydia* par la mise en place d'une réponse humorale spécifique (302, 303). Dans l'optique d'éviter qu'un de ses antigènes soit présenté par le CMH II aux lymphocytes T, *Chlamydia* bloque l'expression de CMH II induit par l'IFN- γ en dégradant « Upstream Stimulatory Factor-1 » (USF-1) (304). Il peut aussi inhiber l'expression du CMH I, constitutif ou induit par l'IFN- γ , grâce à la dégradation de « Regulatory Factor X5 » (RFX5) (305). Ainsi, *Chlamydia* élabore un subterfuge pour limiter la génération de cellules T CD4⁺TNF- α ⁺IFN- γ ⁺ spécifiques, impliquées dans la résolution de l'infection et l'immunisation (306, 307). Enfin, l'infection à *Chlamydia* entraîne également une augmentation de l'expression de « Programmed cell death protein ligand 1 » (PD-L1) localement, empêchant l'expansion et le recrutement local des lymphocytes T CD8⁺ sécréteurs de l'INF- γ , connu pour être bactéricide (308).

3.7. Mécanismes pathogéniques au cours de l'arthrite réactionnelle

Contrairement à la SA les données immunologiques dans l'arthrite réactionnelle sont assez limitées et parfois difficiles d'interprétation. En effet, en l'absence de critères diagnostiques internationaux reconnus, les patients inclus dans les études sont assez hétérogènes rendant la comparaison complexe. Certains auteurs s'attachent à inclure des patients après l'identification bactérienne par culture ou PCR afin de retenir le diagnostic, d'autres non.

C. trachomatis se retrouve dans la synoviale de sujets atteints d'arthrite réactionnelle sous la forme de corps aberrants entraînant une infection chronique à bas bruit (309). Certains auteurs décrivent même la présence de corps élémentaires dans le liquide synovial (259). *Chlamydia* persiste et reste métaboliquement active même dans les articulations des sujets atteints d'arthrite réactionnelle en rémission (310). Contrairement à *Chlamydia*, les entérobactéries induisant une arthrite réactionnelle ne sont jamais isolées dans les articulations. En revanche, certains de leurs produits bactériens comme le LPS peuvent être retrouvés (311, 312).

Une des questions est de savoir comment *Chlamydia* qui infecte initialement la muqueuse de l'appareil génital se retrouve à infecter finalement les macrophages et fibroblastes synoviaux de l'articulation (309). Même si *C. trachomatis* est une bactérie intra-cellulaire strict il n'est pas exclu que des corps élémentaires diffusent dans la circulation sanguine puis se retrouvent dans la membrane synoviale et le liquide synovial, comme ce que l'on observe dans l'arthrite septique à pyogène. Néanmoins, il paraît plus probable que *Chlamydia* soit transportée par des cellules et notamment les monocytes/macrophages, tel un cheval de Troie, à travers le flux sanguin (313, 314). De l'ADN de *Chlamydia* est d'ailleurs détecté par PCR dans les cellules mononuclées sanguines et dans les articulations des patients souffrant d'arthrites réactionnelles chroniques (261). Un traitement antibiotique prolongé améliore les symptômes de ces patients, suggérant que la persistance de *Chlamydia* dans l'articulation est responsable des manifestations rhumatologiques (261). Le lien entre la dissémination systémique de *Chlamydia* et l'arthrite réactionnelle n'est pas clairement démontré. Cependant, la présence de *Chlamydia* dans l'articulation n'explique pas isolément la survenue de l'arthrite réactionnelle. En effet, il est possible d'en retrouver dans les articulations de sujets atteints d'arthrose (21,9%) ou même des sujets sains (6,6%), indiquant que l'infection doit survenir sur un terrain prédisposant pour que l'arthrite survienne (315, 316).

Des clones de lymphocytes T, reconnaissant spécifiquement des antigènes de *Chlamydia* (MOMP et HSP60), infiltrent en grandes quantités les articulations (5 à 30 fois plus que dans le sang périphérique) (317, 318). Ils sont localement polarisés Th1 et sécrètent à la fois du TNF- α et de l'IFN- γ après une stimulation antigénique spécifique (317). Les patients HLA-B27 positifs, plus susceptibles de souffrir de forme chronique, produisent moins d'IFN- γ et de TNF- α , suggérant qu'une réponse Th1 moins franche en phase aiguë peut être impliquée dans la

chronicisation de l'arthrite (319-321). Ce défaut de production de cytokines pro-inflammatoires dans le sang est un environnement favorable à la survie de *Chlamydia* durant sa migration vers l'articulation. A contrario, dans l'articulation, quatre fois plus de lymphocytes CD3⁺ sécrètent de l'IFN- γ dans les arthrites réactionnelles chroniques comparées aux formes aiguës. Cette production locale importante d'IFN- γ peut expliquer la présence de corps aberrants de *Chlamydia* dans l'articulation responsable de la chronicisation de l'arthrite (320).

Une production accrue dans le liquide synoviale d'IL-17, IL-6 et d'IL-1 β est observée dans l'arthrite réactionnelle (322, 323). Comme dans la SA, les cellules de l'immunité innées sont des cellules productrices importantes d'IL-17. En effet, il est identifié durant l'arthrite réactionnelle que des lymphocytes T $\gamma\delta$ et NK produisent dans l'articulation de l'IL-17 (324). De façon intéressante, les NK ont dans l'articulation des capacités de cytotoxicité diminuées (expression de perforine et de granzyme diminués) ce qui pourrait être un mécanisme impliqué dans la persistance de l'infection (324).

Néanmoins, malgré des décennies de recherches, la démonstration que l'arthrite réactionnelle est déclenchée par un processus auto-immun, induit par une perte de tolérance du fait d'un mimétisme moléculaire, peine à convaincre. Un autre paradigme peut être proposé, postulant que cette maladie est pilotée par une réponse inflammatoire dirigée par la persistance des PAMPs de *Chlamydia* dans l'articulation. Une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques conduisant à l'arthrite réactionnelle nécessite de faire appel à des modèles animaux robustes.

4. Les souris SKG, modèle murin d'étude des spondyloarthrites

L'étude des modèles animaux a permis à la communauté scientifique de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les rhumatismes inflammatoires chroniques et d'étudier en pré-clinique l'efficacité et la toxicité de nouvelles approches thérapeutiques (325). L'étude des mécanismes amenant aux SpA nécessite d'avoir un modèle d'étude possédant un système immunitaire mature complet, condition qui n'est pas possible de réunir sur des expériences *in vitro*. L'accès à des prélèvements d'intérêts (enthèse, biopsie digestive...) est limité chez l'humain rendant l'étude des modèles animaux important. Un modèle animal doit répondre à plusieurs critères pour être utilisé comme modèle d'étude de pathologies humaines (326) :

- Reproduire les symptômes et les manifestations cliniques de la maladie étudiée
- Mettre en jeu des mécanismes biologiques, censés être à l'origine des manifestations chez l'humain.
- Devoir répondre à des traitements connus pour être efficaces chez l'humain.

4.1. Découverte du modèle SKG par Sakaguchi

En 2003, Sakaguchi *et al.* ont observé qu'une de leurs colonies de reproduction de souris BALB/c entretenues dans leur laboratoire dans un environnement conventionnel avait développé spontanément des arthrites chroniques (327). Ils avaient découvert un nouveau modèle murin d'étude des rhumatismes inflammatoires qu'ils nommeront souris SKG.

En milieu conventionnel (non SPF), les souris SKG développent spontanément des arthrites destructrices au niveau des articulations interphalangiennes des pattes antérieures à 2 mois de vie, puis progressivement de façon symétrique au niveau des interphalangiennes des doigts des pattes arrière pour enfin atteindre les articulations des poignets, des chevilles et la base de la queue à 4 et 8 mois de vie. Les épaules, coudes et genoux sont rarement affectés. Le phénotype est plus sévère chez les femelles. En histologie, les articulations gonflées sont le siège d'une synovite sévère très vascularisée avec prolifération de synoviocytes villosités et infiltrée de neutrophiles, macrophages, lymphocytes T CD4⁺ et B accompagnée d'un épanchement articulaire riche en neutrophiles (327).

Les souris SKG développent aussi des manifestations extra-articulaires avec des pneumopathies interstitielles à 6 mois dans 90% des cas, des infiltrats inflammatoires de la peau dans plus de 90% des cas et dans 10-20% des nodules sous-cutanés nécrobiotiques.

Sur le plan auto-immun, les souris SKG produisent des facteurs rhumatoïdes et des auto-anticorps anti-collagènes de type II et anti-HSP-70 de *Mycobacterium tuberculosis*, une hypergammaglobulinémie IgG et des complexes auto-immuns circulants. Cependant, aucun anticorps anti-ADN ou spécifique d'organes n'est retrouvé à 6 mois de vie. Du fait de cette description initiale du modèle, le modèle SKG est longtemps resté un modèle d'étude de la PR.

4.2. La mutation ZAP-70^{W163C} dans le modèle SKG

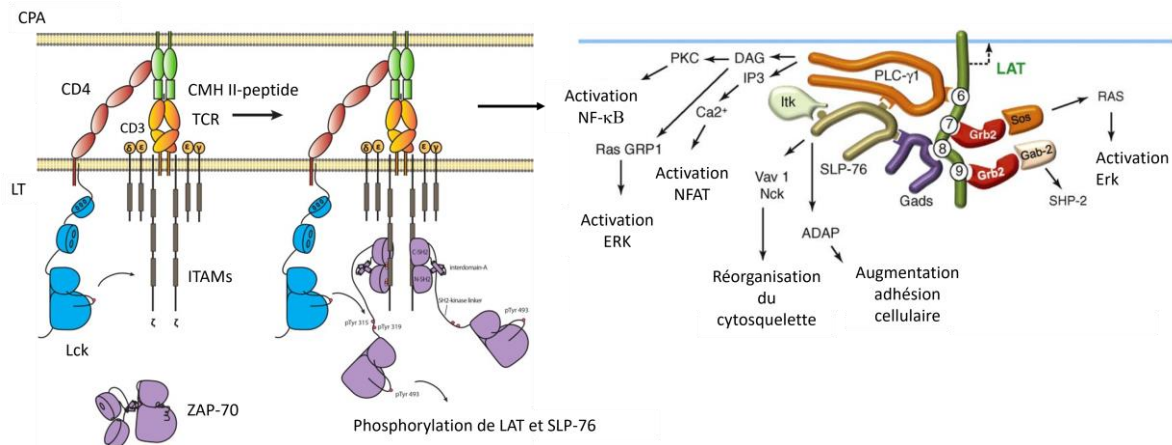
Une mutation de la partie codante du gène Zap-70 (zeta-chain-associated protein) au niveau du nucléotide 489 consistant en une substitution d'une Guanine pour une Thymine a été identifiée chez ces souris SKG (327). Cette mutation faux-sens est responsable d'une altération du codon 163 entraînant la substitution du tryptophane par une cystéine (W163C). Cette substitution

d'acide aminé intéresse le domaine « Src Homology 2 » (SH2) de la protéine ZAP-70. Ainsi, la conformation du domaine SH2 est perturbée, ce qui empêche l'arrimage de ZAP-70 aux résidus tyrosines phosphorylés d'autres protéines, conduisant à un défaut de transduction du signal TCR dans les lymphocytes T.

Le TCR permet aux cellules T de reconnaître spécifiquement un antigène et de proposer une réponse en retour, base de la réponse immunitaire adaptative. Une transduction du signal en intra-cellulaire est alors nécessaire pour engager la réponse du lymphocyte. Le complexe TCR est constitué par l'hétérodimère TCR $\alpha\beta$ qui reconnaît spécifiquement l'antigène mais aussi par d'autres protéines indispensables : le complexe CD3 (chaînes γ , δ , ϵ) et la chaîne ζ . Le TCR identifie l'antigène spécifique présenté par la cellule présentatrice d'antigène via le CMH II (328). Le CD4 est impliqué dans la stabilisation de cette interaction du complexe TCR-antigène-CMH II et recrute la tyrosine kinase Lck. Lck phosphoryle alors les deux tyrosines présentes dans des régions intra-cytoplasmiques, « Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs » (ITAMs), des chaînes γ , δ , ϵ et ζ du complexe CD3 (328). C'est alors que ZAP-70 intervient en se fixant via son domaine SH2 aux tyrosines phosphorylées des régions ITAMs (328). Lck phosphoryle trois tyrosines de la protéine ZAP-70 et l'active. A son tour ZAP-70 phosphoryle « linker for activated T cells » (LAT) et SLP-76 (328). Une protéine adaptatrice Gads maintient ensemble LAT et SLP-76, via ces tyrosines phosphorylées. LAT et SLP-76 ont de multiples sites de fixation lui permettant de recruter de nombreuses protéines impliquées dans l'activation de quatre voies de signalisation au total : la phospholipase C- γ (PLC- γ) responsable de la transcription, Akt qui affecte le métabolisme du lymphocyte, « adhesion and degranulation-promoting adapter protein » (ADAP) qui augmente l'adhésion cellulaire et Vav qui initie la polymérisation de l'actine (328) (**Figure 11**).

L'activation de tous ces facteurs de transcription aboutit à une production d'IL-2 qui est essentielle pour la prolifération et la différenciation du lymphocyte T.

Figure 11. ZAP-70 et transduction du signal TCR



CPA : cellule présentatrice d'antigène, LT : lymphocyte T, CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité, TCR : T cell receptor, ITAMs : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs, ZAP-70 : zeta-chain-associated protein 70, LAT : Linker for Activated T cells, PLC- γ : la phospholipase C- γ , ADAP : Adhesion and Degranulation-promoting Adapter Protein, NFAT : Nuclear factor of activated T-cells.

Figure adaptée des figures issues de Roncagalli *et al.* (329) et Yan *et al.* (330)

Nous pouvons donc voir que la protéine ZAP-70 a une place centrale et est impliquée très en amont dans le signal de transduction du TCR. La mutation SKG $ZAP-70^{W163C}$ à l'état homozygote ($ZAP-70^{skg/skg}$) est responsable de l'arthrite chez ces souris (phénotype observé aussi chez les souris croisées $ZAP-70^{skg/-}$ mais pas chez les souris $ZAP-70^{skg/+}$) (327). Des expériences de co-précipitations ont démontré que ZAP-70 muté n'arrivait pas à se complexer aux régions ITAM de la chaîne ζ (327). Les lymphocytes SKG ($ZAP-70^{skg/skg}$) spléniques et des ganglions, stimulés par un anticorps monoclonal anti-CD3, ont comparativement à des souris BALB/c non mutées ($ZAP-70^{+/+}$) (327) :

- Un faible niveau de phosphorylation de ZAP-70, TCR- ζ , de LAT et de PLC- γ 1
- Une forte diminution des flux calciques intracytoplasmiques (reflet de la diminution de l'activation de PLC- γ)
- Une absence d'augmentation de Syk, tyrosine-protéine kinase ayant une action similaire à ZAP-70 dans les lymphocytes B qui pourrait compenser le rôle de ZAP-70 dans les lymphocytes T.

L'ensemble de ces constatations indique que la mutation $ZAP-70^{W163C}$ altère le recrutement de ZAP-70 par les régions ITAMs ce qui bloque fortement, très en amont, la transduction du signal

TCR et l'activation des facteurs de transcription, nécessaire à la prolifération et la survie des lymphocytes via la sécrétion d'IL-2.

4.3. La mutation ZAP-70^{W163C} entraîne une sélection thymique de lymphocytes Th17 autoréactifs

L'architecture du thymus, le nombre de thymocytes et de splénocytes et la fonction des NK (qui expriment ZAP-70) ne sont pas modifiés chez la souris SKG. En revanche, il existe une lymphopénie CD4⁺ et CD8⁺ en périphérie.

L'hypothèse pour expliquer la génération de lymphocytes auto-réactifs « arthritogènes » est que la mutation ZAP-70^{W163C} modifie la sensibilité des lymphocytes à la sélection thymique positive et négative. La sélection positive au niveau du thymus permet de retenir uniquement les lymphocytes T capables de reconnaître le CMH via son TCR. Pour cela la reconnaissance du CMH doit induire une transduction du signal TCR. Au final, chez la souris SKG, seuls les lymphocytes hautement auto-réactifs (les lymphocytes T arthritogènes), reconnaissant des protéines du soi, ont une transduction suffisante du signal TCR, compensant la signalisation atténuée par la protéine ZAP-70^{W163C} mutée leur permettant de passer la sélection positive thymique (331) (**Figure 12**). Ces altérations de la sélection des cellules T thymiques entraînent une déviation de l'ensemble du répertoire des cellules T vers une plus grande auto-réactivité. Le rôle pathogénique de ces lymphocytes mutés ZAP-70^{W163C} a été démontré à la suite d'un transfert adoptif de cette population de cellules T CD4⁺ (CD4⁺^{skg/skg} ou CD4⁺^{skg/-}), à des souris « nude », qui ont développé de l'arthrite. Les CD8⁺^{skg/skg} ou ^{skg/-} ne sont pas, contrairement aux CD4⁺, impliquées dans la genèse de l'arthrite.

Figure 12. La mutation ZAP-70^{W163C} est responsable d'une altération de la sélection de lymphocytes T.

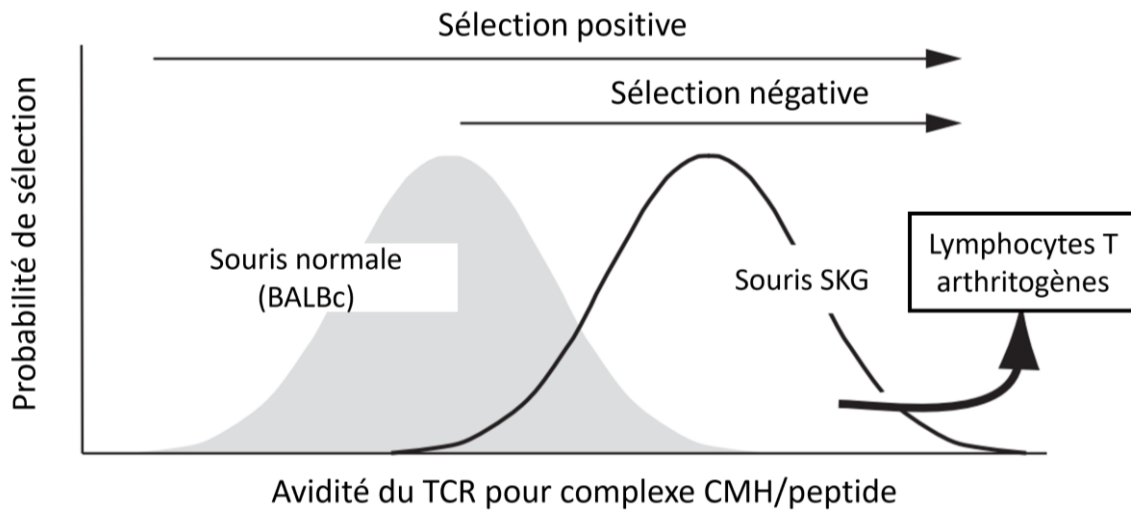


Figure issue et adaptée de Sakaguchi *et al.* (332)

Les souris SKG ont, en milieu SPF, de façon spontanée, une augmentation des lymphocytes CD4⁺IL-17A⁺ (Th17) dans les ganglions (3-10%) et dans la rate, comparée à des souris BALB/c (0.2-0.7%) (331, 333, 334). Les lymphocytes CD4⁺IL-17A⁺IFN- γ infiltrent l'articulation et expriment fortement CCR6 à la différence des Th1 (334). CCL20, ligand du CCR6, produit par les synoviocytes et les Th17, permet d'attirer ces derniers sur le site articulaire (334). Le transfert de lymphocytes CD4⁺IL-17^{+/+} SKG à des souris immunodéficientes RAG 2^{-/-} provoque des arthrites, ce qui n'est pas le cas pour les CD4⁺IL-17^{-/-} SKG, apportant la preuve que cette fraction de lymphocytes Th17 sont bien les lymphocytes « arthritogènes » (333).

Le nombre de lymphocytes Treg FOXP3⁺ est diminué dans le thymus et il est comparable en nombre (mais pas en proportion du fait de la lymphopénie SKG) dans les ganglions et la rate chez la souris SKG (331). Les Treg SKG ont des fonctions immunosuppressives altérées. Le transfert de CD4⁺ SKG déplétée en Treg^{skg/skg} chez des souris nude induit une arthrite plus précoce et plus sévère associée à une mortalité accrue (survie 66.7% contre 100%) et au développement d'autres atteintes d'organes (gastrite, thyroïdite, colite, dermatite, et pneumonie). Le transfert adoptif de Treg de BALBc ZAP-70^{+/+} diminue la sévérité des arthrites plus efficacement que les Treg^{skg/skg}, démontrant que les Treg mutés SKG ont une action immunosuppressive diminuée (331).

4.4. Souris SKG modèle d'étude de l'impact des facteurs environnementaux sur un terrain de prédisposition génétique

En condition SPF, les souris SKG ne déclenchent pas d'arthrite alors qu'elles ont de lymphocytes T potentiellement arthritogènes qui sont contrebalancés par la présence des lymphocytes Treg. Cet équilibre fragile est rompu quand les lymphocytes Th17 effecteurs sont forcés à proliférer lorsqu'ils sont introduits dans un environnement déficient en cellules T (souris « nude »), d'autant plus en absence de Treg, ou quand une stimulation de l'immunité innée survient. En effet, l'arthrite chez les souris SKG est moins sévère si elle est déclenchée dans un environnement sans germe que SPF (335). L'inflammation digestive iléale dans le modèle SKG est elle aussi médiée par le microbiote digestif (335).

Les souris SKG sont plus susceptibles aux infections fongiques et il s'est avéré que les souris SKG originelles maintenues en milieu conventionnel étaient en fait infectées au niveau pulmonaire par de nombreux champignons (*Pneumocystis murina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Graphium rubrum*, *Alternaria alternata*, et *Aspergillus nidulans*) (336). Le traitement des souris SKG élevées en milieu conventionnel par un antifongique (l'amphotéricine) prévient l'apparition spontanée de l'arthrite (336).

Par la suite, plusieurs agents chimiques et biologiques ont été testés pour induire une arthrite précoce et sévère dans le modèle SKG en condition SPF afin d'avoir un contrôle optimal de l'environnement. Une unique injection de zymosan (β -glucan associé à du mannan, chitin et des protéines) en intra-péritonéal (IP) s'avérait être le stimulus le plus efficace pour le développement de l'arthrite (337).

Initialement le modèle SKG était considéré comme un modèle d'étude de la PR. Ruutu *et al.* ont décrit plus précisément les manifestations cliniques du modèle SKG survenant après une stimulation par du curdlan (beta 1-3 glucan linéaire d'environ 500-mers provenant de la bactérie *Alcaligenes faecalis*). L'injection de curdlan en intrapéritonéal ou sous cutanée, et non par gavage, induit une arthrite sévère des chevilles et/ou des poignets 2 à 3 semaines après chez toutes les souris et des dactylites dans 40-50% des cas. A 10 semaines, l'enthésite achilléenne, la fasciite plantaire, l'arthrite des sacro-iliaques, et un infiltrat inflammatoire des disques intervertébraux à l'étage lombaire est évident chez toutes les souris SKG. Une inflammation du tube digestif, prédominant sur l'intestin grêle, survient à 10-12 semaines, chez 50-60% des souris SKG (inflammation transmurale, élongation des cryptes, abcès, formation de granulome comme dans la maladie de Crohn). Une inflammation du derme et un épaissement de l'épiderme est aussi retrouvé. Enfin, 25 % des souris SKG sont sujettes à une uvéite antérieure

unilatérale 12 semaines après l'injection de curdlan. Les souris SKG produisent des anticorps antiprotéoglycanes et anti-collagène de type II 4 semaines après l'induction par curdlan mais pas de facteurs rhumatoïdes. Le curdlan active les cellules dendritiques via l'activation du récepteur Dectin-1 et induit la production de TNF- α ainsi qu'une surexpression de CD40, CD80 et du CMH II. *In vivo*, le blocage de Dectin-1 avec un anticorps monoclonal diminue la sévérité et l'incidence de l'arthrite. Chez la souris BALB/c non mutée, le curdlan entraîne une arthrite modérée, transitoire et retardée dans 50% des cas (histologie normale à 4 mois). Le transfert de splénocytes de souris SKG ayant présenté une arthrite induite par le curdlan chez une souris Nude transfère l'arthrite ce qui n'est pas le cas avec des souris BALBc donneuses. Plus de la moitié des macrophages/cellules dendritiques infiltrant la synoviale expriment Dectin-1, le reste étant des neutrophiles. L'inflammation articulaire observée chez certaines souris BALB/c semblent donc plutôt s'expliquer par une stimulation transitoire des macrophages et neutrophiles ; inflammation ne pouvant perdurer en l'absence de participation de lymphocytes T auto-réactifs.

En résumé, les souris SKG reproduisent les manifestations extra-articulaires retrouvées dans les SpA humaines (inflammation de l'intestin grêle reproduisant des caractéristiques de la maladie de Crohn, infiltrat inflammatoire de la peau faisant évoquer du psoriasis et des uvéites) mais aussi les manifestations articulaires avec une inflammation intéressant le squelette axial (discite, sacro-iliite) responsable d'érosions sévères et de productions osseuses (338), de dactylites, d'enthésites du tendon achilléen et des fasciites plantaires. L'ensemble de ces observations font aujourd'hui du modèle SKG un modèle animal d'étude des SpA.

4.5. Les souris SKG, modèle d'étude de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia*

Il existe de nombreux modèles murins d'étude de l'infection génitale à *Chlamydia* permettant de disséquer les mécanismes immunopathologiques responsables de la stérilité tubaire dans l'optique de mettre au point une vaccination efficace (339). Ces modèles murins consistent à instiller en intravaginal une suspension de *C. muridarum* ou *C. trachomatis*. Les souris, malgré l'infection, ne déclenchent aucune arthrite.

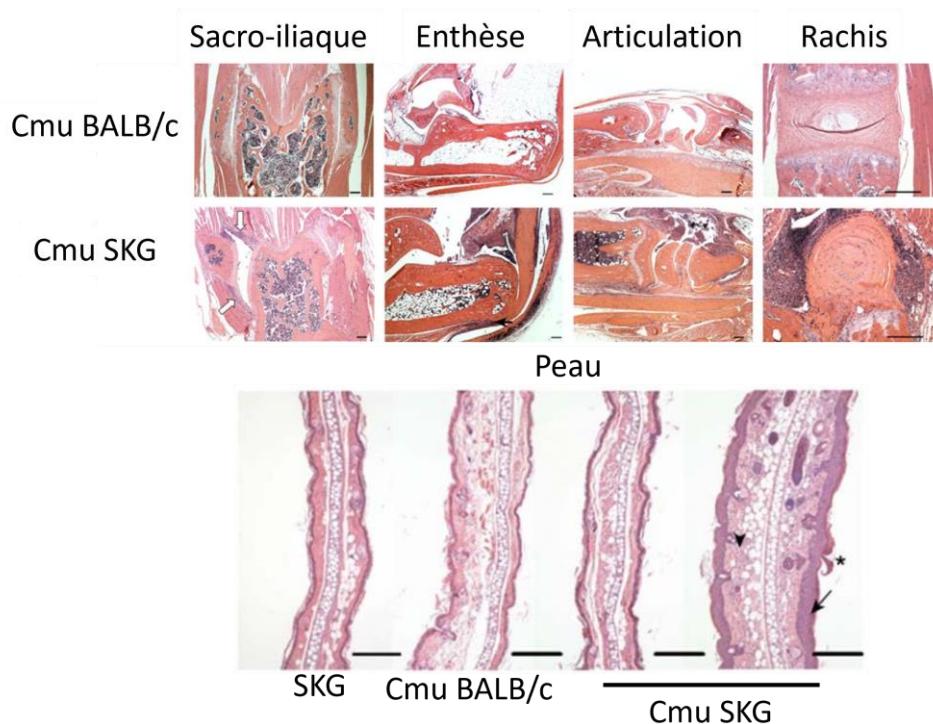
Il existe, cependant, très peu de modèles murins permettant d'étudier l'histoire naturelle et la pathogenèse de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia*. Hough A. *et al.* ont démontré qu'une inoculation de *C. trachomatis* directement dans l'articulation chez des souris C57BL/6 induit une arthrite aiguë résolutive en 7-10 jours, d'autant plus importante si la souris avait été précédemment infectée par voie génitale (340). Dans l'articulation, *C. trachomatis* était

préférentiellement retrouvée dans les synoviocytes macrophagiques mais n'entraînait pas d'arthrite chronique. Ce modèle ne permet pas d'étudier le lien entre la persistance de l'infection à *Chlamydia* et l'entretien de l'inflammation articulaire. Un autre modèle d'étude de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* consiste à injecter des synoviocytes infectés par *C.trachomatis* directement dans l'articulation de rats Lewis. Une arthrite chronique locale se développe alors associée à une diffusion de *C.trachomatis* au niveau de la rate et du foie (341). Cependant, aucune arthrite ne survient à distance de l'articulation infectée et aucune manifestation extra-articulaire habituellement observée dans l'arthrite réactionnelle est rapportée. Enfin, la voie de transmission de l'infection à *C.trachomatis* dans cette étude reste très éloignée de ce qui se passe en médecine humaine. Ces modèles ne reproduisent donc pas fidèlement les symptômes observés chez l'humain au cours de l'arthrite réactionnelle, rendant difficile l'extrapolation de ces résultats.

Cinq semaines après une infection génitale à *C. muridarum*, équivalent murin de *C. trachomatis*, 85% des souris SKG femelles développaient un phénotype d'arthrite réactionnelle avec des arthrites asymétriques des chevilles et des poignets (342). L'infection de souris non mutées BALB/c n'était pas suffisante pour induire des arthrites. L'analyse histologique a confirmé dans ce modèle la présence de sacro-iliites, enthésites, synovites, spondylites et de lésions cutanées ressemblant au psoriasis (**Figure 13**). Des conjonctivites étaient aussi observées chez certaines souris, surtout chez les mâles, sans savoir si leur survenue était la conséquence d'une inoculation directe de *Chlamydia* secondaire au comportement de toilettage des souris. En revanche, l'infection à *C. muridarum* n'était pas suffisante pour que ces souris manifestent une maladie inflammatoire de l'intestin. Ces manifestations observées chez la souris SKG reproduisent assez fidèlement les symptômes de l'arthrite réactionnelle humaine. La survenue de l'arthrite dans ce modèle est induite par un contrôle insuffisant de la réponse inflammatoire à la suite de l'infection. Seules les souris SKG infectées avec du *C. muridarum* virulent déclenchent une arthrite (non observée avec du *C. muridarum* inactivée par ultra-violet) avec une sévérité inoculum dépendant. Une antibiothérapie efficace sur *C. muridarum* (rifampicine associée à la doxycycline) débutée au moment de l'infection prévient l'apparition de l'arthrite (342). Ces observations indiquent que l'infektivité de la souche bactérienne est importante dans le processus immunologique mis en place amenant à l'arthrite (342). Les souris SKG présentent d'ailleurs un défaut de clairance de l'infection dans les premiers jours comparée aux souris BALB/c (342). De l'ADN de *Chlamydia* a été mis en évidence une semaine post infection dans les articulations des souris SKG déplétées en lymphocytes Treg

mais non retrouvée à 12 semaines post infection chez les souris SKG ou BALB/c (342). Les lymphocytes T effecteurs de la rate, stimulés avec l'antigène MOMP de *Chlamydia*, produisent de façon accrue du TNF- α et diminuent leur expression de l'IL-17A et de l'IFN- γ , cytokine clef dans le contrôle de l'infection à *Chlamydia* (342). Enfin, il a été identifié que les cellules myéloïdes CD11b⁺ augmentaient dans la rate des souris SKG après l'infection et transportaient de l'ADN de *C. muridarum* (342).

Figure 13. L'infection génitale à *Chlamydia muridarum* induit chez la souris SKG des lésions de sacroiliite, enthésite, synovite, spondylite et de l'inflammation cutanée.



Coupes histologiques colorées en hématoxyline et éosine des sacro-iliaques, de l'enthèse achilléenne, des articulations des poignets, du rachis et de la peau des oreilles obtenus chez des souris SKG et BALBc, infectées ou non, 12 semaines après l'infection. Grossissement x4 et x10 pour la peau. Figures adaptées de A. Baillet *et al.* (342) avec l'accord de l'auteur.

Ce modèle est, à notre connaissance, le premier modèle murin d'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia* se rapprochant le plus de la présentation clinique survenant chez l'Homme. L'étude de ce modèle pourrait améliorer notre connaissance de la physiopathologie de l'arthrite réactionnelle qui reste à ce jour encore mal connue.

Axes et Objectifs de travail

Les SpA sont des rhumatismes inflammatoires chroniques fréquents, invalidants qui touchent des sujets jeunes. Les mécanismes sous tendant la rupture entre un état sain et les SpA sont à ce jour insuffisamment compris. Les données les plus récentes de la littérature démontrent que l'environnement bactérien et l'immunité innée de type 3 occupent une place déterminante dans le développement de cette maladie. En effet, la dysbiose intestinale est responsable d'une augmentation de la perméabilité intestinale source de translocation de produits bactériens et d'activation des cellules immunitaires innées de l'intestin qui sont retrouvées dans les articulations au cours de l'arthrite.

L'arthrite réactionnelle est un sous-groupe de SpA déclenchée à la suite d'une infection par un agent bactérien spécifique reconnu pour être l'agent causal de l'arthrite. Nous pensons que l'étude de l'arthrite réactionnelle est une occasion unique de mieux comprendre comment des bactéries font basculer le système immunitaire dans un état pro-inflammatoire responsable de l'apparition de l'arthrite. Pour cela nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia*, premier agent bactérien inducteur de ce rhumatisme inflammatoire. Les dernières études mettent en évidence que dans l'arthrite réactionnelle les lymphocytes T effecteurs produisent plus de TNF- α et que les cellules myéloïdes CD11b⁺ transporte *Chlamydia* dans les tissus périphériques. La première partie de ce travail de thèse (**Chapitre 1**) s'est concentré sur l'étude du modèle murin SKG d'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia* afin d'identifier si les macrophages et les neutrophiles sont impliqués dans la dissémination de l'infection, le déclenchement de l'arthrite et si cette dernière est médiée par une production accrue de TNF- α , IL-17 et IL-23 comme dans les autres SpA. L'étude des modèles animaux est à ce jour essentiel afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Afin de mieux évaluer en pré-clinique les effets des nouveaux traitements dans le domaine de la rhumatologie, nous proposons une nouvelle approche innovante d'évaluation du retentissement fonctionnel de l'arthrite chez le petit animal.

Il est à ce jour difficile de discriminer les patients qui se verront développer des formes plus sévères de leur rhumatisme inflammatoire chronique. Ces patients pourraient se voir proposer dans l'avenir des stratégies thérapeutiques personnalisées. L'identification de ces patients est donc importante. Nous évaluons dans la 2^{ème} partie de cette thèse (**Chapitre 2**) l'intérêt d'un biomarqueur sérique excrétés par les monocytes et neutrophiles, la calprotectine (protéine S100

A8/A9), pour détecter les patients les plus à risque de présenter une progression structurale dans la SpA ou une rechute dans une maladie impliquant le neutrophile, les vascularites à anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA).

La standardisation de la prise en charge des patients dans certaines maladies permet d'améliorer le devenir de ces derniers. Afin de mieux prendre en charge les SpA des programmes de dépistage et de prise en charge standardisée des comorbidités ont été organisés. Le rhumatologue dans sa pratique clinique a à disposition un nombre d'outils disponibles importants afin d'évaluer plusieurs composantes du rhumatisme. J'ai été amené à participer à une initiative nationale visant à élaborer des recommandations définissant la liste de variables à collecter et à rapporter systématiquement après le diagnostic et pendant le suivi des SpA axiale dans la pratique quotidienne. Ce travail est présenté dans la dernière partie de la thèse (**Chapitre 3**). Enfin, il existe une surmortalité cardiovasculaire dans la SA et des atteintes cardiaques telle que des valvulopathies source d'insuffisance aortique, de trouble de la conduction et des cardiomyopathies peuvent être observées au cours de l'évolution de la maladie. Devant ce constat nous nous sommes posé la question de savoir si le dépistage des comorbidités dans cette maladie nécessiterait d'incorporer une évaluation systématique de la dysfonction myocardique et des valvulopathies par une échographie trans-thoracique. Afin de répondre à cette question un travail de méta-analyse a été réalisé et présenté dans la dernière partie de la thèse (**Chapitre 3**).

CHAPITRE 1 : LA SOURIS SKG MODELE D'ETUDE D'ARTHRITE REACTIONNELLE

1. Etude du rôle du macrophage dans l'arthrite réactionnelle

1.1. Introduction

L'arthrite réactionnelle est un rhumatisme inflammatoire appartenant au spectre des SpA qui survient à la suite d'une infection. *C. trachomatis* est la bactérie la plus pourvoyeuse d'arthrite réactionnelle. L'incidence de l'arthrite réactionnelle acquise après infection uro-génitale à *C. trachomatis* est estimée entre 3,0 à 8,1% (249). Il est probable que l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia* soit sous diagnostiquée du fait que l'infection urogénitale causale est souvent paucisymptomatique. Les mécanismes conduisant à l'induction et à la persistance de l'arthrite réactionnelle ne sont pas entièrement compris. La découverte en 2015 que le modèle SKG (souris mutante BALBc ZAP70^{W163C}) développent une arthrite réactionnelle cinq semaines à la suite d'une infection à *C. muridarum*, équivalent murin de *C. trachomatis* chez l'Homme, offre la possibilité d'acquérir de nouvelles connaissances dans cette pathologie. Dans ce modèle, l'arthrite induite par *C. muridarum* débute à la suite d'un déficit de contrôle de l'agent pathogène. Les lymphocytes T CD4⁺ ont un déficit de production d'IFN- γ et d'IL-17 associé à une expression accrue de TNF en réponse à une stimulation antigénique spécifique par le MOMP de *C. muridarum* (342). La sévérité de l'arthrite suit une réponse dose-dépendante en fonction de la charge bactérienne initiale (342). On pense que les macrophages et les neutrophiles jouent un rôle important dans l'arthrite réactionnelle en disséminant de façon systémique les PAMPs de *Chlamydia* (313). Nous avons vu dans l'introduction que les macrophages sont des importants producteurs d'IL-23 dans les SpA et que cette production est influencée par les voies du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie. L'IL-23 est une cytokine clef qui participe à l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$, ILC3 et par l'expansion des Th17 qui sont impliqués dans le développement de l'enthésite. Étant donné que la charge bactérienne, la virulence du *Chlamydia* et son contrôle immunitaire sont essentiels au développement et à la persistance de l'arthrite chez les souris SKG, nous avons examiné comment les macrophages et les neutrophiles SKG qui phagocytent *C. muridarum* contribuent au développement de l'arthrite réactionnelle.

Cet article, dont je suis le premier auteur a été publié en 2021 dans un journal de rang A, *Arthritis & Rheumatology* (impact factor 2020 : 10.9).

Dans cet article nous montrons que :

- Le macrophage est impliqué dans la dissémination du *Chlamydia* du tractus génital vers d'autres tissus et est indispensable au développement de l'arthrite.
- L'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* dans le modèle SKG est médiée par le TNF- α , l'IL-23 et l'IL-17.

Ma contribution a été de :

- Réaliser les expériences animales où j'avais la charge d'induire la maladie en provoquant une infection vaginale à *Chlamydia*, de réaliser des prélèvements vaginaux, d'obtenir des prélèvements de sang, de dépléter les macrophages ou réaliser des blocages cytokiniques, de mesurer les articulations et de réaliser les prélèvements terminaux.
- Effectuer la préparation et les analyses par cytométrie en flux.
- Mesurer par immunofluorescence la charge bactérienne en *Chlamydia*.
- Réaliser les expériences de RT-qPCR.
- Faire la lecture des coupes histologiques des articulations.
- Contribuer substantiellement à l'analyse des données.
- Rédiger, soumettre et réviser l'article

Les expériences d'imagerie *in vivo* et de tri cellulaire par « Fluorescence-activated Cell Sorting » (FACS) pour identifier les cellules transportant de l'ADN de *C. muridarum* ont été réalisées par les membres du Translational Research Institute, University of Queensland, Brisbane, Australie.

Ces résultats suggèrent que la dissémination accrue de *Chlamydia*, par les macrophages des souris SKG, est responsable d'une production accrue de TNF, responsable du développement et de l'entretien de l'arthrite.

1.2. Article 1 : Mediation of Interleukin-23 and Tumor Necrosis Factor–Driven Reactive Arthritis by Chlamydia-Infected Macrophages in SKG Mice

Mediation of Interleukin-23 and Tumor Necrosis Factor–Driven Reactive Arthritis by Chlamydia-Infected Macrophages in SKG Mice

Xavier Romand, MD^{1*}, Xiao Liu, PhD^{2*}, M Arifur Rahman, PhD², Zaied Ahmed Bhuyan, PhD^{2,3}, Claire Douillard, MD¹, Reena Arora Kedia, MSc², Nathan Stone, BSc², Dominique Roest, MSc², Zi Huai Chew, BSc², Amy J Cameron, BBiomedSc², Linda M Rehaume, PhD², Aurélie Bozon, PhD¹, Mohammed Habib, PhD¹, Charles W Armitage, PhD^{4,5}, Minh Vu Chuong Nguyen, PhD¹, Bertrand Favier, PhD¹, Kenneth Beagley, PhD⁴, Max Maurin, MD, PhD¹, Philippe Gaudin, MD, PhD¹, Ranjeny Thomas, MBBS, MD^{2°}, Timothy J Wells, PhD^{2°}, Athan Baillet, MD, PhD^{1°}

1. Univ. Grenoble Alpes, GREPI TIMC-IMAG, UMR 5525, 38000 Grenoble, France

2. The University of Queensland Diamantina Institute, Princess Alexandra Hospital, Brisbane, QLD, Australia

3. Department of Biochemistry and Microbiology, School of Health and Life Sciences, North South University, Dhaka, Bangladesh

4. Queensland University of Technology, School of Biomedical Sciences and Centre for Immunology and Infection Control, Brisbane, QLD, Australia

5. King's College London, School of Immunology and Microbial Sciences, London, United Kingdom

**Authors equally contributed to this work*

°Equal contribution as senior author

Running head: Chlamydia-infected Macrophages drive SKG Reactive Arthritis

Funding: Supported by NHMRC grant 1071822 and unrestricted grants from Pfizer (Passerelle grant), UCB (Sirius grant), Chugai. RT is supported by Arthritis Queensland and an NHMRC Senior Research Fellowship, XL is supported by Arthritis Queensland Fellowship, LMR by a University of Queensland post-doctoral fellowship. XR and CD are supported by the Société Française de Rhumatologie (SFR).

Acknowledgements: We thank the SCIMI Microbiology-Imaging-Microscopy Facility of the TIMC IMAG University Grenoble Alpes for access to instruments and technical advices

Conflict of interest: authors indicated that they had nothing to disclose

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Pr. Baillet had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Address correspondence: Athan Baillet, Rheumatology department, CHU Grenoble Alpes Avenue de Kimberley, 38434 Echirolles Cedex, France. Telephone: +33 476765458,

E-mail: abaillet@chu-grenoble.fr.

Abstract

Objective: ZAP-70^{W163C} BALB/c (SKG) mice develop reactive arthritis (ReA) after *Chlamydia muridarum* (Cmu) infection. Since intracellular pathogens enhance their replicative fitness in stressed host cells, we examined how myeloid cells taking up Cmu drive arthritis.

Methods: Female SKG, *Il17a*-deficient SKG and BALB/c mice were genitally infected with Cmu or Cmu Luciferase. Cmu dissemination was assessed by *in vivo* imaging or genomic DNA amplification. Macrophages were depleted using clodronate liposomes. Anti-TNF, anti-IL-23p19 were administered after infection or arthritis onset. *Hspa5*, *Tgtp1*, *Il23a*, *Il17a*, *Il12b* and *Tnf* expression was compared in SKG and BALB/c mice.

Results: One-week post infection, macrophages and neutrophils infiltrated the uterus; both carried Cmu DNA to the spleen. Cmu load was higher in SKG than BALB/c. Macrophage depletion reduced Cmu load and prevented arthritis. Compared with BALB/c, expression of *Il23a* and *Il17a* was increased in SKG uterine and splenic neutrophils. Anti-IL-23p19 during infection or *Il17a* deficiency suppressed arthritis. *Tnf* was over-expressed in SKG joints within one-week post infection and persisted. TNF inhibition during infection or at arthritis onset suppressed arthritis. Endoplasmic reticulum stress was constitutively increased in SKG joints but was induced, with immunity-related GTPase, by Cmu infection in uterus.

Conclusion: The load of Cmu is higher in SKG than BALB/c mice. While proinflammatory IL-23 produced by neutrophils contributes to the initiation of Cmu-mediated ReA, macrophage depletion reduces Cmu dissemination to other tissues, tissue burden, and arthritis. TNF inhibition suppresses arthritis. Our data suggest that enhanced bacterial dissemination in SKG macrophages drives TNF production required for persistent arthritis.

Introduction

Chlamydia-induced reactive arthritis (ReA) belongs to the spondyloarthritis (SpA) group of diseases. ReA occurs in 4 to 15% of *Chlamydia trachomatis* infections (1). *Chlamydia* is the most common cause of ReA overall. Clinical features typically include enthesitis, peripheral arthritis, inflammation of the axial skeleton, conjunctivitis and a psoriasis-like skin rash. Symptoms develop a few weeks after infection, which can be silent, partially explaining why ReA remains under-diagnosed. The mechanisms of ReA induction and persistence are not fully understood. However, new insights were made with the discovery that ZAP70^{W163C}-mutant BALB/c (SKG) mice develop features of human ReA five weeks after *Chlamydia muridarum* (Cmu) infection, a mouse-adapted *Chlamydia trachomatis* related pathogen (2).

The SKG ZAP70 mutation results in attenuated T cell receptor signaling, promoting a state of relative immunodeficiency. Cmu-induced ReA developed in association with deficient pathogen control by major outer membrane protein (MOMP)-specific IFN- γ and IL-17-producing CD4⁺ T cells and increased T cell tumor necrosis factor (TNF) production (2). Arthritis development depended on infection with live pathogen and was pathogen dose dependent (2).

Macrophages and neutrophils are thought to play an important role in ReA, through the systemic dissemination of pro-inflammatory *Chlamydia pneumoniae* and *trachomatis* pathogen-associated inflammatory molecules (PAMPs) (3). *Chlamydia* may paralyze neutrophil pathogen control mechanisms, such as extracellular trap formation (4). Toll-like receptor (TLR) stimulated macrophages are substantial producers of IL-23 in SpA, while neutrophils produce IL-23 in inflammatory bowel disease (5-8). IL-23 is a critical cytokine for the maintenance of Th17 cells and for stimulation of other pro-inflammatory cytokines

production in SpA (9). In HLA-B27⁺ patients and HLA-B27 SpA transgenic rats, endoplasmic reticulum (ER) stress may favor macrophage and dendritic cell (DC) production of IL-23 in the presence of TLR ligands (6, 10). Furthermore, *Salmonella enterica*, a ReA-associated pathogen, was shown to exploit ER stress in HLA-B27-expressing cells to promote its own intracellular replication (11). Autophagy, a highly conserved process that recycles defective organelles and non-functional proteins and contributes to control of intracellular microorganisms, was shown to contribute to intestinal IL-23 production in ankylosing spondylitis (AS) (12). Of interest, autophagy sequesters the NF-κB regulatory protein A20, promoting pro-inflammatory cytokine and chemokine production (13). Interferon-inducible immunity-related GTPase (IRG) proteins are required for control of intra-cellular bacterial infection (14). IRG proteins are recruited into *Chlamydia* inclusions and restrict *Chlamydia* replication by routing inclusions to the lysosome and inducing autophagy (15, 16).

Given that Cmu burden and its immune control are critical for the development and persistence of arthritis in SKG mice, and that intracellular pathogens enhance their own replicative fitness in stressed host cells, we examined how SKG macrophages and neutrophils taking up Cmu contributed to development of Cmu-induced ReA.

Materials and Methods

Mice

Female BALB/c, SKG mice (ZAP-70^{w163c}-mutant BALB/c mice) and IL-17^{-/-} SKG mice aged 6-10 weeks were bred and maintained under specific pathogen-free conditions (4 to 6 mice per conventional cage) at the Universities of Queensland (Australia) and Grenoble-Alpes (France, agreement: C 3851610006). BALB/cJRj mice were obtained from Janvier Labs. Housing condition was humidity 50%±20%, temperature 19-23°C, 12/12hrs dark/light sessions and ad libitum access to food and water. Neither SKG mice nor IL-17^{-/-} SKG mice developed spontaneous disease under these conditions. Animal study was conducted in accordance with the European Directive 2010/63/EU and experimental procedures were approved by Ethical Committees: #7781-201611251629264v1 (French Research Ministry) and UQDI/467/12/NHMRC (University of Queensland).

Chlamydia muridarum bacteria

The same strain of Cmu (Weiss strain) was used for all experiments, grown and purified as previously described (2). Cmu (Weiss strain) expressing luciferase and Green Fluorescent Protein (pGFP-Luc-Cmu) was engineered as previously described (17). A plasmid-deficient strain of Cmu (Nigg strain), generated by treatment with novobiocin (O'Connell and Nicks), was a generous gift from Dr Catherine O'Connell, University of North Carolina at Chapel Hill (18). Chlamydial vaginal load was determined by direct inoculation of vaginal swabs sample onto McCoy cell monolayers as previously described (2). Cmu DNA was detected using the following primers: 5' -GGAGCAAATCCTCAAAGCTG-3', 5'-ATCCCAGTCATCAGCCTCAC-3' and quantified using SYBR green technique. Cmu gene copy number per cell was calculated by dividing the Cmu gene copy number by the number of sorted cells.

Infection of SKG mice

Mice aged 6 to 10 weeks were primed by a subcutaneous injection of 2.5 mg of medroxyprogesterone acetate (Depo-Provera®, Pfizer) one week before infection and then infected with $7 \cdot 10^3$ to $1 \cdot 10^6$ inclusion-forming units (IFU) of Cmu intravaginally, as previously described (2). Infected and non-infected mice were placed in different cages and manipulated separately to avoid cross-contamination.

Clinical and histopathologic assessment

Paw swelling, the primary experimental outcome, was evaluated by the same observer for 12 weeks post infection (pi) by measuring the thickness of hind paws with a digital caliper and the paw inflammation index (paw swelling variation from baseline) was calculated as in (2). Joints were fixed at week 12 in 10% formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. Two blinded and independent readers assigned a histological score of inflammation on a scale of 0-5 for joints and skin (2).

***In vivo* imaging**

BALB/c and SKG mice were infected intravaginally with $2 \cdot 10^5$ IFU of pGFP-Luc-Cmu. Mice were imaged, as previously described (17) using the Xenogen IVIS imaging system (PerkinElmer, MA, USA) one week pi. Intensity of bioluminescence was analyzed by using living image software (PerkinElmer).

Anti-Cmu MOMP antibody measurement

Anti-*Chlamydia* MOMP IgG and IgA were measured in serum of infected mice 12 weeks pi, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as previously described (2).

Macrophage depletion

Macrophages were depleted by intraperitoneal injection of liposomal clodronate (Liposoma, The Netherlands). Upon Cmu infection, mice received an initial clodronate dose of 2 mg per 20g of mouse body weight, followed by weekly injections of 1 mg per 20 g of mouse body weight, for 12 weeks (n=7 mice analyzed). The control group was injected with phosphate buffered saline (PBS) liposomes (n=7 mice analyzed).

Anti-TNF, anti-IL-23p19 and antibiotics treatment

Mice were treated by subcutaneous injections of anti-mouse TNF antibody (2mg/kg/week of mouse-adapted certolizumab pegol antibody PEGylated Fab with 40kD Nektar PEG (CA156-00501, UCB) (n=18) or 4.5 mg/kg/3 days of etanercept (n=18) (Enbrel, Pfizer) or by intraperitoneal injection of anti-mouse IL-23p19 antibody (60 µg/week, LSN2479016, Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA) (n=17) from week 1 (at infection) to week 12 or from week 5 (disease onset) to week 12. The control groups were injected with PBS or isotype controls (n=8-13 mice per experiment). Rifampicin (0.4 mg/day intraperitoneally, Sanofi-Aventis) and doxycycline (0.3 mg/day by gavage, Alphapharm) were administered (n=11 mice) from week 7 through week 9 pi. Adverse events and experimental group are described in **supplementary table 1**.

Isolation of uterine and splenic mononuclear cells and neutrophils

Genital tract and spleen from Cmu infected mice were collected 7 days pi for cell isolation (**Supplementary method**). Cells were used in flow cytometry or for myeloid cell isolation by Histopaque gradient technique (Sigma). Macrophages (MHCII⁺CD11c⁺CX3CR1⁺), dendritic cells (MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺), neutrophils (MHCII⁻CD11b⁺Ly6G⁺) and lymphocytes (CD3⁺)

were sorted with a BD FACSAria Fusion Sorter (BD Biosciences) or MoFlo Astrios EQ™ Sorter (Beckman Coulter).

Flow cytometry analysis

Cells were treated with anti-CD16/32, stained with LIVE/DEAD™ Aqua, anti-mouse CD45.2 APC (clone 104, Biolegend), anti-mouse I-A/I-E Pacific Blue (clone M5/114.15.2, Biolegend), anti-mouse Ly6G PerCP-Cy5.5 (clone 1A8, Biolegend), anti-mouse CD11b AF700 (clone M1/70, Biolegend), anti-mouse CD11c APC/Cy7 (clone N418, Biolegend), anti-mouse CX3CR1 FITC (clone SA011F11, Biolegend), anti-mouse CD103 PE (clone 2E7, Biolegend) and anti-mouse CD3 FITC (clone 17A2, Biolegend), adapting a method identifying intestinal myeloid populations (7). Cell numbers were enumerated using Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter), as previously described (19). Data were acquired on a LSRII Fortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences) (**Supplementary method**).

Quantitative real time PCR

Uterine and splenic macrophage/DC, neutrophils and lymphocytes from infected SKG and BALB/c mice were analyzed after total RNA was isolated using RNeasy minikit (Qiagen) and cDNA was prepared using Tetro cDNA synthesis kit (Bioline). RNA from genital tracts and hind paws were isolated 1 and 5 weeks pi respectively and cDNA was generated using SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Kit (Invitrogen) (**Supplementary method**).

Quantitative real-time PCR for *Il12b* (Forward 5'- GGAAGCACGGCAGCAGAATA-3'; reverse 5'-AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG -3'), *Il23* (Forward 5'- GCTGTGCCTAGGAGTAGCAG-3'; reverse 5'-TGGCTGTTGTCCTTGAGTCC-3'), *Il17a* (Forward 5'-TCTCCACCGCAATGAAGACC-3'; reverse 5'-CACACCCACCAGCATCTTCT-3'), *Tnf* (Forward 5'-

CATCTTCTCAAAAATTCGTGTGACAA-3'; reverse 5'-
TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3' or *Tnf*, Mm00443258_m1, Thermofisher), *Hspa5*
(Forward 5'-ACTTGGGGACCACCTATTCCT-3'; reverse 5'-
GTTGCCCTGATCGTTGGCTA-3'), *Tgtp1* (Forward 5'-
TGCACAGATGGGGATGAATTTTC-3'; reverse 5'-TCACTGTCGAGAGACTCCTGA-3),
Hprt (Forward 5'- CCCCAAAATGGTTAAGGTTGC -3'; reverse 5'-
AACAAAGTCTGGCCTGTATCC -3' or Forward 5'-TCAGTCAACGGGGGACATAAA-3';
reverse 5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG-3') and *Gapdh* (Mm99999915_g1,
Thermofisher) was performed using SYBR green or TaqMan technology. All real-time RT-
PCR data were normalized relative to a housekeeping gene (*Hprt* or *Gapdh*). Data are reported
as relative fold change compared to *Hprt* calculated using the Δ Ct method or as relative fold
change in gene expression compared to non-infected BALB/c using the $\Delta\Delta$ Ct method.

Statistical analysis

The normality of the distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. One-way non-parametric ANOVA (Kruskal Wallis test) and Mann-Whitney tests were used for non-normally distributed data and t-test or one and two-way ANOVA with post hoc Tukey's test for normally distributed data. *P* values < 0.05 (2-tailed) were considered significant. The number of animals needed to achieve statistical power was estimated from previous experiments: 8 mice per group with an α -risk of 0.05 reach a power of 80% (2). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Results

Macrophages and neutrophils infiltrate the genital tract of infected mice and systemically disseminate Cmu

Cmu genital infection induces a pro-inflammatory response. By flow cytometric analysis of cellular infiltrate into the uterine horns, the number of macrophages and neutrophils, but not DCs, increased in both BALB/c and SKG mice within one-week post-Cmu genital infection (**Figure 1A-C and Supplementary Figure 1**). Previously, Cmu DNA was found in CD11b⁺ myeloid cells in SKG mouse spleen and lymph node 1 week pi (2), indicating that myeloid cells may transport Cmu from the site of infection to the spleen. To identify which myeloid cells transport Cmu to the spleen after genital tract infection, we infected SKG mice with Cmu, and one-week later isolated splenic DCs (MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺), macrophages (MHCII⁺CD11c⁺CX3CR1⁺), and neutrophils (MHCII⁻CD11b⁺Ly6G⁺). Cmu DNA was detected in macrophages and neutrophils, but not DCs, indicating that these cells take up and disseminate Cmu within 1 week of infection (**Figure 1D**). When normalized against number of sorted cells, Cmu DNA copy number was higher in macrophages than neutrophils, and also higher in SKG infected mice compared to BALB/c (**Figure 1E**).

To track Cmu dissemination and burden after infection of the genital tract epithelium, we used Cmu expressing luciferase and GFP (pGFP-Luc-Cmu). Luciferase signal ascended from lower to upper genital tract by 7-11 days pi in SKG and BALB/c mice infected with pGFP-Luc-Cmu (**Figure 2A**). Vaginal shedding of wild type (WT) and pGFP-Luc-Cmu was significantly higher in SKG than BALB/c mice for 2 weeks pi (**Figure 2B**). To determine the contribution of macrophages to the Cmu burden, we administered clodronate liposomes 1 day before infection with pGFP-Luc-Cmu. Consistent with published evidence (20, 21), clodronate liposomes significantly depleted CD11b⁺Ly6G⁻ blood and peritoneal monocytes/macrophages, and

preserved CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils (**Figure 2C**). Macrophage depletion reduced Cmu burden, as the pGFP-Luc-Cmu signal was almost undetectable in the lower and upper genital tract 6 days pi (**Figure 2D**). These data indicate that macrophages and neutrophils take up Cmu in the inflamed lower genital tract and transport it systemically. After clodronate, dissemination to upper genital tract is minimal and the Cmu load is reduced.

Macrophages are necessary for Cmu-induced ReA

To investigate the role of macrophages in the development of WT Cmu-induced ReA in SKG mice, macrophages were depleted with weekly injections of clodronate liposomes, starting on the day of Cmu genital infection. SKG mice infected with Cmu and treated with clodronate liposomes did not develop arthritis (**Figure 3A**), consistent with the reduction in genital tract Cmu burden (**Figure 2D**) and the relationship between Cmu burden and arthritis (2). Mean paw inflammatory indices were significantly decreased in infected SKG mice treated with clodronate liposomes when compared to SKG mice treated with PBS liposomes and no different from uninfected SKG mice. This was confirmed histologically: cellular infiltration was present in the skin, fore and hind paws of mice treated by PBS liposomes and not in mice treated with clodronate liposomes, with a reduced histological score at each site (**Figure 3B**). Enthesitis, synovitis and plantar fasciitis were also abrogated by macrophage depletion (**Figure 3C**). Anti-chlamydial MOMP antibody titers were not affected by clodronate treatment (**Figure 3D**). This is consistent with evidence that CD4 T cells and neutrophils are necessary for anti-Cmu antibody production in BALB/c mice (22) and that anti-Cmu MOMP antibody titers are not reduced in SKG relative to BALB/c mice (2). These data indicate that Cmu transport by macrophages is required for the development of ReA but not Cmu antibody immune response in SKG mice.

Autophagy and ER stress characterize SKG response to Cmu infection

Intracellular pathogens may enhance their replicative fitness in stressed host cells. To compare propensity of SKG and BALB/c mice to develop an IRG response and ER stress in response to Cmu infection, we quantified ER stress-related *Hspa5* and IRG-related *Tgtp1* (also known as *Irgb6*) expression in genital tract and ankle joint before infection and 1 and 5 weeks pi as arthritis began. In the joint, *Tgtp1* and *Hspa5* were constitutively increased in SKG mice. *Tgtp1* increased 100 fold in SKG mice 1 week pi (**Figure 4A**). *Hspa5* increased in BALB/c mice 5 weeks pi (**Figure 4B**). In the uterine horn, *Tgtp1* increased 10 fold in BALB/c mice 1 week pi then 100 fold 5 weeks pi in SKG mice (**Figure 4C**). *Hspa5* also increased in SKG mice at 5 weeks pi (**Figure 4D**). *Hspa5* and *Tgtp1* levels were strongly correlated in joint and uterine horn (**Figure 4E-F**). These data indicate that while BALB/c mice make a small early genital tract IRG response that drives autophagy to control chlamydia replication, the SKG response is much greater – first in joint and then in uterine horn. This IRG response correlates with an ER stress response in SKG genital tract after Cmu infection. In contrast and unrelated to infection, ER stress and low levels of IRG are constitutive in the joints of naïve SKG mice.

Persistent infection and inflammation are required for Cmu -induced ReA in SKG mice

Dissemination of chlamydial PAMPs systemically promotes TLR2-mediated TNF production. The cryptic plasmid is a virulence factor for Cmu and *Chlamydia trachomatis* in animal models. The plasmid is required for TLR2 signaling and disease pathology (2). In BALB/c mice, a plasmid-cured strain of Cmu retained infectivity in the genital tract and generated an effective Th1 immune response. However, it failed to induce inflammatory disease of the oviduct or significant levels of genital tract TNF production. Furthermore bone marrow-derived DC infected with this strain *in vitro* secreted little TNF (23). Hence, we infected SKG mice with a plasmid-deficient Cmu strain to ascertain the role of the plasmid in Chlamydia-mediated

inflammation in ReA. While SKG mice infected with WT Cmu developed swelling of fore and hind paws, which gradually evolved into an asymmetrical polyarthritis, no joint swelling occurred after infection of SKG mice with plasmid-deficient Cmu over 12 weeks (**Figure 5A**). Rifampicin and doxycycline antibiotics that in combination have been shown to eliminate Cmu (2), begun 2 weeks after the onset of arthritis, significantly suppressed arthritis severity in SKG mice infected with Cmu (**Figure 5B**) indicating that long-term chlamydial infection drives ReA.

Given neutrophils and macrophages infiltrated the genital tract of Cmu infected mice and transported Cmu systemically, we sorted neutrophils (CD11b⁺Ly6G⁺), macrophages/DCs (MHCII⁺CD11c⁺) and lymphocytes (CD3⁺) from uterine horns and spleen at baseline and 1 week pi, and quantified the expression of *Il23a*, *Il17a* and *Il12b*. In the genital tract, expression of *Il23a* and *Il17a* was significantly higher in SKG neutrophils than either SKG macrophages/DCs or BALB/c neutrophils. In the spleen of SKG mice, neutrophils expressed higher *Il23a* and *Il17a* transcripts than macrophages/DC/T cells. *Il12b* was expressed by myeloid cells in genital tract, and at significantly greater levels by SKG macrophages/DC than SKG neutrophils or BALB/c macrophages/DC (**Figure 5C-E**). To test the function of SpA-associated cytokines in arthritis development, we blocked IL23p19 in WT Cmu-infected SKG mice, or infected *Il17a*^{-/-} SKG mice. Early inhibition of IL-23p19 (from weeks 1 to 12) prevented ReA development whereas inhibition during the disease period from weeks 5 to 12 did not (**Figure 5F, G** and **Supplementary Figure 2A**). All mice treated with early inhibition of IL-23 had high titers of anti-MOMP antibodies (**Supplementary Figure 2B**). Early inhibition of IL-23p19 had no effect on vaginal shedding of Cmu (**Supplementary Figure 2C**). *Il17a*^{-/-} SKG mice did not develop persistent arthritis after genital infection with Cmu (**Figure 5H**). Together these data suggest that plasmid-mediated Cmu PAMPs drive early expression of

neutrophil and macrophage IL-23 and IL-17A in SKG genital tract and that depletion of either macrophages, IL-23, IL-17A or the plasmid is sufficient to block disease development.

Cmu ReA in SKG mice depends on TNF

We showed previously in SKG mice depleted of Foxp3⁺ regulatory T cells, that Cmu-induced ReA was TNF-dependent (2). In SKG mice, *Tnf* expression increased in the joint at 1 week and persisted at 5 weeks pi, at the onset of arthritis (**Figure 6A**). This increase in *Tnf* in the joint coincided with increased expression in the genital tract 1-week pi in both mouse strains (**Figure 6B**). While *Tnf* transcripts were expressed by both macrophages and neutrophils in the uterine horn, SKG neutrophils expressed significantly greater levels than macrophages in the spleen at 1-week pi (**Figure 6C**). Inhibition of TNF with either monoclonal antibody or soluble decoy TNF receptor (scores combined) decreased joint inflammation in SKG mice infected with WT Cmu, whether the inhibition began at the time of infection or 5 weeks later, at disease onset (**Figure 6D and E**). TNF inhibition did not alter the levels of anti-MOMP antibodies in Cmu-infected SKG mice (**Figure 6F**) or vaginal shedding of Cmu (**Supplementary Figure 2D**). These data suggest that infected macrophages and neutrophils drive arthritis onset by TNF production.

Discussion

We show here that the load of Cmu is higher in SKG than BALB/c mice. While proinflammatory neutrophils appear to contribute to disease initiation, macrophage depletion reduces Cmu tissue dissemination, tissue burden, and arthritis, but not anti-MOMP antibodies. Our data suggest that enhanced bacterial survival in SKG macrophages drives production of TNF required for persistent arthritis. Macrophages are known to transport Cmu to other tissues (24). In SKG mice, Cmu DNA is transported predominantly by macrophages, as well as neutrophils, to spleen after genital tract infection. In SKG mice, depletion of macrophages by clodronate prevents Cmu dissemination and disease. Although arthritis fails to develop with macrophage depletion in Cmu infected SKG mice, anti-MOMP antibodies, which require neutrophils and B cells, are still produced (22). In contrast, BALB/c mice clear Cmu even when macrophages are present, and fail to develop arthritis or a TNF response in the joint. Consistent with this, the load of Cmu is higher in SKG than in BALB/c mice, and controlling the growth of chlamydia with a combination of antibiotics controls the disease. Although Clodronate liposomes have been shown to selectively deplete macrophages and not conventional DC or neutrophils (25), the dependence of ReA on macrophages would ideally be confirmed in *Csf1r*-DTR mice on the SKG genetic background. Together, our data indicate that poor chlamydia clearance by macrophages underpins ReA in SKG mice. The proinflammatory impact of macrophages and poor clearance of Cmu in SKG mice is consistent with the production of TNF by macrophages and impaired production of MOMP-specific T cell IFN- γ and IL-17 (2), which are required for Cmu control (26, 27).

