



**HAL**  
open science

# Régulation négative de la signalisation de l'interleukine-10 par le TNFa dans les monocytes humains : implication de NOX2 et impact dans la polyarthrite rhumatoïde

Marwa Ben Khemis

► **To cite this version:**

Marwa Ben Khemis. Régulation négative de la signalisation de l'interleukine-10 par le TNFa dans les monocytes humains : implication de NOX2 et impact dans la polyarthrite rhumatoïde. Immunologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7212 . tel-03988398

**HAL Id: tel-03988398**

**<https://theses.hal.science/tel-03988398>**

Submitted on 14 Feb 2023

**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.

# Université de Paris

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité ED562

Centre de Recherche sur l'Inflammation

INSERM U1149 CNRS ERL8252

## Régulation négative de la signalisation de l'interleukine-10 par le TNF $\alpha$ dans les monocytes humains : implication de NOX2 et impact dans la polyarthrite rhumatoïde

Par Marwa BEN KHEMIS

Thèse de doctorat en Immunologie

Dirigée par le Dr. Pham My-Chan DANG

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 16 Décembre 2021

Devant un jury composé de :

<b>Dr. Marie-Hélène PACLET</b>	MCU-PH, Université de Grenoble Alpes	Rapportrice
<b>Pr. Oliver NÜSSE</b>	PU, Université Paris-Saclay	Rapporteur
<b>Dr. Nathalie THIEBLEMONT</b>	CRHC, Université de Paris	Examinatrice
<b>Pr. Dominique LEDOUX</b>	PU, Université Sorbonne Paris Nord	Examineur
<b>Dr. Pham My-Chan DANG</b>	DR, Université de Paris	Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

# **Régulation négative de la signalisation de l'interleukine-10 par le TNF $\alpha$ dans les monocytes humains : implication de NOX2 et impact dans la polyarthrite rhumatoïde.**

## **RESUME**

L'interleukine 10 (IL-10) est une puissante cytokine anti-inflammatoire produite par la plupart des cellules de l'immunité innée et adaptative et dont les monocytes en sont une cible majeure. La liaison de l'interleukine-10 à son récepteur initie une signalisation intracellulaire impliquant STAT3 ce qui induit l'expression de gènes codant pour des facteurs anti-inflammatoires. Du fait de son action immuno-modulatrice, l'IL-10 a été considérée comme un outil thérapeutique intéressant dans les maladies inflammatoires aiguës ou chroniques, et les maladies auto-immunes ayant une composante inflammatoire. Cependant l'administration de l'IL-10 n'a montré que peu d'efficacité dans diverses situations pathologiques telle que la polyarthrite rhumatoïde (PR). La difficulté pourrait être liée à la complexité du foyer inflammatoire où la présence de multiples cytokines pourrait affecter la signalisation de l'IL-10. Dans ce contexte l'objectif de la thèse était de déterminer si le TNF $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire majeure, pouvait altérer la signalisation de l'interleukine-10 dans les monocytes humains et de déterminer mécanismes sous-jacents, impliquant la NADPH oxydase 2 (NOX2) acteur important de la signalisation cellulaire et dont le TNF $\alpha$  en est agoniste, ainsi que l'impact potentiel dans les situations inflammatoires pathologiques, telle que la PR, en utilisant un modèle expérimental murin.

Nos résultats montrent que le TNF $\alpha$  interfère avec la signalisation de l'IL-10 en induisant une déphosphorylation rapide de STAT3 dans les monocytes humains. La déphosphorylation de STAT3 induite par le TNF $\alpha$  se traduit par une diminution de la capacité de l'IL-10 à induire l'expression de SOCS3 un facteur anti-inflammatoire majeur. La diminution de la phosphorylation de STAT3 implique une phosphatase SHP1 / 2 car l'utilisation du NSC-87877, un inhibiteur de SHP1 / 2, empêche l'action inhibitrice du TNF $\alpha$  sur la signalisation de l'IL-10. Dans les monocytes stimulés par le TNF $\alpha$ , la SHP1 est activée alors que la SHP2 ne l'est pas, suggérant l'implication de SHP1 et non pas celle de SHP2 dans la déphosphorylation de STAT3. L'activation de SHP1 par le TNF $\alpha$  est dépendante de NOX2 car nous avons observé que le diphénylèneiodonium (DPI), un inhibiteur de NOX2, supprime l'activation de SHP1 et la déphosphorylation de STAT3 déclenchée par le TNF $\alpha$ . De plus, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a reproduit l'action inhibitrice du TNF $\alpha$  sur la signalisation

de l'IL-10. Par ailleurs, l'activation de SHP1 par les FRO dans les monocytes stimulés par le TNF $\alpha$  est médiée par la tyrosine kinase Lyn connue pour être régulée par oxydation. Enfin, l'inhibiteur SHP1/2, NSC-87877, atténue l'arthrite induite par les anticorps de collagène (CAIA) chez la souris. Ces résultats révèlent que le TNF $\alpha$  perturbe la signalisation de l'IL-10 en induisant la déphosphorylation de STAT3 via l'axe NOX2-ROS-Lyn-SHP1 dans les monocytes humains et que l'inhibition de SHP1/2 *in vivo* protège contre la CAIA. Cette nouvelle découverte pourrait expliquer la résistance à l'IL-10 dans l'arthrite et pourrait être utile pour exploiter l'IL-10 dans l'immunothérapie.

Mots clés : IL-10, STAT3, TNF $\alpha$ , SHP1, monocytes, NOX2, FRO, inflammation.

# **Negative regulation of Interleukin-10 signaling pathway by TNF $\alpha$ in human monocytes: implication of NOX2 and impact in rheumatoid arthritis.**

## **ABSTRACT**

Interleukin 10 (IL-10) is a potent anti-inflammatory cytokine produced by most innate and adaptive immune cells and which monocytes are a major target. Binding of interleukin-10 to its receptor initiates intracellular signaling involving STAT3 which induces the expression of genes encoding anti-inflammatory factors. Due to its immunomodulatory action, IL-10 has been considered as an interesting therapeutic tool in diseases, acute or chronic inflammatory diseases, and autoimmune diseases with an inflammatory component. However, administration of IL-10 has shown little efficacy in various pathological conditions such as rheumatoid arthritis (RA). The difficulty could be related to the complexity of the inflammatory environment where the presence of multiple cytokines could affect IL-10 signaling. In this context, the objective of the thesis was to determine whether TNF $\alpha$ , a major pro-inflammatory cytokine, could alter interleukin-10 signaling in human monocytes and to determine underlying mechanisms, involving NADPH oxidase 2 (NOX2) an important player in cell signaling and in which TNF $\alpha$  is an agonist, as well as the potential impact in pathological inflammatory situations, such as RA, using an experimental mouse model.

Our results show that TNF $\alpha$  interferes with IL-10 signaling by inducing rapid dephosphorylation of STAT3 in human monocytes. TNF $\alpha$ -induced dephosphorylation of STAT3 results in decreased ability of IL-10 to induce expression of SOCS3, a major anti-inflammatory factor. The decrease in STAT3 phosphorylation involved SHP1 / 2 phosphatase because the use of NSC-87877, an SHP1 / 2 inhibitor, prevents the inhibitory action of TNF $\alpha$  on IL-10 signaling. In monocytes stimulated by TNF $\alpha$ , SHP1 is activated while SHP2 is not, suggesting the involvement of SHP1 and not that of SHP2 in the dephosphorylation of STAT3. The activation of SHP1 by TNF $\alpha$  is dependent on NOX2 because we observed that diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of NOX2, suppressed the activation of SHP1 and the dephosphorylation of STAT3 triggered by TNF $\alpha$ . In addition, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mimicked the inhibitory action of TNF $\alpha$  on IL-10 signaling. Furthermore, activation of SHP1 by ROS in TNF $\alpha$ -stimulated monocytes is mediated by Lyn tyrosine kinase known to be regulated by oxidation. Finally, the SHP1 / 2 inhibitor, NSC-87877, attenuated collagen antibody-induced arthritis

(CAIA) in mice. These results revealed that TNF $\alpha$  disrupted IL-10 signaling by inducing STAT3 dephosphorylation via the NOX2-ROS-Lyn-SHP1 axis in human monocytes and that inhibition of SHP1/2 in vivo protected against CAIA. This new finding might explain the resistance to IL-10 supplementation in arthritis and might be useful to harness IL-10 for immunotherapy.

Key words: IL-10, STAT3, TNF $\alpha$ , SHP1, monocytes, NOX2, ROS, inflammation.

## REMERCIEMENTS

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit a été effectué au Centre de Recherche sur l'Inflammation de la Faculté de Médecine Xavier Bichat, dans le laboratoire « Phagocytes et NADPH oxydases dans l'inflammation » de l'unité INSERM U1149 CNRS ERL8252 sous la direction du Docteur Pham My-Chan DANG.

En préambule à ce manuscrit, je souhaite adresser ici mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Je tiens en premier lieu à remercier vivement et à témoigner ma reconnaissance envers ma directrice de thèse, le Docteur Pham My-Chan DANG, pour son encadrement de qualité tout au long de cette thèse et pour m'avoir formé avec beaucoup de gentillesse, de pédagogie et de patience. Merci My-Chan de m'avoir toujours consacré du temps, aidée, conseillée et soutenue. J'ai beaucoup appris à vos côtés et ces trois années de travail avec vous restera une belle expérience enrichissante pour moi.

Je remercie ensuite le Docteur Jamel EL BENNA de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son équipe, pour sa bienveillance, et pour toutes ses suggestions pertinentes pour mon projet.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Marie-Hélène PACLET et au Professeur Oliver NÜSSE qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse ainsi qu'au Docteur Nathalie THIEBLEMONT et au Professeur Dominique LEDOUX d'avoir accepté de juger mon travail.

Merci au Docteur Jean-Claude MARIE pour sa bonne humeur constante et son aide avec les souris. Merci également au Docteur Margarita HURTADO-NEDELEC pour sa gentillesse et son aide en cytométrie en flux. Merci aussi au Professeur Marie-Anne GOUGEROT-POCIDALO pour son aide en allant chercher la poche de sang.

Coralie PINTARD et Docteur Dan LIU, merci d'avoir été présentes durant ces trois années et d'avoir rendu mes journées au laboratoire tellement sympas et amusantes ! Toutes nos discussions de tout et de rien, tous nos fou-rires et toutes nos sorties resteront pour moi de très bons souvenirs. Merci aussi pour votre précieuse aide expérimentale.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont partagé avec moi un bout de ma thèse et avec qui j'ai passé de bons moments : Amira, Amina, Asma, Ines, Rana, Min, Shana, Emma, Noémie et tous les autres...

Merci à mes amies d'avoir été là pour moi : Fouzia, Niouma, Nasria, Amaias, Aicha, Leila, Fatiha, Sawsen, Maëva, et un remerciement spécial à Marjan qui est bien plus qu'une amie et qui m'a toujours fortement soutenue et encouragée pour arriver jusqu'à cette étape.

Amine, ton soutien, ton écoute, tes encouragements ont été tellement importants pour moi tout au long de mes études et je t'en remercie sincèrement.

Je garde les dernières lignes pour des personnes spéciales, sans qui, je ne serais jamais arrivée là où je suis. Mes plus profonds remerciements vont ainsi à mes parents. Tout au long de mes études, ils m'ont toujours soutenue, encouragée, et m'ont donné toutes les clés pour réussir. Quoique je puisse écrire, je ne pourrais exprimer ma reconnaissance envers vous. J'ai la fierté d'être votre fille, et cette thèse, je vous la dédie...

Enfin mais non des moindres, un énorme merci à l'homme avec qui je partage ma vie. Amir, je te remercie pour ton soutien inébranlable, tes encouragements incessants, ta bienveillance inconditionnelle, et d'avoir toujours tout fait pour me faciliter la fin de ma thèse. Pour cela et tout le reste, je t'adresse mes plus chaleureux remerciements.

Un dernier merci avant de clôturer cette liste à tous les donneurs de sang et à l'EFS qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Merci.



# SOMMAIRE

<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	10
<b>LISTE DES PRINCIPALES ABBREVIATIONS</b> .....	11
<b>INTRODUCTION</b> .....	14
<b>I. Les monocytes, cellules clés du système immunitaire</b> .....	16
I.1. Développement des monocytes par l'organisme ou la monocytopoïèse.....	17
I.2. Les différentes populations monocytaires chez l'Homme .....	18
• I.2.a. Les monocytes classiques humains .....	20
• I.2.b. Les monocytes intermédiaires humains .....	20
• I.2.c. Les monocytes non-intermédiaires humains .....	21
I.3. Rôles des monocytes dans l'immunité innée et l'inflammation.....	23
• I.3.a. Plasticité des monocytes et conversion durant l'inflammation.....	23
- I.3.a.i. Les cellules dendritiques (CD).....	24
- I.3.a.ii. Les macrophages.....	26
• I.3.b. Sécrétion de cytokines et chimiokines .....	29
• I.3.c. Phagocytose et bactéricidie .....	30
- I.3.c.i. Mécanisme indépendant de l'oxygène .....	31
- I.3.c.ii. Mécanisme dépendant de l'oxygène .....	32
<b>II. La NADPH Oxydase 2</b> .....	34
II.1. Structure de NOX2.....	36
• II.1.a. Les composants membranaires de NOX2.....	37
• II.1.b. Les composants cytosoliques de NOX2 .....	38
II.2. Activation et modulation de NOX2 .....	39
II.3. La NOX2 des monocytes .....	41
II.4. Formes réactives de l'oxygène et signalisation intracellulaire .....	42
<b>III. La polyarthrite rhumatoïde</b> .....	44
III.1. Etiologie et pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde .....	45
• III.1.a. Etiologie .....	45
• III.1.b. Pathogenèse de la PR .....	46
- III.1.b.i. Implication des cytokines.....	47
- III.1.b.ii. Implication des cellules de l'articulation dans la pathogenèse de la PR .....	48
- III.1.b.iii. Implication des cellules immunitaires dans la pathogenèse de la PR .....	49

III.2. Monocytes et macrophages : acteurs pathogéniques dans la polyarthrite rhumatoïde .....	51
• III.2.a. Les monocytes, précurseurs des cellules effectrices dans la PR .....	52
- III.2.a.i. Les monocytes, précurseurs des ostéoclastes .....	52
- III.2.a.ii. Les monocytes, précurseurs des macrophages .....	53
• III.2.b. Les monocytes, producteurs de médiateurs inflammatoires .....	55
- III.2.b.i. Les monocytes producteurs de cytokines.....	55
- III.2.b.ii. Les monocytes producteurs des FRO.....	57
<b>IV. Le TNF<math>\alpha</math> et l'interleukine-10 (IL-10), deux acteurs majeurs dans la polyarthrite rhumatoïde. ....</b>	<b>59</b>
IV.1. Signalisation intracellulaire et rôles physiologiques du TNF $\alpha$ et de l'IL-10 .....	59
• IV.1.a. Le TNF $\alpha$ .....	59
• IV.1.b. L'IL-10.....	62
IV.2. Le TNF $\alpha$ et l'IL-10 dans la polyarthrite rhumatoïde.....	65
• IV.2.a. Place du TNF $\alpha$ dans la PR .....	65
• IV.2.b. Place de l'IL-10 dans la PR.....	67
<b>OBJECTIF</b> .....	<b>69</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>70</b>
Article : NOX2-dependent activation of SHP1 mediates the inhibitory activity of TNF $\alpha$ on interleukin-10 signaling in human monocytes and exacerbates experimental arthritis.....	71
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	<b>72</b>
<b>CONCLUSION ET PERPECTIVES</b> .....	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>80</b>

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Représentation schématique simplifiée des différentes étapes de la monocytopoïèse.
- Figure 2 : Hétérogénéité des monocytes humains par cytométrie en flux (d'après Wong, 2012)
- Figure 3 : Classification des sous-populations de monocytes humains
- Figure 4 : Classification des différentes sous-population de CD
- Figure 5 : Fonctions des sous-populations des macrophages résidents (d'après Amitava, 2015)
- Figure 6 : Représentation schématique de la coopération entre les systèmes dépendants et non-dépendant de l'oxygène dans la dégradation du pathogène au cours de la phagocytose
- Figure 7 : Réactions enzymatiques intervenants lors de la production des FRO
- Figure 8 : Localisations des NOX dans l'organisme (d'après Quinn, 2006)
- Figure 9 : La NADPH oxydase dans les cellules au repos et les cellules activées
- Figure 10 : Atteinte clinique de la PR
- Figure 11 : Les différentes cytokines et leurs rôles dans la pathogenèse de la PR (d'après Brzustewicz, 2015)
- Figure 12 : Représentation schématique de la membrane synoviale
- Figure 13 : Coopération des cellules immunitaires dans la pathogenèse de la PR (d'après Castro-Sanchez, 2017)
- Figure 14 : Implication des monocytes dans la PR (d'après Rana, 2018)
- Figure 15 : Récepteurs du TNF $\alpha$  (d'après Yang, 2018)
- Figure 16 : Structure du récepteur de l'IL-10 (d'après Srinivasan, 2017)
- Figure 17 : Rôles du TNF $\alpha$  dans la PR (d'après Brennan, 2008)
- Figure 18 : Le TNF $\alpha$  perturbe la signalisation de l'IL-10 *via* l'axe NOX2-ROS-Lyn-SHP1 dans les monocytes.

## LISTE DES PRINCIPALES ABBREVIATIONS

ACPA	Anticorps anti-protéine anticitrullinée
AIR	Région auto-inhibitrice
ARN	Acide ribonucléique
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CD	Cellule dendritique
CD14-16	Cluster of differentiation 14-16
CFU	Colony forming unit
CGD	Granulomatose septique chronique
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CXCL-	Chimiokine (C-X-C motif) ligand
DPI	Diphénylène iodonium
DUOX	Dual Oxidase
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
FAD	Flavine adénine dinucléotide
fMLF	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FRO	Formes réactives de l'oxygène
GAP	GTP activating protein
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.
G-CSF	Granulocyte - Colony stimulating factor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	GTP exchange factor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage- Colony stimulating factor
HLA	Human Leucocyte Antigen
HOCl	Acide hypochloreux
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
IL-	Interleukine
IFN- $\gamma$	Interferon gamma

JAK1 Janus kinase 1  
JNK c-Jun NH2-terminal kinase  
LAMP-1 Lysosome-associated membrane protein-1  
LT leucotriènes  
LTB4 leucotriène B4  
LPS Lipopolysaccharide  
Kda Kilo dalton  
MAPK Mitogen-activated protein kinase  
M-CSF Macrophage colony stimulating factor  
MEK Mitogen extracellular kinase  
MICI Maladies inflammatoires chronique de l'intestin  
Mo-DC Monocyte-derived DC  
MMP Métalloprotéinases matricielle  
MPO Myéloperoxydase  
NADPH Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate  
NCF1 Neutrophil cytosolic factor 1  
NF- $\kappa$ B Nuclear factor-kappa B  
NK Natural killer  
NO Monoxyde d'azote  
NOX NADPH oxydase  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> Anion superoxyde  
OH<sup>•</sup> Radical hydroxyle  
OONO- Peroxynitrite  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> Oxygène singulet  
OPG Ostéoprotégérine  
PAMPs Pathogen-associated molecular patterns  
PKA Protéine kinase A  
PKC Protéine kinase C  
PLA2 Phospholipase A2  
PLC Phospholipase C

PLD Phospholipase D  
Phox Phagocyte oxidase  
PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase  
Pin1 peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1  
PMA Phorbol-12-myristate-13-acetate  
PMC Progéniteur myéloïde commun  
PMN Polynucléaire neutrophile  
PMP Progéniteur multipotent  
PR Polyarthrite rhumatoïde  
RANK Receptor activator of nuclear factor-  $\kappa$ B  
RANK-L Receptor activator of nuclear factor-  $\kappa$ B ligand  
Rho-GDI Rho GDP-dissociation inhibitor  
RF Facteur rhumatoïde  
ROS Reactive oxygen species  
SDS Sodium dodécyl sulfate  
SDS-PAGE SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis  
Ser Serine  
SHP1/2 Src homology phosphatase 1/2  
SOCS3 Suppressor Of Cytokine Signaling 3  
SOD Superoxyde dismutase  
STAT3 Signal Transducer And Activator Of Transcription 3  
TGF $\beta$  Transforming growth factor beta  
TLR Toll like receptor  
Th2 Lymphocyte T helper 2  
TNF $\alpha$  Tumor necrosis factor  $\alpha$   
Treg Lymphocyte T regulateur  
TYK2 Tyrosine kinase 2  
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

## INTRODUCTION

Les monocytes sont des cellules immunitaires exerçant un rôle capital dans l'immunité innée et acquise, le développement tissulaire, l'homéostasie, mais aussi dans les phénomènes inflammatoires. Ces cellules sont en effet connues comme étant des cellules présentatrices d'antigène (CPA) capables d'activer les lymphocytes T et de médier ainsi une réponse cellulaire adaptative. Les monocytes ont également la capacité de migrer dans les tissus inflammés, de s'y différencier en macrophages de type M1 ou M2, et de promouvoir ainsi ou de résoudre l'inflammation. Ils participent également à l'élimination d'agents pathogènes ou de débris cellulaire via la phagocytose.

Cette activité microbicide se fait grâce à l'activité de la NADPH oxydase 2 (NOX2), complexe enzymatique constitué de plusieurs sous-unités cytosoliques (p40phox, p47phox, p67phox et Rac2) ainsi que de composants membranaires (p67phox et gp91phox) inactif à l'état basale. Au cours de la réponse immunitaire, NOX2 devient active et va produire de manière rapide et massive des formes réactives de l'oxygène (FRO), molécules hautement toxiques, intervenants dans l'élimination des agents pathogènes bactériens et fongiques. En plus de leur capacité bactéricide, les FRO sont également des médiateurs de la signalisation intracellulaire en régulant l'activité des kinases et phosphatases par oxydation. Un dernier rôle important des monocytes correspond à leur activité sécrétoire de médiateurs pro-inflammatoires, anti-inflammatoires ou angiogénique. En effet, en réponse à un stimuli inflammatoire, les monocytes vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires en particulier le  $TNF\alpha$ , l'IL-1, ou encore l'IL-6 qui vont participer à l'installation d'une réaction inflammatoire. Les monocytes sécrètent également un large panel de chimiokines intervenant dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau du foyer inflammatoire. Enfin, la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires par les monocytes tel que l'IL-10 est tout aussi importante que celle des cytokines pro-inflammatoires. Cet équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est sous le contrôle d'une régulation fine et précise permettant ainsi d'éviter l'installation d'une inflammation chronique.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un exemple d'inflammation chronique caractérisé par des arthralgies associées à des gonflements articulaires appelés synovites. Bien que l'origine de la maladie demeure inconnue, les données récentes de la littérature incriminent les cellules de l'immunité innée, dont les monocytes, dans le développement des lésions de la PR. Il a par ailleurs été montré l'existence d'un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et des

cytokines à activité anti-inflammatoire. Le TNF $\alpha$  représente la cytokine pro-inflammatoire pivot dans la PR du fait de son importante présence et de ses nombreuses conséquences délétères au cours de la maladie. L'IL-10 est le prototype des cytokines anti-inflammatoires et son rôle est capital pour la résolution de l'inflammation. Etant donné ses capacités immunosuppressives, l'utilisation de l'IL-10 en thérapie pour le traitement de la PR a été envisagée, mais les essais cliniques ont donné lieu à des résultats peu concluants. Ceci pourrait être expliqué par la complexité du foyer inflammatoire où de nombreuses cytokines, à la fois pro-et anti-inflammatoires, sont présentes. La compréhension de l'interaction entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et leurs voies de signalisation est un axe de recherche de plus en plus étudié car il constitue une base pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutique avec des molécules inhibitrices ou des anticorps.

**Dans ce contexte, mon travail de recherche a eu pour objectif de comprendre comment les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires interagissent dans un contexte inflammatoire tel que la polyarthrite rhumatoïde. Nous avons axé notre travail sur le TNF $\alpha$  qui est le prototype des cytokines pro-inflammatoires exerçant un rôle crucial dans la PR, ainsi que sur l'IL-10 qui, elle, correspond au prototype des cytokines anti-inflammatoires.**

Nous avons ainsi révélé, dans ce travail, une nouvelle propriété du TNF $\alpha$  à savoir sa capacité à inhiber la signalisation des cytokines anti-inflammatoires exacerbant ainsi l'inflammation. En effet, nos résultats montrent que dans les monocytes, le TNF $\alpha$  interfère avec la voie de signalisation de l'IL-10. Cette action inhibitrice du TNF $\alpha$  se fait *via* l'activation de la tyrosine phosphatase SHP1 qui entraîne la déphosphorylation de STAT3, l'effecteur en aval de l'IL-10. Nous avons démontré dans ce travail l'implication des FRO produits par NOX2 dans l'activation de SHP1. L'activation de SHP1 par les FRO dans les monocytes stimulés par le TNF $\alpha$  est médié par Lyn, une tyrosine kinase connue pour être régulée par oxydation. Enfin, un inhibiteur pharmacologique de SHP1/2 protège contre l'arthrite expérimentale dans un modèle murin.

Ce manuscrit débutera par une introduction décrivant les monocytes, la NADPH oxydase 2, la polyarthrite rhumatoïde, et enfin le TNF $\alpha$  et l'IL-10. Nous présenterons par la suite les résultats expérimentaux obtenus au cours de ma thèse avant de conclure et de discuter des résultats dans le contexte des données de la littérature.



## I. Les monocytes, cellules clés du système immunitaire.

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme contre l'infection par un large spectre de pathogènes divers et variés. L'infection par les agents pathogènes est empêchée en premier lieu par les défenses immunitaires innées constitutives comme les muqueuses et les tissus épithéliaux. Si le pathogène parvient à pénétrer l'organisme, les médiateurs cellulaires de la défense innée sont activés pour combattre le pathogène. Les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques constituent ces médiateurs cellulaires. Ils sont produits dans la moelle osseuse au cours d'un processus appelé hématopoïèse.

L'hématopoïèse est définie comme étant l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines. Ce processus a été décrit il y'a plus d'un siècle par Alexander Maximow comme étant un processus hautement ordonné résultant de précurseurs communs qui deviennent progressivement plus restreints, aboutissant *in fine* à la production des diverses populations de cellules sanguines. Cette hiérarchie est modélisée sur l'hypothèse d'un développement graduel, où un ensemble de cellules progénitrices avec différentes potences cellulaires (oligopotence, bipotence puis unipotence) devient au fur et à mesure plus spécialisé et finit par donner lieu en fonction des signaux cellulaires présents, un type cellulaire particulier (Galvão et al., 2010). Dans ce modèle, la cellule souche hématopoïétique (CSH) est la cellule primitive qui est à l'origine de toutes les lignées des cellules sanguines de l'organisme (Busch et al., 2015). Cette cellule est capable de s'auto-renouveler et de générer des progéniteurs multipotents (PMP ; (Pietras et al., 2016)) qui vont à leur tour se différencier en deux progéniteurs distincts : le progéniteur myéloïde commun (PMC ; (Akashi et al., 2000)) et le progéniteur lymphoïde commun (PLC ; (Kondo et al., 1997)). Ces deux progéniteurs vont par la suite se différencier respectivement lors de la myélopoïèse et de la lymphopoïèse. Alors que la lymphopoïèse permet la formation des lymphocytes, la myélopoïèse, elle, va aboutir à la production et à la libération des granulocytes ainsi que des monocytes.

Nous développerons dans cette première partie la monocytopoïèse, les différentes populations de monocytes ainsi que leurs rôles clés dans l'inflammation et l'immunité innée.

## I.1. Développement des monocytes par l'organisme ou la monocytopoïèse.

Les monocytes sont classiquement définis comme étant des cellules sanguines circulantes constituant approximativement 10% des cellules leucocytaires chez l'Homme et approximativement 4% des leucocytes chez la souris. Ces cellules font partie du système des phagocytes mononucléés (SPM) ; système incluant les macrophages et les cellules dendritiques (Guilliams et al., 2014). Les monocytes se développent dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur myéloïde commun (PMC) issue de la différenciation initiale des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ce progéniteur myéloïde commun va lui-même se différencier en progéniteur granulocytaires/monocytaires communs (PGM) donnant successivement naissance aux cellules formatrices de colonies (CFU : colony forming unit) CFU-GM, CFU-G et CFU-M. C'est à partir des CFU-M que sont générés les précurseurs monocytaires appelés pro-monocytes. Ces monocytes immatures se multiplient ensuite tout en poursuivant leur différenciation. Lorsque la maturation cellulaire est suffisante, les monocytes quittent la moelle osseuse, se retrouvent dans le sang et migrent ensuite vers les tissus périphériques où ils peuvent se différencier soit en macrophage, soit en cellule dendritique, susceptible de survivre plusieurs mois (Figure 1). Cette dernière étape de différenciation des CFU-M en monocytes sanguins dure entre 5 à 7 jours (van Furth and Sluiter, 1986).

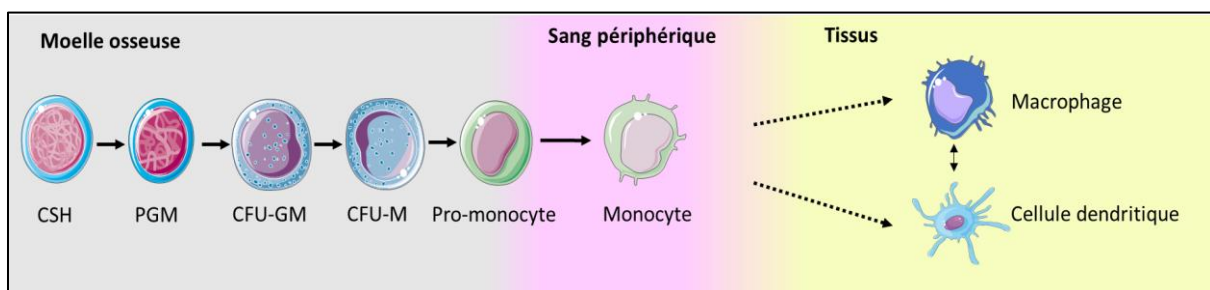


Figure 1 : Représentation schématique simplifiée des différentes étapes de la monocytopoïèse.

Des travaux ont démontré que ces différentes étapes de la monocytopoïèse sont régies par la présence de cytokines spécifiques comprenant en particulier le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), l'IL-3 (Interleukine 3) et le M-CSF (macrophage colony stimulating factor). Il a été ainsi montré *in vivo* qu'en présence de GM-CSF et d'IL-3, les cellules souches s'engagent dans la différenciation aboutissant aux cellules souches commises vers la lignée granulo-macrophagique, les CFU-GM (Guilliams et al., 2018). Les CFU-GM continuent de se multiplier et sous l'effet du M-CSF évoluent en promonocytes.

L'importance du M-CSF dans le développement de la lignée monocyttaire a été démontrée dans un modèle murin déficient en M-CSF qui se traduit par une absence de monocytes (Wiktor-Jedrzejczak and Gordon, 1996); pouvant être corrigée par la transgénèse de M-CSF (Ryan et al., 2001). Ces cytokines dérivant de différents types cellulaires (monocytes, macrophages, lymphocytes T, mastocytes, cellules endothéliales, fibroblastes), peuvent ainsi stimuler à la fois la prolifération et la différenciation des précurseurs des monocytes mais aussi activer leurs fonctions effectrices telles que la phagocytose. La réponse d'une cellule à une combinaison de cytokines dépend des récepteurs qu'elle exprime et du traitement quantitatif des signaux produits.

Outre les cytokines, un groupe de facteurs de transcriptions comprenant PU.1, IRF8, KLF4 et GATA2, jouent un rôle fondamental dans la différenciation cellulaire myéloïde. Ainsi, il a été démontré chez la souris, que la suppression de ces facteurs perturbe la composition des progéniteurs myéloïdes et entraîne une réduction du nombre de monocytes périphériques (Bigley et al., 2011; Kurotaki et al., 2013; Scott et al., 2016; Sichien et al., 2016). Ces facteurs de transcription vont agir à différentes étapes de la différenciation. Par exemple, PU.1 est connu pour agir lors des premières étapes en induisant un engagement myéloïde des cellules souches hématopoïétique (Nerlov and Graf, 1998) et est requis pour la génération de progéniteur myéloïde commun au début de la myélopoïèse (Dakic et al., 2005; Iwasaki et al., 2005). Le facteur de transcription IRF8, est quant à lui connu pour intervenir lors de la différenciation terminale notamment au cours de la transition MDP (progéniteur commun monocytes cellules dendritiques) – monocytes (Feinberg et al., 2007).

Ainsi, de nombreuses cytokines et de nombreux facteurs de transcriptions vont intervenir de manière séquentielle pour contrôler les programmes d'expression géniques qui détermineront le destin des différents progéniteurs à l'origine des différentes populations de monocytes (Friedman, 2007).

## **I.2. Les différentes populations monocytaires chez l'Homme.**

A la fin du dix-neuvième siècle, Paul Ehrlich, alors étudiant en médecine, met en place une technique de cytologie, basée sur la coloration, permettant de visualiser la morphologie des cellules sanguines par microscopie optique. Il décrit ainsi les monocytes comme étant une population de cellules homogène avec un noyau en forme de rein. Cependant, au cours du XXème siècle, l'avènement de la cytométrie en flux et le développement des anticorps

monoclonaux ont permis la visualisation et l'identification de l'hétérogénéité des monocytes dans diverses espèces (Ziegler-Heitbrock, 2014) notamment l'Homme (Passlick et al., 1989) et la souris (Geissmann et al., 2003). Des populations distinctes de monocytes ont été dès lors décrites grâce à l'analyse de l'expression différentielle des marqueurs antigéniques CD14 et CD16 (Passlick et al., 1989; Ziegler-Heitbrock et al., 1991). Trois groupes de sous-populations monocytaires ont été ainsi identifiés et décrits chez l'Homme : les monocytes dits « classiques »  $CD14^{high}CD16^{neg}$ , les monocytes appelés « intermédiaires »  $CD14^{high}CD16^{high}$  et enfin, les monocytes dits « non classiques »  $CD14^{low}CD16^{high}$  (Figure 2). De façon analogue, les monocytes murins peuvent être séparés en deux sous-populations fonctionnellement différentes basés sur leur expression des molécules de surface Ly6C, CCR2 et CX3CR1. Le sous-ensemble  $Ly6C^{+}CCR2^{high}CX3CR1^{low}$  est équivalent ainsi aux monocytes humains classiques et intermédiaires, tandis que le sous-ensemble  $Ly6C^{-}CCR2^{low}CX3CR1^{high}$  équivaut aux groupes des monocytes non-classiques chez l'Homme (Ingersoll et al., 2010; Ziegler-Heitbrock, 2014). L'identification de cette hétérogénéité est d'une grande importance car des études récentes ont montré que celle-ci va conférer différentes propriétés fonctionnelles aux différentes sous-populations monocytaires. En effet, les sous-populations de monocytes semblent refléter des stades de développement variés avec des activités transcriptionnelles différentes mais aussi des rôles physiologiques distincts, comme par exemple le recrutement vers des lésions inflammatoires, ou encore l'entrée dans les tissus normaux (Guilliams et al., 2018; Yona and Jung, 2010).

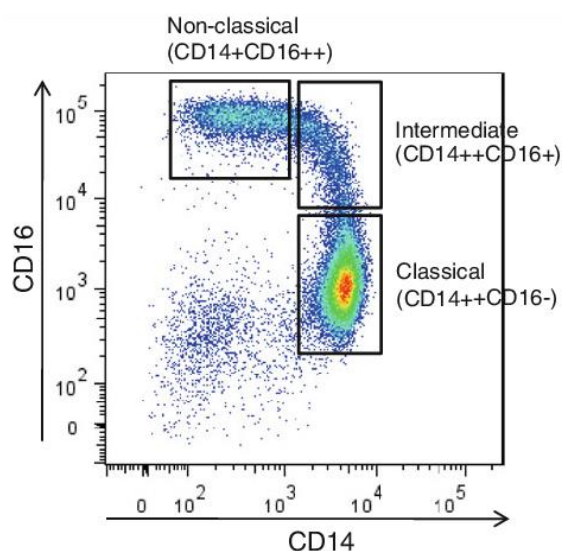


Figure 2 : Hétérogénéité des monocytes humains par cytométrie en flux. D'après « The three human monocyte subsets: Implications for health and disease ». Immunologic research. Wong et al., 2012

### **I.2.a. Les monocytes classiques humains.**

Les monocytes dits « classiques »,  $CD14^{high}CD16^{neg}$ , sont caractérisés par une expression élevée du récepteur de surface cellulaire CD14 (récepteur du lipopolysaccharide) et par l'absence d'expression du récepteur de surface cellulaire CD16 (récepteur Fc $\gamma$ RIII). Par ailleurs, ils expriment hautement le récepteur CCR2 (récepteur du CCL2/MCP1) mais faiblement le CX3CR1 (récepteur de la fractalkine) (Weber et al., 2000). Au cours de la réponse inflammatoire, les monocytes classiques sont rapidement recrutés pour envahir les tissus enflammés afin de participer à la réponse immunitaire *via* la reconnaissance et l'élimination des micro-organismes et cellules mourantes (Wong et al., 2012). Ces monocytes sont ainsi caractérisés par une forte activité phagocytaire (Thiesen et al., 2014). Par ailleurs, ils sont également caractérisés par une faible activité de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme en témoigne plusieurs études *in vitro* démontrant que la stimulation des monocytes par le LPS entraîne une production d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) plutôt que du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 (Mukherjee et al., 2015; Weber et al., 2000; Ziegler-Heitbrock et al., 1992). Leur phénotype ressemble à celui des monocytes murins  $Ly6C^{+}CCR2^{high}CX3CR1^{low}$ , bien que ces derniers soient très efficaces dans la production des cytokines pro-inflammatoires (Ingersoll et al., 2010; Ziegler-Heitbrock, 2014). Cette sous-population de monocyte représente à elle seule, 80 à 90% du pool des monocytes circulants. Le reste du pool monocyttaire est constitué des monocytes « intermédiaires » et des monocytes « non-classiques » (Sampath et al., 2018).

### **I.2.b. Les monocytes intermédiaires humains.**

Les monocytes dits « intermédiaires »,  $CD14^{high}CD16^{high}$ , sont caractérisés par une expression élevée, des récepteurs de surface cellulaire CD14 et CD16. À l'inverse des monocytes « classiques », ils expriment faiblement le récepteur CCR2 mais fortement CX3CR1 (Al-Rashoudi et al., 2019). Les monocytes intermédiaires sont recrutés à un stade ultérieur de l'inflammation. Cette sous-population monocyttaire représente 2 à 8% des monocytes circulants. Tout comme les monocytes  $CD14^{high}CD16^{neg}$ , les monocytes « intermédiaires » ont une forte activité phagocytaire. En revanche, ils possèdent un niveau d'expression important du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMH II), plus important que les monocytes « classiques ». Par conséquent, ces cellules participent activement à la présentation antigénique et stimulent l'activation des lymphocytes T (Sánchez-Torres et al., 2001; Sprangers et al., 2016;

Yang et al., 2014). Ces cellules sont également associées à une importante production de FRO (Merino et al., 2011; Ong et al., 2018) et à de fortes sécrétions de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, en réponse au LPS, elles vont sécréter d'importante quantité de TNF $\alpha$  et d'IL-1 (Belge et al., 2002; Grage-Griebenow et al., 2001) mais aussi d'IL-6 ou encore de CCL2 (Ancuta et al., 2006). Enfin, cette sous-population est également connue comme étant fortement impliquée dans la cicatrisation tissulaire en libérant différents facteurs de croissance endothéliale (VEGF), des cytokines comme le TGF- $\beta$ , afin de stimuler l'angiogenèse et la production de collagène (Sprangers et al., 2016; Yang et al., 2014). Une comparaison transcriptionnelle entre les monocytes humains et murins a associé cette sous-population aux monocytes murins Ly6C<sup>-</sup> CCR2<sup>low</sup>CX3CR1<sup>high</sup>. Ces monocytes CD16<sup>high</sup> ont été appelés monocytes « inflammatoires » au vu de leur potentiel à sécréter un niveau important de cytokines pro-inflammatoires mais aussi en raison de l'augmentation de leur nombre dans la circulation de patients atteints de pathologies inflammatoires telles que l'athérosclérose (Schlitt et al., 2004) ou la polyarthrite rhumatoïde (Baeten et al., 2004). Toutefois, ce terme de monocyte inflammatoire reste controversé car l'équivalent murin de ces monocytes est la population monocyttaire dite « résidente », dont la potentialité à sécréter des cytokines inflammatoires est faible (Geissmann et al., 2003). Par ailleurs, les travaux de Grage-Griebenow ont montré que les monocytes CD16<sup>high</sup> sont composés d'au moins deux populations dotées de fonctions remarquablement distinctes et ont mis ainsi en lumière l'existence des monocytes CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup> dits « non-classiques » (Grage-Griebenow et al., 2001).

### **I.2.c. Les monocytes « non-classiques » humains.**

Les monocytes dits « non-classiques », CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup> sont caractérisés par une expression de niveau faible du récepteur de surface cellulaire CD14 et une expression élevée du récepteur CD16. Cette sous-population représente 2 à 11% des monocytes circulants. Le rôle de ces monocytes est moins connu que les autres sous-populations. Cependant, il a été montré qu'à l'inverse des monocytes « intermédiaires », ces monocytes n'ont pas une activité phagocytaire importante et ne produisent pas de TNF $\alpha$  ou IL-1 en réponse au LPS (Skrzeczyńska-Moncznik et al., 2008). En revanche, ces cellules ont une forte activité de production de formes réactives de l'oxygène, similaire aux monocytes « intermédiaires » (Ong et al., 2018). Par ailleurs, ces cellules de taille inférieure au monocyte classique (14 $\mu$ m vs 18  $\mu$ m) et de nature mobile patrouillent l'endothélium à la recherche de blessures (Thomas et al., 2015). En dehors de leur

rôle majeur dans la surveillance locale innée, les monocytes « non-classiques » sont également impliqué dans la présentation de l'antigène et la stimulation des lymphocytes (Robbins and Swirski, 2010). D'autres études ont montré que ces monocytes ont une activité pro-apoptotique associée à une activité anti-proliférative (Sampath et al., 2018). Enfin, les récents travaux de l'équipe *Ong et al.*, associent cette sous-population à une population de cellules sénescentes et suggèrent l'implication de ces cellules dans les maladies telles que l'athérosclérose et arthrose.