ER stress and proinflammatory cytokines also play an important role in Cmu-induced ReA in SKG mice. ER stress was constitutively increased in SKG joints and induced by Cmu infection of the genital tract, along with a delayed and excessive IRG response. We focused on *Tgtp1* as

a marker of autophagy because it is implicated in the initiation and coordination of the routing of other IRGs into the early chlamydial inclusions independent of IFN- γ stimulation, and plays a necessary role in the control of Chlamydial replication (15). In SKG mice, MOMP-specific T cells produce low levels of IFN- γ (2). Expression of *Il23a* and *Il17a* was increased in SKG uterine and splenic neutrophils at the time that *Tgtp1* increased in the joint. These data suggest a relationship between infection-driven autophagy to control Cmu transported to the joint by macrophages and infection-associated IL-23/IL-17 in the genital tract. IL-23 and IL-17 drive arthritis development, as anti-IL-23p19 administered during infection or *Il17a* deficiency suppressed arthritis. Similarly, matrix metalloproteinase production by neutrophils is decreased in Cmu-infected *Il17^{-/-}* mice, along with reduced oviduct pathology (28). The inter-relationship between infection, ER stress, autophagy and IL-23 in SpA is supported by: induction of the unfolded protein response (UPR), autophagy and thus host cell survival upon Cmu infection, the relationship between autophagy and IL-23 in AS gut, the sequestration of A20 by autophagy and the provocation of IL-23 production by ER stress in the context of TLR stimulation (6, 12, 13, 29). Thus arthritis pathogenesis after Cmu infection of SKG mice appears to be two-pronged, with neutrophils contributing to disease initiation and macrophages bearing the pathogen burden for persistent pathogenic TNF production. It is interesting that *Tgtp1* and *Hspa5* increased at 5 weeks pi in the uterine horn of SKG mice, suggesting that *Chlamydia*-infected macrophages may continue to be a source of reinfection and thus perpetuation of inflammation.

Here we show that TNF inhibitors, both monoclonal antibody and soluble receptor, suppress inflammatory arthritis in SKG mice, whether TNF is blocked at the time of Cmu infection or at arthritis onset 5 weeks later, similar to human ReA (30). Furthermore arthritis development depends on the Cmu cryptic virulence plasmid that is required for TLR2-mediated TNF

production upon dissemination (2). Together our data support the concept that Cmu ReA results from host factors promoting ER stress, bacterial virulence factors promoting inflammation under stress and host immune dysregulation underlying poor pathogen control.

Previous studies identified DNA and other bacterial products from multiple species implicated in ReA, including *Salmonella typhimurium* and *Chlamydia trachomatis*, in the synovial tissues and fluid of ReA patients, and found the persistent forms to be metabolically-active (31). Dissemination of Cmu to sites outside the genital tract, such as spleen, implies the dissemination of PAMPs and capacity for presentation of chlamydial antigen to T cells, driving a chronic inflammatory response. Indeed, *Chlamydia*-specific CD4+ and CD8+ T cells have been identified in the joints of patients with *Chlamydia*-induced ReA (31). Persistent *Chlamydia* and chlamydial antigen and TLR signals will drive macrophage and DC activation, chronic activation of T cells and production of pro-inflammatory cytokines, thus inducing persistent inflammation (32, 33).

Persistent *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* are in the aberrant-body phase, with an aberrant morphology and metabolic state (34, 35). Bacteria in this persistent state are non-culturable by standard methods, resistant to antibiotics and display an unusual transcription profile (36, 37). *Chlamydia trachomatis* may enter a persistent state after infection of monocytes, influenced by the macrophage polarization state (32). Persistent forms of *Salmonella typhimurium* are similarly induced by macrophage internalization (38), and are related to genomic toxin-antitoxin systems, which increase bacterial fitness under stress conditions after macrophage internalization, antibiotic exposure and/or viral co-infection. While toxin-antitoxin systems remain quiescent under favorable growth conditions, toxins can be activated in response to stress, suppressing bacterial growth and promoting a stress-tolerant

dormant state. The increased ER stress in joints and infection-induced ER stress in the genital tract of SKG mice would thus favour the persistence of Cmu or *Salmonella typhimurium*.

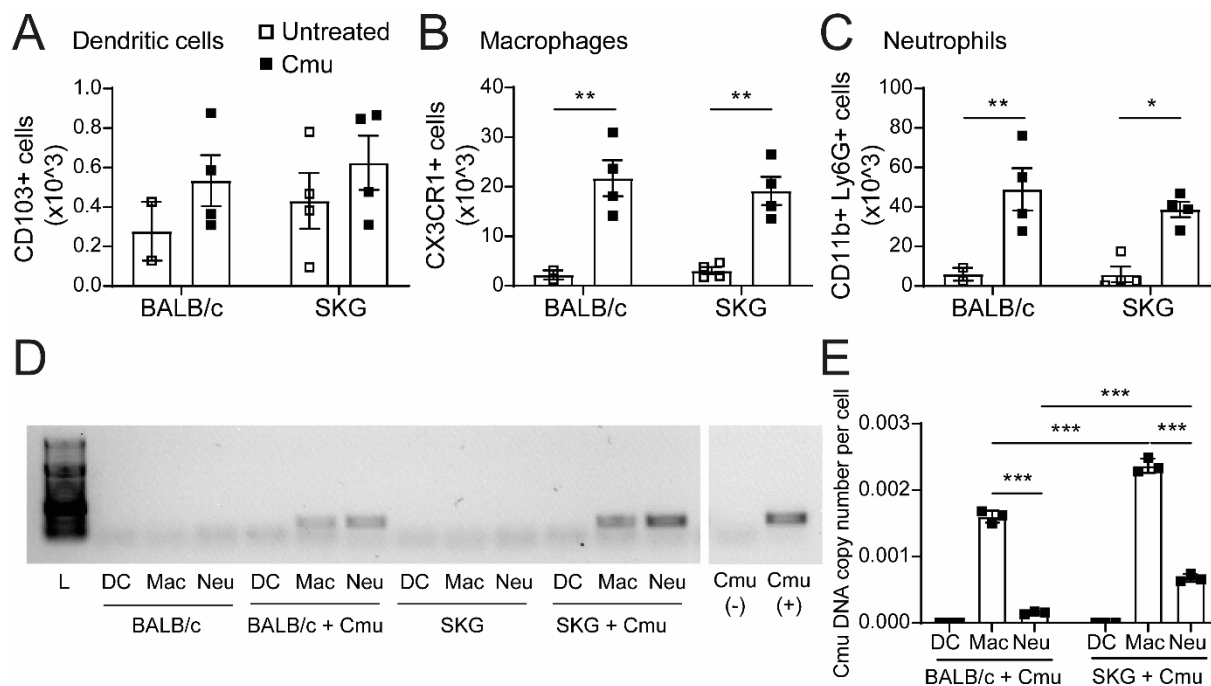
Autophagy plays a major role in the processing of *Chlamydia trachomatis* in macrophages (16, 39), to restrict the formation of infectious inclusion bodies, with potential impact on IL-23 production. Autophagy restricts *Chlamydia trachomatis* growth in human macrophages via IFN-inducible IRG proteins (15, 16). IFN- γ is fundamental to the eradication of intracellular pathogens through macrophage activation, nitric oxide, reactive oxygen species and indoleamine 2,3-dioxygenase production and tryptophan starvation (16, 40, 41). The impaired production of IFN- γ by SKG mice T cells in response to chlamydial antigen and impaired macrophage responsiveness to IFN- γ in SpA are thus significant (2, 42, 43). Moreover, autophagy mediates bacterial killing in macrophages (44) and contributes to antigen presentation and IL-23 secretion (12, 45, 46). Various cytokines have been shown to stimulate autophagy in macrophages including TNF, IFN- γ , IL-1 α and IL-1 β (44). While autophagy activation in human AS may be the consequence of HLA B27 misfolding in the gut (12), in SKG mice, activation of autophagy may be the consequence of macrophage infection by Cmu, and may help to drive IL-23.

IL-23 not only supports the differentiation of Th17 cells but is also required for the secretion of IL-17, IFN- γ and IL-22 by Th17 and $\gamma\delta$ T cells (47, 48). Since IL-23 blockade prevented arthritis only during infection, IL-23 must drive disease pathogenesis prior to development of arthritis, while TNF mediates clinical inflammatory manifestations. This is supported by evidence that IL-23 is only involved early in the pathogenesis of autoimmune inflammatory animal models, promoting the development of inflammatory pathogenic antibodies (49) and that blocking this cytokine during established AS is ineffective (50). Collectively, our results

identify the pivotal role played by macrophages in the development of Cmu-induced ReA in SKG mice.

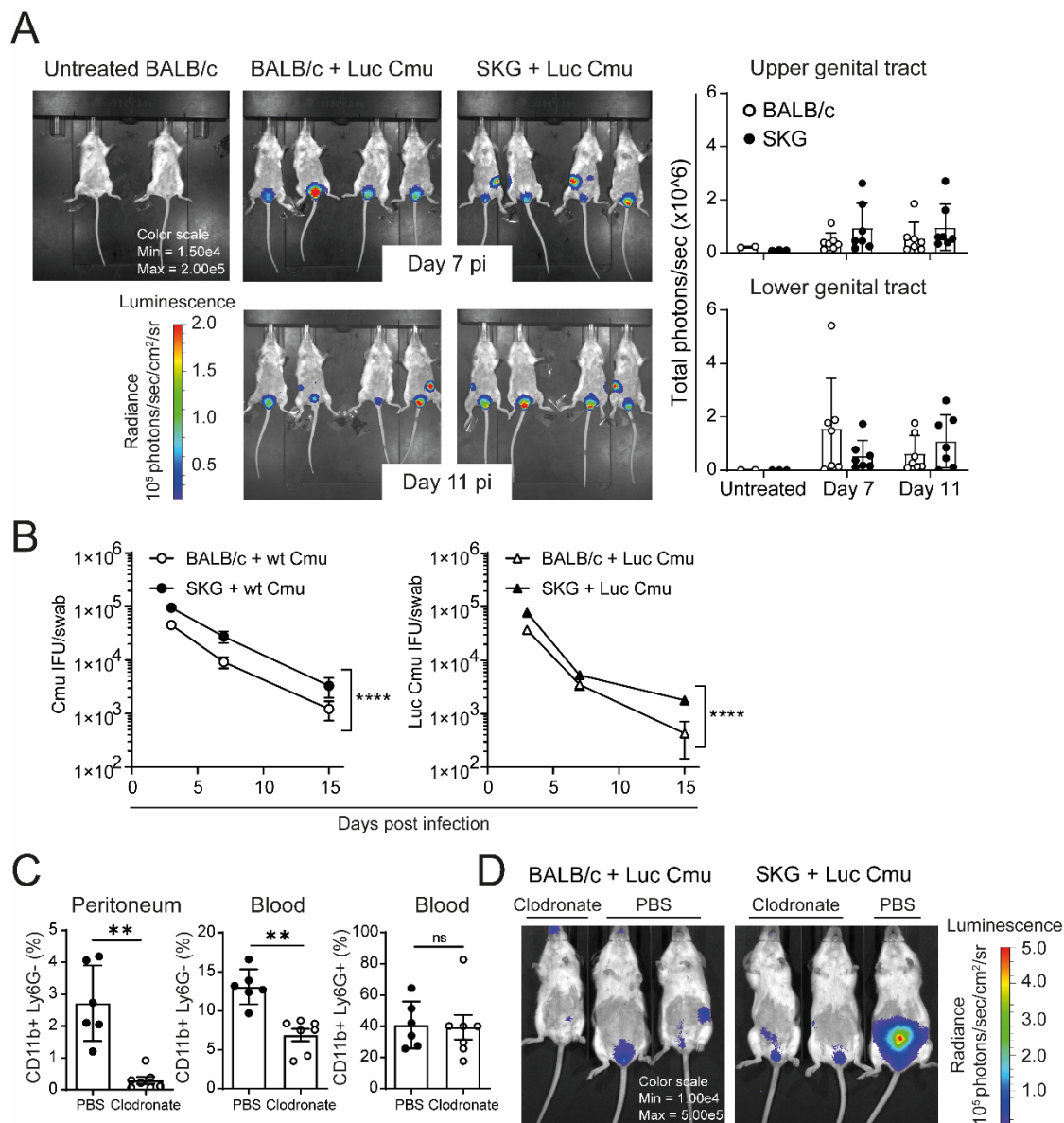
Figures

Figure 1. Macrophages and neutrophils infiltrate the genital tract of infected mice and transport *Chlamydia muridarum* systemically



Female BALB/c or SKG mice (n=2-4/group) remained untreated or were primed with progesterone, then infected 1 week later with 10^6 IFU *Chlamydia muridarum* (Cmu). One week post-infection, flow cytometric analysis of number (**A**, **B**, **C**) of live CD45.2⁺ dendritic cells (MHCII⁺CD11b⁺CD11c⁺CD103⁺), macrophages (MHCII⁺CD11b⁺CD11c⁺CX3CR1⁺), and neutrophils (MHCII⁺CD11b⁺Ly6G⁺) were assessed. Cmu DNA detected by PCR (**D**) in splenic dendritic cells (DC) (MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺), macrophages (Mac) (MHCII⁺CD11c⁺CX3CR1⁺), and neutrophils (Neu) (MHCII⁺CD11b⁺Ly6G⁺). To quantify Cmu DNA, Cmu copy number was normalized to number of sorted cells (**E**). Data represent mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, with 2-way ANOVA and post hoc Tukey's test.

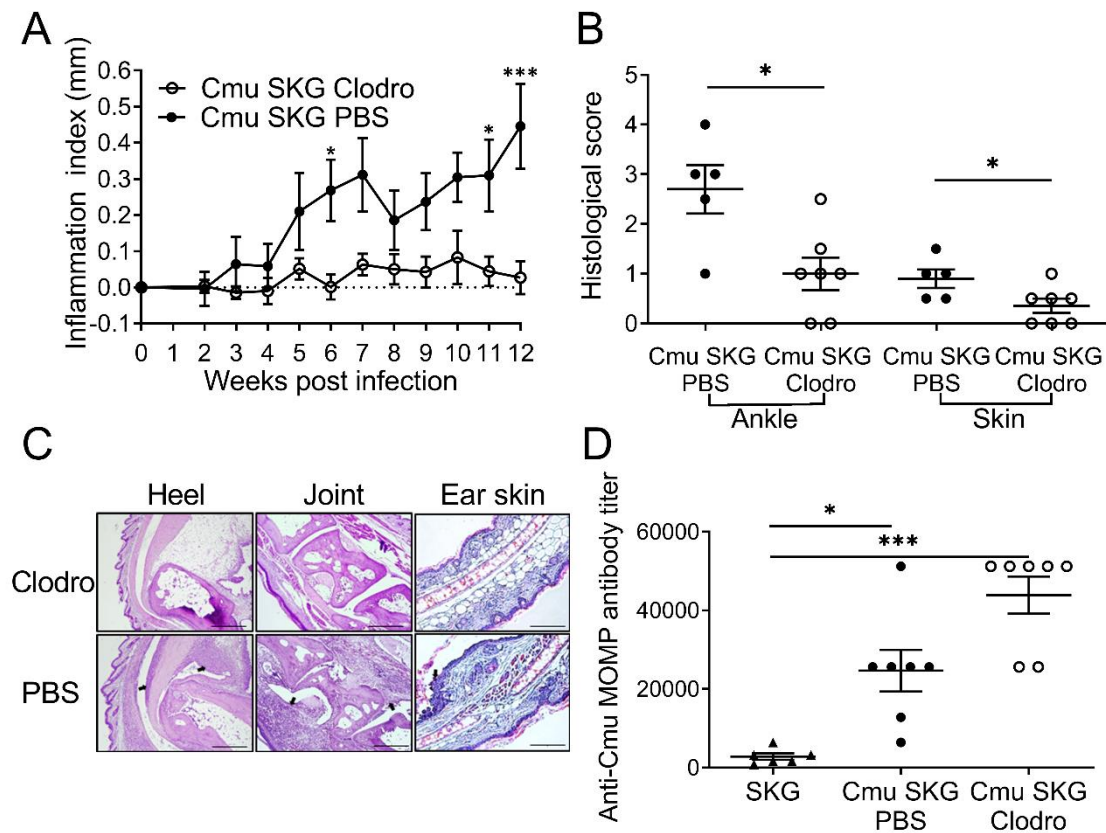
Figure 2. Infected macrophages disseminate *Chlamydia muridarum* to upper genital tract



SKG and BALB/c mice were infected intra-vaginally with 2.10^5 IFU pGreen Fluorescent Protein-Luciferase-*Chlamydia muridarum* (Luc Cmu) weiss strain. Infected and control uninfected mice were imaged *in vivo* 7 and 11 days post infection (pi) (A). Cmu load in genital swabs from infected mice from day 3 to day 15 pi with 10^6 IFU wild type (wt Cmu) (left) or Luc Cmu (right, n=5 per group) (B). SKG and BALB/c mice were administered PBS or clodronate liposomes the day before infection with 10^6 Luc Cmu. Proportion of macrophages/monocytes (CD11b⁺Ly6G⁻) and neutrophils (CD11b⁺Ly6G⁺) were assessed in blood and peritoneal cavity 3 days after clodronate injection by flow cytometry (n=7 mice) or PBS liposome (n=6 mice) (C). Mice were imaged *in vivo*, 6 days later (D). Representative of

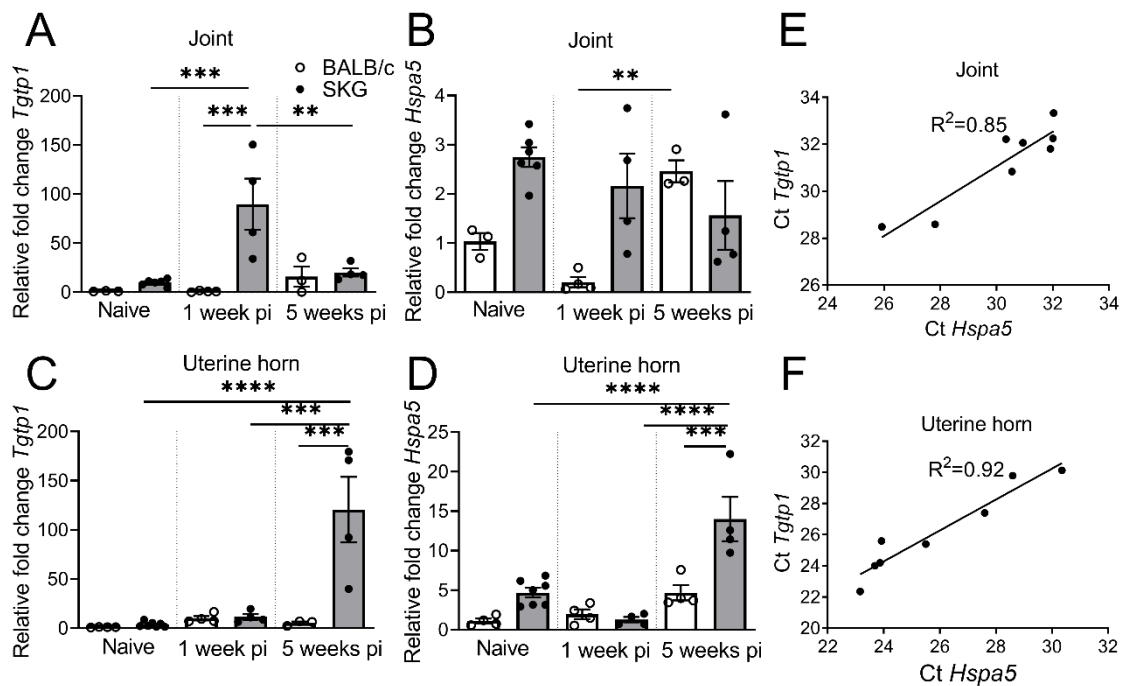
2 similar experiments. Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, **(B)** 2-way ANOVA and post hoc Tukey's test; **(C)** Mann-Whitney test.

Figure 3. Macrophages are immunosuppressive and required for *Chlamydia muridarum* reactive arthritis



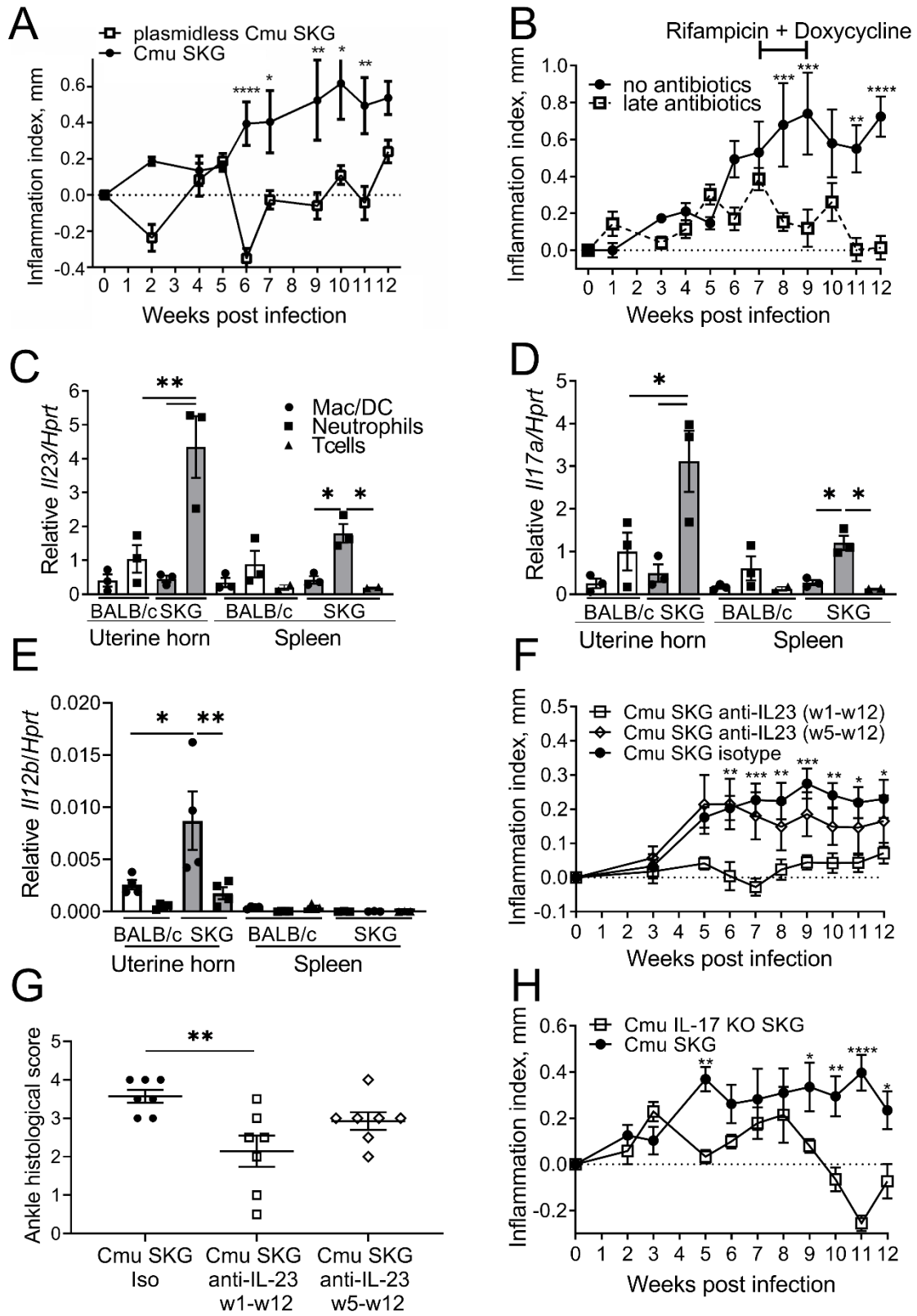
SKG mice were administered PBS (n=7) or clodronate liposomes (n=7, 2mg/20g mouse as initial dose then 1mg/20g/week) from the day of *Chlamydia muridarum* (Cmu) infection until week 12. Inflammation index indicates mean \pm SEM ankle width (mm) variation compared to baseline (A). Hind paw joint and skin histological scores (0-5) 12 weeks post infection (B). Representative H&E-stained sections from heels, hind paw joints and ear skin, harvested 12 weeks after infection (C). Original magnification x4 for heels, hind paw, and x20 for ear skin. Bars represent 500 μ m for magnification x4 and 100 μ m for x20. Arrows represent Achilles tendinitis, synovitis, fasciitis, inflammatory cell infiltrate and epidermal thickening. Serum anti-Cmu MOMP antibody titers, measured by ELISA, 12 weeks post-infection (D). *p<0.05, ***p<0.001, with 2-way ANOVA and post hoc Tukey's test (A), t-test (B) and one-way non-parametric ANOVA (Kruskal Wallis test) and post hoc Dunn's test (D).

Figure 4. Endoplasmic reticulum stress and immunity-related GTPase are increased in SKG joints and genital tract



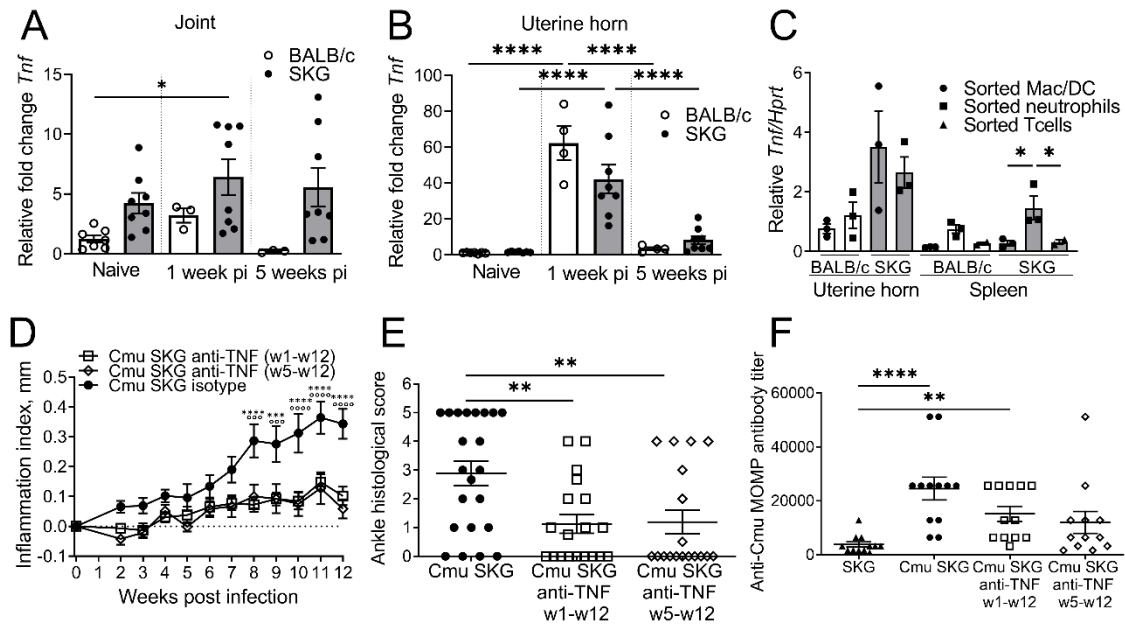
Tgtp1 (A, C) and *Hspa5* (B, D) were quantified by RT-qPCR analysis relative to non infected BALB/c mice at baseline and 1 and 5 weeks post-infection (pi) in joints (A, B) and uterine horn (C, D) of infected SKG (black circle) and BALB/c (white circle) mice. Correlation between Ct *Tgtp1* and Ct *Hspa5* in joint (E) and uterine horn (F) of infected SKG mice. Each symbol represents an individual mouse (n=3 to 7 mice per group). Data represent mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, with one-way ANOVA and post hoc Tukey's test.

Figure 5. Neutrophil derived IL-23 and IL-17 promote *Chlamydia muridarum* reactive arthritis



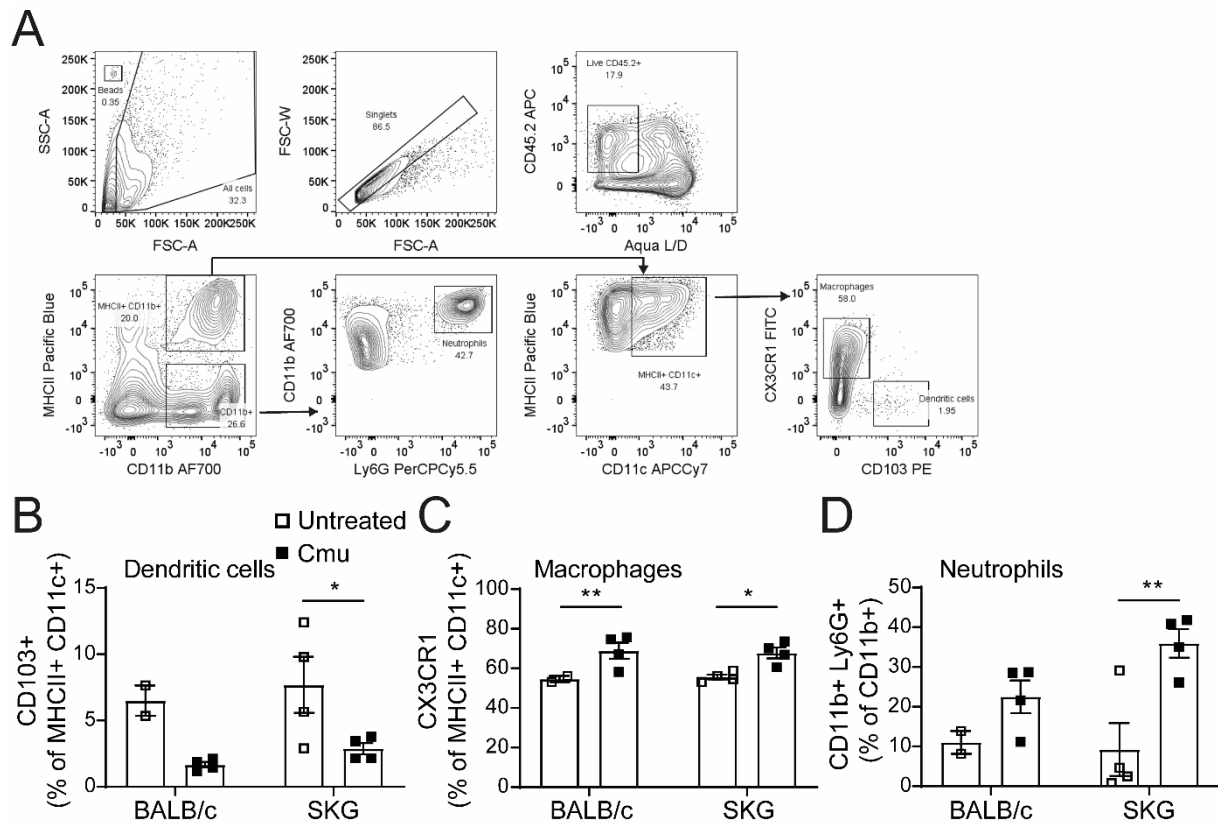
Inflammation index over 12 weeks of SKG mice infected with Cmu or Plasmid-deficient Cmu (**A**). Inflammation index over 12 weeks of SKG mice infected with Cmu and treated with rifampicin (0.4 mg/day) and doxycycline (0.3 mg/day) from week 7 to week 9 post infection (pi) (**B**). BALB/c or SKG mice were infected with Cmu. One-week pi, macrophages/DCs (MHCII⁺CD11c⁺), neutrophils (CD11b⁺Ly6G⁺) and lymphocytes (CD3⁺) were sorted from spleen and uterine horn. Expression of *Ii23a* (**C**) *Ii17a* (**D**) and *Ii12b* (**E**) relative to *Hprt* was quantified by RT-qPCR (n=3). Inflammation index over 12 weeks of Cmu-infected SKG mice administered anti-mouse IL23p19 or isotype mAb either from week 1 to week 12 (w1-w12, n=9) or from week 5 to week 12 (w5-w12, n=8, isotype n=13) (**F**). Hind paw histological scores from Cmu-infected mice treated with anti-mouse IL23p19 or isotype mAb (**G**). Inflammation index over 12 weeks of Cmu-infected SKG and *Ii17a*^{-/-} SKG mice. (n=4 to 6 per group) (**H**). Data represent mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, (**A, B, F, H**) 2-way ANOVA; (**C, D, E, G**) one-way ANOVA and post hoc Tukey's test.

Figure 6. *Chlamydia muridarum* reactive arthritis depends on TNF



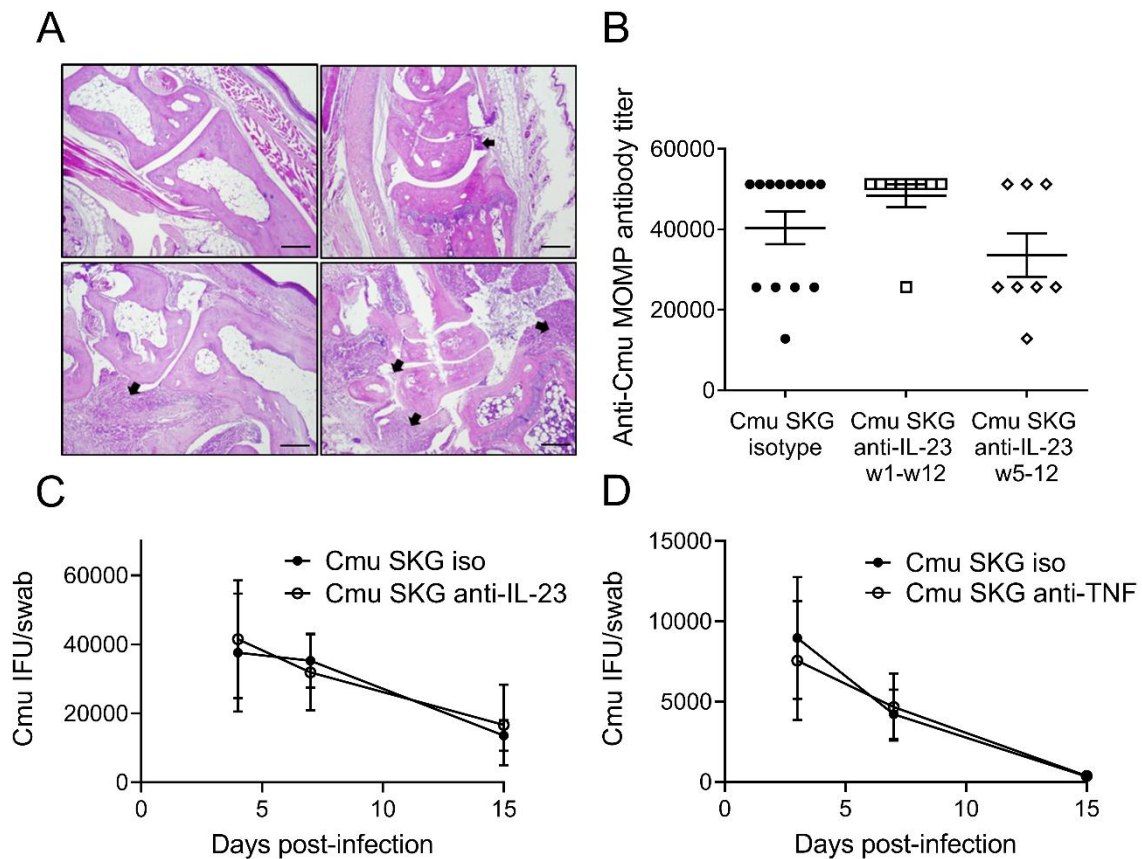
Tnf expression was quantified by RT-qPCR analysis relative to non infected BALB/c mice at baseline, 1 and 5 weeks post infection (pi) in joints (A) and uterine horn (B) of infected SKG (black circle) and BALB/c (white circle) mice. BALB/c or SKG mice were infected with *Chlamydia muridarum* (Cmu). One-week pi, macrophages/DCs (MHCII⁺CD11c⁺), neutrophils (CD11b⁺Ly6G⁺) and lymphocytes (CD3⁺) were sorted from spleen and uterine horn. Expression of *Tnf* relative to relative to *Hprt* was quantified by RT-qPCR (C). Inflammation index over 12 weeks of Cmu-infected SKG mice administered with mouse-adapted certolizumab pegol or etanercept or PBS either from week 1 to week 12 (w1-w12, n=18, treatments pooled) or from week 5 to week 12 (w5-w12, n=17, treatment pooled) (PBS n=19) (D). Hind paw histological score in mice 12 weeks pi with Cmu and treated with anti-TNF or PBS (E). Serum anti-Cmu MOMP antibody titres, measured by ELISA, 12 weeks pi (F). Bars represent the mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, (A, B, C, E) one-way ANOVA and post hoc Tukey's test; (D) 2-way ANOVA and post Tukey's test; (F) one-way non-parametric ANOVA (Kruskal Wallis test) and post hoc Dunn's test.

Supplementary Figure 1. Macrophages and neutrophils infiltrate the genital tract of *Chlamydia muridarum* infected mice.



Female BALB/c or SKG mice (n=2-4/group) remained untreated or were primed with progesterone, then infected 1 week later with 10^6 IFU *Chlamydia muridarum* (Cmu). One week post-infection, flow cytometric analysis (A) of percentage (B, C, D) of live CD45.2⁺ dendritic cells (MHCII⁺CD11b⁺CD11c⁺CD103⁺), macrophages (MHCII⁺CD11b⁺CD11c⁺CX3CR1⁺), and neutrophils (MHCII⁺CD11b⁺Ly6G⁺) were assessed. Data represent mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, with 2-way ANOVA and post hoc Tukey's test.

Supplementary Figure 2. IL-23 blockade prevents reactive arthritis



Hematoxylin and eosin-stained sections from the joints of infected SKG mice administered anti-mouse IL-23p19 or isotype mAb, harvested 12 weeks pi (A). Bars represent 500 μ m. Original magnification \times 4. Arrows represent synovitis and inflammatory cell infiltrate. Serum anti-*Cmu* MOMP antibody titres, measured by ELISA, 12 weeks pi (B). Bars represent the mean \pm SEM. Each symbol represents an individual mouse. *Cmu* load in genital swabs from mice infected with 7.10^3 IFU of *Cmu* (Cmu SKG) treated with anti-IL23-p19 antibodies (n=11 for Cmu SKG, n=6 for treated Cmu SKG) (C) or anti-TNF α (etanercept, n=10 per group) (D) from day 1 to day 35 post-infection. 2way ANOVA with post hoc Tukey's test.

Supplementary table 1. Description of experimental groups and adverse effect observed.

| Experiments | Group | Adverse events |
|-------------------------------|--|---|
| Certolizumab | Cmu SKG CTZ w1-w12 (n=9) and w5-w12 (n=9) | None |
| | Cmu SKG PBS (n=11) | None |
| Etanercept | Cmu SKG etanercept w1-w12 (n=10) and w5-w12 (n=8) | None |
| | Cmu SKG PBS (n=8) | None |
| Anti-IL-23 p19 | Cmu SKG anti-IL23p19 w1-w12 (n=9) and w5-w12 (n=8) | None |
| | Cmu SKG isotype w1-w12 (n=7, 6 mice analyzed) and w5-w12 (n=7) | 1 mouse euthanized for accident during Cmu inoculation |
| Clodronate liposome arthritis | Cmu SKG Clodronate-Lip (n=12, 7 mice analyzed) | 1 spontaneous death* and 4 euthanized for significant weight loss (>20%)* |
| | Cmu SKG PBS-Lip (n=8, 7 mice analyzed) | 1 spontaneous death 1 wpi* |
| Clodronate liposome imaging | Cmu SKG Clodronate-Lip (n=3, 2 mice analyzed) | 1 euthanized for significant weight loss (>20%)* |
| | Cmu SKG PBS-Lip (n=3, 1 mouse analyzed) | 1 spontaneous death 1 wpi* 1 euthanized for significant weight loss (>20%)* |
| | Cmu BALB/c Clodronate-Lip (n=3, 1 mouse analyzed) | 1 spontaneous death 1 wpi* and 1 euthanized for significant weight loss (>20%)* |
| | Cmu BALB/c PBS-Lip (n=3, 2 mice analyzed) | 1 spontaneous death 1 wpi * |

| | | |
|-------------|--|------|
| RNA tissue | SKG (n=7) and BALBc (n=4) | None |
| expression | Cmu SKG sacrificed 1 wpi (n=4) and 5wpi (n=4) | None |
| | Cmu BALBc sacrificed 1 wpi (n=4) and 5 wpi (n=4) | None |
| Antibiotics | Cmu SKG PBS (n=6) | None |
| experiment | Cmu SKG doxycycline and rifampicine w7-w9 (n=11) | |

Cmu: mice infected with *Chlamydia muridarum*, n=number of mice per group, w1-w12: treatment from week 1 to week 12 post-infection, w5-w12: treatment from week 1 to week 12 post-infection, w7-w9: treatment from week 7 to week 9, wpi: weeks post-infection, PBS: phosphate buffered saline, Lip: liposome *side effects attributed to clodronate or PBS liposome injection.

References

1. Rich E, Hook EW, 3rd, Alarcón GS, Moreland LW. Reactive arthritis in patients attending an urban sexually transmitted diseases clinic. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1172-7.
2. Baillet AC, Rehaume LM, Benham H, O'Meara CP, Armitage CW, Ruscher R, et al. High Chlamydia Burden Promotes Tumor Necrosis Factor-Dependent Reactive Arthritis in SKG Mice. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:1535-47.
3. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse. *J Infect Dis.* 1998;177:1322-5.
4. Rajeeve K, Das S, Prusty BK, Rudel T. Chlamydia trachomatis paralyzes neutrophils to evade the host innate immune response. *Nature Microbiology.* 2018;3:824-35.
5. Zeng L, Lindstrom MJ, Smith JA. Ankylosing spondylitis macrophage production of higher levels of interleukin-23 in response to lipopolysaccharide without induction of a significant unfolded protein response. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3807-17.
6. Goodall JC, Wu C, Zhang Y, McNeill L, Ellis L, Saudek V, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:17698-703.
7. Ciccica F, Guggino G, Zeng M, Thomas R, Ranganathan V, Rahman A, et al. Pro-inflammatory CX3CR1(+) CD59(+) TL1A(+) IL-23(+) monocytes are expanded in patients with Ankylosing Spondylitis and modulate ILC3 immune functions. *Arthritis Rheumatol.* 2018.
8. Kvedaraitė E, Lourda M, Idestrom M, Chen P, Olsson-Akefeldt S, Forkel M, et al. Tissue-infiltrating neutrophils represent the main source of IL-23 in the colon of patients with IBD. *Gut.* 2016;65:1632-41.
9. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, et al. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR-gammat+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat Med.* 2012;18:1069-76.
10. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2633-43.
11. Antoniou AN, Lenart I, Kriston-Vizi J, Iwawaki T, Turmaine M, McHugh K, et al. Salmonella exploits HLA-B27 and host unfolded protein responses to promote intracellular replication. *Ann Rheum Dis.* 2019;78:74-82.
12. Ciccica F, Accardo-Palumbo A, Rizzo A, Guggino G, Raimondo S, Giardina A, et al. Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with ankylosing spondylitis and subclinical gut inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:1566-74.
13. Kanayama M, Inoue M, Danzaki K, Hammer G, He YW, Shinohara ML. Autophagy enhances NFkappaB activity in specific tissue macrophages by sequestering A20 to boost antifungal immunity. *Nat Commun.* 2015;6:5779.
14. Shenoy AR, Kim BH, Choi HP, Matsuzawa T, Tiwari S, MacMicking JD. Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families. *Immunobiology.* 2007;212:771-84.
15. Al-Zeer MA, Al-Younes HM, Braun PR, Zerrahn J, Meyer TF. IFN-gamma-inducible Irga6 mediates host resistance against Chlamydia trachomatis via autophagy. *PLoS One.* 2009;4:e4588.
16. Al-Zeer MA, Al-Younes HM, Lauster D, Abu Lubad M, Meyer TF. Autophagy restricts Chlamydia trachomatis growth in human macrophages via IFNG-inducible guanylate binding proteins. *Autophagy.* 2013;9:50-62.

17. Campbell J, Huang Y, Liu Y, Schenken R, Arulanandam B, Zhong G. Bioluminescence imaging of *Chlamydia muridarum* ascending infection in mice. *PLoS One*. 2014;9:e101634.
18. O'Connell CM, Nicks KM. A plasmid-cured *Chlamydia muridarum* strain displays altered plaque morphology and reduced infectivity in cell culture. *Microbiology*. 2006;152:1601-7.
19. Steptoe RJ, Stankovic S, Lopaticki S, Jones LK, Harrison LC, Morahan G. Persistence of recipient lymphocytes in NOD mice after irradiation and bone marrow transplantation. *Journal of autoimmunity*. 2004;22:131-8.
20. Biewenga J, van der Ende MB, Krist LF, Borst A, Ghufron M, van Rooijen N. Macrophage depletion in the rat after intraperitoneal administration of liposome-encapsulated clodronate: depletion kinetics and accelerated repopulation of peritoneal and omental macrophages by administration of Freund's adjuvant. *Cell and tissue research*. 1995;280:189-96.
21. Claassen I, Van Rooijen N, Claassen E. A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogeneous cell populations in vitro, using the liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *Journal of immunological methods*. 1990;134:153-61.
22. Naglak EK, Morrison SG, Morrison RP. Neutrophils Are Central to Antibody-Mediated Protection against Genital Chlamydia. *Infect Immun*. 2017;85.
23. Porcella SF, Carlson JH, Sturdevant DE, Sturdevant GL, Kanakabandi K, Virtaneva K, et al. Transcriptional profiling of human epithelial cells infected with plasmid-bearing and plasmid-deficient *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 2015;83:534-43.
24. Airene S, Surcel HM, Alakärppä H, Laitinen K, Paavonen J, Saikku P, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. *Infection and immunity*. 1999;67:1445-9.
25. Junt T, Moseman EA, Iannaccone M, Massberg S, Lang PA, Boes M, et al. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature*. 2007;450:110-4.
26. Scurlock AM, Frazer LC, Andrews CW, Jr., O'Connell CM, Foote IP, Bailey SL, et al. Interleukin-17 contributes to generation of Th1 immunity and neutrophil recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection but is not required for macrophage influx or normal resolution of infection. *Infect Immun*. 2011;79:1349-62.
27. Zhang Y, Wang H, Ren J, Tang X, Jing Y, Xing D, et al. IL-17A synergizes with IFN-gamma to upregulate iNOS and NO production and inhibit chlamydial growth. *PLoS One*. 2012;7:e39214.
28. O'Meara CP, Armitage CW, Harvie MC, Andrew DW, Timms P, Lycke NY, et al. Immunity against a *Chlamydia* infection and disease may be determined by a balance of IL-17 signaling. *Immunology and cell biology*. 2014;92:287-97.
29. George Z, Omosun Y, Azenabor AA, Partin J, Joseph K, Ellerson D, et al. The Roles of Unfolded Protein Response Pathways in *Chlamydia* Pathogenesis. *J Infect Dis*. 2017;215:456-65.
30. Meyer A, Chatelus E, Wendling D, Berthelot JM, Dernis E, Houvenagel E, et al. Safety and efficacy of anti-tumor necrosis factor alpha therapy in ten patients with recent-onset refractory reactive arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63:1274-80.
31. Gerard HC, Carter JD, Hudson AP. *Chlamydia trachomatis* is present and metabolically active during the remitting phase in synovial tissues from patients with chronic *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *Am J Med Sci*. 2013;346:22-5.
32. Gracey E, Lin A, Akram A, Chiu B, Inman RD. Intracellular survival and persistence of *Chlamydia muridarum* is determined by macrophage polarization. *PLoS One*. 2013;8:e69421.
33. Harvie MC, Carey AJ, Armitage CW, O'Meara CP, Peet J, Phillips ZN, et al. *Chlamydia*-infected macrophages are resistant to azithromycin treatment and are associated

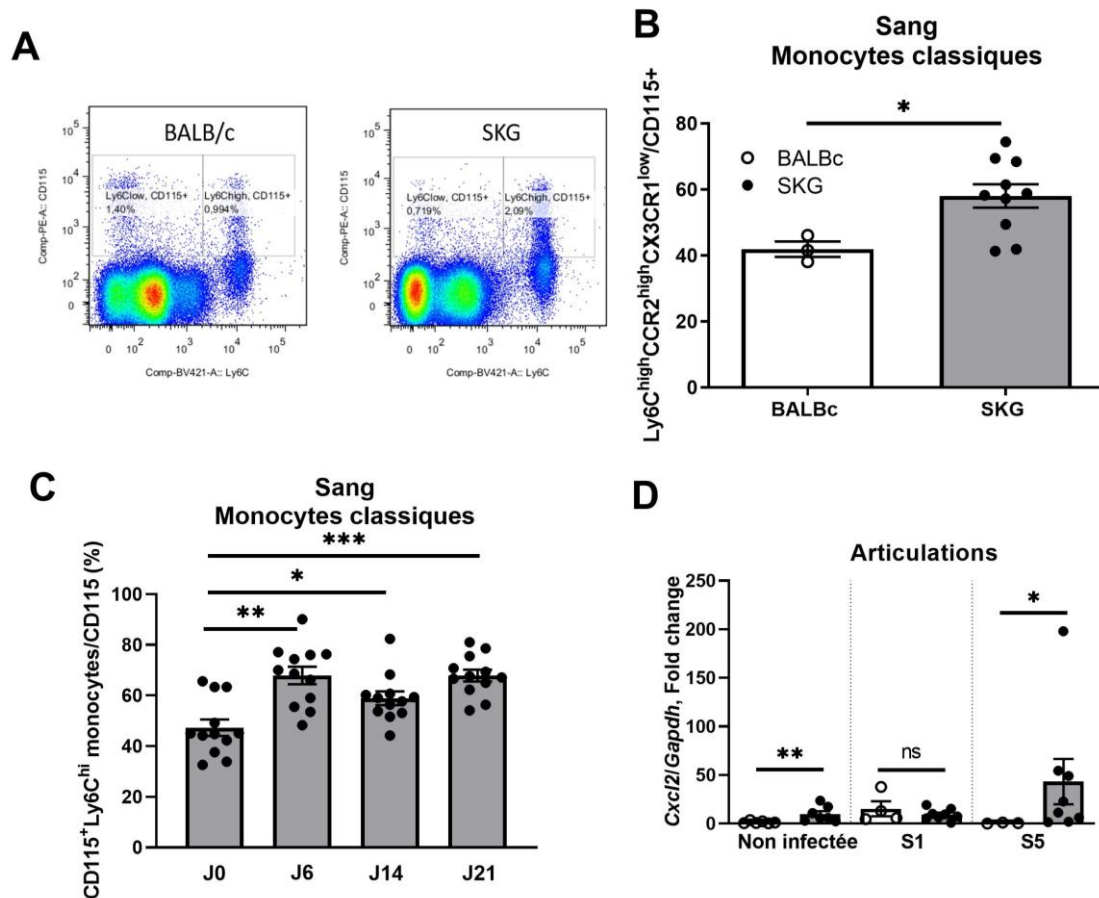
with chronic oviduct inflammation and hydrosalpinx development. *Immunology and cell biology*. 2019;97:865-76.

34. Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun*. 2004;72:1843-55.
35. Schumacher HR, Jr., Arayssi T, Crane M, Lee J, Gerard H, Hudson AP, et al. Chlamydia trachomatis nucleic acids can be found in the synovium of some asymptomatic subjects. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1281-4.
36. Gerard HC, Freise J, Wang Z, Roberts G, Rudy D, Krauss-Opatz B, et al. Chlamydia trachomatis genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs. persistent infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2002;4:13-22.
37. Gerard HC, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial Chlamydia trachomatis up regulates expression of a panel of genes similar to that transcribed by *Mycobacterium tuberculosis* during persistent infection. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:321-7.
38. Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, Faure LM, Matthews SA, Holden DW. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*. 2014;343:204-8.
39. Sun HS, Eng EW, Jeganathan S, Sin AT, Patel PC, Gracey E, et al. Chlamydia trachomatis vacuole maturation in infected macrophages. *J Leukoc Biol*. 2012;92:815-27.
40. Cotter TW, Ramsey KH, Miranpuri GS, Poulsen CE, Byrne GI. Dissemination of Chlamydia trachomatis chronic genital tract infection in gamma interferon gene knockout mice. *Infect Immun*. 1997;65:2145-52.
41. Virok DP, Raffai T, Kokai D, Paroczai D, Bogdanov A, Veres G, et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Chlamydia muridarum and Chlamydia pneumoniae Infected Mouse Lung Tissues. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:192.
42. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, Letourneur F, Jacques S, Smith JA, et al. Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:841-51.
43. Smith JA, Barnes MD, Hong D, DeLay ML, Inman RD, Colbert RA. Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon-gamma dysregulation. *Arthritis Rheum*. 2008;58:1640-9.
44. Bah A, Vergne I. Macrophage Autophagy and Bacterial Infections. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1483.
45. Peral de Castro C, Jones SA, Ni Cheallaigh C, Hearnden CA, Williams L, Winter J, et al. Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on IL-1 secretion. *J Immunol*. 2012;189:4144-53.
46. Munz C. Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore? *Curr Opin Immunol*. 2010;22:89-93.
47. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009;10:314-24.
48. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009;31:331-41.
49. Pfeifle R, Rothe T, Ipseiz N, Scherer HU, Culemann S, Harre U, et al. Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2017;18:104-13.
50. Deodhar A, Gensler LS, Sieper J, Clark M, Calderon C, Wang Y, et al. Three Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Studies Evaluating the Efficacy and Safety of Ustekinumab in Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71:258-70.

1.3. Perspectives

Ce travail montre donc la place importante que tient le macrophage dans le développement de l'arthrite réactionnelle. Les souris BALB/c ne développent pas d'arthrite à la suite de l'infection à *Chlamydia* à la différence des souris SKG, laissant donc suggérer que la réponse du macrophage diffère chez les souris SKG. Il s'avère que la proportion des monocytes classiques pro-inflammatoires sanguins $CD11b^+CD115^+Ly6C^{hi}CCR2^{hi}CX3CR1^{lo}$ est augmentée dans le sang circulant des souris SKG non infectées comparativement à des souris BALB/c (**Figure 14 A, B**). Ces monocytes sont reconnus pour être recrutés sur le site inflammatoire et se différencier en macrophages pro-inflammatoires M1. L'infection à *C. muridarum*, d'ailleurs, entraîne une expansion de ces monocytes classiques pro-inflammatoires circulants (**Figure 14 C**) comme ce qui est observé dans les SpA humaines (150, 151). De façon intéressante, une augmentation de l'expression de CXCL2, chimiokine produite par les monocytes et macrophages polarisés M1, impliquée dans l'attraction des neutrophiles sur le site inflammatoire, est observée dans les articulations des souris SKG nativement et à 5 semaines post-infection au moment où l'arthrite se développe (**Figure 14 D**). Ces données suggèrent que les monocytes/macrophages privilégient une polarisation pro-inflammatoire M1 dans le modèle SKG, responsable du recrutement des neutrophiles dans l'articulation amenant au développement de l'arthrite. Les déterminants expliquant ce phénomène restent encore à être évalués.

Figure 14. Les monocytes classiques pro-inflammatoires sont augmentés chez la souris SKG

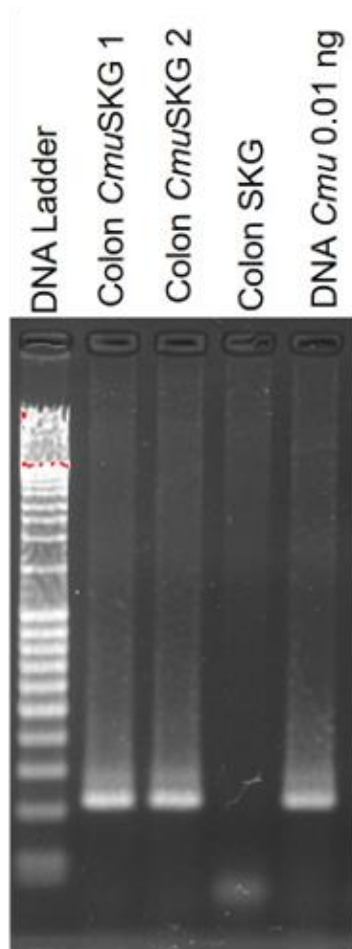


(A) Graphiques de cytométrie en flux des monocytes sanguin CD115⁺CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} chez les BALB/c et les SKG non infectées (A). Proportion de monocytes sanguin classiques Ly6C^{high}CCR2^{high}CX3CR1^{low} parmi les monocytes CD115⁺CD11b⁺Ly6G⁻ des souris SKG non infectées (n=10) par rapport aux souris BALB/c non infectées (n=3) (B). Evolution de la proportion des monocytes sanguin CD11b⁺CD115⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} chez la souris SKG au cours de l'infection à *Chlamydia muridarum* survenu au jour 0 (J0) (C). Expression génétique de *Cxcl2* dans l'articulation, de souris SKG (rond noir) et BALB/c (rond blanc) non infecté ou à une semaine (S1) ou 5 semaines (S5) post-infection, relatif à des souris BALB/c non infectée quantifiée par PCR quantitative en temps réelle (RT-qPCR) normalisée sur l'expression de *Gapdh* (D). Les données représentent la moyenne ± SEM. Test t de Student (B, C) et test de Mann-Whitney (D), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

L'arthrite réactionnelle semble dû à une dysfonction du système immunitaire inné qui favorise la dissémination et la persistance de signaux de danger ou PAMPs à l'origine de la réponse inflammatoire tissulaire chronique. Bien que ce concept de l'infection persistante à *C. trachomatis* soit connu depuis de nombreuses années, très peu d'études précisent les mécanismes impliqués dans le développement de l'arthrite réactionnelle. Il a été montré chez l'Homme la présence persistante de *Chlamydia* qui loge dans les articulations sous un forme

aberrante métaboliquement active (310). Il est envisageable que d'autres tissus soient chroniquement infectés et forment une sorte de réservoir capable d'alimenter régulièrement l'articulation en *Chlamydia*. Une méta-analyse, incluant 14 études, retrouve des taux élevés d'infection rectale concomitante (68,1%) chez les femmes atteintes d'une infection urogénitale à *C. trachomatis* (343). Les études sur les modèles murins ont aussi identifié que, suite à une infection génitale, le *Chlamydia* se propage à l'intestin (344). Cette dissémination de l'infection n'était pas expliquée par une auto-inoculation orale de *Chlamydia* du fait de la coprophagie des souris. Alors que l'infection à *C. trachomatis* est contrôlée rapidement au niveau génital chez la souris (durée moyenne d'infection : 25 jours), une infection active persiste au niveau du colon (durée moyenne d'infection >260 jours) permettant la libération de corps élémentaires infectants sans qu'aucune réponse inflammatoire locale soit à noter (345). L'intestin serait donc un réservoir bactérien de *Chlamydia*. Cela est rendu possible par l'absence de mise en place d'une réponse immunitaire locale dirigée contre *Chlamydia* mais aussi par l'inefficacité des traitements antibiotiques utilisés actuellement, notamment l'azithromycine, pour traiter ce réservoir bactérien (346). Le portage chronique digestif est une source antigénique de *Chlamydia* à l'origine d'une stimulation chronique de l'immunité innée et de réinfection qui pourraient être impliqués dans la genèse de l'arthrite réactionnelle. Le concept du « Two hit model » visant à expliquer la survenue chez certaines femmes de lésions de fibrose cicatricielle des trompes utérines met en jeu la présence d'une infection digestive persistante à *C. trachomatis* (347, 348). Ce réservoir bactérien entraînerait la génération de lymphocytes CD8⁺ et de cytokines pro-fibrotiques (TNF et IL-13) impliquées dans ces phénomènes. Il est de plus en plus suspecté que les cellules de l'immunité innée intestinale (ILC3 et les lymphocytes T $\gamma\delta$) sont activées localement par le microbiote ce qui induit une migration de ces cellules vers les articulations, entraînant les phénomènes d'enthésite et d'arthrite. Alors qu'aucune trace d'ADN de *Chlamydia* persiste à 12 semaines post-infection dans la rate, les trompes utérines et l'utérus des souris SKG, nous avons mis en évidence la persistance de *Chlamydia* dans le colon distal de deux souris sur six testées (**Figure 15**). Il est donc possible que le colon puisse être un sanctuaire pour *Chlamydia* entraînant une stimulation chronique de l'immunité digestive à l'origine de l'activation d'un sous-ensemble de cellules immunitaire innées responsable de l'arthrite. Une étude plus précise des mécanismes de polarisation macrophagique et de l'effet sur l'immunité muco-sale de la persistance de *Chlamydia* dans l'arthrite réactionnelle pourrait améliorer notre compréhension de cette maladie.

Figure 15 : De l'ADN de *Chlamydia muridarum* est détecté 12 semaines après l'infection dans le côlon distal mais pas dans les trompes de Fallope, l'utérus ou la rate.



(A) De l'ADN de *Chlamydia muridarum* est détecté par PCR dans le côlon distal de deux souris SKG infectées (CmuSKG 1 et 2) 12 semaines après une infection génitale. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% du produit de réaction de la PCR.

2. Etude de l'implication du neutrophile dans l'arthrite réactionnelle

2.1. Introduction

Dans le travail publié précédemment nous avons mis en évidence la présence d'ADN de *Chlamydia muridarum* dans les neutrophiles présents dans la rate une semaine après infection. Ces neutrophiles expriment de l'*IL17* et *IL23* suggérant qu'ils pourraient avoir un rôle dans l'initiation de l'arthrite réactionnelle.

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans le sang humain et sont les premières cellules immunitaires recrutées lors du processus inflammatoire. Ils sont particulièrement connus pour leurs fonctions antimicrobiennes, ce qui en fait la première ligne de défense du système immunitaire contre les micro-organismes invasifs. Il est aujourd'hui reconnu que les neutrophiles, en plus de leur fonction de phagocytose, de dégranulation, de production d'espèces réactives de l'oxygène et de NETs, ont des fonctions additionnelles importantes : production de cytokines, modulation des activités des cellules voisines contribuant à la résolution de l'inflammation, régulation de la polarisation des macrophages et modulation de la réponse des cellules B, des anticorps et des cellules T, en particulier les lymphocytes T $\gamma\delta$ (349, 350).

Ces dernières années, les preuves se sont accumulées que les neutrophiles sont des cellules immunitaires plastiques pouvant changer de phénotypes, générant diverses sous-populations avec des fonctions différentes. Au cours d'une infection, trois sous-types de neutrophiles peuvent être observés (351) :

- Les neutrophiles pro-inflammatoires (PNN-I), qui expriment TLR2/TLR4/TLR5/TLR8, CD49d^{hi} CD11b^{low}, sécrètent l'IL-12 et qui ont la capacité d'induire une polarisation pro-inflammatoire des macrophages M1
- Les neutrophiles anti-inflammatoires (PNN-II), qui expriment TLR2/TLR4/TLR7/TLR9, CD49d^{low} CD11b^{hi}, sécrètent l'IL-10 et activent les macrophages alternatifs M2
- Les neutrophiles normaux (PNN-N).

Les neutrophiles ont une capacité unique leur permettant de migrer de la circulation sanguine vers les tissus puis de repartir dans la lumière vasculaire. Cette capacité s'appelle la migration transendothéliale inverse (« reverse transendothelial migration »). Ces neutrophiles expriment

alors les marqueurs de surfaces ICAM-1^{hi} CXCR1^{low} contrairement aux neutrophiles classiques présent dans la circulation sanguine (ICAM-1^{low} CXCR1^{hi}) ou tissulaire (ICAM-1^{low} CXCR1^{hi}). Cette caractéristique fait du neutrophile une cellule pouvant potentiellement transporter des bactéries vers des sites périphériques tels que les articulations via la circulation sanguine. Un autre sous-type de PNN, les PNN CCR7⁺LFA-1⁺CXCR4⁺, peut migrer dans les ganglions lymphatiques pour interagir avec les lymphocytes. Ainsi, les PNN coordonnent la réponse immunitaire innée et adaptative.

C. trachomatis, bactérie intracellulaire, développe des subterfuges afin de pouvoir se répliquer dans les cellules, notamment en empêchant l'apoptose des cellules infectées et en modifiant le métabolisme cellulaire vers la glycolyse aérobie, ce qui lui permet d'obtenir les substrats anaboliques nécessaire pour sa réplication (352). *C. trachomatis* est capable de se répliquer et de survivre dans les neutrophiles (289). *C. pneumoniae* utilise les neutrophiles pour produire des corps apoptotiques infectants qui seront phagocytés par les macrophages, induisant une polarisation M2 favorable à la persistance de l'infection (290, 295). Enfin, par sa capacité de migration transendothéliale inverse, le neutrophile a possiblement la capacité de transporter *Chlamydia* du site de l'infection vers les articulations.

Certaines données ont démontré que les neutrophiles sont impliqués dans l'axe IL-23/IL-17, cytokines clefs dans la physiopathologie des SpA. Les neutrophiles CXCR1⁺CXCR2⁺IL-23⁺ sont la principale source d'IL-23 dans le côlon des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (353). Des neutrophiles produisant de l'IL-23 et de l'IL-17 sont retrouvés en quantité importante dans les articulations zygapophysaires du rachis des patients atteints de SpA (126, 131). Enfin, les principales cellules inflammatoires observées dans la pneumopathie interstitielle, dans le modèle SKG, sont des neutrophiles CD11b⁺Gr1⁺ qui co-expriment l'IL-17A et le GM-CSF plutôt que le TNF- α (354).

Nous avons donc réalisé un travail préliminaire visant à explorer si les neutrophiles étaient impliquées dans la genèse de l'arthrite réactionnelle dans le modèle murin SKG.

Dans ce travail j'ai :

- Contribué de manière substantielle à la conception et au design de l'étude.
- Obtenu un financement de 20 000 euros en déposant le projet (bourse Dreamer 2020)
- Participé à l'écriture du dossier déposé au comité d'éthique.

- Réalisé les expériences animales où j'avais la charge d'induire la maladie en provoquant une infection vaginale à *Chlamydia*, de réaliser des prélèvements vaginaux, d'obtenir des prélèvements de sang, de déléter les neutrophiles, de mesurer les articulations et de réaliser les prélèvements terminaux.
- Effectué la préparation et l'analyse par cytométrie en flux pour m'assurer que la déplétion en neutrophile était bien obtenue.
- Mesuré par immunofluorescence la charge bactérienne en *Chlamydia*.
- Encadré le travail d'un étudiant de Master 2, Mr Mickael Dalecky de janvier à juin 2021.
- Contribué substantiellement à l'analyse des données.
- Rédigé les résultats de ce travail.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1 Souris SKG

Des souris femelles SKG (souris BALB/c mutantes ZAP-70^{w163c}) âgées de 6 à 10 semaines ont été élevées et maintenues dans des conditions spécifiques exemptes d'agents pathogènes (SPF) à la plateforme de haute technologie animale à Grenoble (France, C 3851610006). Les conditions d'hébergement étaient les suivantes : humidité de 50% ±20%, température de 19-23°C, sessions de 12/12 heures d'obscurité et de lumière et accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Dans ces conditions, les souris SKG ne développent pas d'arthrite spontanée. L'étude sur les animaux a été menée conformément à la directive européenne 2010/63/UE et les procédures expérimentales ont été approuvées par un comité d'éthique (246_UHTA-FRE3405-AB-01).

2.2.2 Infection des souris par le *Chlamydia muridarum*

Les souris SKG ont été infectées avec 7.10^4 « Inclusion Forming Unit » (IFU) de *C. muridarum* introduit au niveau du vagin sous anesthésie générale par kétamine (100mg/kg, IP) et xylazine (10mg/kg, IP). Une semaine avant l'infection, une synchronisation hormonale favorisant la prise de l'infection a été réalisée par une injection sous cutanée de 2,5mg d'acétate de médroxyprogestérone (Depo Provera®, Pfizer).

2.2.3 Evaluation clinique

Le gonflement des pattes a été évalué par le même observateur (XR) chaque semaine pendant toute l'expérience. L'épaisseur des pattes arrière et avant était mesurée à l'aide d'un pied à coulisse numérique toutes les semaines pendant 12 semaines après l'infection. L'index

inflammatoire des pattes (variation du gonflement des pattes par rapport aux mesures de référence avant l'infection) a été calculé (342). Les souris étaient pesées une fois par semaine. La fin de l'expérience était fixée à 12 semaines post-infection ou si des points limites étaient atteints.

2.2.4 Déplétion in vivo de neutrophiles

Une injection quotidienne IP de 100 µg/souris d'un anticorps monoclonal anti-Ly6G (Clone 1A8, Bio X Cell) ou de son isotype (IgG2a anti-trinitrophénol, clone 2A3, Bio X Cell) était effectuée la veille de l'infection puis pendant 2 semaines après infection. L'efficacité de la déplétion en neutrophiles a été confirmée par cytométrie en flux. Du sang par voie rétro-orbitaire a été collecté dans des tubes EDTA (BD Microtainer K2EDTA 1.0mg) le jour de l'infection, une semaine et 3 semaines après l'infection, soit une semaine après la levée de la déplétion en neutrophiles. Les cellules ont ensuite été incubées avec un marqueur de viabilité cellulaire (LIVE/DEAD™ Near IR, Invitrogen) pendant 30 min à 4°C dans le noir. Puis après lavages au PBS les cellules étaient re-suspendues dans du PBS BSA 1% avec 0,5 µg d'anti CD16/32 (CD16/CD32 Monoclonal Antibody, eBioscience) pour limiter le marquage aspécifique avant d'incuber les cellules pendant 30 minutes avec des anticorps anti-Ly6G APC (1A8-Ly6G, eBioscience), anti-CD3 FITC (17A2, eBioscience), anti-CD11b eFluor 506 (M1/70, eBioscience), anti-CD115 PE (AFS98, eBioscience), anti-CD45 PerCPCy5.5 (30-F11, eBioscience), anti-Ly6C (SB 436, HK1.4, eBioscience). Une lyse de globules rouges et une fixation des cellules étaient ensuite réalisées (BD FACS Lysis) avant acquisition sur le cytomètre en flux BD FACSCanto™ II. L'analyse des données a été réalisée sur le logiciel Flowjo (version 10.5.0).

2.2.5 Confirmation de l'infection et étude de l'évolution de la charge bactérienne

Des frottis cervico-vaginaux ont été effectués à 3 jours, 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines et 5 semaines après l'infection. Les prélèvements ont ensuite été stockés dans un tampon SPG (sucrose/phosphate/glutamate) adapté à la conservation des *Chlamydia* puis congelés à -80°C. 4.10⁴ cellules McCoy (fibroblastes murins ; ATCC, Virginia, USA) cultivées dans du milieu DMEM avec glutamine complété avec 10% de sérum de veau fœtal et de la gentamycine (50 µg/mL), ont été déposées dans une plaque 48 puits. 24 h après, une confluence de 90% a été obtenue et 10 à 25µL du prélèvement dilué dans un volume total de 250 µL de milieu DMEM, a ensuite été déposé sur les cellules. Les cellules ont été incubées pendant 4h à 37°C avec 5% de CO₂. Le surnageant a ensuite été jeté et remplacé par du milieu contenant 1µg/mL de

cycloheximide. Après 24h d'incubation les cellules ont été lavées puis fixées pendant 10 min avec du méthanol 100%. Puis chaque puits a été bloqué toute la nuit à 4°C avec une solution de saturation contenant 5% de sérum de veau fœtal dans du PBST (0.1% de Tween 20). Le lendemain, les cellules ont été incubées dans la solution de saturation avec 1/250 de serum de mouton anti-MOMP de *C. muridarum* pendant 1h à 37°C. Après lavage, une incubation de 1µg/mL d'un anticorps secondaire anti-mouton marqué à l'Alexa Fluor (DONKEY anti-Sheep Alexa Fluor 488 2mg/mL, Invitrogen) combiné à du Di Aminido Phenyl Indol 0.5µg/mL dilué dans du PBST a été réalisé pendant 1 heure à 37°C. Après 3 lavages avec du PBST les cellules ont été stockées dans le noir à 4°C. L'analyse par immunofluorescence a été réalisée sur un microscope Olympus IX81. L'acquisition de 12 champs de différentes zones du puits a ensuite été effectuée automatiquement et analysée grâce au logiciel ScanR (Olympus Life Science). Les IFUs ont été calculées selon la formule suivante : nombres d'IFUs/puits = nombre moyen d'IFUs par champs (obtenu suite à l'analyse de 12 puits) x nombre de champ total dans un puits. L'analyse était effectuée en duplicat.

2.2.6 Séroconversion anti-MOMP de *C. muridarum*

La séroconversion des souris a été évaluée par technique ELISA. Un prélèvement sanguin terminal a été effectué à 12 semaines post-infection sous anesthésie générale pour confirmer la séroconversion des souris. Le serum a été récupéré après une centrifugation à 4000 rpm pendant 20 min à 4 °C puis stocké à -20°C. 2 µg/puit d'antigènes MBP-MOMP dilués dans du tampon de « coating » (tampon bicarbonate : NaHCO₃ 0.1M, pH 8.6) ont été incubées sur la nuit dans une plaque 96 puits NUNC MaxiSorp (Thermo Scientific). Chaque échantillon de sérum a été incubé à une dilution différente par puits (de 1/100 à 1/204800) puis conjugué avec 4 anticorps secondaires dilués au 6000ème dans du PBST (PBS 0.05% v/v Tween 20) : anticorps de chèvre anti-IgA (Thermo Scientific), anti-IgG (Jackson ImmunoResearch), anti-IgG1 (Thermo Scientific) et anti-IgG2a (Life Technologies) de souris conjugués à la peroxydase de raifort. La révélation a été effectuée par ajout de tétraméthylbenzidine (TMB, Invitrogen) avec une incubation pendant 10 minutes puis arrêt de la réaction avec 100µL d'acide sulfurique 1M. La lecture de la densité optique de chaque puits à 450 nm a été effectuée avec un spectrophotomètre Multiskan GO (Thermo Scientific).

Le titre de séroconversion retenu pour chaque souris était la plus importante dilution de sérum pour laquelle la densité optique mesurée était supérieure à la moyenne des densités optiques des blancs additionnée de trois fois l'écart-type.

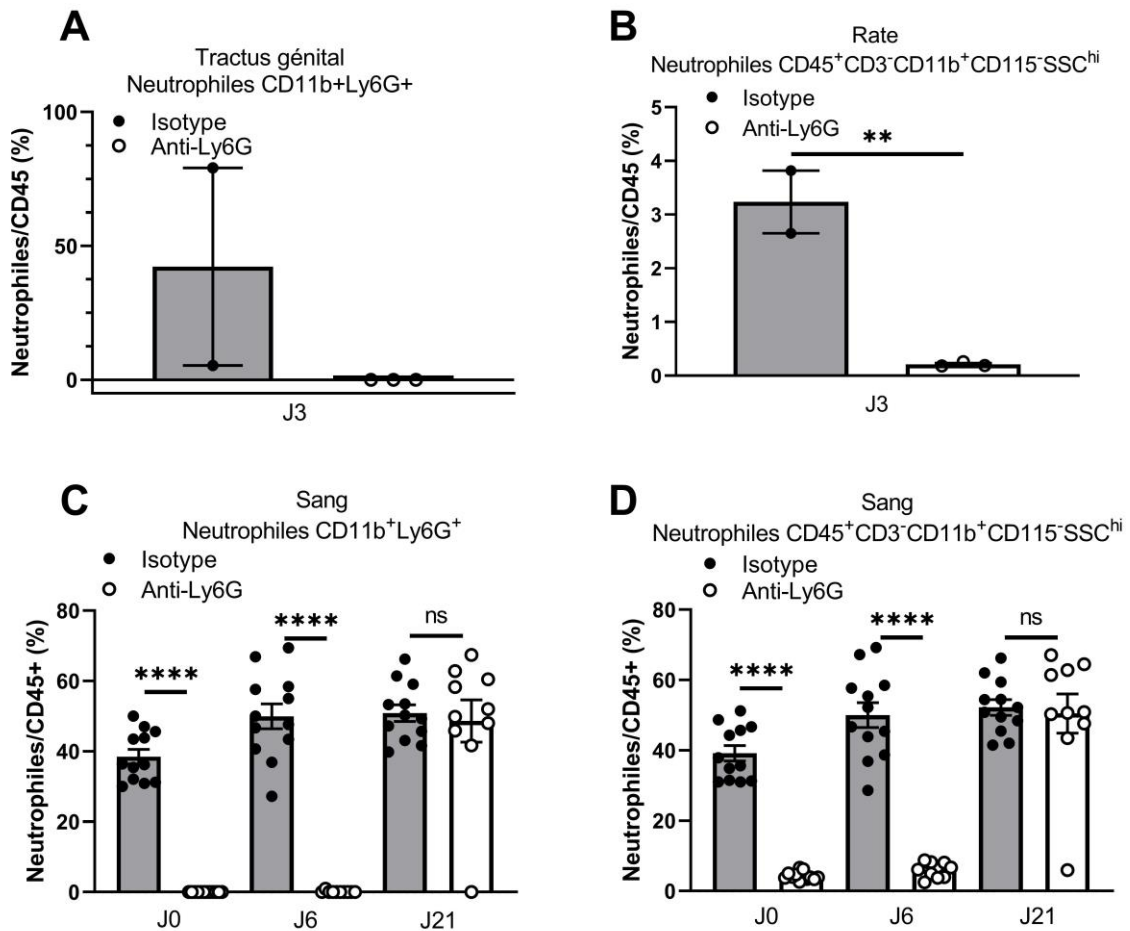
2.2.7 Analyse statistique

La normalité de la distribution a été évaluée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les données à distribution non normale et un t-test ou un t-test multiple pour les données à distribution normale. Une analyse de survie de survenue de l'arthrite au cours du temps a été effectuée et un test de log rank a été mené pour comparer les groupes. Les valeurs $P < 0,05$ (bilatéral) ont été considérées comme significatives. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

2.3. Résultats

Pour évaluer l'implication du neutrophile dans le développement de l'arthrite réactionnelle induite à *C. muridarum*, les neutrophiles ont été déplétés avec des injections quotidiennes d'anticorps monoclonal anti-Ly6G un jour avant l'infection puis tous les jours pendant 2 semaines. L'analyse par cytométrie en flux a montré une diminution significative des neutrophiles $CD3^-CD11b^+Ly6G^+$ après injection d'anticorps monoclonal anti-Ly6G dans le tractus génital, la rate et le sang périphérique. Afin de confirmer la déplétion en neutrophile, nous avons utilisé une stratégie alternative pour définir les neutrophiles en cytométrie en flux en excluant le marqueur de surface Ly6G, épitope qui pourrait être masqué par l'anticorps anti-Ly6G sans que ce dernier ne provoque de déplétion cellulaire. Les neutrophiles sont ainsi définis comme des cellules $CD45^+CD3^-CD11b^+CD115^-SSC^{hi}$. Cette nouvelle stratégie d'analyse nous a confirmé que l'anticorps anti-Ly6G déplétait significativement et de façon réversible les neutrophiles (**Figure 16 A-D**).

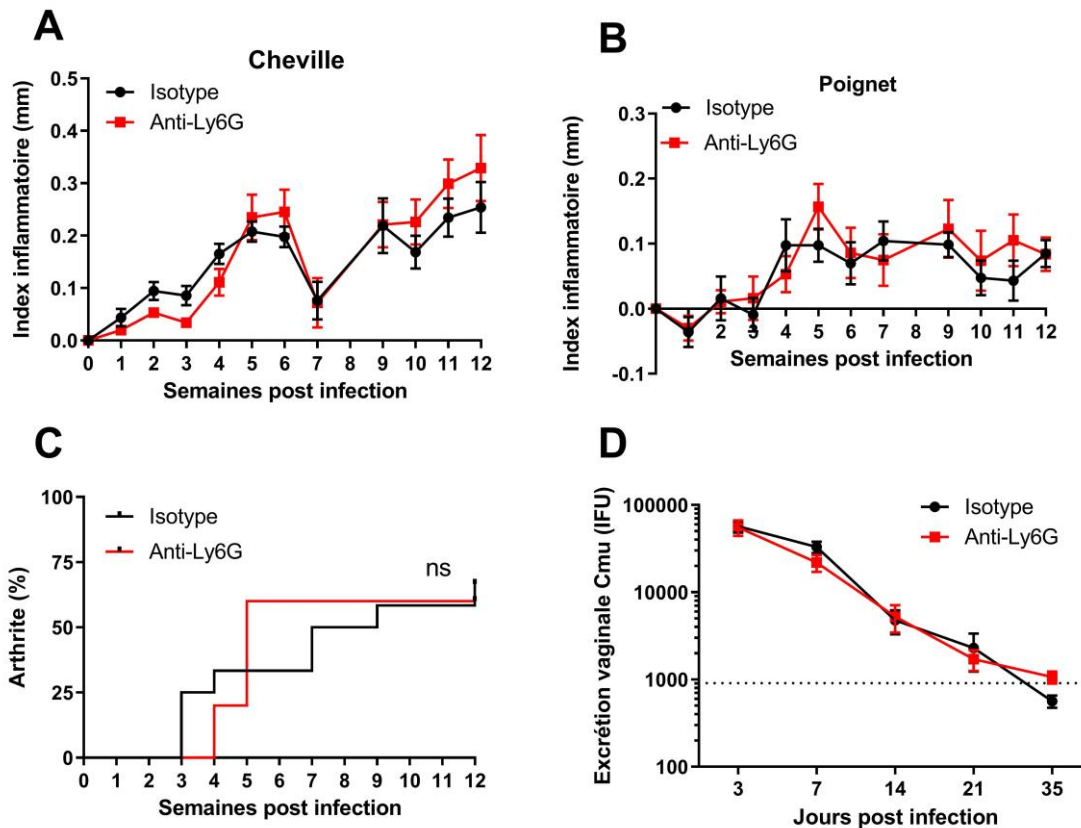
Figure 16. Déplétion des neutrophiles in vivo par un anticorps monoclonal anti-Ly6G.



Pourcentage de neutrophiles dans le tractus génital (A), rate (B) et dans le sang (C et D) des souris SKG après une infection avec 7.10^4 IFU de *Chlamydia muridarum* survenant au jour 0 (J0). Les souris recevaient une injection intrapéritonéale d'anticorps anti-Ly6G (n=10) ou un isotype (n=12) la veille de l'infection puis tous les jours jusqu'au jour 14 (J14). Moyenne \pm SEM, Test de Mann-Whitney (A, B) et t-test multiple (C, D). **p<0.01, ****p<0.0001.

La déplétion en neutrophiles pendant les deux premières semaines post-infection n'empêchaient pas le développement de l'arthrite et n'avait pas d'influence sur la cinétique d'apparition de ces dernières (**Figure 17 A-C**). Aucune modification de l'évolution de la charge bactérienne vaginale de *C. muridarum* était retrouvée (**Figure 17 D**).

Figure 17. La déplétion des neutrophiles *in vivo* ne prévient pas l'apparition de l'arthrite et ne modifie pas la charge bactérienne chez la souris SKG infectée par du *Chlamydia muridarum*.



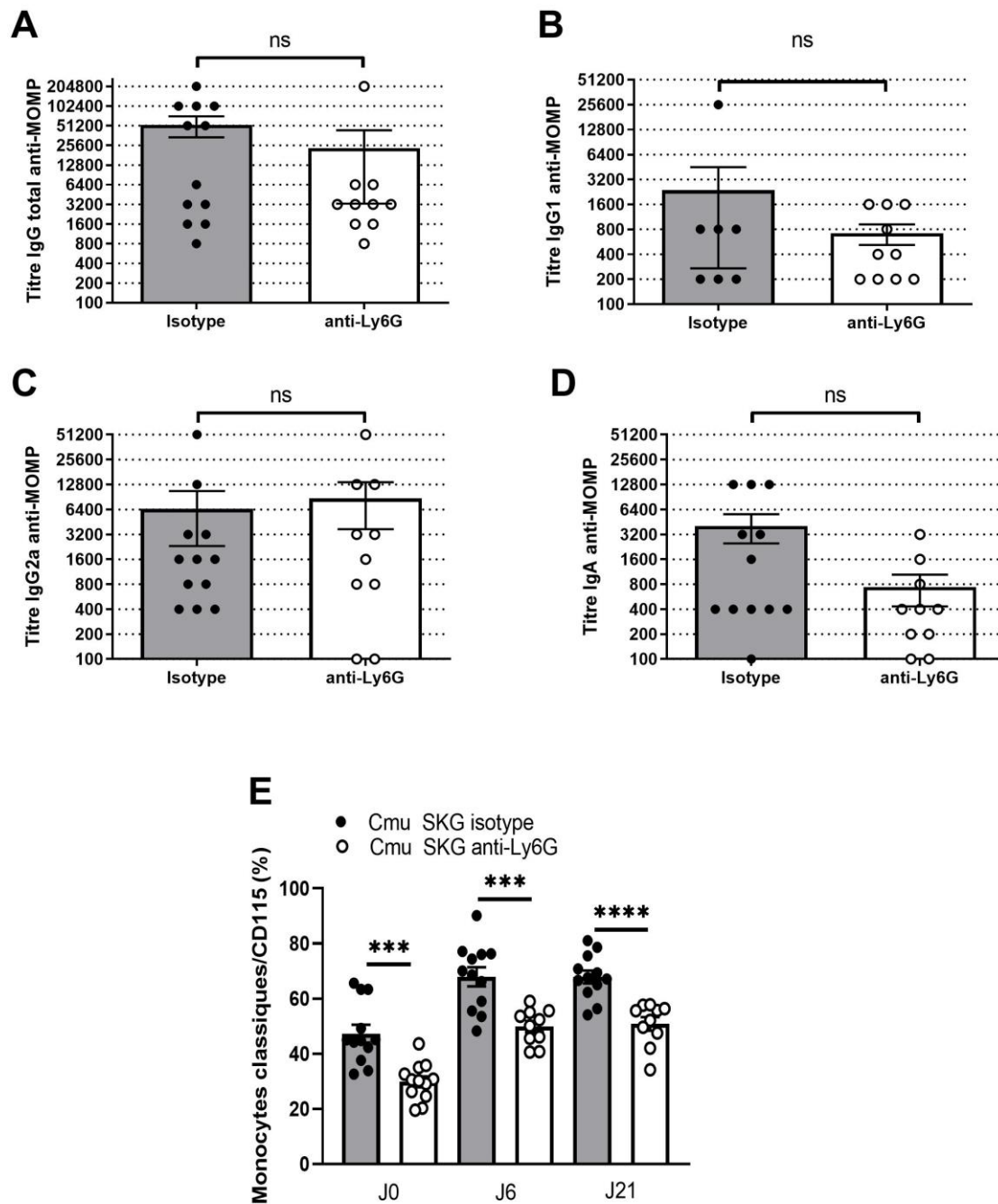
Les souris SKG ont reçu une injection quotidienne intrapéritonéale d'anticorps anti-Ly6G (n=10) ou un isotype (n=12) la veille de l'infection à *Chlamydia muridarum* (Cmu) ($7 \cdot 10^4$ IFU) et jusqu'à 14 jours post infection. Variation des moyennes \pm SEM de l'index inflammatoire au cours du temps, à la cheville (A) et au poignet (B). Délai d'apparition d'une arthrite chez la souris SKG en fonction du temps (C). Evolution de la moyenne \pm SEM de la charge bactériennes vaginales de Cmu au cours du temps. Le seuil de détection figure en pointillé (907 IFUs). C : Log rank (Matnel-Cox) test ; A, B et D : t-test multiple.

L'ensemble des souris infectées ont développé une séroconversion IgG anti-MOMP de *C. muridarum* et avaient une charge bactérienne détectable 3 jours après l'infection, confirmant que toutes les souris ont bien été infectées. La déplétion de neutrophile pendant les 2^{er} semaines post-infection n'a pas impacté la production des IgG, IgG1 et IgG2A mais a tendance à être associé à une diminution de la production d'IgA (Figure 18 A-D). Afin de déterminer si le neutrophile est impliqué dans la polarisation des monocytes circulants nous avons regardé si la déplétion de ces derniers entraînait des modifications de la proportion des monocytes classiques $CD11b^+CD115^+Ly6C^{hi}$ sanguins. La proportion de monocytes classiques circulants augmentait à la suite de l'infection génitale à *C. muridarum* (Figure 18 E). La déplétion en neutrophiles

entraînait une diminution des monocytes classiques sans toutefois avoir un impact sur le développement ultérieur de l'arthrite (**Figure 18 E**).

Ces données prises collectivement indiquent que le neutrophile n'est pas essentiel dans la phase précoce de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* malgré sa probable implication dans la polarisation monocyttaire au cours de l'infection.

Figure 18. Effet de la déplétion des neutrophiles sur la production d'anticorps anti-major outer membrane protein (MOMP) de *Chlamydia muridarum* dans le serum et sur la polarisation monocytaire.



Le serum des souris SKG recueilli 12 semaines après l'infection génitale par 7.10^4 IFUs de *Chlamydia muridarum* déplétées (anti-Ly6G) ou non (Isotype) en neutrophile pendant les 2 premières semaines post-infection ont été analysés par ELISA pour les IgG totales (A), IgG1 (B), IgG2a (C) et IgA (D). Proportion de monocytes classiques CD11b⁺CD115⁺Ly6C^{hi} parmi les monocytes dans le sang (E). Moyenne \pm SEM. Test de Mann Whitney (A-D), t-test (E). *** p<0,001, **** p<0,0001.

2.4. Discussion

Nous avons montré préalablement que les neutrophiles des souris SKG produisaient plus de transcrit d'*Il17* et d'*Il23* une semaine post-infection comparativement aux souris non mutées. Cette nouvelle étude a mis en évidence que le neutrophile n'est pas indispensable dans la phase immunologique précoce amenant à l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia*. En effet, la déplétion en neutrophile ne modifie pas la cinétique d'élimination de *C. muridarum* au niveau vaginal et ne prévient pas la survenue de cette arthrite dans le modèle SKG malgré une possible implication du neutrophile dans la polarisation des monocytes circulants.

La déplétion de neutrophiles dans des modèles animaux d'études de l'infection génitale à *Chlamydia* montrent que les neutrophiles sont fortement impliqués dans l'immunopathologie des muqueuses responsables des lésions tubaires, source d'infertilité. Cependant dans ces expériences le neutrophile ne joue pas un rôle primordial dans la clairance locale de l'infection à *C. trachomatis* au niveau du tractus génital, ce qui est concordant avec nos résultats (287). Le neutrophile stimulé par l'IFN- γ est capable de tuer *Chlamydia* selon un mécanisme dépendant des anticorps faisant intervenir les IgG dirigées contre ce dernier. Cette réponse humorale protège aussi l'hôte des réinfections (355). Dans cette étude nous n'avons pas mis en évidence qu'une déplétion de neutrophile dans les deux semaines suivant l'infection influençait la réponse humorale anti-*Chlamydia*.

L'efficacité de la déplétion des neutrophiles par anti-Ly6G a été questionné par certaines équipes dans la littérature (356). Nous avons confirmé dans ce travail que la déplétion des neutrophiles par l'injection d'anticorps anti-Ly6G est bien effective, efficace et résolutive à l'arrêt des injections chez les souris SKG. Les neutrophiles participent au phénomène de réparation des lésions hépatiques en favorisant la conversion phénotypique chez la souris des monocytes classiques pro-inflammatoires Ly6C^{hi}CX3CR1^{lo} en monocytes anti-inflammatoires Ly6C^{lo}CX3CR1^{hi}, en passant par un mécanisme impliquant la production d'espèces dérivés de l'oxygène (357). Afin de démontrer l'implication du neutrophile dans ce phénomène, cette étude avait, elle aussi, utilisé une stratégie de déplétion par l'injection d'anticorps anti-Ly6G (357). De façon surprenante, nous avons observé un phénomène inverse selon lequel le neutrophile favoriserait la conversion phénotypique vers les monocytes classiques pro-inflammatoires Ly6C^{hi}. *In vivo*, l'anticorps anti-Ly6G opsonise le neutrophile qui est ensuite phagocyté par le macrophage, entraînant une déplétion cellulaire (356). Il est reconnu que les corps apoptotiques de neutrophiles phagocytés par les macrophages sont essentiels pour la résolution de l'inflammation et induisent une polarisation macrophagique M2 (358). Nous

pouvons donc nous demander si la diminution des monocytes pro-inflammatoires observée ne pourrait pas être expliquée aussi par un effet direct médié par l'anti-Ly6G.

Nous avons décidé de réaliser une déplétion des neutrophiles dans les 2 semaines post-infection ce qui correspondait à la période nécessaire pour la résolution de l'infection génitale à *Chlamydia* et non durant toute la durée de l'expérience. En effet, une déplétion trop prolongée aurait, *de facto*, entraîné une diminution de l'index inflammatoire du fait de l'absence de l'effecteur principal de l'inflammation articulaire (327).

En conclusion, les neutrophiles ne sont pas nécessaires, dans la phase aiguë de l'infection à *Chlamydia*, au développement de l'arthrite réactionnelle. Ces résultats laissent donc suggérer une implication prépondérante du macrophage dans la physiopathogénèse de l'arthrite réactionnelle.

3. Retentissement fonctionnel de l'arthrite chez la souris SKG

3.1. Introduction

Les rhumatismes inflammatoires chroniques sont source d'handicap. L'inflammation articulaire et les dommages structuraux induits amènent à une perte de fonction. L'ensemble des recommandations des sociétés savantes pour la prise en charge des SpA s'accordent à définir la normalisation ou au moins la préservation de la fonction comme un objectif thérapeutique (40, 359).

De nombreux traitements ciblant le processus inflammatoire sont maintenant disponibles pour les patients mais malgré cela certains échappent à ces stratégies. Ce constat pousse la communauté scientifique à chercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

Avant de confirmer par des essais thérapeutiques chez l'être humain (phase I à III) que de nouveaux traitements sont efficaces et sûrs, des études pré-cliniques chez l'animal sont essentielles afin de valider le concept. De nombreux modèles de petit animal d'étude des rhumatismes inflammatoires sont utilisés (360). L'analyse de l'effet d'une nouvelle drogue *in vivo* nécessite le choix minutieux du modèle adapté à l'hypothèse expérimentale posée (361).

Actuellement, les paramètres évalués dans ces modèles sont centrés sur la quantification de la sévérité de l'arthrite (score clinique semi-quantitatif, mesure du gonflement de l'articulation, évaluation de l'inflammation par imagerie nucléaire) et en post-mortem (quantification de l'infiltrat inflammatoire en histologie). Les dommages structuraux articulaires sont, quant à eux, évalués par l'imagerie (essentiellement par micro-tomodensitométrie).

L'étude du retentissement fonctionnel de l'arthrite est, par-contre, très rarement évalué et plus difficile à quantifier chez le petit animal. En effet, certaines méthodes d'évaluation font intervenir des processus d'apprentissage et/ou motivationnel qui peuvent influencer les mesures. De plus, l'intervention humaine au cours de l'expérience peut induire du stress chez l'animal ce qui modifie son comportement et induit un biais dans les mesures.

Plusieurs méthodes d'évaluation de la fonction chez le petit animal sont décrites dans la littérature. La marche peut être analysée en colorant les pattes des souris à l'aide d'encre de couleurs différentes pour les pattes avant et arrière. La souris par la suite est amenée à se déplacer sur une piste recouverte de papier blanc avec une chambre noire présente à l'extrémité de la piste pour attirer les souris. La distance entre les traces de pas permet de calculer la foulée de la souris, l'écartement des pattes et la symétrie de la marche (362). Le « Catwalk test » est un système automatisé d'analyse de la marche. La souris est amenée à marcher sur une

plateforme translucide tandis qu'une caméra enregistre les mouvements depuis le bas. Les paramètres de marche suivants sont donc enregistrés : foulée, pression, vitesse et durée de la marche. La chambre d'activité est un test évaluant le niveau d'activité locomotrice générale en impliquant les capacités d'exploration de la souris. La souris est placée dans une cage transparente insonorisée équipée de détecteurs infrarouges. L'animal est positionné au centre et est amené à se déplacer librement pendant un temps imparti. Les déplacements sont enregistrés par les détecteurs et ainsi, la distance parcourue, la vitesse, le temps d'immobilité, le nombre d'extension sur les pattes arrière et le temps passé dans chaque zone de l'arène sont déterminés. Le suivi des mouvements des animaux peut aussi être effectué par enregistrement vidéo afin d'évaluer la distance parcourue (363). Le test de distribution pondérale cinétique (Dynamic Weight Bearing Test) consiste à placer la souris dans un corridor ou une boîte avec un tapis de capteur sur le sol enregistrant la pression de l'appui de la souris permettant d'extraire automatiquement pour chaque patte la force maximale (mN), la vitesse de masse (N/s), et la surface de contact (364). Le test du « Rotarod » consiste à placer la souris sur un tube rotatif qui accélère progressivement de façon continue obligeant la souris à avancer. Le test se termine quand la souris tombe en toute sécurité du tube. Le temps d'exercice et la vitesse finale du rotarod avant chute sont les principaux résultats obtenus. Un entraînement préalable est nécessaire afin que la souris apprenne bien à faire cette tâche.

Les principaux problèmes de ces tests sont qu'ils sont influencés par l'état psychologique de la souris (anxiété) car l'ensemble de ces systèmes sont externes à leur cage de domiciliation et entraîne donc un changement d'environnement (absence de litière, absence d'odeur de ses congénères...). De plus, la volonté du rongeur à faire la tâche est mise en jeu car on l'oblige à faire une tâche précise à un moment donné. Enfin, ces enregistrements sont habituellement effectués la journée alors que la souris est un animal nocturne ce qui peut influencer le résultat de l'analyse et ce qui reflète uniquement l'activité à un moment donné de quelques minutes à plusieurs heures.

Un système a été conçu pour mesurer automatiquement l'activité spontanée des souris. Les cages ventilées numériques ou « Digital ventilated cage » (DVC) permettent d'enregistrer l'activité spontanée des souris 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7, les souris restant dans ces cages durant toute l'expérience. Un champ électromagnétique est créé par une plaque de douze électrodes placées sous la cage qui collectent en temps réel les modifications de la capacitance électrique de l'environnement autour de chaque électrode (4 fois par seconde) (365, 366). Le

champ électromagnétique est modifié à chaque mouvement des souris permettant de quantifier ainsi leurs déplacements. Cette technologie n'entraîne pas de modification du comportement des animaux et a des performances similaires comparée à des enregistrements vidéo des cages pour les paramètres suivants : distance, vitesse moyenne, densité de l'activité, occupation de la partie avant et arrière de la cage (365). Les principaux avantages sont que les mesures se font sans interruption le jour et la nuit directement dans l'environnement de vie de l'animal sans intervention humaine. Cela évite ainsi d'utiliser des dispositifs externes de mesure nécessitant la manipulation des souris ce qui permet de s'affranchir de certains biais expérimentaux (stress, nécessité d'apprentissage...). Enfin, ce système est capable de mesurer en temps réel l'activité de centaines de cages permettant d'analyser le comportement des animaux et leur activité sur des expériences incluant des nombreux animaux.

Dans ce travail, nous avons étudié l'impact de l'arthrite sur l'activité spontanée des souris mesurée dans leur environnement habituel grâce à des cages ventilées numériques (DVC).

Ma contribution a été de :

- Participer de manière substantielle à la conception et au design de l'étude.
- Participer à l'écriture du dossier déposé au comité d'éthique.
- Réaliser les expériences animales où j'avais la charge d'induire la maladie par injection intra péritonéale de Curdlan, de mesurer les articulations et d'évaluer cliniquement les souris.
- Participer à la réalisation d'une partie de l'analyse statistique, certaines analyses ayant été effectuée par le Dr Bertrand Favier, TIMC-CNRS UMR 5525, Grenoble, France.
- Contribuer substantiellement à l'analyse des données.
- Rédiger les résultats de ce travail.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1 Souris

Des souris femelles SKG (souris BALB/c avec mutation ZAP-70^{W163C}) âgées de 6 à 10 semaines ont été élevées et maintenues dans des conditions spécifiques exemptes d'agents pathogènes (SPF) à la plateforme de haute technologie animale à Grenoble (France, C 3851610006). Les conditions d'hébergement étaient les suivantes : humidité de 50% \pm 20%, température de 19-23°C, sessions de 12/12 heures d'obscurité et de lumière et accès *ad libitum*

à la nourriture et à l'eau. Dans ces conditions, les souris SKG ne développaient pas d'arthrite spontanée. L'étude sur les animaux a été menée conformément à la directive européenne 2010/63/UE et les procédures expérimentales ont été approuvées par un comité d'éthique #27015-2020082817478482 v4 (ministère français de la Recherche).

Une randomisation stratifiée sur l'âge et le poids des souris a été effectuée. Deux souris SKG femelles ont été allouées à chaque cage au début de l'expérience. Les cages (Tecniplast GM500 cages) étaient ensuite, durant toute l'étude, maintenues dans le système d'enregistrement DVC™ et chacune équipée d'une roue d'activité (DVC GYM 500) (366).

3.2.2 Induction de l'arthrite par le Curdlan

L'arthrite était induite par une injection IP de 3mg par souris de curdlan (β 1-3 glucan, Wako Chemicals USA) dilué dans du PBS stérile (338). Les souris contrôles recevaient une injection de PBS.

3.2.3 Evaluation clinique et histologique

Le gonflement des pattes a été évalué par le même observateur (XR) chaque semaine pendant toute l'expérience après l'injection de curdlan, en mesurant l'épaisseur des pattes arrière et avant avec un pied à coulisse numérique. L'index inflammatoire des pattes (variation du gonflement des pattes par rapport aux mesures effectuées de référence avant injection de curdlan) a été calculé (342). La sévérité des arthrites a été quantifiée par un score d'arthrite clinique (0-6 points) toutes les semaines comme suit : pas de gonflement (0 point), gonflement d'un doigt (0,1 point par doigt), léger gonflement du poignet ou de la cheville (0,5 point par articulation) et gonflement sévère du poignet ou de la cheville (1 point par articulation). La somme des scores obtenus pour tous les doigts des pattes antérieures et postérieures, des poignets et chevilles donne le score final (327). Les souris étaient pesées une fois par semaine. L'expérience se terminait si les points limites préalablement définis étaient atteints ou à défaut au bout de 8 semaines post injection de curdlan. Les points limites étaient les suivants : perte de poids par rapport au poids de référence au jour de l'injection de curdlan (10-15% : 1 point, 15-20% : 2 points, >20% : 4 points), état général (crottes molles : 1 point, diarrhée liquidienne : 2 points, conjonctivite : 1 point, automutilation des yeux : 4 points, mobilité réduite : 1 point, réduction toilette : 1 point, plaie de léchage : 2 points, prostration : 4 points) et sévérité de l'arthrite (augmentation du diamètre des articulations : 20-40% : 1 point, 40-60% : 2 points, >60% : 3 points). Un score pour les points limites supérieur ou égal à 4 induisait le sacrifice de l'animal.

Afin de minimiser l'impact des manipulations humaines nécessaires à l'obtention de ces mesures, ces dernières étaient systématiquement effectuées chaque mardi matin pendant toute l'expérience et la litière était changée 1 fois tous les 15 jours après les mesures. En dehors de ce jour, les souris et leurs cages n'étaient pas manipulées afin de minimiser au maximum le stress induit.

3.2.4 Micro-tomodensitométrie (micro-TDM)

Les articulations des chevilles et poignets fixées dans du formol à 10% à la fin de l'expérience ont été analysées par micro-TDM (nanoScan SPECT/CT (Mediso), résolution de 10 à 30 μm) afin d'évaluer la destruction articulaire. Les images ont été analysées en aveugle du groupe d'attribution par un même expérimentateur (XR) afin de déterminer s'il existait un pincement articulaire ou des érosions au niveau de la cheville, articulations du médio-pied, poignet et carpe.

3.2.5 Mesure de l'activité

Les données suivantes étaient enregistrées puis exportées pour réaliser des analyses statistiques à partir de la plateforme DVC® Analytics : « animal locomotion index », la distance effectuée dans la roue et le « Regularity Disruption Index » (RDI).

Une électrode est considérée comme activée quand elle mesure une perturbation significative du champ électromagnétique durant un intervalle de temps défini, ce qui survient lorsqu'une souris est en mouvement. Chaque diminution/augmentation du signal électrique enregistrée supérieure au bruit de fond est considéré comme une activation. L'« animal locomotion index » est donc calculé pour exprimer dans une unité arbitraire en pourcentage l'activité des souris (0-100%). Le RDI permet de quantifier le degré de régularité de l'activité des souris au cours du temps (motif d'activité). La journée et la nuit étaient définies par la période où la lumière était allumée (entre 7h et 19h) ou éteinte (entre 19h et 7h) dans l'animalerie.

3.2.6 Analyse statistique

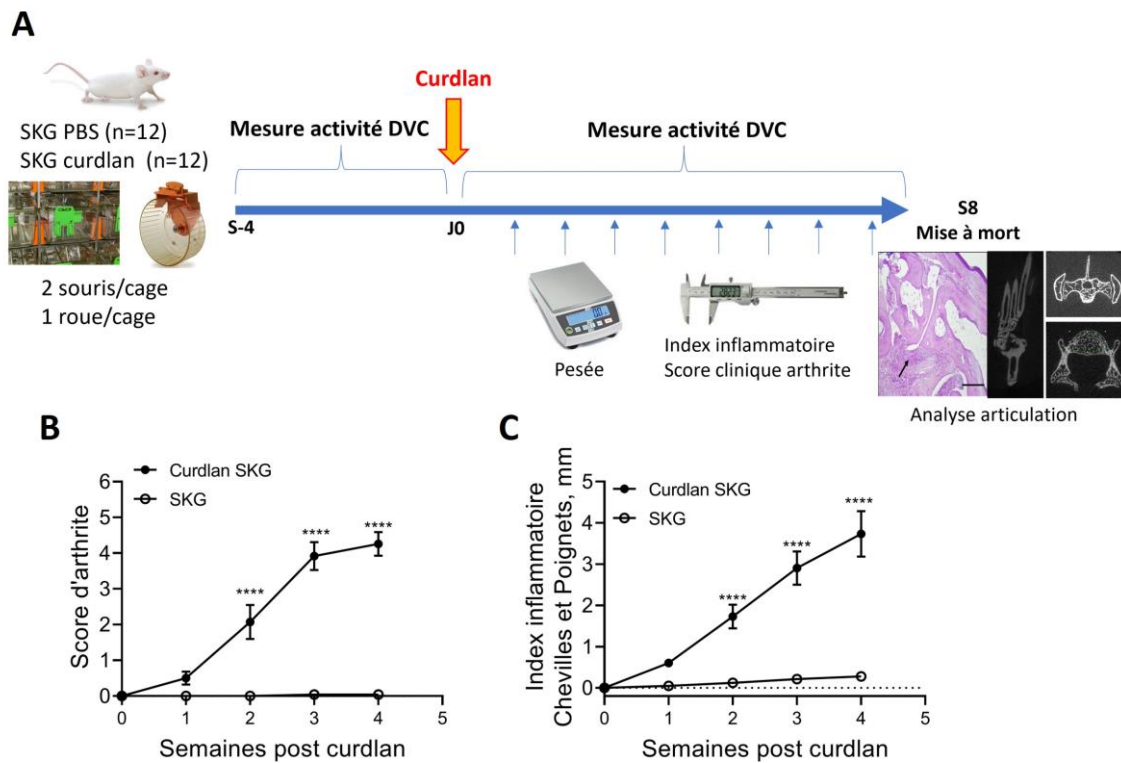
La normalité de la distribution a été évaluée par le test de Kolmogorov-Smirnov. L'ANOVA à deux voies avec le test *post hoc* de Tukey a été utilisé pour les données à distribution normale. Pour les données d'activité, une ANOVA non paramétrique pour données longitudinales avec analyse multivariée (ANOVA np-ld) effectuée pour chaque semaine a été conduite. Le test de corrélation de Spearman a été appliqué pour rechercher une corrélation entre l'index d'activité ou la distance parcourue par cage et la somme des scores de sévérité de l'arthrite des deux souris

présentes dans chaque cage. Une p-value < 0,05 était considérée comme significative. Le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir une puissance statistique suffisante pour l'arthrite a été estimé à partir d'expériences précédentes : 8 souris par groupe avec un risque de 0,05 atteignent une puissance supérieure à 80 % (338). Le respect des règles d'éthique d'avoir au moins deux souris par cages durant toute l'expérience nous a amené à inclure 12 souris par condition afin d'avoir les données de 6 cages de souris par condition expérimentale. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) et le logiciel R.

3.3. Résultats

Les souris femelles SKG (n=12) ont déclenché une arthrite intéressant les poignets et les chevilles dans les 2 semaines suivant l'injection de curdlan (**Figure 19 A, B**), ce qui n'était pas observé avec le PBS. La durée de l'expérience a été restreinte à 4 semaines du fait de l'atteinte précoce des points limites pour les souris faisant de l'arthrite.

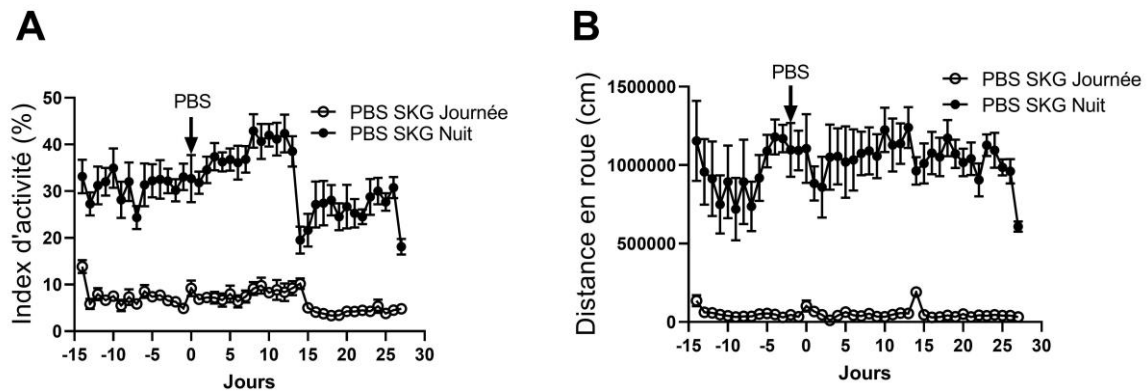
Figure 19. L'injection de curdlan en intrapéritonéal induit une arthrite précoce et sévère chez les souris SKG.



Des souris SKG femelles ont reçu une injection unique de 3mg de Curdlan en intrapéritonéal au jour 0 (Curdlan SKG, n=12) ou du PBS (SKG, n=12). L'activité et la distance parcourue dans les roues en temps réel 24/24h a été enregistré (A). Variation des moyennes \pm erreur standard de la moyenne du score d'arthrite (0-6) (B) et de l'index inflammatoire des chevilles et poignets (C) au cours du temps. t-test multiple (B, C). ANOVA à deux voies avec le test *post hoc* de Tukey, **** $p < 0,0001$.

Comme attendu, l'activité des souris et la distance parcourue dans la roue était significativement plus importante durant la nuit ($p < 0,0001$) (Figure 20 A, B).

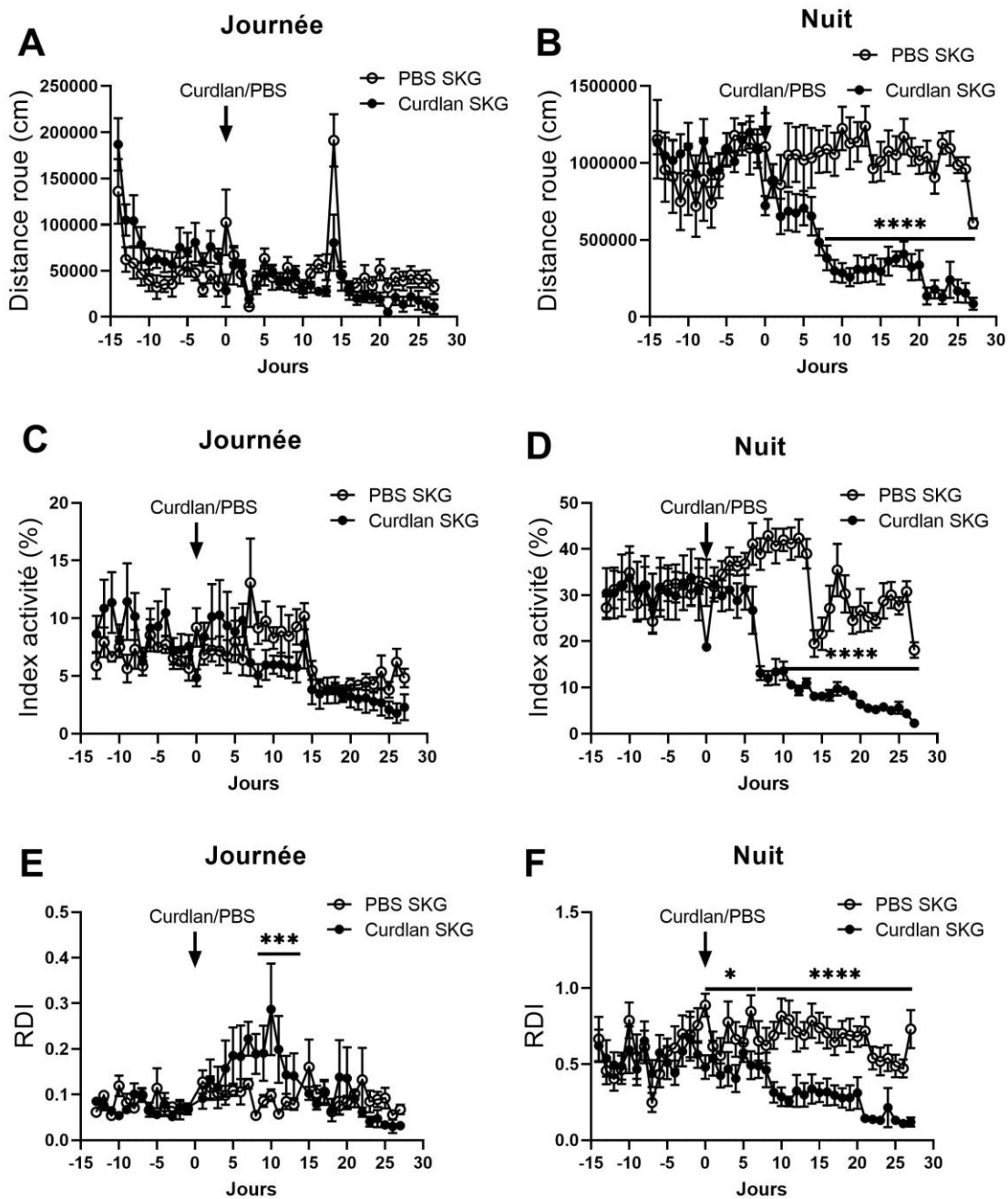
Figure 20. Les souris SKG ont une activité nocturne importante.



Variation des moyennes \pm erreur standard de la moyenne de l'index d'activité (A) et de la distance parcourue dans la roue (B) la journée (7h-19h) et la nuit (19-7h) chez des souris SKG n'ayant pas développé d'arthrite après l'injection de PBS. p -value $<0,0001$ au test ANOVA à deux voies avec le test *post hoc* de Tukey (A, B).

Les souris qui ont développé une arthrite à la suite de l'injection de curdlan voyaient leur niveau d'activité et leur distance parcourue dans la roue la nuit diminuer significativement et drastiquement dès la 2^{ème} semaine, correspondant au moment d'apparition de l'arthrite (**Figure 21 B, D**). Aucune différence n'était observée en journée (**Figure 21 A, C**). Une augmentation de la distance parcourue au cours de la journée est retrouvée chez les souris SKG ayant reçu du PBS au jour 0 et jour 14. Ces jours correspondant à des journées où des mesures des articulations et des injections intrapéritonéales ont été effectuées chez ces souris, ce qui indique que l'intervention humaine entraîne des modifications de comportement. Le RDI, explorant le motif d'activité en mesurant le degré de régularité de l'activité, est significativement diminué la nuit, et non la journée, chez les souris arthritiques indiquant que le motif d'activité est plus régulier dans ce groupe de souris (**Figure 21 E-F**). La moyenne par cage au cours de la 3^{ème} semaine de l'index d'activité et de la distance parcourue dans les roues durant la nuit corrélaient significativement avec les scores d'arthrite (respectivement, $r=-0,80$, $p<0,01$ et $r=-0,86$, $p<0,001$) et l'index inflammatoire aux 4 membres par cages (respectivement, $r=-0,66$, $p=0,02$ et $r=-0,75$, $p<0,01$).

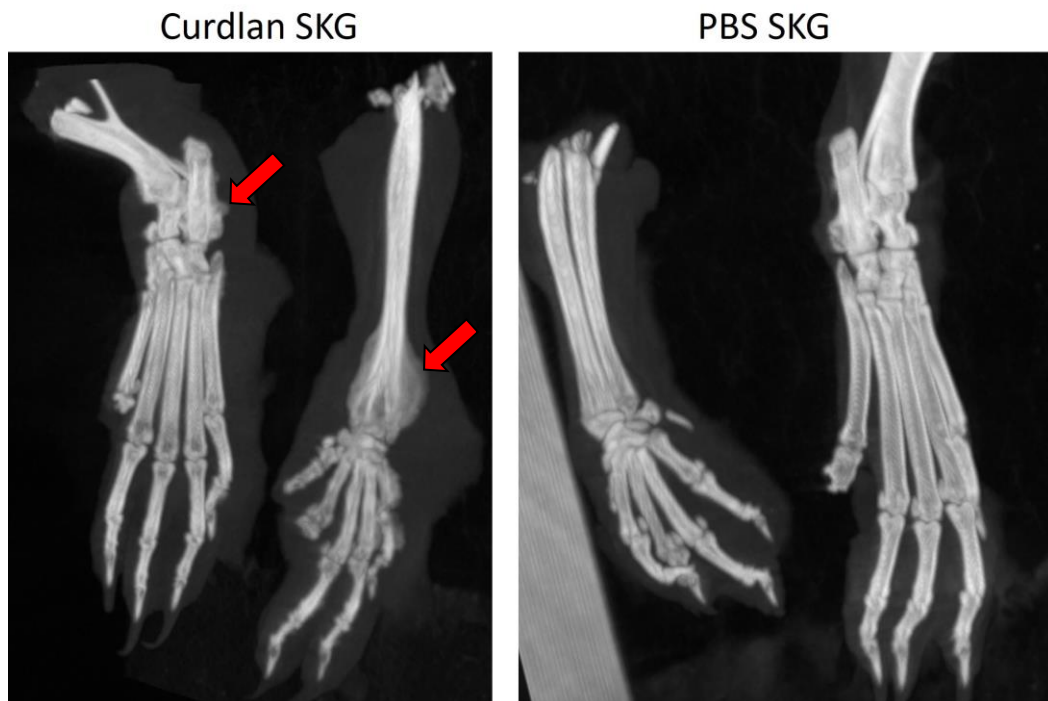
Figure 21. L'arthrite induite par le curdlan est responsable d'une perte de fonction importante



Variation des moyennes \pm erreur standard de la moyenne de la distance parcourue dans la roue en centimètre (A,B), de l'index d'activité exprimé en une unité arbitraire (C, D) et du « Regularity Disruption Index » (RDI) exprimé en une unité arbitraire représentant le degré de régularité de l'activité (un index faible indiquant une activité plus homogène au cours de la période) (E-F) en fonction de la journée (7h-19h) et la nuit (19-7h) chez des souris SKG ayant développé une arthrite après l'injection de curdlan (Curdlan SKG, n=6 cages) comparé à des souris SKG sans arthrite (PBS SKG, n=6 cages). ANOVA non paramétrique pour données longitudinales avec analyse multivariée (ANOVA np-ld) effectuée pour chaque semaine. * p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Aucune érosion ou pincement de l'interligne articulaire n'a été observé en micro scanner au niveau de la cheville, du tarse, du poignet et du carpe des souris ayant développé ou non une arthrite. En revanche, des productions osseuses ab-articulaires étaient fréquemment retrouvées chez les souris ayant reçu une injection de curdlan (**Figure 22**).

Figure 22. Les souris SKG avec arthrite induite par le curdlan développent des productions osseuses ab-articulaires.



Reconstruction en 3 dimensions d'une patte avant et arrière analysée par micro-scanner d'une souris SKG ayant développé une arthrite à la suite de l'injection de curdlan (Curdlan SKG) et d'une souris non arthritique (PBS SKG). Aucune érosion ou pincement de l'interligne articulaire n'a été observé pour l'ensemble des souris analysées (Curdlan SKG (n=12), PBS SKG (n=4)) contrairement à la présence de production osseuse ab-articulaire (dont certaines sont désignées par une flèche rouge) mise en évidence uniquement chez les souris avec arthrite (Curdlan SKG).

3.4. Discussion

Cette étude préliminaire démontre que l'activité spontanée des souris SKG, enregistrée à l'aide de cages ventilées digitales (DVC®), est sévèrement altérée la nuit au cours de l'arthrite. Cette altération de la fonction ne semble pas expliquée par la destruction articulaire mais d'avantage influencé par le processus inflammatoire comme observé dans les SpA débutantes chez l'Homme (367, 368).

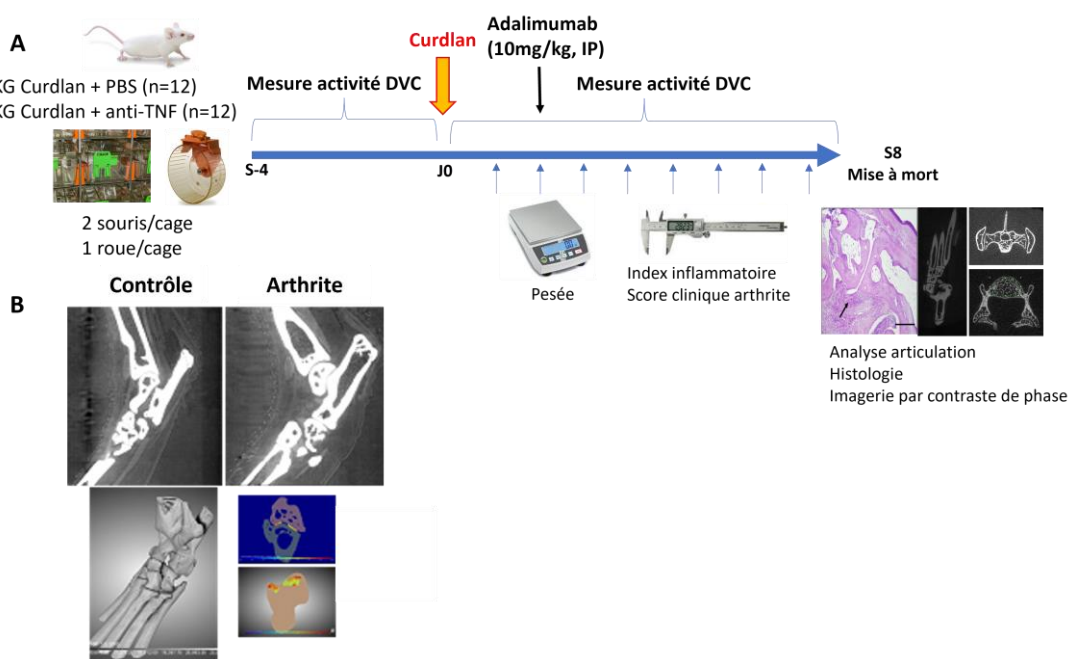
Les modèles précliniques jouent un rôle crucial pour tester de nouvelles stratégies de traitement et pour valider la première étape du développement d'un nouveau médicament. L'évaluation précise de l'effet des nouveaux médicaments chez le petit animal, et notamment son impact sur

la fonction, est limitée du fait des difficultés de mise en œuvre de ces tests. En effet, l'évaluation de la dysfonction locomotrice chez les souris et autres rongeurs est difficile car le comportement de proie conduit ces animaux à dissimuler la douleur et le handicap dans des tests actifs tels que le Rotarod ou le Catwalk. Nous introduisons ici une nouvelle modalité d'évaluation de l'activité locomotrice des souris. Le DVC® offre la possibilité de suivre de façon automatisée en temps réel 24/24h et sur de longues périodes l'activité des modèles murin d'arthrite sans qu'aucune intervention humaine soit nécessaire, source de perturbation du comportement des animaux. Afin de montrer l'intérêt de cet outil dans l'évaluation d'agent thérapeutique chez le petit animal nous souhaitons étudier l'effet d'un traitement par anti-TNF (Adalimumab) qui a montré son efficacité dans la diminution de la sévérité de l'arthrite dans le modèle SKG (369) et dans la diminution du handicap dans les SpA selon le plan expérimental présenté en **Figure 23A**. Nous évaluerons la sensibilité du DVC® à capter un changement d'activité spontanée des souris au cours du traitement. La résolution limitée de la microTDM et le contraste de l'image obtenue par absorption de rayons X ne sont pas suffisants chez le petit animal pour analyser les tissus mous (synovite, ténosynovite et enthésites) et le cartilage, ce qui ne permet pas d'évaluer précisément l'effet des nouveaux médicaments chez le petit animal. D'ailleurs, dans cette étude nous n'avons pas mis en évidence de pincement ou d'érosion de l'interligne articulaire et le contraste limité des parties molles rendait l'analyse impossible des structures articulaires et ab-articulaires. L'imagerie par contraste de phase des rayons X permet d'obtenir un contraste d'image plus élevé par comparaison avec la radiographie conventionnelle basée sur l'étude de l'absorption des rayons X. Ainsi, cette méthode d'analyse, du fait d'un contraste accru de l'image et une résolution accrue de l'ordre de 3µm, permet d'avoir une image à une résolution quasiment histologique de l'articulation. Une étude de preuve de concept a montré que cette modalité d'imagerie permettait de quantifier le cartilage calcifié et d'avoir une résolution permettant de visualiser des clusters de chondrocytes au sein de cartilage (370). L'analyse, qui est en cours, des articulations par cette modalité d'imagerie innovante permettra de mieux adresser les éléments anatomiques responsables de la perte de fonction (**Figure 23B**). Par l'étude de ces outils nous souhaitons permettre une évaluation plus poussée des modèles animaux en rhumatologie.

Une des principales limites de notre analyse est que l'évaluation individuelle de la fonction des souris n'est pas possible actuellement si plusieurs souris sont présentes dans la même cage. Il n'est pas envisageable pour des considérations éthiques d'isoler les souris dans les cages. Afin de répondre au mieux à cette problématique nous avons décidé de placer uniquement deux souris par cage.

En conclusion, les cages ventilées digitales (DVC®) sont un outil assez sensible pour mesurer les altérations de la fonction chez le petit animal souffrant d'arthrite. Des études sont encore nécessaires pour montrer l'intérêt de cette technologie dans l'évaluation d'agent thérapeutique chez le petit animal.

Figure 23. Perspective de future recherche visant à évaluer l'intérêt du DVC® et de l'imagerie par contraste de phase dans l'études de modèle préclinique d'arthrite inflammatoire.



Plan expérimental envisagé pour évaluer l'altération de la fonction, à l'aide de cages connectées ventilées (DVC®), au cours de l'arthrite chez des souris SKG traitées par un agent biologique reconnu pour améliorer la fonction chez l'Homme (anti-TNF, adalimumab) (A). Résultats préliminaires de l'imagerie par contraste de phase aux rayons X obtenues à partir de chevilles de souris SKG arthritiques. Une quantification automatisée du volume de l'interligne articulaire, de la synovite, du cartilage calcifié et des érosions est possible grâce à l'analyse d'image utilisant des outils d'intelligence artificielle. Travail réalisé en collaboration avec le laboratoire STROBE (Rayonnement SynchroTRON pour la Recherche Biomédicale, Dr. Emmanuel BRUN et Dr. Shifali SINGH).

CHAPITRE 2 : LA CALPROTECTINE SÉRIQUE, BIOMARQUEUR D'ACTIVITÉ DANS LES RHUMATISMES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES

4. La calprotectine sérique biomarqueur d'activité dans les spondyloarthrites axiales débutantes

4.1. Introduction

La SpA axiale est un rhumatisme inflammatoire chronique touchant le squelette axial pouvant entraîner une ankylose rachidienne irréversible par la formation de ponts osseux (syndesmophytes). Ces lésions sont responsables d'un handicap fonctionnel pour le patient (371). L'évolution radiographique est à ce jour imprévisible et est très variable d'un patient à l'autre (372). L'activité de la maladie (ASDAS, CRP), le tabagisme, la présence d'œdème inflammatoire en IRM ou de syndesmophytes en radiographie sont des facteurs de risque de progression radiographique dans la SA (373-376). L'inflammation est un facteur déterminant dans le développement des dommages structuraux. Cependant, la CRP est normale chez près de la moitié des patients atteints de SpA (377). L'évaluation de nouveaux biomarqueurs d'inflammation est nécessaire pour mieux apprécier l'inflammation, l'activité de la maladie et le risque de développer des dommages structuraux irréversibles au stade précoce de la SpA axiale (377).

La calprotectine, également appelée protéine S100A8/A9, est une alarmine sécrétée par les cellules myéloïdes activées (neutrophiles, monocytes et aux premiers stades de différenciation, macrophages). Dans le rhumatisme psoriasique, la calprotectine est sécrétée localement dans les articulations après le recrutement et la migration des monocytes et des neutrophiles du sang périphérique vers la cavité articulaire (378). La calprotectine sérique pourrait être un biomarqueur intéressant pour évaluer le niveau d'infiltration des cellules mononucléaires activées dans les articulations sacro-iliaques et au rachis (128). Turina *et al.* ont décrit que la calprotectine sérique pouvait prédire la progression radiographique au rachis dans la SpA axiale radiographique établie répondant aux critères modifiés de New York après 2 ans de suivi (216). Dans cette étude nous avons voulu évaluer si la calprotectine sérique était un biomarqueur d'activité dans la SpA axiale débutante et si elle pouvait prédire la progression radiographique rachidienne à 2 ans dans la cohorte DESIR.

J'ai commencé à étudier au cours de ma thèse de médecine, soutenue le 27/09/2018, l'intérêt du dosage de la calprotectine dans les rhumatismes inflammatoires chroniques. Je me suis

attaché pendant ma thèse de sciences à publier une revue de la littérature sur le sujet intitulé «Systemic calprotectin and chronic inflammatory rheumatic diseases » dans le journal Joint Bone Spine (impact factor 2020 : 4.9, rang C) afin de conclure ce travail (203). J'avais aussi conduit une étude dans la cohorte de SpA débutante DESIR visant à évaluer l'intérêt de la calprotectine comme biomarqueur d'activité et de prédiction de progression structurale. J'ai repris pendant ma thèse de science l'analyse statistique de cette étude et poursuivi l'écriture de ce travail. Cette étude a finalement été publiée sous la forme d'une lettre à l'éditeur (Article 2) dans Joint Bone Spine en 2020 (impact factor 2020 : 4.9, rang C).

Dans cet article nous montrons que :

- La calprotectine sérique ne permet pas de prédire la progression structurale dans la SpA axiale débutante contrairement aux données déjà publiées sur les SA établies.
- La calprotectine est un biomarqueur d'activité dans les SpA axiales débutantes.

Dans cet article ma contribution a été de :

- Soumettre une demande auprès de la cohorte DESIR.
- Participer de manière substantielle à la conception et au design de l'étude.
- Réaliser l'analyse statistique et l'analyse des données.
- Rédiger l'article qui a été publié dans Joint Bone Spine pendant ma thèse de sciences.

4.2. Article 2: Serum calprotectin is increased in early axial spondyloarthritis with sacroiliitis and objective signs of inflammation: Results from the DESIR cohort

Serum calprotectin is increased in early axial spondyloarthritis with sacroiliitis and objective signs of inflammation: results from the DESIR cohort

Authors: Xavier Romand^{a,b}, Marie-Hélène Paclet^{b,c}, Anaïs Courtier^d, Minh Vu Chuong Nguyen^{b,d}, Daniel Wendling^e, Francis Berenbaum^f, Philippe Gaudin^{a,b}, Athan Baillet^{a,b}

Affiliate:

^a Department of Rheumatology, CHU Grenoble Alpes, Echirolles, France

^b Univ. Grenoble Alpes, GREPI TIMC, CNRS UMR 5525, Grenoble, France

^c Department of Biology, CHU Grenoble Alpes, La Tronche, France

^d Sinnovial, Grenoble, France

^e Department of Rheumatology, University Teaching Hospital (CHRU), Besançon, and EA4266, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

^f Department of Rheumatology, Sorbonne Université, INSERM CRSA, AP-HP Saint-Antoine Hospital, Paris, France

Corresponding author: Xavier Romand, Department of Rheumatology, CHU Grenoble Alpes Hôpital Sud, 19 Avenue de Kimberley, 38130 Échirolles, France.

E-mail: xromand@chu-grenoble.fr

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2222-1456>

[Letter to the editor: 499/500 words](#)

Keywords: calprotectin, S100 proteins, spondyloarthritis, biomarker, structural damage

Axial Spondyloarthritis (axSpA) is a chronic inflammatory disease that affects spine and sacroiliac joint (SIJ) leading to highly variable spinal radiographic damages in the individual patient [1]. Inflammation appears to be a determining factor of developing future structural damage [2, 3]. The quantification of inflammation in axSpA remains a challenge [4]. Calprotectin, an alarmin secreted by activated myeloid cells, has been suggested as a biomarker predicting radiographic spinal progression at 2 years in established ankylosing spondylitis (AS) [5-7]. The aim was to assess whether serum calprotectin was associated with inflammation and spinal radiographic progression within 2 years in early axSpA.