L'hétérogénéité phénotypique de ces trois sous-populations de monocytes leur confère ainsi une hétérogénéité fonctionnelle (Figure 3). Des études chez l'Homme et l'animal ont suggéré que dans des conditions inflammatoires, l'émergence des trois sous-ensembles de monocytes est un processus graduel au cours duquel les monocytes classiques quittent la moelle osseuse et la rate et pourraient donner lieu à des monocytes intermédiaires en quelques jours suivis de monocytes non classiques (Yang et al., 2014). Les similitudes entre les sous-ensembles de monocytes humains et de souris indiquent qu'il s'agit d'un système conservé. La caractérisation de ce système fait l'objet de plus en plus d'études et de progrès dans sa compréhension. Par exemple, des études plus poussées *via* le séquençage d'ARN ont élargi l'hétérogénéité au sein de la population intermédiaire avec l'identification de plusieurs sous-ensembles chez l'homme (Villani et al., 2017) et chez la souris (Mildner et al., 2017). Néanmoins, la nomenclature des trois sous-populations chez l'Homme et des deux sous-populations chez la souris est encore et reste d'actualité.

Sous-population	Classique	Intermédiaire	Non classique
Proportion approximative des monocytes totaux	80 à 90%	2 à 8%	2 à 11%
Taille	18 µm	intermédiaire	14 µm
Marqueur de surface	CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>neg</sup>	CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>high</sup>	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup>
Fonctions	Phagocytose, forte activité MPO	Phagocytose, production de ERO, de cytokines pro-inflammatoires, activation des cellules T.	Réparation tissulaire, surveillance de l'intégrité tissulaire.

Figure 3 : Classification des sous-populations de monocytes humains.

### **I.3. Rôles des monocytes dans l'immunité innée et l'inflammation.**

Les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (CD) sont des cellules mononucléaires myéloïdes qui exercent un rôle capital dans l'immunité innée mais aussi dans l'immunité adaptative grâce à leur rôle dans la présentation antigénique. Ces cellules contribuent aussi à la réponse inflammatoire qui est bénéfique lorsqu'elle est contrôlée, mais devient pathologique lorsqu'elle est non résolue et chronique. Les monocytes sont les archétypes de ces cellules myéloïdes. Produites dans la moelle osseuse et libérées dans le sang, ces cellules circulent dans le sang ou résident dans un réservoir situé dans la rate avant de pénétrer dans les tissus et de se différencier en macrophages ou cellules dendritiques. Toutefois, des populations de monocytes tissulaires présentes à l'état d'équilibre, chez l'Homme et la souris ont également été décrites dans plusieurs études (Jakubzick et al., 2013; McGovern et al., 2014). Les monocytes sont ainsi plus que des cellules de transition capable de s'adapter à un environnement tissulaire particulier. L'accumulation de preuves indique maintenant que les monocytes ont des fonctions pléiotropes et sont prédéterminés pour une fonction particulière à l'état d'équilibre et au cours de l'inflammation. Nous traiterons dans cette partie ces différentes fonctions.

#### **I.3.a. Plasticité des monocytes et conversion durant l'inflammation.**

Outre l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle, les monocytes ont comme caractéristique leur plasticité cellulaire (Sica and Mantovani, 2012). Cette plasticité cellulaire se caractérise par leur capacité à reprogrammer de manière rapide et adéquate leur phénotype en réponse au microenvironnement et aux agents pathogènes aboutissant ainsi à un changement fonctionnel (Mitchell et al., 2014). Cette reprogrammation a lieu suite à leur recrutement de la moelle osseuse vers le sang circulant, puis vers le tissu enflammé, et implique divers récepteurs membranaires en particulier le récepteur membranaire CCR2 (Serbina and Pamer, 2006). En effet, il a été montré que les souris CCR2<sup>-/-</sup> avaient un nombre fortement augmenté de monocytes dans la moelle osseuse suggérant ainsi que le récepteur CCR2 est essentiel à la sortie des monocytes (Tsou et al., 2007). Une fois arrivée sur le lieu de l'inflammation, les monocytes infiltreront les tissus par transmigration (Das et al., 2015). Ils vont alors en fonction des signaux présents localement, se différencier en cellules dendritiques ou macrophages. Ces deux types cellulaires vont avoir des différences phénotypique et fonctionnelle et vont tous deux intervenir dans la réponse inflammatoire.



### 1.3.a.i. Les cellules dendritiques (CD).

C'est lors d'une étude microscopique réalisée en 1973 sur des splénocytes de souris adhérant au verre, que Ralph Steinman et Zan Cohn ont découvert une petite population de cellules avec une morphologie stellaire unique, et les ont nommées cellules dendritiques (Steinman and Cohn, 1973). Ces cellules ont suscité un intérêt particulier lorsqu'il a été démontré que ce sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) présentant les antigènes aux lymphocytes T avec une efficacité remarquable (Mellman and Steinman, 2001). Il a été ainsi rapidement mis en évidence que les CD expriment un niveau élevé de CMH II et sont particulièrement efficaces pour stimuler la prolifération des lymphocytes T et activer les lymphocytes T naïfs (Steinman and Witmer, 1978). Leur distribution est ubiquitaire : elles sont présentes en faibles nombre dans le sang (Szabolcs et al., 2003) où elles ne survivent pas plus d'une semaine (van Furth and Sluiter, 1986). Elles sont présentes également dans les organes lymphoïdes, et dans les tissus non lymphoïdes comme le cœur, le pancréas, le poumon ou encore la peau (Merad and Manz, 2009). Concernant leur origine, il a été longtemps considéré que toutes les cellules du système des phagocytes mononuclés, parmi lesquels les CD, dérivent de cellule de la moelle osseuse par l'intermédiaire des monocytes (van Furth and Cohn, 1968). Ce raisonnement a été soutenu par le fait que les monocytes humains et de souris peuvent acquérir des caractéristiques typiques des CD sous certaines conditions. Ainsi, lorsqu'ils sont cultivés en présence du GM-CSF *in vitro*, les monocytes régulent positivement l'expression du CMH II, développent des dendrites et deviennent immunostimulants pour les lymphocytes T (Inaba et al., 1992; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). De même, *in vivo*, les monocytes peuvent développer des caractéristiques des CD pendant l'inflammation (Cheong et al., 2010; Randolph et al., 1999). Cependant, ce concept a été invalidé par de nombreuses études sur les cellules myéloïdes résidentes des tissus (Hashimoto et al., 2013). Ainsi, les cellules dendritiques ne dérivent pas toutes de monocytes et une partie de leur population ont pour origine des progéniteurs distincts des monocytes. Les CD sont, tout comme les monocytes, constituées de populations cellulaires hétérogènes et sont classées en différents groupes. On dénombre à l'heure actuelle, quatre grandes catégories de CD, à savoir : les plasmacytoïdes (pDC), les CD dits « conventionnelles », les cellules de Langerhans et enfin les CD dérivées de monocytes (mo-DC pour monocyte-derived DC) (Macri et al., 2018). Nous traiterons dans le paragraphe qui suit uniquement des propriétés fonctionnelles des CD dérivées de monocytes, les mo-DC. Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des autres CD sont brièvement résumées dans la figure ci-dessous (figure 4).

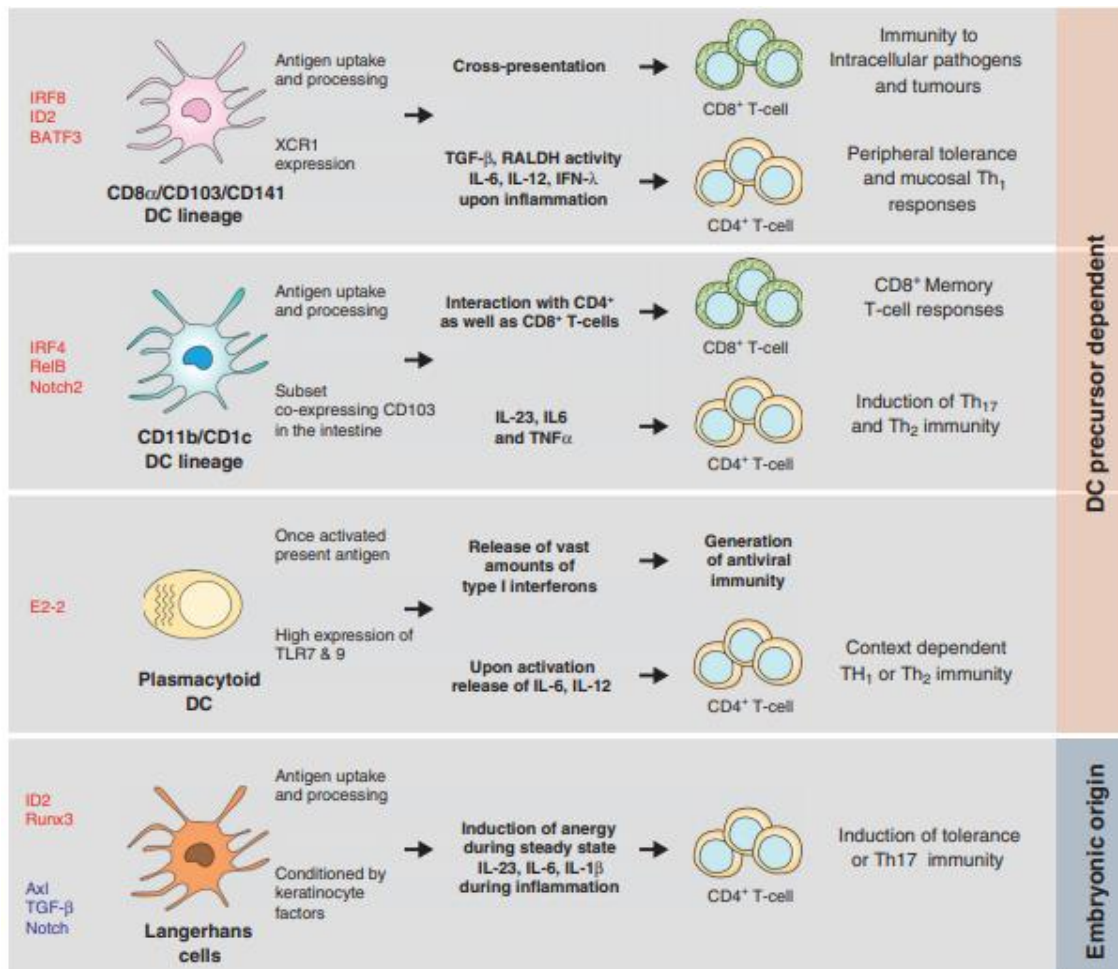


Figure 4 : Classification des différentes sous-population de CD.

Différents sous-ensembles de cellules dendritiques façonnent différents types de réponses immunitaires. Cette figure illustre l'origine et les propriétés fonctionnelles des sous-populations de CD chez l'Homme dans l'ordre suivant : les CD, les mo-DC les plasmacytoïdes et les cellules de Langerhans.. D'après « Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse ». Advances in Immunology. Kenneth et al., 2013.

De nombreuses études *in vitro* ont démontré la capacité des monocytes à se différencier en CD en présence de différents agonistes. En effet, il a été montré par exemple, que des monocytes humains, en présence de GM-CSF et d'IL-4 se différencient en CD (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Ces CD deviennent ensuite matures en présence de TNF $\alpha$ , et leur phénotype ainsi que leur fonction activatrice des cellules T sont alors comparables aux CD présents dans le sang (Chapuis et al., 1997; Romani et al., 1994). Les mo-DC partagent de nombreuses caractéristiques morphologiques avec les monocytes. En effet, les mo-DC conservent l'expression des récepteurs membranaires CD11b, CD11c et CMH II, CRR2, CD14, ainsi que la co-expression de CD16 présents initialement chez les monocytes non classiques. En revanche, les mo-DC expriment les récepteurs CD1a, CD206 and CD209 qui sont spécifiques

à cette sous-population (Collins et al., 2015). En termes de fonctions, les mo-DC partagent des caractéristiques fonctionnelles communes avec les CD « conventionnelles » (CDc) telles qu'une efficacité élevée dans la capture et le traitement des antigènes, l'expression de molécules co-stimulantes et la capacité de présenter des peptides microbiens aux lymphocytes T CD4+ et T CD8+ (Nakano et al., 2009; Serbina et al., 2003). Les mo-DC sont présents dans les tissus à l'état d'équilibre, notamment dans la peau, les poumons, et l'intestin (An et al., 2016; McGovern et al., 2014; Watchmaker et al., 2014). Cependant, leur présence augmente fortement pendant l'inflammation, où elles deviennent la catégorie de CD résidentes la plus importante (Jenner et al., 2014; Liao et al., 2017). Les mo-DC ont d'ailleurs été qualifiés de « cellules dendritiques inflammatoires » en raison de leur présence importante dans diverses maladies inflammatoires comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Grimm et al., 1995), la rhinite allergique (Eguíluz-Gracia et al., 2016) ou encore l'eczéma (Wollenberg et al., 1996).

### **1.3.a.ii. Les macrophages.**

Les macrophages sont des acteurs clés dans la réponse immunitaire innée mais aussi adaptative. Ils sont généralement considérés comme étant l'une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes, mais interviennent également dans de nombreux autres processus immunitaires. En effet, ils ont été initialement décrits par rapport à leur activité phagocytaire d'agents pathogènes ou de débris cellulaires et ont été ainsi nommés « macrophages » (macro : grand et phage : mangeur). Toutefois, leurs rôles sont pléiotropes et ces cellules sont impliquées dans la résolution de l'inflammation, dans la cicatrisation des plaies et des tissus après une infection ou une blessure ainsi que lors de la présentation de l'antigène (Duffield et al., 2013; Martinez et al., 2009; Wynn et al., 2013). Concernant leur origine, les monocytes sanguins en circulation étaient considérés comme étant les précurseurs exclusifs des macrophages tissulaires (van Furth and Sluiter, 1986). Toutefois, il a été montré que l'origine des macrophages variait en fonction du tissu. Ainsi, les monocytes provenant de la moelle osseuse se différencient en macrophages dans l'intestin et le derme lors d'une infection aiguë au cours de l'inflammation (Jakubzick et al., 2013). En revanche, des études ont montré que les macrophages dans des tissus comme le foie et la rate proviennent de précurseurs capables de s'auto-renouveler et dérivant du sac vitellin (Yona et al., 2013). Il existe une coopération entre les macrophages dérivés de monocytes et les macrophages dérivés d'autres progéniteurs. Ainsi, les monocytes étant un système cellulaire hautement plastique et dynamique viennent compléter l'action des macrophages résidant dans les tissus en cas de besoin comme par exemple lors d'une blessure ou d'une infection (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Bien que les macrophages dans les tissus présentent de nombreuses caractéristiques communes, ils sont néanmoins extrêmement hétérogènes en termes de fonction et d'expression des marqueurs de surface (Gordon and Taylor, 2005; Ovchinnikov, 2008). De nombreuses études en ont conclu que la localisation anatomique des macrophages dicte leur hétérogénéité en termes de fonction (Gordon and Taylor, 2005). L'autre particularité qui caractérise ce type cellulaire est leur plasticité remarquable ; les macrophages peuvent ainsi passer d'un phénotype à un autre au cours d'un phénomène appelé « polarisation ». (Bashir et al., 2016; Cassetta et al., 2011; Mantovani et al., 2004). La polarisation des macrophages est un processus par lequel les macrophages adoptent un phénotype spécifique et une réponse fonctionnelle en réponse aux stimuli micro-environnementaux (facteurs de croissances, cytokines, acides gras...) et aux signaux présents dans chaque tissu spécifique (Sica and Mantovani, 2012). A l'issue de la polarisation, deux grandes sous-populations de macrophages avec différentes fonctions se distinguent : les macrophages de type M1 dits « inflammatoires » et les macrophages de type M2 dits « anti-inflammatoires ». Un troisième groupe de macrophage a été décrit. Ce dernier comprend les macrophages résidents. Toutefois, la majorité des cellules constituant le troisième groupe dérivent de progéniteurs autre que les monocytes circulants (Davies et al., 2013; Epelman et al., 2014; Hashimoto et al., 2013). Nous traiterons dans le paragraphe qui suit uniquement des propriétés fonctionnelles des macrophages M1 et M2 dérivés de monocytes. Les caractéristiques fonctionnelles des macrophages résidents sont brièvement résumées dans la figure ci-dessous (figure 5).

Tissues/organs	Name of cells	Major functions
Wound	Wound macrophages	Scavenging, <sup>30</sup> phagocytosis, <sup>31</sup> efferocytosis, <sup>32</sup> antigen presentation, <sup>33</sup> promotion of repair, <sup>30,34</sup> extracellular signaling, <sup>35</sup> and angiogenesis <sup>34,36</sup>
Central nervous system	Microglial cells	Scavenging, <sup>37</sup> phagocytosis, <sup>38</sup> cytotoxicity, <sup>39</sup> antigen presentation, <sup>40</sup> synaptic stripping, <sup>41</sup> promotion of repair, <sup>42</sup> and extracellular signaling <sup>43</sup>
Lungs	Alveolar macrophages	Efferocytosis, <sup>44</sup> phagocytosis, <sup>45</sup> and surfactant homeostasis <sup>46</sup>
Connective tissue	Histiocytes	Phagocytosis <sup>47</sup> and antigen presentation <sup>47</sup>
Liver	Kupffer cells	Endocytic activity against blood-borne materials entering the liver <sup>48</sup> and host defense <sup>49</sup>
Bone	Osteoclasts	Bone resorption <sup>50</sup>

Figure 5 : Fonctions des sous-populations des macrophages résidents. D'après « Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration » The American Journal of Pathology 2015 Amitava Das et al., 2015.

- Les macrophages pro-inflammatoires M1 :

Les macrophages M1 constituent la première ligne de défense contre les pathogènes intracellulaires. Ce sont en effet des cellules effectrices spécialisées dans la destruction des microorganismes. Elles sont généralement induites par des cytokines Th1, telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , ou par reconnaissance d'agoniste de Toll-like récepteurs (TLRs) tel que le

lipopolysaccharides bactériens (LPS) (Gordon and Taylor, 2005; Stout and Suttles, 2004). Concernant le phénotype, les macrophages M1 expriment à leur surface deux récepteurs caractéristiques de cette sous-population à savoir CD64 et CD80 (Tarique et al., 2015). On retrouve également à leur surface l'expression du CMHII ce qui fait de ces cellules des CPA. Ces macrophages produisent et sécrètent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, ou encore l'IL-12 (Paletta-Silva and Meyer-Fernandes, 2012). En revanche, les M1 sont connus comme sécrétant de faibles niveaux d'IL-10. Ces cellules sont également caractérisées par une forte sécrétion de diverses chimiokines qui vont promouvoir la polarisation Th1 des lymphocytes CD4 (Mantovani et al., 2004). Fonctionnellement, les macrophages M1 participent à l'élimination des agents pathogènes lors d'une infection grâce à leur forte activité phagocytaire. L'élimination de l'agent pathogène se fait ensuite grâce à l'activité de la NADPH oxydase et la génération massive de formes réactives de l'oxygène (Canton et al., 2014; Tan et al., 2016). Ce processus de production de FRO par la NADPH oxydase sera détaillé dans la deuxième partie du manuscrit. Ils libèrent aussi beaucoup de monoxyde d'azote via l'activation de la NO synthase (MacMicking et al., 1997). Cependant, un excès de production de FRO par les M1 conduit à l'endommagement des tissus et altère la régénération des tissus et la cicatrisation des plaies. Pour empêcher ces effets délétères, la réponse inflammatoire médiée par les M1 est inhibée *via* les mécanismes anti-inflammatoires des macrophages M2 (Stout and Suttles, 2004).

- Les macrophages anti-inflammatoires M2 :

Les macrophages M2 interviennent après le déclenchement de l'inflammation. Ils sont qualifiés de macrophages « anti-inflammatoires » et « réparateurs » car ils interviennent dans la résolution de l'inflammation et dans les processus de réparation tissulaire. Ces cellules sont généralement induites par des cytokines Th2 telles que l'IL-4, l'IL-13 *via* l'activation de STAT6 ou encore l'IL-10. L'IL-10 peut en effet régir la polarisation en M2 en activant STAT3 après liaison à son récepteur (IL10-R) (Porta et al., 2015; Wang et al., 2014). Concernant leur phénotype, les macrophages de type M2 expriment à leur surface deux récepteurs caractéristiques de cette sous-population à savoir CD64 et CD209 (Tarique et al., 2015). Ces macrophages produisent et sécrètent des niveaux élevés de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou encore l'IL-13 (Iqbal and Kumar, 2015; Martinez et al., 2008). En revanche, les M2 sont connus comme sécrétant de faibles niveaux de cytokines pro-

inflammatoires. Ces cellules sont également caractérisées par une forte sécrétion de diverses chimiokines telles que CCL17, CCL18, et CCL22, afin de recruter des lymphocytes Th2, lymphocytes T régulateurs (Tregs), des éosinophiles et basophiles pour médier une réponse anti-inflammatoire (Schultze et al., 2015). Fonctionnellement, les macrophages M2 ont également la capacité de phagocyter les débris de pathogène et les cellules apoptotiques (Vogel et al., 2014). Ils favorisent la réparation des tissus et la cicatrisation des plaies en intervenant dans les processus de remodelage tissulaire et d'angiogenèse (Hinz et al., 2012; Mantovani et al., 2013). Par exemple, la sécrétion de chimiokines va permettre le recrutement des fibroblastes qui vont favoriser la croissance cellulaire et par ce biais, la réparation tissulaire (Galván-Peña and O'Neill, 2014). Enfin, ces cellules participent à la modération de la réponse inflammatoire en inhibant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les M1 (Paletta-Silva and Meyer-Fernandes, 2012).

### **1.3.b. Sécrétion de cytokines et chimiokines.**

La synthèse et la libération des cytokines et des chimiokines en tant que messagers solubles sont des mécanismes fondamentaux de la communication cellulaire et de la régulation au sein du système immunitaire (Aderem and Ulevitch, 2000; Cassatella, 1999). Ces molécules sont des protéines de faible poids moléculaire et sont synthétisées par différents types cellulaires, principalement par les cellules du système immunitaire. En effet, elles sont produites par les cellules épithéliales et endothéliales, les adipocytes, les polynucléaires neutrophiles (PMN) et surtout par les lymphocytes et monocytes/macrophages. Leurs rôles sont pléiotropes et vont varier en fonction de la nature de la cytokine mais ont pour mission commune la régulation des défenses de l'organisme.

Les cytokines sont indispensables pour le bon fonctionnement des monocytes/macrophages. En effet, elles assurent l'orientation de la réponse immunitaire en fonction de la nature du signal détecté, relient l'immunité innée et adaptative et influencent la polarisation des macrophages (Unanue et al., 1976). Ainsi, lorsque les monocytes vont être exposés à un stimulus inflammatoire comme par exemple au LPS, ils vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires en particulier le TNF $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-12 (Stow et al., 2009). Ces cytokines vont, en synergie avec d'autres médiateurs (chimiokines, prostaglandines, leucotriènes), augmenter la perméabilité vasculaire et le recrutement des cellules inflammatoires. Elles vont également avoir des effets systémiques notamment en induisant l'augmentation de la température corporelle et la production de protéines inflammatoires. Cette réponse inflammatoire est nécessaire et bénéfique pour l'organisme lorsque ces cytokines pro-inflammatoires sont

produites de manière régulée. En revanche, lorsqu'elles sont produites en excès, elles vont avoir des effets délétères et contribuer à la genèse de maladies inflammatoires (Beutler, 1999). La sécrétion des cytokines anti-inflammatoires par les monocytes est ainsi tout aussi importante que celle des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont les deux cytokines anti-inflammatoires majoritairement sécrétées. Dotées également de rôles pléiotropes, ces cytokines vont agir principalement en supprimant la production des cytokines pro-inflammatoires permettant ainsi d'éviter l'installation d'une inflammation chronique. Enfin, les monocytes sécrètent un large panel de chimiokines intervenant dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau du foyer inflammatoire.

### **1.3.c. Phagocytose et bactéricidie.**

Les monocytes sont des cellules dotées d'une mobilité extrême leur permettant de migrer vers le foyer infectieux en étant guidés par les chimiokines. Une fois sur le site infectieux, les monocytes vont reconnaître et éliminer l'agent pathogène lors de la phagocytose. Le mécanisme de phagocytose est un élément important de la défense de l'hôte chez les eucaryotes (Brown, 1995). Il est impliqué dans la destruction des agents pathogènes et dans le maintien de l'homéostasie dans le foyer infecté. La phagocytose est également impliquée dans l'induction de l'immunité spécifique contre des agents pathogènes puisqu'elle est essentielle à la présentation de l'antigène aux lymphocytes. Les monocytes sont armés pour reconnaître et phagocyter des micro-organismes opsonisés ou non opsonisés, des cellules sanguines abimées et des débris cellulaires qui apparaissent durant une infection, une inflammation ou une lésion tissulaire. La phagocytose est médiée par la reconnaissance de ligands sur les cibles phagocytées par des récepteurs spécifiques présents sur les monocytes (Greaves and Gordon, 2009). En effet, ils expriment de nombreux récepteurs leur permettant de reconnaître des immunoglobulines IgG (CD16, CD32, CD64), les IgA (CD89), les IgE (récepteur de faible affinité Fc $\epsilon$ RII) dans le cas où la cible à digérer est préalablement opsonisée. Les monocytes expriment également à leur surface des récepteurs de type Toll (TLR) qui vont reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPS) (Strowig et al., 2012). Fonctionnellement, les récepteurs de monocyte ont la propriété de déclencher un réarrangement de l'actine du cytosquelette lors de la fixation de l'agoniste reconnu comme étranger. L'internalisation du pathogène s'effectue alors par l'émission membranaire d'une protrusion analogue à un lamellipode qui s'étale sur la particule jusqu'à ce qu'elle l'englobe complètement. Une fois la particule endocytée, celle-ci reste dans une vacuole, appelée phagosome, formée par invagination de la membrane plasmique. Cette étape finale du processus de phagocytose

correspond à la destruction du pathogène (Aderem and Underhill, 1999). Elle fait intervenir différents mécanismes bactéricides complexes qui agissent en coopération et qui peuvent être classés en deux groupes : un mécanisme indépendant de l'oxygène et un mécanisme dépendant de l'oxygène.

### **1.3.c.i. Mécanisme indépendant de l'oxygène.**

Le phagosome interagit successivement avec plusieurs compartiments vacuolaires de la cellule, les endosomes (Russell et al., 2009), et va acquérir des constituants spécifiques tels que LAMP-1 (lysosome-associated membrane protein 1), témoins du processus de maturation du phagosome. Cette maturation va conduire à introduire dans le phagosome de nombreuses substances potentiellement bactéricides : le lysozyme, les défensines, des protéases et des lipases qui interviennent dans la dégradation des composants bactériens et cellulaires (Auger et al., 1999; Lehrer et al., 1993). Ce processus de fusion se termine après plusieurs dizaines de minutes avec la fusion du phagosome avec un lysosome pour former un phagolysosome. En parallèle, une acidification d'une à deux unités pH a lieu, suite à l'activation des pompes à protons dans le phagosome (Geisow et al., 1981). L'acidification du pH va moduler l'efficacité des mécanismes bactéricides mis en jeu par la cellule notamment en favorisant l'action des hydrolases acides. D'autres enzymes telles que les sérines protéases comme l'élastase, la cathépsine G participent également à la microbicidie intraphagosomale en intervenant à différents niveaux (Babior, 1984). Ainsi, les enzymes hydrolytiques participent à la digestion des microorganismes morts et des cellules hôtes endommagées. Le lysozyme dégrade les composants lipopolysaccharidiques tandis que les sérines protéases hydrolysent les protéines contenues dans l'enveloppe bactérienne. Par ailleurs, le déversement de la myéloperoxydase (MPO) illustre la coopération entre les mécanismes enzymatiques et la production des FRO par la NADPH oxydase comme nous le décrivons dans la partie ci-dessous (figure 6).



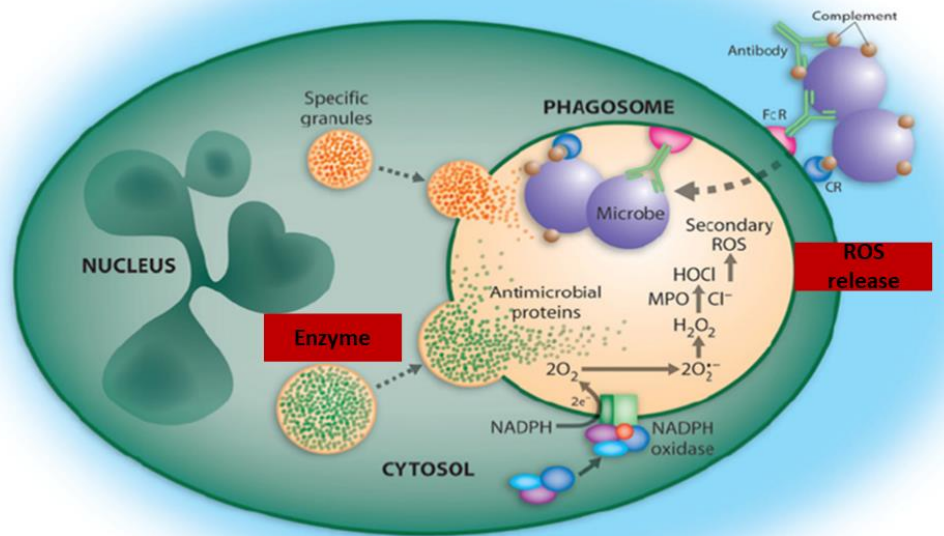


Figure 6 : Représentation schématique de la coopération entre les systèmes dépendant et non-dépendant de l'oxygène dans la dégradation du pathogène au cours de la phagocytose

### 1.3.c.ii. Mécanisme dépendant de l'oxygène.

Un des mécanismes majeurs conduisant à l'élimination des pathogènes phagocytés est basé sur l'activité enzymatique de la NADPH oxydase qui catalyse la conversion de l'oxygène consommé par les monocytes en anion superoxyde ( $O_2^-$ ), qui va être la source des autres FRO exerçant une activité bactéricide et fongicide (Babior, 1978). Cette production rapide des FRO par les monocytes en réponse à divers stimuli est appelée explosion oxydative. La production de ces FRO va se faire de manière graduelle et selon les réactions enzymatiques illustrées dans la figure 7. Dans un premier temps, l'oxygène est réduit en anion superoxyde grâce à la NADPH oxydase 2 (NOX2), enzyme dont la structure et l'activité seront détaillées dans la seconde partie de l'introduction. L'anion superoxyde  $O_2^-$  formé dans le phagosome est instable à pH acide, et va se transformer en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par dismutation spontanée de l' $O_2^-$  ou, catalysé par une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD). Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas en soi un radical mais une molécule, il est lui-même toxique et est capable de donner naissance, *via* des réactions de type « Haber-Weiss », à la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant, le radical hydroxyle  $OH^\bullet$ . En effet, le radical hydroxyle est hautement toxique et est capable de réagir avec les molécules de l'environnement à la vitesse de la

diffusion moléculaire. Ces réactions forment aussi un composé très toxique l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), (Babior, 2000; Wang et al., 1996). Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  formé peut également, grâce à la myéloperoxydase (MPO), donner de grandes quantités d'acide hypochloreux (HOCl) un oxydant fort, capable d'oxyder et de chlorer de nombreuses molécules (Hampton et al., 1998). Dans le phagolysosome, HOCl fonctionne comme un bactéricide puissant. En effet, il peut pénétrer à l'intérieur des bactéries et entraîne la chlorination des molécules biologiques. Il est notamment très réactif sur les acides aminés bloquant toute activité enzymatique. Il bloque ainsi la synthèse d'ATP (Albrich et al., 1981), oxyde les résidus méthionine des protéines membranaires et cytosoliques des bactéries, bloque leur prolifération et induit leur mort. Enfin,  $\text{O}_2^{\circ}$  peut réagir avec le monoxyde d'azote radicalaire  $\text{NO}^{\circ}$  générée par la NO synthase pour donner naissance au peroxydinitrite  $\text{OONO}^-$ , composé bien connu pour ses effets délétères sur l'ADN, les protéines et les lipides (Gutteridge and Halliwell, 1992).

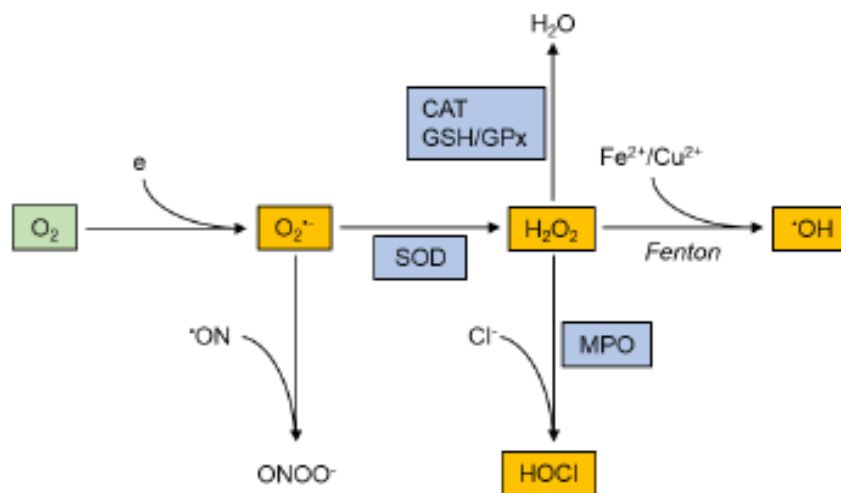


Figure 7 : Réactions enzymatiques intervenant lors de la production des FRO.

La production de ces FRO se fait sur la face externe de la membrane plasmique, devenant la face interne du phagosome lors du processus de phagocytose des microorganismes. Les FRO sont donc physiologiquement produites au contact direct de l'agent pathogène phagocyté, atteignant de hautes concentrations dans le phagosome, milieu clos jouant un rôle majeur dans la bactéricidie. Les FRO produites par la face externe de la membrane plasmique dans le milieu extracellulaire sont physiologiquement peu concentrées. Elles sont ainsi présentes dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Cependant, produites de façon excessive ou inappropriée dans le milieu extracellulaire, les FRO peuvent participer à la

survenue de lésions tissulaires au niveau du site inflammatoire. La première réaction à l'origine de toutes ces FRO est catalysée par une enzyme : la NADPH oxydase.

## II. La NADPH Oxydase 2 :

Les formes réactives de l'oxygène ont été identifiées comme étant des acteurs essentiels dans la défense anti-infectieuse de l'organisme (Kohchi et al., 2009). Leurs origines sont diverses. En effet, les FRO proviennent à la fois de sources exogènes, telles que les rayonnements ou les médicaments, et de sources endogènes, notamment des mitochondries, des peroxysomes et d'une multitude d'enzymes qui comprennent la xanthine oxydase, l'oxyde nitrique synthétase (NO synthase), le cytochrome p450 et surtout et essentiellement, la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Oxydase (NADPH Oxydase, ou NOX en anglais) (Brieger et al., 2012). Parmi toutes ces sources, les NOX sont les seuls systèmes à avoir comme rôle exclusif la production de FRO et constituent ainsi une source majeure de FRO dans l'organisme (Babior, 1999). Ce sont en effet des complexes enzymatiques constitués de plusieurs sous-unités dont la principale fonction est de transférer des électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire entraînant ainsi la génération de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), précurseur des autres formes réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ). La NADPH oxydase a été initialement décrite en 1964 dans les cellules phagocytaires par Rossi et Zatti comme l'enzyme responsable de l'explosion oxydative (Rossi and Zatti, 1964). En 1973, *Babior et al.* ont apporté la première preuve que cette enzyme catalyse la formation de l'anion superoxyde à partir de l'oxygène moléculaire, *via* le NADPH (Babior et al., 1973). Cette NADPH oxydase phagocytaire a été renommée NOX2. Il existe aujourd'hui sept isoenzymes NOX identifiées chez l'Homme : NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 et NOX5, ainsi que les DUOX1 et 2, chacune provenant d'un gène spécifique ayant évolué à partir d'un ancêtre commun (Bedard and Krause, 2007). Les sept isoformes de NOXs partagent non seulement des fonctions conservées mais également des propriétés structurales conservées (Brown and Griendling, 2009; Magnani et al., 2017). En effet, toutes les isoformes ont au moins six domaines transmembranaires, un domaine de fixation de la flavine adénine dinucléotide (FAD) et du NADPH au niveau C-terminal. Les principales différences entre les NOXs résident dans leurs manières d'être activées et dans le type de FRO généré. Ainsi, les NOX 1, 2, 3 et 5 génèrent l'anion superoxyde, tandis que NOX4, DUOX 1 et 2 libèrent directement du peroxyde d'hydrogène (Chen et al., 2008; Martyn et al., 2006).

Concernant leur expression, les NOX ont des schémas de distribution uniques et des niveaux d'expression variés dans différents tissus de l'organisme (Ansari and Scheff, 2011; Brown and Griendling, 2009). Ainsi, NOX1 est très présente dans le côlon, NOX2 dans les phagocytes, NOX3 dans l'oreille interne, NOX4 dans les reins et les vaisseaux sanguins, NOX5 dans le tissu lymphoïde et les testicules, et enfin, DUOX1 et 2 dans la thyroïde (Figure 8).

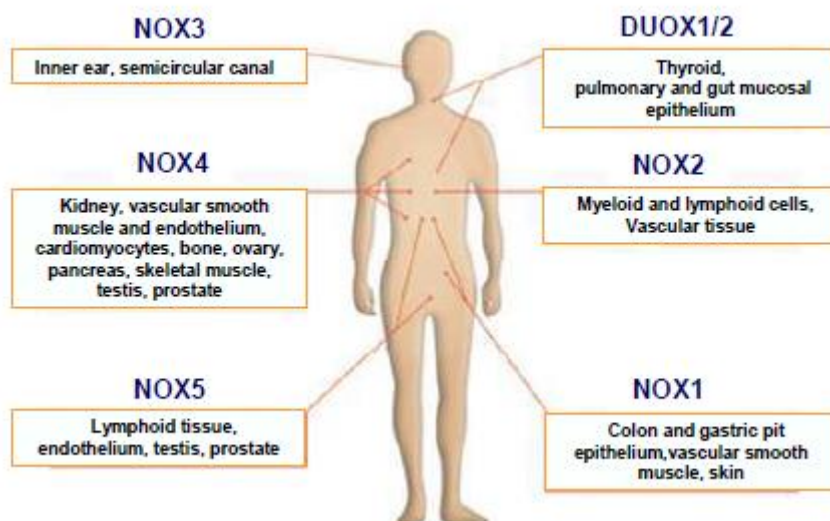


Figure 8 : Localisations des NOX dans l'organisme. D'après « The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction » Quinn et al. Clin sci. 2006

En dehors de la défense de l'hôte, les FRO produites par les enzymes NOX jouent un rôle important dans plusieurs autres processus biologiques tels que, la signalisation intracellulaire, le métabolisme, la réponse au stress, ou encore la transcription de gènes (Bedard and Jaquet, 2012; Gao et al., 2012; Lambeth et al., 2008). Cependant, une production excessive de FRO par les NOX est impliquée dans l'exacerbation du stress oxydatif et, est à l'origine de nombreuses pathologies impliquant l'inflammation, le diabète et le cancer (Blanchetot and Boonstra, 2008; Sedeek et al., 2012; Tang et al., 2012). L'activité des NOX nécessite ainsi une régulation fine et précise du fait de la haute toxicité des FRO.

NOX2 a été la première enzyme NOX découverte lors d'études réalisées sur l'explosion oxydative chez les neutrophiles et constitue ainsi le prototype des NADPH oxydase (Clark et al., 1987; Segal and Jones, 1978). Elle est exprimée par les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, et les éosinophiles. Bien qu'elle soit exprimée par les autres cellules immunitaires, la NOX2 des neutrophiles demeure actuellement la plus étudiée

et la mieux caractérisée, et son mode d'activation est relativement bien compris. En revanche, malgré son importance dans l'immunité et son implication des certaines pathologies, la NOX2 des monocytes est moins caractérisée et la littérature à son sujet reste pauvre en comparaison à la NOX2 des neutrophiles.

Nous présenterons dans cette seconde partie NOX2, à partir de ce qui a été décrit dans les neutrophiles et dans les cellules phagocytaires en général. Nous consacrons ensuite une partie pour décrire ce qui a été étayé par la littérature concernant les spécificités de la NOX2 des monocytes avant de clôturer cette partie en présentant le rôle des FRO dans la signalisation cellulaire.