Patients with recent-onset inflammatory back pain, suggestive of axSpA from the DESIR cohort (NCT01648907) were included [8]. Assessment in SpondyloArthritis Society (ASAS) and modified New York criteria were respectively used for classification of axSpA and AS patients. Serum calprotectin was assessed at baseline (Calprotectin ELISA kit, Hycult Biotech). Radiographic spinal progression was defined as worsening by ≥ 2 units of the modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score 2 years after the inclusion. Spine and SIJ magnetic resonance imaging (MRI) inflammation were graded with the Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC) score.

At baseline, calprotectin was assessed in 426 early axSpA, including 149 patients with AS (**Table 1**). Serum calprotectin level was not significantly different between patients with recent-onset inflammatory back pain fulfilling vs. those not the ASAS criteria. High level of calprotectin was observed in axSpA with sacroiliitis, non-radiographic axSpA with objective signs of inflammation (*i.e.* with sacroiliitis on MRI and/or elevated CRP levels) and AS (**Figure 1A-B**). A total of 211 axSpA and 77 AS patients had both baseline and 2 years mSASSS scoring. Fifteen (15/211, 7.1%) axSpA and seven (7/77, 9.1%) AS had a radiographic spinal progression within 2 years. Serum calprotectin levels did not identify patients with subsequent radiographic progression and was not increased in axSpA with syndesmophytes (≥ 1) or with

significant SIJ erosions (≥ 3) and fat lesions (≥ 3) on MRI. axSpA patients with high disease activity index score (BASDAI >4 and ASDAS >3.5) and high SIJ and spine SPARCC scoring (≥ 5) showed an elevated calprotectin level (**Figure 1 C-F**). Calprotectin correlated with inflammatory parameters as CRP ($r_s = 0.32$, $p < 0.01$), ESR ($r_s = 0.23$, $p < 0.0001$), IL-6 ($r_s = 0.24$, $p < 0.0001$), IL-31 ($r_s = 0.17$, $p < 0.001$), sCD40L ($r_s = 0.13$, $p < 0.05$) but not with TNF.

The present study shows that calprotectin is associated with inflammatory parameters, MRI inflammation rather than structural lesions in early axSpA. These results are in line with previous study [9]. We do not confirm, as observed in establish AS patient [5], that calprotectin level is a factor associated with spinal radiographic progression in early axSpA and AS. Nevertheless, this analysis is limited by a lack of statistical power to detect small effect size. Structural damage in axSpA is definitely a complex phenomenon hardly captured by a single biomarker assay compared to a biomarker combination strategy [10].

In conclusion, calprotectin in early axSpA seems to reflect the local inflammatory process involving myeloid cells in SIJ and spine.

Fundings: The DESIR-cohort is financially supported by unrestricted grants from the Société Française de Rhumatologie (SFR) and Pfizer. No specific funding was received from any bodies in the public, commercial or not-for-profit sectors to carry out the work described in this article. Pfizer did not review the content or have influence on this manuscript.

Acknowledgements:

The DESIR cohort was sponsored by the Département de la Recherche Clinique et du Développement de l'Assistance Publique–Hôpitaux de Paris. This study is conducted under the umbrella of the French Society of Rheumatology and INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). The database management is performed within the department of epidemiology and biostatistics (Professor Paul Landais, D.I.M., Nîmes, France). An unrestricted grant from Pfizer was allocated for the first 10 years of the follow-up of the recruited patients. The authors thank the different regional participating centers: Professor M Dougados (Paris—Cochin B), Professor A Kahan (Paris—Cochin A), Professor P Dieudé (Paris—Bichat), Pr L Gossec (Paris—Pitié-Salpêtrière), Professor F Berenbaum (Paris—Saint Antoine), Professor P Claudepierre (Créteil), Professor M. Breban (Boulogne Billancourt), Dr B. Saint-Marcoux (Aulnay-sous-Bois), Professor P Goupille (Tours), Professor J-F. Maillefert (Dijon), Dr E Dernis (Le Mans), Professor D Wendling (Besançon), Professor B Combe (Montpellier), Professor L Euller-Ziegler (Nice), Professor P Orcel, Professor P Richette (Paris—Lariboisière), Professor P Lafforgue (Marseille), Dr P Boumier (Amiens), Professor M Soubrier (Clermont-Ferrand), Dr N Mehsen (Bordeaux), Professor D Loeuille (Nancy), Professor R-M Flipo (Lille), Professor A Saraux (Brest), Dr S Pavy (Kremlin Bicêtre), Professor A Cantagrel (Toulouse), Professor O Vittecoq (Rouen). The authors also thank URC-CIC Paris Centre for the coordination and monitoring of the study and Sylvie Papacatzis for performing the serum calprotectin assays.

Disclosure of interest: The authors declare that they have no competing interest.

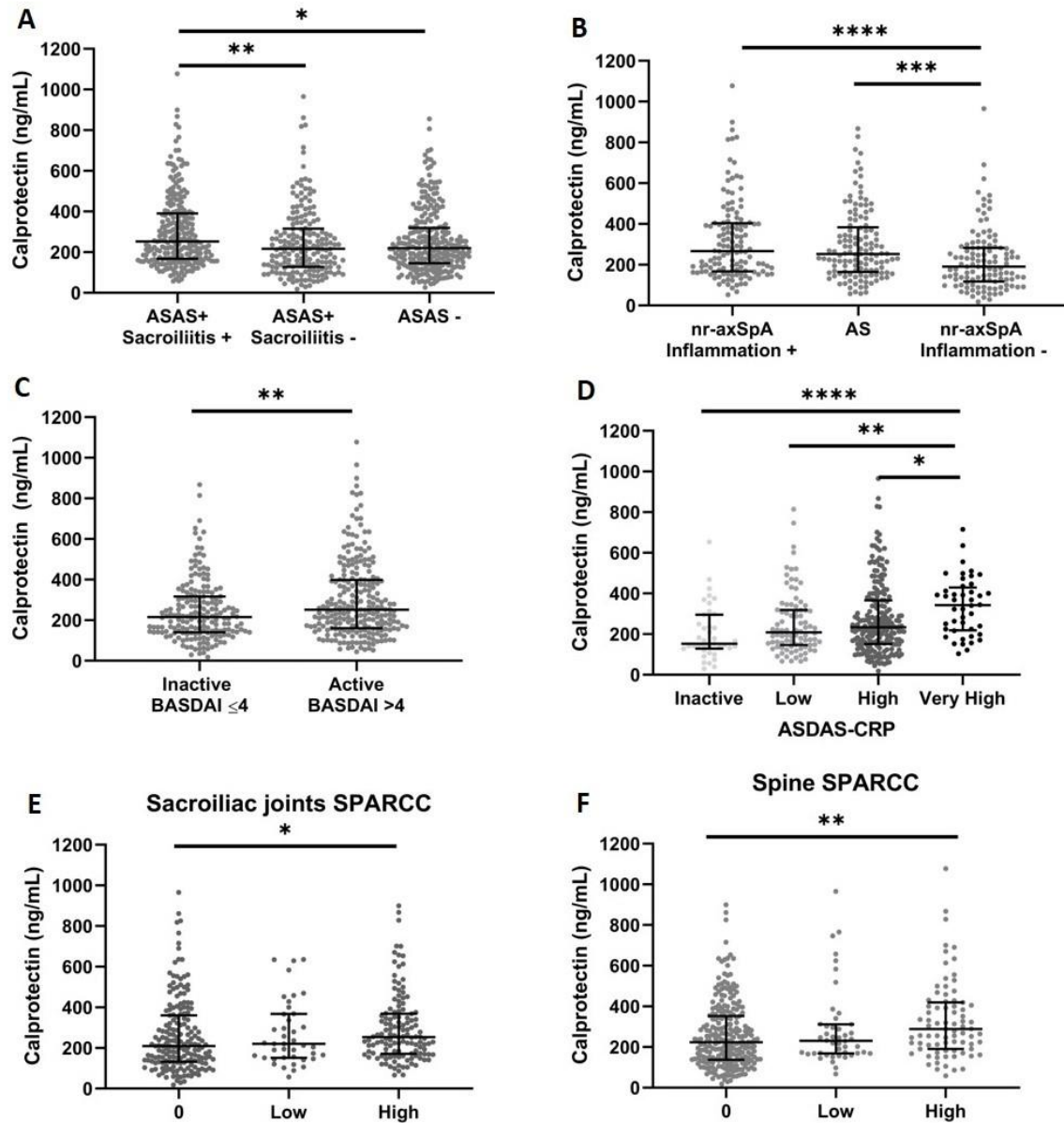


Figure 1. Serum calprotectin level is increased in early axial spondyloarthritis with sacroiliitis and objective signs of inflammation

Serum calprotectin levels at baseline (A) in early axial SpA (axSpA) patients fulfilling axial ASAS criteria (ASAS+) with sacroiliitis (sacroiliitis +) or not (sacroiliitis -) on X-ray or magnetic resonance imaging (sacroiliitis +) compared to those not fulfilling (ASAS-) and (B) in non-radiographic axSpA (nr-axSpA) patient with objective signs of inflammation (sacroiliitis + or elevated C-reactive protein level) (inflammation +), AS and those without objective signs of inflammation (inflammation -). (C) Serum calprotectin levels according to disease activity assessed with Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), (D) Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score with CRP (ASDAS-CRP) and Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC) magnetic resonance imaging score of the (E) sacroiliac joints and (F) spine. Inactive: ASDAS <1.3 , Low: 1.3-2.1, High: 2.1-3.5 and Very High: ASDAS >3.5 . 0: SPARCC score=0, Low: 2 \leq SPARCC score <5 and High: SPARCC score ≥ 5 . Each point represents a subject, horizontal and vertical lines show the median and interquartile range. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ with Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis one-way test with post hoc Dunn's test.

Table 1. Baseline characteristics of axial spondyloarthritis patients included from the DESIR cohort.

| Baseline characteristics | axSpA ASAS+ (n=426) | AS mNY+ (n=149) | p-value |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------|---------|
| Males (%) | 51.9 | 62.8 | <0.05 |
| Age (years, mean±SD) | 31.4±7.2 | 32.1±8.5 | NS |
| Disease duration (months, mean±SD) | 10.4±23.0 | 13.1±24.5 | NS |
| HLA B27 positivity (%) | 86.1 | 74.3 | <0.01 |
| CRP level baseline (mg/L, mean±SD) | 8.9±14.0 | 12.7±17.0 | <0.01 |
| elevated CRP | 34.1 | 48.6 | <0.01 |
| BASDAI (mean±SD) | 42.7±20.3 | 40.3±19.2 | NS |
| ASDAS-CRP (mean±SD) | 2.6±1.0 | 2.7±1.0 | NS |
| BASFI (mean±SD) | 28.8±22.1 | 30.2±23.2 | NS |
| mSASSS (mean±SD) | 1.5±4.0 | 1.9±4.2 | <0.05 |
| Serum calprotectin (ng/mL, mean±SD) | 271.4±170.0 | 268.0±156.1 | NS |
| Total Berlin score | 1.2±2.9 | 2.7±4.5 | <0.0001 |
| SIJ SPARCC score | 5.6±9.3 | 10.0±12.0 | <0.0001 |
| Spine SPARCC score | 4.6±13.1 | 10.6±20.8 | <0.0001 |

axSpA ASAS+: axial Spondyloarthritis fulfilling axial Assessment of Spondyloarthritis international Society criteria, AS mNY+: Ankylosing Spondylitis fulfilling modified New York criteria, HLA B27: Human Leukocyte Antigen B27, CRP: C-reactive protein, elevated CRP: CRP above 5mg/L, BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, ASDAS: Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score, BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Spine Score, mSASSS: modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score, SIJ: sacroiliac joint, SPARCC: Spondyloarthritis Research Consortium of Canada. P-values refer to Mann-Whitney U test result and Fisher's exact test. NS: non-significant

REFERENCES

- [1] Ramiro S, Stolwijk C, van Tubergen A, et al. Evolution of radiographic damage in ankylosing spondylitis: a 12 year prospective follow-up of the OASIS study. *Ann Rheum Dis* 2015;74:52-9.
- [2] Machado PM, Baraliakos X, van der Heijde D, Braun J, Landewé R. MRI vertebral corner inflammation followed by fat deposition is the strongest contributor to the development of new bone at the same vertebral corner: a multilevel longitudinal analysis in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1486-93.
- [3] Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, et al. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2012;64:1388-98.
- [4] Benhamou M, Gossec L, Dougados M. Clinical relevance of C-reactive protein in ankylosing spondylitis and evaluation of the NSAIDs/coxibs' treatment effect on C-reactive protein. *Rheumatology (Oxford, England)* 2010;49:536-41.
- [5] Turina MC, Sieper J, Yeremenko N, et al. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1746-8.
- [6] Romand X, Bernardy C, Nguyen MVC, et al. Systemic calprotectin and chronic inflammatory rheumatic diseases. *Joint bone spine* 2019;86:691-8.
- [7] Edgeworth J, Gorman M, Bennett R, Freemont P, Hogg N. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:7706-13.
- [8] Dougados M, d'Agostino MA, Benessiano J, et al. The DESIR cohort: a 10-year follow-up of early inflammatory back pain in France: study design and baseline characteristics of the 708 recruited patients. *Joint bone spine* 2011;78:598-603.
- [9] Huang J, Yin Z, Song G, Cui S, Jiang J, Zhang L. Discriminating Value of Calprotectin in Disease Activity and Progression of Nonradiographic Axial Spondyloarthritis and Ankylosing Spondylitis. *Disease markers* 2017;2017:7574147.
- [10] Rademacher J, Tietz LM, Le L, et al. Added value of biomarkers compared with clinical parameters for the prediction of radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2019;58:1556-64.

Supplementary methods

Patients and study parameters

The DESIR cohort (NCT01648907) has been previously described (217). Briefly, consecutive patients aged 18–50 years from 25 centers in France who had inflammatory back pain (evaluated by either the Calin or the Berlin criteria) (379, 380) that lasted ≥ 3 months but < 3 years were included if the treating rheumatologist considered the symptoms suggestive of axSpA (a score ≥ 5 on a scale from 0 to 10). Moreover, we excluded patients who had a different diagnosis than that of axSpA after at least 2 years of follow-up according to the treating rheumatologist. Visits were scheduled every 6 months during the first 2 years and yearly thereafter. In this study, axSpA patients were defined as patients who fulfilled the Assessment in SpondyloArthritis Society (ASAS) criteria for axSpA at baseline (7). Ankylosing spondylitis (AS) patients were defined as patients who fulfilled modified New York (mNY) criteria and non-radiographic axSpA (nr-axSpA) as patients who fulfilled ASAS criteria but not mNY criteria.

As previously described (217), the activity of the disease was assessed with Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score with CRP (ASDAS-CRP), functional disability with Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) and Health Assessment Questionnaire for Ankylosing Spondylitis (HAQ-AS) and quality of life with Ankylosing Spondylitis Quality of Life questionnaire (ASQoL). Active disease was defined by a BASDAI score above 4 points and these ASDAS-CRP cut-offs were used to determine activity: < 1.3 for inactive disease, between ≥ 1.3 and < 2.1 for low disease activity, between ≥ 2.1 and < 3.5 for high disease activity and > 3.5 for very high disease activity (381). A CRP level above 5 mg/L defined an elevated CRP level. Patient had objective signs of inflammation if a sacroiliitis on MRI and/or X-rays and/or an elevated CRP level were present. The study was conducted according to good clinical practice guidelines, was approved by the appropriate local medical ethical committees: the “Comité de Protection des Personnes Physiques” (CPP), Ile de France III” ethics committee (Number 2457; EUDRACT number 2007-A00608-45) and informed written consent was obtained before inclusion from all patients

Serum calprotectin and cytokines assessment

In the DESIR cohort, serum was prospectively collected from 2009 to 2010 at inclusion and stored in aliquots at -80°C in the Biological Resources Center at Bichat Hospital. Calprotectin

serum concentrations were assessed at baseline in the patient's serum by enzyme-linked immunosorbent assay kit according to the manufacturer method (Calprotectin ELISA kit, Hycult Biotech, Netherlands). Cytokines in serum were measured with the Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Assays 1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) as previously described (382).

Imaging

Radiographs and MRI were blindly evaluated by two trained central readers as previously described (383). A radiographic spinal progression was defined as worsening by ≥ 2 units at 2 years of the modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score (mSASSS) (384). A lower threshold for defining radiographic progression, *i.e.* a worsening by one point or more over 2 years was also applied (385). MRI spine and SIJ inflammation at baseline and at 2 years were evaluated with Berlin and Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC) score (386, 387). We defined a low SPARCC score as a score of ≥ 2 and a high score as ≥ 5 (106).

Statistical analysis

Data between groups were compared using Wilcoxon-Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis one-way test with post hoc Dunn's test. Data were described as median and interquartile range (IQR). Spearman's correlation test was used to assess the relation between serum calprotectin and MRI score, activity and functional scores. The value of 0 pg/mL was assigned when cytokine assay had a value below the limits of detection. Statistical analysis was performed only for IL-6, TNF- α , IL-31 and sCD40L because these cytokines has been detected with a value above the limits of detection in more than 50% of axSpA ASAS+ (382). Spearman's correlation was used to determine the relation between cytokine and calprotectin level. Statistical analyses were performed using R software version 3.5.1 and GraphPad Prism 8.4.1 (GraphPad Software, San Diego, USA). A p-value <0.05 was considered statistically significant.

1.3.5 Role of the funding source

The DESIR cohort was sponsored by the Département de la Recherche Clinique et du Développement de l'Assistance Publique–Hôpitaux de Paris. This study is conducted under the umbrella of the French Society of Rheumatology and INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). The database management is performed within the department of epidemiology and biostatistics (Professor Paul Landais, D.I.M., Nîmes, France). An

unrestricted grant from Pfizer was allocated for the first 10 years of the follow-up of the recruited patients. Pfizer did not review the content or have influence on this manuscript.

5. Calprotectine sérique et déclin de la fonction rénale dans les vascularites à ANCA

5.1. Introduction

La granulomatose avec polyangéite (GPA) et la polyangéite microscopique (PAM) sont des maladies inflammatoires graves caractérisées par une vascularite nécrosante des petits vaisseaux associée à la présence d'auto-anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA) avec une spécificité pour la protéinase 3 (PR3) ou la MPO. Ces maladies sont regroupées sous le terme de vascularite à ANCA (VAA).

Afin de mettre en rémission ces maladies sévères, un traitement immunosuppresseur lourd source de complications est employé. L'évolution de la maladie après le traitement initial est très variable et les rechutes restent fréquentes et difficilement prévisibles.

Certaines études soutiennent la valeur du suivi des ANCA dans la prédiction des rechutes (388, 389). Une méta-analyse sur ce sujet a conclu qu'une augmentation ou une persistance des ANCA pendant la rémission n'est que modestement prédictive d'une rechute future de la maladie, limitant l'intérêt du suivi des ANCA pour guider le traitement à l'échelle du patient (390). En pratique clinique, le taux d'ANCA est suivi au cours de la maladie et une surveillance rapprochée est effectuée en cas d'ascension de ces derniers. La prédiction imparfaite du risque de rechute par le suivi des ANCA laisse la place à la recherche d'autres candidats qui permettraient d'améliorer le suivi des patients. La CRP, quant à elle, se situe généralement dans la fourchette normale pendant la rémission des VAA et ne fournit donc pas d'information pronostique.

Les ANCA ont un rôle pathogénique dans cette maladie. En effet, ils sont capables d'activer les neutrophiles et les monocytes *in vivo* (391), et induisent la maladie dans des modèles animaux (392). L'activation des neutrophiles par les ANCA, mais aussi par l'endothélium activé, conduit à un relargage de calprotectine qui est impliquée dans l'inflammation vasculaire conduisant à la génération de lésions endothéliales.

Pepper *et al.* ont montré que l'absence de diminution de la calprotectine à 1 ou 6 mois après l'introduction d'un traitement d'induction de la rémission peut être un prédicteur utile de futures rechutes (393). Néanmoins, cette étude ne permettait pas de savoir si la calprotectine serait un biomarqueur prédictif de rechute au cours du traitement d'entretien de la VAA une fois la rémission clinique obtenue.

L'ensemble de ces observations a fait émerger la question de savoir si le suivi de la calprotectine pendant la phase d'entretien de la rémission permettait de prédire la dégradation de la fonction rénale et la rechute dans les VAA.

Pour répondre à cette question scientifique, nous avons dosé la calprotectine sérique chez les patients ayant participé à l'essai thérapeutique multicentrique français MAINRITSAN (Maintenance of Remission using Rituximab in Systemic ANCA-associated Vasculitis), essai qui visait à montrer l'intérêt du rituximab (anti CD20) comparativement à l'azathioprine pour prévenir la rechute chez des patients en rémission après un traitement d'induction par cyclophosphamide. Cet essai a inclus des patients atteints de GPA, PAM et quelques VAA, avec une atteinte limitée au rein, qui étaient en rémission complète (Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) de 0).

Dans cet article ma contribution a été de :

- Soumettre une demande auprès de l'unité en charge de l'essai thérapeutique MAINRITSAN afin de réaliser ce projet.
- Participer de manière substantielle à la conception et au design de l'étude
- Réaliser les analyses statistiques et contribuer substantiellement à l'analyse des données.
- Rédiger l'article que j'ai soumis récemment à Rheumatology (impact factor 2020 7.580, rang B).
- Présenter ce travail lors d'une communication orale au Congrès de l'EULAR et de la Société Française de Rhumatologie en 2020.

Dans cet article nous montrons que :

- L'augmentation de la calprotectine à 6 mois de l'introduction d'un traitement de maintien de la rémission est associé à la survenue d'une détérioration de la fonction rénale dans l'année.
- L'augmentation de la calprotectine à 6 mois est aussi associée à un risque de rechute mais uniquement chez les patients avec des anticorps anti-PR3 positifs.
- L'évolution de la cinétique de la calprotectine au cours du temps est plus informative qu'un dosage effectué uniquement au moment de la rémission.

5.2. Article 3 : Serum calprotectin increase is associated with renal function decline during remission maintenance therapy in ANCA-associated vasculitides

Serum calprotectin increase is associated with renal function decline during remission maintenance therapy in ANCA-associated vasculitides

Xavier Romand, MD^{1,2}, Anaïs Courtier, MSc³, Minh Vu Chuong Nguyen, PhD^{1,3}, Marie-Hélène Paclet, PhD^{1,4}, Philippe Gaudin, MD PhD^{1,2}, Bruno Fautrel^{5,6}, Christian Pagnoux, MD MSc MPH⁷, Loïc Guillevin, MD PhD^{8,9}, Benjamin Terrier, MD PhD^{8,9*}, Athan Baillet, MD, PhD^{1,2*}

¹Univ. Grenoble Alpes, T-RAIG TIMC, UMR 5525, Grenoble, France

²Département de Rhumatologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

³Sinnovial, Grenoble, France

⁴Département de Biologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

⁵Pierre et Marie Curie University—Paris 6, Sorbonne Universités, GRC-08 (EEMOIS), Paris, France

⁶APHP, Rheumatology Department, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France

⁷Vasculitis clinic, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada

⁸Université de Paris, Paris, France

⁹Department of Internal Medicine, National Referral Center for Rare Systemic Autoimmune Diseases, Cochin Hospital, APHP-Centre Université Paris (CUP), Paris, France

* Both senior authors equally contributed to this work

Corresponding author: Dr. Xavier Romand, Department of Rheumatology, CHU Grenoble Alpes, Hôpital Sud, 19 Avenue de Kimberley, 38130 Échirolles, France.

E-mail: xromand@chu-grenoble.fr, ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2222-1456>

Running head: Serum calprotectin and relapse in ANCA-vasculitides

Disclosure of interest: None

Financial support: The MAINRITSAN trial was supported by a grant from the Hospital Clinical Research Program (Programme Hospitalier de Recherche Clinique), French Ministry of Health (2008-002846-51).

Abstract

Objective: To assess whether serum calprotectin level can predict renal function decline in ANCA-associated vasculitides (AAV) patients receiving maintenance therapy.

Methods: Serum calprotectin levels were assessed at inclusion and month 6 in AAV patients, in complete remission after induction therapy, randomly assigned to rituximab or azathioprine to maintain remission. Renal function decline was defined as a 25% decrease in estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) and a change in the eGFR category, or a decrease of 15 ml/min/1.73m². Relapse was defined as a Birmingham Vasculitis Activity Score >0 attributable to active vasculitis. Renal function decline and relapse were considered if occurring in the 12 months following the calprotectin assay at month 6.

Results: 76 patients were included. Serum calprotectin increased from baseline to month 6 in patients with renal function decline (7940 [-226.0, 28691] ng/mL, ratio M6/M0 2.86 [0.94, 4.27]) and decreased in those without deterioration of renal function (-4800 [-18777, 3708] ng/mL, ratio M6/M0 0.57 [0.22, 1.78]; p<0.001). An increase of calprotectin level was associated with a higher risk of subsequent renal function decline even after adjustment for gender, baseline serum creatinine, and ANCA serotype (OR=7.8 (95% CI, 2.2-33.8, p=0.003). A significantly higher risk of relapse was observed in proteinase 3-ANCA AAV patients with an increase of serum calprotectin levels (OR=5.6 (95% CI, 1.0-31.2), p=0.03).

Conclusion: An increase in serum calprotectin by month 6 compared to inclusion during remission-maintenance therapy in AAV was associated with a higher risk of renal function decline in the following 12 months.

Introduction

Anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-associated vasculitides (AAV) are severe diseases with life-threatening complications, including renal function worsening leading to end-stage renal disease (ESRD). The prediction of relapse and complications in AAV patients remains a challenge. Proteinase 3 (PR3)-ANCA at diagnosis and persistent positive ANCA at the time of switching from induction to maintenance therapy are associated with a higher risk of relapse^{1, 2}. The usefulness of monitoring ANCA titers as a marker of relapse remains controversial and a source of debate^{3, 4}. Renal relapse, creatine clearance at baseline, and proportion of normal glomeruli on kidney biopsy, contrary to proteinuria or clinical outcomes, predict ESRD in AAV patients^{5, 6, 7}. However, renal relapse remains difficult to predict in AAV patients leading to the necessity to carefully monitor the renal function⁵. Discovering new predictive biomarkers of relapse could help physicians optimize maintenance therapy, especially its duration, avoiding unnecessary over-treatment and side effects and preventing relapses and life-threatening events through an adapted and personalized therapeutic strategy.

Calprotectin (protein S100A8/A9) is an alarmin intensely released by neutrophils and macrophages during inflammation. It amplifies inflammation by activating Toll-like receptor 4 (TLR4)^{8, 9} and advanced glycation end-products receptor leading to endothelial and mesangial cell damages in the kidney^{10, 11}. Calprotectin correlates with disease activity and severe outcomes in multiple inflammatory disorders such as chronic inflammatory rheumatic diseases⁹ and more recently in SARS-CoV-2 infection^{12, 13}. Elevated urinary level of calprotectin in the general population allows to distinguish with a very high accuracy intrinsic acute kidney injury (AKI) from pre-renal AKI¹⁴.

In AAV patients, calprotectin is highly expressed in serum, on neutrophils and monocytes cell surface, and in active glomerular lesion¹⁵ independently of renal function^{15, 16}. An increase of calprotectin in patients with active AAV receiving induction of remission therapy by cyclophosphamide or rituximab identified patients with a higher risk of relapse¹⁷. There is currently scarce knowledge about the usefulness of the monitoring of serum calprotectin during remission maintenance therapy. A previous study failed to demonstrate that serum calprotectin is a predictor of relapse during the remission phase¹⁶. However, it suggested that it could be a biomarker of renal prognosis, but the limited number of patients included did not allow to draw strong conclusions¹⁶.

We propose in this study to assess the predictive value of serum calprotectin in a large cohort of AAV patients in remission. Since calprotectin plays a role in the development of glomerulonephritis and reflects the severity of the inflammatory process, we hypothesized that serum calprotectin changes in AAV patients in remission could be associated with renal function decline and relapse in the following 12 months.

Patients and Methods

Study design and patients

The Maintenance of Remission using Rituximab in Systemic ANCA-associated Vasculitis (MAINRITSAN) trial design details have been reported previously¹⁸. Briefly, calprotectin assays were performed in patients with granulomatosis with polyangiitis (GPA), microscopic polyangiitis (MPA), or renal-limited ANCA-associated vasculitis, in complete remission (Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) of 0) after induction therapy with cyclophosphamide and included in the multicenter, randomized, open-label MAINRITSAN trial (ClinicalTrials.gov number: NCT00748644; EudraCT number: 2008-002846-51). After inclusion, patients were randomized to either receive rituximab (RTX) or azathioprine (AZA) to maintain remission, during 18 and 22 months, respectively.

To compare the serum calprotectin levels during remission phase in AAV patients to another chronic inflammatory rheumatic disease, we assessed serum calprotectin levels in patients included in Spacing of TNF-blocker injections in Rheumatoid Arthritis Study (STRASS, ClinicalTrials.gov number: NCT00780793, CPP Ile de France VI; IRB authorization no. 100-07)¹⁹. Briefly, STRASS study is an 18-months equivalence multicenter randomized controlled trial which compared two therapeutic strategies (maintenance or spacing of biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs) in patients with established rheumatoid arthritis (RA) according to 1987 American College of Rheumatology classification criteria. RA patients were in clinical remission according to a Disease Activity Score 28 \leq 2.6 for at least 6 months with stable dosage of anti-TNF drugs for at least 6 months.

Serum Calprotectin assessment

Sera from AAV patients were prospectively collected at inclusion (month 0, i.e. on achievement of remission) and month 6 after initiation of maintenance therapy and stored in aliquots at -80°C at the Cochin Hospital (Paris, France). Baseline sera from RA patients in remission were prospectively collected from September 2008 to January 2011 and stored in aliquots at -80°C in the Biological Center at Assistance Publique Hopitaux de Paris (APHP). Calprotectin serum concentrations were assessed with an In Vitro Diagnostic (IVD) enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay kit according to the manufacturer's method (IDK® Calprotectin ELISA kit K6935, Immunodiagnostik). The serum calprotectin assay was centralized and performed by the same technician. In order, to study a homogeneous population, we decided to include only AAV patients with a serum sample available both at inclusion and month 6.

Study parameters

Significant renal function decline was based on the National Institute for Health and Care Excellence (NICE) 2015 guideline definition as (i) a decrease in estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) $\geq 25\%$ and a change in eGFR category or (ii) a decrease in eGFR ≥ 15 ml/min/1.73m² occurring during the follow-up²⁰. Serum creatinine levels were assessed every 3 months and eGFR was calculated using the MDRD equation. Relapse was defined as the reappearance or worsening of manifestations attributable to active vasculitis (BVAS >0) and (i) involvement of at least one major organ, a life-threatening manifestation or both (major relapse), or (ii) reappearance or worsening of manifestations attributable to active vasculitis, not corresponding to a major relapse but requiring mild treatment intensification (minor relapse). A calprotectin ratio (calprotectin M6/M0 ratio) was calculated by dividing the calprotectin level at month 6 (M6) by the calprotectin level at inclusion (M0). The calprotectin difference was calculated by subtracting the calprotectin level at month 6 (M6) by the calprotectin level at inclusion (M0). An increase in calprotectin level was defined as a calprotectin M6/M0 ratio >1. Relapse and significant renal function decline were retained if occurring between M6 and M18 of follow-up. The following data were collected at inclusion and used in this study: age, gender, disease status (newly diagnosed vs. relapse), AAV clinical phenotype (GPA vs. MPA), ANCA subtype (PR3 vs. MPO), ANCA evolution after induction of remission, maintenance treatment (RTX vs. AZA), neutrophil count, C-reactive protein (CRP) level, dose of prednisone, eGFR and Vasculitis Damage Index (VDI).

Objectives

The primary objective was to evaluate if serum calprotectin level variation during maintenance therapy was associated with renal function decline within the following 12 months.

Secondary objectives were (i) to determine if calprotectin level could predict relapse within the 12 months follow-up and (ii) to assess whether calprotectin levels correlated with inflammatory parameters.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R software version 3.5.1 and GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Mann-Whitney tests and t-tests were used, respectively, to compare two groups with non-normally or normally distributed data. The D'Agostino-Pearson test was used to determine the normal distribution of data. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD) for normally distributed or median and interquartile range (IQR) for non-normally variables. Correlations between calprotectin level and neutrophil count, CRP level, VDI, eGFR, and age were assessed with non-parametric Spearman's correlation tests (r_s). Calprotectin variation and risk of renal function decline and relapse were investigated using (i) Kaplan-Meier survival analysis and the Gehan-Beslow-Wilcoxon test, (ii) odds ratio (OR) calculation and chi-square test. The dichotomization of M6/M0 calprotectin ratio was considered; OR were plotted as a function of ratio cut-off. Age, sex, disease status, ANCA-associated vasculitis type (GPA *vs.* MPA), serum creatine at inclusion, CRP at inclusion, PR3-ANCA status at disease flare-up, ANCA evolution after induction of remission and maintenance remission treatment type, and an increase of calprotectin were evaluated as potential factors predictive of renal function deterioration using univariate logistic regression analysis. Variables with significant results in univariate analysis were selected for multivariate analysis. Moreover, PR3-ANCA status and serum creatinine, two factors known as relevant in the literature¹, were also added in the multivariate model. Multivariate logistic regression was performed to build the final combined model. A p-value <0.05 was considered significant.

Results

Baseline characteristics

Out of the 115 patients included between October 2008 and June 2010 in the MAINRITSAN trial, 76 patients included had serum samples available for calprotectin determination at both inclusion and month 6 and were included in the present study. Mean age of patients was 55.7 ± 13.1 years, 50% were female and 69.8% had GPA. Mean eGFR was 64.5 ± 31.8 mL/min/1.73m² and 22 patients (28.9%) had moderately to severely decrease of eGFR (eGFR <45 ml/min/1.73m²) at inclusion. Considering baseline patient characteristics, included patients differed significantly from those not included only for AAV clinical phenotype ($p=0.04$). Baseline characteristics of AAV patients are described in **Table 1**.

Serum calprotectin level in AAV patients in remission

Median serum calprotectin level was similar at month 0 and month 6 (median [IQR], 11250 [5498-26475] vs. 10450 [3700-31525] ng/mL; $p=0.53$). Patients with positive ANCA at inclusion had similar levels of calprotectin compared to ANCA-negative patients (9411 [4285-24725] vs. 13000 [5928-28250] ng/mL; $p=0.49$). Serum calprotectin at inclusion was associated with higher neutrophil counts ($r_s=0.25$, $p=0.03$), higher CRP level ($r_s=0.27$, $p=0.03$) but not with gender, age, disease status (newly diagnosed vs. relapse), AAV clinical phenotype (GPA vs. MPA), ANCA serotype (PR3 vs. MPO), maintenance treatment (RTX vs. AZA) and VDI.

Serum calprotectin levels obtained from AAV patients in remission (at inclusion) were compared to RA patients in remission ($n=133$). Whereas AAV and RA patients were in remission, AAV patients demonstrated a serum calprotectin level approximately nine times higher than RA patients (median [IQR], 11250 [5498-26475] vs. 1271 [822.5-1945] ng/mL; $p<0.0001$) (**Figure 1**).

Serum calprotectin variation at month 6 and renal function decline

Among 76 patients with a calprotectin dosage at both inclusion and month 6, 19 patients (25.0%) (12 in the AZA group and 7 in the RTX arm, including 15 PR3-ANCA patients) developed significant renal function decline between month 6 and month 18. The baseline calprotectin level was significantly lower in patients developing significant renal function decline (5283 [3406, 12100] vs. 14500 [7067, 33300] ng/mL, $p=0.002$). In contrast, the serum calprotectin level at month 6 was not different. Calprotectin increased from baseline to month

6 in patients with renal function decline (7940 [-226.0, 28691] ng/mL, calprotectin ratio M6/M0: 2.86 [0.94, 4.27]) and decreased in those without deterioration of renal function (-4800 [-18777, 3708] ng/mL, calprotectin ratio M6/M0: 0.57 [0.22, 1.78]; $p < 0.001$) between month 6 and month 18 (**Figure 2A**). An increase in serum calprotectin during the first 6 months of maintenance therapy, observed in 33 patients (43.4%), predicted a significant deterioration of renal function within the following 12 months (OR = 5.60 (95% CI, 1.8-17.9; $p = 0.002$) (**Figure 2B**). After adjustment on potential confounding factors (serum creatinine, gender, and ANCA serotype), calprotectin level increase was a factor independently associated with subsequent renal function decline (OR=7.8 (95% CI, 2.2-33.8; $p = 0.003$) (**Table 2**). The area under the ROC curve for predicting renal function worsening using calprotectin ratio M6/M0 was 0.77 (95% CI 0.66-0.88, $p < 0.001$). After determining the optimal cut-off for calprotectin ratio M6/M0 at 2.07 using the Youden index, sensitivity was 68.4% (95% CI: 46.0-84.6), specificity 79.0% (95% CI: 66.7-87.5), positive predictive values (PPV) 52.0% (95% CI: 31.8-71.7), negative predictive values (NPV) 88.2% (95% CI: 75.4-95.1), positive likelihood ratio (LR+) of 3.3 (95% CI: 1.8-5.9) and negative likelihood ratio (LR-) of 0.4 (95% CI: 0.2-0.8) (**Figure 2C**). A calprotectin M6/M0 ratio above 1.82 was the optimal cut-off of calprotectin ratio to predict subsequent renal function decline (OR=8.1 (95% CI, 2.6-25.9) $p < 0.001$). Since identifying patients with a high risk of renal function worsening during remission maintenance therapy is relevant, we also examined a pragmatic cutoff determined as the 75th percentile of calprotectin ratio M6/M0 (ratio of 2.9) observed in our population to maximize the specificity of the test. Calprotectin change levels were 82.5% (70.6–90.2%) specific for renal function decline with this cut-off. Serum calprotectin variation at month 6 was independent of age, gender, disease status (newly diagnosed *vs.* relapse), AAV clinical phenotype (GPA *vs.* MPA), ANCA serotype (PR3 *vs.* MPO), increased CRP, and maintenance treatment used (RTX *vs.* AZA). Calprotectin level was not correlated with eGFR and was not significantly different in patients with hematuria.

Serum calprotectin variation by month 6 and risk of relapse

Ten patients (13.1%) (7 in the AZA group and 3 in the RTX arm, including 8 PR3-ANCA patients) experienced a relapse within the first 18 months of follow-up. The serum calprotectin level at baseline and month 6 was not significantly different between relapsing patients and those without relapse.

Serum calprotectin level increased from inclusion to month 6 in relapsing patients (5578 [-3402, 46338] ng/mL), whereas a decline was observed in patients without subsequent relapse (-3100

[-14975, 7594] ng/mL, $p=0.04$) (**Figure 3A**). Calprotectin ratio M6/M0 tended to be increased in relapsing patients (2.2 [0.45, 6.3] vs. 0.71 [0.23, 2.6], $p=0.08$). An increase in serum calprotectin, occurred in 33 patients (33/76, 43.4%), had a tendency to be associated in the whole study population (OR = 3.6 (95% CI, 0.9-15.1), $p=0.07$) with relapse and was statistically associated in AAV patients with PR3-ANCA (OR=5.6 (95% CI, 1.0-31.2, $p=0.03$)). A calprotectin M6/M0 ratio above 1.14 was the optimal cut-off of calprotectin increase to predict subsequent relapse in the whole study group (OR=4.1 (95% CI, 1.0-15.9) $p=0.04$). The area under the ROC curve of calprotectin ratio M6/M0 was 0.67 ($p=0.08$) to predict relapse.

Discussion

The present study shows that an increase in serum calprotectin during the first 6 months following the initiation of maintenance therapy in AAV patients identifies patients at risk of subsequent renal function deterioration and relapse within the following 12 months.

Pepper *et al.* demonstrated that an increase in serum calprotectin at 2 or 6 months, compared to baseline, in active PR3-ANCA patients treated with rituximab for induction of remission is associated with a higher risk of relapse during 18 months of follow-up, whereas a single calprotectin dosage did not predict subsequent relapse¹⁷. In contrast, a previous small study including 27 patients in persistent remission failed to demonstrate that serum calprotectin dosage identified patients that relapsed during 24 months of follow-up¹⁶. Here, on a larger population, we show that calprotectin variation may predict the risk of subsequent relapse in PR3-ANCA patients.

Martinez Valenzuela *et al.* showed that during remission, serum calprotectin at inclusion was significantly higher in AAV patients with subsequent eGFR decrease and failed to predict relapse, which contrasts with our findings¹⁶. In this study, the definition of eGFR worsening was less stringent, since a decrease >2 mL/min/year (compared to a physiological eGFR loss of 1 mL/min/year) was sufficient to determine renal function decline. A small variation in eGFR could be explained by analytical and within-subject biological variability. A recent study suggests that a decrease of eGFR by 13.1% could be considered as a clinically relevant renal function deterioration²¹. Therefore, we decided to use a stringent definition of renal function decline following the NICE 2015 guideline. Importantly, serum calprotectin was not correlated with renal function as previously described¹⁶, allowing the use of this biomarker in AAV patients with renal impairment.

In our study, the serum calprotectin level was independent of ANCA status suggesting that calprotectin could be useful in addition to ANCA to predict the subsequent risk of relapse³. As

in the active phase of the disease¹⁷, calprotectin levels correlated with inflammatory parameters such as neutrophil count and CRP level in AAV patients in remission. Calprotectin level remains high in AAV patients compared to RA, another autoimmune disease characterized by exaggerated neutrophil activation, even if remission is obtained²². The difference in calprotectin level observed could be explained by a lower level of neutrophil activation in RA during remission or by the fact that the calprotectin excretion occurs in an extra-vascular site, the synovial membrane in RA. CRP is a widely-used biomarker to assess disease activity in AAV, but its predictive value for relapse is limited since its elevation remains very acute. In contrast, the CRP level during remission does not predict relapse in GPA patients²³ which tempered its interest during AAV monitoring. Calprotectin seems to reflect the subclinical inflammation occurring during the remission phase and leading to AAV relapse and renal damage.

C5a receptor inhibitor, avocapan, by blocking neutrophil activation and chemoattraction, induced remission and improve kidney function in AAV patients²⁴. The complement component C5a mediates the release of calprotectin from neutrophils and induced glomerulonephritis in an animal model^{25, 26}. Calprotectin could be an interesting candidate biomarker of neutrophil activation for monitoring the efficiency of avocapan treatment.

The major strength of our study is to assess for the first-time serum calprotectin in a large cohort of AAV patients in remission in the RTX era. Also, in contrast with previous studies, we used a stringent definition of renal function decline. The limitation of this study includes a small number of relapses resulting in a loss of statistical power with a risk of overfitting when multivariate logistic regression was used.

Overall, an increase in serum calprotectin at month 6 after initiation of maintenance therapy was independently associated with a risk of subsequent renal function decline and relapse in PR3-AAV patients in the following 12 months. Serum calprotectin reflects the subclinical inflammation occurring during remission and could represent an interesting biomarker to predict subsequent renal function deterioration and relapses during maintenance therapy. These results must be confirmed in a future prospective study.

References

1. Walsh M, Flossmann O, Berden A, *et al.* Risk factors for relapse of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2012; **64**: 542-548.
2. Morgan MD, Szeto M, Walsh M, *et al.* Negative anti-neutrophil cytoplasm antibody at switch to maintenance therapy is associated with a reduced risk of relapse. *Arthritis Res Ther* 2017; **19**: 129.
3. Tomasson G, Grayson PC, Mahr AD, *et al.* Value of ANCA measurements during remission to predict a relapse of ANCA-associated vasculitis--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2012; **51**: 100-109.
4. Charles P, Terrier B, Perrodeau É, *et al.* Comparison of individually tailored versus fixed-schedule rituximab regimen to maintain ANCA-associated vasculitis remission: results of a multicentre, randomised controlled, phase III trial (MAINRITSAN2). *Ann Rheum Dis* 2018; **77**: 1143-1149.
5. Wester Trejo MAC, Floßmann O, Westman KW, *et al.* Renal relapse in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: unpredictable, but predictive of renal outcome. *Rheumatology (Oxford, England)* 2019; **58**: 103-109.
6. Slot MC, Tervaert JW, Franssen CF, *et al.* Renal survival and prognostic factors in patients with PR3-ANCA associated vasculitis with renal involvement. *Kidney international* 2003; **63**: 670-677.
7. Brix SR, Noriega M, Tennstedt P, *et al.* Development and validation of a renal risk score in ANCA-associated glomerulonephritis. *Kidney international* 2018; **94**: 1177-1188.
8. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, *et al.* Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007; **13**: 1042-1049.
9. Romand X, Bernardy C, Nguyen MVC, *et al.* Systemic calprotectin and chronic inflammatory rheumatic diseases. *Joint Bone Spine* 2019; **86**: 691-698.
10. Viemann D, Barczyk K, Vogl T, *et al.* MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. *Blood* 2007; **109**: 2453-2460.
11. Pepper RJ, Wang HH, Rajakaruna GK, *et al.* S100A8/A9 (calprotectin) is critical for development of glomerulonephritis and promotes inflammatory leukocyte-renal cell interactions. *Am J Pathol* 2015; **185**: 1264-1274.
12. Shi H, Zuo Y, Yalavarthi S, *et al.* Neutrophil calprotectin identifies severe pulmonary disease in COVID-19. *J Leukoc Biol* 2021; **109**: 67-72.
13. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, *et al.* Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell* 2020; **182**: 1401-1418 e1418.
14. Schrezenmeier EV, Barasch J, Budde K, *et al.* Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol (Oxf)* 2017; **219**: 554-572.

15. Pepper RJ, Hamour S, Chavele KM, *et al.* Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. *Kidney international* 2013; **83**: 1150-1158.
16. Martinez Valenzuela L, Draibe J, Quero Ramos M, *et al.* Calprotectin as a smoldering activity detection tool and renal prognosis biomarker in ANCA associated vasculitis. *PLoS One* 2018; **13**: e0205982.
17. Pepper RJ, Draibe JB, Caplin B, *et al.* Association of Serum Calprotectin (S100A8/A9) Level With Disease Relapse in Proteinase 3-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2017; **69**: 185-193.
18. Guillevin L, Pagnoux C, Karras A, *et al.* Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *The New England journal of medicine* 2014; **371**: 1771-1780.
19. Fautrel B, Pham T, Alfaiate T, *et al.* Step-down strategy of spacing TNF-blocker injections for established rheumatoid arthritis in remission: results of the multicentre non-inferiority randomised open-label controlled trial (STRASS: Spacing of TNF-blocker injections in Rheumatoid Arthritis Study). *Ann Rheum Dis* 2016; **75**: 59-67.
20. National Institute for Health and Care Excellence: Chronic kidney disease in adults: assessment and management. In, 2015
21. Rowe C, Sitch AJ, Barratt J, *et al.* Biological variation of measured and estimated glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Kidney international* 2019; **96**: 429-435.
22. Bach M, Moon J, Moore R, *et al.* A Neutrophil Activation Biomarker Panel in Prognosis and Monitoring of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2020; **72**: 47-56.
23. Kalsch AI, Csernok E, Munch D, *et al.* Use of highly sensitive C-reactive protein for followup of Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 2010; **37**: 2319-2325.
24. Jayne DRW, Merkel PA, Schall TJ, *et al.* Avacopan for the Treatment of ANCA-Associated Vasculitis. *The New England journal of medicine* 2021; **384**: 599-609.
25. Hetland G, Talgo GJ, Fagerhol MK. Chemotaxins C5a and fMLP induce release of calprotectin (leucocyte L1 protein) from polymorphonuclear cells in vitro. *Mol Pathol* 1998; **51**: 143-148.
26. Xiao H, Dairaghi DJ, Powers JP, *et al.* C5a receptor (CD88) blockade protects against MPO-ANCA GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2014; **25**: 225-231.

Table 1. Baseline characteristics of ANCA-associated vasculitis patients from the MAINRITSAN trial eligible for this study.

| Patient characteristics | All patients n=76 | GFR decline* n=19 | no GFR decline* n=57 | p-value |
|---|----------------------|----------------------|-------------------------|---------|
| Age (years) | 55.7 (13.1) | 55.0 (11.0) | 56.0 (13.8) | 0.8 |
| Female (n (%)) | 38 (50.0) | 14 (73.7) | 24 (42.1) | 0.02 |
| Granulomatosis with polyangiitis (n (%)) | 53 (69.8) | 15 (78.9) | 38 (66.7) | 0.3 |
| Microscopic polyangiitis (n (%)) | 19 (25.0) | 3 (15.8) | 16 (28.1) | 0.3 |
| Renal-limited ANCA-associated vasculitis (n (%)) | 4 (5.2) | 1 (5.3) | 3 (5.3) | 1.0 |
| Disease status: newly diagnosed (n (%)) | 57 (75.0) | 15 (78.9) | 42 (73.7) | 0.6 |
| ANCA-positivity at inclusion (n (%)) | 50 (65.8) | 12 (63.2) | 32 (56.1) | 0.6 |
| C-reactive protein (mg/L)* | 2.5 [1.0 ; 5.0] | 2.7 [1.0 ; 5.2] | 2.3 [1.0 ; 5.0] | 0.7 |
| C-reactive protein elevated (n (%))* | 16 (21.1) | 5 (27.8) | 11 (19.7) | 0.5 |
| Serum calprotectin at inclusion (ng/mL) | 11250 [5498; 26475] | 5283 [3406; 12100] | 14500[7067; 33300] | 0.002 |
| Serum calprotectin at month 6 (ng/mL) | 10450 [3700; 31525] | 18000 [4574; 39600] | 7148 [3058; 27500] | 0.2 |
| estimated Glomerular Filtration Rate (mL/min/1.73m ²) | 64.5 (31.8) | 75.9 (40.3) | 60.7 (27.7) | 0.07 |
| Prednisone (mg/day) | 17.0 [12.5; 20.0] | 15.0 [13.0; 17.5] | 20.0 [12.5; 20.0] | 0.5 |
| Rituximab remission-treatment (n (%)) | 37 (48.7) | 7 (36.9) | 30 (52.6) | 0.2 |
| Neutrophil count (10 ⁹ /L)** | 5.3 [3.7; 7.9] | 5.5 [2.8; 9.3] | 5.3 [4.0; 7.4] | 0.8 |
| Vascular Disease Index | 2 [1; 3] | 2.0 [1; 3] | 2.0 [1; 3] | 1.0 |

GFR: Glomerular filtration rate, ANCA: Anti-neutrophil cytoplasm antibody ,*C-reactive protein was missing for 2 patients, **Neutrophil count was missing for 3 patients. Normally distributed continuous data were described as mean (standard deviation) and non-normally distributed variables as median [Q1; Q3]. t-test and Mann-Whitney U test for continuous data and Chi-square test for dichotomous data were used.

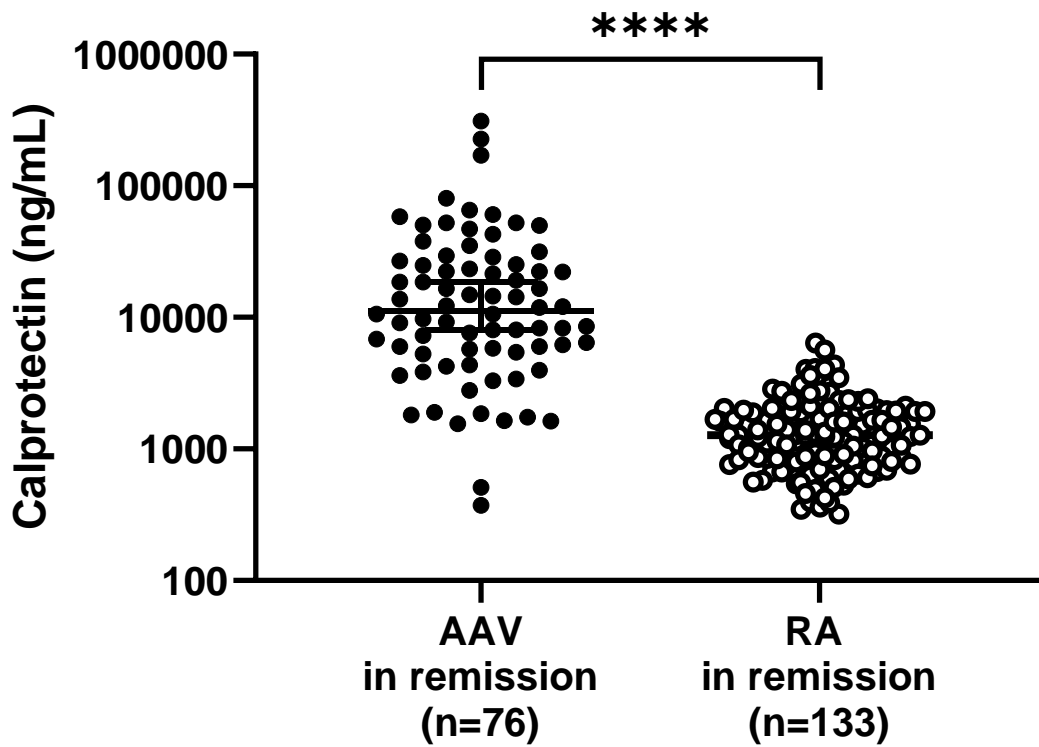


Figure 1. Serum calprotectin levels in ANCA-associated vasculitis patient and rheumatoid arthritis patients in remission.

The level of serum calprotectin in ANCA-associated vasculitis (AAV) patients in remission from the MAINRITSAN trial and in patient with rheumatoid arthritis (RA) in disease remission from the STRASS trial. Mann Whitney U test, **** $p < 0.0001$.

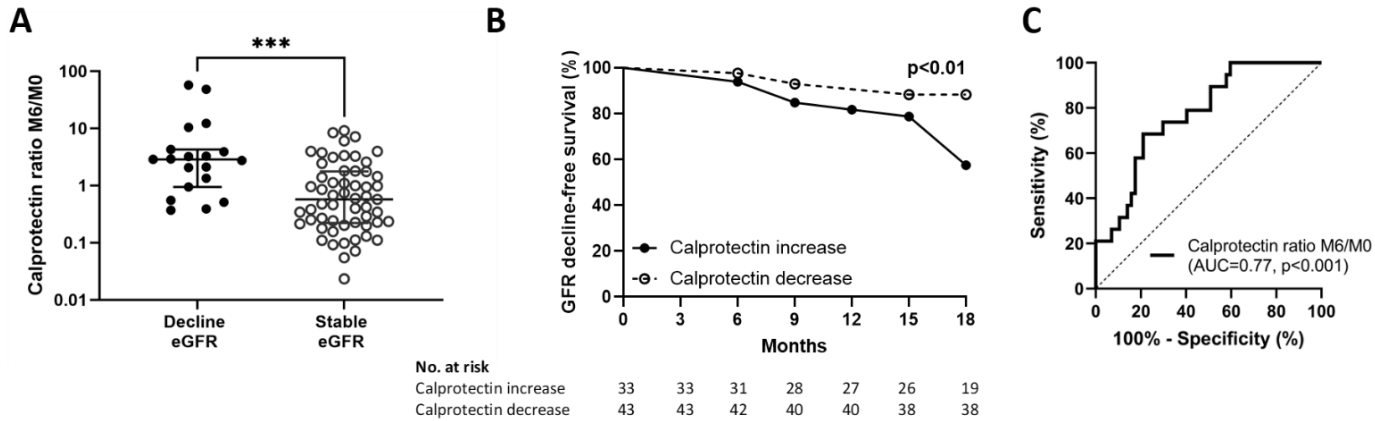


Figure 2. Serum calprotectin change predicting renal function decline in ANCA associated vasculitides (AAV) patients.

Calprotectin ratio M6/M0 in AAV patients (A) with renal function decline (decline estimated glomerular filtration rate (eGFR)) or not (stable eGFR) between month 6 and month 18. Data are shown as median with interquartile range. Mann-Whitney U test, *** $p < 0.001$. Kaplan-Meier survival curves of AAV patients (B) with an increase in serum calprotectin at month 6 (solid line) or not (dotted line) remaining without eGFR decline (GFR decline-free) between month 6 and month 18. The time is the number of months without the occurrence of renal function decline during 18 months of follow-up. A Gehan-Beslow-Wilcoxon test was performed. Receiver operating characteristic (ROC) curves of the predictive value of eGFR decline of calprotectin ratio M6/M0 (C).

| Variables at inclusion | OR (95% CI) | P values |
|---|----------------------|----------|
| Univariate analysis | | |
| Age (≤ 50 years) | 1.40 (0.46 to 4.85) | 0.6 |
| Female (vs. Male) | 3.85 (1.28 to 13.26) | 0.02 |
| Newly diagnosed (vs. Relapsing) | 1.34 (0.41 to 5.26) | 0.7 |
| GPA (vs. MPA or renal-limited vasculitis) | 1.88 (0.58 to 7.27) | 0.3 |
| Serum creatinine $> 200 \mu\text{mol/L}$ at inclusion | 1.70 (0.33 to 7,3) | 0.5 |
| CRP $> 5 \text{ mg/L}$ at inclusion | 1.57 (0.43 to 5.22) | 0.5 |
| PR3-ANCA (vs. MPO-ANCA or no ANCA) | 2.19 (0.69 to 8.45) | 0.2 |
| Induction to remission ANCA evolution (persistence vs. disappearance) | 1.34 (0.47 to 4.07) | 0.6 |
| Azathioprine (vs. Rituximab) | 1.90 (0.67 to 5.78) | 0.2 |
| Calprotectin increase | 5.60 (1.85 to 19.5) | 0.004 |
| Multivariate analysis | | |
| Calprotectin increase | 7.78 (2.21 to 33.85) | 0.003 |
| Female | 4.27 (1.22 to 17.42) | 0.03 |
| Serum creatinine | 0.99 (0.98 to 1.00) | 0.6 |
| PR3-ANCA | 2.58 (0.57 to 13.50) | 0.3 |

Table 2. Univariate and multivariate analysis of predictive factors of significant renal function decline in ANCA associated vasculitides (AAV) patients.

ANCA: Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, GPA: granulomatosis with polyangiitis, MPA: microscopic polyangiitis, PR3: proteinase 3, MPO: myeloperoxidase. Logistic regression models were applied for univariate and multivariate analysis. Calprotectin increase, female gender, serum creatine, PR3-ANCA were included in the multivariate model.

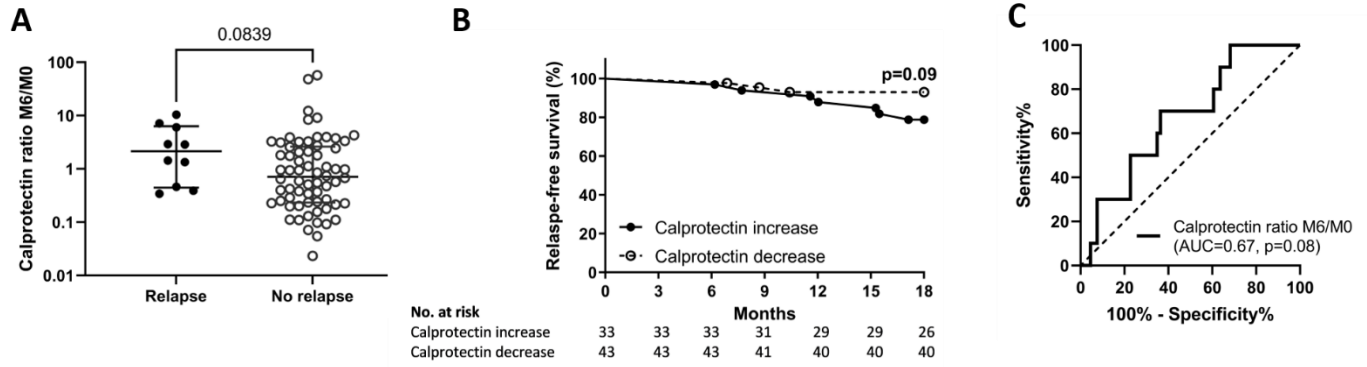


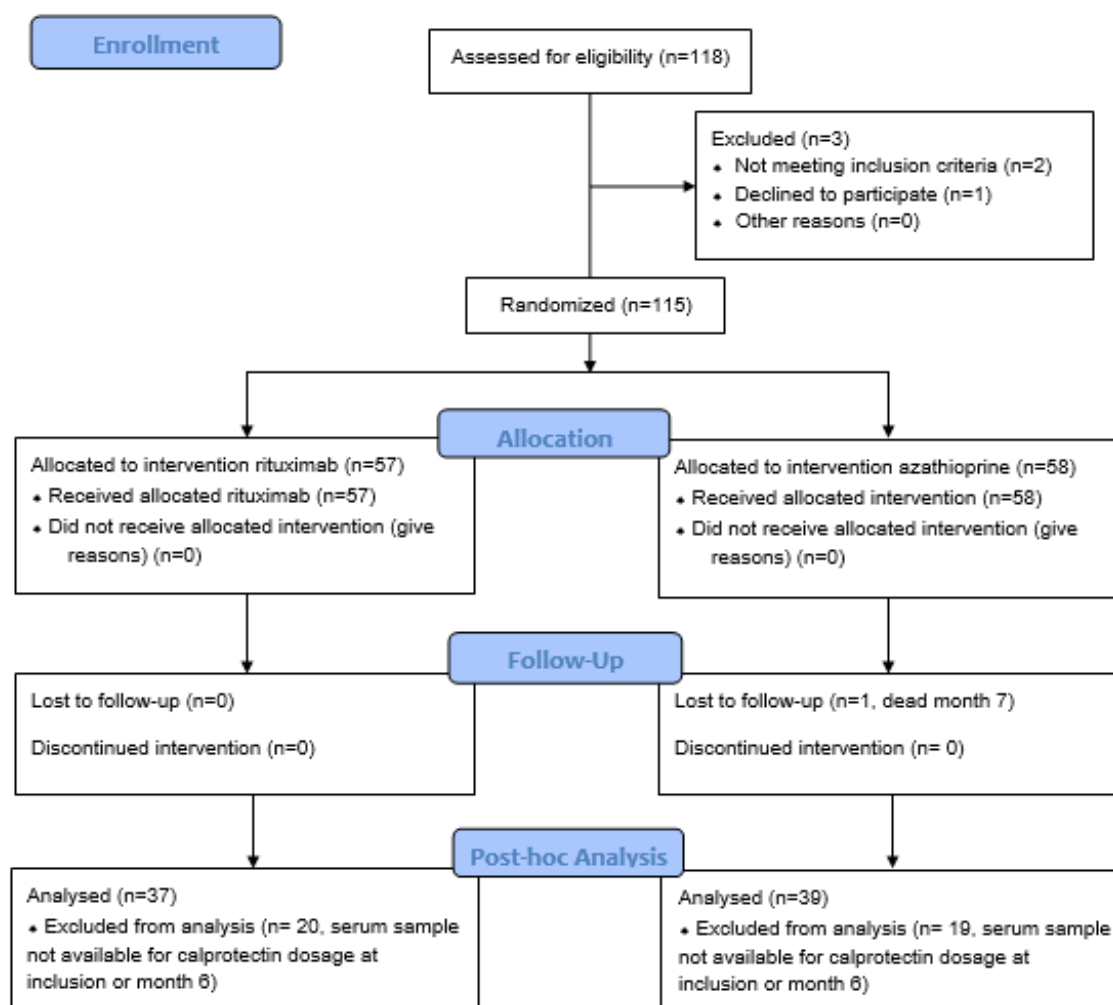
Figure 3. Serum calprotectin change in ANCA associated vasculitides (AAV) patients and risk of relapse.

Calprotectin ratio M6/M0 in AAV patient (A) relapsing or not between month 6 and month 18. Data are shown as median with interquartile range. Mann-Whitney U test. Kaplan-Meier survival curves of AAV patients (B) with an increase in serum calprotectin at month 6 (solid line) or not (dotted line) remaining relapse-free between month 6 and month 18. The time is the number of months of remission during 18 months of follow-up. A Gehan-Beslow-Wilcoxon test was performed. Receiver operating characteristic (ROC) curves of the predictive value of relapse of serum calprotectin ratio M6/M0 (C).

Supplementary figure 1



CONSORT 2010 Flow Diagram



CHAPITRE 3 : PRISE EN CHARGE OPTIMISEE DES SPONDYLOARTHRISES EN PRATIQUE CLINIQUE

6. Dépistage systématique des atteintes cardiaques dans les spondyloarthrites axiales

6.1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont des manifestations extra-articulaires des SpA. Il s'agit d'ailleurs de la principale cause de mortalité dans cette population (13-15). La prévalence de l'insuffisance cardiaque, de l'ischémie myocardique, des artériopathies périphériques et des accidents vasculaires cérébraux sont augmentés dans la SA (12). Les facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels n'expliquent qu'en partie l'augmentation du risque cardiovasculaire (16). De plus, des valvulopathies aortiques responsables d'insuffisance aortique, des aortites et des troubles de la conduction cardiaque sont rapportés dans la SA (39). L'EULAR a proposé un ensemble de variables à recueillir systématiquement au moment du diagnostic et au cours du suivi des rhumatismes inflammatoires chroniques pour prendre en charge le risque de maladie cardiovasculaire (394). Bien que le lien entre les SpA axiales et les maladies cardiovasculaires est reconnu, la prévalence des valvulopathies et de la dysfonction systolique et diastolique du ventricule gauche diffère dans la littérature. Au vu de l'augmentation du risque d'insuffisance cardiaque observé dans la SA, la question d'inclure une échocardiographie trans-thoracique dans le bilan initial des SpA pourrait se discuter. Néanmoins, la prévalence des valvulopathies et de la dysfonction systolique et diastolique du ventricule gauche chez les patients atteints de SpA axiale sans antécédents de maladie cardiovasculaire diffère dans la littérature. L'intérêt ou non du dépistage des valvulopathies et de l'insuffisance cardiaque par la réalisation d'une échographie trans-thoracique systématique n'est pas évoqué dans les recommandations européennes ou françaises (35, 36). Afin de répondre à cette question, j'ai conduit un travail de méta-analyse visant à évaluer la prévalence de la dysfonction systolique et diastolique et des valvulopathies dans la SA, sans antécédent connu de maladie cardio-vasculaire.

Ce travail a été soumis à *Joint Bone Spine* (impact factor 2020 : 4.9, rang C) et est actuellement en révision.

Dans cet article ma contribution a été de :

- Participer de manière substantielle à la conception et au design de l'étude

- Mener le travail de revue systématique de la littérature en sélectionnant les articles dans la littérature et en procédant à l'extraction des données. Ce travail a été fait en collaboration avec le Dr. Fanny Adeline comme le nécessite cette méthodologie.
- Réaliser les analyses statistiques et participer substantiellement à l'analyse des données.
- Co-écrire l'article avec le Dr. Fanny Adeline. Ce travail a été présenté pour l'obtention de sa thèse de médecine le 15/04/2021, thèse que j'ai encadrée en tant que directeur de thèse.