## II.1. Structure de NOX2.

La NADPH oxydase NOX2 est un complexe enzymatique formé de 6 sous-unités réparties entre le cytosol et la membrane, évitant ainsi toute activation basale de l'enzyme dans les phagocytes au repos (Babior, 1999; El-Benna et al., 2005). Les sous-unités membranaires sont la gp91<sup>phox</sup> et la p22<sup>phox</sup> (phox pour phagocyte oxydase). Ces deux sous-unités membranaires forment le flavocytochrome b<sub>558</sub> (Babior, 1999; Leusen et al., 1996). Les sous-unités cytosoliques sont la p47<sup>phox</sup>, la p67<sup>phox</sup>, la p40<sup>phox</sup> et la petite protéine G Rac présente sous deux isoformes (Rac1 et Rac2) dans les cellules phagocytaires. Elles sont situées dans les membranes des granulations spécifiques en ce qui concerne les neutrophiles et plus généralement dans la membrane plasmique des phagocytes (Borregaard et al., 1983). Lorsque les phagocytes sont stimulés par un agoniste, ces sous-unités cytosoliques migrent vers la membrane pour s'associer au cytochrome b<sub>558</sub> et former ainsi la NADPH oxydase active responsable de la production des FRO (Figure 9).

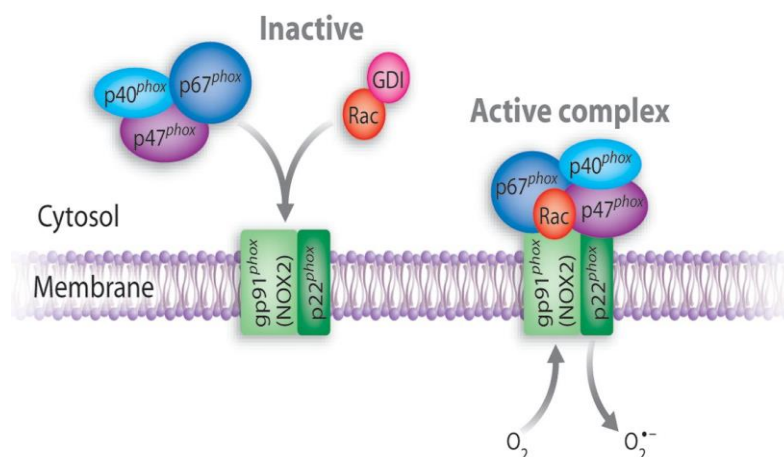


Figure 9 : La NADPH oxydase dans les cellules au repos et les cellules activées. Après activation, les composants cytosoliques migrent vers la membrane pour s'associer avec le cytb<sub>558</sub> et former l'enzyme active.

### II.1.a. Les composants membranaires de NOX2.

Le composant membranaire est le flavocytochrome  $b_{558}$ . Il contient le système entier de transport d'électrons et correspond ainsi au centre catalytique de la NADPH oxydase. C'est une hémoflavoprotéine constituée de deux sous-unités : la p22phox et la gp91phox (renommée NOX2, elle a donné son nom à l'ensemble du complexe enzymatique) assemblées de façon non covalente selon une stœchiométrie 1:1 (Wallach and Segal, 1997).

La sous-unité gp91phox, également nommée NOX2, correspond à la sous-unité  $\beta$  du cytochrome  $b_{558}$  et est, le noyau catalytique de la NADPH oxydase, car elle contient tous les cofacteurs de transfert d'électrons requis (Koshkin and Pick, 1993). Cette production a lieu en deux étapes. La première étape catalytique correspond à la liaison du NADPH au niveau du domaine cytosolique C-terminal et au transfert d'électrons à l'hème proximal via la flavine FAD (Nisimoto et al., 2004). Les électrons sont ensuite transférés dans un deuxième temps vers l'hème distale puis vers l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde. En plus de servir de sous-unité catalytique de la NADPH oxydase, la gp91phox est également un site de liaison pour les composants cytosoliques p47phox, p67phox et Rac (Quinn and Gauss, 2004). L'importance de la sous-unité gp91phox est illustré par un trouble génétique potentiellement létal appelé granulomatose septique chronique (CGD). Cette maladie est caractérisée par un dysfonctionnement de la NADPH oxydase phagocytaire entraînant une défense défectueuse contre les infections bactériennes et fongiques (Gérard et al., 2001).

La sous-unité p22phox correspond à la sous-unité  $\alpha$  du cytochrome  $b_{558}$  et est, essentielle pour la stabilisation et la maturation de la gp91phox ainsi que pour la formation du complexe NADPH oxydase actif (DeLeo et al., 2000). Cette sous-unité sert en effet, de point d'ancrage à la p47phox (Dahan et al., 2002). Cette interaction avec la p47phox est potentialisée lorsque la p22phox est phosphorylée sur la thréonine 147 lors de l'activation de la NADPH oxydase (Lewis et al., 2010). Toutefois, le principal rôle physiologique de la sous-unité p22phox est de contribuer à la maturation et à la stabilisation de l'hétérodimère qu'il forme avec la sous-unité NOX2 (Bedard and Krause, 2007). En effet, l'association de NOX2 avec la p22phox dans le réticulum endoplasmique semble être une condition préalable à la localisation de l'hétérodimère la membrane plasmique (Ambasta et al., 2004). Par ailleurs, les neutrophiles des patients CGD avec des mutations affectant soit *CYBB* soit *CYBA* n'expriment ni la gp91phox ni la p22phox confirmant que ces deux sous-unités sont nécessaires pour une expression stable du cytochrome  $b_{558}$  (Porter et al., 1994). Avec une fréquence inférieure à 5%, la mutation affectant p22phox est néanmoins moins fréquente que celle affectant la gp91phox.

### **II.1.b. Les composants cytosoliques de NOX2.**

Les composants cytosoliques de NOX2 sont au nombre de quatre : la p47phox, la p67phox, la p40phox et la protéine G Rac1/2. Ces sous-unités vont intervenir dans la régulation de l'activité catalytique de NOX2.

La sous-unité p47phox est une protéine pivot dans l'assemblage des autres composants de la NADPH oxydase (El-Benna et al., 2008). Elle existe au repos sous forme libre ou associée à la p67phox et à la p40phox (Roos et al., 1996), sous la forme d'un complexe de 240 kDa (Park et al., 1994). Cette sous-unité joue un rôle central dans l'activation de NOX2 car elle est responsable de la translocation du trimère cytosolique (p47phox-p67phox-p40phox) vers la membrane (Dusi et al., 1996). L'importance de la sous-unité p47phox dans la formation d'un complexe NOX2 actif est illustrée à travers la CGD où il a été observé une absence de translocation de la p67phox et p40phox vers la membrane dans des neutrophiles déficient en p47phox associée à une absence de production de FRO (Chang et al., 1998; Dusi et al., 1996).

La p67phox est une sous-unité du complexe NADPH oxydase nécessaire à la régulation du transfert des électrons. Cette sous-unité joue le rôle de protéine adaptatrice en liant les sous-unités p47phox et p40phox (Lapouge et al., 2002). Lors de l'activation de la NADPH oxydase, la p67phox est phosphorylée et migre avec la p47phox au niveau de la membrane. Une fois à la membrane, la p67phox s'associe à Rac *via* son domaine TPR, et le complexe p67phox-Rac induit un changement conformationnel de NOX2 permettant le transfert des électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire (Diebold and Bokoch, 2001; Koga et al., 1999; Paclet et al., 2007). Tout comme pour les autres sous-unités, l'importance de la p67phox est illustrée à travers la CGD p67phox déficiente qui représente 5% des CGD et est associée à une absence de p40phox mais aussi à un défaut de production de FRO (Bonizzato et al., 1997; Kenney et al., 1993).

La sous-unité p40phox est considérée comme étant la sous-unité régulatrice du complexe NADPH oxydase et est la dernière sous-unité à avoir été découverte. Elle interagit avec la p47phox (Grizot et al., 2001; Tsunawaki et al., 1996) et la p67phox (Honbou et al., 2007) tout en se liant avec les phosphatidyl inositol 3-phosphate (PI3P) de la membrane plasmique (Ago et al., 2001; Kanai et al., 2001). La sous-unité p40phox a été longtemps considérée comme étant un partenaire de liaison obligatoire pour la p67phox, mais son rôle dans l'activation de l'oxydase est resté longtemps méconnu. Cependant, le développement de modèles murins p40phox<sup>-/-</sup> (Ellson et al., 2006b) ou ayant une mutation ponctuelle dans le domaine PX (Ellson

et al., 2006a), mais également la découverte d'un patient CGD exprimant une p40phox mutée (Matute et al., 2009), ont établi l'importance de cette sous-unité dans l'activation de NOX2. Des études ont démontré que la p40phox contribue à l'activation de la NADPH oxydase en facilitant la localisation membranaire de la p67phox (et de sa protéine associée p47phox) (Kuribayashi et al., 2002), et en favorisant la production d'anion superoxyde via la liaison du domaine PX au PI3P qui augmente au cours de l'internalisation du phagosome (Tian et al., 2008).

Enfin, la protéine Rac appartient à la famille des GTPases, de la sous-famille Rho, impliquée dans la régulation d'une grande variété de processus cellulaires importants comme la croissance cellulaire, la migration cellulaire, l'activation de kinases etc... Il existe 2 isoformes de la protéine Rac dans les cellules phagocytaires : Rac 1 et Rac 2 (Didsbury et al., 1989). Les neutrophiles expriment majoritairement Rac2 tandis que les monocytes expriment Rac1 (Zhao et al., 2003). Bien qu'elle ne soit pas considérée comme faisant partie intégrante du système NOX du fait de ses rôles pléiotropes, la protéine G Rac joue un rôle important dans l'activation de la NADPH oxydase (Hordijk, 2006; Miyano and Sumimoto, 2007). En effet, dans les cellules au repos, Rac est retenue dans le cytosol dans un état inactif, liées au GDP et à son inhibiteur Rho-GDI (GDP Dissociation Inhibitor) (Werner, 2004). Lorsque les cellules phagocytaires sont activées, Rac se dissocie de son inhibiteur Rho-GDI, lie le GTP, et parallèlement mais indépendamment au trimère p40phox/p67phox/p47phox, transloque vers la membrane. Rac sous la forme liée au GTP, se lie ainsi directement à la sous-unité p67phox en induisant un changement conformationnel de celle-ci, ce qui lui permet d'interagir avec Nox2, et conduit ainsi à la production de l'anion superoxyde (Bokoch and Zhao, 2006).

## **II.2. Activation et modulation de NOX2.**

En dehors de toute stimulation, la NADPH oxydase des phagocytes est au repos, et les différentes sous-unités qui la composent sont dispersées entre le cytosol et la membrane. La stimulation des phagocytes par différents facteurs solubles physiologique (C5a, fMLF, LTB4, PAF) ou pharmacologique (PMA, activateur direct des PKC) ainsi que les facteurs particulaires (bactéries, zymosan opsonisé et particules de latex opsonisées) va initier l'assemblage et l'activation de NOX2. Ces agents stimulants vont induire l'activation de différentes cascades de signalisation intracellulaire impliquant des acteurs variés qui sont des protéines G, des phospholipases (PLC, PLD, PLA2), des kinases (PKA, PKC, MAPK, PI3K), et aboutissant à la phosphorylation des différentes sous-unités de la NOX2 (El-Benna et al., 2016). Ces modifications post-traductionnelles génèrent de nouvelles interactions protéines-protéines et



protéines-lipides, qui permettent l'assemblage des sous-unité cytosoliques (p47phox, p67phox et p40phox) aux sous-unités membranaires (gp91phox et p22phox) mais aussi aux phospholipides membranaires ce qui aboutit à la formation d'un complexe NOX2 actif. L'activation de la petite protéine G, Rac2 est un autre évènement majeur accompagnant l'activation de NOX2 (Lőrincz et al., 2014).

La NADPH oxydase des cellules phagocytaires passe ainsi d'un état de repos total à un état activé. Cependant, il est aujourd'hui clair que ce passage ne se fait pas de façon brutale, mais qu'une étape intermédiaire prépare à l'activation : c'est ce qu'on appelle le « priming ». Le priming pouvant être traduit par amorçage, est défini *in vitro* par le fait qu'un prétraitement par un premier agoniste ne déclenche pas lui-même la production de FRO mais va potentialiser celle-ci en réponse à un second stimulus ajouté ultérieurement (Sheppard et al., 2005). Ainsi, alors que le terme d'activation fait référence à l'induction d'une production de FRO facilement détectable en réponse à un seul agoniste, le terme de « priming », quant à lui, indique la transformation phénotypique et mécanistique des cellules phagocytaires en un phénotype les rendant plus sensibles à l'activation et cela, par le biais d'un agent dit primant. Les agents « primants » peuvent être des cytokines pro-inflammatoires, des agonistes des TLRs ou des agents chimiotactiques à de très faibles concentrations (El-Benna et al., 2016).

Par ailleurs, après l'activation, une étape d'arrêt et d'inhibition est nécessaire pour limiter l'activation dans le temps et aider à la résolution de l'inflammation. Cette étape est appelée « depriming » ou « désensibilisation ». Contrairement au priming, le phénomène de dé-priming est bien moins caractérisé et étudié malgré son importance égale. En effet, la production de FRO est une fonction nécessaire pour éliminer l'agent pathogène mais qui peut devenir délétère si elle perdure dans le temps. Une définition générale de ce processus serait de dire que la désensibilisation correspond au fait qu'un premier contact avec un agoniste diminue la réponse ultérieure. Mon équipe d'accueil a montré que l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, exerce un effet de dé-priming en diminuant la production de FRO induite par le GM-CSF dans les neutrophiles (Dang et al., 2006a).

Ainsi, ces deux processus de priming et de dé-priming participent à la modulation de l'activation de la NADPH oxydase

### **II.3. La NOX2 des monocytes.**

Les monocytes/macrophages exercent un rôle capital dans la défense de l'organisme. En effet, ils phagocytent et tuent les agents pathogènes tout en coordonnant la réponse inflammatoire. Bien qu'il soit bien établi que la NOX2 des neutrophiles est essentielle pour la défense de l'hôte, l'importance de NOX2 dans les monocytes est moins mise en lumière. L'une des preuves les plus solides du rôle de NOX2 des monocytes dans la défense de l'hôte provient de la découverte que les mutations de la gp91phox qui affectent sélectivement les macrophages conduisent à une sensibilité accrue aux maladies mycobactériennes (Bustamante et al., 2011; Okura et al., 2015). Des études antérieures ont montré que les macrophages alvéolaires ingèrent et tuent les spores d'*Aspergillus*, tandis que les neutrophiles ciblent principalement le stade hyphal (Schaffner et al., 1982). Les FRO dérivés de macrophages jouent également un rôle dans l'immunité adaptative en participant à la sélection des lymphocytes T, leur maturation et à leur différenciation (Gelderman et al., 2007). L'ensemble de ces résultats montrent le rôle important de la NOX2 des monocytes dans la défense de l'hôte. Parallèlement à son rôle indispensable dans l'immunité, la NOX2 des monocytes est également impliquée dans certaines pathologies inflammatoires. En effet, plusieurs données indiquent clairement que les monocytes contribuent activement au développement de l'athérosclérose (Cathcart, 2004; Gui et al., 2012; Lara-Guzmán et al., 2017). En effet, leur production incontrôlée d'anion superoxyde va conduire à l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et va contribuer ainsi de manière significative au développement des lésions vasculaires. La production excessive de FRO par NOX2 des macrophages est également associée à la neuro-inflammation et à la neurodégénérescence chronique à la suite d'une lésion cérébrale traumatique (TBI) (Barrett et al., 2017; Kumar et al., 2016). Ainsi, malgré son importance dans le système immunitaire et son implication dans certaines pathologies, la NOX2 des monocytes reste toutefois peu étudiée en comparaison à NOX2 des neutrophiles.

Les études réalisées sur la NOX2 monocyttaire ont mis en évidence des similitudes mais aussi des différences par rapport à la NOX2 des neutrophiles. Contrairement aux neutrophiles, la NADPH oxydase des monocytes est située principalement dans la membrane plasmique car les monocytes sont dépourvus de granules. Toutefois, dans les macrophages murins, le cytochrome b558 est détecté dans les endosomes précoces Rab 11 et rab 5 positifs (Casbon et al., 2009) ainsi que dans le réticulum endoplasmique.

La NOX2 monocyttaire est constituée des mêmes sous-unités que la NADPH oxydase des neutrophiles mais à la particularité d'exprimer majoritairement l'isoforme Rac1. En effet, dans les monocytes humains au repos, Rac1 existe sous la forme d'un hétérodimère avec Rho-GDI dans le cytosol. Lors de l'activation des monocytes par le zymosan opsonisé, le PMA, ou le fMLF, Rac1 se dissocie de son partenaire et transloque à la membrane pour s'associer avec la p67phox et le cytochrome b558 pour permettre l'activation de l'oxydase (Zhao et al., 2003).

Cependant, même si la structure de la NADPH oxydase des monocytes et neutrophiles se ressemblent, il existe toutefois, quelques différences au niveau de la régulation de son activité. En effet, il a par exemple été montré que, lors de leur stimulation, les neutrophiles, vont libérer de manière rapide et intense des FRO avec un pic atteint entre 2 et 10 minutes selon l'agoniste tandis que les monocytes augmentent progressivement leur production de FRO. Le pic de libération apparaît en effet 1 heure après stimulation mais reste détectable plusieurs heures après (Cathcart et al., 1989).

La NOX2 des monocytes *via* la libération des FRO, exerce ainsi un rôle tout aussi important que la NOX2 des neutrophiles dans la défense immunitaire de l'organisme ainsi que dans la signalisation intracellulaire.

#### **II.4. Rôle des formes réactives de l'oxygène dans la signalisation intracellulaire.**

Les FRO ont au début étaient décrites comme étant des molécules toxiques libérées par les cellules phagocytaires au cours de la réponse immunitaire pour détruire les agents pathogènes de type bactérien ou fongique. Cependant, les nombreuses preuves accumulées rendent indéniable le rôle central des FRO dans la modulation de signalisation cellulaire et leur action en tant que second messager. Il a été ainsi montré que les FRO interviennent dans la modulation des voies des MAPKinases, des PI3K-Akt, de la voie Nrf2, ou encore la voie NfκB (Zhang et al., 2016). Les FRO vont en effet agir sur différentes cibles incluant des facteurs de transcriptions, des récepteurs ou encore des canaux afin d'induire une signalisation cellulaire. Les kinases et les phosphatases sont également des cibles des FRO. Elles modulent la signalisation cellulaire avec des phénomènes de phosphorylation et de déphosphorylation respectivement. Ce sont des protéines qui peuvent être sensibles et oxydées de manière réversibles par les FRO. Parmi les différents acides aminés qui composent ces protéines, la cystéine (Cys) est d'un intérêt particulier, car la fraction thiol (SH) dans la chaîne latérale est très sensible à l'oxydation par les FRO entraînant la formation de liaisons disulfures avec un

autre résidu thiol voisin (Tanner et al., 2011). Cette modification oxydative des protéines n'est pas définitive et peut être reversée par des agents réducteurs intracellulaires (Ostman et al., 2011).

L'oxydation des phosphatases est souvent associée à leur inactivation (Miki and Funato, 2012). Il a été en effet montré que plusieurs types de protéine tyrosine phosphatase (PTP) sont régulées négativement par oxydation de leur cystéine située au niveau du site catalytique. La MAP kinase phosphatase (MKP), par exemple, est une protéine impliquée dans la voie de signalisation du stress en régulant négativement l'activité de c-Jun Kinase N-terminale (JNK). Il a été montré que lorsque les cellules sont stimulées avec le  $\text{TNF}\alpha$ , les FRO sont activement libérées et oxydent la MKP, ce qui entraîne l'inhibition de son activité phosphatase et contribue à l'activation soutenue de JNK (Kamata et al., 2005). De manière générale, l'inhibition exercée par les FRO sur les PTP aide à propager les signaux des récepteurs tyrosine kinase.

Outre l'inhibition de l'activité des PTP, les FRO régulent positivement la phosphorylation des protéines tyrosines kinases par oxydation spécifique des groupes SH de la cystéine, induisant ainsi un changement de conformation nécessaire à leur activation. Il a été montré par exemple que, la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase D (PKD), les récepteurs tyrosine kinase (RTK), ou encore les protéines kinases de la famille Src ont une activité régulée positivement par les FRO (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2012; Giannoni et al., 2005; Thompson et al., 2012). L'effet des FRO varie en fonction de la cible protéique et de leur concentration intracellulaire. Une étude a montré ainsi que les FRO jouent un double rôle à la fois en stimulant et en inactivant la PKC en fonction de leur concentration : des doses élevées d'oxydants réagissent avec les résidus cystéine catalytiquement importants inactivant la PKC; tandis que de faibles doses induisent une stimulation de l'activité PKC (Mochly-Rosen et al., 2012).

Ainsi, même s'il a été clairement démontré que l'équilibre redox joue un rôle central l'homéostasie cellulaire en raison de la capacité des FRO à activer ou désactiver une variété de cible, la signalisation médiée par les FRO est en réalité complexe du fait des nombreuses voies de signalisation sensibles aux FRO et du haut degré de complexité dans les actions simultanées des FRO. Par ailleurs, au-delà de leurs rôles physiologiques dans la signalisation intracellulaire, les FRO participent également au développement du stress oxydant lorsque leur quantité excède celle prise en charge par les mécanismes antioxydants de la cellule. Ainsi, une production trop importante de FRO non contrôlée induit de nombreux effets délétères tels que la peroxydation

lipidique, l'oxydation des protéines, les dommages à l'ADN, l'activation des MMP, la mort cellulaire etc... Par ailleurs leur production inappropriée peut également entraîner une dérégulation de la signalisation intracellulaire. Tous ces facteurs concourent à la genèse de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, telle que la polyarthrite rhumatoïde qui est développée dans la section suivante (Brieger et al., 2012; Cadet and Wagner, 2013).

### III. La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie chronique systémique, inflammatoire et auto-immune caractérisée par une inflammation des articulations synoviales (synovite), une hyperplasie du tissu synovial (pannus) associée à une destruction du cartilage osseux provoquant un gonflement des articulations et à une déformation de l'aspect du membre touché (Figure 10). L'évolution de cette affection se fait par poussées inflammatoires provoquant la destruction articulaire en l'absence d'une prise en charge efficace. L'origine exacte de cette pathologie demeure actuellement inconnue. Toutefois, les données récentes de la littérature incriminent les cellules de l'immunité innée dans le développement des lésions de la PR (Rana et al., 2018). Nous présenterons dans cette troisième partie l'étiologie et la pathogenèse de la PR avant de mettre l'accent sur le rôle prépondérant des monocytes/macrophages et des FRO qu'ils produisent dans cette pathologie.

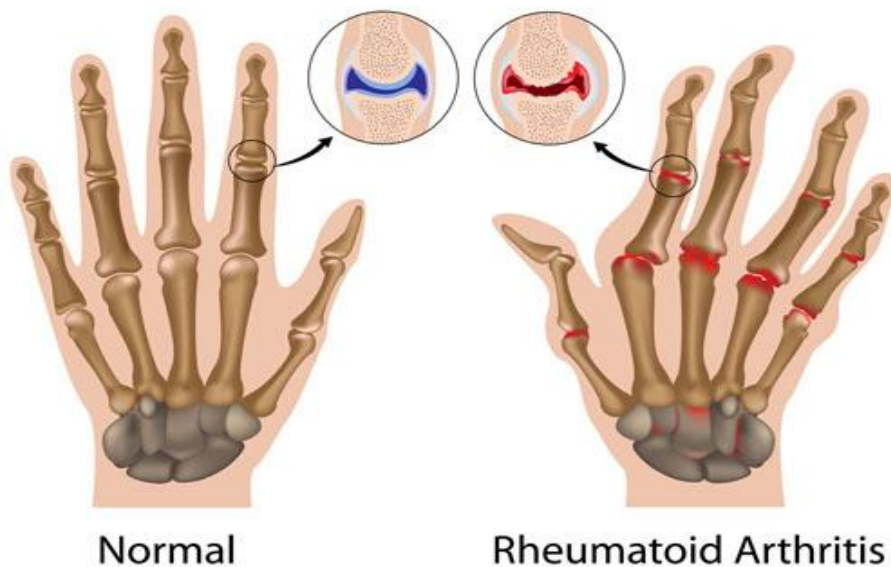


Figure 10 : Atteinte clinique de la PR. Illustration d'une main normale (gauche) et d'une main atteinte de PR (droite). La PR entraîne un gonflement des articulations associé à une déformation de l'aspect des doigts de la main au niveau des phalanges et à une érosion osseuse.

### **III.1. Etiologie et pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde.**

La PR est une pathologie touchant 1% de la population mondiale. La dernière étude a révélé une incidence annuelle de 40 cas pour 100 000 habitants dans le monde (Alam et al., 2017). En France, la PR touche environ 300000 à 500000 personnes avec une incidence en légère diminution durant les 40 dernières années (Kaipiainen-Seppanen and Kautiainen, 2006). Les femmes sont plus touchées que les hommes par cette pathologie ; elle atteint un homme pour trois à cinq femmes et le risque de déclarer la PR dans la vie d'une femme est de 1 sur 28, contre 1 sur 59 pour les hommes (Roux et al., 2007). L'âge moyen d'apparition de la PR est de 50 ans. Cette pathologie constitue un véritable problème de santé publique, tant par le handicap occasionné, par les lésions articulaires que par le coût du traitement sur l'économie de santé (Safiri et al., 2019). Toutefois, le développement ces dernières décennies de médicaments immuno-modulateurs et de thérapeutiques ciblées ont contribué à l'amélioration de la prise en charge des patients, permettant de diminuer l'activité de la maladie (Gartlehner et al., 2006), d'améliorer le handicap, et de ralentir ainsi l'évolution de la destruction articulaire (Aletaha et al., 2008). Néanmoins, malgré ces progrès substantiels, l'impact de la PR sur la capacité fonctionnelle et la qualité de vie des patients reste un problème important. La plupart des patients ont, en effet, une forme chronique persistante de la maladie car une rémission complète est rare et une rémission prolongée est encore plus improbable. De plus, afin de contrôler cette maladie, un traitement chronique est nécessaire et de multiples effets indésirables dues aux médicaments s'accroissent souvent au fil des ans. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc clairement nécessaires pour contrôler au mieux l'évolution de la pathologie en minimisant les effets secondaires (Smolen et al., 2016).

#### **III.1.a. Etiologie.**

Comme la plupart des maladies auto-immunes, la PR est une pathologie multifactorielle, avec un terrain génétique particulier (Auger et al., 2005) impliquant des facteurs environnementaux et hormonaux. À la fin des années 1970 et au début des années 1980, plusieurs études ont mis en évidence un lien entre la susceptibilité à la PR et les différents allèles du gène HLA-DRB1. Ce gène appartient au complexe majeur d'histocompatibilité et code ainsi des molécules essentielles pour la présentation des antigènes au système immunitaire. Les différentes mutations de ce gène contribuent directement à la pathogenèse de la PR en entraînant la présentation incorrecte d'auto-antigènes aux cellules T par les cellules présentatrices d'antigène, résultant en une réponse immunitaire auto-immune (Gregersen et al., 1987; van der Helm-van

Mil et al., 2005). La prédisposition héréditaire de la PR peut être renforcée par différents facteurs environnementaux tels que la pollution de l'air ou certaines infections, ainsi que des facteurs comportementaux, tel que le tabagisme ou l'alimentation (Scherer et al., 2020).

### **III.1.b. Pathogenèse de la PR.**

La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie complexe caractérisée par une hyperplasie synoviale, une production accrue de cytokines, de chimiokines, d'auto-anticorps comme les facteurs rhumatoïdes (RF) et les anticorps anti-protéine anticitrullinée (ACPA), une ostéoclastogenèse et angiogenèse excessive, entraînant des conséquences systémiques comme des troubles cardiovasculaires, pulmonaires, psychologiques et squelettiques. La progression de la maladie est classiquement découpée en quatre phases (Alam et al., 2017) :

Une phase dite « pré-arthritique » ; phase non pathologique de prédisposition à la maladie. Le mécanisme de déclenchement exact du processus pathologique est encore inconnu mais les causes de la PR sont multiples comme mentionné précédemment.

Une phase dite « pré-clinique » ; phase caractérisée par une apparition d'une auto-immunité contre des protéines du soi modifiées situées dans l'articulation, sans manifestation clinique associée.

Une phase dite « clinique » ; phase caractérisée par l'apparition des symptômes. C'est au cours de cette phase que va avoir lieu le recrutement massif des cellules de l'immunité, l'installation et la progression de la réaction inflammatoire.

Une phase dite de « réparation » ; la phase de réparation responsable de la fibrose articulaire, a lieu parallèlement à la phase de destruction, mais ne compense pas le processus de destruction. Elle fait participer des facteurs de croissance et le TGF- $\beta$  (Elshabrawy et al., 2015).

La PR est ainsi une maladie graduelle résultant de l'hyper-activation du système immunitaire. De nombreuses cellules immunitaires interviennent dans le processus pathologique. Parmi ces cellules, les monocytes jouent un rôle central dans la pathogenèse car ils sont à l'origine du recrutement massive des cellules immunitaires au niveau de la membrane synoviale *via* la

sécrétion de cytokines et chimiokines. Ils peuvent également se différencier en ostéoclastes, synoviocytes et macrophages, cellules responsables de l'amplification du processus inflammatoire ainsi que de la destruction osseuse.

### III.1.b.i. Implication des cytokines.

Le nom "cytokine" vient du grec cyto signifiant « cellule » et kinin signifiant « mouvement » (Tayal and Kalra, 2008). Les cytokines sont un groupe diversifié de protéines qui comprennent les monokines, les lymphokines, les interleukines (IL), les interférons (IFN), les facteurs de stimulation des colonies (CSF) et les chimiokines. Ce sont des petites protéines de poids moléculaire compris entre 8 kDa et 50 kDa, synthétisées au besoin au cours de la réponse immunitaire qui agissent par liaison à un récepteur. Dans la PR, le profil de sécrétion de cytokines dans la membrane synoviale est caractérisé par un changement du type de cytokine secrété en fonction de la progression de la maladie. Ainsi au temps précoce de la maladie, les cytokines dominantes retrouvées dans la membrane synoviale sont l'IL-2, IL-4, IL-13, IL-17 et IL-15. Lorsque la PR est bien établie, les cytokines présentes majoritairement sont l'IFN- $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-10 avec une expression faible ou absente d'IL-2, IL-4, IL-5 et IL-13 (Meyer et al., 2010; Steiner et al., 1999). Le mécanisme de modification du spectre des cytokines au cours de la progression de la maladie reste inconnu (Cope, 2008). En revanche, le rôle de chaque cytokine dans la PR est aujourd'hui bien renseigné (Brennan and McInnes, 2008) (Figure 11). Les rôles respectifs du TNF $\alpha$  et de l'IL-10, cytokines sur lesquelles a porté mon travail, seront détaillés dans la partie 4. L'ensemble de ces cytokines sont produites par différentes cellules de l'immunité innée et adaptative.



Antigen Presenting Cells	Signal responders	Differentiating toward:	Cytokines required to maturation	Cytokines produced	Role in RA pathogenesis
 <p>APCs</p> <p>MHC II</p>	 <p>naive T cells</p> <p>TCR CD28 CD3 CD4</p>	Th1	IFN $\gamma$ , IL-12	IL-2, IL-12, IL-18, IL-27, IFN $\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pro-inflammatory response</li> <li>- Activation of macrophages and neutrophils</li> <li>- Inhibition of Th2 lymphocytes proliferation</li> </ul>
		Th2	IL-2, IL-4, IL-31, IL-33	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulation of B cells to proliferation and plasma cells differentiation–autoantibody production</li> <li>- Inhibition of Th1 lymphocyte proliferation</li> </ul>
		Th17	TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23	IL-17, IL-21, IL-22, IL-26, GM-CSF, TNF $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pro-inflammatory response</li> <li>- Local inflammatory response regulation</li> <li>- Increasing production of neutrophil attractants</li> </ul>
		Th22	TNF $\alpha$ , IL-6	IL-22, IL-13, TNF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Regulation of immune response</li> </ul>

Figure 11 : Les différentes cytokines et leurs rôles dans la pathogenèse de la PR. D'après The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis – Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy, Brzustewicz et al, Department of Pathology and Experimental Rheumatology, 2015.



### **III.1.b.ii. Implication des cellules de l'articulation dans la pathogenèse de la PR.**

La PR se développe de manière progressive en réponse à l'action d'un réseau cellulaire varié (Boissier et al., 2012). Avant de présenter les différents types de cellules impliquées dans la pathogenèse de la PR, il convient de décrire comment se traduit le développement de la maladie à l'échelle cellulaire. Pour rappel, la membrane synoviale est une structure cellulaire d'origine mésenchymateuse, tapissant toutes les surfaces articulaires à l'exception du cartilage, qui délimite la cavité contenant le liquide synovial (Figure 12). Elle est divisée en deux couches : une couche profonde recouvrant la capsule articulaire et une couche superficielle, elle-même formée d'une couche bordante, composée d'une à deux assises de cellules, l'intima, et d'une zone plus profonde, la sub-intima. La membrane synoviale est vascularisée et innervée et possède un rôle important dans le bon fonctionnement de l'articulation car elle élabore le liquide articulaire qui permet la lubrification et la nutrition du cartilage avasculaire, mais aussi régule la pression et la température locale (Giannini et al., 2020). Elle assure ainsi à l'état normal, à l'articulation diarthrodiale, un mouvement indolore. Les cellules constituant la membrane synoviale sont appelées synoviocytes et sont de deux types : les synoviocytes de type A et les synoviocytes de type B. Ces deux types cellulaires ont des origines et des caractéristiques morphologiques, histo-chimiques et immuno-histologiques différentes. Les synoviocytes de type A ou macrophagique, d'origine hématopoïétique, ont une forme sphérique et disposent d'une couverture dense en filo- et lamellipodes. Ces cellules sont aussi considérées comme similaires aux macrophages par leur structure superficielle et par leur distribution inégale, avec une fréquence plus élevée autour des pointes des villosités synoviales. (Iwanaga et al., 2000; Shikichi et al., 1999). Ils ont pour principale fonction de nettoyer les débris produits par déchirure et usure dans une articulation en les phagocytant. Les synoviocytes de type A expriment également des molécules de la classe HLA II et présentent les peptides liés au CMH II (Kitamura et al., 2001). Ils participent ainsi activement aux réponses immunologiques en conditions pathologiques et sont directement partie prenante dans la destruction articulaire. Le synoviocyte de type B appelé également synoviocyte fibroblastique est une cellule d'origine mésenchymateuse. Les synoviocytes de type B ont un potentiel prolifératif supérieur à celui des synoviocytes et diffèrent des autres fibroblastes par l'expression de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), du CD44 (récepteur principal de l'acide hyaluronique), et de l'UDGPD (uridine diphosphoglucose déshydrogénase) qui permet la synthèse de l'acide hyaluronique (Mombberger et al., 2005). Ils participent ainsi, tous comme les synoviocytes de type A, au bon fonctionnement de l'articulation. En effet, dans une articulation saine, les synoviocytes de type

B synthétisent et sécrètent de nombreuses protéines (collagène, fibronectine (Laviètes et al., 1985)) et cytokines qui assurent le renouvellement de la matrice extracellulaire, la nutrition des autres cellules articulaires, et la synthèse d'un liquide articulaire lubrifiant du cartilage. Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, ces cellules subissent des modifications phénotypiques, expriment des proto-oncogènes (Fas, Bcl-2 et c-Myc) et des protéines anti-apoptotiques, et produisent des cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-6) (Chevrel et al., 2002) ainsi que des médiateurs solubles qui vont recruter et activer les cellules immunitaires et les cellules résidentes de la membrane synoviale, à l'origine de l'inflammation chronique et de la destruction ostéoarticulaire (Bartok and Firestein, 2010; Nygaard and Firestein, 2020). Enfin, les synoviocytes fibroblastiques sécrètent certaines métalloprotéinases matricielle (MMP) qui activent la gélatinase MMP-2 et la collagénase MMP-1, amplifiant et entretenant la protéolyse matricielle. Les fragments de fibronectine et vitronectine ainsi générés activent également la sécrétion de différentes MMP, entraînant une rupture de l'homéostasie en faveur d'un catabolisme matriciel et ainsi, d'une érosion osseuse (Lin et al., 2020).

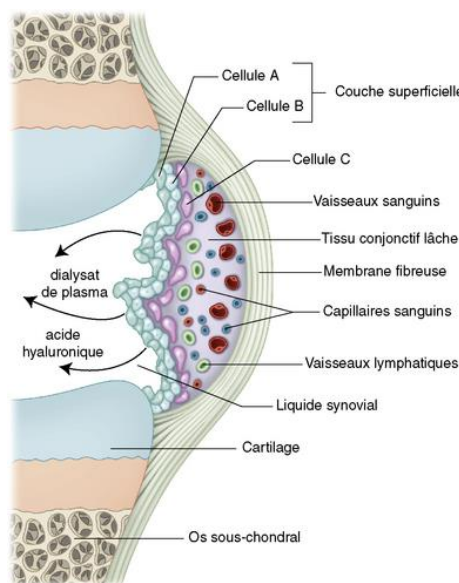


Figure 12 : Représentation schématique de la membrane synoviale. La membrane synoviale est un tissu conjonctif de type particulier, qui tapisse entièrement la face interne de la cavité articulaire, y compris les éventuels ligaments intra-articulaires. Seul le cartilage articulaire n'est pas recouvert par cet élément.

### III.1.b.iii. Implication des cellules immunitaires dans la pathogenèse de la PR.

L'inflammation articulaire est initiée et maintenue par une interaction complexe entre différentes cellules immunitaires (Figure 13) : des cellules dendritiques, lymphocytes T, lymphocytes B, neutrophiles, monocytes, et des macrophages. Du fait de la présence d'auto-antigènes spécifique de la PR, l'activation de ces cellules immunitaires est continue ce qui

provoque un état inflammatoire chronique et un gonflement de la membrane synoviale induisant chez les patients touchés une douleur et un gonflement des articulations. Chaque type cellulaire précédemment cité occupe un rôle dans la pathogenèse de la maladie. En effet, les cellules dendritiques ont une fonction critique dans la régulation des réponses immunitaires en absorbant, traitant, et en présentant les antigènes aux cellules T naïves. Ces cellules déterminent l'équilibre entre l'activation du système immunitaire ou l'induction et le maintien de la tolérance. L'accumulation de preuves suggère qu'une distribution et une fonction modifiées des CD dans la PR comme dans d'autres maladies auto-immunes contribuent à l'inflammation auto-immune (Coutant and Miossec, 2016). Dans le contexte de la PR, une fréquence réduite des CD conventionnelles et des plasmacytoïdes dans le plasma des patients arthritiques a été signalée, causée probablement par une migration accrue des CD vers l'articulation enflammée (Jongbloed et al., 2006). Une fois dans l'articulation, les CD vont produire et libérer les cytokines IL-12 et IL-23 favorisant les réponses Th17 spécifiques de l'antigène et entraînant des déséquilibres entre les réponses Th1-Th2 et les réponses Th17. De plus, il a également été rapporté que les plasmacytoïdes contribuent à l'inflammation globale chez les patients atteints de PR *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en particulier d'IFN- $\alpha$ , d'IFN- $\beta$ , d'IL-18 et d'IL-23. La production accrue de cytokines pro-inflammatoires associée avec le statut activé des CD favorisent la présentation d'auto-antigènes aux cellules T et la perpétuation de la réponse inflammatoire (Segura et al., 2013; Tournadre et al., 2012). Initiées à la fois par les cellules épithéliales de la synoviale et par les CPA comme les CD, les principales cellules infiltrant les articulations touchées dans la PR sont les cellules T, les cellules B, les neutrophiles et les monocytes (Aletaha et al., 2008). Les cellules T activées migrent vers la membrane synoviale et interagissent localement avec les macrophages résidents, les CD, les synoviocytes et les ostéoclastes. Dans l'articulation touchée, les cellules T activées activent ensuite à leur tour, les macrophages et les fibroblastes *via* la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-17, IFN- $\gamma$ , et de RANK-L (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand), ligand activateur des ostéoclastes qui sont les cellules responsables de la destruction osseuse (Okamoto and Takayanagi, 2011a). Les lymphocytes T activés fournissent également une aide aux lymphocytes B auto-réactifs entraînant la production d'anticorps anti-protéines citrullinées et du facteur rhumatoïde. Ces auto-anticorps entraînent davantage l'inflammation soit par activation directe des macrophages, soit par le déclenchement de la cascade du complément. L'ensemble des médiateurs pro-inflammatoires et des chimiokines vont également entraîner le recrutement et l'activation des neutrophiles. En effet, représentant plus de 80% des leucocytes infiltrant le liquide synovial, les neutrophiles sont les premières cellules infiltrant l'articulation

(Chen et al., 2006). Leur implication majeure dans la physiopathologie de la PR est supposée depuis longtemps et suggérée expérimentalement par l'absence d'arthrite dans un modèle murin de PR dépourvu de PMN (Wipke and Allen, 2001). Ainsi, il a été montré que les neutrophiles interviennent dans plusieurs manifestations caractéristiques de la PR à savoir la destruction cartilagineuse, les érosions osseuses et la synovite chronique. Les neutrophiles activés libèrent en effet pour cela, des niveaux élevés de FRO, de cytokines et d'agents inflammatoires y compris, les protéases, les phospholipases, les défensines et les myéloperoxydases dans l'articulation ce qui contribue en outre à sa destruction (Chen et al., 2018; O'Neil and Kaplan, 2019). Enfin, les derniers acteurs cellulaires ayant un rôle crucial dans la pathogenèse de la PR sont les monocytes. Leur rôle central dans la maladie sera décrit dans la partie ci-après.

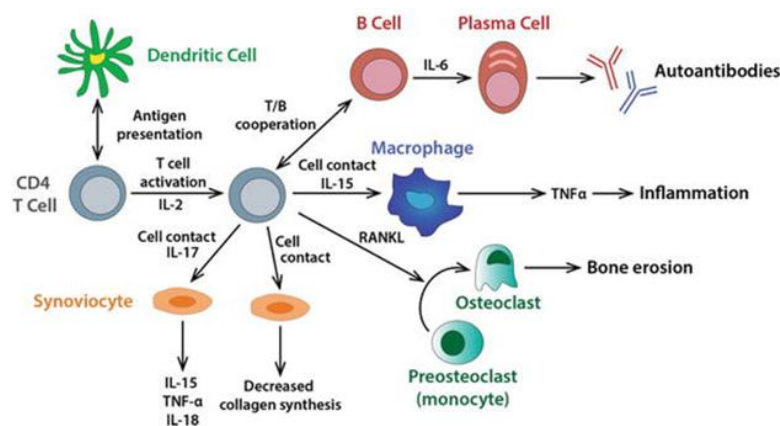


Figure 13 : Coopération des cellules immunitaires dans la pathogenèse de la PR. Les cellules immunitaires principalement impliquées dans la pathogenèse de la PR sont les cellules B, les cellules T, les cellules dendritiques et les monocytes/ macrophages . D'après « Cognitive Decline in Rheumatoid Arthritis: Insight into the Molecular Pathogenetic Mechanisms » Basile et al, Molecular Sciences, 2021.

### III.2. Les monocytes, acteurs pathogéniques dans la polyarthrite rhumatoïde.

Les monocytes sont au cœur de la physiopathologie de l'inflammation. Au cours de la PR, ils sont activés (Torsteinsdóttir et al., 1999) et infiltrent massivement le foyer inflammatoire (Swirski et al., 2009), plus particulièrement la membrane synoviale où ils y produisent du TNFα (Kinne et al., 2007) (Figure 14). Cette observation a permis d'identifier des gènes spécifiques activés dans les monocytes de patients atteints de PR (Stuhlmüller et al., 2000). Par ailleurs, une augmentation des monocytes intermédiaires CD14<sup>high</sup>CD16<sup>high</sup> dans le sang de patients atteints de PR a été mise en évidence (Kawanaka et al., 2002). Cette augmentation du niveau de monocytes intermédiaires et associée à une diminution du niveau de monocytes classiques

(CD14<sup>high</sup> CD16<sup>low</sup>) dans le sang périphérique des patients atteints de PR ce qui reflète du recrutement constant de monocytes classiques dans la synovie enflammée locale afin de favoriser le processus inflammatoire. La sortie des monocytes circulants et leur recrutement vers la membrane synoviale au cours de la PR est médiée par l'interaction entre les chimiokines CCL2 et CX3CL1 avec leur récepteur respectif CCR2 et CX3CR1 présents sur les monocytes (Yano et al., 2007). De plus, l'augmentation du niveau de monocytes intermédiaires et classiques dans la synoviale de la PR suggère leur implication active dans l'inflammation locale (Bas et al., 2004). Une autre preuve quant au rôle important des monocytes dans l'inflammation est le fait qu'il a été montré que la déplétion des monocytes à l'aide d'anticorps spécifiques empêche leur présence dans le pannus et atténue ainsi l'inflammation (Brühl et al., 2007; Thurlings et al., 2009). Les monocytes sont donc des acteurs pathogéniques clés dans la PR. Leur pathogénicité se présente sous différents aspects décrits ci-dessous.

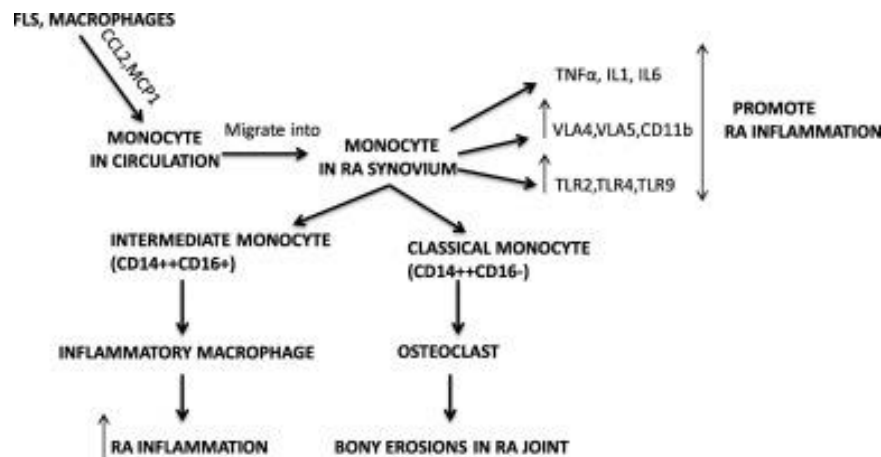


Figure 14 : Implication des monocytes dans la PR. D'après « Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis » Rana et al, International Immunopharmacology, 2018.

### III.2.a. Les monocytes, précurseurs des cellules effectrices dans la PR.

#### III.2.a.i. Les monocytes, précurseurs des ostéoclastes.

L'ostéopénie périarticulaire et les érosions osseuses adjacentes à la formation du pannus des articulations synoviales sont les deux événements les plus destructeurs de la PR qui ont lieu à un stade avancé de la maladie (Rana et al., 2018). Les ostéoclastes sont les seules cellules spécialisées dans la résorption osseuse. En effet, à l'inverse des ostéoblastes, cellules intervenant dans la formation de l'os, les ostéoclastes, eux, sont responsables du catabolisme

osseux (Swales and Sabokbar, 2014). Les monocytes circulants et les macrophages résidents sont les précurseurs des ostéoclastes. Dans la PR, les monocytes sont alimentés en continu au niveau de la membrane synoviale inflammée pour se différencier en ostéoclastes et leur taux de conversion est augmenté en fonction de l'agressivité de la maladie. Des études suggèrent que les monocytes CD14<sup>high</sup> CD16<sup>low</sup> se différencient principalement en ostéoclastes et sont les progéniteurs des ostéoclastes (OCP) ce qui n'est pas le cas des monocytes CD16<sup>high</sup> constituant les groupes de monocytes intermédiaires et monocytes non classiques (Komano et al., 2006). La différenciation des monocytes en ostéoclastes se fait *via* l'interaction RANK- RANKL (Figure 33). Dans la PR, le récepteur RANK est régulé à la hausse à la surface des monocytes et interagit avec le ligand RANKL principalement exprimé par les synoviocytes de type B mais aussi par les ostéoblastes et les cellules T activées (Udagawa et al., 2021). Les synoviocytes de type B synthétisent également du M-CSF qui en se liant à son récepteur c-MFS, agit sur les monocytes en induisant le récepteur RANK et promeut ainsi leur différenciation en ostéoclastes (Nakashima and Takayanagi, 2008). Par ailleurs, les cytokines relarguées par les cellules immunitaires dans la membrane synoviale telles que l'IL-17, le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , ou encore l'IL-6 amplifient le processus de destruction osseuse par les ostéoclastes en stimulant la synthèse de RANKL par les synoviocytes fibroblastiques (Okamoto and Takayanagi, 2011b). Dans le contexte de la PR, il a également été montré que les monocytes présentent une expression régulée à la hausse du récepteur associé aux ostéoclastes nommé OSCAR qui, en interagissant avec les ligands collagène de type I et de type II présents dans le cartilage articulaire dans la membrane synoviale inflammée, facilite encore l'ostéoclastogenèse (Schultz et al., 2016). Une fois différenciés et matures, les ostéoclastes activés libèrent de l'acide chlorhydrique (HCl) entraînant alors la solubilisation du calcium de la matrice osseuse et produisent également des MMP et de la cathepsine K qui dégradent le reste de la matrice osseuse conduisant à des érosions osseuses juxta-articulaires (Väänänen and Laitala-Leinonen, 2008).

### **III.2.a.ii. Les monocytes, précurseurs des macrophages.**

Les monocytes sont des cellules dotées d'une plasticité cellulaire et sont capables de se différencier en macrophages comme détaillé dans la première partie de l'introduction. Dans la PR, bien que les monocytes circulants remplacent une petite fraction des macrophages, un afflux continu de monocytes dans le compartiment synovial a lieu maintenant ainsi l'inflammation synoviale. Le GM-CSF produit par les fibroblastes synoviaux en réponse au TNF- $\alpha$  et à l'IL-1 $\beta$ , favorisent la survie des monocytes dans le liquide synovial plutôt que leur

polarisation en macrophages (Rana et al., 2018). Par ailleurs, alors que les progéniteurs myéloïdes primitifs situés dans le sac vitellin et les cellules souches hématopoïétiques (CSH) du foie fœtal alimentent les macrophages résidents au cours de l'embryogenèse (Gomez Perdiguero et al., 2015), les monocytes circulants, eux, remplissent l'approvisionnement des macrophages inflammatoires au moment de besoins accrus, comme lors de l'inflammation aiguë de la membrane synoviale. La différenciation des monocytes en macrophages dépend de la disponibilité des macrophages dans la membrane synoviale : au début, les macrophages s'auto-renouvellent, puis, lorsque le pool de cellules devient insuffisant, les monocytes circulants se différencient en macrophages (Guilliams and Scott, 2017). Une étude a démontré que parmi les monocytes, le groupe des monocytes intermédiaires sont les monocytes prédominants dans le liquide synovial et sont les principaux sous-ensembles à se différencier en macrophages inflammatoires (M1) au cours de la PR (Amoruso et al., 2016). Une fois différenciés, les macrophages peuvent être activés par les cytokines produites par les cellules T, les fibroblastes et les cellules immunitaires innées, mais aussi par les auto-anticorps tel que le facteur rhumatoïde. Les macrophages activés vont produire de nombreuses cytokines et participer ainsi à la destruction articulaire ou à la résolution de l'inflammation en fonction de leur polarisation. En effet, pour rappel, les deux principaux phénotypes de macrophages humains dérivés des monocytes sont les macrophages M1 « pro-inflammatoires » et les macrophages M2 « anti-inflammatoires ». Les macrophages M1 produisent des niveaux élevés de TNF $\alpha$ , d'IL-1, d'IL-6, d'IL-12, d'IL-23, et de FRO qui ont un impact majeur sur la persistance du processus inflammatoire dans la PR. Les macrophages M2 produisent des niveaux élevés d'IL-10, IL-1Ra, TGF- $\beta$  et participent à la cicatrisation, au remodelage tissulaire ainsi qu'à la réponse anti-inflammatoire. Les deux types de macrophages sont nécessaires pour maintenir une homéostasie cellulaire.

Une fois activé, les macrophages M1 vont participer à la pathogenèse de la PR à différents niveaux (Yang et al., 2020). Ils vont stimuler l'afflux des neutrophiles en sécrétant de l'IL8, cytokine qui favorise le chimiotactisme des polynucléaire neutrophiles (PNN), du TNF $\alpha$ , cytokine qui augmente l'expression des molécules d'adhésion du PNN ainsi que du GM-CSF qui favorise l'extravasation des neutrophiles (Lefkowitz and Lefkowitz, 2001). Par ailleurs, ils vont contribuer à l'action pro-inflammatoire des lymphocytes T à plusieurs niveaux. Les macrophages vont, en effet, exprimer les molécules HLA responsables de la présentation d'antigènes et les molécules CD40, CD80, CD86, responsables de la costimulation des lymphocytes T CD4 (Roberts et al., 2015; Stamp et al., 2009). De plus, L'IL-23 sécrété par les macrophages active les cellules Th17 et l'IL-12 et le TNF $\alpha$  sécrétés par les macrophages

activent les cellules Th1. Ils induisent également la prolifération et l'activation des synoviocytes fibroblastiques en produisant de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$ . Les synoviocytes activés sécrètent RANKL et M-CSF, entraînant la formation et l'activation d'ostéoclastes, qui sont également induites par l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF $\alpha$  sécrétés par les macrophages (Yang et al., 2020). Les macrophages synoviaux produisent un large panel de médiateurs pro-inflammatoires. En effet, ils ont été identifiés comme les principaux producteurs des cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$ . Ce sont également des cellules impliquées dans la production de formes réactives de l'oxygène et de l'azote. L'excès en FRO provoque un stress oxydatif et induit une peroxydation des lipides (Taysi et al., 2002), des dommages oxydatifs de l'ADN (Bashir et al., 1993), une dégradation de la matrice cartilagineuse (Grootveld et al., 1991) et un auto-entretien de l'inflammation (Filippin et al., 2008). Toutefois, l'impact des FRO au cours de la PR semble être double. Cet aspect des FRO et l'implication des cytokines dans la PR seront décrits dans la partie ci-après. Enfin, en dehors de leur rôle actif dans la pathogenèse de la PR, les macrophages sont également impliqués dans la résolution de l'inflammation. En effet, les M2 vont sécréter des médiateurs qui vont intervenir dans différentes étapes de la résolution de l'inflammation. Ils vont libérer par exemple la marésine-1 qui va intervenir dans l'inhibition du recrutement des neutrophiles vers la membrane synoviale, dans la repolarisation des M1 en M2 ainsi que dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse (Serhan et al., 2012). Ainsi, les macrophages jouent un rôle pivot dans la polyarthrite rhumatoïde.

### **III.2.b. Les monocytes, producteurs de médiateurs inflammatoires.**

Les monocytes sont impliqués dans l'installation et le maintien de l'inflammation au niveau des articulations touchées en constituant un réservoir de cellules précurseurs pouvant se différencier en ostéoclastes ou macrophages. De plus, ils participent directement à l'inflammation en sécrétant des chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau du foyer inflammatoire, un large panel de cytokines pro-inflammatoires ainsi que des FRO qui vont provoquer la destruction articulaire.

#### **III.2.b.i. Les monocytes producteurs de cytokines.**

Au cours de la PR, les cellules de l'immunité innée et acquise ainsi que les cellules synoviales résidentes vont générer de nombreuses cytokines qui vont déterminer l'environnement inflammatoire de la membrane synoviale et contribuer à la progression de la maladie. Les cytokines libérées participent à chaque phase de la pathogenèse de la PR et sont des cibles



thérapeutiques pertinentes pour atténuer la progression et l'agressivité de la maladie. Les cytokines impliquées dans la pathogenèse de la PR peuvent être classées en deux ensembles : les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires. Le groupe des cytokines pro-inflammatoires orchestre l'initiation et la progression de l'inflammation synoviale tandis que le groupe des cytokines anti-inflammatoires participent, elles, à la résolution de l'inflammation. Les macrophages/monocytes et les fibroblastes synoviaux produisent des niveaux relativement élevés de cytokines dans la membrane synoviale comparés aux cellules T. En effet, les monocytes, macrophages M1, vont libérer massivement différentes cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-12 qui avec le TNF $\alpha$ , vont favoriser l'inflammation au niveau de la membrane synoviale (Rana et al., 2018). L'IL-1 $\beta$  a un rôle autocrine en activant les monocytes permettant une synthèse accrue de cytokines, ainsi qu'un rôle paracrine en induisant la prolifération des synoviocytes fibroblastiques provoquant la formation du pannus synovial, ainsi qu'en activant les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse. L'IL-1 $\beta$  va également induire la synthèse de MMP, de NO et va inhiber la synthèse de collagène ce qui va promouvoir la dégradation de l'articulation (Gabay, 2000). L'IL-6 favorise une inflammation chronique caractérisée par une infiltration articulaire avec des cellules immunitaires activées *via* la stimulation de la production de chimiokines. Il agit également sur les lymphocytes B en stimulant la production d'auto-anticorps (Assier et al., 2010). La preuve du rôle crucial de l'IL-6 dans la pathogenèse de la PR est fournie avec l'utilisation du tocilizumab, un anticorps monoclonal humanisé spécifique du récepteur de l'IL-6, en tant que traitement de la PR. Cet anticorps a montré en effet, une amélioration significative de l'activité de la maladie avec chez certains patients une rémission de leur maladie (Yokota et al., 2008). L'IL-12 induit la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  par les NK, et contribue également aux symptômes de la PR. Cette cytokine stimule l'infiltration des macrophages vers la membrane synoviale chez les patients atteints de PR. Une étude *in vivo* a montré que l'administration d'IL-12 diminue la sévérité de la maladie dans un modèle animal de PR (Leonard et al., 1997). Par ailleurs, le blocage de l'IL-12 au cours de l'arthrite induite par le collagène atténue également nettement la sévérité de l'arthrite (Malfait et al., 1998). Le TNF $\alpha$  est le prototype des cytokines pro-inflammatoires dans la PR. Son impact dans la PR est illustré par l'utilisation des anti-TNF dans le traitement contre la PR. Les différents rôles du TNF $\alpha$  dans la pathogenèse de la PR seront exposés dans la prochaine partie. Hormis les cytokines pro-inflammatoires, au cours de la PR, les monocytes produisent également des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 ou encore l'antagoniste du

récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra), qui atténue l'inflammation (Lopa et al., 2015). Cependant, l'inflammation chronique dans la PR est si importante que la quantité d'IL-10 produite dans la membrane synoviale est insuffisante pour supprimer le processus inflammatoire en cours. Les rôles de l'IL-10 ainsi que sa voie de signalisation seront présentés ultérieurement.

### **III.2.b.ii. Les monocytes producteurs des FRO.**

La production de formes réactives de l'oxygène (FRO) participe à la physiopathologie de la PR (Mateen et al., 2016; McInnes et al., 1996). Les FRO sont générés principalement par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles *via* le complexe NADPH oxydase 2. L'accumulation des FRO dans les cellules va provoquer un stress oxydatif et va endommager différentes macromolécules biologiques. En effet, les FRO vont avoir comme cibles les lipides et vont induire une peroxydation lipidique entraînant des dommages au niveau de la membrane cellulaire (Hitchon and El-Gabalawy, 2004). Les FRO entraînent également une oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) qui s'accumulent sous l'intima vasculaire où ils sont ensuite phagocytés par les monocytes (Winyard et al., 1993). Par ce mécanisme, les FRO participent à l'accélération de l'athérosclérose qui constitue la première cause de mortalité dans la PR (del Rincón and Escalante, 2003). Le stress oxydatif peut aussi entraver le mécanisme de réparation de l'ADN ou endommager directement l'ADN en provoquant une mutation des bases nucléiques ou en cassant un brin d'ADN. Les produits issus de l'oxydation des bases nucléiques sont, dans leur nature, cytotoxiques et mutagènes. Il a été démontré que les patients atteints de PR possèdent un taux augmenté de 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) résultant de l'oxydation de la désoxyguanosine par le radical hydroxyle dans leur sérum. Il a été également démontré que les tissus des patients atteints de PR présentent des microsatellites instables impliqués dans la progression de la mutagenèse (Hajizadeh et al., 2003). Dans des conditions physiologiques, des systèmes de réparation corrigent ce type de mutagenèse, systèmes défectueux dans la PR. Les FRO altèrent également directement au cartilage en détériorant les composants de la matrice extra-cellulaire (MEC) tels que les protéoglycanes ainsi qu'en inhibant la synthèse de collagène de type II et la sulfatation des glycosaminoglycanes (Henrotin et al., 2003). Ils engendrent la dépolymérisation de l'acide hyaluronique en fragments aux propriétés pro-inflammatoires susceptibles de stimuler les récepteurs de l'immunité innée TLR-2 et de promouvoir ainsi une réponse inflammatoire (Rees et al., 2004). Ces fragments sont ainsi assimilables à de véritables signaux de danger (DAMPs) à l'instar des polysaccharides bactériens et des nucléotides viraux (Matzinger, 2002). Par ailleurs, il a été montré que les FRO

perturbent l'association des chondrocytes avec la MEC et que l'oxydation des chondrocytes entraînent leur apoptose (Phull et al., 2016). De plus, le stress oxydatif active et régule à la hausse les MMP, protéases impliquées dans l'endommagement de la MEC.

Les FRO participent ainsi activement à la pathogenèse de la PR. Toutefois, l'impact des FRO au cours de la PR semble être double. En effet, comme dis précédemment, les FRO sont connues comme étant des seconds messagers et jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire. Un certain nombre d'études ont démontré l'interrelation des FRO avec la voie de signalisation NF-kB. NF-kB est un groupe de facteurs de transcription crucial impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires telles que la réponse inflammatoire, la différenciation, la prolifération, l'adhésion cellulaire, l'apoptose et la sénescence. La dérégulation de NF-kB est impliquée dans différentes maladies, y compris l'inflammation, l'arthrite, l'asthme, et le cancer (Baldwin, 2012). Les FRO ont un impact significatif sur l'activation de la voie NF-kB *via* la diminution de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Par la suite, l'une des voies NF-kB induit l'expression des protéines antioxydantes, notamment GPx, MT3, GST-pi, Mn-SOD et Cu-Zn-SOD et régule ainsi les niveaux de FRO (Phull et al., 2018). Il a été également montré dans une étude, que chez les souris mutées dans les macrophages au niveau de la p47phox, la reconstitution de NOX2 avec une capacité de production de FRO normale est suffisante pour protéger les souris de la PR. L'approfondissement de cette étude a permis de conclure, chez l'Homme, que les macrophages induisent les lymphocytes T régulateurs de manière FRO-dépendante (Kraaij et al., 2010). Ainsi, les FRO produits par les monocytes et les autres phagocytes jouent un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme mais une dérégulation de cette production devient délétère et conduit à des pathologies inflammatoires.

## IV. Le TNF $\alpha$ et l'interleukine-10 (IL-10), deux acteurs majeurs dans la polyarthrite rhumatoïde.

Un grand nombre de cytokines sont présentes dans les articulations des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Il est désormais clair que ces cytokines jouent un rôle fondamental dans les processus qui provoquent l'inflammation, la destruction articulaire et les comorbidités associées à la PR. Il existe dans la PR un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires en faveur d'une installation d'une inflammation chronique. Parmi les cytokines pro-inflammatoires présentes, le TNF $\alpha$  est la cytokine la plus importante de la cascade de régulation de la production d'autres cytokines pro-inflammatoires dans le tissu synovial rhumatoïde. Le TNF $\alpha$  est principalement produit par les monocytes et macrophages activés, mais il est également exprimé par les neutrophiles, les cellules NK, les cellules endothéliales et les lymphocytes activés. L'IL-10, est, elle, une cytokine anti-inflammatoire produite de façon constitutionnelle dans la synoviale rhumatoïde. Elle agit comme suppresseur naturel de la production de cytokines pro-inflammatoires en particulier, le TNF $\alpha$  et l'IL-1. Nous présenterons dans cette dernière partie la signalisation de ces deux cytokines, ainsi que leurs actions dans la polyarthrite rhumatoïde.

### IV.1. Signalisation intracellulaire et rôles physiologiques du TNF $\alpha$ et de l'IL-10.

#### IV.1.a. Le TNF $\alpha$ .

Le facteur de nécrose tumoral  $\alpha$ , dit TNF $\alpha$ , a été isolé en 1975 par *Carswell et al.* sous forme d'un facteur soluble libéré par les cellules de l'hôte et capable de provoquer la nécrose d'une tumeur transplantée, la « sarcome Meth A » (Carswell et al., 1975). Il est principalement généré par les monocytes et les macrophages. Cependant, d'autres cellules telles que certains sous-ensembles de lymphocytes T, de cellules NK, de cellules dendritiques, de lymphocytes B, de cardiomyocytes, de fibroblastes et d'astrocytes produisent également cette cytokine à un faible niveau. Le facteur de nécrose tumorale est une protéine transmembranaire de type II. Il existe sous une forme liée à la membrane (mTNF $\alpha$ ) avec un poids moléculaire relatif de 26 kDa. Le mTNF $\alpha$  peut être transformé en TNF $\alpha$  soluble de 17 kDa (sTNF $\alpha$ ) par l'action de la métalloprotéinase matricielle connue sous le nom d'enzyme de conversion du TNF $\alpha$  (TACE :

ADAM17) (Luettig et al., 1989). Le sTNF $\alpha$  circule dans tout le corps et confère au TNF $\alpha$  sa puissante fonction endocrinienne, loin du site de sa synthèse. Le sTNF $\alpha$  et le mTNF $\alpha$  sont tous deux biologiquement actifs sous forme homotrimerique. La cytokine exerce ses fonctions *via* deux récepteurs spécifiques : le TNFR1 appelé aussi p55 présent sur de nombreuses cellules, et le TNFR2 appelé aussi p75 dont l'expression se limite principalement aux cellules de la lignée hématopoïétique (Monaco et al., 2015). Chaque récepteur a un domaine extracellulaire caractéristique, un segment transmembranaire et un domaine intracellulaire. Les domaines extracellulaires des deux récepteurs ont un motif similaire riche en cystéine qui est répété deux à six fois, sont actifs en tant qu'homodimères mais, ne forment pas d'hétérodimères TNFR1/TNFR2 (Naismith et al., 1995). Toutefois, les segments intracellulaires de TNFR1 et TNFR2 ne portent pas de séquences homologues et activent des voies de signalisation distinctes (Yang et al., 2018) (Figure 15).

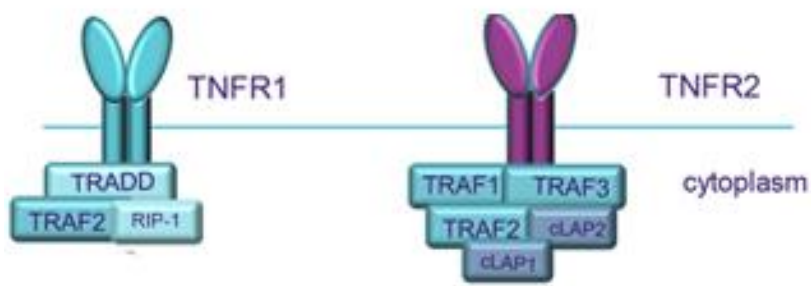


Figure 15 : Récepteurs du TNF $\alpha$ . D'après « Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications », Yang et al, Frontiers in immunology, 2018.

La liaison du TNF $\alpha$  au TNFR1 active deux voies de signalisation différentes aboutissant respectivement : 1) au maintien de la survie cellulaire et la promotion de l'expression des cytokines inflammatoires 2) à l'apoptose et la nécrose cellulaire. L'équilibre entre ces deux voies dépend de nombreux facteurs tels que le type cellulaire, le microenvironnement intracellulaire ou extracellulaire, la concentration de protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) ou le niveau d'expression de NF- $\kappa$ B (Waetzig et al., 2005). Lorsque le TNF $\alpha$  se lie au TNFR1, les domaines intracellulaires interagissent avec la protéine du domaine de la mort associée au TNFR de type 1 (TRADD), qui recrute la kinase RIP-1 et le facteur 2 associé au récepteur du TNF (TRAF-2) pour former le complexe de signal I (Bradley, 2008). Ce complexe, une fois formé, peut déclencher NF- $\kappa$ B, qui initie les transcriptions de nombreux gènes différents, y compris ceux

associés à la survie cellulaire, à la production de cytokines inflammatoires et aux voies anti-apoptotiques (Bonizzi and Karin, 2004). Le complexe est également capable d'activer les MAP kinases (MAPK) régulées par les signaux extracellulaires, la 38 MAP kinase p38 activée par le stress, et la kinase c-Jun N-terminale (JNK), et ERK 1/2, qui sont importantes pour AP-1, promoteur important de l'inflammation (Sabio and Davis, 2014).

Lorsque le TNF $\alpha$  se lie au TNFR2, les domaines intracellulaires recrutent les complexes cytoplasmiques TRAF-2–cIAP-1–cIAP-2 existants. cIAP peut exercer une activité ubiquitine-ligase et peut inhiber les caspases et d'autres facteurs induisant l'apoptose, entraînant l'activation de la voie canonique et non canonique de NF- $\kappa$ B (Naudé et al., 2011). L'interaction du TNF $\alpha$  avec le TNFR2 active également la voie PI3K/Akt. Cette voie non seulement maintient la survie et améliore la prolifération (Fischer et al., 2011), mais recrute également Etk pour former le complexe TNFR2-Etk-VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) qui participe à l'adhésion cellulaire, à la migration, à la survie et à la prolifération cellulaire (Zhou et al., 2008).

Le TNF $\alpha$  est impliqué dans de multiples fonctions biologiques. L'un de ses rôles biologiques majeurs est la défense de l'hôte contre les infections bactériennes, virales et parasitaires. En effet, le TNF $\alpha$  est important pour la réponse défensive contre l'infection mais, une production inappropriée ou excessive peut être nocive. L'importance du TNF $\alpha$  en tant que modulateur de la réponse de l'hôte à l'infection a été confirmée par des études utilisant des souris déficientes en récepteurs de TNF $\alpha$ . Les souris déficientes en TNF-R1 sont résistantes aux doses létales de lipopolysaccharides ou d'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*, mais ont un défaut de clairance des bactéries intracellulaires tel que *Listeria monocytogenes* et succombent facilement à cette infection (Sonje et al., 2010).

Le TNF $\alpha$  est aussi impliqué dans d'autres fonctions biologiques. Ainsi, il module la croissance, la différenciation, le métabolisme et l'activation d'une grande variété de cellules. Il a été en effet montré que l'activation des lymphocytes B est induite par le TNF $\alpha$  transmembranaire exprimé sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés par le HTLV de type I (HTLV-I) et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> transformés par le virus de l'herpès (Del Prete et al., 1994; Higuchi et al., 1997). Le TNF $\alpha$  possède également un rôle anti-oxydant dans des conditions physiologiques. En effet, il est capable d'activer la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Blaser et al., 2016) entraînant ainsi la transcription de gènes anti-apoptotiques et de gènes impliqués dans la neutralisation des FRO d'origine mitochondriale tels que la catalase et les superoxyde dismutases (SOD) (Han et al., 2009). Enfin et surtout, le TNF $\alpha$  est à l'origine de l'inflammation. Avec l'IL-1, il s'agit

d'un puissant inducteur de la réponse inflammatoire et joue un rôle régulateur clé dans l'immunité innée. Les médiateurs induits par l'action du TNF $\alpha$  sont très nombreux. Citons par exemple les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-1-Ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , RANK-L (Arend and Gabay, 2004). Le TNF $\alpha$  joue également un rôle important dans la production des FRO. En effet, il s'agit d'un puissant agent primant de la NADPH oxydase 2 (Dang et al., 2006) et permet ainsi la production de FRO et la défense de l'organisme face aux agents pathogènes. Ainsi, le TNF $\alpha$  est un régulateur prépondérant de la survie et de la mort cellulaire, et étant donné qu'il intervient dans de nombreuses voies intracellulaires contrôlant l'immunité et l'inflammation, son action doit être contrebalancé pour éviter le basculement vers des situations pathologiques.

#### **IV.1.b. L'IL-10.**

L'interleukine-10 (IL-10), est une cytokine pléiotrope dotée d'importantes fonctions immuno-régulatrices. L'IL-10 est produite par de nombreux types cellulaires parmi lesquels ont été identifiés les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules dendritiques, et les lymphocytes B (Saraiva and O'Garra, 2010; Verma et al., 2016). Cette cytokine existe sous la forme d'un homodimère de 36 kDa composé de deux monomères liés de manière non covalente, chacun avec une longueur de 160 acides aminés (Zdanov, 2010). Deux ponts disulfures existent entre les monomères, qui sont nécessaires à leur activité biologique et au maintien de l'intégrité structurale (Windsor et al., 1993). L'IL-10 se lie à son récepteur tétramérique, qui se compose de deux sous-unités IL-10R $\alpha$  (récepteur de haute affinité) et de deux sous-unités IL-10R $\beta$  (récepteur de basse affinité). La sous-unité IL-10R $\alpha$  (ou IL10-R1) est connu comme étant la sous-unité de liaison au ligand tandis que l'IL-10R $\beta$  (ou IL-10R2) est connue comme étant la sous-unité de signalisation du complexe IL-10R et est exprimée de manière constitutive dans la plupart des types cellulaires (Liu et al., 1994). Des études antérieures ont suggéré que l'IL-10R $\beta$  n'a pratiquement aucun rôle dans la liaison à l'IL-10 ; son rôle principal étant de recruter les kinases de signalisation en aval (Kotenko et al., 1997). Cependant, des études plus récentes ont montré que lors de la liaison à IL-10, IL-10R $\alpha$  induit un changement de conformation de l'IL-10R $\beta$ , permettant à l'IL-10R $\beta$  de lier également l'IL-10 (Yoon et al., 2006). Il a été ainsi montré que la liaison de l'IL-10 à son récepteur se fait en deux étapes. Au cours de la première étape, l'IL-10 se lie symétriquement aux deux chaînes IL-10R $\alpha$ . Cette première interaction crée la formation de sites de coopération entre le complexe IL-10/IL-10R $\alpha$ /IL-10R $\beta$  (Pletnev et al.,

2005). Contrairement à l'IL-10R $\alpha$ , qui est spécifique de l'IL-10, la sous-unité IL-10R $\beta$  est partagée par les récepteurs d'autres cytokines, notamment l'IL-22, l'IL-26 et l'INF- $\lambda$  (Shouval et al., 2014). Une fois le complexe IL-10/IL-10R $\alpha$ /IL-10R $\beta$  assemblé, les tyrosine kinases Jak1 et Tyk2 qui sont constitutivement et respectivement associées à IL-10R $\alpha$  et IL-10R $\beta$ , sont activées et phosphorylent des résidus tyrosine spécifiques dans le domaine intracellulaire d'IL-10R $\alpha$  au niveau des Tyr446 et Tyr 496 (Weber-Nordt et al., 1996). La phosphorylation du récepteur conduit au recrutement du facteur de transcription STAT3. Après son recrutement, JAK1 et TYK2 phosphorylent STAT3, sur un résidu tyrosine critique la tyrosine 705 (Y705) ce qui déclenche sa dimérisation et sa translocation vers le noyau (Yoshimura et al., 2007) (Figure 16).

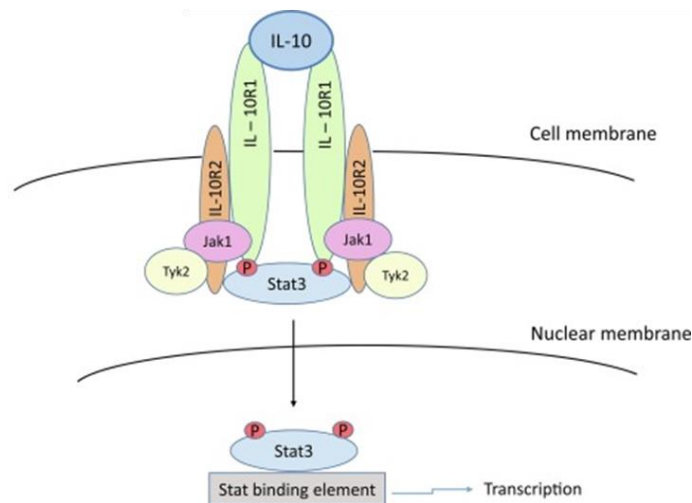


Figure 16 : Structure du récepteur de l'IL-10. Le récepteur IL-10 est un hétérodimère composé de sous-unités appelées IL-10R1 ou IL-10R $\alpha$  et IL-10R2 ou IL-10R $\beta$ ). Le récepteur interagit avec les membres de la famille JAK, en particulier JAK1 et la tyrosine kinase 2. La liaison de l'IL-10 déclenche la phosphorylation de la tyrosine et l'activation des facteurs de transcription STAT3. D'après « Cytokines and Inflammatory Response in the Fetus and Neonate », Srinivasan et al, Fetal and Neonatal Physiology, 2017.

En plus de la phosphorylation de la tyrosine 705, STAT3 peut être également activé par phosphorylation au niveau de la sérine 727 (S727) (Tkach et al., 2013). Une fois dans le noyau, STAT3 va se lier sur des promoteurs de gènes sensibles à l'IL10 tels que BCL1, MAD, PTP1B et induire leur transcription (Antoniv and Ivashkiv, 2006). STAT3 induit également l'expression de SOCS3 (Suppressor of cytokines signaling 3). Les protéines SOCS3 empêchent la kinase JAK d'activer STAT3 par des interactions directes et indirectes avec les domaines tyrosine kinase SH2 (Alexander and Hilton, 2004). À ce jour, la famille de protéines SOCS comprend



huit membres et SOCS3 semble être l'inhibiteur le plus spécifique de la voie de signalisation STAT3. Or, l'IL10 (anti-inflammatoire) et l'IL6 (pro-inflammatoire) utilisent toutes deux STAT3 pour transduire leur signalisation. Toutefois, le rôle inhibiteur de SOCS3 semble être limité à l'IL-6. Ce résultat s'explique par le fait que SOCS3 se lie au récepteur de l'IL-6 au niveau de la gp130 mais n'interagit pas avec les motifs tyrosines phosphorylées du récepteur de l'IL-10 (Niemand et al., 2003). Les protéines PIAS (protein inhibitor of activated STAT3) exercent également une régulation de STAT3. Contrairement aux molécules SOCS, les protéines PIAS sont des facteurs nucléaires. Ils régulent négativement l'activité transcriptionnelle de STAT par plusieurs mécanismes, notamment en interagissant et en bloquant ainsi l'activité de liaison à l'ADN (Shuai and Liu, 2005). D'autres modes de régulation de STAT3 impliquant de nombreuses phosphatases ont été décrits, telles que PTEN, CD45, SHP-1 et SHP-2 (Irie-Sasaki et al., 2001; Kim et al., 2018; Migone et al., 1998; Schaper et al., 1998; Sun and Steinberg, 2002). De plus, des kinases telle que la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) peut également réguler la phosphorylation de STAT3 de manière différente, selon le modèle cellulaire. Ainsi, la voie STAT3 est inhibée par PI3K dans les cellules de mélanome, alors qu'elle est activée dans les papillomes laryngés ou dans les cellules souches du cancer du sein (Krasilnikov et al., 2003; Zhou et al., 2007).

L'IL-10 va, à travers sa signalisation exercer différentes fonctions biologiques anti-inflammatoires. En effet, l'IL-10 agit en diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires par différentes cellules immunitaires. En effet, dans les monocytes et les macrophages activés, l'IL-10 inhibe la sécrétion des cytokines telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, le GM-CSF, ou encore le M-CSF (macrophage colony stimulating factor) (Moore et al., 2001). Cette cytokine agit également sur les cellules dendritiques en inhibant la production d'IL-12 (Taga et al., 1993) et sur les lymphocytes T auxiliaires en inhibant la production d'IL-2 et d'IL-5 (Schandené et al., 1994). L'IL-10 diminue aussi la production des cytokines TNF $\alpha$ , GM-CSF, et IL-8 par les polynucléaires éosinophiles activés par le LPS (Takanaski et al., 1994). Elle inhibe également la production de l'IL-12 par les cellules dendritiques (Taga et al., 1993) ainsi que la synthèse de IL-2 et de l'IL-5 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Schandené et al., 1994). Il en est de même pour les neutrophiles, où des études ont montré que l'IL-10 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS, LPS+INF- $\gamma$  et TNF $\alpha$  (Cassatella et al., 1993). Hormis les cytokines pro-inflammatoires, l'IL-10 exerce sa fonction de suppression de l'inflammation en inhibant la production d'autres médiateurs inflammatoires. En effet, l'IL-10 diminue le recrutement des cellules immunitaires vers le foyer inflammatoire

en inhibant la production monocyttaire de chémokines telles que MIP-1, et MIP-2 (MIP : macrophage inflammatory protein) (Sherry et al., 1998). Par ailleurs, l'IL-10 induit la production de molécules anti-inflammatoires telles que l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA) et les antagonistes du récepteur du TNF (p55 et p75) (Hart et al., 1996) ce qui va les empêcher d'exercer leur fonction pro-inflammatoire. L'IL-10 inhibe également l'expression de la cyclooxygénase 2 ainsi que la production de la prostaglandine E2 par les monocytes et les macrophages (Niironen et al., 1995) ainsi que la synthèse de métalloprotéinases matricielles (MMP9 et MMP1) (Mostafa Mtairag et al., 2001) ce qui module l'interaction monocytes/cellules endothéliales. L'IL-10 peut également inhiber la phagocytose et la destruction des agents pathogènes en limitant la production par les macrophages de formes réactives de l'oxygène et de l'azote en réponse à l'IFN- $\gamma$  (Gazzinelli et al., 1992; Redpath et al., 2001). Elle agit également sur les neutrophiles en inhibant la production des FRO en agissant sur le priming induit par le GM-CSF via une diminution de l'activité ERK1/2 (Dang et al., 2006).