Nous montrons dans ce travail que :

- La prévalence des valvulopathies détectées par échocardiographie trans thoracique chez les SpA axiale sans antécédent cardiovasculaire est comparable à celle observée chez des sujets sains.
- Il existe une altération significative des paramètres d'évaluation de la fonction diastolique du ventricule gauche, suggérant une dysfonction diastolique dans la SpA axiale.
- Néanmoins, il est nécessaire d'effectuer d'autres études en utilisant une définition plus rigoureuse de la dysfonction diastolique du ventricule gauche afin de pouvoir conclure avec certitude.

6.2. Article 4 : Systematic assessment of heart valves and cardiac function by echocardiography in axial spondyloarthritis: a systematic review and meta-analysis

Systematic assessment of heart valves and cardiac function by echocardiography in axial spondyloarthritis: a systematic review and meta-analysis

Xavier Romand, MD^{a,b*}, Fanny Adeline, MD^{b*}, Mickael Dalecky, MSc^{a,b}, Arnaud Pflimlin, MD^c, Alexandre Bellier, MD^d, Gilles Barone-Rochette, MD, PhD^{e,f,g}, Daniel Wendling, MD, PhD^h, Philippe Gaudin, MD, PhD^{a,b}, Pascal Claudepierre, MD, PhDⁱ, Maxime Dougados, MD, PhD^j, Athan Baillet, MD, PhD^{a,b}.

**Authors equally contributed to this work*

a. Univ. Grenoble Alpes, T-RAIG, TIMC-IMAG, CNRS UMR 5525, Grenoble, France

b. Department of Rheumatology, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

c. Department of Rheumatology, Lille University Hospital, Lille, France

d. Quality of Care Unit, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

e. Univ. Grenoble Alpes, INSERM, U1039, RadiopharmaceutiquesBiocliniques, Grenoble, France

f. Department of Cardiology, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

g. French Alliance Clinical Trial, French Clinical Research Infrastructure Network

h. Department of Rheumatology, CHRU Besançon and Université Bourgogne Franche-Comté (EA 4266), Besançon, France

i. Department of Rheumatology, University Paris Est Créteil, Henri Mondor Hospital, Creteil, France.

j. Université de Paris, Department of Rheumatology - Hôpital Cochin, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris INSERM (U1153): Clinical epidemiology and biostatistics, PRES Sorbonne Paris-Cité. Paris, France.

Corresponding author: Xavier Romand, Department of Rheumatology, CHU Grenoble Alpes Hôpital Sud, 19 Avenue de Kimberley, 38130 Échirolles, France.

E-mail: xromand@chu-grenoble.fr

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2222-1456>

Funding statement: This work was supported by an unrestricted grant from Abbvie France (Rencontres d'Experts en Rhumatologie program). All authors, except Fanny Adeline, Alexandre Bellier and Gilles Barone-Rochette have received honoraria from Abbvie as members of the scientific committee. AbbVie did not review the content or have influence on this systematic review and meta-analysis.

Declarations of interest: none.

HIGHLIGHTS

- **Prevalence of valvular heart diseases in ax-SpA is comparable to healthy subjects.**
- **Ax-SpA have impaired TTE parameters suggestive of diastolic dysfunction.**
- **Use of stringent definition of diastolic dysfunction is needed for future research.**

ABSTRACT

Objectives: Axial Spondyloarthritis (ax-SpA) is associated with increased risk of cardiovascular disease (CVD)-specific deaths. We aimed to assess the prevalence of left ventricular (LV) systolic and diastolic dysfunction and valvular heart disease (VHD) by transthoracic echocardiography (TTE) in ax-SpA patients without history of CVD.

Methods: A systematic literature review was performed in PUBMED, Embase, Cochrane Library databases published before April 2020. We included all controlled studies assessing myocardial function and heart valve by TTE in ax-SpA without history of CVD. A meta-analysis was performed with random or fixed effects model estimating mean differences (MD) and odds ratio (OR).

Results: Literature search selected 189 abstracts and 28 articles were included (1,471 ax-SpA and 1,115 controls). ax-SpA had a statistically slight alteration of LV ejection fraction (MD=0.64%, 95%CI:0.14-1.14). ax-SpA had more frequently LV diastolic dysfunction (OR=3.43, 95%CI:1.78-6.59) and an alteration of E/A ratio (MD=0.15, 95%CI:0.08-0.21), deceleration time (MD=13.07ms, 95%CI:7.75-18.40), isovolumetric relaxation time (MD=7.90ms, 95%CI:4.50-11.30), left-ventricular end diastolic (MD=0.57mm, 95%CI:0.19-0.95) and systolic (MD=0.77mm, 95%CI:0.36-1.17) diameters. Three studies (15%) used a combination of TTE parameters to diagnose LV diastolic dysfunction. Prevalence of mitral regurgitation and aortic regurgitation were similar in ax-SpA patients and healthy individuals.

Conclusion: ax-SpA have a non-clinically relevant alteration of LV ejection fraction and similar prevalence of VHD compared to healthy individuals. LV diastolic TTE parameters are altered in ax-SpA. However, most studies do not combine set of parameters to recognize diastolic dysfunction. The clinical relevance of diastolic dysfunction observed by TTE remains to be determined in future longitudinal studies.

Keywords: spondyloarthritis, echocardiography, valvular disease, cardiac insufficiency

INTRODUCTION

Axial spondyloarthritis (ax-SpA) is a chronic inflammatory rheumatic disease that primarily affects the axial skeleton. Extra-articular manifestations (EAM), such as uveitis, inflammatory bowel disease and psoriasis, are frequently observed in ax-SpA [1, 2] and should be considered in the treatment strategy [3, 4].

Cardiovascular diseases (CVD), another EAM, are the leading cause of increased mortality in ax-SpA patients [5]. Ankylosing spondylitis patients display, respectively, a 60% and 36% enhanced risk of myocardial infarction [6] and CVD specific death compared to the general population [7]. The traditional CVD risk factors alone fail to explain the increased risk observed [8]. Increasing evidence suggests that the low-grade inflammation occurring in ax-SpA contributes to the development of endothelial dysfunction, atherosclerosis lesions and heart valve damage that can lead to myocardial dysfunction and severe valvular regurgitation requiring surgical replacement [9-12].

European League Against Rheumatism (EULAR) proposed a systematic core set of variables to be collected at the diagnosis and during the follow-up for optimal management of ax-SpA in daily practice, including an annual cardiovascular risk assessment [3, 13]. While the link between ax-SpA and CVD is recognized, the prevalence of valvular heart disease (VHD), systolic and diastolic dysfunction (DD) in ax-SpA is highly variable in the literature. The role of trans-thoracic echocardiography (TTE) to detect myocardial dysfunction and VHD in ax-SpA patients without history of CVD is not mentioned in the EULAR recommendation. An American College of Rheumatology's research group published guidelines for the management of ax-SpA excluding the assessment of myocardial and valvular function with TTE. They claimed that this exam may cause unnecessary investigations and raise anxiety for the patients. These recommendations are nevertheless based on a low level of evidence [14].

A previous systematic review and meta-analysis performed in 2014 found that ax-SpA patients have increased features of left ventricular (LV) DD [15]. Since many studies assessing myocardial function by TTE have been undertaken on a larger scale but with discordant results [16-22]. Meta-analysis is the cornerstone of medical literature, provides guidance to practitioners and requires to be updated as new data become available. We propose in this article to update the meta-analysis of Heslinga et al. [15] regarding LV DD and to assess the LV myocardial structure and the prevalence of VHD in ax-SpA.

We thus performed a systematic literature review and meta-analysis in order to assess the prevalence of systolic and diastolic LV dysfunction and VHD detected by conventional TTE in ax-SpA without history of CVD compared to healthy subjects.

MATERIALS AND METHODS

Systematic literature review process

This systematic review and meta-analysis were conducted according to Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 guidelines and the Cochrane collaboration guidelines [23, 24]. The protocol has not been published or registered. An extensive search in Pubmed, Cochrane Library and Embase databases (last accessed January 17th 2020) was performed by two investigators independently (X.R., F.A.). A complementary search was performed only in Pubmed from January 17th to April 2nd 2020 to include potential new articles published during the meta-analysis work process. ACR and EULAR annual meeting databases were screened for the years 2018 and 2019. Search strategy and participants, intervention, control and outcome (PICO) terms were presented in **Supplementary Table S1**. We systematically reviewed articles written in English or in French. No date restrictions were applied. In addition, the reference lists of relevant articles detected were hand-searched to identify additional eligible studies. Studies were selected based on their titles and abstracts and then on their full text. Duplicates were removed.

Study Selection

We included all studies that (i) were controlled (ii) were conducted to compare the TTE parameters in ax-SpA patients and controls, (iii) included patients with ax-SpA according to the New York modified criteria, axial Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS) criteria or European Spondylarthropathy Study Group (ESSG) criteria.

Studies were excluded if (i) the language was not English or French, (ii) data on TTE measurements were lacking or could not be extracted and (iii) history of CVD at baseline was not reported as an exclusion criterion.

Data extraction

Two investigators (X.R. and F.A.) individually extracted data from the included studies using a predetermined form and verified that the inclusion criteria were fulfilled. In case of disagreement, the opinion of a third reviewer was sought (A.B.) to find a consensus.

The study design, age, sex, ax-SpA classification, disease duration, disease activity according to Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), HLA-B27 prevalence, C-reactive protein level, exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs, biologic and conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs, cardiovascular risk (CVR)

factors with smoking status and body mass index, TTE methods and ultrasound settings were collected.

TTE parameters

The efficiency of the ventricular function is objectified by the LV Ejection Fraction (LVEF) which is the percentage of the final diastolic volume ejected during systole. Systolic LV dysfunction was defined as an LVEF <50% [25].

The TTE parameters commonly used to assess diastolic LV function include left ventricular end-systolic diameter (LVESD), end-diastolic diameter (LVEDD) and isovolumic relaxation time (IVRT), corresponding to the 3 phases of ventricular filling, isovolumic, early and late, respectively.

When flow across the mitral valve is assessed, two waves are characteristically seen, mitral early diastolic velocity (E), which represent passive filling of the ventricle, and late diastolic velocity (A), active filling with atrial systole. E/A ratio and mitral E deceleration time (DT) can be extracted from this analysis and evaluate LV diastolic function.

The left myocardial structure parameters are represented by left ventricular mass index (LVMI) measured in g/m², left ventricular septum thickness at end-diastole and posterior thickness and left atrial (LA) dimension.

Prevalence of systolic and DD with grades of severity, TTE parameters assessing systolic (LVEF) and diastolic (LVESD, LVEDD, IVRT, E/A, DT) LV function and LV structure (LVMI, left ventricular septum thickness, posterior thickness), LA dimension and VHD (aortic, mitral, tricuspid and pulmonary valves) with grades of severity were extracted.

Quality assessment

All studies were independently assessed for quality by two authors (X.R. and F.A.) using the Newcastle-Ottawa Scale (NOS) consisting to evaluate the selection process (0-4 points), comparability (0-2 points) and exposure (0-3 points) cases and controls. A higher score indicated a better methodologic quality. The methodological quality was based on classification into three groups of total NOS score: very high risk of bias (0 to 3 points), high risk of bias (4 to 6) and low risk of bias (7 to 9) [26].

Statistical analysis

Data extracted were analyzed using Review Manager 5.3 (Cochrane), Jamovi 1.6.23 and StatsDirect 3.3.4 softwares. The main characteristics and results of the included studies are summarized in a table. To compare TTE parameters of ax-SpA with control patients, pooled mean difference (MD) and pooled standard mean difference (SMD) with 95% confidence interval (95% CI) were calculated using the inverse of variance statistical method. In order to calculate the pooled mean difference some parameters have been converted to the same unit before statistical analysis. Pooled odds ratio (OR) was calculated to compare the prevalence of LV DD and VHD between ax-SpA and controls. Statistical heterogeneity was assessed by the Chi-square (Cochran's Q test) and the I^2 statistic. A fixed-effect analysis model was performed when I^2 values were below 25 % indicating a low heterogeneity score. In other circumstances, a random effect analysis model was applied. A p-value <0.05 was considered statistically significant. Data obtained were shown by a forest plot for each outcome studied. To facilitate the analysis of the continuous outcomes and appreciate the clinical relevance, the Ratio of Means (RoM) was employed [27]. RoM measures the relative difference between the mean value in two groups and estimates, in this meta-analysis, the relative difference between ax-SpA and controls. This information was added to the forest plot. Publication bias was assessed with funnels plot analysis, Begg's test and Egger's test. A sensitivity analysis was conducted to evaluate the robustness of the results of the meta-analysis by assessing the influence of an individual study on the overall MD and SMD or odds ratio by removing each study individually from the meta-analysis. Subgroup analyses were performed to explore heterogeneity. To that scope, studies were combined in two subgroups according to the trial design (NOS<7 and NOS≥7), published before or after 2010, blind TTE examination or not and characteristics of the patients (mean age of included patients below or above 40 years). Heterogeneity between the subgroups was tested using a chi-square test. A p-value<0.1 was considered statistically significant for heterogeneity analysis.

RESULTS

Literature search results and study characteristics

A total of 189 abstracts were identified in databases and 4 additional records were identified through hand search. A total of 28 studies involving 1,471 patients and 1,115 controls were included in the meta-analysis (**Figure 1**). The inter-observer agreement on article selection was high ($k=0.960$ (95% CI 0.91-1.00)) and the disagreement between X.R. and F.A. was resolved after discussion to obtain a consensus. The consultation of a third reviewer (A.B.) was not necessary.

The mean age in the studies ranged from 26.7 to 55.7 years. Ax-SpA was defined according to the modified New York criteria (26/28 studies, 1,357 ax-SpA and 1,019 controls) or the ASAS criteria (2/28 studies, 114 ax-SpA and 96 controls). The mean disease duration ranged from 3.2 to 32.9 years, HLA B27 positivity from 51 to 100% and BASDAI from 1.24 to 5.6 (**Table 1**). A total of 10 studies presented a low risk of bias, 18 a high risk and none a very high risk (**Table 1**).

LV and LA structure

LVMI was reported in 8 controlled studies (379 ax-SpA, 290 controls), septum and posterior thickness of LV at end-diastole in, respectively, 9 (608 ax-SpA, 489 controls) and 10 (634 ax-SpA, 515 controls) articles. No significant difference in septum and posterior thickness of LV at end-diastole, nor LVMI was observed between ax-SpA patients and controls (**Figure 2 A, B, C**).

LA dimension was reported in 10 controlled studies (491 ax-SpA, 366 controls) and was significantly increased in ax-SpA patients compared to healthy subject (MD=1.27 mm, 95% CI: 0.03-2.50, SMD=0.35, 95% CI: 0.01-0.68, $p=0.04$; RoM=0.04, 95% CI: 0.001-0.070, $p=0.04$; $I^2=85\%$). (**Figure 2 D**)

Systolic LV function

LVEF was reported in 22 controlled studies (1,251 ax-SpA, 947 controls), with a decrease in ax-SpA (MD=0.64%, 95% CI: 0.14-1.14, $p=0.01$; SMD=0.16, 95% CI: 0.04-0.29, $p=0.01$, RoM=0.01, 95% CI: 0.00-0.02, $p<0.001$, $I^2=51\%$). (**Figure 3A**)

Diastolic LV function

LVEDD and LVESD was reported, respectively, in 15 (911 ax-SpA, 674 controls) and 11 (583 ax-SpA, 423 controls) controlled studies with a significant increase (LVEDD: MD=0.57 mm, 95% CI : 0.19-0.95, p=0.003, SMD=0.13, 95% CI : 0.03-0.23, p=0.01, RoM=0.01, 95% CI: 0.004-0.020, p=0.003, I²=0% and LVESD : MD=0.77 mm, 95% CI : 0.36-1.17, p<0.001, SMD=0.21, 95% CI 0.08-0.34, p=0.002, RoM=0.03, 95% CI 0.01-0.04, p<0.001, I²=0%) in ax-SpA patients compared to healthy subject respectively. **(Figure 3B-C)**

E/A ratio was reported in 18 controlled studies (1,013 ax-SpA, 768 controls). On average, a worse E/A ratio was found in ax-SpA patients (MD=0.15, CI 95%: 0.08-0.21, p<0.0001, SMD=0.49, 95% CI: 0.29-0.69, p<0.0001, RoM=0.11, 95% CI: 0.07-0.16, p<0.001, I²=81%). **(Figure 3D)**

A total of 14 controlled studies (692 ax-SpA, 531 controls) found a longer DT in ax-SpA group (MD=13.07 ms, 95% CI: 7.75-18.40, p<0.0001, SMD=0.45, 95% CI: 0.27-0.64, p<0.0001, RoM=0.07, 95% CI: 0.04-0.10, p<0.001, I²=66%). **(Figure 3E)**

Finally, 11 controlled studies (497 ax-SpA, 414 controls) reported a significant increase of IVRT in ax-SpA group (MD=7.90 ms, 95% CI 4.50-11.30, p<0.0001, SMD=0.69, 95% CI 0.34-1.04, p<0.001, RoM=0.09, 95% CI 0.05-0.13, p<0.001, I²=79%) **(Figure 3F)**.

Total prevalence of LV DD was reported in 4 (20%) controlled-studies [19, 28-30] (183 ax-SpA, 140 controls) among 20 controlled-studies (1,093 ax-SpA, 823 controls) reporting at least one parameter of LV diastolic function (E/A ratio, IVRT, DT). 3 studies [28-30] used a combination of LV diastolic function parameters to diagnose LV DD whereas 1 study [19] did not precise clearly the diastolic LV dysfunction used. The pooled prevalence of LV DD by tissue doppler imaging was 16.6% (CI 95%: 8.5-24.8, p<0.001, I²=57.9%) in ax-SpA **(Figure 4A)**. Ax-SpA had more frequently LV DD than controls (OR=3.43, 95%CI: 1.78-6.59, p<0.001, I²=0%) **(Figure 4B)** even if we excluded Inci et al. study which did not precisely describe the definition of LV DD used (OR=3.54, 95%CI: 1.67-7.51, p<0.001, I²=0%). Few studies described the grade of LV DD. Acar et al. reported eleven grade I and one grade II LV DD in ax-SpA and Okan et al. six grade I and sixteen grade II.

Valvular heart disease

12 controlled studies (745 ax-SpA and 453 controls) and 10 controlled studies (616 ax-SpA and 403 controls) reported, respectively, the prevalence of aortic regurgitation (AR) and mitral regurgitation (MR) in ax-SpA patients without history of CVD.

The prevalence of AR ranges from 0 to 26%, and MR from 0 to 45%. The random-effect pooled prevalence of AR was 4.0% (95% CI 1.7-6.3, $p < 0.001$, $I^2 = 75\%$) and 9.8% (95% CI 3.8-15.8, $p = 0.001$, $I^2 = 94\%$) (**Figure 5 A, B**). The high heterogeneity resulted from the Mitbo et al. and Ozkaramanli et al. studies. After removal of these two studies, prevalence of AR was 1.4% (95% CI 0.4-2.4, $p = 0.007$, $I^2 = 0\%$) and was 1.9% (95% CI 0.6-3.2, $p = 0.005$, $I^2 = 0\%$) for MR. The prevalence of AR (OR=1.18, 95%CI: 0.68-2.04, $p = 0.55$, $I^2 = 0\%$) and MR (OR=1.09, 95%CI: 0.73-1.63, $p = 0.68$, $I^2 = 0\%$) were not different in ax-SpA and controls (**Figure 5 C, D**). The large majority of VHD observed was mild (grade I). Severe grade valve disease was rare. (**Supplementary Table S2**). No controlled study included evaluated pulmonary and tricuspid VHD.

Heterogeneity exploration and publication bias

A statistically significant subgroup effect was observed with the covariate publication date for DT and LA size and with the covariate study quality for E/A ratio and AR (**Supplementary Table S3**). Subgroup analyses were not possible to evaluate additional patients' characteristics as smoker status, body mass index and disease characteristics (activity, duration) due to data unavailability for the considered articles. A sensitivity analysis was conducted to evaluate the robustness of the results of the meta-analysis by assessing the influence of an individual study on the overall MD and SMD or odds ratio by removing each study individually from the meta-analysis. The sensitivity analysis showed that the overall effect was not significantly changed after the withdrawal of any of the studies for each parameter studied except for LA dimension (**Supplementary Table S4**). Begg's test and Egger's test reach statistical significance for LVESD and E/A ratio indicating a possible publication bias for these parameters (**Supplementary Figure S1**).

DISCUSSION

This systematic review and meta-analysis showed that ax-SpA patients without history of CVD displayed a slight alteration of LV systolic and diastolic parameters on TTE compared to healthy subjects. The prevalence of aortic or mitral regurgitation diagnosed with TTE was not increased in ax-SpA. The severity of VHD was mild.

The prevalence of LV DD on TTE, estimated at 16.4% in our meta-analysis, is increased in ax-SpA. The development of LV DD in ax-SpA could be explained by the deleterious effect of inflammatory cytokines known to induce endothelial dysfunction and myocardial remodeling in animal models [31, 32]. Subclinical myocardial inflammation and fibrosis are highlighted on cardiac magnetic resonance imaging (MRI) in ax-SpA and seem to be reduced under anti-TNF therapy [33-35]. The progression of LV DD is an independent predictor of heart failure and mortality (52, 53). It has been shown that grade I, even asymptomatic, was associated with a 5-fold higher 3-year to 5-year mortality in comparison with subjects with normal diastolic function (54). It is therefore recommended to follow up in any patient with DD of any degree, to avoid the development of atrial fibrillation or heart failure (55). The preclinical LV DD could explain a part of the increased mortality risk observed in ax-SpA compared to the general population (55).

Nevertheless, the LV DD defined by TTE in the general population is not rare and increased with age [36]. Only a quarter of studies included evaluated this outcome and among them only some studies combined a set of parameters according to American or European guidelines. To improve the implementation in clinical practice, the definition of LV DD by TTE has been revised in 2016 by the American Society of Echocardiography and European Association of Echocardiography (ASE/EACVI) [37]. This updated diagnostic algorithm is more accurate, has superior inter-observer reliability, better predicts major adverse cardiac events than 2009 ASE/EACVI criteria [38]. The application of the 2016 ASE/EACVI criteria results in a decrease in the prevalence of LV DD observed in the general population [39]. No recent studies included in this meta-analysis used this actualized definition of LV DD.

The prevalence of valvular abnormalities on TTE was not significantly increased in ax-SpA patients in our meta-analysis. The global prevalence detected by conventional TTE is 4.0% for AR and 9.8% for MR in ax-SpA patients without history of cardiovascular diseases. The prevalence of VHD is highly variable between studies possibly due to the VHD definition used, some authors may consider trace of AR or MR as a VHD and others not. Transesophageal echocardiography found a higher prevalence of AR (16%) and MR (32%) in a study conducted

in 1998 on forty-four AS patients suggesting an underestimation of VHD by TTE [12]. Nevertheless, in this study, 9% of patients had known to have VHD or heart murmur and 7% a valve surgery whereas we included in this meta-analysis ax-SpA without history of cardiovascular diseases [12]. Similar to enthesitis, aortic root, aortic and mitral valve cups are subject to mechanical stress and are infiltrated by γ/δ T cells producing IL-17 accumulated in an IL-23 dependent manner promoting local inflammation, fibrosis lesion ultimately leading to valvular regurgitation [40, 41]. The progress in ax-SpA management with tight control of inflammation by biologic disease-modifying antirheumatic drugs may have reduced the occurrence of valve lesions. The subgroup analysis does not allow us to conclude if the prevalence of VHD is influenced by biotherapy and possibly better management of associated comorbidities because only two controlled studies were conducted before the era of biotherapies (2000's). Another hypothesis is that we selected articles that included patients without a history of CVD, which may have underestimated the prevalence of VHD. Nevertheless, this choice is in accordance with the objective of this study, which aimed to evaluate the relevance of including a systematic TTE in a screening program for comorbidities in patients with ax-SpA [3].

Despite this meta-analysis shows altered parameters in ax-SpA without history of CVD the clinical relevance of such data remains unclear. Despite the standardization of cardiac chamber quantification [42] and heart valve function [43], the reproducibility of TTE is limited ranging from 6-7% for LVEF and 11% for LV end-diastolic volume [44, 45]. In this meta-analysis, the average score on LA size, LVEDD, LVESD for ax-SpA were 3.5%, 1.2% and 2.7% higher and 1.0% lower for LVEF than healthy controls. The magnitude of variation for these parameters does not seem to us clinically relevant because could be explained by TTE measurement imprecision contrary to results observed for E/A ratio, DT and IVRT parameters indicating LV DD in ax-SpA.

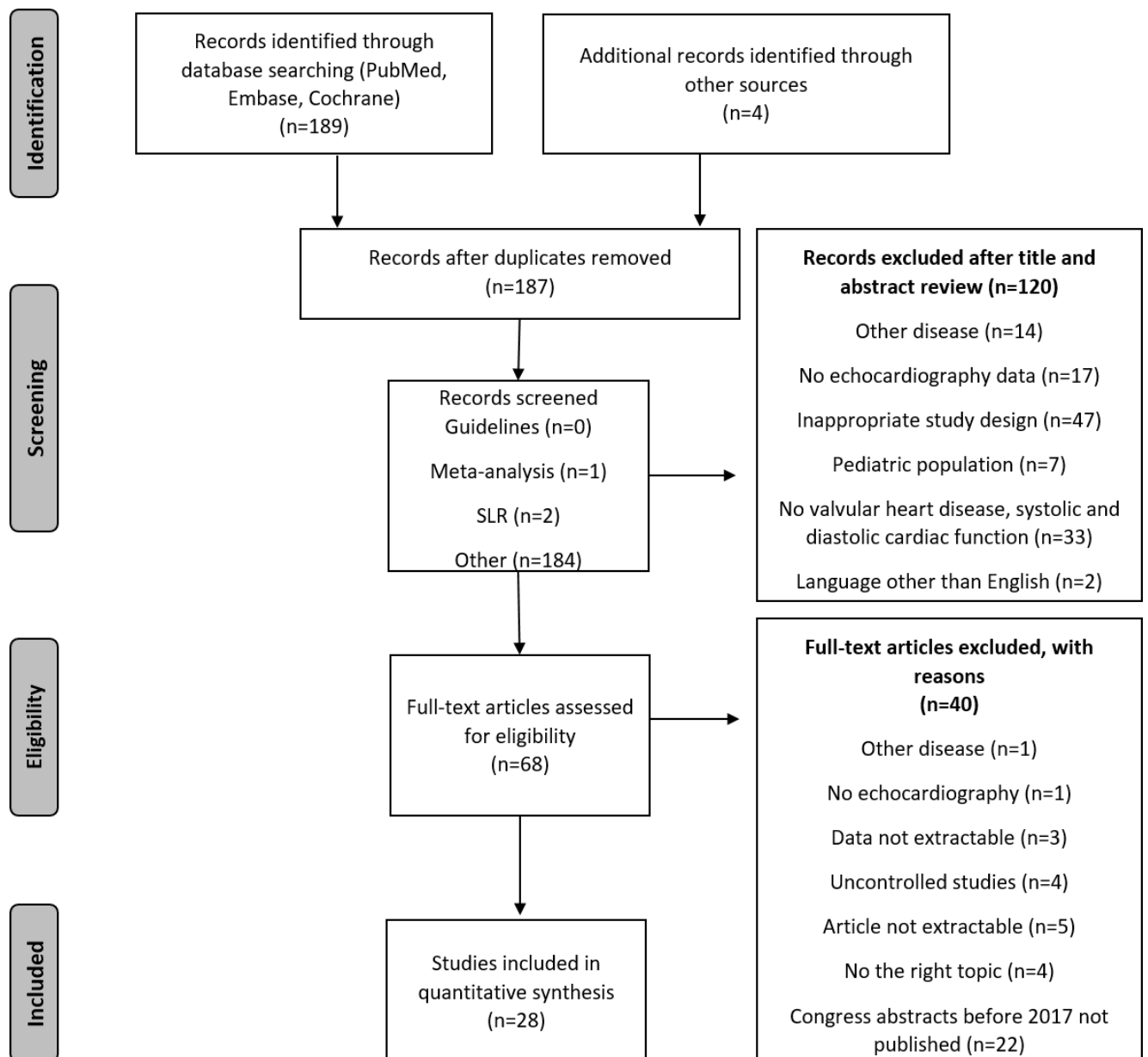
Our studies have some limitations. We decided to include only controlled studies to improve the homogeneity of studies. The heterogeneity between studies was nevertheless high but due to the lack of baseline characteristics of ax-SpA in many articles we cannot identify potential confounding factors such as disease activity, ax-SpA disease duration and CVR factors. We take into account the heterogeneity by applying a random-effect model to minimize its impact on the meta-analysis results. The majority of studies analyzed included a limited number of ax-SpA patients and two-thirds were at high risk of bias according to NOS scale even if sub-group analyses do not change largely the meta-analysis outcomes. However, we aimed at determining whether ax-SpA patients should be systematically screened for VHD and systolic or DD with

TTE. Another important point concerns the increasingly important sensitivity of new devices and new techniques, which make it possible to detect minimal anomalies without clinical consequences. Diastolic function is defined according to a set of parameters according to ASE/EAE guidelines [37]. A single diastolic parameter on TTE is therefore not sufficient to define a reliably LV DD. The lack of data in the majority of included articles could not permit us to use a stringent definition of LV DD for all studies included.

CONCLUSIONS

In conclusion, the prevalence of VHD detected by TTE is not increased in ax-SpA patients compared to healthy subjects. On the other hand, an alteration of the LV diastolic parameters indicating a potential preclinical DD in ax-SpA without history of CVD is observed. Other studies using a stringent and actualized definition of LV DD and assessing the clinical relevance are necessary before recommending a systematic TTE screening in all ax-SpA without history of CVD.

Figure 1. Flow chart



| Author, year (ref.) | Study design | Ax-SpA mNY+ (n) | Ctrl (n) | Ax-SpA age (years (SD)) | Ctrl age (years (SD)) | Disease duration (years (SD)) | BASDAI in ax-SpA | Blind TTE | Exclusion criteria: CVD/CV risk factor | Quality score (NOS) |
|-------------------------------------|--|-----------------|----------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------|-----------|--|---------------------|
| Kucuk et al. 2018 [46] | M Prospective case-control | 30 | 30 | 41.0 (9.2) | 37.5 (10.7) | 8.53 (NA) | 3.32 (2.5) | Yes | Yes/Yes | 3/0/2 |
| Ozkarama nli Gur D et al. 2018 [47] | M Prospective case-control | 75 | 30 | 41.7 (10.1) | 38.5 (9.9) | 5 [1-37]** | 3.3 (2.2) | Yes | Yes/Yes | 2/2/2 |
| Ozen S et al. 2018 [48] | Cross-sectional Prospective case-control | 55 | 20 | 43.3 (7.9) | 44.6 (8.1) | 16.7* (7.16) | 2.73 (2.02) | NA | Yes/Yes | 3/1/2 |
| Midtbø H et al. 2018 [20] | Cross-sectional cohort study | 139 | 26 | 49.1 (11.7) | 52.1 (11.4) | 23.3 (11) | 3.5 (1.8) | NA | Yes/No | 4/2/2 |
| Inci U et al. 2017 [19] | Case-control | 60 | 40 | 32.2 (7.8) | 30.0 (7.3) | 8.3 (6.2) | 2.88 (2.03) | NA | Yes/Yes | 2/2/2 |
| Ustun N et al. 2014 [22] | Cross-sectional Case-control study | 26 | 26 | 43.7 (11.8) | 42.5 (9.5) | 11.83 (10.98) | 4.1 (2.0) | Yes | Yes/Yes | 3/2/2 |
| Chen Y et al. 2014 [16] | Case-control study | 104 | 50 | 45.5 (13.3) | 43.8 (10.8) | 15 (10.1)* | 3.8 (1.6) | NA | Yes/No | 4/2/2 |
| Ercan S et al. 2013 [49] | Case-control study | 66 | 21 | 30.9 (6.0) | 27.1 (4.0) | 4.99 (4.18) | NA | NA | Yes/Yes | 3/2/2 |
| Kırış A et al. 2012 [50] | Case-control study | 77 | 40 | 36.4 (10.0) | 39.1 (8.2) | 7.6 (4.4) | 2.8 (0.9) | NA | Yes/Yes | 2/0/2 |
| Kaya EB et al. 2010 [51] | Case-control study | 28 | 30 | 28.7 (5.7) | 29.3 (5.8) | NA | 1.87 (0.8) | NA | Yes/Yes | 2/2/2 |
| Gunes Y et al. 2009 [29] | Case-control study | 35 | 25 | 33.5 (9.4) | 36.9 (10.4) | 7.55 (5.83) | NA | Yes | Yes/Yes | 2/2/2 |
| Acar G et al. 2009 [28] | Case-control study | 40 | 42 | 37.82 (10.22) | 35.74 (9.98) | 5.79 (5.32) | 2.02 (1.44) | Yes | Yes/Yes | 3/1/2 |
| Moyssakis I et al. 2009 [52] | Case-control study | 57 | 78 | 41.78 (10.02) | 39.92 (9.11) | 14.77 (10.07) | 1.24 (1.13) | NA | Yes/Yes | 2/0/2 |
| Okan T et al. 2008 [30] | Case-control study | 49 | 33 | 38.0 (11.00) | 36.0 (9.0) | 12.4 (9.2) | 3.5 (2.0) | Yes | Yes/Yes | 3/2/2 |
| Caliskan M et al. 2008 [53] | Case control study | 40 | 35 | 38.9 (10.2) | 37.5 (6.4) | 6.05 (4.96) | NA | Yes | Yes/Yes | 2/2/2 |
| Yildirim A et al. 2002 [54] | Case-control study | 88 | 31 | 33.0 (11.0) | 33.0 (9.0) | 5.58* (5.83) | NA | Yes | Yes/Yes | 3/2/2 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|----|----|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-----|---------|-------|
| Crowley J. 1993 [55] | Case-control study | 59 | 44 | 42 (10) | 42 (8) | 17 (9) | NA | NA | Yes/Yes | 3/2/2 |
| Sun JP et al. 1992 [56] | Case-control study | 20 | 25 | 45 (11) | 44 (11) | NA | NA | Yes | Yes/No | 2/2/2 |
| O'Neill et al. 1992 [57] | Case-control study | 24 | 24 | 40.7 (NA) | 43.4 (NA) | 17 (NA) | NA | Yes | Yes/Yes | 3/2/2 |
| Gould A et al. 1992 [58] | Case-control study | 21 | 24 | NA | | NA | NA | NA | Yes/No | 2/0/2 |
| Brewerton et al. 1987 [59] | Case-control study | 30 | 30 | NA | | NA | NA | NA | Yes/No | 2/1/2 |
| Emren SV et al. 2020 [17] | a cross-sectional case control study | 72 | 56 | 39.2 (9.6) | 41 (7.2) | 13 (8.1) | 2.8 (2.2) | Yes | Yes/Yes | 3/2/2 |
| Kuloglu O et al. 2012 [60] | Case-control study | 30 | 30 | 37.2 (10.23) | 33.2 (8.12) | NA | NA | Yes | Yes/Yes | 2/0/2 |
| Park SH et al. 2012 [61] | Case-control study | 50 | 25 | 26.7 (4.8) | 27 (2.5) | 4.2 (2.8) | 2.5 (1.8) | Yes | Yes/No | 3/1/2 |
| Büyükterzi Z. et al. 2019 [62] | Cas-control study | 50 | 50 | 39.0 [35.0-45.0]** | 40.0 [34.0-46.0]** | NA | NA | NA | Yes/Yes | 3/2/2 |
| Çağlar S.O. et al. 2016 [18] | Case-control study | 42 | 40 | 39.3 (8.5) | 37.2 (8.7) | NA | NA | Yes | Yes/Yes | 3/0/2 |
| Zungur M. et al. 2018 [63] | Case-control study | 64 | 70 | 55.7 (9.2) | 54.9 (8.5) | 7.1 (2.6) | | NA | Yes/Yes | 3/1/2 |
| Turkmen S. et al. 2020 [21] | A cross-sectional case control study | 40 | 40 | 32,1 (5,5) | 31.2 (3,9) | NA | NA | Yes | Yes/Yes | 3/0/2 |

Table 1: Characteristics of the studies included

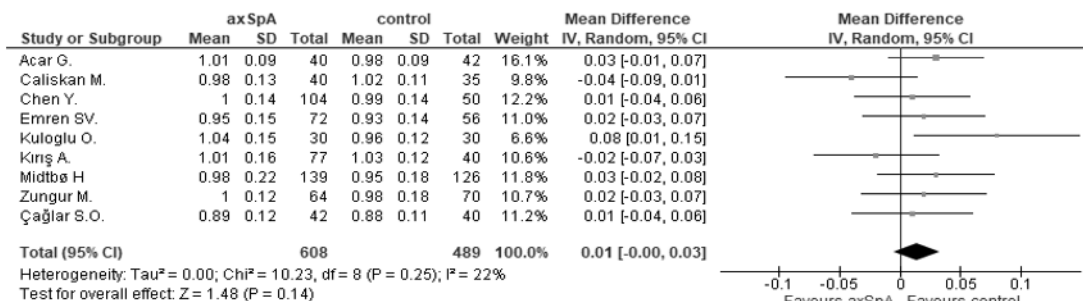
NA: not available, SD: standard deviation, Ctrl: control, ax-SpA: axial spondyloarthritis, mNY+: modified New York criteria, ASAS: Axial Assessment of SpondyloArthritis International Society criteria, CVD: cardiovascular disease, CV: cardiovascular, DD: diastolic dysfunction, TTE: transthoracic echocardiography, BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, NOS: Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale, DT: deceleration time, LVEF : left ventricular ejection fraction, LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter, LVESD: left ventricular end-systolic diameter, LVMI: left ventricular mass index, IVRT: isovolumetric relaxation time, LAD: left atrial diameter, LAVI: left atrial volume index, ASE: American Society of Echocardiography

* *Symptoms duration*, ** *Median*

Figure 2. Left ventricular and atrial structure.

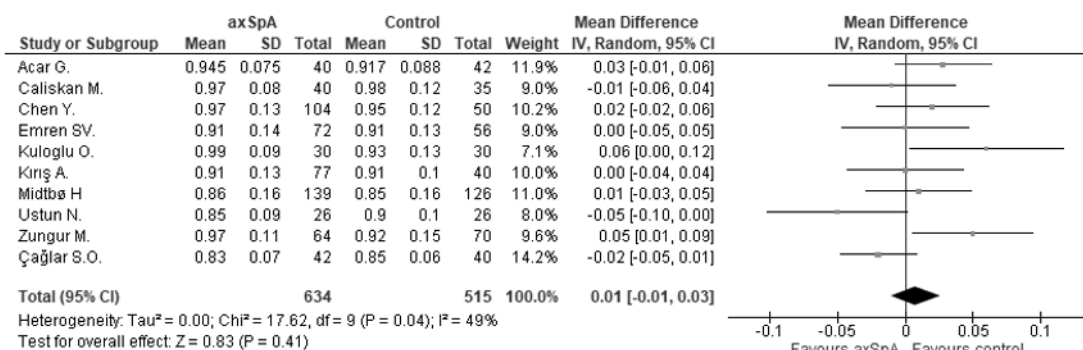
LV: Left ventricular, LVMI: Left ventricular mass index, LA: Left atrial, RoM: Ratio of mean, axSpA: axial spondyloarthritis

A. LV septum (cm)



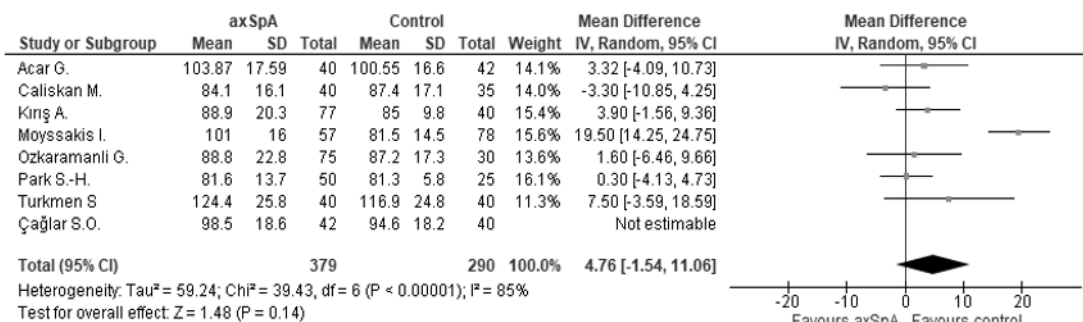
RoM=1.5% (-0.5-3.4)

B. LV posterior (cm)



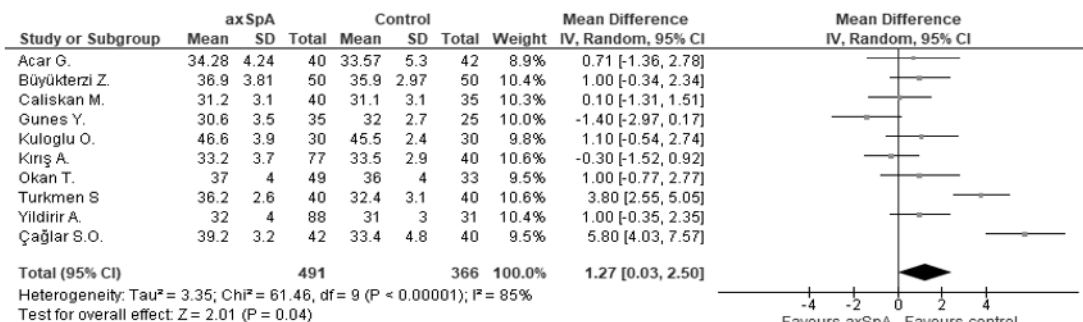
RoM=1.0% (-1.2-2.9)

C. LVMI (g/m²)



RoM=4.9% (-1.1-11.0)

D. LA dimension (mm)



RoM=3.5% (0.1-7.0)

Figure 3. Left ventricular systolic and diastolic function.

LVEF: Left ventricular ejection fraction, RoM: Ratio of means, axSpA: axial spondyloarthritis, LVEDD: Left ventricular end-diastolic diameter, LVESD: Left ventricular end-systolic diameter, DT: Deceleration time, IVRT: Isovolumetric relaxation time

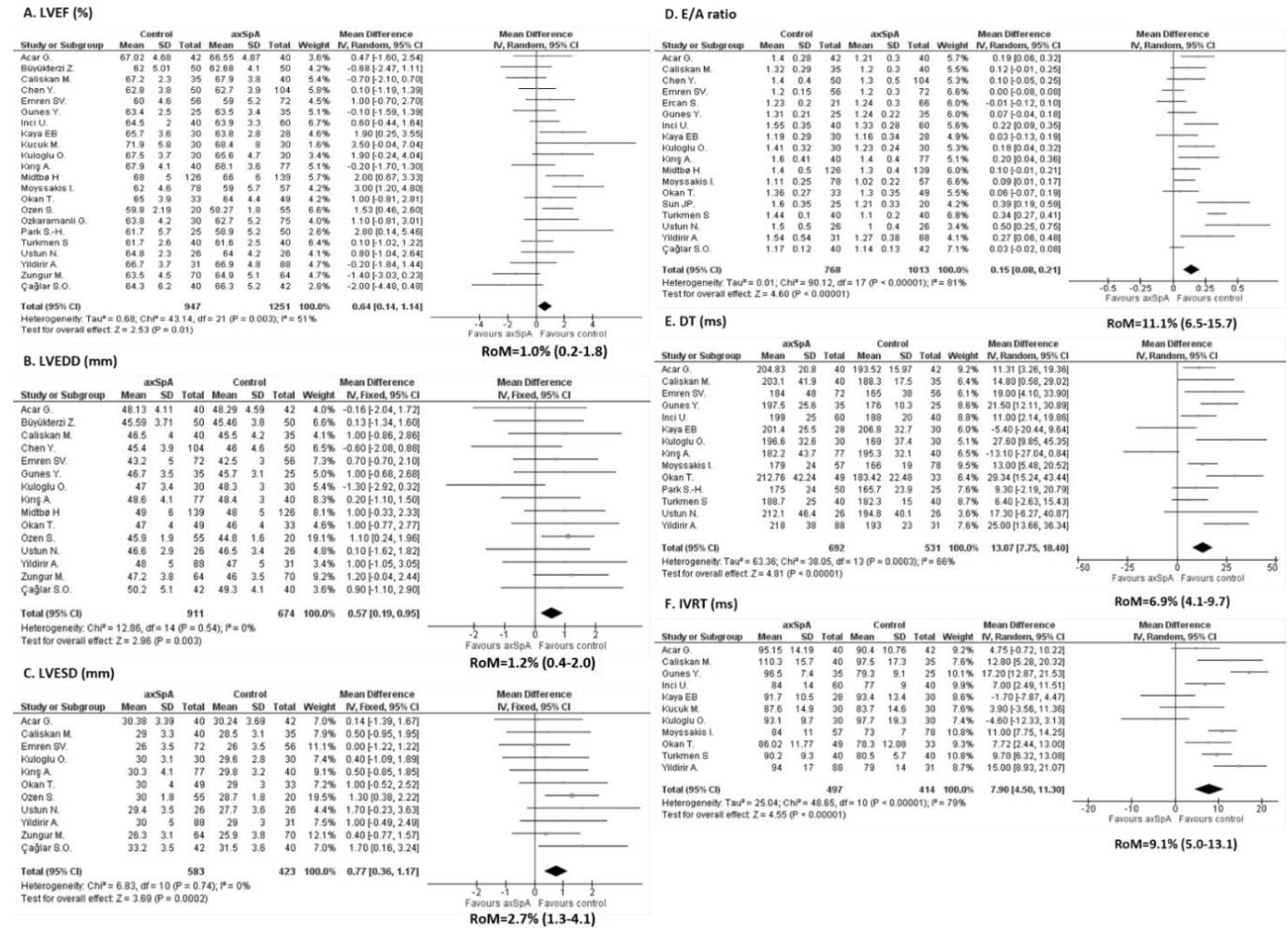
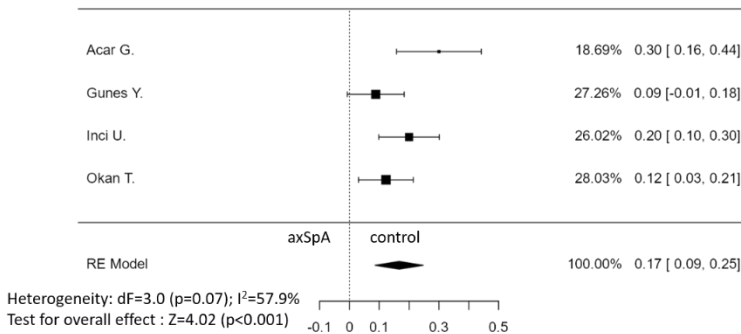


Figure 4. Left ventricular diastolic dysfunction in ax-SpA

LV: left ventricular, DD: diastolic dysfunction, axSpA: axial spondyloarthritis

A. LV DD pooled prevalence



B. LV DD axSpA vs. control

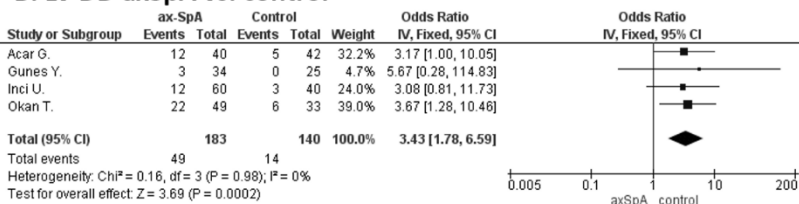
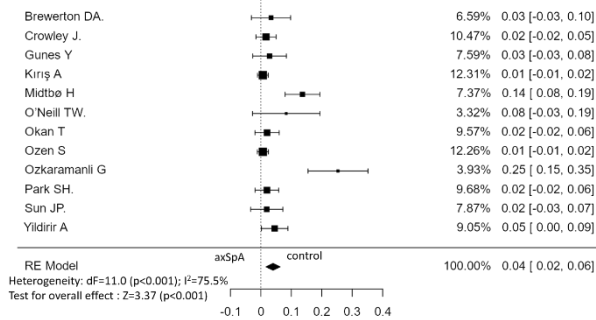


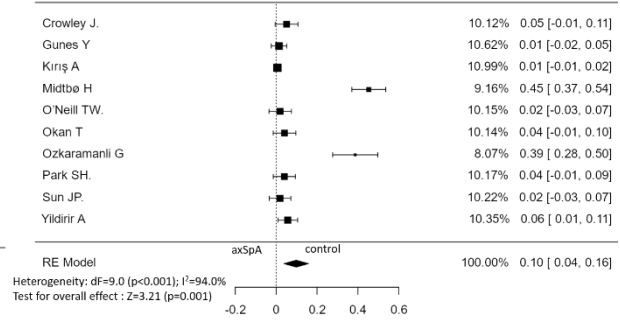
Figure 5. Aortic and mitral regurgitation prevalence

AR: aortic regurgitation, MR: mitral regurgitation, ax-SpA: axial spondyloarthritis

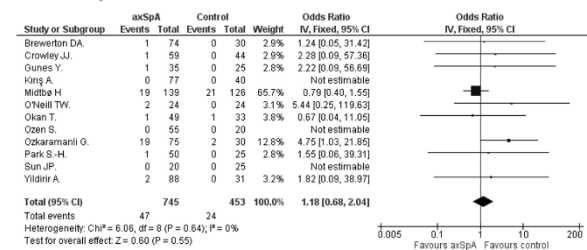
A. AR pooled prevalence



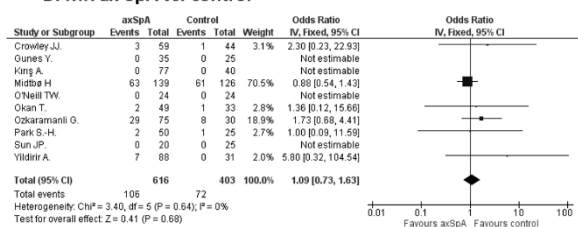
B. MR pooled prevalence



C. AR ax-SpA vs. control



D. MR ax-SpA vs. control



| Search strategy | Key words |
|-----------------|--------------------------------|
| 1 | axial [TIAB] |
| 2 | spondyla*[TIAB] |
| 3 | spondyloa*[TIAB] |
| 4 | 2 or 3 |
| 5 | 1 and 4 |
| 6 | Spondylitis, ankylosing"[Mesh] |
| 7 | ankylosing spondylitis [TIAB] |
| 8 | 5 or 6 or 7 |
| 9 | echocardiograph*[TIAB] |
| 10 | cardiograph*[TIAB] |
| 11 | Echocardiography [Mesh] |
| 12 | 9 or 10 or 11 |
| 13 | english[lang] |
| 14 | french[lang]) |
| 15 | 13 or 14 |
| 16 | 8 and 12 and 15 |

| PICO strategy | Patient | Intervention | Comparison | Outcomes |
|---------------|---|--------------|------------------|---|
| | Axial spondyloarthritis according to modified Ney York or ASAS or ESSG criteria | TTE | Healthy subjects | <ul style="list-style-type: none"> ✓ LV systolic dysfunction, LVEF ✓ LV diastolic dysfunction, LVESD, LVEDD, IVRT, E/A, DT ✓ LV structure: LVMI, LV septum thickness, LV posterior thickness, LA dimension ✓ Aortic, mitral, tricuspid and pulmonary valvular regurgitation |

Supplementary Table S1. PICO and search strategy

ASAS: Assessment of SpondyloArthritis International Society, ESSG: European Spondylarthropathy Study Group, LV: Left ventricular, TTE: Transthoracic echocardiography, parameters, LVEF: LV ejection fraction, LVESD: left ventricular end-systolic diameter, LVEDD: end-diastolic diameter, IVRT: isovolumic relaxation time, DT: deceleration time, LVMI: left ventricular mass index, LA: left atrial.

Supplementary Table S2. Aortic and mitral regurgitations prevalence and severity in axial spondyloarthritis

NA: not available, NS: no significant, Ctrl: control, ax-SpA: axial spondyloarthritis, mNY+: modified New York criteria, AR: aortic regurgitation, MR: mitral regurgitation

* Comparison with corresponding results from the literature in the normal population

| Author, year (ref.) | Subject Ax-SpA mNY+ (n) | Subject ctrl (n) | Severity | AR ax-SpA (n; %) | AR ctrl (n, %) | p-value | MR ax-SpA (n, %) | MR ctrl (n, %) | p-value |
|------------------------------------|-------------------------|------------------|--|------------------|----------------|---------|------------------|----------------|---------|
| Ozkaramanli Gur D et al. 2018 (59) | 75 | 30 | AR and MR grade I | 19 (26) | 2 (7) | 0.03 | 29 (38.7) | 8 (26.6) | 0.17 |
| Ozen S et al. 2018 (60) | 55 | 20 | Not applicable | 0 (0) | 0 (0) | NA | NA | NA | NA |
| Midtbø H et al. 2018 (20) | 139 | 126 | No difference between the groups, and no grade III Any AR ax-SpA 19 (14) vs. 21 (17) p=0.50 Any MR ax-SpA 63 (45) vs. 61 (48) p=0.62 | 19 (14) | 21 (17) | 0.50 | 63 (45) | 61 (48) | 0.62 |
| Kırıř A et al. 2012 (62) | 77 | 40 | No valvular disease except for minimal MR and AR | 0 (0) | 0 (0) | NA | 0 (0) | 0 (0) | NA |
| Gunes Y et al. 2009 (29) | 35 | 25 | One patient with grade I aortic stenosis and grade II AR | 1 (2.9) | 0 (0) | NA | 0 (0) | 0 (0) | NA |
| Okan T et al. 2007 (30) | 49 | 33 | Grade I MR and AR | 1 (2.0) | 1 (3.0) | NA | 2 (4.1) | 1 (3.0) | NA |
| Yildirir A et al. 2002 (65) | 88 | 31 | MR: only grade I AR: grade I (2), II (2), III (0) | 4 (4.6) | 0 (0) | P<0.05 | 5 (5.7) | 0 (0) | P<0.05 |
| Crowley J. et al. 1993 (66) | 59 | 44 | MR: only grade I AR: only grade I | 1 (1.7) | 0 (0) | NA | 3 (5.1) | 1 (2.3) | NA |
| Sun JP et al. 1992 (67) | 20 | 25 | Not applicable | 0 (0) | 0 (0) | NA | 0 (0) | 0 (0) | NA |
| O'Neill et al. 1992 (68) | 24 | 24 | NA | 2 (8.3) | 0 (0) | NA | 0 (0) | 0 (0) | NA |
| Brewerton et al. 1987 (70) | 30 | 30 | AR : grade I (1), II (0), 3 (0) | 1 (3.3) | 0 (0) | NA | NA | NA | NA |
| Park SH et al. 2012 (72) | 50 | 25 | NA | 1 (2) | 0 (0) | NS | 2 (4) | 1 (4) | NS |

Supplementary Table S3. Subgroup analysis to investigate source of heterogeneity

TTE: Trans-Thoracic Echocardiography, NE: Not Estimable, CI: Confidence Interval, SMD: Standard Mean Difference, LV: Left Ventricular, LVEDD: Left ventricle end-diastolic diameter, LVESD: Left ventricle end-systolic diameter, LVMI: Left ventricular mass index, LA: Left atrial, LVEF: Left ventricular ejection fraction, DT: Deceleration time, IVRT: Isovolumetric relaxation time

| TTE parameters | Statistical analysis | Age | | TTE | | Quality Study | | Publication date | |
|----------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | <40 years | ≥40 years | TTE Blind | No TTE Blind | High risk of bias | Low risk of bias | Before 2010 | After 2010 |
| LVEDD | SMD (95% CI) | 0.11 (-0.03, 0.24) | 0.17 (0.01, 0.32) | 0.12 (-0.03, 0.27) | 0.14 (0.00, 0.27) | 0.15 [0.01, 0.30] | 0.11 [-0.03, 0.25] | 0.18 (-0.02, 0.38) | 0.12 (0.00, 0.23) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 0 0.85 | 43 | 0 | 21 | 0 | 19 | 0 | 23 |
| LVESD | SMD (95% CI) | 0.17 (0.02, 0.31) | 0.33 (0.08, 0.58) | 0.20 (0.04, 0.35) | 0.23 (0.01, 0.46) | 0.22 [0.06, 0.38] | 0.19 [-0.02, 0.40] | 0.17 (-0.05, 0.39) | 0.23 (0.07, 0.39) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 0 0.55 | 48 | 0 | 50 | 2 | 0 | 0 | 22 |
| LV septum | SMD (95% CI) | 0.10 (-0.14, 0.33) | 0.12 (-0.05, 0.29) | 0.15 (-0.12, 0.42) | 0.08 (-0.07, 0.24) | 0.10 [-0.14, 0.33] | 0.13 [-0.05, 0.30] | 0.01 (-0.64, 0.65) | 0.12 (-0.01, 0.25) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 46 0.98 | 0 | 47 | 0 | 15 | 0 | 76 | 0 |
| LV posterior | SMD (95% CI) | 0.06 (-0.16, 0.28) | 0.08 (-0.20, 0.35) | 0.00 (-0.29, 0.28) | 0.14 (-0.02, 0.29) | 0.14 [-0.11, 0.39] | 0.00 [-0.21, 0.21] | 0.12 (-0.30, 0.06) | 0.06 (-0.13, 0.18) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 38 0.99 | 60 | 58 | 0 | 52 | 32 | 46 | 49 |
| LVMI | SMD (95% CI) | 0.14 (-0.04, 0.31) | 0.68 (-0.50, 1.86) | 0.11 (-0.08, 0.29) | 0.75 (-0.29, 1.79) | NE | NE | 0.43 (-0.47, 1.33) | 0.17 (0.05, 0.50) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 0 0.54 | 94 | 0 | 93 | NE | NE | 93 | 0 |
| LA size | SMD (95% CI) | 0.35 (0.01, 0.68) | NE | 0.41 (0.00, 0.83) | 0.10 (-0.27, 0.47) | 0.39 [-0.12, 0.89] | 0.27 [0.03, 0.51] | 0.08 (-0.15, 0.31) | 0.64 (0.06, 1.23) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 82 1.00 | NE | 84 | 45 | 88 | 0 | 23 | 88 |
| LVEF | SMD (95% CI) | 0.09 (-0.05, 0.22) | 0.28 (0.05, 0.52) | 0.13 (-0.01, 0.27) | 0.21 (-0.02, 0.43) | 0.19 [0.00, 0.37] | 0.15 [0.01, 0.30] | 0.10 (-0.12, 0.32) | 0.18 (0.03, 0.33) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 25 0.35 | 66 | 17 | 70 | 60 | 11 | 45 | 53 |
| E/A | SMD (95% CI) | 0.48 (0.22, 0.75) | 0.51 (0.19, 0.83) | 0.65 (0.32, 0.98) | 0.30 (0.14, 0.46) | 0.63 [0.34, 0.92] | 0.29 [0.06, 0.52] | 0.49 (0.29, 0.68) | 0.50 (0.35, 0.63) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 77 0.99 | 70 | 81 | 24 | 76 | 59 | 20 | 83 |
| DT | SMD (95% CI) | 0.45 (0.23, 0.66) | 0.55 (0.25, 0.84) | 0.57 (0.43, 0.71) | 0.16 (-0.32, 0.63) | 0.40 [0.15, 0.65] | 0.58 [0.37, 0.80] | 0.68 (0.50, 0.85) | 0.27 (0.02, 0.53) |
| | I ² (%) χ ² test, p | 65 0.85 | 0 | 0 | 81 | 68 | 0 | 0 | 61 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| IVRT | SMD (95% CI) | 0.67 (0.27, 1.07) | 0.76 (-0.19, 1.71) | 0.73 (0.31, 1.16) | 0.57 (- 0.18, 1.32) | 0.67 [0.24, 1.10] | 0.79 [0.48, 1.10] | 0.97 (0.57, 1.37) | 0.33 (- 0.19, 0.86) |
| | I ² (%) | 84 | 89 | 84 | 89 | 87 | 0 | 78 | 83 |
| | χ ² test, p | 0.99 | | 0.93 | | 0.66 | | 0.17 | |
| Aortic Regurgitation | OR (95% CI) | 1.34 (0.33, 5.35) | 1.16 (0.64, 1.74) | 2.77 (1.00, 7.69) | 0.84 (0.44, 1.60) | 3.09 [0.95, 10.07] | 0.91 [0.49, 1.69] | 1.80 (0.51, 6.36) | 1.07 (0.59, 1.97) |
| | I ² (%) | 0 | 47 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 |
| | χ ² test, p | 0.98 | | 0.15 | | 0.07 | | 0.77 | |
| Mitral Regurgitation | OR (95% CI) | 1.78 (0.40, 7.86) | 1.05 (0.69, 1.60) | 1.75 (0.79, 3.85) | 0.92 (0.57, 1.48) | 1.69 [0.75, 3.82] | 0.94 [0.59, 1.51] | 2.41 (0.57, 10.27) | 1.02 (0.67, 1.55) |
| | I ² (%) | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | χ ² test, p | 0.80 | | 0.39 | | 0.22 | | 0.53 | |