## **IV.2. Le TNF $\alpha$ et l'IL-10 dans la polyarthrite rhumatoïde.**

### **IV.2.a. Place du TNF $\alpha$ dans la PR.**

Le TNF $\alpha$  joue un rôle clé dans la PR comme en témoigne sa forte présence dans les liquides synoviaux des patients arthritiques. Les études ont en effet montré des taux élevés de TNF $\alpha$  dans environ 50 % des liquides synoviaux et sérums des patients atteints de PR, principalement au cours des formes les plus sévères (Alvaro-Gracia et al., 1991). Les types cellulaires contenant du TNF $\alpha$  sont les cellules du pannus, les monocytes et macrophages, les cellules bordantes, les cellules profondes et plus particulièrement les jonctions synoviale-cartilage, à proximité des destructions cartilagineuses (Chu et al., 1991). De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré le rôle dominant du TNF $\alpha$  dans la physiopathologie de la PR. La figure 17 illustre les activités biologiques du TNF $\alpha$ , qui est principalement produit par les macrophages activés de la membrane synoviale de patients atteints de PR. Les actions du TNF $\alpha$  qui sont importantes dans la pathogénèse de la PR incluent sa faculté à induire la production de nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF. Il a été en effet observé dans des cultures de cellules synoviales de patients atteints de PR, que le blocage du TNF $\alpha$  avec des anticorps neutralisants réduit significativement la production de ces cytokines (Butler et al., 1995). Le TNF $\alpha$  est également réputé pour sa capacité à induire la sécrétion de

chimiokines telles que le CXCL8, CCL2 et CCL5 qui participent au recrutement des leucocytes sanguins vers le tissu synovial inflammé (Koch, 2005). Les cellules immunitaires recrutées vont produire du TNF $\alpha$  supplémentaire, ce qui entraîne un rétrocontrôle positif et une inflammation accrue. Il facilite aussi l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium en stimulant l'expression d'intégrines clés et de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 et la selectin-E (Ende et al., 2014). Par ailleurs, le TNF $\alpha$  stimule la pathogenèse de la PR en favorisant la différenciation des cellules dendritiques et la présentation d'auto-antigènes aux cellules T dans la synoviale des patients atteints de PR (Sarkar and Fox, 2005; Zou and Tam, 2002). Le TNF $\alpha$  est également incriminé dans l'angiogenèse pathologique au cours de la PR car il a été montré que l'inhibition du TNF $\alpha$  est associée à une régulation négative de la synthèse du facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF et à la suppression de néovascularisation (Paleolog, 2002). Un autre rôle important du TNF $\alpha$  dans le développement de la PR est de stimuler le développement, l'activation et le recrutement des ostéoclastes en induisant l'expression de la cytokine RANKL par les cellules stromales de la moelle osseuse (Zhang et al., 2001). La liaison de RANKL à son récepteur RANK provoque l'activation des ostéoclastes et donc la destruction osseuse. Il provoque également la destruction du cartilage en stimulant la production d'enzymes dégradant la matrice de type MMP (Vandooren et al., 2004), et la sécrétion de Dickkopf homologue-1, qui agit comme un inhibiteur de Wnt et bloque la formation d'os et de cartilage (Diarra et al., 2007) (Figure 17).

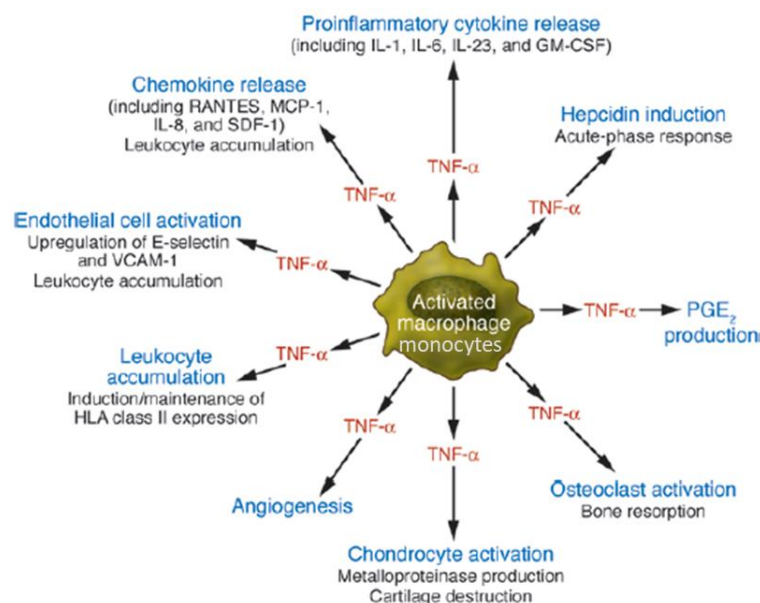


Figure 17 : Rôles du TNF $\alpha$  dans la PR. D'après « Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis », Brennan et al, The Journal of Clinical Investigation, 2008.

Enfin, il a été montré *in vivo*, que l'injection de TNF $\alpha$  accélère le début et augmente la sévérité des arthrites dans un modèle d'arthrite au collagène chez la souris DBA/1 (Müssener et al., 1997). De plus, le traitement préventif des souris par un anticorps monoclonal anti-TNF $\alpha$  diminue la sévérité de la maladie induite par l'injection du collagène (Williams et al., 1992). Ainsi le TNF $\alpha$  est un acteur primordial dans la PR comme en témoigne la mise sur le marché de cinq anti-TNF pour le traitement de cette pathologie (Edwards, 2005; Schett and Gravallese, 2012). Cependant, en raison du taux élevé de non-répondeurs au traitement anti-TNF (environ un tiers des patients), des médicaments sont en cours de développement ciblant soit des éléments précis de la signalisation (kinases, phosphatases etc...) soit d'autres cytokines ou chimiokines.

### **III.2.b. Place de l'IL-10 dans la PR.**

Dans la membrane synoviale de la PR, une réponse anti-inflammatoire compensatrice se développe et implique, le récepteur IL-1 (IL-1Ra), les récepteurs solubles du TNF $\alpha$  p55 et p75 (sTNFR), en plus des cytokines TGF- $\beta$ , IL-4, et l'IL-10. (Vervoordeldonk and Tak, 2002). L'IL-10 est présente dans la membrane synoviale et dans le liquide synovial au cours de la PR (Cicutini et al., 1995). En effet, le liquide synovial de patients atteints de PR contient des niveaux détectables d'IL-10 au niveau de l'ARNm et de la protéine (Cush et al., 1995; Isomaki et al., 1996). Comme mentionné précédemment, elle est produite par les monocytes, les macrophages ainsi que par les cellules B et T activées (Verma et al., 2016). L'augmentation de l'IL-10 au cours de l'inflammation aiguë a pour rôle de contrôler le degré d'inflammation et d'arrêter le processus inflammatoire. Dans de nombreuses inflammations aiguës, ce mécanisme suffit à inhiber l'inflammation. Cependant, en cas d'activation chronique du système immunitaire, l'IL-10 fonctionne insuffisamment, car une stimulation constante submerge les activités anti-inflammatoires de la cytokine. Par ailleurs, les inflammations chroniques sont caractérisées par un déséquilibre de la balance cytokinique en faveur des cytokines pro-inflammatoires. Les cytokines anti-inflammatoires deviennent alors incapables de contrer l'action des cytokines pro-inflammatoires présentes en excès. Dans la PR, l'IL10 agit pour freiner la réponse inflammatoire. En effet, une étude a montré que la neutralisation de l'IL-10 endogène dans des cultures de membrane synoviale issu de patients RA entraîne une augmentation de la production de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (Katsikis et al., 1994). Par ailleurs, il a été

observé que l'ajout d'IL-10 aux cellules de la synoviale en culture inhibe également la production d'IL-8, G-CSF, et GM-CSF ainsi que l'expression de HLA-DR, ICAM-1 et VCAM-1 induite par l'IFN- $\gamma$  (Kawakami et al., 1997). Ces résultats mettent en évidence la présence d'un réseau complexe de cytokines étroitement régulé dans lequel l'IL-10 permet d'atténuer l'inflammation synoviale. L'IL10 est également le produit des cellules T synoviales. La plupart des cellules T clonées isolées de l'articulation rhumatoïde présentent un phénotype de type T helper (Th1) et produisent de l'IL-10 en réponse à une stimulation par des facteurs mitogènes ou facteurs de croissance (Cohen et al., 1995). Une autre étude a démontré la capacité de l'IL-10 à inhiber l'expression de NLRP3 et de certains composants de l'inflammasome dans la membrane synoviale. En effet, la neutralisation de la signalisation du récepteur de d'IL-10 chez les souris WT augmente l'expression synoviale de *Nlrp3* et de *Casp1*. Cette même étude a mis en évidence l'implication de l'inflammasome dans l'ostéoclastogenèse. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle de l'IL-10 et de l'inflammasome dans contrôle de l'ostéoclastogenèse et de l'érosion osseuse (Greenhill et al., 2014). Etant donné ses propriétés anti-inflammatoires, l'IL-10 a été envisagé comme outil thérapeutique potentiel dans le cadre de la PR. Cependant, les essais thérapeutiques visant à traiter la maladie par l'administration d'IL-10 recombinante chez l'Homme n'ont montré qu'une faible efficacité (Clair, 1999). En effet, il a été observé au contraire que l'administration d'IL-10 recombinante augmente l'expression de Fc $\gamma$ R sur les monocytes rendant les monocytes plus sensibles aux complexes immuns, ce qui entraîne une augmentation de la production de TNF- $\alpha$ . De ce fait, de manière paradoxale, l'IL-10 peut augmenter le potentiel pro-inflammatoire des monocytes, contrecarrant ses propres effets anti-inflammatoires (Roon et al., 2003).

## OBJECTIF

Comme il a été décrit dans la dernière partie de ce manuscrit, l'IL-10, malgré ses propriétés anti-inflammatoires n'est pas un outil thérapeutique efficace pour la résolution de l'inflammation dans les maladies inflammatoire et notamment la polyarthrite rhumatoïde. Dans ce contexte nous avons émis l'hypothèse que la voie de signalisation de l'IL-10 pourrait être altérée par l'action d'un facteur pro-inflammatoire présent au niveau du foyer inflammatoire (ou site enflammé). L'objectif de ma thèse était donc de déterminer si le  $\text{TNF}\alpha$ , pouvait altérer la signalisation de l'IL-10 dans les monocytes humains, qui sont des acteurs centraux de la PR. J'ai axé mon travail sur le  $\text{TNF}\alpha$  car il s'agit d'une cytokine pro-inflammatoire abondamment exprimée dans le liquide synovial, qui possède un rôle prépondérant dans la pathogenèse de la PR, et dont l'importance est illustrée avec l'utilisation des anti-TNF en tant que traitement de la PR. J'ai ensuite déterminé les mécanismes sous-jacents, en me focalisant sur un rôle potentiel des FRO issus de NOX2 qui peuvent altérer la signalisation intracellulaire en oxydant les effecteurs de la signalisation.

## RESULTATS

L'IL-10, cytokine dotée d'une forte action immunosuppressive n'est pas efficace dans le traitement de la PR (Clair, 1999; Roon et al., 2003). Nous avons émis l'hypothèse que son action pouvait être empêchée par la présence d'une cytokine pro-inflammatoire telle que le TNF $\alpha$ , cytokine majeure dans la PR, qui pourrait interférer avec sa voie de signalisation.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps analysé les voies de signalisation induites par le TNF $\alpha$  et l'IL-10, seuls ou en combinaison, dans les monocytes humains. Nos résultats montrent que, le TNF $\alpha$  interfère avec la signalisation de l'IL-10 en induisant une déphosphorylation rapide de STAT3. Cette déphosphorylation de STAT3 se traduit par une diminution de la capacité de l'IL-10 à induire l'expression de SOCS3, facteur anti-inflammatoire majeur. Nous avons démontré l'implication d'une tyrosine phosphatase de type SHP1 dans la déphosphorylation de STAT3 dont l'activation est induite par le TNF $\alpha$ . Cette activation de SHP1 par le TNF $\alpha$  est dépendante de NOX2. En effet, l'utilisation du diphenylène iodonium (DP1), inhibiteur de la NADPH Oxydase, inhibe à la fois la production des FRO, l'activation de SHP1 et la déphosphorylation de STAT3 induites par le TNF $\alpha$ . Par ailleurs, nous avons montré que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reproduit l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur la signalisation de l'IL-10, en induisant l'activation de SHP1 et la déphosphorylation de STAT3. Nous avons également démontré que l'activation de SHP1 par les FRO dans les monocytes stimulés par le TNF $\alpha$  est médié par la tyrosine kinase Lyn connue pour être régulée par oxydation en utilisant un inhibiteur sélectif de Lyn, le bafetinib. De manière intéressante, nous avons constaté que l'inhibition de la voie de signalisation de l'IL-10 est spécifique au TNF $\alpha$  car d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels que le GM-CSF ou le LPS n'affectent pas la signalisation de l'IL-10. Enfin, dans un modèle d'arthrite induit par les anticorps anti-collagène chez la souris, le NSC87877, un inhibiteur de SHP1/2, diminue la sévérité de l'arthrite.

L'ensemble de ces résultats révèle que le TNF $\alpha$  inhibe la signalisation de l'IL-10 en induisant la déphosphorylation de STAT3 *via* l'axe NOX2-ROS/Lyn/SHP1 dans les monocytes humains. Ce travail met ainsi en lumière une nouvelle propriété pro-inflammatoire du TNF $\alpha$  à savoir l'exacerbation de l'inflammation en contrant l'action de l'IL-10. Il permet également de comprendre la résistance à l'administration d'IL-10 recombinante dans un contexte inflammatoire et suggère une thérapie couplée à l'utilisation d'anti-TNF pour obtenir des effets immunosuppresseurs de l'IL-10 plus élevés. Enfin, l'inhibition de NOX2 ou de SHP1 pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante dans la polyarthrite rhumatoïde.

## ARTICLE

Les résultats de cette étude ont été soumis pour publication sous le titre : « **NOX2-dependent activation of SHP1 mediates the inhibitory activity of TNF $\alpha$  on interleukin-10 signaling in human monocytes and exacerbates experimental arthritis** ».



**NOX2-dependent activation of SHP1 mediates the inhibitory activity of TNF $\alpha$  on interleukin-10 signaling in human monocytes and exacerbates experimental arthritis.**

**Running title:** TNF $\alpha$  hinders IL-10 signaling *via* SHP1 in human monocytes.

Marwa Ben-Khemis<sup>1</sup>, Liu Dan<sup>1</sup>, Coralie Pintard<sup>1</sup>, Margarita Hurtatado-Nedelec<sup>1,2</sup>, Jean-Claude Marie<sup>1</sup>, Jamel El-Benna<sup>1</sup>, and Pham My-Chan Dang<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>INSERM U1149, CNRS ERL8252, Centre de Recherche sur l'Inflammation, Université de Paris, Laboratoire d'Excellence Inflammex, Faculté de Médecine, Site Xavier Bichat, Paris, F-75018, France

<sup>2</sup>Département d'Immunologie et d'Hématologie, UF Dysfonctionnements Immunitaires, HUPNVS, Hôpital Bichat, Paris, France.

**\*Correspondance to :** Dr. Pham My-Chan DANG, INSERM U1149, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, Paris F-75018, France. Tel: 33 1 57 27 74 72, Fax: 33-1 57-27-74-61, E-mail: [my-chan.dang@inserm.fr](mailto:my-chan.dang@inserm.fr)

**ABSTRACT** (244 words)

TNF $\alpha$ -mediated signaling pathways play a pivotal role in the pathogenesis of several chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (RA) by promoting phagocyte inflammatory functions, notably cytokine release and reactive oxygen species (ROS) production by NOX2. In contrast, interleukin-10 (IL-10), a powerful anti-inflammatory cytokine, potently shuts down phagocyte activation, making IL-10 an attractive therapeutic candidate. However, IL-10 therapy has shown limited efficacy in patients with inflammatory diseases. In this study, we show that TNF $\alpha$  can block IL-10 anti-inflammatory pathways in human monocytes, thereby prolonging inflammation. TNF $\alpha$  decreased IL-10-induced phosphorylation of STAT3 and consequently IL-10-induced expression of the major anti-inflammatory factor, SOCS3. Decreased STAT3 phosphorylation was due to a SHP1/2 phosphatase, as NSC-87877, a SHP1/2 inhibitor, restored STAT3 phosphorylation and prevented the inhibition of IL-10 signaling by TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  activated only SHP1 in human monocytes and this activation was NOX2-dependent, as diphenyleneiodonium, a NOX2 inhibitor, suppressed SHP1 activation and STAT3 dephosphorylation triggered by TNF $\alpha$ . ROS-induced activation of SHP1 was mediated by the redox-sensitive kinase, Lyn, as its inhibition impeded TNF $\alpha$ -induced SHP1 activation and STAT3 dephosphorylation. Furthermore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recapitulated TNF $\alpha$ -inhibitory activity on IL-10 signaling. Moreover, NSC-87877 dampened collagen antibody-induced arthritis (CAIA) in mice. These results reveal that TNF $\alpha$  disrupts IL-10 signaling by inducing STAT3 dephosphorylation *via* a NOX2-ROS-Lyn-SHP1 axis in human monocytes and that inhibition of SHP1/2 *in vivo* protects against CAIA. These new findings might explain the poor efficacy of IL-10 therapy in patients with arthritis and might be useful to harness IL-10 for in therapeutic.

## INTRODUCTION

Cytokine-mediated signaling pathways play a pivotal role in the pathogenesis of several chronic inflammatory diseases. Notably, the critical role of TNF $\alpha$  has been indisputably demonstrated by the clinical efficiency of biological therapies targeting this cytokine in rheumatoid arthritis (RA) and inflammatory bowel diseases (IBD) [1]. RA is a severe chronic, inflammatory, autoimmune disease with multifactorial etiology that primarily affects the joints, causing irreversible bone and cartilage destruction [2]. In RA, TNF $\alpha$  holds a dominant hierarchical position in the cytokine network as inhibition of its bioactivity in RA synovial mononuclear cell cultures also inhibited the release of other pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1, IL-6 and GM-CSF [3-5]. Monocytes/macrophages play a central role in the initiation and maintenance of synovial joint inflammation in RA. They massively infiltrate the synovial membranes, and are the major TNF $\alpha$ -producing cells in the inflamed human RA joints [6, 7]. TNF $\alpha$  produced by monocytes/macrophages not only exert paracrine effects but also an autocrine feedback loop that can amplify the inflammatory functions of monocytes, thus influencing disease progression [8]. These functions include production of reactive oxygen species (ROS), release of cytokines and chemokines, adhesion, migration, differentiation and survival [9-12].

The role of ROS in RA immunopathogenesis has been well described and TNF $\alpha$  overproduction is considered as the main inducer of ROS release by the immune cells of RA patients [13]. In monocytes, the major source of ROS is the NADPH oxidase 2 (NOX2), also known as the phagocyte NADPH oxidase. NOX2 is an enzymatic complex that consists of the transmembrane proteins, gp91<sup>PHOX</sup> (renamed NOX2) and p22<sup>PHOX</sup>, and the cytosolic proteins, p47<sup>PHOX</sup>, p67<sup>PHOX</sup> and Rac1, a small G protein. TNF $\alpha$  has been shown to prime ROS generation by NOX2 in monocytes of RA patients [9, 10]. ROS can damage biological molecules within the joint such as proteins, lipids, nucleic acids and matrix components, but

can also function as second messengers regulating several intracellular signaling pathways that may have an impact on the inflammatory response [13].

IL-10 is a well-established anti-inflammatory cytokine that plays an important role in down-regulating inflammatory and immune responses, as part of key homeostatic processes [14, 15]. Its cellular source is ubiquitous, as almost all innate and adaptive immune cells including lymphocytes, monocytes and neutrophils are able to produce IL-10. IL-10 signals through a heterodimeric receptor composed of two subunits, IL-10R $\alpha$  that has high affinity for IL-10 and is mainly expressed in leukocytes, and IL-10R $\beta$  that is ubiquitously expressed. Binding of IL-10 to its receptor enables the activation of the members of the Janus protein kinase families, JAK1 and TYK2, which are constitutively associated with IL-10R $\alpha$  and IL-10R $\beta$ , respectively. This is followed by the activation of STAT3, which then translocates to the nucleus to regulate the transcription of genes involved in anti-inflammatory responses [16]. Among myeloid cells, monocytes/macrophages are the major cellular target of IL-10 and many of their pro-inflammatory functions can be potently inhibited by IL-10. This includes the production of ROS, the synthesis of pro-inflammatory cytokines (i.e., TNF $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6) and chemokines (i.e., IL-8, MCP-1), and their survival [17]. As such, IL-10 has emerged as an attractive therapeutic tool, especially considering that significant risk of infections and lack of response have been described with anti-TNF therapy [18, 19]. However, its systemic administration has shown limited efficacy in RA [20], possibly due to the complexity of the inflammatory environment of the joint where the presence of multiple cytokines could interfere with IL-10 signaling.

In this study, we evaluated whether TNF $\alpha$  could affect IL-10 signaling in human monocytes and deciphered the underlying mechanisms. Importantly, we found that TNF $\alpha$  inhibited key effectors of the IL-10 pathway in human monocytes and that activation of SHP1 by NOX2-derived ROS mediated the inhibition of IL-10 signaling by TNF $\alpha$ . Moreover, pharmacological

inhibition of SHP1/2 had a protective effect in the collagen antibody-induced arthritis mouse model, which is dependent on innate immune cells such as monocyte/macrophages.

## RESULTS

### **TNF $\alpha$ inhibits IL-10-induced STAT3 phosphorylation and SOCS3 expression in human monocytes.**

To assess whether TNF $\alpha$ , the pivotal pro-inflammatory cytokine, could interfere with IL-10 signaling, we analyzed its effect on IL-10-induced STAT3 phosphorylation in human monocytes isolated from whole blood. Interestingly while TNF $\alpha$  had no effect on STAT3 phosphorylation, it significantly inhibited in a concentration-dependent manner IL-10-induced phosphorylation of STAT3 on Tyr-705 as shown by the use of specific antibodies directed against this phosphosite (**Fig. 1a**). We also used HL-60 cells differentiated into monocytes with 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 (1 $\alpha$ ,25 D3). These differentiated cells strongly expressed the CD14 monocyte/macrophage marker but did not express the CD15 neutrophil marker, confirming the monocytic phenotype (**Supplemental Fig. 1a**). In addition, the subunits of the NOX2 complex were expressed in differentiated cells but not in undifferentiated cells (**Supplemental Fig. 1b**). We observed the same results in these cells after treatment with TNF $\alpha$   $\pm$  IL-10 (**Supplemental Fig. 1c**). The inhibitory effect on IL-10 signaling was specific of TNF $\alpha$  as other pro-inflammatory mediators such as GM-CSF or Lipopolysaccharides (LPS) did not alter STAT3 phosphorylation induced by IL-10 (**Supplemental Fig. 2 a and b**).

The inhibitory effect of TNF $\alpha$  on IL-10 signaling was mediated by TNF receptor 2 (TNFR2) and not by TNFR1 as neutralizing antibodies against TNFR2 restored IL-10-induced STAT3 phosphorylation whereas neutralizing antibodies against TNFR1 did not (**Fig. 1b**). The neutralizing effects of TNFR1 and TNFR2 antibodies were validated by their ability to inhibit the activation of ERK1/2 and p38MAPK elicited by TNF $\alpha$  (**Fig. 1c**).

One of the major anti-inflammatory genes induced by the IL-10-STAT3 axis is *SOCS3* [16]. To analyze whether the inhibitory action of TNF $\alpha$  on IL-10-induced STAT3 phosphorylation impacted SOCS3, we analyzed its expression at the protein and messenger levels. **Figure 2a**

and **2b** showed that concomitantly to its inhibitory action on IL-10-induced STAT3 phosphorylation, TNF $\alpha$  also decreased IL-10-induced SOCS3 protein expression. Similar to the decrease of phosphorylation of STAT3, the reduction of SOCS3 protein expression triggered by TNF $\alpha$  occurred within the first 2 hours and could be observed as soon as 30 min after treatment of human monocytes with TNF $\alpha$  (**Fig 2a**). The inhibitory effect of TNF $\alpha$  on IL-10-induced SOCS3 protein expression was probably not due to SOCS3 degradation since TNF $\alpha$  also rapidly impeded IL-10-induced SOCS3 mRNA expression after 30 minutes (**Fig. 2c**). These data indicated that the inhibitory effect of TNF $\alpha$  on IL-10-induced STAT3 phosphorylation resulted into the inhibition of the transcription of its major anti-inflammatory gene target, *SOCS3*. IL-10 is well known to inhibit the release of cytokines induced by pro-inflammatory mediators. Interestingly, we found that the secretion of several pro-inflammatory cytokines (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-13, IL-12p40, INF $\gamma$ ) induced by treatment of human monocytes with TNF $\alpha$  for 1hr was not be inhibited by IL-10 (**Fig 2d**).

### **TNF $\alpha$ inhibition of IL-10-induced STAT3 phosphorylation in human monocytes involves a SHP1/2 phosphatase.**

Next, we investigated the mechanisms underlying the inhibitory effect of TNF $\alpha$  on IL-10-induced STAT3 phosphorylation in human monocytes. First, we analyzed whether TNF $\alpha$  affected the activation of TYK2 upstream STAT3, as its deficiency in humans has been shown to impair monocyte responses to IL-10, including STAT3 phosphorylation and SOCS3 transcription [21]. **Figure 3a** shows that IL-10 induced TYK2 phosphorylation, but adding TNF $\alpha$ , even at increasing concentrations, did not modify TYK2 phosphorylation status, indicating that TNF $\alpha$  probably did not act at the level of the Janus kinase family. Second, we investigated the possible involvement of a tyrosine phosphatase. To test this hypothesis, we examined whether pervanadate, a generic tyrosine phosphatase inhibitor, and NSC-87877, a

specific Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1/2 (SHP1/2) inhibitor, were able to reverse TNF $\alpha$  inhibitory effect on IL-10-induced STAT3 phosphorylation. While TNF $\alpha$  clearly inhibited IL-10-induced STAT3 phosphorylation, pre-treatment of human monocytes with pervanadate or NSC-87877 both prevented the inhibition of STAT3 phosphorylation by TNF $\alpha$  (**Fig. 3b**), while not affecting that induced by IL-10 (**Fig. 3c**). Similar data were obtained with NSC-87877 in the HL-60 cell line differentiated into monocytes with 1 $\alpha$ ,25 D3 (**Supplemental Fig. 3a and 3b**). NSC-87877 also restored IL-10-induced expression of SOCS3 that was hindered by TNF $\alpha$  in human monocytes (**Supplemental Fig. 4**). To confirm these observations, confocal microscopy experiments were performed to analyze the phosphorylation status of STAT3 simultaneously to its subcellular localization. **Figure 3d** shows that stimulation of the monocytic cell line for 30 minutes with IL-10 induced phosphorylation of STAT3 and its localization within the nucleus. TNF $\alpha$  did not induce phosphorylation of STAT3, but inhibited phosphorylation and translocation to the nucleus of STAT3 induced by IL-10. Interestingly, NSC-87877 reversed the inhibitory effect of TNF $\alpha$  and restored the phosphorylation and localization of STAT3 within the nucleus (**Fig. 3d**). Altogether, these data suggest that the TNF $\alpha$  inhibitory action on IL-10-induced STAT3 phosphorylation in human monocytes involves a SHP1/2 phosphatase.

**TNF $\alpha$  specifically induced the phosphorylation of SHP1 via NOX2-derived ROS in human monocytes.**

To define which SHP1/2 phosphatase is involved, we analyzed the activation status of SHP1 and SHP2 in TNF $\alpha$ -stimulated human monocytes. TNF $\alpha$  stimulated in a time-dependent and concentration-dependent manner the phosphorylation of SHP1 on Tyr 564, which has been shown to be important for maximal activity of SHP1 [22] (**Fig. 4a upper panel, and Supplemental Fig. 5a**). In contrast, using two different specific antibodies directed against



phosphorylated Tyr542 and Tyr580 of SHP2, known to be essential for SHP-2 activity [23], no phosphorylation could be detected, even though the protein was abundantly expressed (**Fig. 4a lower panel, and Supplemental Fig. 5b**). IL-10 did not significantly induce the phosphorylation of SHP1 (**Fig. 4b**). This indicates that TNF $\alpha$  was only able to activate SHP1 and not SHP2 in human monocytes.

It is now widely accepted that ROS are important regulators of TNF $\alpha$  signaling [24]. We therefore examined whether TNF $\alpha$  could induce ROS production, which could then modulate SHP1 activity in human monocytes. First, we showed that stimulation of human monocytes with TNF $\alpha$  increased ROS production (**Fig. 4c and 4d**). Treatment of monocytes with diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of NADPH oxidases including NOX2, inhibited basal and TNF $\alpha$ -induced ROS production. Moreover, DPI significantly inhibited TNF $\alpha$ -induced SHP1 phosphorylation (**Fig. 4e**), indicating that SHP1 activation is most likely dependent of NOX2-derived ROS. Surprisingly, N-acetylcysteine (NAC), which is often used as a ROS scavenger, did not inhibit SHP1 phosphorylation (**Fig. 4e**). It has been reported that NAC has a limited ROS reactivity and that the reaction rates for NAC with the major ROS are slow which could explain the observed data [25]. However, addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to monocytes did induce the phosphorylation of SHP1, recapitulating the effect of TNF $\alpha$ , while the presence of catalase, which eliminates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prevented the phosphorylation, confirming the role of ROS in mediating SHP1 phosphorylation (**Fig. 4f**).

#### **TNF $\alpha$ inhibitory effect on IL-10-induced STAT3 phosphorylation is dependent of NOX2-derived ROS in human monocytes.**

As the data thus far indicate that TNF $\alpha$  disrupts IL-10-induced phosphorylation of STAT3 via the ROS-dependent activation of SHP1, we examined whether inhibition of ROS production could restore the phosphorylation of STAT3. **Figure 5a** shows that TNF $\alpha$  dampened IL-10-

induced phosphorylation of STAT3 and that DPI, but not NAC, restored STAT3 phosphorylation. Interestingly, the inability of NAC to restore STAT3 phosphorylation correlates with its inability to inhibit SHP1 phosphorylation. We verified that neither NAC nor DPI altered the phosphorylation of STAT3 induced by IL-10 (**Fig. 5b**). The restoration of STAT3 phosphorylation by DPI suggests that NOX2-derived ROS are responsible for the inhibitory effect of TNF $\alpha$  on IL-10 signaling, probably *via* activation of SHP1. We then determined whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could recapitulate the effect of TNF $\alpha$  and inhibited IL-10-induced STAT3 phosphorylation. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone had no effect on STAT3 phosphorylation but, as for TNF $\alpha$ , it down-regulated IL-10-induced STAT3 phosphorylation in a concentration dependent manner (**Fig. 5c and 5d**). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone was able to induce the phosphorylation of SHP1 (**Fig. 5c and 5e**). This effect was concentration-dependent and closely parallel the inhibition of STAT3 phosphorylation. Of note, monocytes seem to be remarkably resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a concentration of 1 mM was required to start observing its inhibitory activity on STAT3 phosphorylation and its activation of SHP1. The concentrations of DPI and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> used did not affect monocyte viability (**Supplemental Fig. 6**). Altogether, these data suggest that disruption of IL-10 signaling by TNF $\alpha$  involves a NOX2/ROS/SHP1 pathway.

### **The redox-sensitive Src kinase Lyn controls SHP1 phosphorylation and is involved in TNF $\alpha$ -induced inhibition of IL-10 signaling in human monocytes.**

We next wondered how ROS could regulate SHP1 phosphorylation. It has been shown that the phosphorylation of SHP1 on Tyr 564 by Lyn, a Src family kinase, is essential for maximal phosphatase activity [22]. Moreover, it is now well recognized that Lyn can be regulated by direct oxidation of specific cysteine residues [27]. We therefore hypothesized that ROS may regulate SHP1 phosphorylation through the redox activation of Lyn. **Figure 6a** shows that TNF $\alpha$  was able to induce the phosphorylation of Lyn in human monocytes. DPI, and to a lesser

extent NAC, prevented this phosphorylation, indicating that Lyn activation was NOX2-dependent. More importantly, the specific Lyn inhibitor, Bafetinib, was able to prevent TNF $\alpha$ - and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced phosphorylation of SHP1 on Tyr 564 in human monocytes demonstrating that Lyn mediates the TNF $\alpha$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on SHP1 (**Fig. 6b**). Finally, Bafetinib also prevented the TNF $\alpha$  inhibitory action on IL-10 signaling, restoring STAT3 phosphorylation (**Fig. 6c**). Bafetinib did not alter the phosphorylation of STAT3 induced by IL-10 (**Fig. 6d**). Altogether, these data suggest that TNF $\alpha$ -induced inhibition of IL-10 signaling involves a NOX2-ROS/Lyn/SHP1 axis in human monocytes.

**The pharmacological SHP1/2 inhibitor, NSC-87877, protected mice from collagen antibody-induced arthritis.**

Based on our data in monocytes, we investigated whether the pharmacological SHP1/2 inhibitor, NSC-87877, could protect against collagen antibody-induced arthritis (CAIA) in a mouse model. This model is known to be driven by innate immunity and to be associated with infiltration of monocyte/macrophages and neutrophils. In addition, TNF $\alpha$  has been shown to be crucial for the induction of CAIA [28]. LPS intraperitoneal injection enhances the severity of CAIA and was included in the standard protocol. As shown in **Figure 7**, administration of anti-type II collagen monoclonal antibodies to mice followed by intraperitoneal injection of LPS induced severe arthritis in control mice as assessed by high disease score calculated by the number of inflamed joints in each paw [29] (**Fig. 7a**), by paw thickening, (**Fig. 7b and 7c**) and by inflammatory cell infiltration (**Fig. 7d**). Treatment of mice with NSC-87877 protected mice from CAIA, as shown by the decrease of the disease score, paw thickness, and innate immune cell infiltration (**Fig. 7 a-d**).

## DISCUSSION

Monocytes are the pivotal innate effectors in RA pathogenesis. Upon tissue entry and activation, they produce high levels of pro-inflammatory cytokines and of ROS that contribute to perpetuation of the RA inflammatory process. They also differentiate into inflammatory macrophages to promote inflammation and into osteoclasts that are specialized in bone resorption [6]. IL-10 has been viewed as a promising therapeutic tool in the treatment of RA due to its ability to switch off monocytes and macrophages [17, 30]. However, IL-10 therapy in patients with RA (Phase I trial) did not show any obvious clinical benefit [20]. The reason for this inconsistency is unknown. We hypothesized that the inflammatory environment in the joints could interfere with IL-10 signaling. Our study revealed that TNF $\alpha$ , the master pro-inflammatory cytokine in RA, hindered IL-10 signaling in human monocytes. Mechanistically, we found that TNF $\alpha$  activated the non-receptor tyrosine phosphatase, SHP1, through a NOX2-ROS-Lyn axis to disrupt phosphorylation of STAT3 induced by IL-10. The inhibition of STAT3 phosphorylation by TNF $\alpha$  resulted into a decrease in IL-10-induced expression of SOCS3, a major anti-inflammatory factor. Furthermore, *in vivo* pharmacological inhibition of SHP1 protected mice from collagen antibody-induced arthritis. Thus, this study reveals that SHP1 could mediate the harmful functions of TNF $\alpha$  by preventing IL-10 from exerting its anti-inflammatory activity through negative regulation of STAT3 signaling.

SHP1 is expressed predominantly in hematopoietic cells of all lineages and all stages of maturation and is well known to downregulate intracellular signaling in both innate and adaptive immune cells [31]. However, while there are many studies about its negative regulatory effect on transduction of pro-inflammatory immunoreceptors, not much is known about its negative effect on anti-inflammatory immune effectors such as IL-10. Our study unveils a novel negative function of SHP1 on IL-10/IL-R signaling in human monocytes.

Human monocytes express both SHP1 and SHP2; however, we found that only SHP1 could be activated by TNF $\alpha$ , indicating that the inhibitory action of TNF $\alpha$  on IL-10 signaling is most likely mediated by SHP1, and not by SHP2. TNF $\alpha$ -induced activation of SHP1 has been also demonstrated in endothelial cells [32]. Activation of SHP1 by TNF $\alpha$  is dependent of ROS, and our data indicate that NOX2-derived ROS are involved. Indeed, DPI an inhibitor of NOX2, was able to inhibit TNF $\alpha$ -induced SHP1 phosphorylation on Tyr-564. Furthermore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could recapitulate the effects of TNF $\alpha$ . H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced phosphorylation of SHP1 was previously described in mouse splenic B cells and mouse embryonic fibroblast [33]. A least 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was required to observe an inhibitory action on IL-10-induced STAT3 phosphorylation and activation of SHP1 in human monocytes, indicating a remarkably resistance of these cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been also observed in other primary cells such B cells and astrocytes [33, 34]. The activation of SHP1 by ROS may seem counter-intuitive as it is well known that PTP contain in their active site an invariant cysteine residue which could be inactivated by oxidation into sulfenic acid [35]. However, the fact that dephosphorylation of STAT3 could be observed concurrently to the increased phosphorylation of SHP1 Tyr-564 strongly supports the active status of SHP1 under these conditions.

In contrast to SHP1, SHP2 phosphorylation could neither be detected upon TNF $\alpha$  stimulation nor upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (data not shown), indicating that the two phosphatases are differently regulated in human monocytes. Interestingly, this differential behavior has also been described in astrocytes where phosphorylation of SHP2 was observed in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while phosphorylation of SHP1 was not [34]. The same study showed that in contrast to astrocytes, phosphorylation of SHP2 in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could barely be detected in microglia, the resident macrophages of the brain, which is consistent with our finding in human monocytes. Besides phosphorylation, the engagement of the SH2 domains of SHP1 is also important for the regulation of its activity. Whether TNF $\alpha$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trigger the engagement of the SH2 domains

from SHP1 to the tyrosine-phosphorylated intracellular domains of the IL-10 receptor remains to be determined.

We showed that Lyn is an upstream regulator of SHP1 activation in response to TNF $\alpha$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Indeed, Bafetinib, a selective Lyn inhibitor, prevented TNF $\alpha$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced phosphorylation of SHP1 on Tyr 564 in human monocytes. Lyn has been shown to act as a redox sensor and its oxidation on specific cysteine residues has been demonstrated to be responsible for its activation [36]. Lyn has also been shown to be the upstream regulator of SHP1 activation in B cells and hematopoietic stem cells [22, 33]. To the best of our knowledge, there are no studies indicating that SHP2 can be phosphorylated by Lyn on Tyr 542 and Tyr 580. This fundamental difference in SHP1 and SHP2 regulation might explain their different behavior in response to TNF $\alpha$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human monocytes.

Our study also demonstrated that activation of SHP1 in response to TNF $\alpha$  disrupted IL-10 – induced phosphorylation of STAT3 in human monocytes. Disruption of STAT3 signaling could prevent IL-10 from exerting its anti-inflammatory functions thus exacerbating the pro-inflammatory response of monocytes, which could contribute to the maintenance of synovial joint inflammation in RA. In fact, we found that the inhibition of IL-10-induced STAT3 phosphorylation by TNF $\alpha$  resulted into a decrease in SOCS3 expression, a major anti-inflammatory factor, both occurring very quickly in human monocytes. We also observed that secretion of pro-inflammatory cytokines induced by treatment of TNF $\alpha$  for 1 hr could not be inhibited by IL-10, although we could not ascertain whether there is a direct relation between the decrease of SOCS3 expression and the inability of IL-10 to inhibit TNF $\alpha$ -induced secretion of pro-inflammatory cytokines under the experimental conditions.

Elevated IL-10 levels have been detected in the sera and synovial fluids of arthritis patients; however, these high levels do not result in disease control, and further systemic administration of IL-10 had little effect [20, 37, 38], suggesting a resistance mechanism. Our study revealed

that TNF $\alpha$ , not only exerts pro-inflammatory effects but also inhibits IL-10 anti-inflammatory signaling *via* SHP1 in human monocytes. This suggested that inhibiting SHP1 would restore IL-10 signaling, allowing for a better control of the inflammatory functions of monocytes/macrophages, and possibly for a protective effect in arthritis. Indeed, we found that the SHP1/2 inhibitor, NSC-87877, reduced inflammation in the CAIA mouse model, which is driven by innate immunity and where TNF $\alpha$  is crucial for the induction of the disease [28]. As we showed that NOX2 is upstream SHP1, it is interesting to note that mice with a mutation in *Ncf1* (encoding for p47<sup>PHOX</sup>) and lacking functional NOX2, had also less severe arthritis in the CAIA model [29]. Beyond arthritis, TNF $\alpha$  inhibitory action on IL-10 signaling *via* the NOX2-ROS-Lyn-SHP1 axis in human monocytes, may also contribute to IL-10 supplementation resistance in other chronic inflammatory disorders such as IBD [39].

Altogether, our study revealed that TNF $\alpha$ , the key pro-inflammatory cytokine in RA, disrupted IL-10 signaling *via* the NOX2-ROS-Lyn-SHP1 axis in human monocytes and that pharmacological inhibition of SHP1/2 *in vivo* had a protective effect in the collagen antibody-induced arthritis mice model. This property of TNF $\alpha$  could be responsible for the resistance to IL-10 supplementary treatment in arthritis. This new finding might be useful to harness IL-10 in therapeutic.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents and antibodies**

Antibodies against phospho-STAT3 (Tyr 705) (Cat# 4113S), STAT3 (Cat# 30835S), phospho-TYK2 (Tyr 1054/1055) (Cat# 68790S), phospho-SHP1 (Tyr 564) (Cat# 8849S), SHP1 (Cat# 3759), phospho-SHP2 (Tyr 542) (Cat# 3751T), phospho-SHP2 (Tyr 580) (Cat# 5431T), SHP2 (Cat# 3397T), phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr 182) (Cat# 9216), p38 MAPK Antibody (Cat# 9212), phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr 204) (Cat# 4377S), p44/42 MAPK (Cat# 4695) were from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). Antibody against phospho-Lyn (Tyr 396) (Cat# AP1050) was from ABclonal (Woburn, MA, USA). Antibody against Lyn (Cat# GTX101222) was from GeneTex (Irvine, CA, USA). Antibody against SOCS3 (Cat# 14025-1-AP) was from Proteintech (Manchester, UK). TNFR1 (Cat# MAB625) and TNFR2 (Cat# MAB726) neutralizing antibodies were from R&D Systems. Antibody against  $\beta$ -actin (Cat# Sc-69879), diphenyleiodonium chloride (Cat# D2926), N-acetyl-L-cysteine (Cat# A7250), catalase (Cat#C3556), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cat# H1009), NSC97877 (Cat# 565851), sodium orthovanadate (Cat# 567540) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier France). Batefinib (Cat# HY-50868) was from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)

### **Ethics statement**

The INSERM Institutional Review Board and ethics committee approved all methods performed in accordance with the international guidelines and regulations. Venous blood was obtained from Etablissement du sang Français (EFS, agreement n° 2018010827) and collected from healthy volunteers with their written informed consent. Data collection and analyses were performed anonymously. Animal studies were performed in accordance with the European



Community Guidelines. All protocols were approved by the Bichat Ethics Committee for Animal Research (APAFIS authorization number 11901).

### **Monocytes isolation from whole blood**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were freshly isolated from the whole blood of healthy donors by dextran sedimentation and Ficoll centrifugation (Pharmacia, Uppsala, Sweden) [40]. Monocytes were then purified by magnetic negative isolation with the EasySep kits (Stemcell isolation kit, Saint Égrève, France) following the manufacturer's instructions.

### **Treatment of monocytes with cytokines and inhibitors**

Monocytes,  $2 \times 10^6$  cells in 400  $\mu$ l of Hanks balanced salt solution (HBSS) with calcium (1.26 M), magnesium (1 mM), and 0.03 % of human serum albumin (HSA), were stimulated with IL-10 and TNF $\alpha$  either individually or in combination at the indicated concentration for 20 min (except where indicated) at 37°C. The reaction was stopped by adding 100  $\mu$ l of 5x Laemmli sample buffer preheated to 100°C (50% glycerol, 12.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 25% beta-mercaptoethanol, 312.4 mM Tris-HCl pH 6.8, 12.5 mM EDTA, 12.5 mM EGTA, 0.75 mM bromophenol blue, 50  $\mu$ g/mL pepstatin, 50  $\mu$ g/mL leupeptin, 25 mM NaF, and 50  $\mu$ g/mL aprotinin). In some assays, cells were pre-treated for 15 min at 37°C with pervanadate (1 mM), NSC97788 (50  $\mu$ M), Bafetinib (10  $\mu$ M), DPI (5  $\mu$ M), N-Acetyl-L-cysteine (20 mM), TNFR1 (30  $\mu$ g/ml) and TNFR2 (30  $\mu$ g/ml) neutralizing antibodies, prior to cytokine stimulation.

### **Western blot analysis**

Proteins were denatured for 5 min at 100°C in Laemmli sample buffer. The samples were then subjected to 11% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using standard techniques [40]. The separated proteins were transferred to nitrocellulose according to the Towbin

procedure [40]. After blocking with 5% non-fat dry milk TBS-Tween (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 hr at room temperature, membranes were probed overnight at 4°C with specific antibodies: anti-pSTAT3 Tyr705 (1:1000), anti-STAT3 (1:1000), anti-SOCS3 (1:1000), anti-Actin (1:1000), anti-pERK1/2 (1:1000), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-p38MAPK (1:1000), anti-p38MAPK (1:1000), anti-pTYK2 Tyr1054 (1:500), anti-pSHP1 Tyr564 (1:1000), anti-SHP1 (1:1000), anti-pSHP2 Tyr542 (1:1000), anti-pSHP2 Tyr580 (1:1000), anti-SHP2 (1:1000), anti-pLyn (1:1000), and anti-Lyn (1:1000). After washing with TBS-Tween, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated (1:30000) or with alkaline phosphatase-conjugated (1:10000) antibodies directed against anti-mouse or anti-rabbit IgG for 1 hr at room temperature. Proteins bands were visualized using ECL chemiluminescence reagents (GE Healthcare LifeSciences, Velizy, France) and then exposed to a camera (Amersham Imager 600; GE Healthcare LifeSciences, Velizy, France) or using NBT/BCIP reagents in carbonate buffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.8).

### **Cytokine measurement**

Monocytes were treated with TNF $\alpha$  (100ng/ml) and IL-10 (12.5 ng/ml), either individually or in combination, at 37°C for 1hr. Supernatants were collected and cytokines were measured with the V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kit (Cat# K15049D) by electrochemiluminescence-based immunoassays from Meso Scale Discovery according to the manufacturer's instructions (MSD technology, Rockville, Maryland, USA). Data were analyzed with Discovery Workbench software.

## **Confocal microscopy**

Following treatment for 20 min at 37°C with TNF $\alpha$  (100ng/ml) and IL-10 (12.5 ng/ml), either individually or in combination, monocytes or monocytic cells obtained by differentiation of HL-60 cell line with 1 $\alpha$ ,25 D3, were fixed in suspension with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with 90% Methanol in PBS for 30 min at 4°C. Cells were then spin-coated on slides with the Cytospin<sup>TM</sup> centrifuge and blocked overnight with 5% BSA in PBS. Monocytes were then incubated with a mouse anti-pSTAT3 antibody (1:100) diluted in 1% BSA in PBS for 1 hr at room temperature. After washing with PBS, cells were incubated with an Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse antibody (1:400) for 1hr at room temperature in the dark. Nuclei were counterstained with DAPI Staining Solution (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired with an inverted confocal laser scanning microscope (Leica SP8, Leica Microsystem) with a 40x objective, and were analysed with the Leica Application Suite X software.

## **RNA extraction and Real time PCR**

Total RNA was extracted from monocytes using TRIzol Reagent (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. RNA concentrations were measured with DeNovix DS 11 Series Microvolume Spectrophotometer. One microgram of RNA was converted to complementary DNA (cDNA) with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher). Real-time PCR reactions were performed with the *GADPH* (forward, CGACAGTCAGCCGCATCTT; reverse, CCCCATGGTGTCTGAGCG) and *SOCS3* (forward, TCCAAACAGGGGACACTTCG; reverse, GGGGGTGTGACCATTTCCTT) primers using the Roche Light Cycler 480 device and the Kapa Sybr Fast qPCR kit (CliniSciences, Nanterre, France) according to the manufacturer's protocol. Relative expression levels for each gene were

calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, with normalization to the average and GAPDH housekeeping genes.

### **Measurement of ROS production by luminol-amplified chemiluminescence**

ROS production was measured by the luminol-amplified chemiluminescence method. Monocytes ( $5 \times 10^5$ ) were suspended in 0.5 mL HBSS with calcium (1.26 M) and magnesium (1 mM) containing 10  $\mu$ M luminol, with or without DPI (5  $\mu$ M) and preheated for 10 min at 37°C in the luminometer. Cells were then treated with TNF $\alpha$  (100 ng/ml). Chemiluminescence was recorded using a Berthold 953 apparatus and light emission was expressed in counted photons per minute (cpm).

### **Viability assay**

Monocytes,  $5 \times 10^6$  cells/ml in HBSS, were treated with DPI (50  $\mu$ M) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) for 30 min at 37°C, and viability was assessed using Trypan blue staining. Results are presented as the percentage of viable cells.

### **Collagen Antibody-induced Arthritis in mice.**

Wild type male BALB/c mice (Janvier Laboratories, Le Genest-St-Isle, France) were bred under specific pathogen-free conditions in a controlled environment with standard bedding and controlled light cycle with water and food provided *ad libitum*. Mice were used at 7-8 weeks of age. Mice were injected intraperitoneally (IP) day (d) 0 with 1.5 mg collagen-induced arthritis monoclonal antibody cocktail recognizing the conserved epitopes on various species of type II collagen (Arthrogen-CIA; clone A2-10, F10-21, D8-6, D1-2G, and D2-112; Gentaur, Paris, France), according to the manufacturer's instructions. At day 3, mice received 50  $\mu$ g of LPS by IP injection. Morphological changes were assessed by measuring paw thickness with a digital

Vernier caliper (Mitutoyo, Roissy en France, France) each day. Observational clinical scores were based upon the number of inflamed joints in each paw. Inflammation was evaluated according to the criteria of redness and swelling: 1 point, each inflamed toe or knuckle; 5 points, inflamed wrist or ankle. For each paw: 0 to 15 (5 toes, 5 knuckles, 1 wrist/ankle); for each mice : 0 to 60 points (4 paws) [29]. Histological examination was assessed according to the recommendations of Hayer et al. [41]. Mice were sacrificed at day 8. Three groups of five mice each were used: Control, CAIA, CAIA+NSC97877. The control group only received PBS, CAIA group received cocktail antibodies and LPS and were treated with vehicle, the CAIA+NSC97877 group, received cocktail antibodies and LPS and were treated daily with NSC97877 (30mg/kg, IP) in PBS, except on day 3 to 5.

## **Statistics**

Data were presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired two-tailed Mann-Whitney rank tests were used for two group comparisons. One way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test or Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons post-test were used for comparison of more than two groups as appropriate. Data were analyzed with Prism 9.2.0.332 (Graphpad Software, San Diego, CA) and a  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## REFERENCES

- [1] Zhang H, Shi N, Diao Z, Chen Y, Zhang Y. Therapeutic potential of TNF $\alpha$  inhibitors in chronic inflammatory disorders: Past and future. *Genes Dis.* **8**:38-47 (2020).
- [2] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* **365**:2205-2219 (2011)
- [3] Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet.* **2**: 244-247 (1989).
- [4] Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev.* **223**:7-19 (2008).
- [5] Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* **118** :3537-3545 (2008).
- [6] Rana AK, Li Y, Dang Q, Yang F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int Immunopharmacol.* **65**:348-359 (2018).
- [7] Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **34**:1125-1132 (1991).
- [8] Gane JM, Stockley RA, Sapey E. TNF- $\alpha$  Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF- $\alpha$  Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. *J Immunol Res* **2016**:1079851 (2016).
- [9] Miesel R, Hartung R, Kroeger H. Priming of NADPH oxidase by tumor necrosis factor alpha in patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation.* **20**:427-438 (1996).

- [10] Gauss KA et al. Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol.* **82**:729-741 (2007).
- [11] Almeida AC et al. The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the NADPH oxidase system of human colostrum macrophages, blood monocytes, and THP-1 cells. *J Interferon Cytokine Res.* **25**:540-546 (2005).
- [12] Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* **5**:491 (2014).
- [13] Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* **7**:195-202 (2008).
- [14] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* **170**, 2081-2095 (1989).
- [15] De Waal Malefyt R et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* **174**, 915-24 (1991).
- [16] Verma R, Balakrishnan L, Sharma K, Khan AA, Advani J, Gowda H, Tripathy SP, Suar M, Pandey A, Gandotra S, Prasad TS, Shankar S. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal.* **10** :61-67 (2016).
- [17] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* **19**:683-765 (2001).
- [18] Minozzi S et al. Risk of infections using anti-TNF agents in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf.* **15** :11-34 (2016).

- [19] Kalden JR, Schulze-Koops H. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: implications for rheumatoid arthritis treatment. *Nat Rev Rheumatol.* **13**:707-718 (2017).
- [20] Castillo P, Kolls JK. IL-10: A Paradigm for Counterregulatory Cytokines. *J Immunol.* **197**:1529-1530 (2016).
- [21] Kreins AY et al. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* **212**:1641-62 (2015).
- [22] Xiao W, Ando T, Wang HY, Kawakami Y, Kawakami T. Lyn- and PLC-beta3-dependent regulation of SHP-1 phosphorylation controls Stat5 activity and myelomonocytic leukemia-like disease. *Blood.* **116** : 6003-13 (2010).
- [23] Lu W, Gong D, Bar-Sagi D, Cole PA. Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol Cell.* **8**: 759-769 (2001).
- [24] Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol.* 2016 26 :249-261.
- [25] Zhitkovich A. N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More. *Chem Res Toxicol.* **32**:1318-1319 (2019).
- [27] Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature*, **480**:109-112 (2011).
- [28] Nandakumar KS, Holmdahl R. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res Ther.* **8** :223-234 (2006).
- [29] Kelkka T, Hultqvist M, Nandakumar KS, Holmdahl R. Enhancement of antibody-induced arthritis via Toll-like receptor 2 stimulation is regulated by granulocyte reactive oxygen species. *Am J Pathol.* **181** :141-150 (2012).
- [30] Keystone E, Wherry J, Grint P. IL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* **24**: 629-639 (1998).



- [31] Garg M, Wahid M, Khan F Dr. Regulation of peripheral and central immunity: Understanding the role of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatases, SHP-1 & SHP-2. *Immunobiology*. **225** :151847 (2020).
- [32] Nakagami H, Cui TX, Iwai M, Shiuchi T, Takeda-Matsubara Y, Wu L, Horiuchi M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits growth factor-mediated cell proliferation through SHP-1 activation in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **22** :238-242 (2002).
- [33] Patterson HC, et al. A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112** :E5679-88 (2015).
- [34] Park SJ, Kim HY, Kim H, Park SM, Joe EH, Jou I, Choi YH. Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes. *Free Radic Biol Med*. **46** :1694-1702 (2009).
- [35] Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*. **37**:5633-5642 (1998).
- [36] Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature*. **480** :109-112 (2011).
- [37] Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, Fujita K, Lipsky PE. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. **38** :96-104 (1995).
- [38] al-Janadi M, al-Dalaan A, al-Balla S, al-Humaidi M, Raziuddin S. Interleukin-10 (IL-10) secretion in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: IL-10-dependent CD4+CD45RO+ T cell-B cell antibody synthesis. *J Clin Immunol*. **16** :198-207 (1996).
- [39] Marlow GJ, van Gent D, Ferguson LR. Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol*. Jul 7;19(25):3931-41 (2013).

- [40] Marzaioli V, Hurtado-Nedelec M, Pintard C, Tlili A, Marie JC, Monteiro RC, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM, El-Benna J. NOX5 and p22phox are 2 novel regulators of human monocytic differentiation into dendritic cells. *Blood*. 130:1734-1745 (2017).
- [41] Hayer S, Vervoordeldonk MJ, Denis MC, Armaka M, Hoffmann M, Bäcklund J, Nandakumar KS, Niederreiter B, Geka C, Fischer A, Woodworth N, Blüml S, Kollias G, Holmdahl R, Apparailly F, Koenders MI. 'SMASH' recommendations for standardised microscopic arthritis scoring of histological sections from inflammatory arthritis animal models. *Ann Rheum Dis*. **80** :714–726 (2021).
- [42] Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **77** :2936-2940 (1980).

## **DATA AVAILABILITY**

All data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Dr. Martine Torres for her editorial help, Olivier Thibaudeau for preparation of the paraffin sections, and Samira Benadda for the confocal microscopy. MBK is a recipient from the French Research Ministry. This work was supported by INSERM, Labex Inflammex, CNRS and University of Paris.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

MBK designed and performed the experiments, analyzed the data, contributed to the writing of the manuscript. DL, CP, and MHN contributed to the experiments. JCM contributed to the experiments and to the writing of the manuscript. JEB and PMCD supervised the project, designed the experiments, and co-wrote the manuscript. All the authors have read the manuscript and agreed with the data.

## **COMPETING INTERESTS**

The authors declare no competing interests

## **ADDITIONAL INFORMATIONS**

The online version of this article contains supplementary material that is available to authorized users.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** *TNF $\alpha$  inhibits IL-10-induced STAT3 phosphorylation in human monocytes through TNFR2.* **a)** Concentration-dependent effect of TNF $\alpha$  on IL-10-induced STAT3 phosphorylation analyzed by Western-Blot. Human monocytes ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were stimulated with IL-10 and TNF $\alpha$ , either individually or in combination, at the indicated concentrations for 20 min at 37°C; **b)** Densitometric analysis of pSTAT3 normalized to total STAT3 in human monocytes stimulated as in (a);  $n \geq 5$ ; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*\*\* $p < 0.001$ ; **c)** *Upper panel:* Effects of neutralizing antibodies against TNFR1 (30  $\mu$ g/ml) and TNFR2 (30  $\mu$ g/ml) on the inhibitory action of TNF $\alpha$  (100 ng/ml) on IL-10 (12.5 ng/ml)-induced STAT3 phosphorylation analyzed by Western-Blot. *Lower panel:* Densitometric analysis of pSTAT3 normalized to total STAT3 in human monocytes stimulated as above in the presence or absence of neutralizing antibodies against TNFR1 and TNFR2;  $n=4$ ; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \* $p < 0.05$ ; **d)** Effects of neutralizing antibodies against TNFR1 (30  $\mu$ g/ml) and TNFR2 (30  $\mu$ g/ml) on the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK induced by TNF $\alpha$  (100 ng/ml).

**Figure 2:** *TNF $\alpha$  inhibits SOCS3 expression induced by IL-10 in human monocytes.* **a)** TNF $\alpha$  decreased IL-10 -induced SOCS3 protein expression concurrently with its inhibitory action on IL-10-induced STAT3 phosphorylation as analyzed by Western-Blot. Human monocytes ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were stimulated with IL-10 (12.5 ng/ml) and TNF $\alpha$  (100 ng/ml), either individually or in combination, for 30 min, 1 hr and 2 hrs at 37°C. Representative of 2 independent experiments; **b)** Densitometric analysis of pSTAT3, normalized to total STAT3, and SOCS3, normalized to  $\beta$ -actin, in human monocytes stimulated for 1 hr as in (a);  $n=4$ ; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; **c)**

TNF $\alpha$  decreased IL-10-induced *SOCS3* messenger RNA expression in human monocytes. Human monocytes were stimulated for 1 hr as in (a). Relative expression levels of *SOCS3* were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, with normalization to the average and *GAPDH* housekeeping genes. n=5; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; **d**) Inability of IL-10 to inhibit TNF $\alpha$ -induced pro-inflammatory cytokines secretion by human monocytes after TNF $\alpha$  treatment for 1 hr as measured by electrochemiluminescence-based immunoassays (MSD technology).

**Figure 3:** *TNF $\alpha$  inhibitory action on IL-10-induced STAT3 phosphorylation in human monocytes involves a SHP1/2 phosphatase. a) Upper panel:* Concentration-dependent effect of TNF $\alpha$  on IL-10-induced TYK2 phosphorylation analyzed by Western-Blot. Human monocytes ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were stimulated with IL-10 and TNF $\alpha$ , either individually or in combination, at the indicated concentrations for 20 min at 37°C. *Lower panel:* Densitometric analysis of pTYK2 in human monocytes stimulated as above, normalized to  $\beta$ -actin; n=3; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; **b) Upper panel:** Pervanadate (1 mM) and NSC-87877 (50  $\mu$ M) prevented TNF $\alpha$  (100 ng/ml) inhibitory action on IL-10 (12.5 ng/ml)-induced STAT3 phosphorylation as analyzed by Western-Blot. *Lower panel:* Densitometric analysis of pSTAT3 normalized to total STAT3 in human monocytes stimulated as above in the presence or absence of Pervanadate or NSC-87877; n=4; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*p<0.05, \*\*p<0.01; **c**) Effect of pervanadate (1 mM) or NSC-87877 (50  $\mu$ M) on the phosphorylation of STAT3 induced by IL-10 (12.5ng/ml); **d**) Confocal microscopy of HL-60 cell line differentiated into monocytes with 1 $\alpha$ ,25 D3, stimulated with IL-10 (12.5 ng/ml) and TNF $\alpha$  (100 ng/ml), either individually or in combination, for 20

min at 37°C in the presence or absence of NSC-87877 (50 µM). pSTAT3 (red), DAPI (blue). Scale bar 10 µm. Representative of 3 independent experiments.

**Figure 4:** *TNFα specifically induced the phosphorylation of SHP1 via NOX2-derived ROS in human monocytes.* **a)** Time-dependent effect of TNFα on SHP1(Tyr 564), SHP2 (Tyr 542), and SHP2 (Tyr 580) phosphorylation analyzed by Western-Blot. Human monocytes (5x10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with TNFα (100 ng/ml) for the indicated times at 37°C; **b) Upper panel:** SHP1 (Tyr 564) phosphorylation in human monocytes (5x10<sup>6</sup> cells/ml) stimulated with IL-10 (12.5 ng/ml) and TNFα (100 ng/ml), either individually or in combination, for 20 min at 37°C as analyzed by Western-Blot ; *Lower panel:* Densitometric analysis of pSHP1(Tyr 564) normalized to total SHP1 in human monocytes stimulated as above. n=3; mean±SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*\*p<0.01; **c)** ROS production measured by luminol-amplified chemiluminescence in human monocytes stimulated with TNFα (100ng/ml) in the presence or absence of DPI (5 µM); **d)** ROS production measured as in (c) was expressed as percentage of control (resting cells); n=5 per condition; mean±SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001; **e) Upper panel:** Effect of NAC (20 mM) and DPI (5 µM) on SHP1 (Tyr 564) phosphorylation induced by TNFα (100ng/ml) as analyzed by Western-Blot . *Lower panel:* Densitometric analysis of pSHP1(Tyr 564) normalized to total SHP1 in human monocytes stimulated with TNFα (100 ng/ml) in the presence or absence of NAC or DPI; n=5; mean±SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; **f ) Upper panel:** Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) on phosphorylation of SHP1 (Tyr 564) in the presence or absence of catalase (150 U) as analyzed by Western-Blot . *Lower panel:* Densitometric analysis of SHP1(Tyr 564) phosphorylation

normalized to total SHP1 in human monocytes stimulated as above n=4; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

**Figure 5:** *TNF $\alpha$  inhibitory effect on IL-10-induced STAT3 phosphorylation is dependent of NOX2-derived ROS in human monocytes. a) Upper panel:* DPI (50  $\mu$ M) but not NAC (20 mM) prevented TNF $\alpha$  (100 ng/ml) inhibitory action on IL-10 (12.5 ng/ml)-induced STAT3 phosphorylation as analyzed by Western-Blot. *Lower panel:* Densitometric analysis of pSTAT3 normalized to total STAT3 in human monocytes stimulated as above in the presence or absence of NAC or DPI; n=3; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*p<0.05, \*\*p<0.01; **b)** Effect of NAC (20 mM) or DPI (50  $\mu$ M) on the phosphorylation of STAT3 induced by IL-10 (12.5ng/ml); **c)** Concentration-dependent effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on IL-10 (12.5 ng/ml)-induced STAT3 phosphorylation, and on SHP1 (Tyr 564) phosphorylation as analyzed by Western-Blot; **d-e)** Densitometric analysis of pSTAT3 normalized to total STAT3 (**d**), and pSHP1(Tyr 564) normalized to total SHP1 (**e**) in human monocytes stimulated as in (c); n $\geq$ 3; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

**Figure 6:** *The redox-sensitive Src kinase Lyn controls SHP1 phosphorylation and is involved in TNF $\alpha$ -induced inhibition of IL-10 signaling in human monocytes. a)* Effect of NAC (20 mM) or DPI (5  $\mu$ M) on Lyn(Tyr 396) phosphorylation induced by TNF $\alpha$  (100 ng/ml) as analyzed by Western-Blot; **b)** Effect of Bafetinib (10  $\mu$ M) on SHP1(Tyr 564) phosphorylation induced by TNF $\alpha$  (100ng/ml) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM), as analyzed by Western-Blot. **c) Upper panel:** Bafetinib (10  $\mu$ M) prevented TNF $\alpha$  (100 ng/ml) inhibitory action on IL-10 (12.5 ng/ml)-induced STAT3 phosphorylation as analyzed by Western-Blot. *Lower panel:* Densitometric

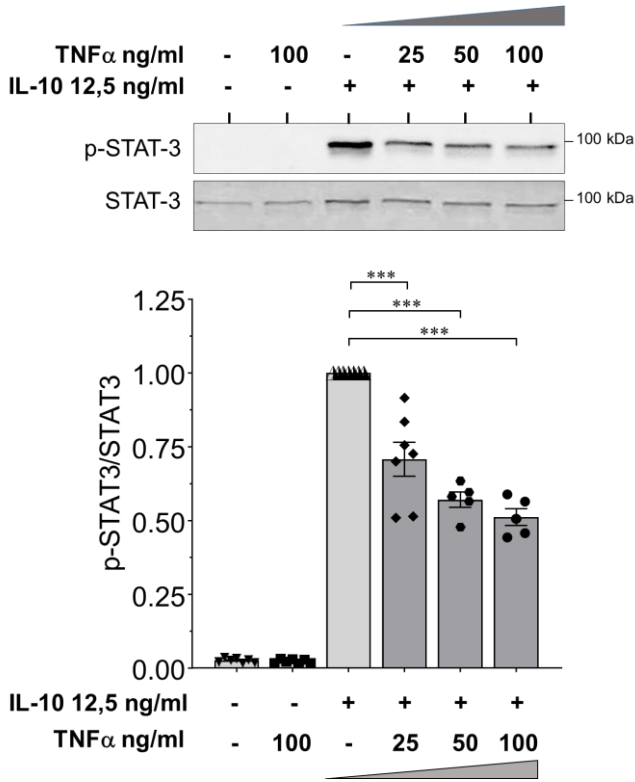
analysis of pSTAT3 normalized to STAT3 in human monocytes stimulated as above in the presence or absence of Bafetinib; n=3; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*\*p<0.01. \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001; **d**) Effect of Bafetinib (10  $\mu$ M) on the phosphorylation of STAT3 induced by IL-10 (12.5ng/ml).

**Figure 7:** *NSC-87877 protected mice from collagen antibody-induced arthritis (CAIA).* CAIA was induced with a single IP injection of five monoclonal anti-collagen II antibodies, followed by injection of LPS 3 days after the initial antibody cocktail injection in NSC-87877 (NSC)-treated or untreated mice. **a**) Arthritis score and **b**) paw thickness were followed each day until the day of sacrifice. Control (CTL, n=5), Arthritis (n=5), Arthritis+NSC (n=5); mean $\pm$ SEM; Two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test; \*p<0.05. \*\*\*\*p<0.0001; **c**) Representative images of hind paws from CTL (n=5), Arthritis (n=5) and Arthritis+NSC(n=5) groups at day 8: **d**) Representative Hematoxylin & Eosin stain section of the ankle joint 8 days after CAIA induction from CTL (n=5), Arthritis (n=5) and Arthritis+NSC (n=5) groups. Scale bar 100  $\mu$ m.

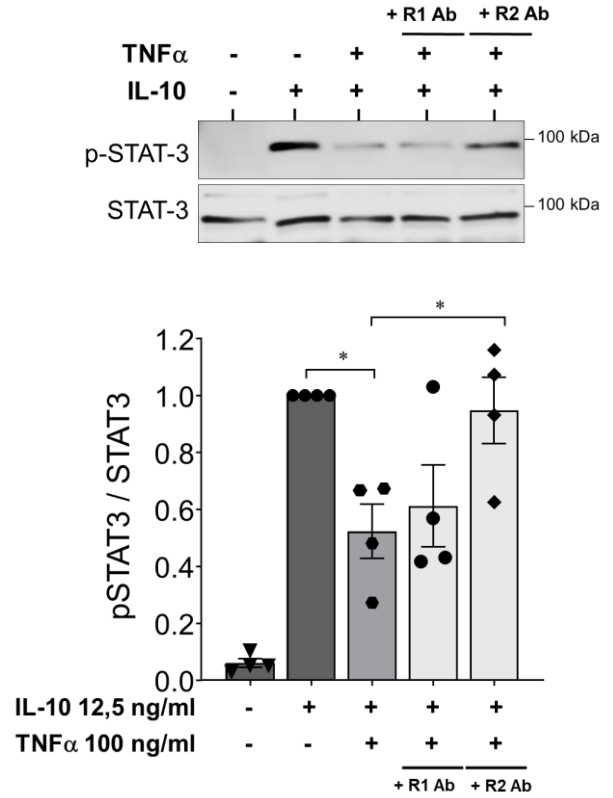


**Figure 1** (*Ben-Khemis et al.*)

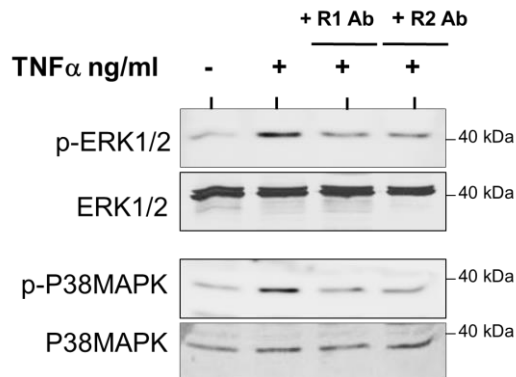
**a**



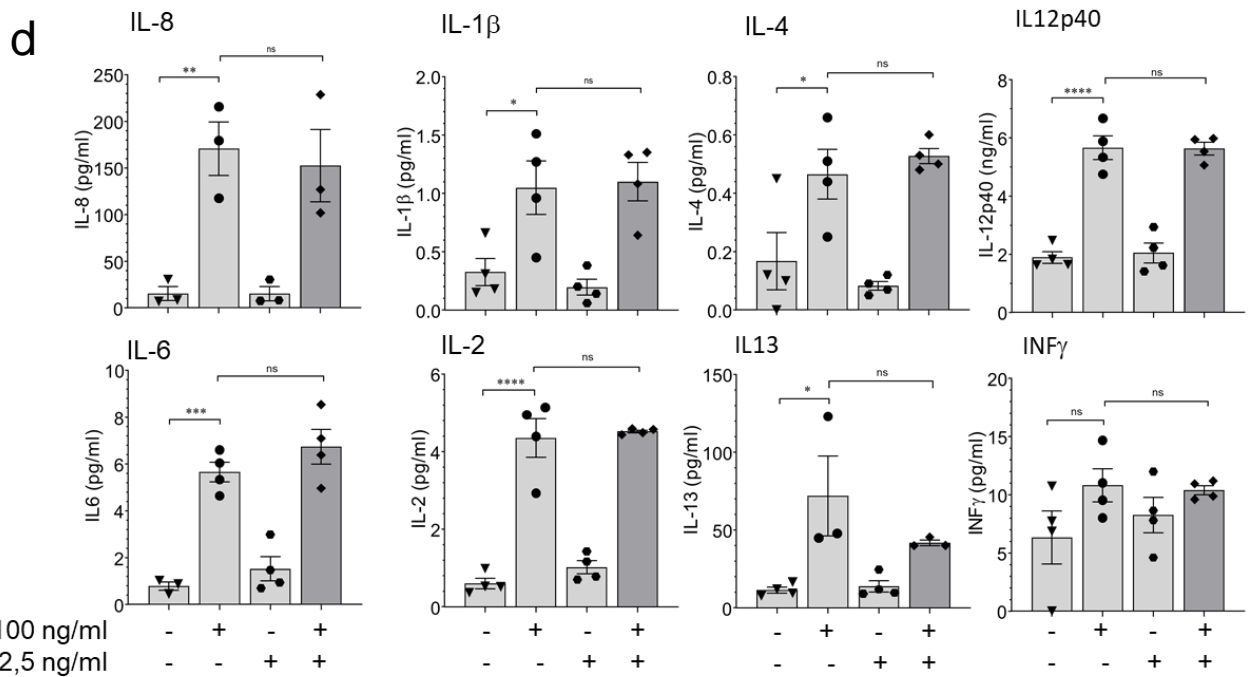
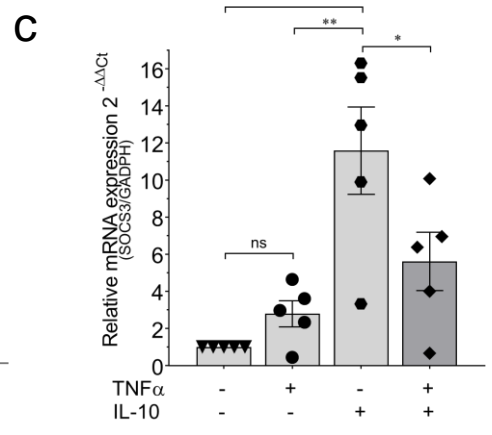
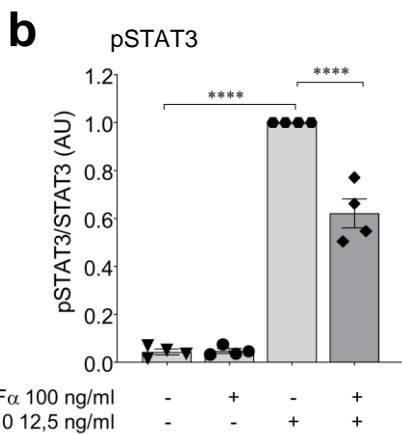
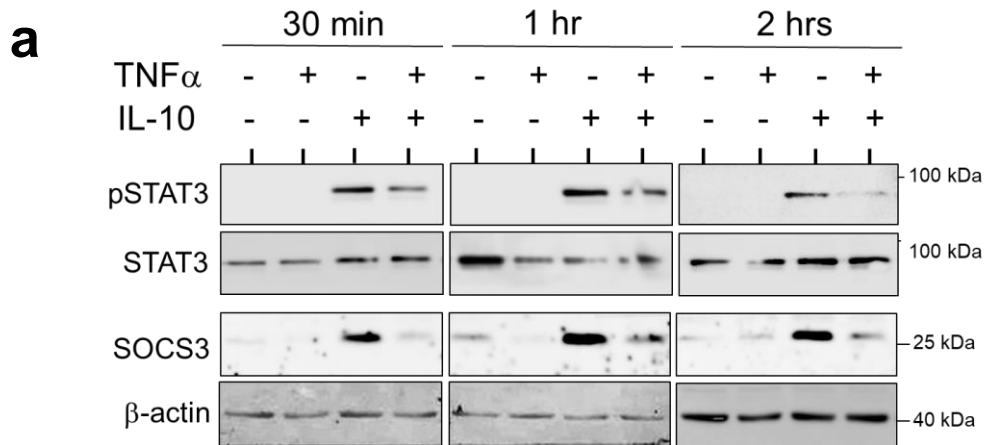
**b**



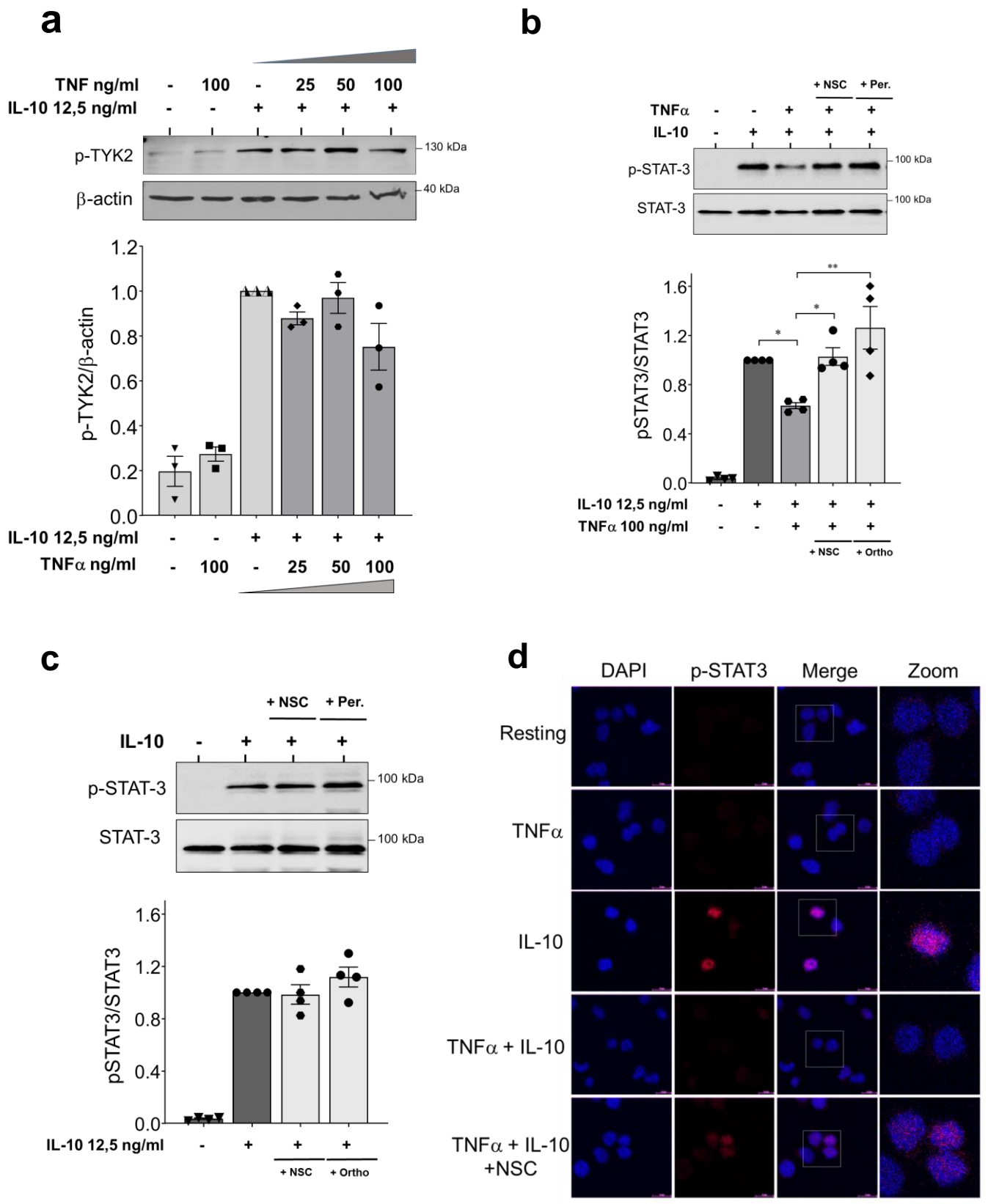
**c**



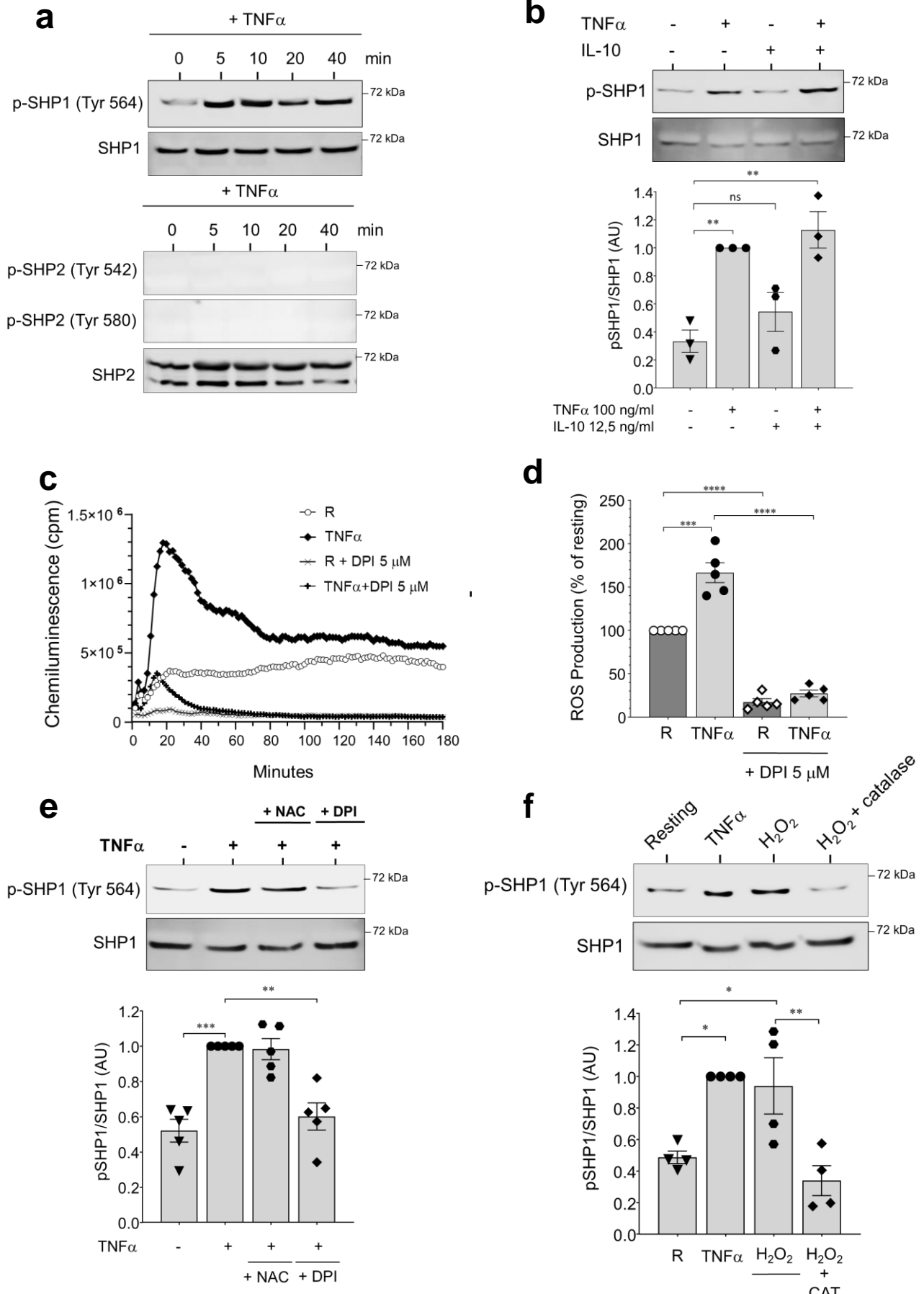
**Figure 2** (Ben-Khemis et al.)