Supplementary Table S4: Sensitivity analysis

LV: Left ventricular, LVMI: Left ventricular mass index, LAD: Left atrial dimension, LVEF: Left ventricular ejection fraction, RoM: Ratio of means, LVEDD: Left ventricular end-diastolic diameter, LVESD: Left ventricular end-systolic diameter, DT: Deceleration time, IVRT: Isovolumetric relaxation time, AR: Aortic regurgitation, MR: Mitral regurgitation, DD: Diastolic dysfunction, w/o: without (study removed of the analysis), MD: Mean difference, OR: odds ratio, 95% CI: 95% Confidence interval

| Outcome | Study removed | MD/OR | 95%CI | Wheight (%) | I ² | Z overall effect | p-value |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------|--------------|-------------|----------------|------------------|---------|
| LVEDD | All studies included | 0.57 | 0.19, 0.95 | 100.0 | 0 | 2.96 | 0.003 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 0.60 | 0.22, 0.99 | 4.0 | 0 | 3.06 | 0.002 |
| | w/o Büyükterzi Z. et al. 2019 | 0.60 | 0.21, 0.99 | 6.6 | 0 | 3.02 | 0.003 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | 0.55 | 0.17, 0.94 | 4.1 | 0 | 2.81 | 0.005 |
| | w/o Chen Y et al. 2014 | 0.65 | 0.26, 1.04 | 6.5 | 0 | 3.28 | 0.001 |
| | w/o Gunes Y et al. 2009 | 0.55 | 0.16, 0.93 | 5.0 | 0 | 2.77 | 0.006 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | 0.68 | 0.29, 1.06 | 5.4 | 0 | 3.42 | 0.0006 |
| | w/o Kırış A et al. 2012 | 0.60 | 0.21, 1.00 | 8.3 | 0 | 3.01 | 0.003 |
| | w/o Midtbø H et al. 2018 | 0.53 | 0.14, 0.93 | 8.1 | 0 | 2.65 | 0.008 |
| | w/o Okan T et al. 2007 | 0.55 | 0.16, 0.94 | 4.6 | 0 | 2.79 | 0.005 |
| | w/o Ozen S et al. 2018 | 0.45 | 0.03, 0.86 | 19.1 | 0 | 2.08 | 0.04 |
| | w/o Emren SV et al. 2019 | 0.56 | 0.17, 0.95 | 7.3 | 0 | 2.80 | 0.005 |
| | w/o Ustun N et al. 2014 | 0.59 | 0.21, 0.98 | 4.8 | 0 | 3.01 | 0.003 |
| | w/o Yildirir A et al. 2002 | 0.56 | 0.17, 0.94 | 3.4 | 0 | 2.84 | 0.005 |
| | w/o Zungur M. et al. 2018 | 0.51 | 0.11, 0.90 | 9.2 | 0 | 2.51 | 0.01 |
| w/o Çağlar S.O. et al. 2016 | 0.56 | 0.17, 0.94 | 3.6 | 0 | 2.85 | 0.004 | |
| LVESD | All studies included | 0.77 | 0.36, 1.17 | 100.0 | 0 | 3.69 | 0.0002 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 0.81 | 0.39, 1.23 | 7.0 | 0 | 3.78 | 0.0002 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | 0.79 | 0.37, 1.21 | 7.9 | 0 | 3.65 | 0.0003 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | 0.80 | 0.37, 1.22 | 7.4 | 0 | 3.69 | 0.0002 |
| | w/o Kırış A et al. 2012 | 0.79 | 0.37, 1.22 | 9.1 | 0 | 3.64 | 0.0003 |
| | w/o Okan T et al. 2007 | 0.75 | 0.33, 1.17 | 7.2 | 0 | 3.48 | 0.0005 |
| | w/o Ozen S et al. 2018 | 0.64 | 0.18, 1.09 | 19.5 | 0 | 2.76 | 0.006 |
| | w/o Emren SV et al. 2019 | 0.86 | 0.43, 1.29 | 11.1 | 0 | 3.92 | <0.0001 |
| | w/o Ustun N et al. 2014 | 0.72 | 0.31, 1.14 | 4.4 | 0 | 3.41 | 0.0007 |
| | w/o Yildirir A et al. 2002 | 0.75 | 0.32, 1.17 | 7.5 | 0 | 3.47 | 0.0005 |
| | w/o Zungur M. et al. 2018 | 0.82 | 0.38, 1.25 | 12.1 | 0 | 3.69 | 0.0002 |
| | w/o Çağlar S.O. et al. 2016 | 0.70 | 0.27, 1.12 | 7.0 | 0 | 3.24 | 0.001 |
| LVMI | All studies included | 4.67 | -0.92, 10.26 | 100.0 | 82 | 1.64 | 0.10 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 4.84 | -1.50, 11.19 | 12.3 | 85 | 1.50 | 0.13 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | 5.78 | -0.15, 11.70 | 12.2 | 82 | 1.91 | 0.06 |
| | w/o Kırış A et al. 2012 | 4.76 | -1.89, 11.42 | 13.7 | 85 | 1.40 | 0.16 |
| | w/o Moyssakis I et al. 2009 | 1.85 | -0.65, 4.36 | 13.8 | 0 | 1.45 | 0.15 |
| | w/o Ozkaramanli Gur D et al. 2018 | 5.07 | -1.17, 11.31 | 11.9 | 85 | 1.59 | 0.11 |
| | w/o Park SH et al. 2012 | 5.37 | -1.02, 11.76 | 14.3 | 82 | 1.65 | 0.10 |
| | w/o Turkmen S. et al. 2018 | 4.35 | -1.74, 10.44 | 9.7 | 85 | 1.40 | 0.16 |
| | w/o Çağlar S.O. et al. 2016 | 4.76 | -1.54, 11.06 | 11.9 | 85 | 1.48 | 0.14 |

| | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|-------|------|-------|-------|
| LV septum | All studies included | 0.01 | 0, 0.03 | 100.0 | 22 | 1.70 | 0.09 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 18.1 | 26 | 1.17 | 0.24 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | 0.02 | 0, 0.04 | 9.3 | 0 | 2.25 | 0.02 |
| | w/o Chen Y et al. 2014 | 0.02 | 0, 0.03 | 12.3 | 31 | 1.66 | 0.10 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | 0.01 | 0.01, 0.03 | 5.8 | 0 | 1.19 | 0.23 |
| | w/o Kırış A et al. 2012 | 0.02 | 0, 0.04 | 10.3 | 16 | 2.06 | 0.04 |
| | w/o Midtbø H et al. 2018 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 11.8 | 28 | 1.37 | 0.17 |
| | w/o Emren SV et al. 2019 | 0.01 | 0, 0.03 | 10.8 | 31 | 1.53 | 0.12 |
| | w/o Zungur M. et al. 2018 | 0.01 | 0, 0.03 | 10.4 | 31 | 1.54 | 0.12 |
| | w/o Çağlar S.O. et al. 2016 | 0.01 | 0, 0.03 | 11.1 | 31 | 1.67 | 0.10 |
| LV posterior | All studies included | 0.01 | -0.01, 0.03 | 100.0 | 49 | 0.83 | 0.41 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 0.01 | -0.02, 0.03 | 11.9 | 50 | 0.50 | 0.62 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 9.0 | 53 | 0.94 | 0.35 |
| | w/o Chen Y et al. 2014 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 10.2 | 53 | 0.63 | 0.53 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | 0.0 | -0.01, 0.02 | 7.1 | 43 | 0.42 | 0.68 |
| | w/o Kırış A et al. 2012 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 10.0 | 54 | 0.84 | 0.40 |
| | w/o Midtbø H et al. 2018 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 11.0 | 54 | 0.72 | 0.47 |
| | w/o Emren SV et al. 2019 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 9.0 | 54 | 0.83 | 0.40 |
| | w/o Ustun N et al. 2014 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 8.0 | 37 | 1.38 | 0.17 |
| | w/o Zungur M. et al. 2018 | 0.0 | -0.01, 0.02 | 9.6 | 41 | 0.35 | 0.73 |
| w/o Çağlar S.O. et al. 2016 | 0.01 | -0.01, 0.03 | 14.2 | 40 | 1.28 | 0.20 | |
| LVEF | All studies included | -0.64 | -1.14, -0.14 | 100.0 | 51 | 2.53 | 0.01 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | -0.65 | -1.17, -0.13 | 3.6 | 54 | 2.47 | 0.01 |
| | w/o Büyükterzi Z. et al. 2019 | -0.70 | -1.21, -0.19 | 4.2 | 51 | 2.71 | 0.007 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | -0.72 | -1.22, -0.21 | 5.4 | 49 | 2.79 | 0.005 |
| | w/o Chen Y et al. 2014 | -0.68 | -1.20, -0.15 | 5.8 | 53 | 2.53 | 0.01 |
| | w/o Gunes Y et al. 2009 | -0.68 | -1.20, -0.16 | 5.1 | 53 | 2.58 | 0.010 |
| | w/o Inci U et al. 2015 | -0.65 | -1.19, -0.11 | 6.7 | 54 | 2.37 | 0.02 |
| | w/o Kaya EB et al. 2010 | -0.58 | -1.09, -0.07 | 4.6 | 51 | 2.24 | 0.02 |
| | w/o Kucuk M et al. 2018 | -0.59 | -1.09, -0.10 | 1.6 | 51 | 2.36 | 0.02 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | -0.60 | -1.11, -0.09 | 3.4 | 52 | 2.31 | 0.02 |
| | w/o Kırış A et al. 2012 | -0.69 | -1.21, -0.17 | 5.1 | 52 | 2.61 | 0.009 |
| | w/o Midtbø H et al. 2018 | -0.56 | -1.06, -0.06 | 5.7 | 48 | 2.19 | 0.03 |
| | w/o Moyssakis I et al. 2009 | -0.53 | -1.01, -0.06 | 4.2 | 45 | 2.20 | 0.03 |
| | w/o Okan T et al. 2007 | -0.63 | -1.15, -0.11 | 4.2 | 53 | 2.37 | 0.02 |
| | w/o Ozen S et al. 2018 | -0.58 | -1.10, -0.06 | 6.6 | 50 | 2.20 | 0.03 |
| | w/o Ozkaramanli Gur D et al. 2018 | -0.63 | -1.14, -0.11 | 4.0 | 53 | 2.37 | 0.02 |
| | w/o Park SH et al. 2012 | -0.59 | -1.08, -0.09 | 2.6 | 51 | 2.31 | 0.02 |
| | w/o Emren SV et al. 2019 | -0.63 | -1.15, -0.11 | 4.5 | 53 | 2.36 | 0.02 |
| | w/o Turkmen S. et al. 2018 | -0.68 | -1.21, -0.15 | 6.4 | 53 | 2.53 | 0.01 |
| | w/o Ustun N et al. 2014 | -0.64 | -1.16, -0.12 | 4.1 | 54 | 2.41 | 0.02 |
| w/o Yildirim A et al. 2002 | -0.69 | -1.20, -0.17 | 4.7 | 53 | 2.60 | 0.009 | |
| w/o Zungur M. et al. 2018 | -0.74 | -1.22, -0.25 | 4.7 | 46 | 2.99 | 0.003 | |
| w/o Çağlar S.O. et al. 2016 | -0.71 | -1.20, -0.23 | 2.8 | 48 | 2.87 | 0.004 | |
| LAD | All studies included | 1.27 | 0.03, 2.50 | 100.0 | 85 | 2.01 | 0.04 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 1.32 | -0.02, 2.66 | 8.9 | 87 | 1.94 | 0.05 |
| | w/o Büyükterzi Z. et al. 2019 | 1.30 | -0.10, 2.70 | 10.4 | 87 | 1.82 | 0.07 |

| | | | | | | | |
|------|-----------------------------|-------|--------------|-------|----|------|----------|
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | 1.40 | -0.04, 2.76 | 10.3 | 86 | 2.02 | 0.04 |
| | w/o Gunes Y et al. 2009 | 1.56 | -0.32, 2.80 | 10.0 | 84 | 2.47 | 0.01 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | 1.29 | -0.08, 2.6 | 9.8 | 87 | 1.84 | 0.07 |
| | w/o Kiriş A et al. 2012 | 1.45 | 0.12, 2.79 | 10.6 | 85 | 2.13 | 0.03 |
| | w/o Okan T et al. 2007 | 1.30 | -0.06, 2.66 | 9.5 | 87 | 1.87 | 0.06 |
| | w/o Turkmen S. et al. 2018 | 0.96 | -0.22, 2.14 | 10.6 | 81 | 1.60 | 0.11 |
| | w/o Yildirim A et al. 2002 | 1.30 | -0.10, 2.70 | 10.4 | 87 | 1.82 | 0.07 |
| | w/o Çağlar S.O. et al. 2016 | 0.80 | -0.21, 1.81 | 9.5 | 76 | 1.55 | 0.12 |
| E/A | All studies included | -0.15 | -0.21, -0.08 | 100.0 | 81 | 4.60 | <0.00001 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | -0.14 | -0.21, -0.08 | 5.7 | 82 | 4.32 | <0.00001 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | -0.15 | -0.21, -0.08 | 5.5 | 82 | 4.43 | <0.00001 |
| | w/o Chen Y et al. 2014 | -0.15 | -0.21, -0.08 | 5.3 | 82 | 4.48 | <0.00001 |
| | w/o Ercan S et al. 2013 | -0.16 | -0.22, -0.09 | 6.0 | 81 | 4.77 | <0.00001 |
| | w/o Gunes Y et al. 2009 | -0.15 | -0.22, -0.09 | 6.0 | 82 | 4.51 | <0.00001 |
| | w/o Inci U et al. 2015 | -0.14 | -0.21, -0.08 | 5.6 | 82 | 4.29 | <0.00001 |
| | w/o Kaya EB et al. 2010 | -0.15 | -0.22, -0.09 | 4.9 | 82 | 4.63 | <0.00001 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | -0.14 | -0.21, -0.08 | 5.3 | 82 | 4.35 | <0.00001 |
| | w/o Kiriş A et al. 2012 | -0.14 | -0.21, -0.08 | 5.1 | 82 | 4.35 | <0.00001 |
| | w/o Midtbø H et al. 2018 | -0.15 | -0.21, -0.08 | 6.0 | 82 | 4.44 | <0.00001 |
| | w/o Moysakis I et al. 2009 | -0.15 | -0.22, -0.08 | 6.6 | 82 | 4.38 | <0.00001 |
| | w/o Okan T et al. 2007 | -0.15 | -0.22, -0.09 | 5.5 | 82 | 4.56 | <0.00001 |
| | w/o Emren SV et al. 2019 | -0.16 | -0.22, -0.09 | 6.6 | 80 | 4.78 | <0.00001 |
| | w/o Sun JP et al. 1992 | -0.13 | -0.20, -0.07 | 4.2 | 81 | 4.27 | <0.00001 |
| | w/o Turkmen S. et al. 2018 | -0.12 | -0.17, -0.07 | 6.8 | 65 | 4.83 | <0.00001 |
| | w/o Ustun N et al. 2014 | -0.13 | -0.19, -0.07 | 3.4 | 80 | 4.28 | <0.00001 |
| | w/o Yildirim A et al. 2002 | -0.14 | -0.20, -0.08 | 4.1 | 82 | 4.33 | <0.00001 |
| | w/o Çağlar S.O. et al. 2016 | -0.15 | -0.22, -0.09 | 7.1 | 79 | 4.64 | <0.00001 |
| DT | All studies included | 13.07 | 7.75, 18.40 | 100.0 | 66 | 4.81 | <0.00001 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 13.27 | 7.33, 19.20 | 9.2 | 68 | 4.38 | <0.00001 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | 12.97 | 7.30, 18.63 | 6.4 | 68 | 4.48 | <0.00001 |
| | w/o Gunes Y et al. 2009 | 12.29 | 6.70, 17.87 | 8.6 | 65 | 4.31 | <0.00001 |
| | w/o Inci U et al. 2015 | 13.29 | 7.41, 19.17 | 8.8 | 68 | 4.43 | <0.00001 |
| | w/o Kaya EB et al. 2010 | 14.22 | 9.01, 19.42 | 6.0 | 63 | 5.35 | <0.00001 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | 12.30 | 6.90, 17.70 | 5.1 | 66 | 4.46 | <0.00001 |
| | w/o Kiriş A et al. 2012 | 14.69 | 10.17, 19.21 | 6.5 | 50 | 6.36 | <0.00001 |
| | w/o Moysakis I et al. 2009 | 13.11 | 7.11, 19.11 | 9.5 | 68 | 4.28 | <0.00001 |
| | w/o Okan T et al. 2007 | 11.96 | 6.70, 17.22 | 6.4 | 63 | 4.46 | <0.00001 |
| | w/o Park SH et al. 2012 | 13.39 | 7.66, 19.12 | 7.6 | 68 | 4.58 | <0.00001 |
| | w/o Emren SV et al. 2019 | 12.69 | 7.09, 18.30 | 6.1 | 68 | 4.44 | <0.00001 |
| | w/o Turkmen S. et al. 2018 | 13.72 | 8.0, 19.43 | 8.7 | 67 | 4.71 | <0.00001 |
| | w/o Ustun N et al. 2014 | 12.92 | 7.40, 18.44 | 3.6 | 68 | 4.59 | <0.00001 |
| | w/o Yildirim A et al. 2002 | 12.08 | 6.68, 17.48 | 7.6 | 64 | 4.38 | <0.00001 |
| IVRT | All studies included | 7.90 | 4.50, 11.30 | 100.0 | 79 | 4.55 | <0.00001 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 8.20 | 4.56, 11.84 | 9.2 | 80 | 4.42 | <0.00001 |
| | w/o Caliskan M et al. 2008 | 7.48 | 3.87, 11.09 | 7.6 | 81 | 4.06 | <0.00001 |
| | w/o Gunes Y et al. 2009 | 6.94 | 3.75, 10.13 | 10.1 | 73 | 4.26 | <0.00001 |
| | w/o Inci U et al. 2015 | 7.96 | 4.18, 11.74 | 9.9 | 81 | 4.13 | <0.00001 |
| | w/o Kaya EB et al. 2010 | 8.88 | 5.67, 12.08 | 8.6 | 75 | 5.43 | <0.00001 |

| | | | | | | | |
|-------|----------------------------|------|--------------|-------|----|------|----------|
| | w/o Kucuk M et al. 2018 | 8.22 | 4.65, 11.80 | 7.6 | 81 | 4.51 | <0.00001 |
| | w/o Kuloglu O et al. 2012 | 8.95 | 5.80, 12.10 | 7.4 | 75 | 5.57 | <0.00001 |
| | w/o Moysakis I et al. 2009 | 7.47 | 3.55, 11.39 | 10.8 | 81 | 3.74 | 0.0002 |
| | w/o Okan T et al. 2007 | 7.88 | 4.15, 11.62 | 9.3 | 81 | 4.13 | <0.0001 |
| | w/o Turkmen S. et al. 2018 | 7.62 | 3.66, 11.58 | 10.8 | 81 | 3.77 | 0.0002 |
| | w/o Yildirim A et al. 2002 | 7.22 | 3.67, 10.78 | 8.7 | 80 | 3.98 | <0.001 |
| LV DD | All studies included | 3.43 | 1.78, 6.59 | 100.0 | 0 | 3.69 | 0.0002 |
| | w/o Acar G et al. 2009 | 3.55 | 1.60, 7.88 | 32.2 | 0 | 3.12 | 0.002 |
| | w/o Gunes Y et al. 2009 | 3.34 | 1.71, 6.54 | 4.7 | 0 | 3.52 | 0.0004 |
| | w/o Inci U et al. 2015 | 3.54 | 1.67, 7.51 | 24.0 | 0 | 3.30 | 0.001 |
| | w/o Okan T et al. 2007 | 3.28 | 1.42, 7.59 | 39.0 | 0 | 2.78 | 0.005 |
| AR | All studies included | 1.18 | 0.68, 2.04 | 100.0 | 0 | 0.60 | 0.55 |
| | w/o Brewerton DA. | 1.18 | 0.68, 2.05 | 2.9 | 0 | 0.59 | 0.56 |
| | w/o Crowley JJ. | 1.16 | 0.67, 2.02 | 2.9 | 0 | 0.52 | 0.60 |
| | w/o Gunes Y. | 1.16 | 0.67, 2.02 | 2.8 | 0 | 0.53 | 0.60 |
| | w/o Midtbø H | 2.55 | 1.00, 6.48 | 65.7 | 0 | 1.97 | 0.05 |
| | w/o O'Neill TW. | 1.13 | 0.65, 1.96 | 3.1 | 0 | 0.42 | 0.68 |
| | w/o Okan T. | 1.21 | 0.69, 2.11 | 3.8 | 0 | 0.67 | 0.50 |
| | w/o Ozkaramanli G. | 0.96 | 0.54, 1.73 | 12.8 | 0 | 0.12 | 0.90 |
| | w/o Park S.-H. | 1.17 | 0.67, 2.04 | 2.8 | 0 | 0.56 | 0.57 |
| | w/o Yildirim A. | 1.17 | 0.67, 2.03 | 3.2 | 0 | 0.54 | 0.59 |
| MR | All studies included | 1.09 | 0.73, 1.63 | 100.0 | 0 | 0.41 | 0.68 |
| | w/o Crowley JJ. | 1.06 | 0.70, 1.61 | 3.1 | 0 | 0.29 | 0.77 |
| | w/o Midtbø H | 1.80 | 0.85, 3.80 | 70.5 | 0 | 1.54 | 0.12 |
| | w/o Okan T. | 1.08 | 0.72, 1.63 | 2.8 | 0 | 0.38 | 0.71 |
| | w/o Ozkaramanli G. | 0.98 | 0.62, 1.53 | 18.9 | 0 | 0.10 | 0.92 |
| | w/o Park S.-H. | 1.09 | 0.72, 1.65 | 2.7 | 0 | 0.42 | 0.67 |
| | w/o Yildirim A. | 5.80 | 0.32, 104.54 | 2.0 | 0 | 0.25 | 0.80 |

Supplementary Figure S1: Publication bias analysis

LVEDD

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = 0.142857 P = 0.4951

Egger: bias = -0.085787 (95% CI = -2.6224 to 2.450825) P = 0.9429



LVESD

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = 0.490909 P = 0.0405

Egger: bias = 4.008408 (95% CI = 0.749929 to 7.266888) P = 0.0213

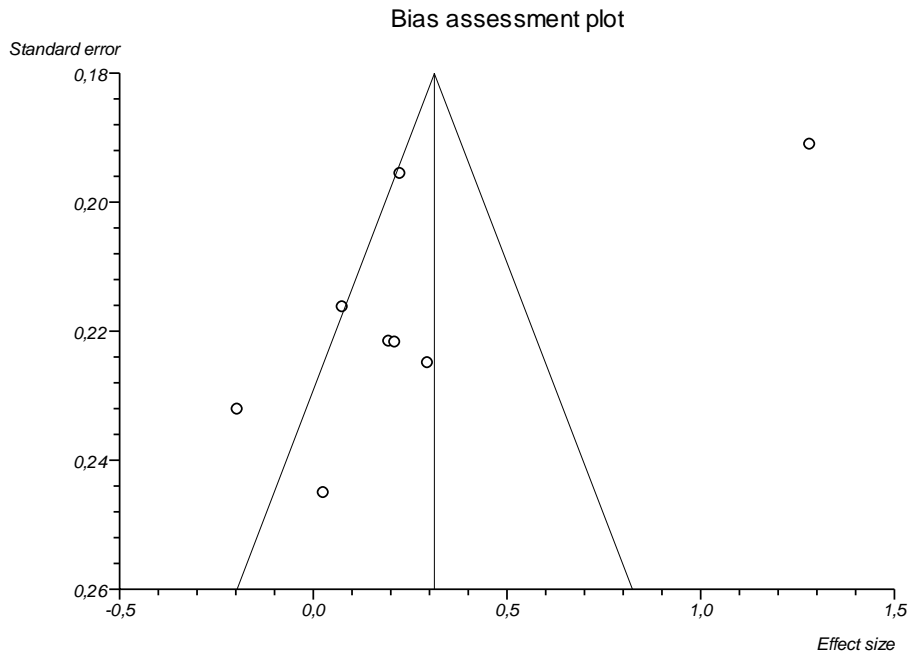


LVMI

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = -0.357143 P = 0.1789 (low power)

Egger: bias = -18.789094 (95% CI = -36.801353 to -0.776835) P = 0.0433



LV septum

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = 0.055556 P = 0.9195 (low power)

Egger: bias = 0.166121 (95% CI = -3.947181 to 4.279423) P = 0.9266

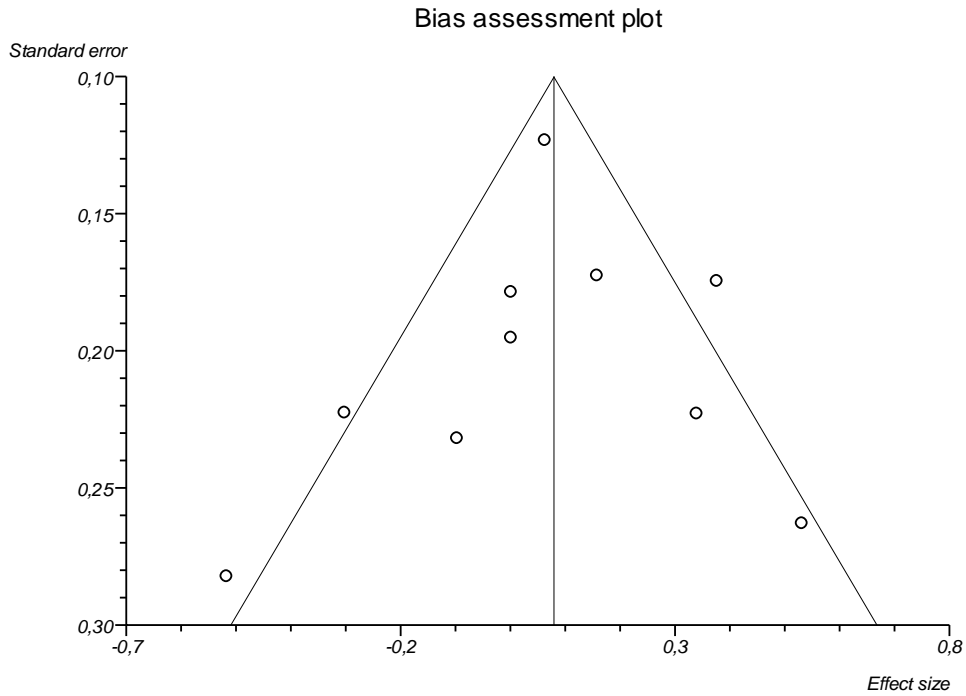


LV posterior

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = -0.244444 P = 0.2912 (low power)

Egger: bias = -0.943218 (95% CI = -5.168798 to 3.282361) P = 0.6207



LVEF

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = -0.238095 P = 0.115

Egger: bias = -0.479467 (95% CI = -3.595519 to 2.636584) P = 0.7516

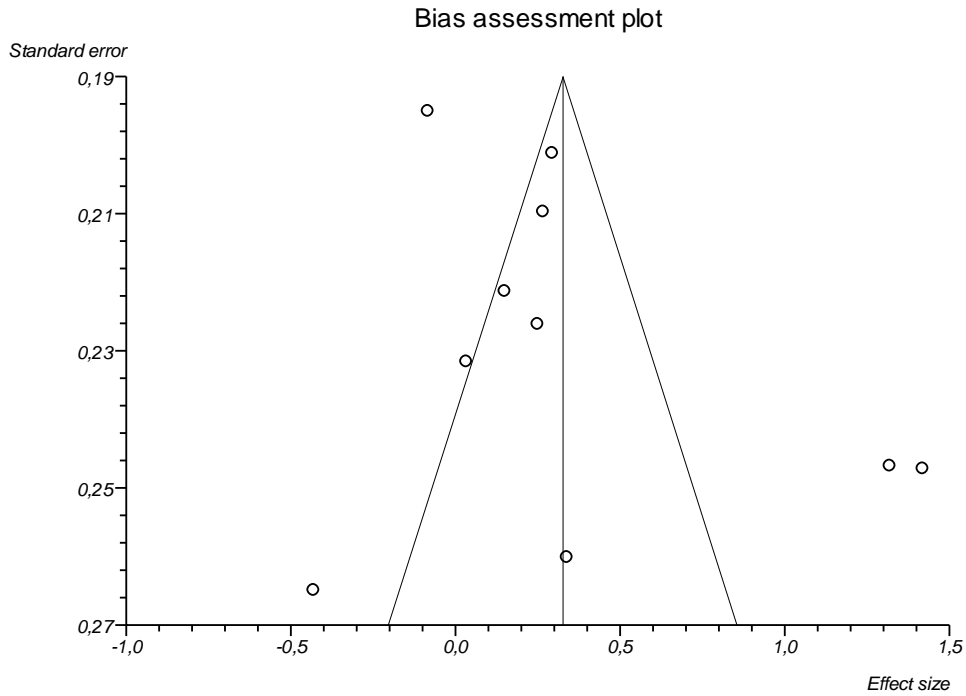


LA dimension

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = 0.111111 P = 0.7275 (low power)

Egger: bias = 6.598009 (95% CI = -10.895231 to 24.09125) P = 0.4098

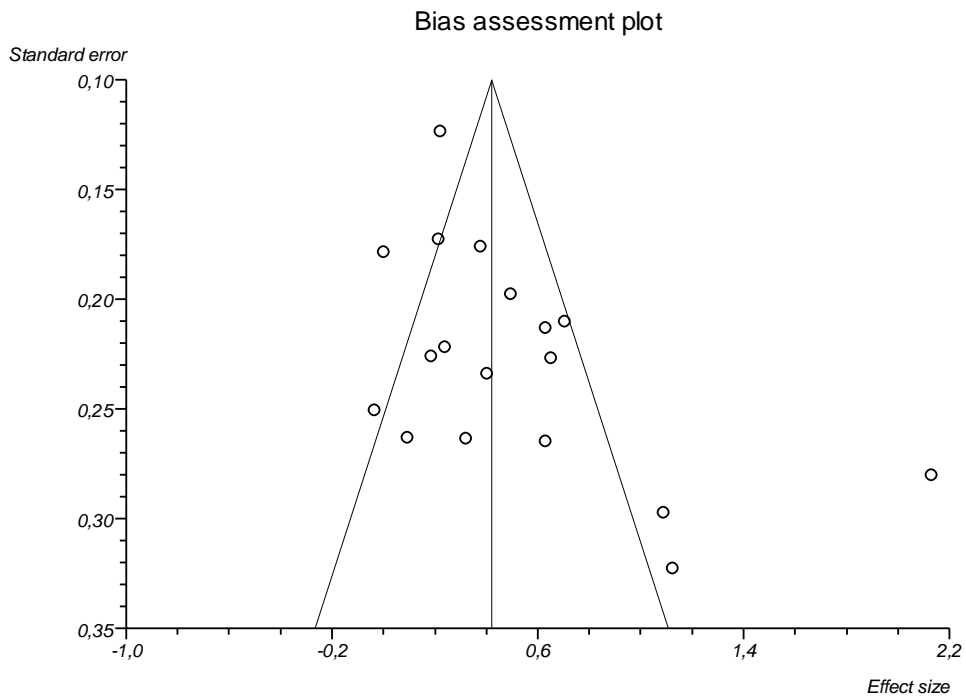


E/A ratio

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = 0.359477 P = 0.0395

Egger: bias = 4.094674 (95% CI = 0.412732 to 7.776615) P = 0.0315

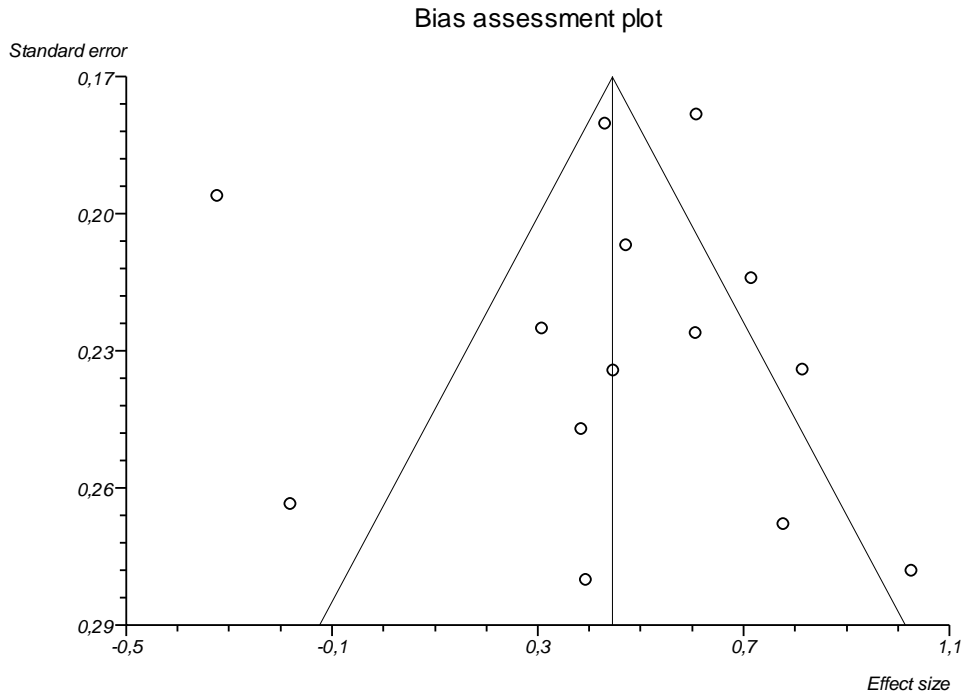


Effect size meta-analysis: DT

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = 0.076923 P = 0.7472

Egger: bias = 1.840811 (95% CI = -4.72861 to 8.410231) P = 0.5529

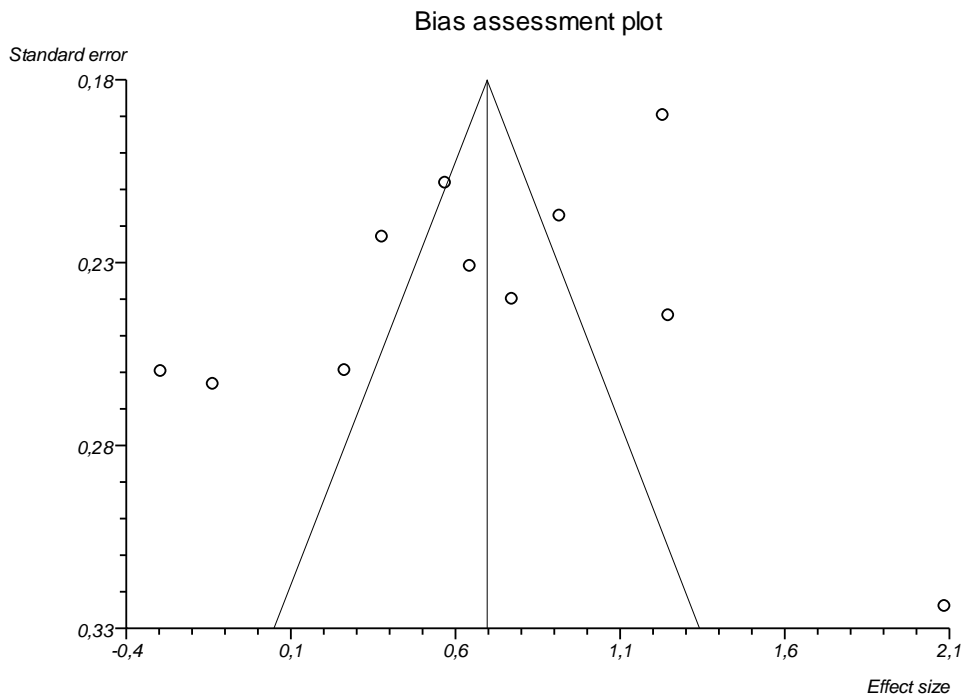


IVRT

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = -0.2 P = 0.3587

Egger: bias = -0.974509 (95% CI = -14.641399 to 12.69238) P = 0.8754

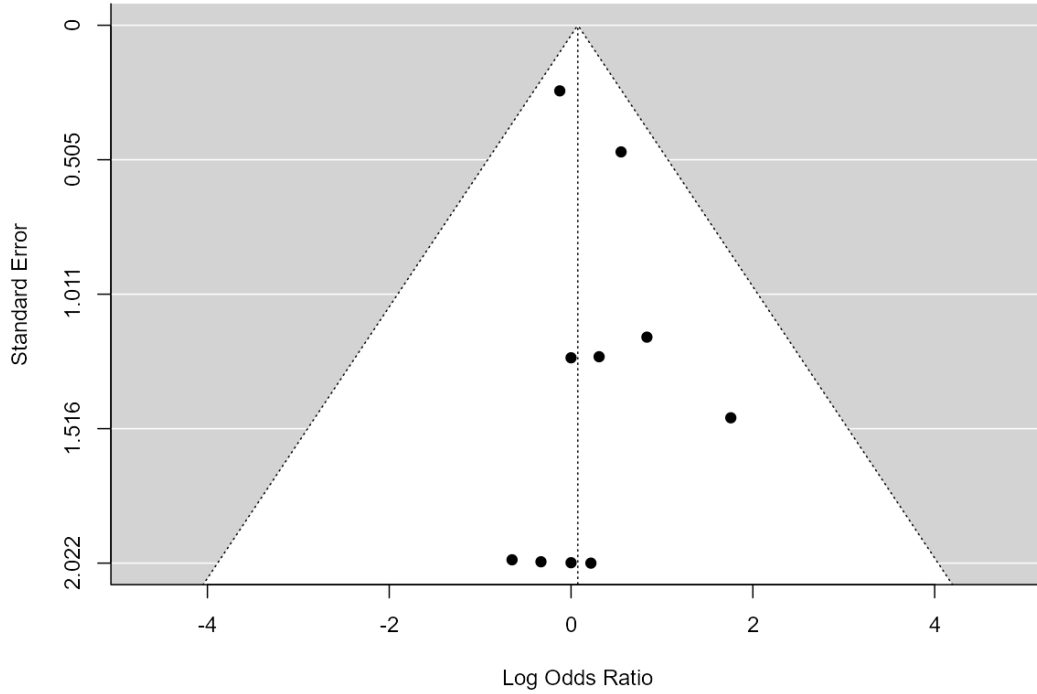


Mitral regurgitation

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = -0.07 P = 0.86

Egger: bias = P = 0.47

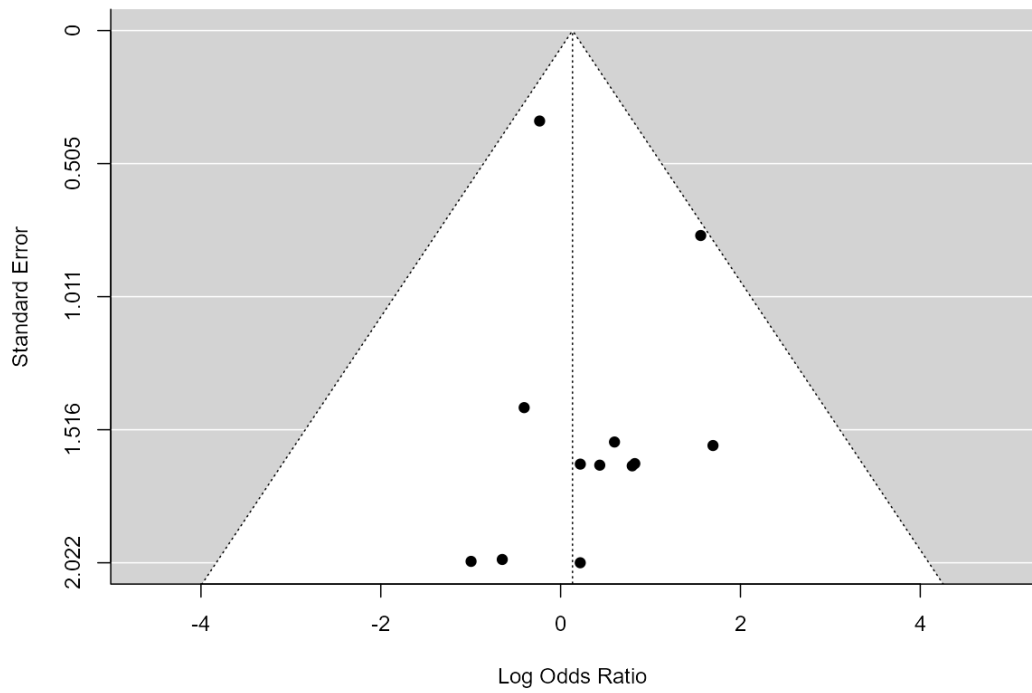


Aortic regurgitation

Bias indicators

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = -0.212 P = 0.38

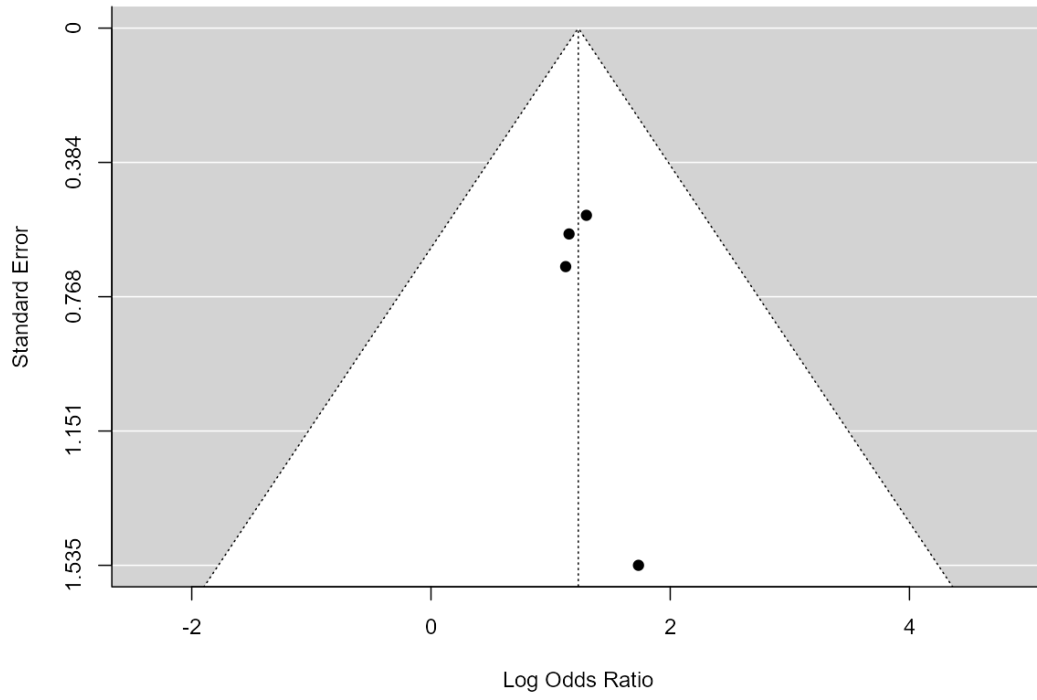
Egger: P = 0.39



LV diastolic dysfunction

Begg-Mazumdar: Kendall's tau = 0.0 , P = 1.0

Egger: P = 0.79



REFERENCES

- [1] de Winter JJ, van Mens LJ, van der Heijde D, Landewe R, Baeten DL. Prevalence of peripheral and extra-articular disease in ankylosing spondylitis versus non-radiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2016;18:196. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1093-z>.
- [2] El Maghraoui A. Extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: prevalence, characteristics and therapeutic implications. *Eur J Intern Med* 2011;22:554-60. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2011.06.006>.
- [3] Baillet A, Romand X, Pflimlin A, Dalecky M, Claudepierre P, Flipo RM, et al. Data to be collected for an optimal management of axial spondyloarthritis in daily practice: Proposal from evidence-based and consensual approaches. *Joint bone spine* 2020;87:405-11. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2020.04.019>.
- [4] Fragoulis GE, Siebert S. Treatment strategies in axial spondyloarthritis: what, when and how? *Rheumatology (Oxford, England)* 2020;59:iv79-iv89. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa435>.
- [5] Bakland G, Gran JT, Nossent JC. Increased mortality in ankylosing spondylitis is related to disease activity. *Annals of the rheumatic diseases* 2011;70:1921-5. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.151191>.
- [6] Mathieu S, Pereira B, Soubrier M. Cardiovascular events in ankylosing spondylitis: an updated meta-analysis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2015;44:551-5. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2014.10.007>.
- [7] Haroon NN, Paterson JM, Li P, Inman RD, Haroon N. Patients With Ankylosing Spondylitis Have Increased Cardiovascular and Cerebrovascular Mortality: A Population-Based Study. *Ann Intern Med* 2015;163:409-16. <https://doi.org/10.7326/M14-2470>.
- [8] Liew JW, Ramiro S, Gensler LS. Cardiovascular morbidity and mortality in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018;32:369-89. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2019.01.002>.
- [9] Nurmohamed MT, Heslinga M, Kitis GD. Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology* 2015;11:693-704. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.112>.
- [10] Roldan CA. Valvular and coronary heart disease in systemic inflammatory diseases: Systemic Disorders in heart disease. *Heart* 2008;94:1089-101. <https://doi.org/10.1136/hrt.2007.132787>.
- [11] Bulkley BH, Roberts WC. Ankylosing spondylitis and aortic regurgitation. Description of the characteristic cardiovascular lesion from study of eight necropsy patients. *Circulation* 1973;48:1014-27. <https://doi.org/10.1161/01.cir.48.5.1014>.
- [12] Roldan CA, Chavez J, Wiest PW, Qualls CR, Crawford MH. Aortic root disease and valve disease associated with ankylosing spondylitis. *Journal of the American College of Cardiology* 1998;32:1397-404. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(98\)00393-3](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(98)00393-3).
- [13] Baillet A, Gossec L, Carmona L, Wit M, van Eijk-Hustings Y, Bertheussen H, et al. Points to consider for reporting, screening for and preventing selected comorbidities in chronic inflammatory rheumatic diseases in daily practice: a EULAR initiative. *Annals of the rheumatic diseases* 2016;75:965-73. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209233>.
- [14] Ward MM, Deodhar A, Gensler LS, Dubreuil M, Yu D, Khan MA, et al. 2019 Update of the American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2019;71:1599-613. <https://doi.org/10.1002/art.41042>.
- [15] Heslinga SC, Van Dongen CJ, Konings TC, Peters MJ, Van der Horst-Bruinsma IE, Smulders YM, et al. Diastolic left ventricular dysfunction in ankylosing spondylitis--a systematic review and meta-analysis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2014;44:14-9. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2014.02.004>.
- [16] Chen Y, Chung HY, Zhao CT, Wong A, Zhen Z, Tsang HH, et al. Left ventricular myocardial dysfunction and premature atherosclerosis in patients with axial spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2015;54:292-301. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu337>.
- [17] Emren SV, Gerçik O, Özdemir E, Solmaz D, Eren N, Şimşek E, et al. Evaluation of subclinical myocardial dysfunction using speckle tracking echocardiography in patients with radiographic and non-

- radiographic axial spondyloarthritis. *European journal of rheumatology* 2020;7:9-15. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2019.19072>.
- [18] Çağlar SO, Boyraz İ, Erdem F, Yazici S, Çağlar H, Koç B, et al. Evaluation of Atrial Conduction Times, Epicardial Fat Thickness and Carotid Intima-Media Thickness in Patients With Ankylosing Spondylitis. *Archives of rheumatology* 2016;31:353-8. <https://doi.org/10.5606/ArchRheumatol.2016.5867>.
- [19] Inci U, Yildiz A, Batmaz I, Tekbas E. Assessment of serum asymmetric dimethylarginine levels and left ventricular diastolic function in patients with ankylosing spondylitis. *International journal of rheumatic diseases* 2017;20:238-44. <https://doi.org/10.1111/1756-185x.12608>.
- [20] Midtbø H, Gerdtz E, Berg IJ, Rollefstad S, Jonsson R, Semb AG. Ankylosing Spondylitis Is Associated with Increased Prevalence of Left Ventricular Hypertrophy. *The Journal of rheumatology* 2018;45:1249-55. <https://doi.org/10.3899/jrheum.171124>.
- [21] Turkmen S, Askin L, Uzel KE, Nacar H, Kavalci V, Akturk E, et al. Association of High-Sensitivity Troponin T With Left Ventricular Dysfunction in Ankylosing Spondylitis. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases* 2020;26:87-93. <https://doi.org/10.1097/rhu.0000000000000951>.
- [22] Ustun N, Kurt M, Nacar AB, Karateke HP, Guler H, Turhanoglu AD. Left ventricular systolic dysfunction in patients with ankylosing spondylitis without clinically overt cardiovascular disease by speckle tracking echocardiography. *Rheumatology international* 2015;35:607-11. <https://doi.org/10.1007/s00296-014-3130-z>.
- [23] Ghogomu EA, Maxwell LJ, Buchbinder R, Rader T, Pardo Pardo J, Johnston RV, et al. Updated method guidelines for cochrane musculoskeletal group systematic reviews and metaanalyses. *The Journal of rheumatology* 2014;41:194-205. <https://doi.org/10.3899/jrheum.121306>.
- [24] Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ (Clinical research ed)* 2015;350:g7647. <https://doi.org/10.1136/bmj.g7647>.
- [25] Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 2015;28:1-39.e14. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2014.10.003>.
- [26] Lo CK, Mertz D, Loeb M. Newcastle-Ottawa Scale: comparing reviewers' to authors' assessments. *BMC medical research methodology* 2014;14:45. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-45>.
- [27] Murad MH, Wang Z, Chu H, Lin L. When continuous outcomes are measured using different scales: guide for meta-analysis and interpretation. *BMJ (Clinical research ed)* 2019;364:k4817. <https://doi.org/10.1136/bmj.k4817>.
- [28] Acar G, Sayarlioglu M, Akcay A, Sokmen A, Sokmen G, Altun B, et al. Assessment of atrial electromechanical coupling characteristics in patients with ankylosing spondylitis. *Echocardiography (Mount Kisco, NY)* 2009;26:549-57. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2008.00838.x>.
- [29] Gunes Y, Tuncer M, Guntekin U, Sahin M, Yazmalar L. Effects of ankylosing spondylitis on the heart. *Acta cardiologica* 2009;64:385-92. <https://doi.org/10.2143/ac.64.3.2038026>.
- [30] Okan T, Sari I, Akar S, Cece H, Goldeli O, Guneri S, et al. Ventricular diastolic function of ankylosing spondylitis patients by using conventional pulsed wave Doppler, myocardial performance index and tissue Doppler imaging. *Echocardiography (Mount Kisco, NY)* 2008;25:47-56. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2007.00541.x>.
- [31] Meléndez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2010;56:225-31. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.109.148635>.
- [32] Mokotedi L, Michel FS, Mogane C, Gomes M, Woodiwiss AJ, Norton GR, et al. Associations of inflammatory markers with impaired left ventricular diastolic and systolic function in collagen-induced arthritis. *PloS one* 2020;15:e0230657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230657>.
- [33] Biesbroek PS, Heslinga SC, Konings TC, van der Horst-Bruinsma IE, Hofman MBM, van de Ven PM, et al. Insights into cardiac involvement in ankylosing spondylitis from cardiovascular magnetic resonance. *Heart* 2017;103:745-52. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2016-310667>.

- [34] Heslinga SC, Konings TC, van der Horst-Bruinsma IE, Kamp O, van Halm VP, de Bruin-Bon H, et al. The effects of golimumab treatment on systolic and diastolic left ventricular function in ankylosing spondylitis. *Biologics : targets & therapy* 2018;12:143-9. <https://doi.org/10.2147/btt.s176806>.
- [35] Ntusi NAB, Francis JM, Sever E, Liu A, Piechnik SK, Ferreira VM, et al. Anti-TNF modulation reduces myocardial inflammation and improves cardiovascular function in systemic rheumatic diseases. *International journal of cardiology* 2018;270:253-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.06.099>.
- [36] Kuznetsova T, Herbots L, López B, Jin Y, Richart T, Thijs L, et al. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in a general population. *Circulation Heart failure* 2009;2:105-12. <https://doi.org/10.1161/circheartfailure.108.822627>.
- [37] Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, 3rd, Dokainish H, Edvardsen T, et al. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 2016;29:277-314. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2016.01.011>.
- [38] Prasad SB, Holland DJ, Atherton JJ, Whalley G. New Diastology Guidelines: Evolution, Validation and Impact on Clinical Practice. *Heart, lung & circulation* 2019;28:1411-20. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2019.03.013>.
- [39] Almeida JG, Fontes-Carvalho R, Sampaio F, Ribeiro J, Bettencourt P, Flachskampf FA, et al. Impact of the 2016 ASE/EACVI recommendations on the prevalence of diastolic dysfunction in the general population. *European heart journal Cardiovascular Imaging* 2018;19:380-6. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jex252>.
- [40] Reinhardt A, Yevsa T, Worbs T, Lienenklaus S, Sandrock I, Oberdörfer L, et al. Interleukin-23-Dependent γ/δ T Cells Produce Interleukin-17 and Accumulate in the Enthesis, Aortic Valve, and Ciliary Body in Mice. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2016;68:2476-86. <https://doi.org/10.1002/art.39732>.
- [41] Klingberg E, Sveälv BG, Täng MS, Bech-Hanssen O, Forsblad-d'Elia H, Bergfeldt L. Aortic Regurgitation Is Common in Ankylosing Spondylitis: Time for Routine Echocardiography Evaluation? *The American journal of medicine* 2015;128:1244-50.e1. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.04.032>.
- [42] Galderisi M, Henein MY, D'Hooge J, Sicari R, Badano LP, Zamorano JL, et al. Recommendations of the European Association of Echocardiography: how to use echo-Doppler in clinical trials: different modalities for different purposes. *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology* 2011;12:339-53. <https://doi.org/10.1093/ejechocard/jer051>.
- [43] Lancellotti P, Tribouilloy C, Hagendorff A, Moura L, Popescu BA, Agricola E, et al. European Association of Echocardiography recommendations for the assessment of valvular regurgitation. Part 1: aortic and pulmonary regurgitation (native valve disease). *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology* 2010;11:223-44. <https://doi.org/10.1093/ejechocard/jeq030>.
- [44] Armstrong AC, Ricketts EP, Cox C, Adler P, Arynchyn A, Liu K, et al. Quality Control and Reproducibility in M-Mode, Two-Dimensional, and Speckle Tracking Echocardiography Acquisition and Analysis: The CARDIA Study, Year 25 Examination Experience. *Echocardiography (Mount Kisco, NY)* 2015;32:1233-40. <https://doi.org/10.1111/echo.12832>.
- [45] Himelman RB, Cassidy MM, Landzberg JS, Schiller NB. Reproducibility of quantitative two-dimensional echocardiography. *American heart journal* 1988;115:425-31. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(88\)90491-7](https://doi.org/10.1016/0002-8703(88)90491-7).
- [46] Kucuk M, Korucuk N, Tosun V, Cavusoglu M, Basarici İ. Assessment of left atrial function using speckle tracking echocardiography in ankylosing spondylitis: a case-control study. *The international journal of cardiovascular imaging* 2018;34:1863-8. <https://doi.org/10.1007/s10554-018-1411-4>.
- [47] Ozkaramanli Gur D, Ozaltun DN, Guzel S, Sarifakioglu B, Akyuz A, Alpsoy S, et al. Novel imaging modalities in detection of cardiovascular involvement in ankylosing spondylitis. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ* 2018;52:320-7. <https://doi.org/10.1080/14017431.2018.1551564>.

- [48] Ozen S, Ozen A, Unal EU, Tufekcioglu O, Ataman S, Yalcin AP. Subclinical cardiac disease in ankylosing spondylitis. *Echocardiography* (Mount Kisco, NY) 2018;35:1579-86. <https://doi.org/10.1111/echo.14103>.
- [49] Ercan S, Goktepe F, Kisacik B, Pehlivan Y, Onat AM, Yavuz F, et al. Subclinical cardiovascular target organ damage manifestations of ankylosing spondylitis in young adult patients. *Modern rheumatology* 2013;23:1063-8. <https://doi.org/10.1007/s10165-012-0791-x>.
- [50] Kırış A, Karkucak M, Karaman K, Kırış G, Capkın E, Gökmen F, et al. Patients with ankylosing spondylitis have evidence of left ventricular asynchrony. *Echocardiography* (Mount Kisco, NY) 2012;29:661-7. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2012.01665.x>.
- [51] Kaya EB, Okutucu S, Aksoy H, Karakulak UN, Tulumen E, Ozdemir O, et al. Evaluation of cardiac autonomic functions in patients with ankylosing spondylitis via heart rate recovery and heart rate variability. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2010;99:803-8. <https://doi.org/10.1007/s00392-010-0187-x>.
- [52] Moysakakis I, Gialafos E, Vassiliou VA, Boki K, Votteas V, Sfikakis PP, et al. Myocardial performance and aortic elasticity are impaired in patients with ankylosing spondylitis. *Scandinavian journal of rheumatology* 2009;38:216-21. <https://doi.org/10.1080/03009740802474672>.
- [53] Caliskan M, Erdogan D, Gullu H, Yilmaz S, Gursoy Y, Yildirim A, et al. Impaired coronary microvascular and left ventricular diastolic functions in patients with ankylosing spondylitis. *Atherosclerosis* 2008;196:306-12. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.11.003>.
- [54] Yildirim A, Aksoyek S, Calguneri M, Oto A, Kes S. Echocardiographic evidence of cardiac involvement in ankylosing spondylitis. *Clinical rheumatology* 2002;21:129-34. <https://doi.org/10.1007/s10067-002-8271-x>.
- [55] Crowley JJ, Donnelly SM, Tobin M, FitzGerald O, Bresnihan B, Maurer BJ, et al. Doppler echocardiographic evidence of left ventricular diastolic dysfunction in ankylosing spondylitis. *The American journal of cardiology* 1993;71:1337-40. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(93\)90551-m](https://doi.org/10.1016/0002-9149(93)90551-m).
- [56] Sun JP, Khan MA, Farhat AZ, Bahler RC. Alterations in cardiac diastolic function in patients with ankylosing spondylitis. *International journal of cardiology* 1992;37:65-72. [https://doi.org/10.1016/0167-5273\(92\)90133-n](https://doi.org/10.1016/0167-5273(92)90133-n).
- [57] O'Neill TW, King G, Graham IM, Molony J, Bresnihan B. Echocardiographic abnormalities in ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 1992;51:652-4. <https://doi.org/10.1136/ard.51.5.652>.
- [58] Gould BA, Turner J, Keeling DH, Hickling P, Marshall AJ. Myocardial dysfunction in ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 1992;51:227-32. <https://doi.org/10.1136/ard.51.2.227>.
- [59] Brewerton DA, Gibson DG, Goddard DH, Jones TJ, Moore RB, Pease CT, et al. The myocardium in ankylosing spondylitis. A clinical, echocardiographic, and histopathological study. *Lancet* (London, England) 1987;1:995-8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)92268-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)92268-9).
- [60] Kuloglu O, Bayram NA, Erten Ş, Durmaz T, Keles T, Sari C, et al. Assessment of left ventricular function by tissue Doppler imaging in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology Reports* 2012;4:6. <https://doi.org/10.4081/rr.2012.e6>.
- [61] Park SH, Sohn IS, Joe BH, Hwang HJ, Park CB, Jin ES, et al. Early cardiac valvular changes in ankylosing spondylitis: a transesophageal echocardiography study. *Journal of cardiovascular ultrasound* 2012;20:30-6. <https://doi.org/10.4250/jcu.2012.20.1.30>.
- [62] Büyükterzi Z, Alpaydin MS, Akkurt HE, Yilmaz H. Epicardial adipose tissue thickness is associated with disease severity in patients with newly- diagnosed ankylosing spondylitis. *Kocaeli Med J* 2019;8:97-103. <https://doi.org/10.5505/ktd.2019.80037>.
- [63] Zungur M, Gul I, Kobak S. Evaluation of Right Ventricular Function by Speckle-Tracking Echocardiography in Patients with Ankylosing Spondylitis: A Case-Control Study. *Acta Cardiologica Sinica* 2018;34:159-65. [https://doi.org/10.6515/acs.201803_34\(2\).20170916a](https://doi.org/10.6515/acs.201803_34(2).20170916a).

7. Données à collectées dans le cadre d'une prise en charge optimale standardisée des spondyloarthrites axiales

7.1. Introduction

L'objectif thérapeutique principal, défini dans les recommandations françaises de prise en charge des SpA, est « d'améliorer la qualité de vie, de contrôler les symptômes et l'inflammation, de prévenir les dommages structuraux, de préserver ou restaurer les capacités fonctionnelles, l'autonomie et la participation sociale des patients » (40). Afin d'atteindre ces nombreux objectifs les rhumatologues ont de nombreux outils à disposition (interrogatoire, examen physique, auto-questionnaires, examens d'imagerie, examen biologique...) sans qu'une hiérarchisation de leur utilité ait été réalisée. Ainsi, il peut exister des divergences dans l'évaluation au diagnostic et pendant le suivi des patients atteints de SpA axiale alors que la standardisation de la prise en charge des maladies chroniques peut améliorer le devenir du patient. J'ai participé à un travail national présidé par le Pr. Dougados visant à élaborer une liste de variables à recueillir lors du diagnostic et pendant le suivi des SpA axiales avec l'objectif final d'harmoniser la prise en charge systématique de ce rhumatisme inflammatoire.

Ce travail a été publié dans *Joint Bone Spine* (impact factor 2020 : 4.9, rang C) où j'apparais en 2^{ème} auteur.

Dans cet article ma contribution a été de :

- Réaliser un travail de revue systématique de la littérature visant à identifier les examens paracliniques d'imagerie et de biologie à effectuer systématiquement au diagnostic et durant le suivi des SpA axiales.
- Présenter l'ensemble des données de la littérature sur ce sujet lors de la réunion des Rencontres d'Expert en Rhumatologie fin 2019 auprès d'une centaine de rhumatologues hospitaliers et libéraux.
- Participer au processus d'élaboration d'un consensus déterminant les variables à recueillir systématiquement chez les patients atteints de SpA axiale.
- Participer à la révision critique de l'article.

En utilisant une approche fondée sur les preuves et un consensus d'experts, nous avons défini un ensemble de variables de base à collecter juste après le diagnostic et pendant le suivi des patients atteints de SpA axiale en pratique quotidienne.

Nous montrons dans ce travail que :

- Parmi 51 variables étudiées, les variables retenues comme étant obligatoires à collecter ou très utiles une fois le diagnostic de SpA axiale posé sont :
 - Auto-questionnaires : douleur lombaire nocturne, durée raideur matinale, échelle visuelle analogique d'évaluation globale de la maladie par le patient, ASDAS, BASDAI
 - Interrogatoire : antécédents de psoriasis/uvéite/MICI, symptômes d'insuffisance cardiaque (dyspnée, malaise)
 - Examen physique : rotation articulation coxo-fémorale, nombre d'articulations gonflées, test de Schober
 - Imagerie : radiographie du bassin et du rachis
 - Biologique : CRP et bandelette urinaire
- Nous avons aussi défini la périodicité de la réévaluation de ces variables qui devraient être rapportées :
 - A chaque visite pour la douleur nocturne et/ou la raideur matinale
 - Deux fois par an pour l'échelle visuelle analogique d'évaluation globale de la maladie par le patient
 - Une fois par an pour l'ASDAS, BASDAI, survenue d'uvéite/MICI/psoriasis, signes d'insuffisance cardiaque, rotation coxo-fémorale, nombre d'articulations gonflées
 - Une fois tous les 2 ans : test de Schober
 - De façon non systématique : radiographies des sacro-iliaques, radiographies du rachis, CRP, bandelette urinaire

7.2. Article 5 : Data to be collected for an optimal management of axial spondyloarthritis in daily practice: Proposal from evidence-based and consensual approaches.

Data to be collected for an optimal management of axial spondyloarthritis

in daily practice: Proposal from evidence-based and consensual approaches

Athan BAILLET¹, Xavier ROMAND^{1*}, Arnaud PFIMLIN^{2*}, Mickael DALECKY^{1*}, Pascal CLAUDEPIERRE³, René-Marc FLIPO², Adeline RUYSSSEN-WITRAND⁴, Philippe GAUDIN¹, Laure GOSSEC⁵, Anna MOLTO⁶, Cédric LUKAS⁷, Sophie POUPLIN⁸, Martin SOUBRIER⁹, Daniel WENDLING¹⁰, Françoise FAYET⁹, Christophe HUDRY¹¹, Eric SENBEL¹², Marjorie SCHWARTZ³, Cécile HACQUARD-BOUDER¹³ and Maxime DOUGADOS⁶

* Xavier ROMAND, Arnaud PFIMLIN, Mickael DALECKY are co-second authors

1. Univ. Grenoble Alpes, GREPI TIMC, CNRS UMR 5525, Grenoble, France
 2. Rheumatology, R Salengro Hospital, University of Lille, Lille, France.
 3. Département de Rhumatologie, Henri Mondor Hospital, APHP, Université Paris Est Créteil, EA 7379 - EpidermE, F-94010, Créteil, France
 4. Rheumatology, UMR 1027 Inserm, Paul Sabatier University and Purpan Hospital, Toulouse, France. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris
 5. Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, GRC-UPMC 08 (EEMOIS); AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Rheumatology, Paris, France.
 6. Paris Descartes University. Department of Rheumatology - Hôpital Cochin. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris. INSERM (U1153) Clinical epidemiology and biostatistics, Université de Paris. Paris, France
 7. Department of Rheumatology, CHU Montpellier and UMR5535 CNRS, Montpellier, France.
 8. Department of Rheumatology, Bois-Guillaume Hospital, Rouen, France
 9. Department of Rheumatology, Gabriel Montpied University Hospital, Clermont-Ferrand, France.
 10. Department of Rheumatology, CHRU Besançon, and EA 4266, Université de Franche-Comté, Besançon, France.
 11. Department of Rheumatology - Hôpital Cochin. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris.
 12. AP-HM, Rheumatology Department, Sainte Marguerite Hospital, Marseille, France.
 13. Rheumatologist, Yvetot, France
- Corresponding author: Prof. Athan Baillet, Univ. Grenoble Alpes, GREPI TIMC, UMR 5525, France

Disclosures of interest: Maxime DOUGADOS has received honorarium fees from Abbvie for his participation as the convenor of this initiative. Athan BAILLET has received honorarium fees from Abbvie for his participation as the coordinator of the systematic literature review.

Xavier ROMAND, Arnaud PFIMLIN and Mickael DALECKY have received honorarium fees from Abbvie for their participation as fellows of this initiative. All the other coauthors have received honoraria from Abbvie as members of the scientific committee.

Funding: this study has been conducted in two parts: the first one (evidence-based) was conducted thanks to a support from Abbvie France. AbbVie representatives were present during the meetings of this first part but did not influence the scientific discussions. AbbVie did not review the content or have influence on this manuscript. The second part of this initiative (consensus) has been conducted thanks to a support from the scientific non-profit organization: Association de Recherche Clinique en Rhumatologie

Key words: comorbidities, physical examination, spondyloarthritis, management

ABSTRACT

Objective: To propose a list of variables to be collected at the time of the diagnosis and during the follow-up of patients with axial spondyloarthritis (ax-SpA) for an optimal management in daily practice.

Methods: The process comprised (1) the evaluation of the interest of 51 variables proposed for the assessment of ax-SpA by means a systematic literature research (2) a consensus process involving 78 hospital-based or office-based rheumatologists ,considering the collection of the variable in a 4 grade scale from "potentially useful" to "mandatory", (3) a consensus on optimal timeline for periodic assessment of the selected variables on a 5 grade scale from "at each visit" to "never to be re-collected".

Results: The systematic literature research retrieved a total of 14,133 abstracts, of which 213 were included in the final qualitative synthesis. Concerning the data to be collected at the time of the diagnosis and during follow-up, we proposed to differentiate the results based on a) the way of collection of the variables (*e.g.* patient's self- administered questionnaires *versus* physician's interview *versus* physical examination and *versus* investigations) b) the importance of the collection of the variables based on the opinion of the rheumatologists" c) the optimal timeline between 2 evaluations of the variable based on the opinion of the rheumatologists

Conclusions: Using an evidence-based and an expert consensus approaches, this initiative defined a core set of variables to be collected and reported at the time of the diagnosis and during follow-up of patients with ax-SpA in daily practice.

INTRODUCTION

Axial spondyloarthritis (ax-SpA) is one of the most common chronic inflammatory rheumatic diseases [1], which mainly affects young adults. The functional consequences of inadequately controlled disease alter both patient's quality of life and professional capacities with direct impact on healthcare costs [2]. In addition to the disabling joint manifestations, some ax-SpA patients develop extra-rheumatological manifestations such as inflammatory bowel disease, uveitis and psoriasis. The prognosis of both rheumatological features (*e.g.* axial disease, peripheral synovitis/enthesitis/dactylitis) and extra-rheumatological manifestations of ax-SpA have dramatically improved during the last decades, especially with regard to new treatments [3], earlier diagnosis [4] and imaging investigations [5].

The number of variables proposed to evaluate an ax-SpA patient (*e.g.* patient's self-administered questionnaires, physician's interview, physical exam, specific ax-SpA imaging modalities, ...) is enormous. Therefore, a selection of the number of these variables would facilitate the daily task of the rheumatologists. Moreover, discrepancies in collecting and reporting these outcome measures have been observed between rheumatology teams as well as between health professionals who manage ax-SpA patients. For instance, substantial differences were observed in physical examination of spinal mobilities between physiotherapists and physicians [6] or between physicians.

In order to standardize the collection of variables in both clinical trials and daily practice, two decades ago, the Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS) developed and reviewed SpA-specific instruments which were analyzed through the Outcome Measures in Rheumatology (OMERACT) filter for relevance and feasibility [7, 8] by means of Delphi

method and with a consensus meeting of the working group. ASAS endorsed core-sets of domains were Physical Function, Spinal Stiffness, Spinal Mobility Measurement and Patient Global Assessment of disease and endorsed also instruments to measure these domains. More recently, ASAS has detailed in a handbook the best way to collect outcome measures (7) and also the way of collection of outcome measures in clinical trials (4). Finally, the importance of a check up to be performed by the rheumatology team not only at the time of the diagnosis (usually called initial systematic review) but also during follow-up (usually called periodic systematic review) has been emphasized by health care providers such as the National Institute for Health and Care Excellence (NICE) recommendations in the United Kingdom [9] or the quality standards proposed by ASAS [10].

The remaining question is related to the detailed content of these reviews and in particular the detailed list of variables reflecting the activity and the severity of the disease to be collected. Standardization of management of diseases and in particular chronic diseases has been proven to be effective [11]. This is particularly true at the time where the concept of treat to target is becoming more and more important in the field of spondyloarthritis [12, 13]. The target is defined by a specific threshold in an outcome variable evaluating a surrogate marker of the risk of the disease (*e.g.* disease activity predisposing for subsequent structural damage, cardiovascular risk factors such as blood pressure or cholesterol level for subsequent cardiovascular diseases, ...) This concept requires at the minimum the collection of the outcome measure defining the target. The current practice concerning the collection of the surrogate markers of the main risks of the disease (*e.g.* disease activity via the ASDAS instrument, cardiovascular diseases risk factors via cardiovascular risk factors) is far to be optimal [14-18]. These preliminary remarks prompted us to run an initiative aimed at proposing a list of variables to be systematically collected and reported in patients suffering from ax-SpA in daily practice differentiating the variables to be collected at the time of diagnosis and during follow-up.

METHODS

This process included systematic literature review and a consensus process, in accordance with a methodology adopted in previous similar initiatives (e.g. Rencontres d'Experts en Rhumatologie (RER) and 3E (Evidence, Expertise, Exchange)) [14, 15].