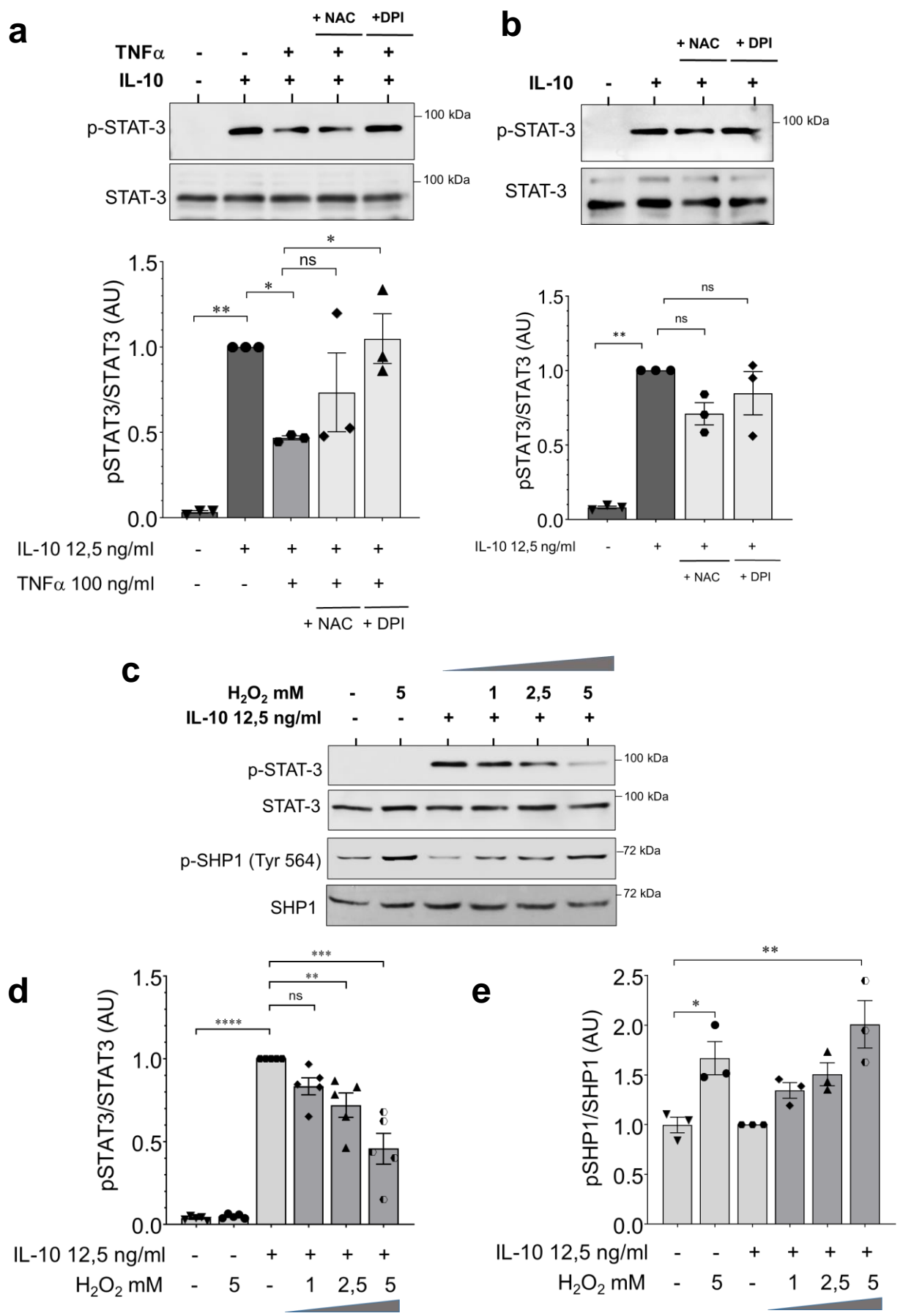
**Figure 3** (Ben-Khemis et al.)



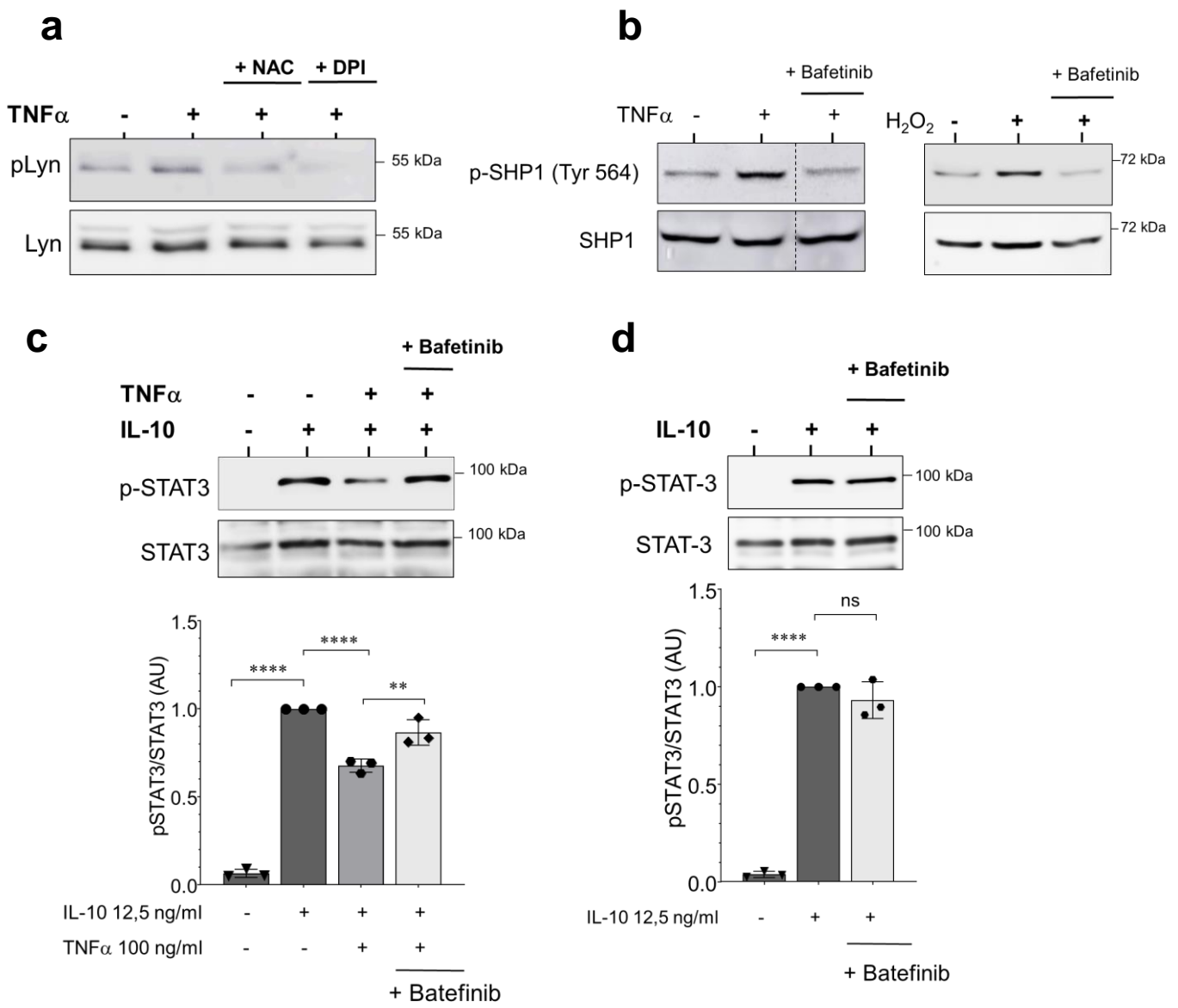
**Figure 4** (Ben-Khemis et al.)



**Figure 5** (Ben-Khemis et al.)

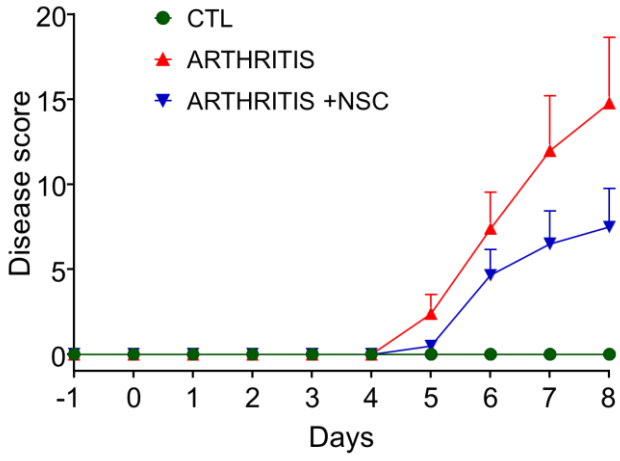


**Figure 6** (*Ben-Khemis et al.*)

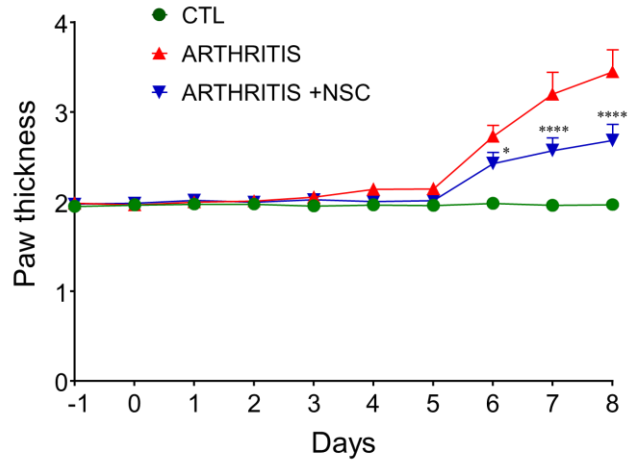


**Figure 7** (Ben-Khemis et al.)

**a**



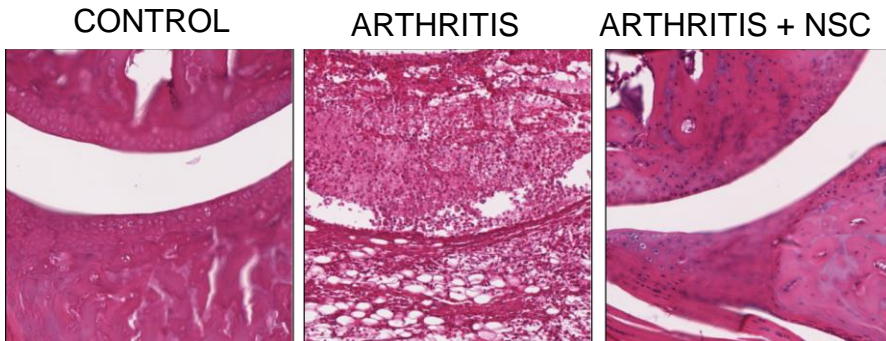
**b**



**c**



**d**



## **SUPPLEMENTARY METHODS**

### **HL-60 culture and differentiation**

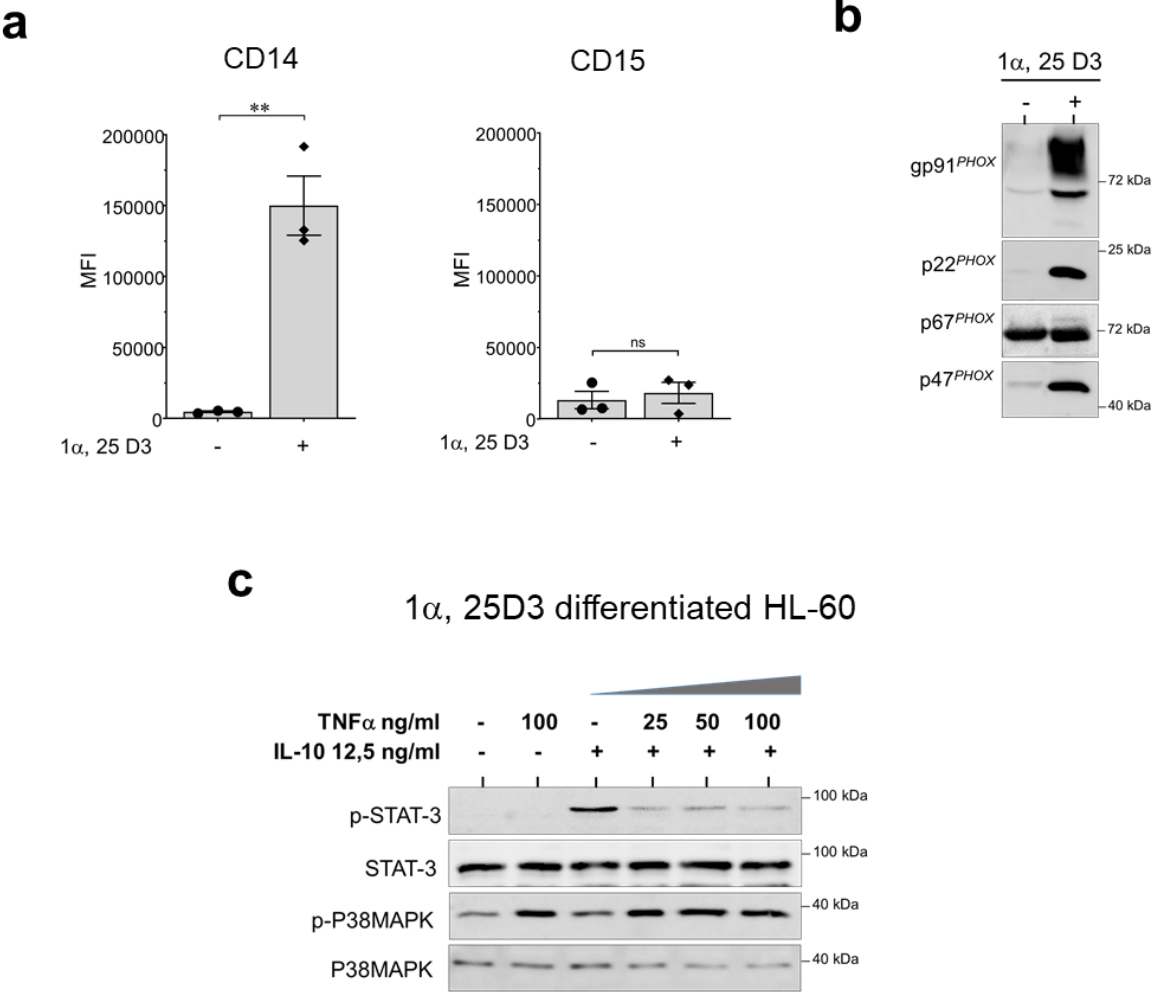
Human HL-60 promyelocytic leukemia cells (Cat# CCL-240, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultured in RPMI media (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. HL-60 cells at the concentration of 6x10<sup>5</sup> cells/ml were differentiated into monocytic cell line by incubation with 100 nM 1α,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (Cat# Sc-202877, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) for 5 days. This protocol was optimized for HL-60 differentiation into monocytes [42].

### **Flow cytometry**

Monocytic phenotype was confirmed by analyzing the expression levels of CD14 and CD15 markers by flow cytometry. Briefly, cells were incubated with PE-conjugated anti-human CD14 or FITC-conjugated anti-human CD15 monoclonal antibodies (Beckman Coulter, Marseille, France) in the dark for 20 minutes on ice. Cells were then suspended in 300 µl of ice cold PBS and suspensions analyzed immediately using a FACS Canto II cytometer (BD Biosciences, Oxford, UK). Non-specific antibody binding was determined with cells incubated with the same concentration of an irrelevant antibody of the same isotype. Forward and side scatter were used to identify the neutrophil population and to gate out contaminating cells and debris. The mean fluorescent intensity (MFI) of CD14-positive and CD15-positive cells was then determined. The BD DIVA software (BD Biosciences) was used for acquisition and analysis. The gating was performed using SSC and FSC plots. All sample acquisitions were performed on >50,000 events using constant photomultiplier values. Results are expressed as MFI.



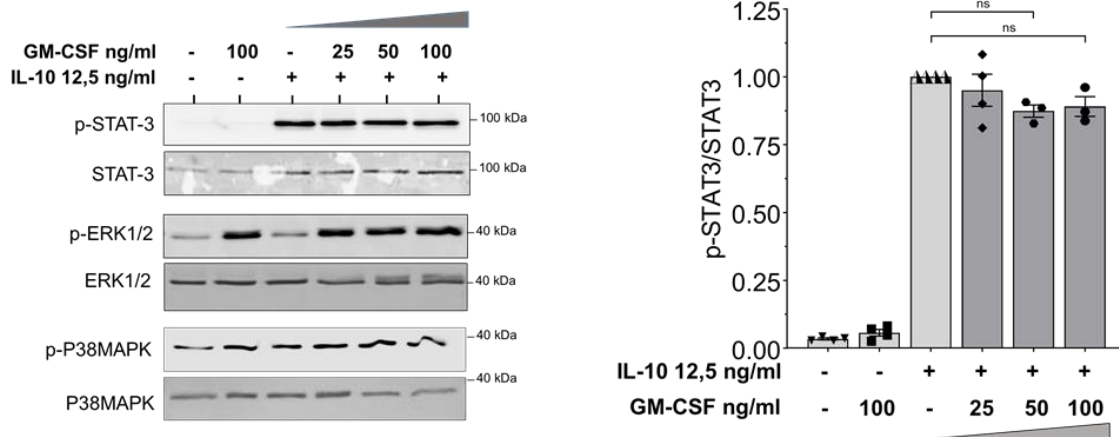
**Supplemental Figure 1 (Ben-Khemis et al.)**



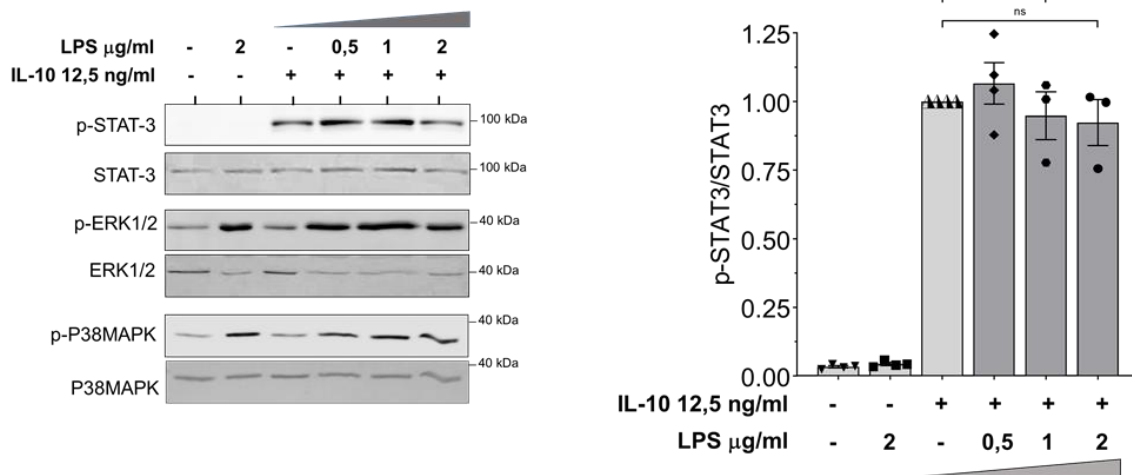
**Supplemental Figure 1: TNF $\alpha$  inhibits STAT3 phosphorylation induced by IL-10 in human HL-60 promyelocytic leukemia cells differentiated into monocytes with 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 (1 $\alpha$ ,25 D3). a) CD14 and CD15 expression in 1 $\alpha$ ,25 D3 differentiated HL-60 cells as assessed by flow cytometry; b) Expression of the NADPH oxidase subunits, gp91<sup>PHOX</sup>, p22<sup>PHOX</sup>, p47<sup>PHOX</sup> and p67<sup>PHOX</sup> in 1 $\alpha$ ,25 D3 differentiated HL-60 cells as compared to undifferentiated cells; c) Concentration-dependent effect of TNF $\alpha$  on IL-10-induced STAT3 phosphorylation as analyzed by Western-Blot. Human monocytic cell line (5x10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with IL-10 and TNF $\alpha$ , either individually or in combination, at the indicated concentrations for 20 min at 37°C.**

## Supplemental Figure 2 (Ben-Khemis et al.)

**a**

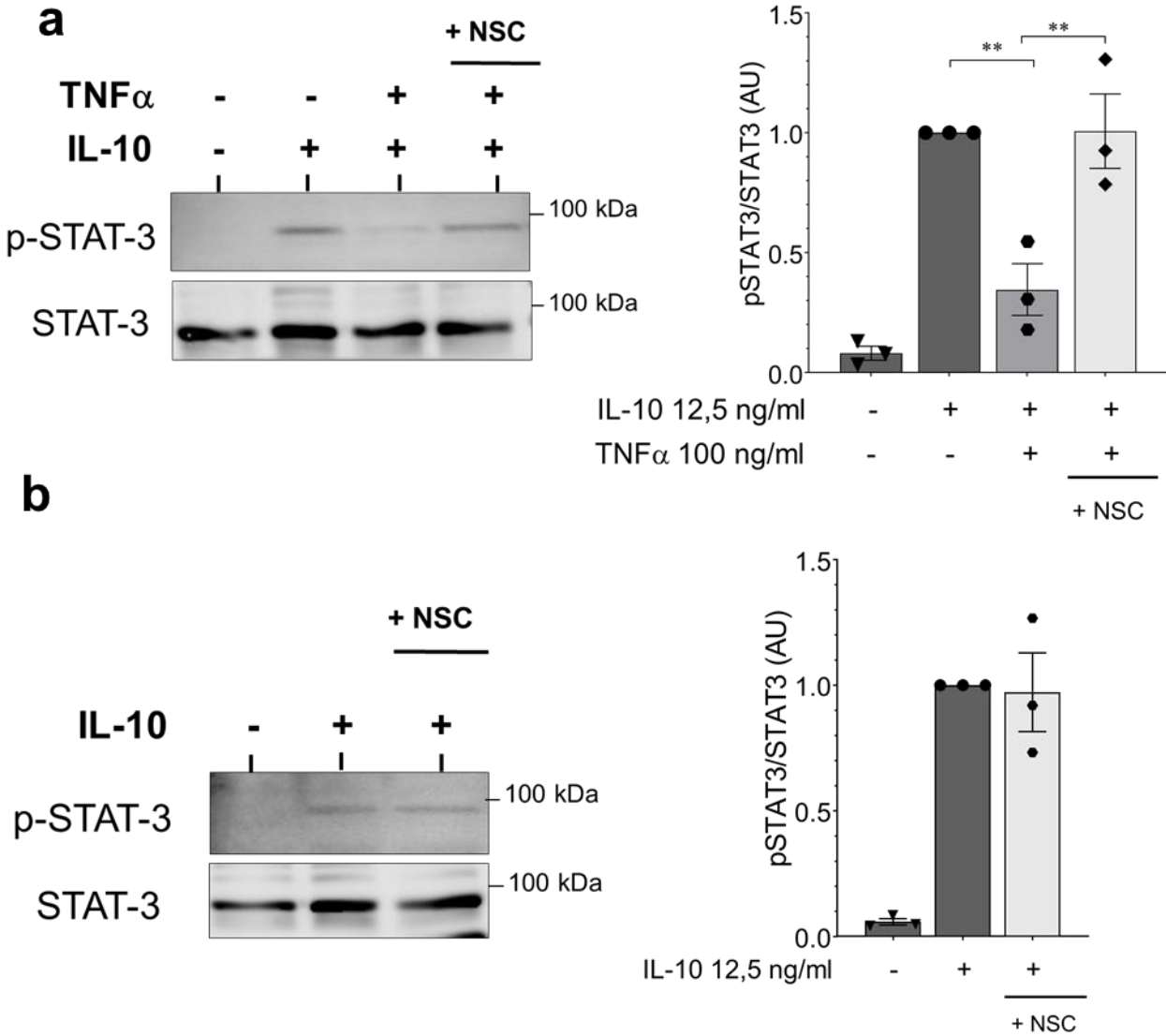


**b**



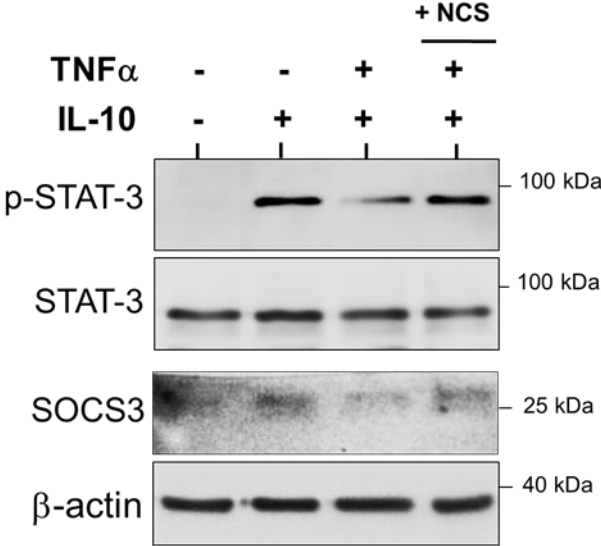
**Supplemental Figure 2: GM-CSF or Lipopolysaccharides (LPS) do not alter STAT3 phosphorylation induced by IL-10 in human monocytes. a) Left panel;** Concentration-dependent effect of TNF $\alpha$  on IL-10-induced STAT3 phosphorylation as analyzed by Western-Blot. Human monocytes ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were stimulated with IL-10 and GM-CSF, either individually or in combination, at the indicated concentrations for 20 min at 37°C; **Right panel:** Densitometric analysis of pSTAT3 normalized to total STAT3 in human monocytes stimulated as above;  $n \geq 3$ ; mean  $\pm$  SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; **b) Same as (a) except that human monocytes were stimulated with IL-10 and LPS at the indicated concentrations.**

**Supplemental Figure 3 (Ben-Khemis et al.)**



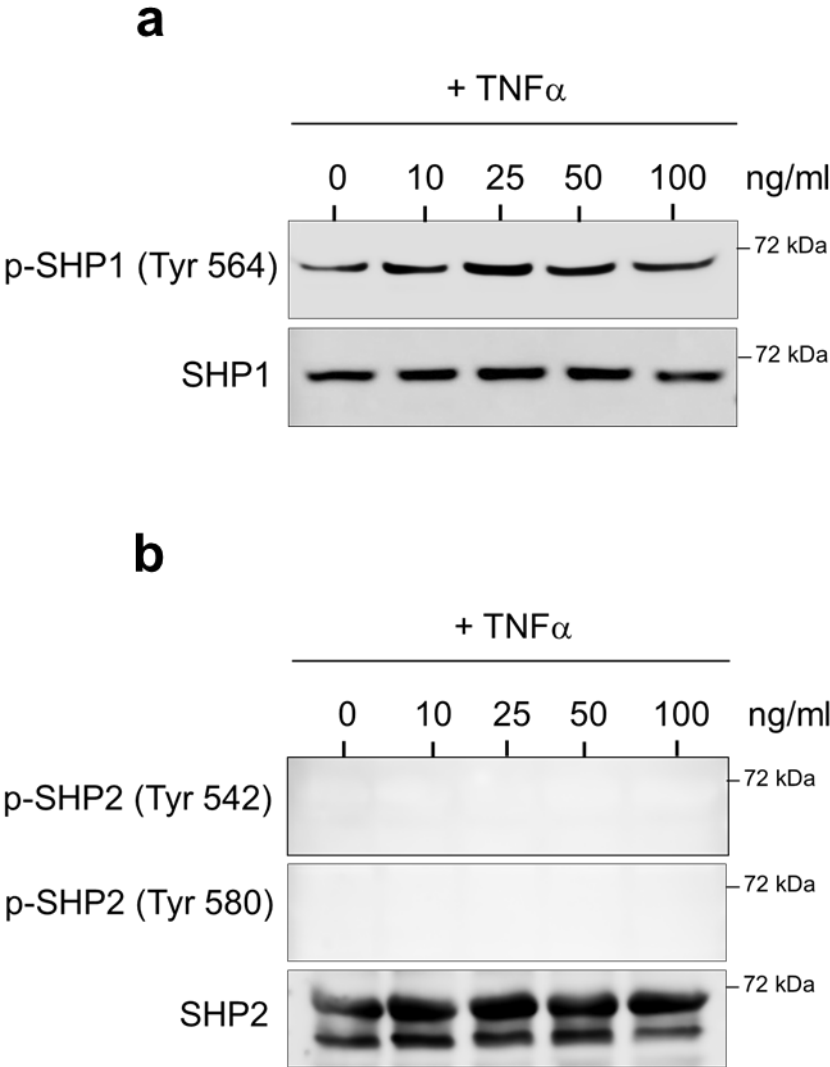
**Supplemental Figure 3:** *TNF $\alpha$  inhibitory action on IL-10-induced STAT3 phosphorylation in 1 $\alpha$ ,25 D3 differentiated HL-60 cells involves a SHP1/2 phosphatase. a) Left panel: NSC-87877 (50  $\mu$ M) prevented TNF $\alpha$  inhibitory action on IL-10-induced STAT3 phosphorylation in 1 $\alpha$ ,25 D3 differentiated HL-60 cells as analyzed by Western-Blot. Right panel: Densitometric analysis of pSTAT3 normalized to total STAT3 in 1 $\alpha$ ,25 D3 differentiated HL-60 cells, stimulated as above in the presence or absence of NSC-87877; n=3; mean $\pm$ SEM; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; \*\*p<0.01; b) Effect of NSC-87877 (50  $\mu$ M) on the phosphorylation of STAT3 induced by IL-10 (12.5ng/ml) in  $\alpha$ ,25 D3 differentiated HL-60 cells.*

**Supplemental Figure 4 (Ben-Khemis et al.)**



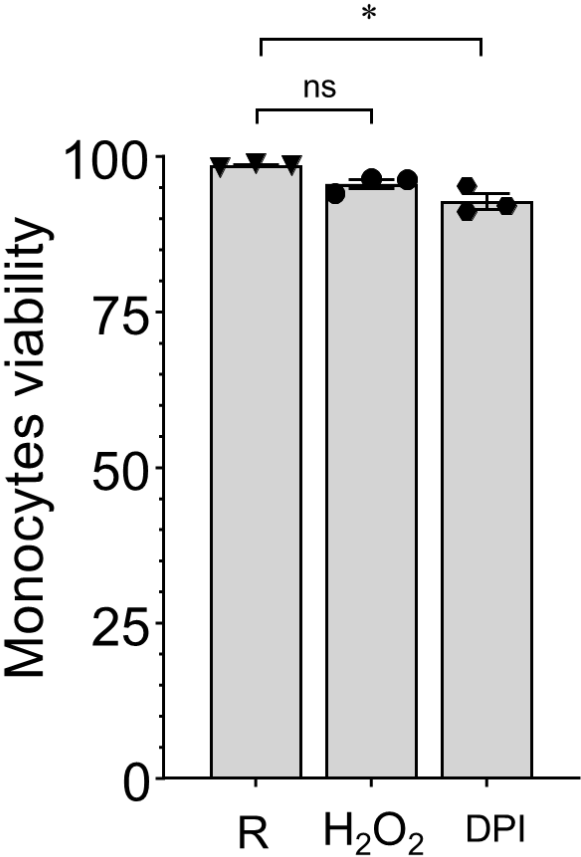
**Supplemental Figure 4:** *NSC-87877 restored IL-10-induced expression of SOCS3 that was reduced by TNF $\alpha$  in human monocytes.* Human monocytes ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were stimulated with IL-10 (12.5 ng/ml) and TNF $\alpha$  (100 ng/ml), either individually or in combination, in the presence or absence of NSC-87877 (50  $\mu$ M) for 20 min at 37°C. Representative of 2 experiments.

**Supplemental Figure 5** (Ben-Khemis et al.)



**Supplemental Figure 5:** Concentration-dependent effect of TNF $\alpha$  on: **a)** SHP1(Tyr 564) phosphorylation; **b)** SHP2 (Tyr 542) and SHP2 (Tyr 580) phosphorylation analyzed by Western-Blot.

**Supplemental Figure 6** (*Ben-Khemis et al.*)



**Supplemental Figure 6:** Monocytes,  $5 \times 10^6$  cells/ml in HBSS, were treated with DPI (50  $\mu$ M) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) for 30 min at 37°C, and viability was assessed using Trypan blue staining. Results are presented as the percentage of viable cells.

## DISCUSSION

Les voies de signalisation médiées par les cytokines jouent un rôle central dans la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires chroniques. Le rôle critique du TNF $\alpha$  a été ainsi incontestablement démontré par l'efficacité clinique des thérapies biologiques ciblant cette cytokine dans les maladies inflammatoires chroniques telle que la polyarthrite rhumatoïde (PR) (McInnes and Schett, 2011). La PR est une maladie chronique, inflammatoire, auto-immune sévère, d'étiologie multifactorielle, qui affecte principalement les articulations provoquant une destruction irréversible des os et du cartilage (Alam et al., 2017). Dans la PR, le TNF $\alpha$  occupe une position hiérarchique dominante dans le réseau de cytokines car l'inhibition de sa bioactivité dans les cultures de cellules mononucléées issues de la synoviale de patients arthritique inhibe également la libération d'autres cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1, l'IL-6 et le GM-CSF (Brennan and McInnes, 2008). Par ailleurs, les monocytes jouent un rôle central dans l'initiation et le maintien de l'inflammation de la membrane synoviale articulaire dans la PR en produisant des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF $\alpha$ , ainsi que de FRO qui contribuent à la perpétuation du processus inflammatoire de la PR. Ils se différencient également en macrophages inflammatoires pour favoriser l'inflammation et en ostéoclastes spécialisés dans la résorption osseuse (Rana et al., 2018). L'IL-10 a été considérée comme un outil thérapeutique prometteur dans le traitement de la PR en raison de sa capacité à désactiver les fonctions pro-inflammatoires des monocytes et les macrophages (Moore et al., 2001). Cependant, l'administration d'IL-10 chez les patients atteints de PR n'a montré aucun bénéfice clinique évident (Castillo and Kolls, 2016). La raison de cette incapacité de l'IL-10 à limiter l'inflammation chez les patients atteints de PR n'est pas connue. Nous avons émis l'hypothèse que l'environnement inflammatoire pourrait interférer avec la signalisation de l'IL-10.

Au cours de ce travail de thèse nous avons pu montrer que le TNF $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire majeure dans la PR, inhibe la signalisation de l'IL-10 dans les monocytes humains. Nous avons en effet découvert que le TNF $\alpha$  active la tyrosine phosphatase SHP1, par l'intermédiaire de l'axe NOX2-ROS-Lyn pour empêcher la phosphorylation de STAT3 induite par l'IL-10 dans les monocytes humains. L'inhibition de la phosphorylation de STAT3 par le TNF $\alpha$  entraîne une diminution de la capacité de l'IL-10 à induire l'expression de SOCS3, un facteur anti-inflammatoire majeur. Nous avons également observé que le TNF $\alpha$  semble empêcher l'un des rôles fondamentaux de l'IL-10 à savoir son effet inhibiteur sur la sécrétion

des cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique des phosphatases SHP1/SHP2 *in vivo* chez la souris protège contre l'arthrite induite par les anticorps anti-collagène. Notre travail révèle ainsi que SHP1 pourrait contribuer aux fonctions néfastes du TNF $\alpha$  en empêchant l'IL-10 d'exercer son activité anti-inflammatoire, *via* la régulation négative de la signalisation STAT3.

## I. Le TNF $\alpha$ interfère avec la voie de signalisation de l'IL-10 *via* l'activation de SHP1.

La phosphorylation et la déphosphorylation des protéines est un mécanisme de régulation extrêmement important dans la plupart des processus cellulaires tels que la synthèse des protéines, la division cellulaire, ou encore la transduction du signal, car de nombreuses enzymes et de nombreux récepteurs sont activés et désactivés *via* des événements de phosphorylation/déphosphorylation dus à des kinases et à des phosphatases spécifiques (Ardito et al., 2017). La tyrosine phosphatase contenant le domaine SH2 -1, dite aussi SHP-1, est une protéine de 65 kDa exprimée principalement par les cellules hématopoïétiques qui agit comme un régulateur négatif de la signalisation dans les cellules immunitaires innées et adaptatives (Abram and Lowell, 2017). SHP1 exerce sa fonction inhibitrice de la signalisation en se liant au niveau de motifs ITIM sur une variété d'immuno-récepteurs (Huang et al., 2003). Lors de sa liaison et de son activation, SHP1 va déphosphoryler ses substrats, transduisant ainsi des signaux inhibiteurs qui restreignent la fonction des cellules immunitaires. De nombreuses études existent concernant l'effet inhibiteur de SHP-1 sur la transduction des immuno-récepteurs pro-inflammatoires. En revanche, la littérature demeure assez pauvre par rapport à son effet négatif sur les immuno-récepteurs anti-inflammatoires. En effet, seule une étude en 1998 a démontré que SHP-1 est un régulateur négatif de la transduction du signal de l'IL-4 et de l'IL-13 (Haque et al., 1998). Notre étude dévoile une nouvelle fonction de régulation négative de SHP1 sur la signalisation des récepteurs de l'IL-10 dans les monocytes humains. Nous avons ainsi montré que l'inhibiteur sélectif des phosphatases de type SHP1/2, le NSC-87877, était capable de restaurer la signalisation de l'IL-10 et d'empêcher l'action inhibitrice du TNF $\alpha$  sur la phosphorylation de STAT3 et l'expression de SOCS3.

Les monocytes humains expriment à la fois SHP1 et SHP2, mais nous avons constaté que seul SHP1 pouvait être activé par le TNF $\alpha$ , ce qui indique que l'action inhibitrice du TNF $\alpha$  sur la signalisation de l'IL-10 est probablement médiée par SHP1 mais pas par SHP2. En effet, nous avons utilisé deux anticorps dirigés contre deux sites différents représentatifs de l'état



d'activation de SHP2, les tyrosines (Tyr) 542 et 580 (Araki et al., 2003) et aucun des deux n'a donné de signal en réponse au TNF $\alpha$  dans les monocytes humains. Cette différence de réponse de ces enzymes homologues n'est pas un résultat surprenant et est bien renseignée dans la littérature. En effet, SHP-2 a une topologie structurale similaire à SHP-1, mais contrairement à SHP-1, il est exprimé de manière ubiquitaire. Mise à part cette homologie structurale, la fonction cellulaire assurée par ces enzymes diffère nettement. Ceci est dû aux différences dans les résidus d'acides aminés formant les domaines SH2 impliqués dans la liaison de ces protéines avec les résidus phosphotyrosines sur la molécule substrat (Lorenz, 2009). SHP-1 est un régulateur négatif bien connu des voies de signalisation cellulaire alors que SHP-2 favorise la prolifération, la différenciation et la croissance cellulaire (Mannell and Krotz, 2014). Dans le but de confirmer le rôle de SHP-1, nous avons utilisé le TPI-1 qui a été décrit comme un inhibiteur sélectif de SHP1 (Kundu et al., 2010) mais cet inhibiteur n'a montré aucun effet. La sélectivité et la spécificité du TPI-1 n'ont pas été complètement établies et une réactivité aspécifique a même été suggérée, ce qui pourrait expliquer ce résultat (Myers et al., 2020). Une autre molécule, le Sodium Stibogluconate (SSG) a également été décrite comme inhibiteur sélectif de SHP-1 (Pathak and Yi, 2001) mais la spécificité et la sélectivité ont également été remise en cause. Ainsi, il n'existe pas encore à l'heure actuelle de molécules spécifiques antagonistes de SHP-1. Cependant, le fait que l'inhibition de STAT3 induite par le TNF $\alpha$  puisse être annulée par le NSC-87877, qui lui est réellement spécifique des SHP1/2 (Chen et al., 2006), et le fait que la déphosphorylation de STAT3 puisse être observée en même temps qu'une augmentation de la phosphorylation de SHP1 sur la Tyr-564 en réponse au TNF $\alpha$  appuient fortement l'implication de SHP1.

## II. Les FRO produites par NOX2 en réponse au TNF $\alpha$ sont impliquées dans l'activation de SHP1 et l'inhibition de la voie de signalisation de l'IL-10.

Nous avons démontré dans cette étude que l'activation de SHP1 par le TNF $\alpha$  dépend des FRO et plus particulièrement des FRO produites par NOX2. En effet, nous avons montré que d'une part, le DPI, un inhibiteur sélectif de NOX2, a pu inhiber la phosphorylation de SHP1 induite par le TNF $\alpha$ , et que d'autre part, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a pu récapituler l'effet du TNF $\alpha$ . Or, les connaissances générales associent plutôt les FRO à l'inactivation des phosphatases. En effet, les protéines tyrosines phosphatases contiennent un résidu cystéine au

niveau de leur site catalytique qui peut être oxydé en acide sulfénique pouvant former un pont disulfure avec une cystéine voisine et rendant ainsi la protéine inactive (Corcoran and Cotter, 2013). Une ancienne étude a d'ailleurs montré *in vitro* que l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la protéine recombinante SHP-1 entraîne son inhibition et qu'en revanche, l'ajout d'antioxydants tels que la NAC ou le GSH reverse l'inhibition de l'activité de SHP-1 (Cunnick et al., 1998). Cependant, une autre étude plus récente a obtenu des résultats similaires aux nôtres à savoir une phosphorylation de SHP1 induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des cellules B spléniques de souris et des fibroblastes embryonnaires de souris (Patterson et al., 2015). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les FRO n'iraient pas agir directement sur la protéine SHP-1 mais, sur des cibles en amont de la cascade de signalisation.