Definition of the scope of this initiative

During the first meeting of the steering committee of this initiative (a convenor (MD), a facilitator (AB), 3 rheumatology fellows (XR, AP, MD), 13 rheumatologists all experts in the field of SpA and 2 rheumatology nurses (FF and JS)) the following tasks were proposed:

- To exclude from this initiative the data to be collected in order to detect and/or prevent comorbidities. In this area, the steering committee proposed to strictly follow the recommendations issued from a similar (RER) initiative [19, 20].
- To exclude from this initiative the variables permitting to check the treatment adherence by the patient. Here again, in this area, the steering committee proposed to strictly follow the recommendations issued from a similar (RER) initiative [21].
- To exclude from this initiative the investigations aimed at making a diagnosis. The postulate was the following: “Considering that the diagnosis of ax-SpA is confirmed which are, in your opinion, the information you need to collect and report in order to optimally monitor/manage the patients?”
- To consider not only the list for variables to collect at the time of the diagnosis but also for the selected variables the minimum interval of time these variables have to be collected again.
- To propose a list of potential variables which will be in the scope of the systematic literature research. The list of these variables explored by the systematic literature review comprised “conventional” outcome measures of ax-SpA disease activity and severity (e.g. BASDAI, BASFI, ASDAS...). However, in order to be in a position to check whether these variables have been not only collected but also reported in the patient’s medical file (usually an Electronic

Medical Record), some variables were split-into different categories. For example, we proposed to check the interest of reporting the total score of the BASDAI versus the interest of reporting the score of each individual question of the BASDAI. Moreover, we proposed also to check the interest of reporting extra-rheumatological manifestations considering not only the most frequent ones (e.g. uveitis, psoriasis, inflammatory bowel diseases) but also more rare events such as cardiovascular diseases (e.g. aortic regurgitation [22, 23], atrioventricular conduction disturbances [24, 25] and urolithiasis [26]). For each variable we tried to be as closer as possible from the daily practice. For example, in order to check cardiovascular abnormalities, we proposed to check the interest of the interview of the patient versus the systematic prescription of an electrocardiogram and/or an echocardiogram.

- To anticipate the presentation of the results in a chronological order reflecting the daily practice (*i.e.* patient's self-administered questionnaire followed by the physician's interview physical examination, and finally prescription of laboratory tests and/or imaging modalities). Using this procedure, a specific question could be included at different stages. For example, the question related to psoriasis occurred in the section "physician's interview" but also in the section "physical examination" and in the "other investigations" (e.g. systematic visit to a dermatologist). The section related to imaging modalities was split into two sub-sections: one focused on the ax-SpA-specific imaging modalities of and one focused other investigations because of the importance of the imaging modalities evaluating the activity or the severity of ax-SpA.

Hierarchical systematic literature reviews

The systematic literature review was performed by 3 fellows (MD, XR, AP) from December 2018 to April 2019, in order to search for evidence of the usefulness and relevance of each variable in the context of a systematic review in ax-SpA.

The first step of the hierarchical systematic literature reviews consisted of checking whether there were data available in international European League Against Rheumatism (EULAR) or American College of Rheumatology (ACR) recommendations for SpA management. If none were available, the second step retrieved data in systematic literature reviews or meta-analysis. If these were not available, the third step focused on clinical trials and ax-SpA cohorts. As the search was hierarchical, when data was found at a specific step, the next steps were not applied. We used a sensitive search of Medline via PubMed. The combination of key words used for this search and the flow charts are detailed in **supplementary Figure 1**. This search was completed by a hand search of references from relevant articles, or reviews. From each selected article, the following information was extracted: definition of the variable, measurement properties according to the OMERACT filter (Truth, Discrimination and Feasibility) [27], how to report its occurrence, prevalence and incidence of abnormalities of each variable in ax-SpA and the general population and proposed a minimum interval of time between two collections/reports. All collected data were compiled in tables and graphs to help appraisal.

Consensus process and votes for agreement

During a two-day physical meeting in October 2019, the literature review was presented and discussed with an expert panel of 83 rheumatologist experts. Amongst them 53% were female; 44% had office- based activities.

The literature review was split into 3 workshops, each repeated 3 times. Every attendee participated at each workshop once. During these workshops, one fellow presented the information issued from the literature search and one convenor (member of the steering committee) managed the discussion between the participants. The next day, members of the expert panel were asked to state their level of agreement concerning the collection and the report of the different variables based on a 4 grade scale: (i) not very useful, (ii) potentially useful,

(iii) very useful, (iv) mandatory. Consensus for usefulness of a specific variable was retained if at least 66% of the panel voted for the same grade. If not, the two grades with the higher percentages were selected and the expert panel were asked to vote again. The final selected grade was the one obtaining at least 50% of the votes during this second round (**supplementary figure 2**).

Thereafter for the variables which have been considered as very useful or mandatory, the expert panel was asked to define the minimum interval of time between two collections they consider optimal using a 5 grade scale: (i) at each visit, (ii) every 6 months, (iii) every year, (iv) every other year or more, (v) never re-collected systemically. For variables related to structural evaluation the following grade scale was proposed: (i) every other year, (ii) every 5 years, (iii) more than 5 years apart, (iv) never re-collected systemically.

RESULTS

Systematic literature reviews

A total of 14,133 abstracts were retrieved by the searches, of which 213 were included in the final qualitative synthesis (**supplementary figure 1**).

Core set-of variables to collect and report during the initial systematic review in ax-SpA

The list of the 51 evaluated variables and the results of the votes of the expert panel are summarized in **table 1**. The proposed core set of variables to collect and report in the initial systematic review in axial spondyloarthritis based on this initiative is presented in **figure 1**.

1. Patient reported outcomes

Despite literature concerning nocturnal pain and morning stiffness was scarce [28], these two variables were the only patient-reported outcome (PRO) that were considered as mandatory to be collected. Patient global visual analogue scale (VAS), BASDAI and ASDAS global scores were considered very useful, whereas the reporting of the 6 questions of the BASDAI score and physician global or fatigue VAS were considered potentially useful. Fibromyalgia Rapid Screening Tool (FIRST) and BASFI questionnaires were considered not very useful.

2. Physician's interview

The expert panel considered mandatory collecting and reporting history of uveitis, psoriasis and inflammatory bowel disease in the initial systematic review in ax-SpA patients. Signs of heart failure (dyspnea and malaise) were considered very useful, whereas collecting and reporting the history of kidney involvement was only considered potentially useful and history of amyloidosis not very useful.

3. Physical examination of ax-SpA

None of the variables were considered mandatory. Modified Schöber test, coxo-femoral rotations and swollen joint count were considered very useful. Indeed other variables of the physical examination were only considered potentially useful or not very useful.

4. Specific ax-SpA imaging modalities

Sacro-iliac joints radiographs were the only variable that was considered mandatory in the systematic review. Spine radiographs were considered very useful. Other variables related to structural damage were considered not very useful. It must be noticed that the investigation by magnetic resonance imaging (MRI) in order to check for either inflammation or structural damage was only considered as potentially useful.

5. Non-specific-ax-SpA imaging modalities and laboratory tests

C-reactiv protein (CRP) was the only variable that was considered mandatory in the systematic review. Urine strip test was considered very useful. Of note, the panel did not consider the HLA B27 typing as very useful in case of a patient with a definite diagnosis of ax-SpA.

6. Periodic systematic review in ax-SpA

The minimum interval of time for repetition of the variables which have been considered as either “mandatory” or “very useful” is presented in **table 1** and **figure 2**. A systematic evaluation at each visit was only proposed for morning stiffness and nocturnal pain whereas ASDAS and BASDAI were proposed to be systematically collected at least yearly. Moreover, search for both extra-rheumatological manifestations (*e.g.* uveitis, psoriasis, IBD) and hip involvement was also proposed to be systematically checked at least yearly. A systematic repetition of imaging modalities was not considered as of great interest

DISCUSSION

This initiative permitted to propose a list of variables to be collected in a patient suffering from a definite ax-SpA, in order to facilitate an optimal management in daily practice. The methodology used for this initiative has some strengths and weakness. Moreover the obtained results might be considered as intriguing in particular in comparison to the scientific literature in this area.

One of the main strengths of the methodology used for this initiative is the combination of an evidence-based and a consensus approach with a representative panel of rheumatologists.

However, the fact that we have excluded some outcome measures out of the list of variables considered for systematic review could be considered as a weakness. For example, smoking habits is a well-known parameter responsible for some comorbidities such as cardiovascular diseases [29] or lung cancer [30]. Moreover, smoking habits has been recognized as a predisposing factor of the occurrence of ax-SpA and as a predisposing factor of structural damage in ax-SpA [31]. Because this variable has been included in the list of variables to be checked in the previous task force which was focused on comorbidities in chronic inflammatory rheumatic diseases [15, 32], we have not considered this variable in this current initiative. The same criticism could be done with regard to the height of the patient. One could consider this variable as crucial in the physical examination of a patient with ax-SpA as a good proxy of the severity of the axial involvement (height loss in case of loss of lumbar lordosis and /or thoracic kyphosis). Because this variable has to be collected in order to calculate the body mass index and because the collection of body mass index has been strongly recommended to check for comorbidities [15, 32] this variable has not been included in this current initiative.

Some results can be considered as intriguing in comparison to the information provided in the literature. This can be the case for some variables which have not been considered as very useful such as the HLA B27 typing or the MRI investigations. In these areas there is an important number of publications and recommendations emphasizing the importance of these variables in the field of ax-SpA. This importance is usually considered at two levels: either for diagnostic or for prognostic purpose. Here we would like to emphasize that the postulate of this current initiative was to focus on the variables to be collected in patients with a definite diagnosis. We took this decision in order to be in accordance with the current ASAS quality standards [10] proposing that a patient should benefit from a comprehensive/holistic review within 2 months after the diagnosis has been made (initial systematic review) and also should benefit from this

review periodically (periodic systematic review). This approach permitted us to detail the content of the recommended initial and periodic systematic reviews.

Concerning the prognostic value of variables, the discrepancies existing between the literature and the variables proposed by this initiative might be explained by the fact that despite a relevant odds-ratio observed in clinical epidemiological studies, the implementation in daily practice might have been considered as questionable by the expert panel of this initiative. For example, MRI inflammation on sacro-iliac joint [33] and/or vertebra corner [34] are strong and independent predisposing factors of structural progression such as syndesmophyte formation or growth. One would expect that MRI would have been included by the panel of rheumatologists in this reported initiative. This non-selection is probably explained by the lack of clinical relevance at the individual level of data observed in epidemiological studies. Indeed, most of new bone formation still develop without previous MRI inflammation [34]. Hence at the patient level, MRI inflammation only marginally predicts new syndesmophyte formation [35] explaining why this imaging modality is not recommended in daily practice [3, 36]. Furthermore, in the German Spondyloarthritis Inception Cohort (GESPIC) and the Outcome in Ankylosing Spondylitis International Study (OASIS) cohorts an increase of modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score (mSASSS) score of 2 units, corresponding to the formation of a new syndesmophyte (increase of 3 mSASSS units in case of bridging syndesmophyte), was only associated with a limited alteration of function scores [37, 38]. These data might explain why variables predicting structural progression were not included in the core set of variables to be collected in our initiative and were discarded from the repetition of these investigations. Finally, another potential explanation of some intriguing results of this initiative might be the lack of interest (or even the potential deleterious effect [39]) of a systematic screening of a rare event. For instance, low grade aortic regurgitation [22, 23] and/or atrioventricular conduction disturbances [24, 25] may be often found by systematic

electrocardiogram and echocardiogram examinations in ax-SpA patients despite the absence of clinical manifestation. However systematic electrocardiogram and echocardiogram were not proposed to be included in the core set of variables to collect in our initiative as clinical relevance of these abnormalities are not clear.

In summary, to our knowledge, for the first time this initiative permitted to propose a list of variables to be collected during initial and periodic systematic reviews of a patient suffering from ax-SpA. This initiative should facilitate the implementation in daily practice of the recently published quality standards. Obviously similar initiatives conducted in other parts of the world might be of interest to check the inter- country variability of the results. Finally, this initiative will necessitate regular updates as some new outcome measures may emerge or change over time.

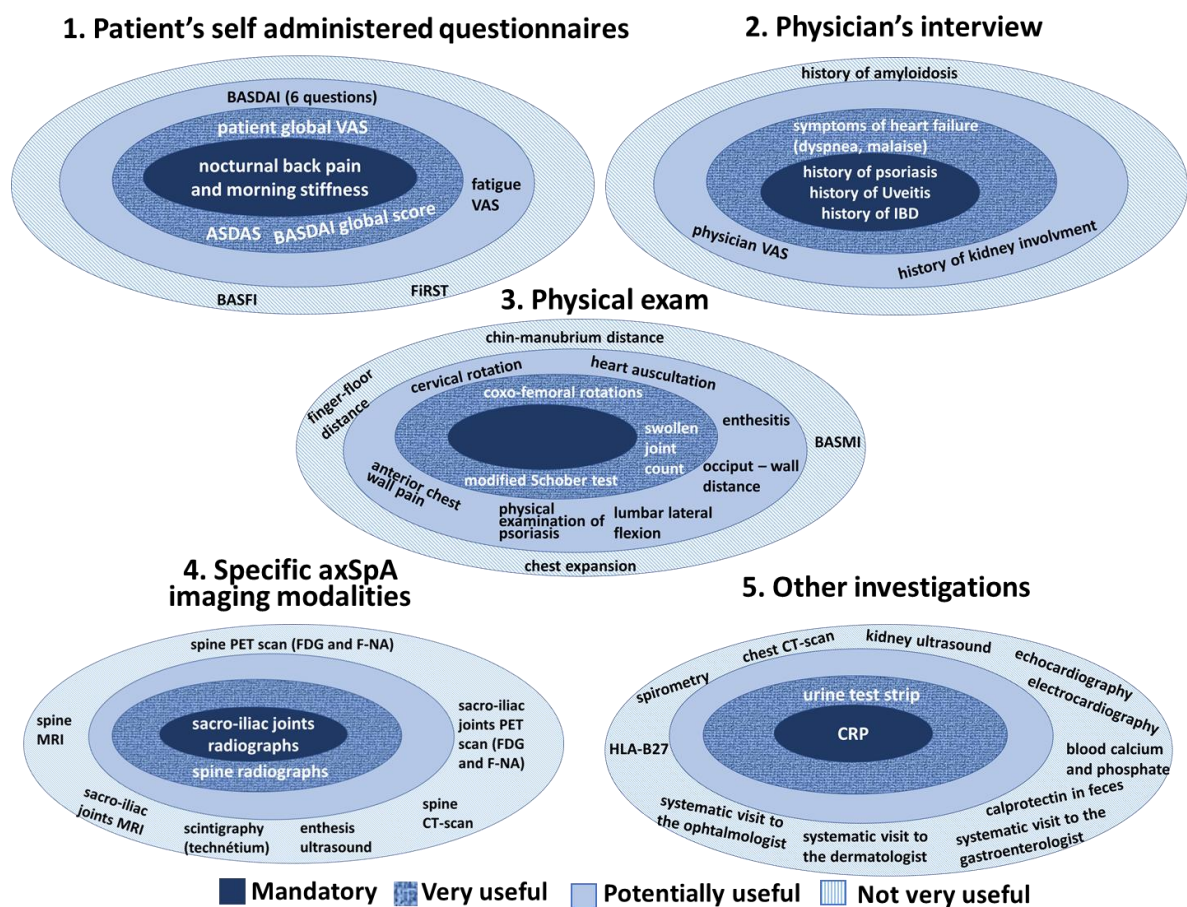
Table 1. Variables to collect and report for initial and periodic systematic review of axial spondyloarthritis

| VARIABLES TO COLLECT AND REPORT | RELEVANCE | | | INTERVAL OF TIME BETWEEN COLLECTIONS/REPORTS | | |
|--|--------------------|-------|-----|--|-------|----|
| | | Votes | % | | Votes | % |
| 1. Patient's self-administered questionnaires | | | | | | |
| patient global VAS * | very useful | 40/71 | 53 | 6 months | 41/71 | 58 |
| nocturnal back pain and/or morning stiffness ** | mandatory | 39/71 | 55 | each visit | 46/71 | 65 |
| BASDAI (global score) | very useful | 55/71 | 76 | yearly | 53/71 | 75 |
| BASDAI (6 questions reported) | potentially useful | 52/71 | 73 | - | | |
| ASDAS | very useful | 56/71 | 79 | yearly | 52/71 | 73 |
| FIRST | not very useful | 45/71 | 63 | - | | |
| Fatigue VAS * | potentially useful | 52/71 | 73 | never systematically | 52/71 | 73 |
| BASFI | not very useful | 39/71 | 55 | never systematically | 61/79 | 77 |
| 2. Physician's interview | | | | | | |
| history of uveitis ** | mandatory | 59/78 | 76 | yearly | 47/71 | 66 |
| history of psoriasis ** | mandatory | 58/80 | 72 | yearly | 36/71 | 51 |
| history of Inflammatory bowel diseases ** | mandatory | 66/8 | 82 | yearly | 43/71 | 43 |
| signs of heart failure (dyspnea, malaise) | very useful | 69/71 | 97 | never systematically | 46/71 | 65 |
| history of kidney involvement | potentially useful | 65/71 | 91 | - | | |
| history of amyloidosis | not very useful | 69/77 | 89 | - | | |
| physician global VAS * | potentially useful | 37/71 | 52 | never systematically | 69/83 | 83 |
| 3. Physical exam | | | | | | |
| anterior chest wall pain ** | potentially useful | 49/71 | 59 | never systematically | 52/78 | 66 |
| occiput – wall distance # | potentially useful | 44/71 | 61 | every 2 years or more¥ | 47/71 | 66 |
| modified Schober (cm) | very useful | 43/71 | 61 | every 2 years or more¥ | 47/71 | 66 |
| lumbar lateral flexion (cm) | potentially useful | 56/71 | 79 | every 2 years or more¥ | 47/71 | 66 |
| chest expansion (cm) | not very useful | 40/71 | 56 | every 2 years or more¥ | 47/71 | 66 |
| finger-floor distance (cm) | not very useful | 39/71 | 55 | every 2 years or more¥ | 47/71 | 66 |
| chin-manubrium distance (cm) | not very useful | 47/71 | 66 | every 2 years or more¥ | 47/71 | 66 |
| cervical rotation (degrees) | potentially useful | 52/71 | 73 | every 2 years or more¥ | 47/71 | 66 |
| coxo-femoral rotations ** | very useful | 44/71 | 62 | yearly | 53/71 | 75 |
| swollen joint count | very useful | 40/71 | 56 | yearly | 40/71 | 56 |
| enthesitis | potentially useful | 50/71 | 70 | never systematically | 45/71 | 63 |
| BASMI (total score) | not very useful | 58/71 | 82 | never systematically | 69/77 | 89 |
| physical examination of psoriasis | potentially useful | 44/71 | 62 | never systematically | 50/71 | 70 |
| heart auscultation | potentially useful | 55/71 | 78 | never systematically | 47/71 | 66 |
| 4. Extra-rheumatological manifestations | | | | | | |
| systematic visit to the ophthalmologist ** | not very useful | 63/79 | 79 | - | | |
| systematic visit to the dermatologist ** | not very useful | 70/81 | 86 | - | | |
| systematic visit to the gastroenterologist ** | not very useful | 71/88 | 88 | - | | |
| calprotectin in faeces ## | not very useful | 66/81 | 82 | - | | |
| electrocardiogram | not very useful | 54/80 | 68 | - | | |
| echocardiography | not very useful | 72/80 | 90 | - | | |
| spirometry | not very useful | 60/79 | 74 | - | | |
| chest CT-scan | not very useful | 64/80 | 81 | - | | |
| urine test strip | very useful | 70/21 | 99 | never systematically | 55/78 | 71 |
| kidney ultrasound | not very useful | 73/81 | 93 | - | | |
| blood calcium and phosphate | not very useful | 50/70 | 71 | - | | |
| HLA B27 | not very useful | 36/71 | 51 | - | | |
| CRP | mandatory | 53/74 | 72 | yearly | 41/71 | 58 |
| 5. Other investigations | | | | | | |
| sacro-iliac joints X-Rays | mandatory | 40/71 | 56 | never systematically | 45/71 | 63 |
| spine X-Rays | very useful | 44/71 | 62 | never systematically | 49/71 | 69 |
| sacro-iliac joints MRI | not very useful | 48/71 | 68 | - | | |
| spine MRI | not very useful | 52/73 | 72 | - | | |
| spine CT-scan | not very useful | 72/74 | 94 | - | | |
| bone scintigraphy | not very useful | 72/73 | 98 | - | | |
| sacro-iliac joint PET scan | not very useful | 73/73 | 100 | - | | |
| spine PET scan | not very useful | 74/74 | 100 | - | | |
| Enthesis ultrasound | not very useful | 57/73 | 78 | - | | |

ASDAS=Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score, BASDAI=Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, BASFI=Bath Ankylosing Spondylitis Functionnal Index, BASMI=Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index, CRP=C-Reactive Protein, CT=computerized tomography, FIRST=Fibromyalgia Rapid Screening Tool, HLA=Human Leukocyte Antigen, MRI=Magnetic resonance imaging, PET=positron emission tomography.

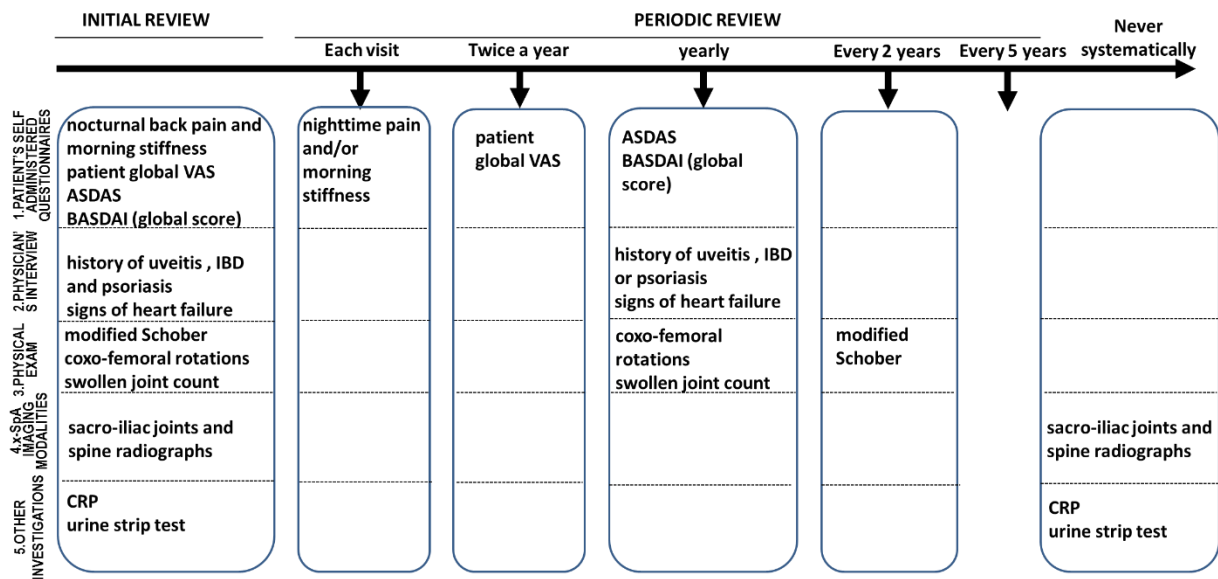
* on Visual Analogic Scale (VAS) a 0 to 10 scale, ** a YES or NO answer, # in cm, ## in mmol/mg feces, ¥=Time lime for spinal mobility was consider at once

Figure 1. Proposed core sets of variables to collect and report during the initial systematic review in axial spondyloarthritis



ASDAS=Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score, BASDAI=Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, BASFI=Bath Ankylosing Spondylitis Functionnal Index, BASMI=Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index, CRP=C Reactive Protein, CT=computerized tomography, FIRST=Fibromyalgia Rapid Screening Tool, HLA=Human Leukocyte Antigen, MRI=Magnetic resonance imaging, PET=positron emission tomography.

Figure 2. Proposed interval of time between two systematic collections and reports of variables considered as “mandatory” or “very useful” by the panel of rheumatologists



ASDAS=Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score, BASDAI=Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, Spondylitis Metrology Index, CRP=C-Reactive Protein, IBD = inflammatory bowel diseases, PRO = Patient Reported Outcomes *i.e. patient's self-administered questionnaire*

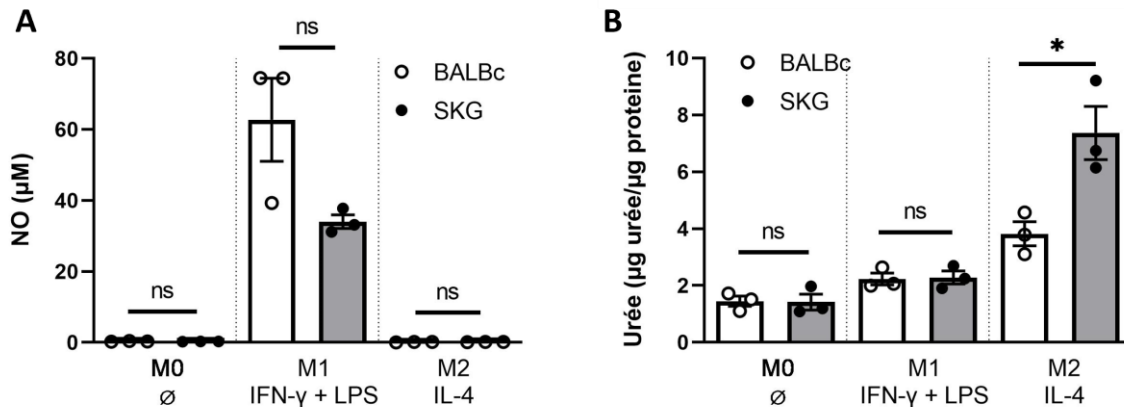
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les SpA sont des rhumatismes inflammatoires chroniques fréquents et invalidants dont l'étiopathogénie est encore mal comprise. Une combinaison de facteurs incluant des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux et des facteurs mécaniques sont à ce jour évoqués pour expliquer le passage d'un état sain vers la SpA. Les données les plus récentes indiquent que l'immunité innée a une place centrale dans la physiopathogénèse suggérant que les SpA sont des maladies à prédominance auto-inflammatoires (99). La dysbiose intestinale induit une perméabilité intestinale accrue, source de translocation bactérienne et de leurs produits bactériens, qui pré-activent les monocytes circulants mais aussi les ILC3 et lymphocytes T $\gamma\delta$ résidents dans l'intestin qui sont secondairement recrutés dans les articulations. Les analyses métagénomiques du microbiome intestinal menées dans les SpA n'ont pas permis d'identifier la ou les bactéries responsables de la maladie. L'étude de l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia* nous a permis de nous focaliser sur l'étude de l'impact d'une infection bactérienne, par une bactérie reconnue comme étant responsable de rhumatisme inflammatoire, sur l'immunité innée.

Dans mon travail de thèse, j'ai étudié l'hypothèse selon laquelle le macrophage pouvait être infecté par *Chlamydia*, et que telle un « cheval de Troie », il permettait la dissémination de la réponse inflammatoire depuis la muqueuse génitale jusqu'à l'articulation. Nous avons mis en évidence que le macrophage est nécessaire à la dissémination du *Chlamydia* dans le tractus génital et dans la circulation systémique comme en atteste la présence de l'ADN de *Chlamydia* et du *Chlamydia* luciférase-GFP dans la rate des souris SKG (395). Nous avons démontré que les macrophages sont nécessaires au développement de l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia*, et que les cytokines clefs dans la SA comme le TNF, l'IL-23 et l'IL-17 sont aussi impliqués dans ce sous-type de SpA. Cependant, il reste encore à caractériser sous quelle forme *Chlamydia* persiste dans le cytoplasme du macrophage (corps élémentaire ? corps réticulé ? forme persistante ?) et s'il est sous une forme viable. En effet, la détection de l'ADN de *C. muridarum* dans les tissus n'indique pas nécessairement la présence d'organismes viables et ne constitue donc pas une preuve certaine d'un état de persistance *in vivo*. Un autre point important à étudier est de savoir quel est l'impact *in vivo* de l'infection à *Chlamydia* sur la polarisation macrophagique.

L'existence d'un état de persistance de *Chlamydia* est une piste très intéressante à explorer car elle pourrait expliquer pourquoi les souris SKG développent de l'arthrite et pas les souris BALBc. Dans des conditions de stress, *Chlamydia* peut réagir en entrant dans un état de persistance, état réversible adapté à la survie à long terme caractérisé par une interruption temporaire du cycle de réplication. Dans cet état, *Chlamydia* reste viable mais non cultivable. De nombreux stimuli induisent la persistance des *Chlamydia*, notamment l'IFN- γ . Ce dernier a des effets antimicrobiens sur *Chlamydia* et limite sa réplication. Il existe un défaut de production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissant spécifiquement l'antigène MOMP de *Chlamydia* chez la souris SKG (342). Ce déficit initial de production d'IFN- γ pourrait faciliter la réplication de *C. muridarum* et avoir un impact sur la persistance de l'infection. Il est envisageable que les macrophages des souris SKG abritent ainsi des niveaux plus élevés de *Chlamydia* parce qu'ils ne peuvent pas les éliminer correctement en raison d'une sécrétion d'IFN- γ insuffisante. Or, nous savons déjà que la charge bactérienne en *Chlamydia* est corrélée à la sévérité de l'arthrite (342). Ce déficit de production en IFN- γ observé dans le modèle SKG est d'ailleurs retrouvé dans la SA humaine (396). Chez l'Homme, un défaut de réponse Th1 semble expliquer que l'arthrite réactionnelle devienne chronique. Nous avons montré de façon indirecte qu'une infection chronique pourrait favoriser l'arthrite. En effet, un traitement antibiotique efficace sur *Chlamydia* débuté dès l'apparition de l'arthrite diminue l'inflammation articulaire comme ce qui est observé dans une étude menée chez l'Homme dans l'arthrite réactionnelle chronique (261, 395). Dans la littérature, la persistance de *Chlamydia* a été explorée principalement en culture cellulaire et certaines observations ont été reproduites *in vivo*. Démontrer un état de persistance de *Chlamydia in vivo* dans des tissus éloignés du site d'infection est un défi et nécessite de multiples techniques d'analyses complémentaires (RT-qPCR, culture de *Chlamydia* à partir des tissus, microscopie électronique...). La polarisation M2 des macrophages est une condition favorable à la persistance de *Chlamydia* (295). Des données préliminaires *ex vivo* suggèrent que les macrophages issus de la moelle osseuse des souris SKG ont une polarisation M2 (IL-4) plus franche que les macrophages de souris BALBc ce qui pourrait favoriser la persistance de *Chlamydia* (**Figure 24**). Ces données devront être répliquées et confirmées par des techniques additionnelles (RT-qPCR, production cytokinique). Un travail spécifique devra être effectué pour répondre à l'ensemble de ces questions.

Figure 24. Les macrophages issus de la moelle osseuse des souris SKG ont une polarisation M2 préférentielle.

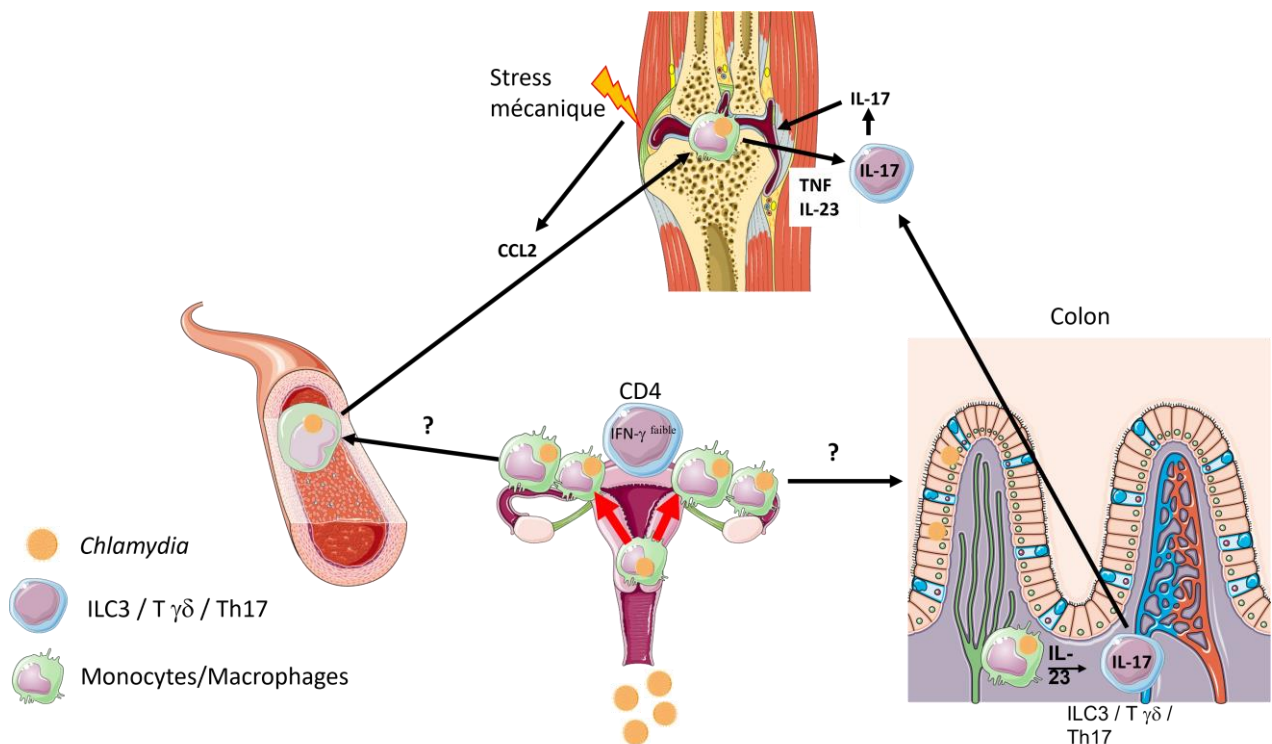


Mesure de la concentration de NO, définissant une polarisation M1, dans le surnageant (A) de culture de macrophages obtenus par différenciation des cellules issues de la moelle osseuse avec du CSF1 (20ng/mL) maintenu pendant 6 jours de souris BALBc (ronds blancs) et SKG (ronds noirs). 20ng/ml d'INF-gamma et 100ng/ml de lipopolysaccharide (LPS) étaient ajoutés au milieu pendant 24h pour induire une polarisation M1 et 20ng/mL d'IL-4 pour entraîner une polarisation M2. L'absence d'ajout de cytokines dans le milieu définissait la polarisation M0. Mesure de la production d'urée, reflétant l'activité arginase (polarisation M2), dans le lysat cellulaire rapportée à la quantité de protéine déterminée par méthode de Bradford (B). t-test, *p-value<0,05, n=3 expériences.

Les muqueuses sont des barrières physiques permettant d'empêcher l'invasion de l'hôte par des agents pathogènes. Les Ig A sont des anticorps produit localement dans les muqueuses et sont un acteur primordial de l'immunité mucoale. Le CD74 est surexprimé par les cellules épithéliales intestinales au cours de l'inflammation digestive (397). L'activation du CD74 favorise des mécanismes impliqués dans la restauration de l'intégrité de la barrière épithéliale digestive (397). Dans les SpA, le taux d'IgA anti-CD74 circulant augmente apportant une preuve indirecte d'une mise en jeu de l'immunité mucoale intestinale (346). Afin d'expliquer la survenue chez certaines femmes de fibrose tubaire dans les suites d'une infection à *C. trachomatis*, l'hypothèse de la survenue d'une infection chronique digestive a été avancée. Ce concept du « Two hit model » admet qu'il existe un portage chronique de *Chlamydia* dans le colon terminal qui serait à l'origine d'une stimulation chronique de l'immunité mucoale entraînant la génération de lymphocytes CD8+ et de cytokines pro-fibrotiques (TNF et IL-13) responsables des lésions fibrotiques (348). La proximité anatomique entre le rectum et l'appareil génital laisse aussi évoquer la possibilité de survenue de réinfections itératives (348). Nous avons mis en évidence la présence d'ADN de *C. muridarum* à 12 semaines post-infection dans le modèle SKG uniquement dans le colon distal/rectum (**Figure 15**). A ce stade nous ne savons pas sous quelle forme est le *Chlamydia* dans le colon (corps élémentaire ? état de

persistance ?) et quelles cellules sont infectées (cellules épithéliales ? cellules immunitaires ?). Il est troublant de constater que l'hypothèse de l'« axe intestin-articulation » actuellement en vogue pour expliquer la SA pourrait être aussi impliqué dans l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia* alors que l'infection initiale survient à distance, dans le tractus génital. Il est possible que le *Chlamydia* qui se retrouve dans l'intestin amorce une activation de l'immunité mucoale et que des cellules immunitaires (ILC3, lymphocytes T $\gamma\delta$) migrent secondairement dans les articulations comme dans la SA (Figure 25).

Figure 25. Hypothèses des mécanismes physiopathogéniques amenant à l'apparition de l'arthrite réactionnelle induite par *Chlamydia*



Chlamydia infecte le macrophage qui migre ensuite dans le tractus génital haut. Les lymphocytes T CD4+ ont un défaut de production en IFN- γ conduisant à un défaut d'élimination et une persistance du *Chlamydia* dans le cytoplasme du macrophage. Le macrophage transporte secondairement le *Chlamydia* du tractus génital vers l'articulation et le colon. Le stress mécanique entraîne une production de CCL2 au niveau de l'enthèse permettant le recrutement de monocytes. Le macrophage dans l'articulation produit du TNF et de l'IL-23 qui est responsable de l'activation locale des ILC3, lymphocytes T $\gamma\delta$ et de l'expansion des lymphocytes Th17. En retour, ces dernières produisent de l'IL-17 responsable de l'arthrite et de l'enthésite. Le *Chlamydia* se propage au niveau de rectum à la suite de l'infection génitale. Le portage chronique intestinal de *Chlamydia* pourrait être responsable d'une activation locale des ILC3 et lymphocyte T $\gamma\delta$ qui migrent secondairement pour être recrutées dans les articulations et entraîner le développement d'une arthrite à la suite de la sécrétion d'IL-23 par les macrophages.

Dans l'arthrite réactionnelle humaine, une dysbiose intestinale s'installe. Elle est caractérisée par une augmentation des entéropathogènes tels que *Erwinia* et *Pseudomonas* alors que des bactéries commensales (*Blautia*, *Coprococcus*, *Roseburia*, et *Collinsella*) se font plus rares (398). Le microbiote intestinal diffère chez les patients avec uvéite et sacroiliite radiographique (prédominance de *Erwinia* et de *Ruminococcaceae*) et enthésites (prédominance *Campylobacter*) (398). De façon intéressante, le genre *Dialister* était aussi enrichi chez ces patients, alors qu'il a été rapporté qu'il était un marqueur microbien d'activité dans la SA (398, 399). Comme l'arthrite réactionnelle fait partie du spectre nosologique des SpA, il est fortement envisageable que la dysbiose intestinale soit un autre point commun entre toutes ces maladies renforçant l'hypothèse de l'axe « intestin-articulation » qui serait impliqué dans le déclenchement de la maladie (398). Cependant, dans les études chez l'Homme il est toujours difficile de savoir si les modifications du microbiote sont la cause ou la conséquence de l'arthrite d'où l'intérêt d'étudier des modèles animaux. Ce travail de thèse illustre que l'étude de modèles animaux permet d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans les rhumatismes inflammatoires chroniques.

Le développement des biothérapies dans le domaine de la rhumatologie a révolutionné la prise en charge des patients atteints de SpA. Afin de démontrer l'efficacité des stratégies de traitement, des études tentent de prouver l'effet des biothérapies sur la prévention de la survenue de lésions structurales arguant que ces dernières sont des données importantes pour juger de l'handicap futur du patient. Cependant, il s'avère que l'altération de la fonction au cours des SpA est surtout expliquée par l'inflammation plus que par les lésions structurales au rachis et aux sacro-iliaques (371, 400, 401). Ce constat rend nécessaire d'apporter de nouveaux outils pour évaluer la composante inflammatoire du rhumatisme. En effet, cette dernière reste difficile à apprécier objectivement du fait que plus de la moitié des SpA n'ont pas de syndrome inflammatoire biologique (377). Dans le domaine de l'expérimentation l'animale, l'étude de la fonction au cours de l'arthrite est que très rarement évaluée comparativement aux dommages structuraux. Nous montrons dans cette thèse que l'étude de la fonction chez le petit animal est possible dans le domaine de la rhumatologie, et est facilitée par l'utilisation de cages connectées numériques (DVC®). Cet outil permet d'obtenir des informations pertinentes sur un paramètre important en médecine humaine. Dans de futures expériences, nous évaluerons la sensibilité du DVC® à capter un changement d'activité spontanée des souris au cours d'un traitement reconnu comme étant efficace dans la SA (anti-TNF, adalimumab) afin de valider l'intérêt de cet outil. L'imagerie par contraste de phase des rayons X que nous étudions actuellement dans nos

modèles murins, en collaboration avec le laboratoire STROBE, est une technique d'imagerie prometteuse permettant d'évaluer à la fois les parties molles et l'os avec une résolution bien supérieure à ce qui est obtenue par des techniques de radiographie conventionnelle basée sur l'étude de l'absorption des rayons X (**Figure 23**). Actuellement, nous explorons l'intérêt de cette technologie sur le petit animal afin d'améliorer nos outils à disposition pour évaluer l'inflammation et la destruction articulaire. Ce travail sur le petit animal est important car il est envisagé que cette nouvelle modalité d'imagerie puisse à terme être disponible en médecine humaine.

L'évolution des rhumatismes inflammatoires chroniques est très hétérogène d'un patient à un autre. La classification nosologique actuelle est basée sur des paramètres cliniques biologiques et radiologique. Néanmoins, sous la même entité nosologique peuvent se retrouver des rhumatismes avec des présentations très diverses. Une sous-classification des rhumatismes en « cluster » basée notamment sur les mécanismes de dysrégulations immunitaires pourrait améliorer le devenir des patients en permettant d'utiliser des stratégies thérapeutiques ciblées adaptées (402). De nombreux nouveaux outils thérapeutiques ont été mis à la disposition des cliniciens ces dernières années pour traiter les SpA. Néanmoins, force est de constater que quelle que soit la molécule testée, le pourcentage de patients répondant au traitement reste stable (40-50%) dans les essais thérapeutiques (403). Une nouvelle classification des SpA selon les mécanismes moléculaires impliqués pourrait peut-être améliorer la réponse thérapeutique des patients aux biothérapies mais aussi permettre d'identifier ceux les plus à risque de développer des formes graves nécessitant une stratégie thérapeutique plus incisive. Ce travail a été mené récemment dans le syndrome de Gougerot Sjögren (404). La combinaison de données transcriptomiques, génomiques, épigénétiques et immunologiques a permis d'identifier quatre groupes de patients dans cette maladie correspondant à des dysrégulations immunitaires distinctes qui pourraient expliquer les nombreux résultats négatifs de plusieurs essais thérapeutiques (404). Dans cette thèse, nous avons montré que la calprotectine sérique, alarmine sécrétée par les neutrophiles et monocytes, ne permet pas d'identifier les patients à risque de progression radiographique dans les SpA débutantes. Cependant, les SpA les plus inflammatoires répondant aux critères ASAS ont des taux de calprotectine sérique plus élevés suggérant indirectement que les neutrophiles et les monocytes sont impliqués dans l'inflammation des enthèses. Le suivi longitudinal de la calprotectine sérique dans une maladie médiée par le neutrophile, les VAA, permet d'identifier les sujets à risque de présenter une altération de la fonction rénale au cours du traitement d'entretien. Il est probablement difficile

d'attendre qu'un unique dosage d'un biomarqueur reflétant l'état du sujet à un moment donné soit suffisant pour prédire la sévérité future de la maladie qui met en jeu des mécanismes dynamiques complexes.

Les SpA sont fréquemment associées à des manifestations extra-articulaires conduisant le rhumatologue à prendre en charge de façon holistique son patient en dépistant et en prenant en charge les comorbidités associées (ostéoporose, facteurs de risques cardiovasculaire, maladie cardiovasculaire, dépression...) et le défaut d'adhérence médicamenteuse (36, 405) Nous pensons que la standardisation des examens initiaux et périodiques en ce qui concerne les variables à recueillir et à rapporter dans les dossiers médicaux facilitera mais aussi améliorera la prise en charge des SpA axiale. En utilisant une approche fondée sur les preuves et un consensus d'experts, nous avons défini un ensemble de variables de base à collecter juste après le diagnostic et pendant le suivi des patients atteints de SpA axiale en pratique quotidienne (406). Point intéressant, parmi les éléments considérés comme obligatoire ou très utile on retrouve la recherche annuelle de manifestations extra-articulaires (uvéïte, psoriasis et MICI) mais aussi de signes évocateurs d'insuffisance cardiaque au vu des atteintes cardiovasculaires rapportées dans la littérature. Dans une optique de prévention, il paraît préférable de dépister des atteintes cardiaques avant que surviennent des signes d'insuffisance cardiaque. Se pose donc la question d'effectuer des échographie trans-thoracique de dépistage dans les SpA axiales. Notre travail de méta-analyse montre que l'échographie trans-thoracique ne retrouve pas une augmentation de la prévalence des valvulopathies et des signes de dysfonction systolique du ventricule gauche dans la SA. En revanche, il existe une altération des paramètres de la fonction diastolique du ventricule gauche dans la SA sans que la qualité des études jusqu'alors menées nous permette d'affirmer l'existence d'une prévalence augmentée de dysfonction diastolique du ventricule gauche. D'autres travaux sont donc nécessaires pour éclaircir ce dernier point, notamment en s'astreignant à utiliser les définitions les plus récentes de la dysfonction diastolique en échocardiographie. Ces altérations de la fonction myocardique sont une piste à explorer qui pourrait expliquer la prévalence augmentée d'insuffisance cardiaque et de cardiopathie ischémique observée chez des jeunes patients atteints par la SA (407). Nous pensons que le processus inflammatoire au cours des SpA est responsable d'une dysfonction de la micro-vascularisation coronarienne source d'ischémie myocardique pouvant entraîner une cardiomyopathie à long terme. Une étude visant à évaluer la réserve coronarienne dans les rhumatismes inflammatoires chroniques est en cours au sein du laboratoire. Les premiers résultats mettent en lumière que 38,8% (7/18) des SA ou de rhumatismes psoriasiques

ont une atteinte de la réserve perfusionnelle en scintigraphie myocardique. Les coronarographies réalisées chez ces 7 patients confirment la présence en majorité d'une dysfonction endothéliale microvasculaire (71,5%, 5/7) conduisant à une intensification du traitement cardiologique. L'étude de la réserve coronarienne par scintigraphie myocardique permettra peut-être de mieux apprécier le risque cardiovasculaire des patients atteints de rhumatisme inflammatoire chronique (16). Afin de mieux disséquer les mécanismes reliant l'immunité aux événements cardiovasculaires observés dans la SA, nous pensons que l'étude du modèle murin SKG pourrait aider à améliorer nos connaissances dans ce domaine. Pour cela nous sommes en train d'étudier les fonctions systolique et diastolique myocardique par échocardiographie au cours de l'arthrite dans le modèle SKG mais aussi chez des souris SKG qui seront invalidées pour le *Ldlr* par la technologie CRISPR/Cas9, mutation nécessaire pour que ces dernières développent de l'athérosclérose.

L'aortite, l'insuffisance valvulaire aortique et les troubles de la conduction cardiaque sont des manifestations extra-articulaires reconnues dans la SA avec des formes sévères décrites avant les années 90's (408). Cependant, nous n'avons pas remarqué d'augmentation de la prévalence des valvulopathies détectées par échocardiographie dans la SA. Le risque de chirurgie valvulaire et de pose de pacemaker dans la SA n'est au final que légèrement plus élevé chez les patients âgés atteints par la SA comparés à des sujets contrôles indiquant que les formes les plus sévères sont rares (409). La moitié de la surmortalité observée dans la SA était auparavant attribuées directement à des complications de la maladie, dont l'amylose secondaire qui expliquait jusqu'à 12.5% du risque de décès durant la période 1992-1994 (410). Cependant, il est maintenant exceptionnel de retrouver des amyloses chez les patients suivis pour une SA suggérant que la sévérité des SpA a diminuée au cours du temps. Ce même phénomène est observé dans la PR (411, 412). La première hypothèse pour expliquer ce phénomène serait d'associer cette amélioration par l'utilisation de stratégies thérapeutiques plus efficaces. Il est vrai que l'arrivée des anti-TNF depuis 2003 a révolutionné le contrôle des symptômes dans la SA. Un traitement plus précoce pourrait expliquer la diminution de la prévalence observée de l'amylose AA. Cependant, malgré l'apport indéniable de l'IRM pour identifier des signes d'inflammation avant l'apparition des lésions structurales, le délai diagnostique des SpA n'a pas profondément été diminué (413, 414). Probablement que le meilleur contrôle de l'inflammation des patients ne répondant pas aux AINS grâce aux anti-TNF explique la diminution de la prévalence de l'amylose dans la SA. Les anti-TNF n'ont néanmoins pas un effet structural majeur tout comme les AINS dans la SA (415). Une étude menée en Norvège

durant la période 1992-1994 rapporte que 18,6% des patients suivis pour SA (moyenne d'âge 41,8 ans, moyenne durée maladie 16,5 ans) avaient une ankylose étagée du rachis appelée « colonne bambou » (416). Au Brésil, la prévalence des « colonnes bambou » montait jusqu'à 20,4% dans la SA durant la période 1988-1998 (417). Ces observations contrastent avec le sentiment qu'il existe une diminution des patients présentant ces formes sévères de SA même si cette démonstration n'a pas été faite à ma connaissance dans la littérature. Par ailleurs, l'incidence des remplacements de valves aortiques, de chirurgie mitrale et de pose de pacemaker comparé à des sujets contrôles est restée stable sur la période de 1999-2003 à 2009-2013 suggérant que les anti-TNF n'ont pas un effet majeur sur les manifestations cardiaques les plus sévères (409). Il est ainsi légitime de se poser la question si les SpA sont devenues moins sévères au cours des années du fait de modifications de facteurs environnementaux, et ce, de façon indépendante des progrès thérapeutiques. D'ailleurs, malgré l'augmentation de l'incidence des infections génitales à *C. trachomatis* en Australie la prévalence de l'arthrite réactionnelle semble diminuer. Pourtant le dépistage de cette infection largement asymptomatique concerne moins de 10% de la population jeune en Australie. Il est donc difficile d'expliquer cette diminution d'incidence par la seule utilisation d'une antibiothérapie adaptée précoce (251). Des autres facteurs rentrent probablement en jeu. La consommation de tabac pourrait en faire partie. Le tabagisme, facteur associé à un risque accru de progression structurale dans la SA conduisant à la formation de « colonne bambou » (418, 419), a été réduit dans de nombreux pays au cours de ces vingt dernières années du fait des efforts de lutte anti-tabac menés par les différents gouvernements (420). D'autres facteurs comme l'exposition à des particules fines en suspension dans l'air et l'alimentation semblent associés avec une sévérité accrue des SpA (421, 422). Nous avons d'ailleurs observé que l'apport de certains prébiotiques comme l'inuline, polysaccharides de type fructane classés dans les fibres alimentaires solubles, stimulent la production d'IL-17 et d'IFN- γ par les lymphocytes Th17 et CD8+ intra-épithéliaux intestinaux et entraînent une augmentation de la sévérité de l'arthrite dans le modèle SKG (**Figure 26**). L'étude des facteurs environnementaux et leurs implications dans les SpA est un domaine d'investigation important qui pourrait amener à une meilleure compréhension de la pathogénèse de cette maladie et une meilleure prise en charge du patient.

Figure 26. L'inuline stimule l'expansion dans l'intestin des lymphocytes Th17 et des CD8+ producteurs IFN- γ et a tendance à augmenter la sévérité des arthrites dans l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia*.

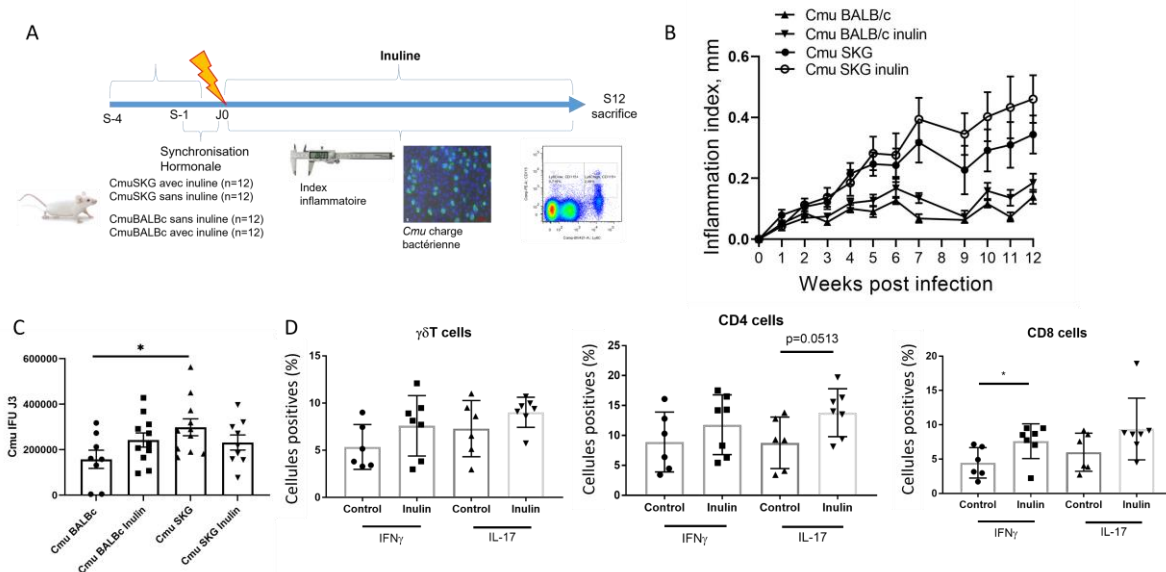


Schéma expérimental (A) : 7,2g/100mL d'inuline (Orafti Inulin, Beneo) a été ajouté à l'eau de boisson 4 semaines avant l'infection puis poursuivi tout au long de l'expérience. Des souris BALBc et SKG ont été infectées en intra-vaginal par 7.10^4 IFUs de *Chlamydia muridarum* (Cmu). L'index inflammatoire des articulations (variation du gonflement des pattes par rapport aux mesures de référence avant l'infection) a été suivi de façon hebdomadaire. Afin de suivre l'évolution de la charge bactérienne, des frottis cervico-vaginaux ont été effectués. A la mise à mort, les lymphocytes intra-épithéliaux des colons ont été isolés et analysés en cytométrie en flux. Index inflammatoire aux chevilles au cours du temps. Moyenne \pm SEM (B). Charge vaginale de *Chlamydia muridarum* trois jours après infection. Moyenne \pm SEM (C). Analyse par cytométrie en flux de la production cytokinique des lymphocytes T $\gamma\delta$, CD4+ et CD8+ intra-épithéliaux du colon. Moyenne \pm SD (D). t-tests, *p<0,05.

En conclusion, ce travail montre que le macrophage est exploité par le *Chlamydia* pour disséminer l'infection du tractus génital vers des organes périphériques entraînant une arthrite réactionnelle médiée par le TNF, l'IL-17 et l'IL-23, cytokines clés dans la physiopathogénèse des SpA. L'étude de l'arthrite réactionnelle est une occasion unique de mieux comprendre l'interaction bactérie-système immunitaire qui conduit au développement des SpA.

REFERENCES

1. Sieper J, Poddubnyy D. Axial spondyloarthritis. *Lancet (London, England)*. 2017;390:73-84.
2. Stolwijk C, van Onna M, Boonen A, van Tubergen A. Global Prevalence of Spondyloarthritis: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *Arthritis care & research*. 2016;68:1320-31.
3. Schett G, Lories RJ, D'Agostino MA, Elewaut D, Kirkham B, Soriano ER, et al. Enthesitis: from pathophysiology to treatment. *Nature reviews Rheumatology*. 2017;13:731-41.
4. Kemta Lekpa F, Claudepierre P. Enthèses : notions fondamentales. *EMC Appareil Locomoteur*. 2015;30:1-6.
5. McGonagle D, Lories RJ, Tan AL, Benjamin M. The concept of a "synovio-entheseal complex" and its implications for understanding joint inflammation and damage in psoriatic arthritis and beyond. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2482-91.
6. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984;27:361-8.
7. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68:777-83.
8. de Winter JJ, van Mens LJ, van der Heijde D, Landewe R, Baeten DL. Prevalence of peripheral and extra-articular disease in ankylosing spondylitis versus non-radiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2016;18:196.
9. Zeboulon N, Dougados M, Gossec L. Prevalence and characteristics of uveitis in the spondyloarthropathies: a systematic literature review. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67:955-9.
10. Roure F, Elhai M, Burki V, Fabreguet I, Koumakis E, Payet J, et al. Prevalence and clinical characteristics of psoriasis in spondyloarthritis: a descriptive analysis of 275 patients. *Clinical and experimental rheumatology*. 2016;34:82-7.
11. Stolwijk C, van Tubergen A, Castillo-Ortiz JD, Boonen A. Prevalence of extra-articular manifestations in patients with ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74:65-73.
12. Zhao SS, Robertson S, Reich T, Harrison NL, Moots RJ, Goodson NJ. Prevalence and impact of comorbidities in axial spondyloarthritis: systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59:iv47-iv57.
13. Bakland G, Gran JT, Nossent JC. Increased mortality in ankylosing spondylitis is related to disease activity. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70:1921-5.
14. Exarchou S, Lie E, Lindstrom U, Askling J, Forsblad-d'Elia H, Turesson C, et al. Mortality in ankylosing spondylitis: results from a nationwide population-based study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75:1466-72.
15. Prati C, Puyraveau M, Guillot X, Verhoeven F, Wendling D. Deaths Associated with Ankylosing Spondylitis in France from 1969 to 2009. *The Journal of rheumatology*. 2017;44:594-8.
16. Sundstrom B, Johansson G, Johansson I, Wallberg-Jonsson S. Modifiable cardiovascular risk factors in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol*. 2014;33:111-7.
17. Bally M, Dendukuri N, Rich B, Nadeau L, Helin-Salmivaara A, Garbe E, et al. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data. *BMJ (Clinical research ed)*. 2017;357:j1909.
18. Bhala N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2013;382:769-79.
19. Atzeni F, Rodriguez-Carrio J, Popa CD, Nurmohamed MT, Szucs G, Szekanecz Z. Cardiovascular effects of approved drugs for rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2021;17:270-90.
20. Karmacharya P, Shahukhal R, Crowson CS, Murad MH, Davis JM, 3rd, Shrestha P, et al. Effects of Therapies on Cardiovascular Events in Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Rheumatology and therapy*. 2020;7:993-1009.
21. Roubille C, Richer V, Starnino T, McCourt C, McFarlane A, Fleming P, et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and

- corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74:480-9.
22. Braun J, Baraliakos X, Westhoff T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk - a matter of indication. *Semin Arthritis Rheum*. 2020;50:285-8.
 23. Yan Y, Guo TM, Zhu C. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on serum proinflammatory cytokines in the treatment of ankylosing spondylitis. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2018;96:450-6.
 24. Haroon NN, Paterson JM, Li P, Inman RD, Haroon N. Patients With Ankylosing Spondylitis Have Increased Cardiovascular and Cerebrovascular Mortality: A Population-Based Study. *Annals of internal medicine*. 2015;163:409-16.
 25. Konst RE, Guzik TJ, Kaski JC, Maas A, Elias-Smale SE. The pathogenic role of coronary microvascular dysfunction in the setting of other cardiac or systemic conditions. *Cardiovasc Res*. 2020;116:817-28.
 26. Faccini A, Kaski JC, Camici PG. Coronary microvascular dysfunction in chronic inflammatory rheumatoid diseases. *Eur Heart J*. 2016;37:1799-806.
 27. Gao Q, Jiang Y, Ma T, Zhu F, Gao F, Zhang P, et al. A critical function of Th17 proinflammatory cells in the development of atherosclerotic plaque in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185:5820-7.
 28. Ma T, Gao Q, Zhu F, Guo C, Wang Q, Gao F, et al. Th17 cells and IL-17 are involved in the disruption of vulnerable plaques triggered by short-term combination stimulation in apolipoprotein E-knockout mice. *Cellular & molecular immunology*. 2013;10:338-48.
 29. Bai R, Zhang Y, Liu W, Ma C, Chen X, Yang J, et al. The Relationship of Ankylosing Spondylitis and Subclinical Atherosclerosis: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Angiology*. 2019;70:492-500.
 30. Brainin P, Frestad D, Prescott E. The prognostic value of coronary endothelial and microvascular dysfunction in subjects with normal or non-obstructive coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2018;254:1-9.
 31. Erre GL, Buscetta G, Paliogiannis P, Mangoni AA, Carru C, Passiu G, et al. Coronary flow reserve in systemic rheumatic diseases: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2018;38:1179-90.
 32. Caliskan M, Erdogan D, Gullu H, Yilmaz S, Gursoy Y, Yildirim A, et al. Impaired coronary microvascular and left ventricular diastolic functions in patients with ankylosing spondylitis. *Atherosclerosis*. 2008;196:306-12.
 33. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England journal of medicine*. 2017;377:1119-31.
 34. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *The New England journal of medicine*. 2019;381:2497-505.
 35. Baillet A, Gossec L, Carmona L, Wit M, van Eijk-Hustings Y, Bertheussen H, et al. Points to consider for reporting, screening for and preventing selected comorbidities in chronic inflammatory rheumatic diseases in daily practice: a EULAR initiative. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75:965-73.
 36. Gossec L, Baillet A, Dadoun S, Daien C, Berenbaum F, Dernis E, et al. Collection and management of selected comorbidities and their risk factors in chronic inflammatory rheumatic diseases in daily practice in France. *Joint bone spine*. 2016;83:501-9.
 37. Hubac J, Tribouillard H, Gastaldi R, Romand X, Gaudin P, Allenet B, et al. Implementation of comorbidities' systematic screening program in daily practice in France. *Joint bone spine*. 2020;87:663-5.
 38. Decarriere G, Pastor J, Demoulin D, Mouterde G, Lukas C, Combe B, et al. OP0214 IMPACT OF A MULTI-MORBIDITY SCREENING AND PREVENTION PROGRAM IN CHRONIC INFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES ON THE ONE-YEAR HOSPITALIZATION RATE BASED ON AN ANALYSIS OF THE FRENCH NATIONAL HEALTH DATABASE. *Annals of the rheumatic diseases*. 2021;80:128-9.

39. Ozkan Y. Cardiac Involvement in Ankylosing Spondylitis. *Journal of clinical medicine research*. 2016;8:427-30.
40. Wendling D, Lukas C, Prati C, Claudepierre P, Gossec L, Goupille P, et al. 2018 update of French Society for Rheumatology (SFR) recommendations about the everyday management of patients with spondyloarthritis. *Joint bone spine*. 2018;85:275-84.
41. Deodhar A, van der Heijde D, Sieper J, Van den Bosch F, Maksymowych WP, Kim TH, et al. Safety and Efficacy of Upadacitinib in Patients With Active Ankylosing Spondylitis and an Inadequate Response to Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Therapy: One-Year Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled Study and Open-Label Extension. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2021.
42. van der Heijde D, Song IH, Pangan AL, Deodhar A, van den Bosch F, Maksymowych WP, et al. Efficacy and safety of upadacitinib in patients with active ankylosing spondylitis (SELECT-AXIS 1): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2/3 trial. *Lancet (London, England)*. 2019;394:2108-17.
43. RINVOQ (upadacitinib) - Spondylarthrite ankylosante. Haute Autorité de la Santé; 5 mai 2021.
44. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1823-8.
45. Geirsson AJ, Kristjansson K, Gudbjornsson B. A strong familiarity of ankylosing spondylitis through several generations. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69:1346-8.
46. Caffrey MF, James DC. Human lymphocyte antigen association in ankylosing spondylitis. *Nature*. 1973;242:121.
47. Colbert RA, DeLay ML, Klenk EI, Layh-Schmitt G. From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunological reviews*. 2010;233:181-202.
48. Sharip A, Kunz J. Understanding the Pathogenesis of Spondyloarthritis. *Biomolecules*. 2020;10.
49. Kavadiachanda CG, Geng J, Bulusu SN, Negi VS, Raghavan M. Spondyloarthritis and the Human Leukocyte Antigen (HLA)-B(*)27 Connection. *Frontiers in immunology*. 2021;12:601518.
50. Costantino F, Talpin A, Said-Nahal R, Goldberg M, Henny J, Chiocchia G, et al. Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74:689-93.
51. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*. 1990;63:1099-112.
52. Taurog JD, Chhabra A, Colbert RA. Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. *The New England journal of medicine*. 2016;374:2563-74.
53. Appel H, Kuon W, Kuhne M, Wu P, Kuhlmann S, Kollnberger S, et al. Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T cells in Chlamydia-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004;6:R521-34.
54. Hermann E, Yu DT, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet (London, England)*. 1993;342:646-50.
55. Ugrinovic S, Mertz A, Wu P, Braun J, Sieper J. A single nonamer from the Yersinia 60-kDa heat shock protein is the target of HLA-B27-restricted CTL response in Yersinia-induced reactive arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1997;159:5715-23.
56. Cragolini JJ, de Castro JA. Identification of endogenously presented peptides from Chlamydia trachomatis with high homology to human proteins and to a natural self-ligand of HLA-B27. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2008;7:170-80.
57. Laloux L, Voisin MC, Allain J, Martin N, Kerboull L, Chevalier X, et al. Immunohistological study of entheses in spondyloarthropathies: comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2001;60:316-21.
58. Gracey E, Yao Y, Qaiyum Z, Lim M, Tang M, Inman RD. Altered Cytotoxicity Profile of CD8+ T Cells in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2020;72:428-34.
59. Atagunduz P, Appel H, Kuon W, Wu P, Thiel A, Kloetzel PM, et al. HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2005;52:892-901.

60. Gao XM, Wordsworth P, McMichael A. Collagen-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *European journal of immunology*. 1994;24:1665-70.
61. Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, Tran TM, Sharma R, Dressel R, et al. Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1977-84.
62. May E, Dorris ML, Satumtira N, Iqbal I, Rehman MI, Lightfoot E, et al. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170:1099-105.
63. Schittenhelm RB, Sian TC, Wilmann PG, Dudek NL, Purcell AW. Revisiting the arthritogenic peptide theory: quantitative not qualitative changes in the peptide repertoire of HLA-B27 allotypes. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015;67:702-13.
64. Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ, Mear JP, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, et al. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:23459-68.
65. Kollnberger S, Bird L, Sun MY, Retiere C, Braud VM, McMichael A, et al. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2972-82.
66. Bird LA, Peh CA, Kollnberger S, Elliott T, McMichael AJ, Bowness P. Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *European journal of immunology*. 2003;33:748-59.
67. Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, Bowness P. Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3586-95.
68. Payeli SK, Kollnberger S, Marroquin Belaunzaran O, Thiel M, McHugh K, Giles J, et al. Inhibiting HLA-B27 homodimer-driven immune cell inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:3139-49.
69. Bowness P, Ridley A, Shaw J, Chan AT, Wong-Baeza I, Fleming M, et al. Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186:2672-80.
70. Lewis Marffy AL, McCarthy AJ. Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors (LILRs) on Human Neutrophils: Modulators of Infection and Immunity. *Front Immunol*. 2020;11:857.
71. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:89-102.
72. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2.
73. Chen X, Guo X, Ge Q, Zhao Y, Mu H, Zhang J. ER Stress Activates the NLRP3 Inflammasome: A Novel Mechanism of Atherosclerosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019:3462530.
74. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2633-43.
75. Turner MJ, Delay ML, Bai S, Klenk E, Colbert RA. HLA-B27 up-regulation causes accumulation of misfolded heavy chains and correlates with the magnitude of the unfolded protein response in transgenic rats: Implications for the pathogenesis of spondylarthritis-like disease. *Arthritis Rheum*. 2007;56:215-23.
76. Neerinckx B, Carter S, Lories RJ. No evidence for a critical role of the unfolded protein response in synovium and blood of patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:629-30.
77. Ambarus CA, Yeremenko N, Baeten DL. Altered cytokine expression by macrophages from HLA-B27-positive spondyloarthritis patients without evidence of endoplasmic reticulum stress. *Rheumatol Adv Pract*. 2018;2:rky014.
78. Zeng L, Lindstrom MJ, Smith JA. Ankylosing spondylitis macrophage production of higher levels of interleukin-23 in response to lipopolysaccharide without induction of a significant unfolded protein response. *Arthritis Rheum*. 2011;63:3807-17.

79. Ciccia F, Accardo-Palumbo A, Rizzo A, Guggino G, Raimondo S, Giardina A, et al. Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with ankylosing spondylitis and subclinical gut inflammation. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:1566-74.
80. Lin P, Bach M, Asquith M, Lee AY, Akileswaran L, Stauffer P, et al. HLA-B27 and human β 2-microglobulin affect the gut microbiota of transgenic rats. *PloS one*. 2014;9:e105684.
81. Asquith M, Sternes PR, Costello ME, Karstens L, Diamond S, Martin TM, et al. HLA Alleles Associated With Risk of Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis Influence the Gut Microbiome. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2019;71:1642-50.
82. Breban M, Tap J, Leboime A, Said-Nahal R, Langella P, Chiocchia G, et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76:1614-22.
83. Liu Y, Liao X, Shi G. Autoantibodies in Spondyloarthritis, Focusing on Anti-CD74 Antibodies. *Front Immunol*. 2019;10:5.
84. Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, Zwerina J, Herrmann M, Mueller R, et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:3257-62.
85. Nocturne G, Pavy S, Boudaoud S, Seror R, Goupille P, Chanson P, et al. Increase in Dickkopf-1 Serum Level in Recent Spondyloarthritis. Data from the DESIR Cohort. *PloS one*. 2015;10:e0134974.
86. Luchetti MM, Ciccia F, Avellini C, Benfaremo D, Guggino G, Farinelli A, et al. Sclerostin and Antisclerostin Antibody Serum Levels Predict the Presence of Axial Spondyloarthritis in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of rheumatology*. 2018;45:630-7.
87. Tsui FW, Tsui HW, Las Heras F, Pritzker KP, Inman RD. Serum levels of novel noggin and sclerostin-immune complexes are elevated in ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:1873-9.
88. Lee JS, Lee EJ, Lee JH, Hong SC, Lee CK, Yoo B, et al. Autoantibodies against Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1A as a Biomarker for Predicting Radiographic Progression in Ankylosing Spondylitis Treated with Anti-Tumor Necrosis Factor Agents. *J Clin Med*. 2020;9.
89. Kim YG, Sohn DH, Zhao X, Sokolove J, Lindstrom TM, Yoo B, et al. Role of protein phosphatase magnesium-dependent 1A and anti-protein phosphatase magnesium-dependent 1A autoantibodies in ankylosing spondylitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66:2793-803.
90. Xu S, Zhang X, Chen Y, Ma Y, Deng J, Gao X, et al. Anti-CD74 antibodies in spondyloarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2021;51:7-14.
91. Ranganathan V, Ciccia F, Zeng F, Sari I, Guggino G, Muralitharan J, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Inflammation and Predicts Spinal Progression in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2017;69:1796-806.
92. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*. 2003;197:1467-76.
93. Starlets D, Gore Y, Binsky I, Haran M, Harpaz N, Shvidel L, et al. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood*. 2006;107:4807-16.
94. Sogkas G, Klose K, Baerlecken N, Schweikhard E, Matthias T, Kniesch K, et al. CD74 is a T cell antigen in spondyloarthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2020;38:195-202.
95. Wilbrink R, Spoorenberg A, Arends S, van der Geest KSM, Brouwer E, Bootsma H, et al. CD27(-)CD38(low)CD21(low) B-Cells Are Increased in Axial Spondyloarthritis. *Front Immunol*. 2021;12:686273.
96. Wendling D, Dougados M, Berenbaum F, Brocq O, Schaeferbeke T, Mazieres B, et al. Rituximab treatment for spondyloarthritis. A nationwide series: data from the AIR registry of the French Society of Rheumatology. *The Journal of rheumatology*. 2012;39:2327-31.
97. Song IH, Heldmann F, Rudwaleit M, Listing J, Appel H, Braun J, et al. Different response to rituximab in tumor necrosis factor blocker-naïve patients with active ankylosing spondylitis and in patients in whom tumor necrosis factor blockers have failed: a twenty-four-week clinical trial. *Arthritis Rheum*. 2010;62:1290-7.
98. Liu D, Liu B, Lin C, Gu J. Imbalance of Peripheral Lymphocyte Subsets in Patients With Ankylosing Spondylitis: A Meta-Analysis. *Front Immunol*. 2021;12:696973.

99. Mauro D, Thomas R, Guggino G, Lories R, Brown MA, Ciccia F. Ankylosing spondylitis: an autoimmune or autoinflammatory disease? *Nature reviews Rheumatology*. 2021;17:387-404.
100. Krainer J, Siebenhandl S, Weinhäusel A. Systemic autoinflammatory diseases. *Journal of autoimmunity*. 2020;109:102421.
101. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*. 1999;97:133-44.
102. Navegantes KC, de Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *Journal of translational medicine*. 2017;15:36.
103. Figueras-Nart I, Mascaró JM, Jr., Solanich X, Hernández-Rodríguez J. Dermatologic and Dermatopathologic Features of Monogenic Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:2448.
104. Dougados M, d'Agostino MA, Benessiano J, Berenbaum F, Breban M, Claudepierre P, et al. The DESIR cohort: a 10-year follow-up of early inflammatory back pain in France: study design and baseline characteristics of the 708 recruited patients. *Joint bone spine*. 2011;78:598-603.
105. Weber U, Jurik AG, Zejden A, Larsen E, Jørgensen SH, Rufibach K, et al. Frequency and Anatomic Distribution of Magnetic Resonance Imaging Features in the Sacroiliac Joints of Young Athletes: Exploring "Background Noise" Toward a Data-Driven Definition of Sacroiliitis in Early Spondyloarthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2018;70:736-45.
106. de Winter J, de Hooze M, van de Sande M, de Jong H, van Hoeven L, de Koning A, et al. Magnetic Resonance Imaging of the Sacroiliac Joints Indicating Sacroiliitis According to the Assessment of SpondyloArthritis international Society Definition in Healthy Individuals, Runners, and Women With Postpartum Back Pain. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2018;70:1042-8.
107. Renson T, Depicker A, De Craemer AS, Deroo L, Varkas G, de Hooze M, et al. High prevalence of spondyloarthritis-like MRI lesions in postpartum women: a prospective analysis in relation to maternal, child and birth characteristics. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020;79:929-34.
108. Seven S, Østergaard M, Morsel-Carlson L, Sørensen IJ, Bonde B, Thamsborg G, et al. Anatomic Distribution of Sacroiliac Joint Lesions on Magnetic Resonance Imaging in Patients With Axial Spondyloarthritis and Control Subjects: A Prospective Cross-Sectional Study, Including Postpartum Women, Patients With Disc Herniation, Cleaning Staff, Runners, and Healthy Individuals. *Arthritis care & research*. 2021;73:742-54.
109. Jacques P, Lambrecht S, Verheugen E, Pauwels E, Kollias G, Armaka M, et al. Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and stromal cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:437-45.
110. Cambré I, Gaublomme D, Burssens A, Jacques P, Schryvers N, De Muyenck A, et al. Mechanical strain determines the site-specific localization of inflammation and tissue damage in arthritis. *Nature communications*. 2018;9:4613.
111. Cambré I, Gaublomme D, Schryvers N, Lambrecht S, Lories R, Venken K, et al. Running promotes chronicity of arthritis by local modulation of complement activators and impairing T regulatory feedback loops. *Annals of the rheumatic diseases*. 2019;78:787-95.
112. McGonagle DG, McInnes IB, Kirkham BW, Sherlock J, Moots R. The role of IL-17A in axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis: recent advances and controversies. *Annals of the rheumatic diseases*. 2019;78:1167-78.
113. Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, et al. Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol*. 2011;30:269-73.
114. Wendling D, Cedoz JP, Racadot E, Dumoulin G. Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Joint bone spine*. 2007;74:304-5.
115. Schinocca C, Rizzo C, Fasano S, Grasso G, La Barbera L, Ciccia F, et al. Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview. *Front Immunol*. 2021;12:637829.
116. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24:179-89.
117. Ivanov, II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Seminars in immunology*. 2007;19:409-17.

118. Jo S, Wang SE, Lee YL, Kang S, Lee B, Han J, et al. IL-17A induces osteoblast differentiation by activating JAK2/STAT3 in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20:115.
119. Ceribelli A, Motta F, Vecellio M, Isailovic N, Ciccia F, Selmi C. Clinical Trials Supporting the Role of the IL-17/IL-23 Axis in Axial Spondyloarthritis. *Front Immunol.* 2021;12:622770.
120. Rosine N, Miceli-Richard C. Innate Cells: The Alternative Source of IL-17 in Axial and Peripheral Spondyloarthritis? *Front Immunol.* 2020;11:553742.
121. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, et al. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- γ t⁺ CD3⁺CD4⁻CD8⁻ enthesal resident T cells. *Nature medicine.* 2012;18:1069-76.
122. Reinhardt A, Yevsa T, Worbs T, Lienenklaus S, Sandrock I, Oberdörfer L, et al. Interleukin-23-Dependent γ/δ T Cells Produce Interleukin-17 and Accumulate in the Enthesis, Aortic Valve, and Ciliary Body in Mice. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ).* 2016;68:2476-86.
123. Cuthbert RJ, Watad A, Fragkakis EM, Dunsmuir R, Loughenbury P, Khan A, et al. Evidence that tissue resident human enthesis $\gamma\delta$ T-cells can produce IL-17A independently of IL-23R transcript expression. *Annals of the rheumatic diseases.* 2019;78:1559-65.
124. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:467-78.
125. Cuthbert RJ, Fragkakis EM, Dunsmuir R, Li Z, Coles M, Marzo-Ortega H, et al. Brief Report: Group 3 Innate Lymphoid Cells in Human Enthesis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ).* 2017;69:1816-22.
126. Appel H, Maier R, Wu P, Scheer R, Hempfing A, Kayser R, et al. Analysis of IL-17(+) cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:R95.
127. Tamassia N, Arruda-Silva F, Calzetti F, Lonardi S, Gasperini S, Gardiman E, et al. A Reappraisal on the Potential Ability of Human Neutrophils to Express and Produce IL-17 Family Members In Vitro: Failure to Reproducibly Detect It. *Front Immunol.* 2018;9:795.
128. Bollow M, Fischer T, Reissshauer H, Backhaus M, Sieper J, Hamm B, et al. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis- cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Annals of the rheumatic diseases.* 2000;59:135-40.
129. Bridgewood C, Watad A, Russell T, Palmer TM, Marzo-Ortega H, Khan A, et al. Identification of myeloid cells in the human enthesis as the main source of local IL-23 production. *Annals of the rheumatic diseases.* 2019;78:929-33.
130. McGonagle D, Marzo-Ortega H, O'Connor P, Gibbon W, Hawkey P, Henshaw K, et al. Histological assessment of the early enthesitis lesion in spondyloarthropathy. *Annals of the rheumatic diseases.* 2002;61:534-7.
131. Appel H, Maier R, Bleil J, Hempfing A, Loddenkemper C, Schlichting U, et al. In situ analysis of interleukin-23- and interleukin-12-positive cells in the spine of patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2013;65:1522-9.
132. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, NY).* 2012;336:86-90.
133. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature.* 2015;518:547-51.
134. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958-69.
135. Thiriou JD, Martinez-Martinez YB, Endsley JJ, Torres AG. Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathog Dis.* 2020;78.
136. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:541-66.
137. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol.* 2019;10:792.
138. Baeten D, Demetter P, Cuvelier CA, Kruithof E, Van Damme N, De Vos M, et al. Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: a link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthropathy. *J Pathol.* 2002;196:343-50.

139. Baeten D, Moller HJ, Delanghe J, Veys EM, Moestrup SK, De Keyser F. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1611-23.
140. Baeten D, Kruithof E, Van den Bosch F, Demetter P, Van Damme N, Cuvelier C, et al. Immunomodulatory effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on synovium in spondylarthropathy: histologic findings in eight patients from an open-label pilot study. *Arthritis Rheum.* 2001;44:186-95.
141. Baeten D, Kruithof E, De Rycke L, Boots AM, Mielants H, Veys EM, et al. Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthropathy. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:R359-69.
142. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yeremenko N, et al. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:966-75.
143. Heftdal LD, Loft AG, Hendricks O, Ashouri Christiansen A, Schiøttz-Christensen B, Arnbak B, et al. Divergent effects on macrophage biomarkers soluble CD163 and CD206 in axial spondyloarthritis. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.* 2018;78:483-9.
144. Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, Accardo-Palumbo A, Raimondo S, Raiata F, et al. Macrophage phenotype in the subclinical gut inflammation of patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53:104-13.
145. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TR, Reedquist KA, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *Journal of immunological methods.* 2012;375:196-206.
146. Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology.* 2014;219:695-703.
147. Etzerodt A, Maniecki MB, Moller K, Moller HJ, Moestrup SK. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol.* 2010;88:1201-5.
148. Kaaij MH, van Tok MN, Blijdorp IC, Ambarus CA, Stock M, Pots D, et al. Transmembrane TNF drives osteoproliferative joint inflammation reminiscent of human spondyloarthritis. *J Exp Med.* 2020;217.
149. Ambarus CA, Noordenbos T, de Hair MJ, Tak PP, Baeten DL. Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R74.
150. Conrad K, Wu P, Sieper J, Syrbe U. In vivo pre-activation of monocytes in patients with axial spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:179.
151. Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, Mikolajczyk T, Telesinska-Jasiowka D, Klimek E, et al. Blood monocyte heterogeneity and markers of endothelial activation in ankylosing spondylitis. *The Journal of rheumatology.* 2014;41:481-9.
152. Rezaieanesh A, Mahmoudi M, Amirzargar AA, Vojdani M, Jamshidi AR, Nicknam MH. Ankylosing spondylitis M-CSF-derived macrophages are undergoing unfolded protein response (UPR) and express higher levels of interleukin-23. *Modern rheumatology.* 2017;27:862-7.
153. Guggino G, Mauro D, Rizzo A, Alessandro R, Raimondo S, Bergot AS, et al. Inflammasome Activation in Ankylosing Spondylitis Is Associated With Gut Dysbiosis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ).* 2021;73:1189-99.
154. Akhtari M, Zargar SJ, Vojdani M, Jamshidi A, Mahmoudi M. Monocyte-derived and M1 macrophages from ankylosing spondylitis patients released higher TNF-alpha and expressed more IL1B in response to BzATP than macrophages from healthy subjects. *Sci Rep.* 2021;11:17842.
155. Akhtari M, Vojdani M, Javinani A, Ashraf-Ganjouei A, Jamshidi A, Mahmoudi M. Activation of adenosine A2A receptor induced interleukin-23 mRNA expression in macrophages of ankylosing spondylitis patients. *Cytokine.* 2020;128:154997.
156. Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, Alessandro R, Luchetti MM, Milling S, et al. Dysbiosis and zonulin upregulation alter gut epithelial and vascular barriers in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2017;76:1123-32.
157. Ciccia F, Guggino G, Zeng M, Thomas R, Ranganathan V, Rahman A, et al. Proinflammatory CX3CR1+CD59+Tumor Necrosis Factor-Like Molecule 1A+Interleukin-23+ Monocytes Are

- Expanded in Patients With Ankylosing Spondylitis and Modulate Innate Lymphoid Cell 3 Immune Functions. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, NJ). 2018;70:2003-13.
158. Diehl GE, Longman RS, Zhang JX, Breart B, Galan C, Cuesta A, et al. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature*. 2013;494:116-20.
159. Wang J, Su J, Yuan Y, Jin X, Shen B, Lu G. The role of lymphocyte-monocyte ratio on axial spondyloarthritis diagnosis and sacroiliitis staging. *BMC Musculoskelet Disord*. 2021;22:86.
160. Romero-Sanchez C, Tsou HK, Jan MS, Wong RH, Chang IC, Londoño J, et al. Serum monocyte chemotactic protein-1 concentrations distinguish patients with ankylosing spondylitis from patients with mechanical low back pain. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2011;24:202-7.
161. Mulay SR. Multifactorial functions of the inflammasome component NLRP3 in pathogenesis of chronic kidney diseases. *Kidney international*. 2019;96:58-66.
162. Kim SK, Cho YJ, Choe JY. NLRP3 inflammasomes and NLRP3 inflammasome-derived proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with ankylosing spondylitis. *Clin Chim Acta*. 2018;486:269-74.
163. Cowardin CA, Kuehne SA, Buonomo EL, Marie CS, Minton NP, Petri WA, Jr. Inflammasome activation contributes to interleukin-23 production in response to *Clostridium difficile*. *mBio*. 2015;6.
164. Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F, Jacques C. The danger from within: alarmins in arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2016;12:669-83.
165. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*. 1965;19:739-44.
166. Pruenster M, Vogl T, Roth J, Sperandio M. S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacology & therapeutics*. 2016;167:120-31.
167. Schäfer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics*. 1995;25:638-43.
168. Edgeworth J, Gorman M, Bennett R, Freemont P, Hogg N. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266:7706-13.
169. Zwadlo G, Brügger J, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clinical and experimental immunology*. 1988;72:510-5.
170. Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2003;171:2602-9.
171. Pruenster M, Kurz AR, Chung KJ, Cao-Ehlker X, Bieber S, Nussbaum CF, et al. Extracellular MRP8/14 is a regulator of β 2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nature communications*. 2015;6:6915.
172. Robinson MJ, Tessier P, Poulson R, Hogg N. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:3658-65.
173. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2005;105:2955-62.
174. Wang L, Luo H, Chen X, Jiang Y, Huang Q. Functional characterization of S100A8 and S100A9 in altering monolayer permeability of human umbilical endothelial cells. *PloS one*. 2014;9:e90472.
175. Viemann D, Barczyk K, Vogl T, Fischer U, Sunderkötter C, Schulze-Osthoff K, et al. MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. *Blood*. 2007;109:2453-60.
176. Ehlermann P, Eggers K, Bierhaus A, Most P, Weichenhan D, Greten J, et al. Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. *Cardiovascular diabetology*. 2006;5:6.
177. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature medicine*. 2007;13:1042-9.

178. Cremers NAJ, van den Bosch MHJ, van Dalen S, Di Ceglie I, Ascone G, van de Loo F, et al. S100A8/A9 increases the mobilization of pro-inflammatory Ly6C(high) monocytes to the synovium during experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19:217.
179. Bouma G, Lam-Tse WK, Wierenga-Wolf AF, Drexhage HA, Versnel MA. Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin. *Diabetes.* 2004;53:1979-86.
180. Crowe LAN, McLean M, Kitson SM, Melchor EG, Patommel K, Cao HM, et al. S100A8 & S100A9: Alarmin mediated inflammation in tendinopathy. *Sci Rep.* 2019;9:1463.
181. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:R69.
182. Fassl SK, Austermann J, Papantonopoulou O, Riemenschneider M, Xue J, Bertheloot D, et al. Transcriptome assessment reveals a dominant role for TLR4 in the activation of human monocytes by the alarmin MRP8. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2015;194:575-83.
183. Kido J, Hayashi N, Kataoka M, Nagata T. Calprotectin expression in human monocytes: induction by porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1beta. *Journal of periodontology.* 2005;76:437-42.
184. van Lent PL, Grevers L, Blom AB, Sloetjes A, Mort JS, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2008;67:1750-8.
185. Dapunt U, Giese T, Maurer S, Stegmaier S, Prior B, Hänsch GM, et al. Neutrophil-derived MRP-14 is up-regulated in infectious osteomyelitis and stimulates osteoclast generation. *J Leukoc Biol.* 2015;98:575-82.
186. Bai S, Wang W, Ye L, Fang L, Dong T, Zhang R, et al. IL-17 stimulates neutrophils to release S100A8/A9 to promote lung epithelial cell apoptosis in Mycoplasma pneumoniae-induced pneumonia in children. *Biomed Pharmacother.* 2021;143:112184.
187. Mihaila AC, Ciortan L, Macarie RD, Vadana M, Cecoltan S, Preda MB, et al. Transcriptional Profiling and Functional Analysis of N1/N2 Neutrophils Reveal an Immunomodulatory Effect of S100A9-Blockade on the Pro-Inflammatory N1 Subpopulation. *Front Immunol.* 2021;12:708770.
188. Sreejit G, Abdel-Latif A, Athmanathan B, Annabathula R, Dhyan A, Noothi SK, et al. Neutrophil-Derived S100A8/A9 Amplify Granulopoiesis After Myocardial Infarction. *Circulation.* 2020;141:1080-94.
189. Wang J, Vodovotz Y, Fan L, Li Y, Liu Z, Namas R, et al. Injury-induced MRP8/MRP14 stimulates IP-10/CXCL10 in monocytes/macrophages. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2015;29:250-62.
190. Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, et al. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nature medicine.* 2010;16:713-7.
191. Austermann J, Spiekermann C, Roth J. S100 proteins in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology.* 2018;14:528-41.
192. Austermann J, Friesenhagen J, Fassl SK, Petersen B, Ortkras T, Burgmann J, et al. Alarmins MRP8 and MRP14 induce stress tolerance in phagocytes under sterile inflammatory conditions. *Cell reports.* 2014;9:2112-23.
193. Lin CR, Wei TY, Tsai HY, Wu YT, Wu PY, Chen ST. Glycosylation-dependent interaction between CD69 and S100A8/S100A9 complex is required for regulatory T-cell differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2015;29:5006-17.
194. Berthier S, Paclet MH, Lerouge S, Roux F, Vergnaud S, Coleman AW, et al. Changing the conformation state of cytochrome b558 initiates NADPH oxidase activation: MRP8/MRP14 regulation. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278:25499-508.
195. Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C, Doussiere J. The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2005;19:467-9.

196. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004;104:4260-8.
197. Nisapakultorn K, Ross KF, Herzberg MC. Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*. 2001;69:4242-7.
198. Nisapakultorn K, Ross KF, Herzberg MC. Calprotectin expression inhibits bacterial binding to mucosal epithelial cells. *Infection and immunity*. 2001;69:3692-6.
199. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:1298.
200. Clark HL, Jhingran A, Sun Y, Vareechon C, de Jesus Carrion S, Skaar EP, et al. Zinc and Manganese Chelation by Neutrophil S100A8/A9 (Calprotectin) Limits Extracellular *Aspergillus fumigatus* Hyphal Growth and Corneal Infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2016;196:336-44.
201. Simard JC, Simon MM, Tessier PA, Girard D. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186:3622-31.
202. Wang J, Huang C, Wu M, Zhong Q, Yang K, Li M, et al. MRP8/14 induces autophagy to eliminate intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *The Journal of infection*. 2015;70:415-26.
203. Romand X, Bernardy C, Nguyen MVC, Courtier A, Trocme C, Clapasson M, et al. Systemic calprotectin and chronic inflammatory rheumatic diseases. *Joint bone spine*. 2019;86:691-8.
204. Hammer HB, Fagerhol MK, Wien TN, Kvien TK. The soluble biomarker calprotectin (an S100 protein) is associated to ultrasonographic synovitis scores and is sensitive to change in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:R178.
205. Chevreau M, Paquet MH, Romand X, Quesada JL, Vittecoq O, Dieudé P, et al. Calprotectin is not independent from baseline erosion in predicting radiological progression in early rheumatoid arthritis. Comment on 'Calprotectin as a marker of inflammation in patients with early rheumatoid arthritis' by Jonsson et al. *Annals of the rheumatic diseases*. 2018;77:e84.
206. Walsham NE, Sherwood RA. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2016;9:21-9.
207. van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2010;341:c3369.
208. De Rycke L, Baeten D, Foell D, Kruithof E, Veys EM, Roth J, et al. Differential expression and response to anti-TNF α treatment of infiltrating versus resident tissue macrophage subsets in autoimmune arthritis. *J Pathol*. 2005;206:17-27.
209. Ma Y, Fan D, Xu S, Deng J, Gao X, Guan S, et al. Calprotectin in spondyloarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Int Immunopharmacol*. 2020;88:106948.
210. Turina MC, Yeremenko N, van Gaalen F, van Oosterhout M, Berg IJ, Ramonda R, et al. Serum inflammatory biomarkers fail to identify early axial spondyloarthritis: results from the SpondyloArthritis Caught Early (SPACE) cohort. *RMD Open*. 2017;3:e000319.
211. Fauny M, D'Amico F, Bonovas S, Netter P, Danese S, Loeuille D, et al. Faecal Calprotectin for the Diagnosis of Bowel Inflammation in Patients With Rheumatological Diseases: A Systematic Review. *J Crohns Colitis*. 2020;14:688-93.
212. Klingberg E, Strid H, Stahl A, Deminger A, Carlsten H, Ohman L, et al. A longitudinal study of fecal calprotectin and the development of inflammatory bowel disease in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19:21.
213. Kopylov U, Starr M, Watts C, Dionne S, Girardin M, Seidman EG. Detection of Crohn Disease in Patients with Spondyloarthropathy: The SpACE Capsule Study. *The Journal of rheumatology*. 2018;45:498-505.
214. Ostgard RD, Deleuran BW, Dam MY, Hansen IT, Jurik AG, Glerup H. Faecal calprotectin detects subclinical bowel inflammation and may predict treatment response in spondyloarthritis. *Scand J Rheumatol*. 2018;47:48-55.
215. Madland TM, Larsen A, Brun JG. S100 proteins calprotectin and S100A12 are related to radiographic changes rather than disease activity in psoriatic arthritis with low disease activity. *The Journal of rheumatology*. 2007;34:2089-92.

216. Turina MC, Sieper J, Yeremenko N, Conrad K, Haibel H, Rudwaleit M, et al. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:1746-8.
217. Dougados M, d'Agostino MA, Benessiano J, Berenbaum F, Breban M, Claudepierre P, et al. The DESIR cohort: a 10-year follow-up of early inflammatory back pain in France: study design and baseline characteristics of the 708 recruited patients. *Joint bone spine*. 2011;78:598-603.
218. Van Praet L, Van den Bosch FE, Jacques P, Carron P, Jans L, Colman R, et al. Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72:414-7.
219. Mielants H, Veys EM, Cuvelier C, de Vos M. Ileocolonoscopy findings in seronegative spondylarthropathies. *British journal of rheumatology*. 1988;27 Suppl 2:95-105.
220. Cuvelier C, Barbatis C, Mielants H, De Vos M, Roels H, Veys E. Histopathology of intestinal inflammation related to reactive arthritis. *Gut*. 1987;28:394-401.
221. Rizzo A, Guggino G, Ferrante A, Ciccio F. Role of Subclinical Gut Inflammation in the Pathogenesis of Spondyloarthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:63.
222. Van Praet L, Jans L, Carron P, Jacques P, Glorius E, Colman R, et al. Degree of bone marrow oedema in sacroiliac joints of patients with axial spondyloarthritis is linked to gut inflammation and male sex: results from the GIANT cohort. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:1186-9.
223. Klingberg E, Magnusson MK, Strid H, Deminger A, Stahl A, Sundin J, et al. A distinct gut microbiota composition in patients with ankylosing spondylitis is associated with increased levels of fecal calprotectin. *Arthritis Res Ther*. 2019;21:248.
224. Costello ME, Ciccio F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, et al. Brief Report: Intestinal Dysbiosis in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015;67:686-91.
225. Scalise G, Ciancio A, Mauro D, Ciccio F. Intestinal Microbial Metabolites in Ankylosing Spondylitis. *J Clin Med*. 2021;10.
226. Ciccio F, Guggino G, Rizzo A, Saieva L, Peralta S, Giardina A, et al. Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22 are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74:1739-47.
227. Romero-Lopez JP, Gomez-Martinez D, Dominguez-Lopez ML, Jimenez-Zamudio L, Casasola-Vargas JC, Burgos-Vargas R, et al. Differential expression of TLR2 and TLR4 in alpha4beta7-positive leukocytes of patients with axial spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59:879-88.
228. Tajik N, Frech M, Schulz O, Schalter F, Lucas S, Azizov V, et al. Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nature communications*. 2020;11:1995.
229. Berlinberg AJ, Regner EH, Stahly A, Brar A, Reisz JA, Gerich ME, et al. Multi 'Omics Analysis of Intestinal Tissue in Ankylosing Spondylitis Identifies Alterations in the Tryptophan Metabolism Pathway. *Front Immunol*. 2021;12:587119.
230. Shao T-j, He Z-x, Xie Z-j, Li H-c, Wang M-j, Wen C-p. Characterization of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis using ¹H NMR-based metabolomics of human fecal extracts. *Metabolomics*. 2016;12.
231. Carter JD, Hudson AP. Recent advances and future directions in understanding and treating Chlamydia-induced reactive arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13:197-206.
232. Iglesias-Gammara A, Restrepo FJ, Valle R, Matteson LE. "A Brief History of Stoll-Brodie-Fiessinger-Leroy Syndrome (Reiters Syndrome) and Reactive Arthritis with a Translation of Reiters Original 1916 Article into English". *Current Rheumatology Reviews*. 2005;1:71-9.
233. Ahvonen P, Sievers K, Aho K. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta rheumatologica Scandinavica*. 1969;15:232-53.
234. Zeidler H, Hudson AP. Reactive Arthritis Update: Spotlight on New and Rare Infectious Agents Implicated as Pathogens. *Curr Rheumatol Rep*. 2021;23:53.
235. Stavropoulos PG, Soura E, Kanelleas A, Katsambas A, Antoniou C. Reactive arthritis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2015;29:415-24.
236. Garcia-Kutzbach A, Chacon-Suchite J, Garcia-Ferrer H, Iraheta I. Reactive arthritis: update 2018. *Clin Rheumatol*. 2018;37:869-74.
237. Hannu T. Reactive arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2011;25:347-57.

238. Lahu A, Backa T, Ismaili J, Lahu V, Saiti V. Modes of presentation of reactive arthritis based on the affected joints. *Med Arch*. 2015;69:42-5.
239. Kvien TK, Gaston JS, Bardin T, Butrimiene I, Dijkmans BA, Leirisalo-Repo M, et al. Three month treatment of reactive arthritis with azithromycin: a EULAR double blind, placebo controlled study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63:1113-9.
240. Mannoja A, Pekkola J, Hamalainen M, Leirisalo-Repo M, Laasonen L, Kivisaari L. Lumbosacral radiographic signs in patients with previous enteroarthritis or uroarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64:936-9.
241. Brown LE, Forfia P, Flynn JA. Aortic insufficiency in a patient with reactive arthritis: case report and review of the literature. *HSS J*. 2011;7:187-9.
242. Hannu T, Inman R, Granfors K, Leirisalo-Repo M. Reactive arthritis or post-infectious arthritis? Best practice & research *Clinical rheumatology*. 2006;20:419-33.
243. Benham H, Robinson PC, Baillet AC, Rehaume LM, Thomas R. Role of genetics in infection-associated arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2015;29:213-25.
244. Rohekar S, Tsui FW, Tsui HW, Xi N, Riarh R, Bilotta R, et al. Symptomatic acute reactive arthritis after an outbreak of salmonella. *The Journal of rheumatology*. 2008;35:1599-602.
245. Pacheco-Tena C, Burgos-Vargas R, Vázquez-Mellado J, Cazarín J, Pérez-Díaz JA. A proposal for the classification of patients for clinical and experimental studies on reactive arthritis. *The Journal of rheumatology*. 1999;26:1338-46.
246. Sieper J, Braun J, Kingsley GH. Report on the Fourth International Workshop on Reactive Arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:720-34.
247. Selmi C, Gershwin ME. Diagnosis and classification of reactive arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2014;13:546-9.
248. Ajene AN, Fischer Walker CL, Black RE. Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *Journal of health, population, and nutrition*. 2013;31:299-307.
249. Denison HJ, Curtis EM, Clynes MA, Bromhead C, Dennison EM, Grainger R. The incidence of sexually acquired reactive arthritis: a systematic literature review. *Clin Rheumatol*. 2016;35:2639-48.
250. Kononoff A, Arstila L, Pussinen P, Kautiainen H, Elfving P, Savolainen E, et al. Incidence of inflammatory joint diseases in Finland: results from a population-based epidemiological study. *Rheumatol Int*. 2017;37:1693-700.
251. Mason E, Wray L, Foster R, Jamil MS, Guy R, McNulty A, et al. Reactive arthritis at the Sydney Sexual Health Centre 1992-2012: declining despite increasing chlamydia diagnoses. *Int J STD AIDS*. 2016;27:882-9.
252. Okamoto H. Prevalence of Chlamydia-associated reactive arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2017;46:415-6.
253. Hayes KM, Hayes RJP, Turk MA, Pope JE. Evolving patterns of reactive arthritis. *Clin Rheumatol*. 2019;38:2083-8.
254. Courcoul A, Brinster A, Decullier E, Larbre JP, Piperno M, Pradat E, et al. A bicentre retrospective study of features and outcomes of patients with reactive arthritis. *Joint bone spine*. 2018;85:201-5.
255. Zambrano-Zaragoza JF, de Jesus Durán-Avelar M, Rodríguez-Ocampo AN, García-Latorre E, Burgos-Vargas R, Dominguez-Lopez ML, et al. The 30-kDa band from *Salmonella typhimurium*: IgM, IgA and IgG antibody response in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48:748-54.
256. Cristea D, Trandafir M, Bojinca VC, Ciontea AS, Andrei MM, Popa A, et al. Usefulness of complex bacteriological and serological analysis in patients with spondyloarthritis. *Exp Ther Med*. 2019;17:3465-76.
257. Zeidler H, Hudson AP. Chlamydia-Induced Reactive Arthritis: Disappearing Entity or Lack of Research? *Curr Rheumatol Rep*. 2019;21:63.
258. Carter JD, Gérard HC, Espinoza LR, Ricca LR, Valeriano J, Snelgrove J, et al. Chlamydiae as etiologic agents in chronic undifferentiated spondylarthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1311-6.
259. Kumar P, Khanna G, Batra S, Sharma VK, Rastogi S. Chlamydia trachomatis elementary bodies in synovial fluid of patients with reactive arthritis and undifferentiated spondyloarthropathy in India. *International journal of rheumatic diseases*. 2016;19:506-11.

260. Schnarr S, Putschky N, Jendro MC, Zeidler H, Hammer M, Kuipers JG, et al. Chlamydia and *Borrelia* DNA in synovial fluid of patients with early undifferentiated oligoarthritis: results of a prospective study. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2679-85.
261. Carter JD, Espinoza LR, Inman RD, Sneed KB, Ricca LR, Vasey FB, et al. Combination antibiotics as a treatment for chronic Chlamydia-induced reactive arthritis: a double-blind, placebo-controlled, prospective trial. *Arthritis Rheum.* 2010;62:1298-307.
262. Barber CE, Kim J, Inman RD, Esdaile JM, James MT. Antibiotics for treatment of reactive arthritis: a systematic review and metaanalysis. *The Journal of rheumatology.* 2013;40:916-28.
263. Flagg SD, Meador R, Hsia E, Kitumnuaypong T, Schumacher HR, Jr. Decreased pain and synovial inflammation after etanercept therapy in patients with reactive and undifferentiated arthritis: an open-label trial. *Arthritis Rheum.* 2005;53:613-7.
264. Meyer A, Chatelus E, Wendling D, Berthelot JM, Dernis E, Houvenagel E, et al. Safety and efficacy of anti-tumor necrosis factor alpha therapy in ten patients with recent-onset refractory reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:1274-80.
265. Thorsteinsson B, Geirsson AJ, Krogh NS, Gudbjornsson B, Icebio. Outcomes and Safety of Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Reactive Arthritis: A Nationwide Experience from Iceland. *The Journal of rheumatology.* 2020;47:1575-81.
266. Brinster A, Guillot X, Prati C, Wendling D. Anti-TNF treatment of reactive arthritis. A monocentric experience. *Joint bone spine.* 2017;84:237-8.
267. Clegg DO, Reda DJ, Weisman MH, Cush JJ, Vasey FB, Schumacher HR, Jr., et al. Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of reactive arthritis (Reiter's syndrome). A Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Arthritis Rheum.* 1996;39:2021-7.
268. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PloS one.* 2015;10:e0143304.
269. Sutton TL, Martinko T, Hale S, Fairchok MP. Prevalence and high rate of asymptomatic infection of *Chlamydia trachomatis* in male college Reserve Officer Training Corps cadets. *Sex Transm Dis.* 2003;30:901-4.
270. Panzetta ME, Valdivia RH, Saka HA. Chlamydia Persistence: A Survival Strategy to Evade Antimicrobial Effects in-vitro and in-vivo. *Front Microbiol.* 2018;9:3101.
271. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization.* 2004;82:844-51.
272. Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH. Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:a010256.
273. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infection and immunity.* 1994;62:3705-11.
274. Gérard HC, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* up regulates expression of a panel of genes similar to that transcribed by *Mycobacterium tuberculosis* during persistent infection. *Annals of the rheumatic diseases.* 2006;65:321-7.
275. Belland RJ, Nelson DE, Virok D, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, et al. Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN-gamma-mediated persistence and reactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100:15971-6.
276. Phillips Campbell R, Kintner J, Whittimore J, Schoborg RV. *Chlamydia muridarum* enters a viable but non-infectious state in amoxicillin-treated BALB/c mice. *Microbes and infection.* 2012;14:1177-85.
277. Phillips-Campbell R, Kintner J, Schoborg RV. Induction of the *Chlamydia muridarum* stress/persistence response increases azithromycin treatment failure in a murine model of infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014;58:1782-4.
278. Lewis ME, Belland RJ, AbdelRahman YM, Beatty WL, Aiyar AA, Zea AH, et al. Morphologic and molecular evaluation of *Chlamydia trachomatis* growth in human endocervix reveals distinct growth patterns. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2014;4:71.
279. Borel N, Leonard C, Slade J, Schoborg RV. Chlamydial Antibiotic Resistance and Treatment Failure in Veterinary and Human Medicine. *Current clinical microbiology reports.* 2016;3:10-8.

280. Horner PJ. Azithromycin antimicrobial resistance and genital *Chlamydia trachomatis* infection: duration of therapy may be the key to improving efficacy. *Sexually transmitted infections*. 2012;88:154-6.
281. Suchland RJ, Dimond ZE, Putman TE, Rockey DD. Demonstration of Persistent Infections and Genome Stability by Whole-Genome Sequencing of Repeat-Positive, Same-Serovar *Chlamydia trachomatis* Collected From the Female Genital Tract. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215:1657-65.
282. Wong WF, Chambers JP, Gupta R, Arulanandam BP. *Chlamydia* and Its Many Ways of Escaping the Host Immune System. *Journal of pathogens*. 2019;2019:8604958.
283. Lausen M, Christiansen G, Bouet Guldbaek Poulsen T, Birkelund S. Immunobiology of monocytes and macrophages during *Chlamydia trachomatis* infection. *Microbes and infection*. 2019;21:73-84.
284. Belay T, Eko FO, Ananaba GA, Bowers S, Moore T, Lyn D, et al. Chemokine and chemokine receptor dynamics during genital chlamydial infection. *Infection and immunity*. 2002;70:844-50.
285. Buchholz KR, Stephens RS. Activation of the host cell proinflammatory interleukin-8 response by *Chlamydia trachomatis*. *Cellular microbiology*. 2006;8:1768-79.
286. Lee HY, Schripsema JH, Sigar IM, Murray CM, Lacy SR, Ramsey KH. A link between neutrophils and chronic disease manifestations of *Chlamydia muridarum* urogenital infection of mice. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2010;59:108-16.
287. Lijek RS, Helble JD, Olive AJ, Seiger KW, Starnbach MN. Pathology after *Chlamydia trachomatis* infection is driven by nonprotective immune cells that are distinct from protective populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115:2216-21.
288. Bai H, Yang J, Qiu H, Wang S, Fan Y, Han X, et al. Intranasal inoculation of *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis agent induces significant neutrophil infiltration which is not efficient in controlling the infection in mice. *Immunology*. 2005;114:246-54.
289. Rajeeve K, Das S, Prusty BK, Rudel T. *Chlamydia trachomatis* paralyzes neutrophils to evade the host innate immune response. *Nat Microbiol*. 2018;3:824-35.
290. Rupp J, Pfliederer L, Jugert C, Moeller S, Klinger M, Dalhoff K, et al. *Chlamydia pneumoniae* hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages. *PloS one*. 2009;4:e6020.
291. Pirbhai M, Dong F, Zhong Y, Pan KZ, Zhong G. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:31495-501.
292. Dong F, Pirbhai M, Xiao Y, Zhong Y, Wu Y, Zhong G. Degradation of the proapoptotic proteins Bik, Puma, and Bim with Bcl-2 domain 3 homology in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *Infection and immunity*. 2005;73:1861-4.
293. Sixt BS, Núñez-Otero C, Kepp O, Valdivia RH, Kroemer G. *Chlamydia trachomatis* fails to protect its growth niche against pro-apoptotic insults. *Cell death and differentiation*. 2019;26:1485-500.
294. Kourtzelis I, Hajishengallis G, Chavakis T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Front Immunol*. 2020;11:553.
295. Gracey E, Lin A, Akram A, Chiu B, Inman RD. Intracellular survival and persistence of *Chlamydia muridarum* is determined by macrophage polarization. *PloS one*. 2013;8:e69421.
296. Kuo CC, Puolakkainen M, Lin TM, Witte M, Campbell LA. Mannose-receptor positive and negative mouse macrophages differ in their susceptibility to infection by *Chlamydia* species. *Microb Pathog*. 2002;32:43-8.
297. Buchacher T, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Fischer MB, Weber V. M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PloS one*. 2015;10:e0143593.
298. Boncompain G, Schneider B, Delevoye C, Kellermann O, Dautry-Varsat A, Subtil A. Production of reactive oxygen species is turned on and rapidly shut down in epithelial cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Infection and immunity*. 2010;78:80-7.
299. Tauber AI, Pavlotsky N, Lin JS, Rice PA. Inhibition of human neutrophil NADPH oxidase by *Chlamydia* serovars E, K, and L2. *Infection and immunity*. 1989;57:1108-12.

300. Patton MJ, McCorrister S, Grant C, Westmacott G, Fariss R, Hu P, et al. Chlamydial Protease-Like Activity Factor and Type III Secreted Effectors Cooperate in Inhibition of p65 Nuclear Translocation. *mBio*. 2016;7.
301. Fehlner-Gardiner C, Roshick C, Carlson JH, Hughes S, Belland RJ, Caldwell HD, et al. Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:26893-903.
302. Morrison RP, Feilzer K, Tumas DB. Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infection and immunity*. 1995;63:4661-8.
303. Stagg AJ, Tuffrey M, Woods C, Wunderink E, Knight SC. Protection against ascending infection of the genital tract by *Chlamydia trachomatis* is associated with recruitment of major histocompatibility complex class II antigen-presenting cells into uterine tissue. *Infection and immunity*. 1998;66:3535-44.
304. Zhong G, Fan T, Liu L. *Chlamydia* inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J Exp Med*. 1999;189:1931-8.
305. Zhong G, Liu L, Fan T, Fan P, Ji H. Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in *chlamydia*-infected cells. *J Exp Med*. 2000;191:1525-34.
306. Igietsme JU, Ramsey KH, Magee DM, Williams DM, Kincy TJ, Rank RG. Resolution of murine chlamydial genital infection by the adoptive transfer of a biovar-specific, Th1 lymphocyte clone. *Regional immunology*. 1993;5:317-24.
307. Yu H, Karunakaran KP, Kelly I, Shen C, Jiang X, Foster LJ, et al. Immunization with live and dead *Chlamydia muridarum* induces different levels of protective immunity in a murine genital tract model: correlation with MHC class II peptide presentation and multifunctional Th1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186:3615-21.
308. Fankhauser SC, Starnbach MN. PD-L1 limits the mucosal CD8+ T cell response to *Chlamydia trachomatis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;192:1079-90.
309. Nanagara R, Li F, Beutler A, Hudson A, Schumacher HR, Jr. Alteration of *Chlamydia trachomatis* biologic behavior in synovial membranes. Suppression of surface antigen production in reactive arthritis and Reiter's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1995;38:1410-7.
310. Gérard HC, Carter JD, Hudson AP. *Chlamydia trachomatis* is present and metabolically active during the remitting phase in synovial tissues from patients with chronic *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *The American journal of the medical sciences*. 2013;346:22-5.
311. Akama H. Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. *Lancet (London, England)*. 1990;335:1224.
312. Nikkari S, Rantakokko K, Ekman P, Möttönen T, Leirisalo-Repo M, Virtala M, et al. Salmonella-triggered reactive arthritis: use of polymerase chain reaction, immunocytochemical staining, and gas chromatography-mass spectrometry in the detection of bacterial components from synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 1999;42:84-9.
313. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *The Journal of infectious diseases*. 1998;177:1322-5.
314. Bryan ER, Kollipara A, Trim LK, Armitage CW, Carey AJ, Mihalas B, et al. Hematogenous dissemination of *Chlamydia muridarum* from the urethra in macrophages causes testicular infection and sperm DNA damage†. *Biology of reproduction*. 2019;101:748-59.
315. Olmez N, Wang GF, Li Y, Zhang H, Schumacher HR. Chlamydial nucleic acids in synovium in osteoarthritis: what are the implications? *The Journal of rheumatology*. 2001;28:1874-80.
316. Schumacher HR, Jr., Arayssi T, Crane M, Lee J, Gerard H, Hudson AP, et al. *Chlamydia trachomatis* nucleic acids can be found in the synovium of some asymptomatic subjects. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1281-4.
317. Thiel A, Wu P, Lauster R, Braun J, Radbruch A, Sieper J. Analysis of the antigen-specific T cell response in reactive arthritis by flow cytometry. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2834-42.

318. Simon AK, Seipelt E, Wu P, Wenzel B, Braun J, Sieper J. Analysis of cytokine profiles in synovial T cell clones from chlamydial reactive arthritis patients: predominance of the Th1 subset. *Clinical and experimental immunology*. 1993;94:122-6.
319. Braun J, Yin Z, Spiller I, Siegert S, Rudwaleit M, Liu L, et al. Low secretion of tumor necrosis factor alpha, but no other Th1 or Th2 cytokines, by peripheral blood mononuclear cells correlates with chronicity in reactive arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:2039-44.
320. Butrimiene I, Jarmalaite S, Ranceva J, Venalis A, Jasiuleviciute L, Zvirbliene A. Different cytokine profiles in patients with chronic and acute reactive arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43:1300-4.
321. Bas S, Kvien TK, Buchs N, Fulpius T, Gabay C. Lower level of synovial fluid interferon-gamma in HLA-B27-positive than in HLA-B27-negative patients with Chlamydia trachomatis reactive arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42:461-7.
322. Singh AK, Misra R, Aggarwal A. Th-17 associated cytokines in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthritis. *Clin Rheumatol*. 2011;30:771-6.
323. Bas S, Neff L, Viatte S, Vuillet M, Spenato U, Guerne PA, et al. Relationship between gamma-interferon and interleukin-17 in Chlamydia trachomatis reactive arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2009;27:885-6.
324. Chowdhury AC, Chaurasia S, Mishra SK, Aggarwal A, Misra R. IL-17 and IFN-gamma producing NK and gammadelta-T cells are preferentially expanded in synovial fluid of patients with reactive arthritis and undifferentiated spondyloarthritis. *Clin Immunol*. 2017;183:207-12.
325. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervoordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70:1357-62.
326. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*. 1984;83:1-16.
327. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*. 2003;426:454-60.
328. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*: Garland Science; 2017.
329. Roncagalli R, Mingueneau M, Grégoire C, Malissen M, Malissen B. LAT signaling pathology: an "autoimmune" condition without T cell self-reactivity. *Trends in immunology*. 2010;31:253-9.
330. Yan Q, Barros T, Visperas PR, Deindl S, Kadlec TA, Weiss A, et al. Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker. *Molecular and cellular biology*. 2013;33:2188-201.
331. Tanaka S, Maeda S, Hashimoto M, Fujimori C, Ito Y, Teradaira S, et al. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185:2295-305.
332. Sakaguchi S, Takahashi T, Hata H, Yoshitomi H, Tanaka S, Hirota K, et al. SKG mice, a monogenic model of autoimmune arthritis due to altered signal transduction in T-cells. In: Holmdahl R, editor. *The Hereditary Basis of Rheumatic Diseases*. Basel: Birkhäuser Basel; 2006. p. 147-59.
333. Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, et al. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 2007;204:41-7.
334. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*. 2007;204:2803-12.
335. Rehaume LM, Mondot S, Aguirre de Cárcer D, Velasco J, Benham H, Hasnain SZ, et al. ZAP-70 genotype disrupts the relationship between microbiota and host, leading to spondyloarthritis and ileitis in SKG mice. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66:2780-92.
336. Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, et al. A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med*. 2005;201:949-60.
337. Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends in immunology*. 2009;30:455-64.

338. Ruutu M, Thomas G, Steck R, Degli-Esposti MA, Zinkernagel MS, Alexander K, et al. beta-glucan triggers spondylarthritis and Crohn's disease-like ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2211-22.
339. De Clercq E, Kalmar I, Vanrompay D. Animal models for studying female genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *Infection and immunity.* 2013;81:3060-7.
340. Hough AJ, Jr., Rank RG. Pathogenesis of acute arthritis due to viable *Chlamydia trachomatis* (mouse pneumonitis agent) in C57Bl/6 mice. *The American journal of pathology.* 1989;134:903-12.
341. Inman RD, Chiu B. Synoviocyte-packaged *Chlamydia trachomatis* induces a chronic aseptic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102:1776-82.
342. Baillet AC, Rehaume LM, Benham H, O'Meara CP, Armitage CW, Ruscher R, et al. High *Chlamydia* Burden Promotes Tumor Necrosis Factor-Dependent Reactive Arthritis in SKG Mice. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ).* 2015;67:1535-47.
343. Chandra NL, Broad C, Folkard K, Town K, Harding-Esch EM, Woodhall SC, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in rectal specimens in women and its association with anal intercourse: a systematic review and meta-analysis. *Sexually transmitted infections.* 2018;94:320-6.
344. Perry LL, Hughes S. Chlamydial colonization of multiple mucosae following infection by any mucosal route. *Infection and immunity.* 1999;67:3686-9.
345. Igietsme JU, Portis JL, Perry LL. Inflammation and clearance of *Chlamydia trachomatis* in enteric and nonenteric mucosae. *Infection and immunity.* 2001;69:1832-40.
346. Yeruva L, Melnyk S, Spencer N, Bowlin A, Rank RG. Differential susceptibilities to azithromycin treatment of chlamydial infection in the gastrointestinal tract and cervix. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2013;57:6290-4.
347. Zhou Z, Tian Q, Wang L, Xue M, Xu D, Zhong G. *Chlamydia* Spreads to the Large Intestine Lumen via Multiple Pathways. *Infection and immunity.* 2021;89:e0025421.
348. Zhong G. *Chlamydia* Spreading from the Genital Tract to the Gastrointestinal Tract - A Two-Hit Hypothesis. *Trends Microbiol.* 2018;26:611-23.
349. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Frontiers in physiology.* 2018;9:113.
350. Leliefeld PH, Koenderman L, Pillay J. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Front Immunol.* 2015;6:471.
351. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity.* 2004;21:215-26.
352. Al-Zeer MA, Xavier A, Abu Lubad M, Sigulla J, Kessler M, Hurwitz R, et al. *Chlamydia trachomatis* Prevents Apoptosis Via Activation of PDPK1-MYC and Enhanced Mitochondrial Binding of Hexokinase II. *EBioMedicine.* 2017;23:100-10.
353. Kvedaraite E, Lourda M, Idestrom M, Chen P, Olsson-Åkefeldt S, Forkel M, et al. Tissue-infiltrating neutrophils represent the main source of IL-23 in the colon of patients with IBD. *Gut.* 2016;65:1632-41.
354. Kwon OC, Lee EJ, Chang EJ, Youn J, Ghang B, Hong S, et al. IL-17A(+)GM-CSF(+) Neutrophils Are the Major Infiltrating Cells in Interstitial Lung Disease in an Autoimmune Arthritis Model. *Front Immunol.* 2018;9:1544.
355. Naglak EK, Morrison SG, Morrison RP. Neutrophils Are Central to Antibody-Mediated Protection against Genital *Chlamydia*. *Infection and immunity.* 2017;85.
356. Stackowicz J, Jönsson F, Reber LL. Mouse Models and Tools for the in vivo Study of Neutrophils. *Front Immunol.* 2019;10:3130.
357. Yang W, Tao Y, Wu Y, Zhao X, Ye W, Zhao D, et al. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nature communications.* 2019;10:1076.
358. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunological reviews.* 2016;273:357-70.
359. van der Heijde D, Ramiro S, Landewé R, Baraliakos X, Van den Bosch F, Sepriano A, et al. 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2017;76:978-91.

360. Fischer BD, Adeyemo A, O'Leary ME, Bottaro A. Animal models of rheumatoid pain: experimental systems and insights. *Arthritis Res Ther.* 2017;19:146.
361. Sardar S, Andersson A. Old and new therapeutics for Rheumatoid Arthritis: in vivo models and drug development. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2016;38:2-13.
362. Ruan MZ, Patel RM, Dawson BC, Jiang MM, Lee BH. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21:1355-64.
363. Rao SR, Olechnowicz SWZ, Kratschmer P, Jepson JEC, Edwards CM, Edwards JR. Small Animal Video Tracking for Activity and Path Analysis Using a Novel Open-Source Multi-Platform Application (AnimApp). *Sci Rep.* 2019;9:12343.
364. Quadros AU, Pinto LG, Fonseca MM, Kusuda R, Cunha FQ, Cunha TM. Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. *Sci Rep.* 2015;5:14648.
365. Iannello F. Non-intrusive high throughput automated data collection from the home cage. *Heliyon.* 2019;5:e01454.
366. Pernold K, Iannello F, Low BE, Rigamonti M, Rosati G, Scavizzi F, et al. Towards large scale automated cage monitoring - Diurnal rhythm and impact of interventions on in-cage activity of C57BL/6J mice recorded 24/7 with a non-disrupting capacitive-based technique. *PloS one.* 2019;14:e0211063.
367. Machado P, Landewé R, Braun J, Hermann KG, Baker D, van der Heijde D. Both structural damage and inflammation of the spine contribute to impairment of spinal mobility in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2010;69:1465-70.
368. Landewé R, Dougados M, Mielants H, van der Tempel H, van der Heijde D. Physical function in ankylosing spondylitis is independently determined by both disease activity and radiographic damage of the spine. *Annals of the rheumatic diseases.* 2009;68:863-7.
369. Lim DH, Lee EJ, Kwon OC, Hong S, Lee CK, Yoo B, et al. Effect of tumor necrosis factor inhibition on spinal inflammation and spinal ankylosis in SKG mice. *Sci Rep.* 2019;9:18000.
370. Broche L, Favier B, Rougé-Labriet H, Drevet S, Lardy B, Brun E, et al. Calcified cartilage revealed in whole joint by X-ray phase contrast imaging. *Osteoarthritis and Cartilage Open.* 2021;3:100168.
371. Poddubnyy D, Listing J, Haibel H, Knüppel S, Rudwaleit M, Sieper J. Functional relevance of radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis: results from the GERman SPondyloarthritis Inception Cohort. *Rheumatology (Oxford).* 2018;57:703-11.
372. Ramiro S, Stolwijk C, van Tubergen A, van der Heijde D, Dougados M, van den Bosch F, et al. Evolution of radiographic damage in ankylosing spondylitis: a 12 year prospective follow-up of the OASIS study. *Annals of the rheumatic diseases.* 2015;74:52-9.
373. Machado PM, Baraliakos X, van der Heijde D, Braun J, Landewé R. MRI vertebral corner inflammation followed by fat deposition is the strongest contributor to the development of new bone at the same vertebral corner: a multilevel longitudinal analysis in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2016;75:1486-93.
374. Baraliakos X, Heldmann F, Callhoff J, Listing J, Appelboom T, Brandt J, et al. Which spinal lesions are associated with new bone formation in patients with ankylosing spondylitis treated with anti-TNF agents? A long-term observational study using MRI and conventional radiography. *Annals of the rheumatic diseases.* 2014;73:1819-25.
375. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, Märker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, et al. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:1388-98.
376. Ramiro S, van der Heijde D, van Tubergen A, Stolwijk C, Dougados M, van den Bosch F, et al. Higher disease activity leads to more structural damage in the spine in ankylosing spondylitis: 12-year longitudinal data from the OASIS cohort. *Annals of the rheumatic diseases.* 2014;73:1455-61.
377. Benhamou M, Gossec L, Dougados M. Clinical relevance of C-reactive protein in ankylosing spondylitis and evaluation of the NSAIDs/coxibs' treatment effect on C-reactive protein. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49:536-41.

378. Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B, FitzGerald O. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1676-85.
379. Rudwaleit M, Metter A, Listing J, Sieper J, Braun J. Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria. *Arthritis Rheum.* 2006;54:569-78.
380. Calin A, Porta J, Fries JF, Schurman DJ. Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. *Jama.* 1977;237:2613-4.
381. Machado PM, Landewé R, Heijde DV. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): 2018 update of the nomenclature for disease activity states. *Annals of the rheumatic diseases.* 2018;77:1539-40.
382. Rosine N, Etcheto A, Hendel-Chavez H, Seror R, Briot K, Molto A, et al. Increase In Il-31 Serum Levels Is Associated With Reduced Structural Damage In Early Axial Spondyloarthritis. *Sci Rep.* 2018;8:7731.
383. Bakker PA, van den Berg R, Lenczner G, Thévenin F, Reijnierse M, Claudepierre P, et al. Can we use structural lesions seen on MRI of the sacroiliac joints reliably for the classification of patients according to the ASAS axial spondyloarthritis criteria? Data from the DESIR cohort. *Annals of the rheumatic diseases.* 2017;76:392-8.
384. van der Heijde D, Landewé R. Selection of a method for scoring radiographs for ankylosing spondylitis clinical trials, by the Assessment in Ankylosing Spondylitis Working Group and OMERACT. *The Journal of rheumatology.* 2005;32:2048-9.
385. Pedersen SJ, Weber U, Said-Nahal R, Sørensen IJ, Loft AG, Kollerup G, et al. Structural progression rate decreases over time on serial radiography and magnetic resonance imaging of sacroiliac joints and spine in a five-year follow-up study of patients with ankylosing spondylitis treated with tumour necrosis factor inhibitor. *Scand J Rheumatol.* 2019;48:185-97.
386. Braun J, Baraliakos X, Golder W, Brandt J, Rudwaleit M, Listing J, et al. Magnetic resonance imaging examinations of the spine in patients with ankylosing spondylitis, before and after successful therapy with infliximab: evaluation of a new scoring system. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1126-36.
387. Maksymowych WP, Inman RD, Salonen D, Dhillon SS, Krishnananthan R, Stone M, et al. Spondyloarthritis Research Consortium of Canada magnetic resonance imaging index for assessment of spinal inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2005;53:502-9.
388. Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS, Ambrus JL, Velosa J, Keane WF, et al. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Archives of internal medicine.* 1989;149:2461-5.
389. Sanders JS, Huitma MG, Kallenberg CG, Stegeman CA. Prediction of relapses in PR3-ANCA-associated vasculitis by assessing responses of ANCA titres to treatment. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:724-9.
390. Tomasson G, Grayson PC, Mahr AD, Lavalley M, Merkel PA. Value of ANCA measurements during remission to predict a relapse of ANCA-associated vasculitis--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51:100-9.
391. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1990;87:4115-9.
392. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest.* 2002;110:955-63.
393. Pepper RJ, Draibe JB, Caplin B, Fervenza FC, Hoffman GS, Kallenberg CG, et al. Association of Serum Calprotectin (S100A8/A9) Level With Disease Relapse in Proteinase 3-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ).* 2017;69:185-93.
394. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJ, et al. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Annals of the rheumatic diseases.* 2017;76:17-28.

395. Romand X, Liu X, Rahman MA, Bhuyan ZA, Douillard C, Kedia RA, et al. Mediation of Interleukin-23 and Tumor Necrosis Factor-Driven Reactive Arthritis by Chlamydia-Infected Macrophages in SKG Mice. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, NJ). 2021;73:1200-10.
396. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, Letourneur F, Jacques S, Smith JA, et al. Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, NJ). 2014;66:841-51.
397. Farr L, Ghosh S, Jiang N, Watanabe K, Parlak M, Bucala R, et al. CD74 Signaling Links Inflammation to Intestinal Epithelial Cell Regeneration and Promotes Mucosal Healing. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2020;10:101-12.
398. Manasson J, Shen N, Garcia Ferrer HR, Ubeda C, Iraheta I, Heguy A, et al. Gut Microbiota Perturbations in Reactive Arthritis and Postinfectious Spondyloarthritis. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, NJ). 2018;70:242-54.
399. Tito RY, Cypers H, Joossens M, Varkas G, Van Praet L, Glorieus E, et al. Brief Report: Dialister as a Microbial Marker of Disease Activity in Spondyloarthritis. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, NJ). 2017;69:114-21.
400. van Lunteren M, Ez-Zaitouni Z, Fongen C, Landewé R, Ramonda R, van der Heijde D, et al. Disease activity decrease is associated with improvement in work productivity over 1 year in early axial spondyloarthritis (SPondyloArthritis Caught Early cohort). *Rheumatology* (Oxford). 2017;56:2222-8.
401. Protopopov M, Sieper J, Haibel H, Listing J, Rudwaleit M, Poddubnyy D. Relevance of structural damage in the sacroiliac joints for the functional status and spinal mobility in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Arthritis Res Ther*. 2017;19:240.
402. Schett G, McInnes IB, Neurath MF. Reframing Immune-Mediated Inflammatory Diseases through Signature Cytokine Hubs. *The New England journal of medicine*. 2021;385:628-39.
403. Poddubnyy D, Sieper J. What is the best treatment target in axial spondyloarthritis: tumour necrosis factor α , interleukin 17, or both? *Rheumatology* (Oxford). 2018;57:1145-50.
404. Soret P, Le Dantec C, Desvaux E, Foulquier N, Chassagnol B, Hubert S, et al. A new molecular classification to drive precision treatment strategies in primary Sjögren's syndrome. *Nature communications*. 2021;12:3523.
405. Gossec L, Molto A, Romand X, Puyraimond-Zemmour D, Lavielle M, Beauvais C, et al. Recommendations for the assessment and optimization of adherence to disease-modifying drugs in chronic inflammatory rheumatic diseases: A process based on literature reviews and expert consensus. *Joint bone spine*. 2019;86:13-9.
406. Baillet A, Romand X, Pflimlin A, Dalecky M, Claudepierre P, Flipo RM, et al. Data to be collected for an optimal management of axial spondyloarthritis in daily practice: Proposal from evidence-based and consensual approaches. *Joint bone spine*. 2020;87:405-11.
407. Huang YP, Wang YH, Pan SL. Increased risk of ischemic heart disease in young patients with newly diagnosed ankylosing spondylitis--a population-based longitudinal follow-up study. *PloS one*. 2013;8:e64155.
408. Gensler LS. Axial spondyloarthritis: the heart of the matter. *Clin Rheumatol*. 2015;34:995-8.
409. Ward MM. Lifetime Risks of Valvular Heart Disease and Pacemaker Use in Patients With Ankylosing Spondylitis. *Journal of the American Heart Association*. 2018;7:e010016.
410. Lehtinen K. Mortality and causes of death in 398 patients admitted to hospital with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1993;52:174-6.
411. Ward MM. Decreases in rates of hospitalizations for manifestations of severe rheumatoid arthritis, 1983-2001. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1122-31.
412. Bartels CM, Bell CL, Shinki K, Rosenthal A, Bridges AJ. Changing trends in serious extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis among United State veterans over 20 years. *Rheumatology* (Oxford). 2010;49:1670-5.
413. Zhao SS, Pittam B, Harrison NL, Ahmed AE, Goodson NJ, Hughes DM. Diagnostic delay in axial spondyloarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology* (Oxford). 2021;60:1620-8.
414. Sykes MP, Doll H, Sengupta R, Gaffney K. Delay to diagnosis in axial spondyloarthritis: are we improving in the UK? *Rheumatology* (Oxford). 2015;54:2283-4.

415. Karmacharya P, Duarte-Garcia A, Dubreuil M, Murad MH, Shahukhal R, Shrestha P, et al. Effect of Therapy on Radiographic Progression in Axial Spondyloarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, NJ). 2020;72:733-49.
416. Gran JT, Skomsvoll JF. The outcome of ankylosing spondylitis: a study of 100 patients. *British journal of rheumatology*. 1997;36:766-71.
417. Sampaio-Barros PD, Bertolo MB, Kraemer MH, Neto JF, Samara AM. Primary ankylosing spondylitis: patterns of disease in a Brazilian population of 147 patients. *The Journal of rheumatology*. 2001;28:560-5.
418. Akar S, Kaplan YC, Ecemiş S, Keskin-Arslan E, Gercik Ö, Gücenmez S, et al. The role of smoking in the development and progression of structural damage in axial SpA patients: A systematic review and meta-analysis. *European journal of rheumatology*. 2019;6:184-92.
419. Gross J, Ramiro S, Etcheto A, Molto A, Van Tubergen A, Landewée R, et al. AB0692 Parameters associated with severe axial structural involvement: data from the bamboo spine cohort on 133 spondyloarthritis patients. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75:1141.1-.
420. Bilano V, Gilmour S, Moffiet T, d'Espaignet ET, Stevens GA, Commar A, et al. Global trends and projections for tobacco use, 1990-2025: an analysis of smoking indicators from the WHO Comprehensive Information Systems for Tobacco Control. *Lancet* (London, England). 2015;385:966-76.
421. Soleimanifar N, Nicknam MH, Bidad K, Jamshidi AR, Mahmoudi M, Mostafaei S, et al. Effect of food intake and ambient air pollution exposure on ankylosing spondylitis disease activity. *Advances in rheumatology* (London, England). 2019;59:9.
422. Ometto F, Ortolan A, Farber D, Lorenzin M, Dellamaria G, Cozzi G, et al. Mediterranean diet in axial spondyloarthritis: an observational study in an Italian monocentric cohort. *Arthritis Res Ther*. 2021;23:219