En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que Lyn était le régulateur en amont de l'activation de SHP1 en réponse au TNF $\alpha$  et au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, l'utilisation du bafetinib, un inhibiteur sélectif de Lyn, empêche la phosphorylation de SHP1 sur la Tyr-564 dans les monocytes humains stimulés par le TNF $\alpha$ , ou traités par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, l'inhibition de STAT3 par le TNF $\alpha$  et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est également reversée en présence du bafetinib. Il a été démontré que Lyn agit comme une sonde rédox et que son oxydation sur des résidus cystéine en particulier la cystéine 466 est responsable de son activation directe (Yoo et al., 2011). Une étude réalisée dans des neutrophiles de souris a montré que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que les FRO produits par NOX2 sont capables d'activer Lyn ce qui est en cohérence avec nos résultats obtenus dans les monocytes humains (Fang et al., 2018). De plus, Lyn a été démontré être le régulateur en amont de l'activation de SHP1 dans les lymphocytes B et les cellules souches hématopoïétiques (Tibaldi et al., 2011; Xiao et al., 2010). Contrairement à SHP1, aucune étude à l'heure actuelle indique que SHP2 puisse être phosphorylé sur les Tyr 542 et 580 par Lyn, à notre connaissance. Cette différence fondamentale dans la régulation de SHP1 et SHP2 pourrait expliquer leur comportement différent en réponse au TNF $\alpha$  et au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les monocytes humains. Ainsi, nous avons montré dans ce travail que les FRO produites par NOX2 qui sont connus pour causer des dommages cellulaires et tissulaires en ciblant les macromolécules biologiques, exercent également leur effet délétère en modulant la signalisation cellulaire. Plus précisément, nous avons montré que les FRO produites en réponse au TNF $\alpha$ , activent la tyrosine kinase rédox sensible, Lyn, qui à son tour va activer le SHP1 en la phosphorylant sur la Tyr-564 ; la SHP1 ainsi activée va ensuite déphosphoryler STAT3. En plus du DPI, nous avons utilisé la N-acétylcystéine (NAC), une molécule antioxydante qui agit en piégeant les FRO, afin de confirmer l'implication des FRO dans le phénomène d'inhibition de la voie de l'IL-10 par le

TNF $\alpha$ . Cependant, contrairement au DPI, la NAC n'a pas inhibé la phosphorylation de SHP1 ni reversé la phosphorylation de STAT3. Il a été décrit que la NAC possède en fait une réactivité limitée avec les FRO et que les taux de réaction de la NAC avec les principaux FRO sont lents, ce qui pourrait expliquer les données observées. Nous avons enfin constaté que les monocytes humains sont remarquablement résistants au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> car une concentration minimale de 1 mM est nécessaire pour observer l'inhibition de la phosphorylation de STAT3 induite par l'IL-10, et l'activation de SHP1. Cette résistance au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a également été observée dans d'autres cellules primaires telles que les lymphocytes B et les astrocytes (Tibaldi et al., 2011).

### III. L'inhibition pharmacologique des SHP1/2 *in vivo* confère aux souris une protection contre l'arthrite expérimentale.

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire caractérisée par une présence anormale de cellules immunitaires au sein de la membrane synoviale entraînant une libération accrue de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. De toutes les cytokines pro-inflammatoires, le TNF $\alpha$  joue un rôle prédominant et est retrouvée en abondance chez les patients arthritiques. Par ailleurs, l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, est retrouvée également en grande quantité dans le sérum et le liquide synovial (Cush et al., 1995). Cependant, malgré la forte présence d'IL-10, l'inflammation n'est pas contrôlée et l'administration systémique d'IL-10 recombinante chez des patients arthritiques a montré peu d'efficacité (Clair, 1999; Roon et al., 2003) ce qui suggère un mécanisme de résistance à l'IL-10. Notre étude a révélé que le TNF $\alpha$ , non seulement exerce des effets pro-inflammatoires, mais inhibe également les signaux anti-inflammatoires de l'IL-10 dans les monocytes humains *via* SHP1. À cet égard, nous avons constaté que l'action inhibitrice du TNF $\alpha$  sur la phosphorylation de STAT3 induite par l'IL-10 provoque une diminution de l'expression de SOCS3, un facteur anti-inflammatoire majeur. De plus, nous avons observé que le TNF $\alpha$  empêche également l'IL-10 d'inhiber la sécrétion de cytokines induites par sa présence alors que de nombreuses études ont démontré la capacité de l'IL-10 à inhiber la sécrétion de cytokines (Couper et al., 2008). Ainsi, la perturbation de la signalisation de STAT3 pourrait empêcher l'IL-10 d'exercer ses fonctions anti-inflammatoires, exacerbant ainsi la réponse pro-inflammatoire des monocytes et qui pourrait de ce fait contribuer au maintien de l'inflammation dans l'articulation synoviale au cours de la PR. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de SHP1, en restaurant la signalisation de l'IL-10, pourrait permettre un meilleur contrôle des fonctions

inflammatoires et pourrait être protectrice dans la polyarthrite rhumatoïde. Nous avons par conséquent testé l'effet de l'inhibiteur pharmacologique des phosphatases SHP1/2, le NSC-87877, dans un modèle d'arthrite induite par des anticorps anti-collagène (CAIA). Ce modèle est connu pour être dépendant de l'immunité innée et est associé à une infiltration importante de monocytes/macrophages et de neutrophiles. De plus, le TNF $\alpha$  s'est avéré être crucial pour l'induction de la CAIA (Nandakumar and Holmdahl, 2006). Techniquement, ce modèle est basé sur une injection unique en intrapéritonéale d'anticorps anti-collagène suivie d'une injection de LPS au 3<sup>ème</sup> jour pour déclencher l'arthrite dans des souris BALB/c. L'effet du NSC-87877 sur l'arthrite ainsi induite, a été déterminé avec le suivi quotidien du score inflammatoire évalué par le nombre de jointures et d'articulation inflammées (Kelkka et al., 2012), par la mesure quotidienne de la taille des pattes des souris, ainsi que par histologie permettant l'analyse de l'infiltration tissulaire par les cellules inflammatoires. Nous avons observé que le NSC-87877 a un effet protecteur contre l'arthrite induite par les anticorps dirigés contre le collagène. En effet, les souris arthritiques traitées par le NSC présentent un score inflammatoire moins important que les souris arthritiques contrôles ainsi qu'un épaissement significativement plus faible des pattes. Par ailleurs, les coupes histologiques des souris arthritiques traitées présentent moins d'infiltrations par les cellules immunitaires que les souris arthritiques contrôles. Ces résultats suggèrent ainsi que SHP1/2 dans notre modèle d'arthrite favoriserait l'inflammation car l'inhibition de son activité limite le processus inflammatoire. Ce résultat est nouveau et original car dans la littérature, l'inactivation de SHP1 a été décrite comme facteur aggravant l'inflammation. En effet, il existe un modèle de souris avec des mutations spontanées dans le gène codant pour SHP1, le gène *Ptpn6*, qui affecte son expression ou sa fonction (Green and Shultz, 1975). Ces souris connues sous le nom de « motheaten » développent une maladie inflammatoire auto-immune associée à hyperactivation de plusieurs types de cellules immunitaires. Les souris motheaten meurent après quelques semaines de vie d'une pneumonite mortelle, et les animaux présentent également un certain nombre d'autres caractéristiques qui reflètent une dérégulation des cellules immunitaires innées et adaptatives, telles que la myélopoïèse accrue, une splénomégalie ou encore une inflammation de la peau (Nesterovitch et al., 2011; Tsui et al., 1993). Par ailleurs, une étude a montré que les souris transgéniques homozygotes (*Shp1-Tg+/+*) sur-exprimant SHP1 (surexpression 11 fois plus importante que les souris WT) sont résistantes à l'arthrite induite par les protéoglycanes de cartilage et que les souris transgéniques hétérozygote (*Shp1-Tg+/-*) ayant une surexpression modérée de SHP-1 (surexpression 6 fois plus importante que les souris WT) étaient partiellement résistantes à la maladie. Cette étude suggère donc contrairement à nous, que SHP1 protège contre la maladie

dans le modèle d'arthrite (Markovics et al., 2020). Ceci peut être expliqué par le fait que les deux modèles soient différents et que SHP1 se comporte différemment en fonction du modèle. En effet le modèle d'arthrite induit par les protéoglycanes est dépendant des lymphocytes T (Finnegan et al., 1999) alors que le modèle induit par les anticorps anti-collagène ne l'est pas. Or, il a été décrit que SHP1 inhibe la prolifération et les fonctions inflammatoires des LT en inhibant la signalisation induite par les récepteur des cellules T (TCR) (Lorenz, 2009). Il serait intéressant de tester dans notre étude le comportement des souris *Shp1-Tg<sup>+/+</sup>* avec notre modèle d'arthrite induit par les anticorps anti-collagène ainsi que d'analyser la signalisation de l'IL-10 dans les monocyte/macrophages de ces souris. Aucune étude avec notre modèle CAIA n'a été réalisé concernant l'impact de SHP1 permettant une confrontation réelle de nos résultats. En revanche, nous avons montré que NOX2 est en amont de SHP1 et régule positivement son activité *via* la production de FRO. Il est intéressant de noter à ce propos, que les souris mutantes pour le gène *Ncf1* (codant pour la sous-unité p47phox) et dépourvues de NOX2 fonctionnelle présentent également une arthrite moins sévère dans le modèle CAIA (Kelkka et al., 2012). Enfin, nous avons montré que la kinase redox sensible Lyn, qui est activée par le TNF $\alpha$  ainsi que par les FRO produites par NOX2, contrôle l'activation de SHP1, et est de ce fait impliquée dans l'inhibition de la voie de l'IL-10 et l'exacerbation de l'inflammation. Une étude a montré que la délétion de Lyn seule n'a pas d'effet sur la PR dans un modèle d'arthrite induite par transfert de sérum arthritogène provenant de souris K/BxN. En revanche, les souris dépourvues des kinases de la famille Src, Hck, Fgr et Lyn étaient complètement protégées de l'arthrite (Kovács et al., 2014). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le rôle de Lyn dans l'exacerbation de l'inflammation est compensé par l'action des autres tyrosines kinases étant donné la complexité de la signalisation intracellulaire.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour conclure, notre étude a révélé que le  $TNF\alpha$ , la cytokine pro-inflammatoire clé dans la polyarthrite rhumatoïde, perturbe la signalisation de l'IL-10 *via* l'axe NOX2-ROS-Lyn-SHP1 dans les monocytes humain (Figure 18) et que l'inhibition pharmacologique de SHP1/2 *in vivo* a un effet protecteur dans le modèle murin d'arthrite induite par les anticorps anti-collagène. Cependant, quelques points restent à approfondir pour finaliser cette étude. Ainsi, il serait intéressant d'analyser l'état d'activation de STAT3 ainsi que l'expression de SOCS3 dans les souris arthritiques traitées ou non par l'inhibiteur de SHP1/2, de démontrer l'oxydation de Lyn par les FRO issus de NOX2, et de trouver un moyen de tester l'impact de l'inhibition de SHP1 seule dans la polyarthrite rhumatoïde. Finalement, il serait intéressant de tester l'effet de l'inhibition de SHP1 dans d'autres modèles de maladies inflammatoires dépendant du  $TNF\alpha$  telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'ensemble de cette étude met ainsi en lumière une nouvelle propriété du  $TNF\alpha$  à savoir l'exacerbation de l'inflammation par l'intermédiaire de l'inhibition de la voie anti-inflammatoire majeure, celle de l'IL-10. Cette propriété du  $TNF\alpha$  pourrait être responsable de l'échec des thérapeutiques anti-inflammatoires reposant sur l'administration de l'IL-10. Ainsi, cette nouvelle découverte pourrait être utile pour exploiter de façon optimale l'IL-10 dans le but de traiter les maladies inflammatoires.

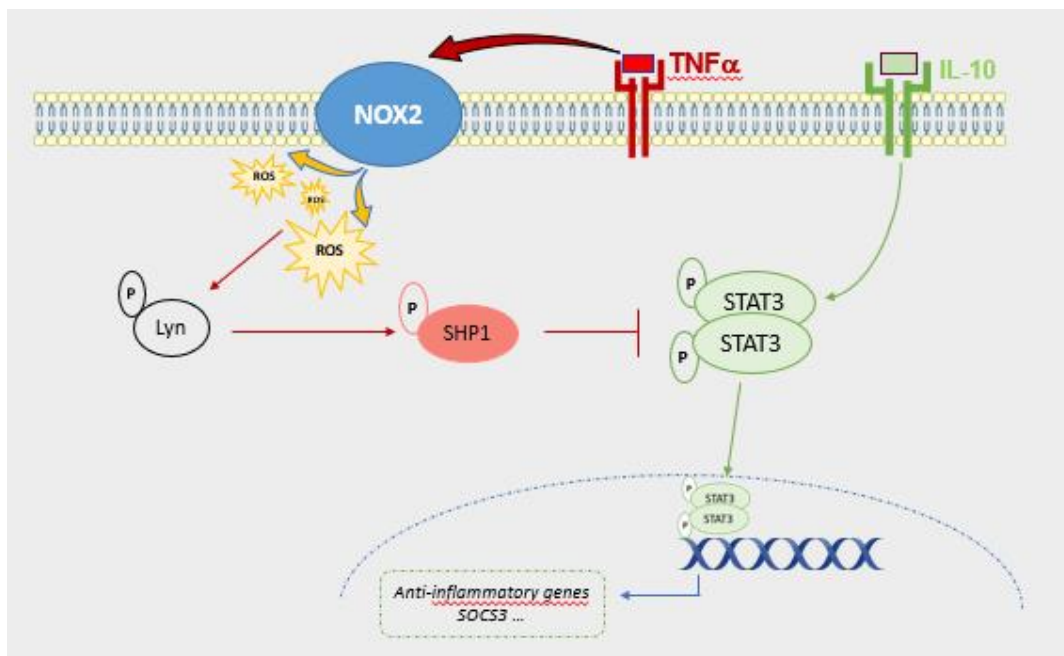


Figure 18 : Le  $TNF\alpha$  perturbe la signalisation de l'IL-10 *via* l'axe NOX2-ROS-Lyn-SHP1 dans les monocytes.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abram, C.L., Lowell, C.A., 2017. Shp1 function in myeloid cells. *J Leukoc Biol* 102, 657–675.
- Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787.
- Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annual Review of Immunology* 17, 593–623.
- Ago, T., Takeya, R., Hiroaki, H., Kuribayashi, F., Ito, T., Kohda, D., Sumimoto, H., 2001. The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 733–738.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197.
- Alam, J., Jantan, I., Bukhari, S.N.A., 2017. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 92, 615–633.
- Albrich, J.M., McCarthy, C.A., Hurst, J.K., 1981. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 210–214.
- Alexander, W.S., Hilton, D.J., 2004. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 22, 503–529.
- Al-Rashoudi, R., Moir, G., Al-Hajjaj, M.S., Al-Alwan, M.M., Wilson, H.M., Crane, I.J., 2019. Differential expression of CCR2 and CX3CR1 on CD16+ monocyte subsets is associated with asthma severity. *Allergy Asthma Clin Immunol* 15, 64.
- Alvaro-Gracia, J.M., Zvaifler, N.J., Brown, C.B., Kaushansky, K., Firestein, G.S., 1991. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 146, 3365–3371.
- Ambasta, R.K., Kumar, P., Griendling, K.K., Schmidt, H.H.H.W., Busse, R., Brandes, R.P., 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 279, 45935–45941.
- Amoruso, A., Sola, D., Rossi, L., Obeng, J.A., Fresu, L.G., Sainaghi, P.P., Pirisi, M., Brunelleschi, S., 2016. Relation among anti-rheumatic drug therapy, CD14(+)CD16(+) blood monocytes and disease activity markers (DAS28 and US7 scores) in rheumatoid arthritis: A pilot study. *Pharmacol Res* 107, 308–314.
- Ancuta, P., Wang, J., Gabuzda, D., 2006. CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1156–1164.
- Ansari, M.A., Scheff, S.W., 2011. NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer

- disease progression. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 171–178.
- Antoniv, T.T., Ivashkiv, L.B., 2006. Dysregulation of interleukin-10–dependent gene expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis & Rheumatism* 54, 2711–2721.
- Araki, T., Nawa, H., Neel, B.G., 2003. Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. *J Biol Chem* 278, 41677–41684.
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., Muzio, L.L., 2017. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med* 40, 271–280.
- Arend, W.P., Gabay, C., 2004. Cytokines in the rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 30, 41–67, v–vi.
- Assier, E., Boissier, M.-C., Dayer, J.-M., 2010. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine* 77, 532–536.
- Auger, F.A., Berthod, F., Goulet, F., Germain, L., 1999. What is new in mechanical properties of tissue-engineered organs. *Curr Top Pathol* 93, 87–93.
- Auger, I., Sebbag, M., Vincent, C., Balandraud, N., Guis, S., Nogueira, L., Svensson, B., Cantagrel, A., Serre, G., Roudier, J., 2005. Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum* 52, 3424–3432.
- Babior, B.M., 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109, 33–44.
- Babior, B.M., 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464–1476.
- Babior, B.M., 1984. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64, 959–966.
- Babior, B.M., 1978. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 298, 659–668.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.T., 1973. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52, 741–744.
- Baeten, D., Møller, H.J., Delanghe, J., Veys, E.M., Moestrup, S.K., De Keyser, F., 2004. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum.* 50, 1611–1623.
- Baldwin, A.S., 2012. Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- $\kappa$ B: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol Rev* 246, 327–345.



- Barrett, J.P., Henry, R.J., Villapol, S., Stoica, B.A., Kumar, A., Burns, M.P., Faden, A.I., Loane, D.J., 2017. NOX2 deficiency alters macrophage phenotype through an IL-10/STAT3 dependent mechanism: implications for traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 14.
- Bartok, B., Firestein, G.S., 2010. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233, 233–255.
- Bas, S., Gauthier, B.R., Spenato, U., Stingelin, S., Gabay, C., 2004. CD14 is an acute-phase protein. *J Immunol* 172, 4470–4479.
- Bashir, S., Harris, G., Denman, M.A., Blake, D.R., Winyard, P.G., 1993. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 52, 659–666.
- Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A., Khan, F., 2016. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm. Res.* 65, 1–11.
- Bedard, K., Jaquet, V., 2012. Cell-free screening for NOX inhibitors. *Chem. Biol.* 19, 664–665.
- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- Belge, K.-U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., Ziegler-Heitbrock, L., 2002. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 168, 3536–3542.
- Beutler, B.A., 1999. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl* 57, 16–21.
- Bigley, V., Haniffa, M., Doulatov, S., Wang, X.-N., Dickinson, R., McGovern, N., Jardine, L., Pagan, S., Dimmick, I., Chua, I., Wallis, J., Lordan, J., Morgan, C., Kumararatne, D.S., Doffinger, R., van der Burg, M., van Dongen, J., Cant, A., Dick, J.E., Hambleton, S., Collin, M., 2011. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.* 208, 227–234.
- Blanchetot, C., Boonstra, J., 2008. The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18, 35–45.
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T.W., Brenner, D., 2016. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol* 26, 249–261.
- Boissier, M.-C., Semerano, L., Challal, S., Saldenber-Kermanac'h, N., Falgarone, G., 2012. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun* 39, 222–228.
- Bokoch, G.M., Zhao, T., 2006. Regulation of the Phagocyte NADPH Oxidase by Rac GTPase. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 1533–1548.
- Bonizzato, A., Russo, M.P., Donini, M., Dusi, S., 1997. Identification of a double mutation (D160V-K161E) in the p67phox gene of a chronic granulomatous disease patient.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 231, 861–863.
- Bonizzi, G., Karin, M., 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280–288.
- Borregaard, N., Heiple, J.M., Simons, E.R., Clark, R.A., 1983. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* 97, 52–61.
- Bradley, J.R., 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214, 149–160.
- Brennan, F.M., McInnes, I.B., 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 118, 3537–3545.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Krause, K.-H., 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 142, 13659.
- Brown, D.I., Griendling, K.K., 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1239–1253.
- Brown, E.J., 1995. Phagocytosis. *Bioessays* 17, 109–117.
- Brühl, H., Cihak, J., Plachý, J., Kunz-Schughart, L., Niedermeier, M., Denzel, A., Rodriguez Gomez, M., Talke, Y., Luckow, B., Stangassinger, M., Mack, M., 2007. Targeting of Gr-1+,CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56, 2975–2985.
- Busch, K., Klapproth, K., Barile, M., Flossdorf, M., Holland-Letz, T., Schlenner, S.M., Reth, M., Höfer, T., Rodewald, H.-R., 2015. Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature* 518, 542–546.
- Bustamante, J., Arias, A.A., Vogt, G., Picard, C., Galicia, L.B., Prando, C., Grant, A.V., Marchal, C.C., Hubeau, M., Chappier, A., de Beaucoudrey, L., Puel, A., Feinberg, J., Valinetz, E., Jannièrè, L., Besse, C., Boland, A., Brisseau, J.-M., Blanche, S., Lortholary, O., Fieschi, C., Emile, J.-F., Boisson-Dupuis, S., Al-Muhsen, S., Woda, B., Newburger, P.E., Condino-Neto, A., Dinauer, M.C., Abel, L., Casanova, J.-L., 2011. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat. Immunol.* 12, 213–221.
- Butler, D.M., Maini, R.N., Feldmann, M., Brennan, F.M., 1995. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw* 6, 225–230.
- Cadet, J., Wagner, J.R., 2013. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Canton, J., Khezri, R., Glogauer, M., Grinstein, S., 2014. Contrasting phagosome pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages. *Mol. Biol. Cell* 25, 3330–3341.

- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666–3670.
- Casbon, A.-J., Allen, L.-A.H., Dunn, K.W., Dinauer, M.C., 2009. Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome B localizes to the plasma membrane and Rab11-positive recycling endosomes. *J Immunol* 182, 2325–2339.
- Cassatella, M.A., 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 73, 369–509.
- Cassatella, M.A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M., Constantin, G., 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 178, 2207–2211.
- Cassetta, L., Cassol, E., Poli, G., 2011. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal* 11, 2391–2402. <https://doi.org/10.1100/2011/213962>
- Castillo, P., Kolls, J.K., 2016. IL-10: A Paradigm for Counterregulatory Cytokines. *J Immunol* 197, 1529–1530.
- Cathcart, M.K., 2004. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 23–28.
- Cathcart, M.K., McNally, A.K., Morel, D.W., Chisolm, G.M., 1989. Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. *J. Immunol.* 142, 1963–1969.
- Chang, Y.C., Segal, B.H., Holland, S.M., Miller, G.F., Kwon-Chung, K.J., 1998. Virulence of catalase-deficient aspergillus nidulans in p47(phox)<sup>-/-</sup> mice. Implications for fungal pathogenicity and host defense in chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 101, 1843–1850.
- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., Gluckman, J.C., 1997. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* 27, 431–441.
- Chen, K., Kirber, M.T., Xiao, H., Yang, Y., Keaney, J.F., 2008. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J. Cell Biol.* 181, 1129–1139.
- Chen, L., Sung, S.-S., Yip, M.L.R., Lawrence, H.R., Ren, Y., Guida, W.C., Sebt, S.M., Lawrence, N.J., Wu, J., 2006. Discovery of a novel shp2 protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Mol Pharmacol* 70, 562–570.
- Chen, M., Lam, B.K., Kanaoka, Y., Nigrovic, P.A., Audoly, L.P., Austen, K.F., Lee, D.M., 2006. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med* 203, 837–842.

- Chen, W., Wang, Q., Ke, Y., Lin, J., 2018. Neutrophil Function in an Inflammatory Milieu of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2018, 8549329.
- Cheong, C., Matos, I., Choi, J.-H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., Koh, H., Rodriguez, A., Idoyaga, J., Pack, M., Velinzon, K., Park, C.G., Steinman, R.M., 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143, 416–429.
- Chevrel, G., Garnero, P., Miossec, P., 2002. Addition of interleukin 1 (IL1) and IL17 soluble receptors to a tumour necrosis factor alpha soluble receptor more effectively reduces the production of IL6 and macrophage inhibitory protein-3alpha and increases that of collagen in an in vitro model of rheumatoid synoviocyte activation. *Ann Rheum Dis* 61, 730–733.
- Chu, C.Q., Field, M., Feldmann, M., Maini, R.N., 1991. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34, 1125–1132.
- Cicuttini, F.M., Byron, K.A., Maher, D., Wootton, A.M., Muirden, K.D., Hamilton, J.A., 1995. Serum IL-4, IL-10 and IL-6 levels in inflammatory arthritis. *Rheumatol Int* 14, 201–206.
- Clair, E.W.S., 1999. Interleukin 10 treatment for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 58, I99–I102.
- Clark, R.A., Leidal, K.G., Pearson, D.W., Nauseef, W.M., 1987. NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J. Biol. Chem.* 262, 4065–4074.
- Cohen, S.B., Katsikis, P.D., Chu, C.Q., Thomssen, H., Webb, L.M., Maini, R.N., Londei, M., Feldmann, M., 1995. High level of interleukin-10 production by the activated T cell population within the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum* 38, 946–952.
- Collins, L.E., DeCoursey, J., Soledad di Luca, M., Rochfort, K.D., Loscher, C.E., 2015. An Emerging Role for SNARE Proteins in Dendritic Cell Function. *Front Immunol* 6, 133.
- Cope, A.P., 2008. T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10 Suppl 1, S1.
- Corcoran, A., Cotter, T.G., 2013. Redox regulation of protein kinases. *The FEBS Journal* 280, 1944–1965.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology* 180, 5771–5777.
- Coutant, F., Miossec, P., 2016. Altered dendritic cell functions in autoimmune diseases: distinct and overlapping profiles. *Nat Rev Rheumatol* 12, 703–715.
- Cunnick, J.M., Dorsey, J.F., Mei, L., Wu, J., 1998. Reversible regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase activity by oxidation. *Biochem Mol Biol Int* 45, 887–894.

- Cush, J.J., Splawski, J.B., Thomas, R., McFarlin, J.E., Schulze-Koops, H., Davis, L.S., Fujita, K., Lipsky, P.E., 1995. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38, 96–104.
- Dahan, I., Issaeva, I., Gorzalczany, Y., Sigal, N., Hirshberg, M., Pick, E., 2002. Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by “peptide walking.” *J. Biol. Chem.* 277, 8421–8432.
- Dakic, A., Metcalf, D., Di Rago, L., Mifsud, S., Wu, L., Nutt, S.L., 2005. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J. Exp. Med.* 201, 1487–1502.
- Dang, P.M.-C., Elbim, C., Marie, J.-C., Chiandotto, M., Gougerot-Pocidallo, M.-A., El-Benna, J., 2006a. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J.* 20, 1504–1506.
- Dang, P.M.-C., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O.N., Gougerot-Pocidallo, M.-A., El-Benna, J., 2006b. A specific p47phox - serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 116, 2033–2043.
- Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C.K., Roy, S., 2015. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am. J. Pathol.* 185, 2596–2606.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., Taylor, P.R., 2013. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995.
- Del Prete, G., De Carli, M., D’Elios, M.M., Fleckenstein, I.M., Fickenscher, H., Fleckenstein, B., Almerigogna, F., Romagnani, S., 1994. Polyclonal B cell activation induced by herpesvirus saimiri-transformed human CD4+ T cell clones. Role for membrane TNF-alpha/TNF-alpha receptors and CD2/CD58 interactions. *J Immunol* 153, 4872–4879.
- del Rincón, I., Escalante, A., 2003. Atherosclerotic cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 5, 278–286.
- DeLeo, F.R., Burritt, J.B., Yu, L., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C., Nauseef, W.M., 2000. Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J. Biol. Chem.* 275, 13986–13993.
- Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M.S., Dwyer, D., Korb, A., Smolen, J., Hoffmann, M., Scheinecker, C., van der Heide, D., Landewe, R., Lacey, D., Richards, W.G., Schett, G., 2007. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 13, 156–163.
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., Snyderman, R., 1989. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* 264, 16378–16382.
- Diebold, B.A., Bokoch, G.M., 2001. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH

- oxidase. *Nat. Immunol.* 2, 211–215.
- Duffield, J.S., Lupper, M., Thannickal, V.J., Wynn, T.A., 2013. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol* 8, 241–276.
- Dusi, S., Donini, M., Rossi, F., 1996. Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. *Biochem. J.* 314 ( Pt 2), 409–412.
- Edwards, C.J., 2005. Immunological therapies for rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 73–74, 71–82.
- Eguíluz-Gracia, I., Bosco, A., Dollner, R., Melum, G.R., Lexberg, M.H., Jones, A.C., Dheyauldeen, S.A., Holt, P.G., Bækkevold, E.S., Jahnsen, F.L., 2016. Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1872-1881.e12.
- Eisenberg-Lerner, A., Kimchi, A., 2012. PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell Death Differ* 19, 788–797.
- El-Benna, J., Dang, P.M.-C., Gougerot-Pocidallo, M.-A., 2008. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 30, 279–289.
- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.-C., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Dang, P.M.-C., 2016. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev* 273, 180–193.
- Ellson, C.D., Davidson, K., Anderson, K., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., 2006a. PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation. *EMBO J.* 25, 4468–4478.
- Ellson, C.D., Davidson, K., Ferguson, G.J., O'Connor, R., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., 2006b. Neutrophils from p40phox<sup>-/-</sup> mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J. Exp. Med.* 203, 1927–1937.
- Elshabrawy, H.A., Chen, Z., Volin, M.V., Ravella, S., Virupannavar, S., Shahrara, S., 2015. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis* 18, 433–448.
- Ende, G., Poitz, D.M., Wiedemann, E., Augstein, A., Friedrichs, J., Giebe, S., Weinert, S., Werner, C., Strasser, R.H., Jellinghaus, S., 2014. TNF- $\alpha$ -mediated adhesion of monocytes to endothelial cells-The role of ephrinA1. *J Mol Cell Cardiol* 77, 125–135.
- Epelman, S., Lavine, K.J., Randolph, G.J., 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21–35.
- Fang, M.M., Barman, P.K., Thirupathi, M., Mirza, R.E., McKinney, R.D., Deng, J., Christman, J.W., Du, X., Fukai, T., Ennis, W.J., Koh, T.J., Ushio-Fukai, M., Urao, N., 2018. Oxidant Signaling Mediated by Nox2 in Neutrophils Promotes Regenerative

- Myelopoiesis and Tissue Recovery following Ischemic Damage. *The Journal of Immunology* 201, 2414–2426.
- Feinberg, M.W., Wara, A.K., Cao, Z., Lebedeva, M.A., Rosenbauer, F., Iwasaki, H., Hirai, H., Katz, J.P., Haspel, R.L., Gray, S., Akashi, K., Segre, J., Kaestner, K.H., Tenen, D.G., Jain, M.K., 2007. The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J.* 26, 4138–4148.
- Filippin, L.I., Vercelino, R., Marroni, N.P., Xavier, R.M., 2008. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 152, 415–422.
- Finnegan, A., Mikecz, K., Tao, P., Glant, T.T., 1999. Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. *J Immunol* 163, 5383–5390.
- Fischer, R., Maier, O., Siegemund, M., Wajant, H., Scheurich, P., Pfizenmaier, K., 2011. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS One* 6, e27621.
- Friedman, A.D., 2007. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 26, 6816–6828.
- Gabay, C., 2000. IL-1 inhibitors: novel agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 113–127.
- Galván-Peña, S., O'Neill, L.A.J., 2014. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* 5, 420.
- Galvão, V., Miranda, J.G.V., Andrade, R.F.S., Andrade, J.S., Gallos, L.K., Makse, H.A., 2010. Modularity map of the network of human cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5750–5755.
- Gao, H.-M., Zhou, H., Hong, J.-S., 2012. NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 295–303.
- Gartlehner, G., Hansen, R.A., Jonas, B.L., Thieda, P., Lohr, K.N., 2006. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol* 33, 2398–2408.
- Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., James, S.L., Sher, A., 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* 148, 1792–1796.
- Geisow, M.J., D'Arcy Hart, P., Young, M.R., 1981. Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy. *The Journal of Cell Biology* 89, 645–652.
- Gelderman, K.A., Hultqvist, M., Pizzolla, A., Zhao, M., Nandakumar, K.S., Mattsson, R., Holmdahl, R., 2007. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J. Clin. Invest.* 117, 3020–3028.

- Gérard, B., El Benna, J., Alcain, F., Gougerot-Pocidalò, M.A., Grandchamp, B., Chollet-Martin, S., 2001. Characterization of 11 novel mutations in the X-linked chronic granulomatous disease (CYBB gene). *Hum. Mutat.* 18, 163.
- Giannini, D., Antonucci, M., Petrelli, F., Bilia, S., Alunno, A., Puxeddu, I., 2020. One year in review 2020: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 38, 387–397.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P., 2005. Intracellular Reactive Oxygen Species Activate Src Tyrosine Kinase during Cell Adhesion and Anchorage-Dependent Cell Growth. *Mol Cell Biol* 25, 6391–6403.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., Rodewald, H.-R., 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.
- Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.
- Grage-Griebenow, E., Flad, H.D., Ernst, M., 2001a. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* 69, 11–20.
- Grage-Griebenow, E., Zawatzky, R., Kahlert, H., Brade, L., Flad, H., Ernst, M., 2001b. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur. J. Immunol.* 31, 48–56.
- Greaves, D.R., Gordon, S., 2009. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S282-286.
- Green, M.C., Shultz, L.D., 1975. Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J Hered* 66, 250–258.
- Greenhill, C.J., Jones, G.W., Nowell, M.A., Newton, Z., Harvey, A.K., Moideen, A.N., Collins, F.L., Bloom, A.C., Coll, R.C., Robertson, A.A., Cooper, M.A., Rosas, M., Taylor, P.R., O'Neill, L.A., Humphreys, I.R., Williams, A.S., Jones, S.A., 2014. Interleukin-10 regulates the inflammasome-driven augmentation of inflammatory arthritis and joint destruction. *Arthritis Research & Therapy* 16, 419.
- Gregersen, P.K., Silver, J., Winchester, R.J., 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30, 1205–1213.
- Grimm, M.C., Pullman, W.E., Bennett, G.M., Sullivan, P.J., Pavli, P., Doe, W.F., 1995. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 387–395.
- Grizot, S., Grandvaux, N., Fieschi, F., Fauré, J., Massenet, C., Andrieu, J.P., Fuchs, A., Vignais, P.V., Timmins, P.A., Dagher, M.C., Pebay-Peyroula, E., 2001. Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox.



Biochemistry 40, 3127–3133.

- Gui, T., Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T., Muragaki, Y., 2012. Diverse Roles of Macrophages in Atherosclerosis: From Inflammatory Biology to Biomarker Discovery. *Mediators of Inflammation* 2012, 1–14.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., Yona, S., 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578.
- Guilliams, M., Scott, C.L., 2017. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nat Rev Immunol* 17, 451–460.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1992. Comments on review of *Free Radicals in Biology and Medicine*, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 93–95.
- Hajizadeh, S., DeGroot, J., TeKoppele, J.M., Tarkowski, A., Collins, L.V., 2003. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5, R234-240.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007–3017.
- Han, D., Ybanez, M.D., Ahmadi, S., Yeh, K., Kaplowitz, N., 2009. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxid Redox Signal* 11, 2245–2263.
- Haque, S.J., Harbor, P., Tabrizi, M., Yi, T., Williams, B.R.G., 1998. Protein-tyrosine Phosphatase Shp-1 Is a Negative Regulator of IL-4- and IL-13-dependent Signal Transduction \*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33893–33896.
- Hart, P.H., Hunt, E.K., Bonder, C.S., Watson, C.J., Finlay-Jones, J.J., 1996. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 157, 3672–3680.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M., 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.
- Henrotin, Y.E., Bruckner, P., Pujol, J.-P.L., 2003. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 747–755.
- Higuchi, M., Nagasawa, K., Horiuchi, T., Oike, M., Ito, Y., Yasukawa, M., Niho, Y., 1997. Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation--characterization of membrane TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol* 82, 133–140.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M., Gabbiani, G., 2012. Recent developments in myofibroblast biology:

- paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 180, 1340–1355.
- Hitchon, C.A., El-Gabalawy, H.S., 2004. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6, 265–278.
- Honbou, K., Minakami, R., Yuzawa, S., Takeya, R., Suzuki, N.N., Kamakura, S., Sumimoto, H., Inagaki, F., 2007. Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J.* 26, 1176–1186.
- Hordijk, P.L., 2006. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ. Res.* 98, 453–462.
- Huang, Z.-Y., Hunter, S., Kim, M.-K., Indik, Z.K., Schreiber, A.D., 2003. The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fcγ receptors FcγRIIB and FcγRIIA. *J Leukoc Biol* 73, 823–829.
- Idriss, H.T., Naismith, J.H., 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50, 184–195.
- Iles, K.E., Forman, H.J., 2002. Macrophage Signaling and Respiratory Burst. *IR* 26, 095–106.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R.M., 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176, 1693–1702.
- Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A.J.R., Ziegler-Heitbrock, L., Randolph, G.J., 2010. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10-19.
- Iqbal, S., Kumar, A., 2015. Characterization of In vitro Generated Human Polarized Macrophages. *J Clin Cell Immunol* 06.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C.D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D.M., Penninger, J.M., 2001. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409, 349–354.
- Isomaki, P., Luukkainen, R., Saario, R., Toivanen, P., Punnonen, J., 1996. Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 39, 386–395.
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H., Nozawa-Inoue, K., 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63, 17–31.
- Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S.-I., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., Fenyus, M.L., Elf, S., Chan, S., Kastner, P., Huettner, C.S., Murray, R., Tenen, D.G., Akashi, K., 2005. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their

- differentiation. *Blood* 106, 1590–1600.
- Jaipersad, A.S., Lip, G.Y.H., Silverman, S., Shantsila, E., 2014. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 63, 1–11.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., van Rooijen, N., Grainger, J.R., Belkaid, Y., Ma'ayan, A., Riches, D.W.H., Yokoyama, W.M., Ginhoux, F., Henson, P.M., Randolph, G.J., 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599–610.
- Jenner, W., Motwani, M., Veighey, K., Newson, J., Audzevich, T., Nicolaou, A., Murphy, S., Macallister, R., Gilroy, D.W., 2014. Characterisation of leukocytes in a human skin blister model of acute inflammation and resolution. *PLoS ONE* 9, e89375.
- Jongbloed, S.L., Lebre, M.C., Fraser, A.R., Gracie, J.A., Sturrock, R.D., Tak, P.P., McInnes, I.B., 2006. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8, R15.
- Kaipainen-Seppänen, O., Kautiainen, H., 2006. Declining trend in the incidence of rheumatoid factor-positive rheumatoid arthritis in Finland 1980-2000. *J Rheumatol* 33, 2132–2138.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M., 2005. Reactive Oxygen Species Promote TNF $\alpha$ -Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. *Cell* 120, 649–661.
- Kanai, F., Liu, H., Field, S.J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G.E., Cantley, L.C., Yaffe, M.B., 2001. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell Biol.* 3, 675–678
- Katsikis, P.D., Chu, C.Q., Brennan, F.M., Maini, R.N., Feldmann, M., 1994. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 179, 1517–1527.
- Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., Tsuboi, M., Urayama, S., Kawabe, Y., Aoyagi, T., Maeda, K., Nagataki, S., 1997. Inhibitory effects of interleukin-10 on synovial cells of rheumatoid arthritis. *Immunology* 91, 252–259.
- Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y., Makino, H., 2002. CD14<sup>+</sup>,CD16<sup>+</sup> blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 2578–2586.
- Kelkka, T., Hultqvist, M., Nandakumar, K.S., Holmdahl, R., 2012. Enhancement of antibody-induced arthritis via Toll-like receptor 2 stimulation is regulated by granulocyte reactive oxygen species. *Am J Pathol* 181, 141–150.
- Kenney, R.T., Malech, H.L., Epstein, N.D., Roberts, R.L., Leto, T.L., 1993. Characterization of the p67phox gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood* 82, 3739–3744.

- Kim, M., Morales, L.D., Jang, I.-S., Cho, Y.-Y., Kim, D.J., 2018. Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Regulators of STAT3 Signaling. *Int J Mol Sci* 19.
- Kinne, R.W., Stuhl Müller, B., Burmester, G.-R., 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Macrophages. Arthritis Res Ther* 9, 224.
- Kitamura, H., Okumura, M., Sato, F., Kimoto, K., Kohama, M., Hashimoto, Y., Tagami, M., Iwanaga, T., 2001. Increased concentrations of protein gene product 9.5 in the synovial fluid from horses with osteoarthritis. *Jpn J Vet Res* 49, 115–123.
- Koch, A.E., 2005. Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: future targets? *Arthritis Rheum* 52, 710–721.
- Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F., Sumimoto, H., 1999. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 274, 25051–25060.
- Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G.-I., 2009. ROS and innate immunity. *Anticancer Res.* 29, 817–821.
- Komano, Y., Nanki, T., Hayashida, K., Taniguchi, K., Miyasaka, N., 2006. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Res Ther* 8, R152.
- Kondo, M., Weissman, I.L., Akashi, K., 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661–672.
- Koshkin, V., Pick, E., 1993. Generation of superoxide by purified and relipidated cytochrome b559 in the absence of cytosolic activators. *FEBS Lett.* 327, 57–62.
- Kotenko, S.V., Krause, C.D., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Wu, W., Pestka, S., 1997. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* 16, 5894–5903.
- Kovács, M., Németh, T., Jakus, Z., Sitaru, C., Simon, E., Futosi, K., Botz, B., Helyes, Z., Lowell, C.A., Mócsai, A., 2014. The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *J Exp Med* 211, 1993–2011.
- Kraaij, M.D., Savage, N.D.L., van der Kooij, S.W., Koekkoek, K., Wang, J., van den Berg, J.M., Ottenhoff, T.H.M., Kuijpers, T.W., Holmdahl, R., van Kooten, C., Gelderman, K.A., 2010. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17686–17691.
- Krasilnikov, M., Ivanov, V.N., Dong, J., Ronai, Z., 2003. ERK and PI3K negatively regulate STAT-transcriptional activities in human melanoma cells: implications towards sensitization to apoptosis. *Oncogene* 22, 4092–4101.
- Kumar, A., Barrett, J.P., Alvarez-Croda, D.-M., Stoica, B.A., Faden, A.I., Loane, D.J., 2016. NOX2 drives M1-like microglial/macrophage activation and neurodegeneration

- following experimental traumatic brain injury. *Brain Behav. Immun.* 58, 291–309.
- Kundu, S., Fan, K., Cao, M., Lindner, D.J., Zhao, Z.J., Borden, E., Yi, T., 2010. Novel SHP-1 inhibitors TPI-1 and analogs with pre-clinical anti-tumor activities as tolerated oral agents. *J Immunol* 184, 6529–6536.
- Kuribayashi, F., Nunoi, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T., Sumimoto, H., 2002. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* 21, 6312–6320.
- Kurotaki, D., Osato, N., Nishiyama, A., Yamamoto, M., Ban, T., Sato, H., Nakabayashi, J., Umehara, M., Miyake, N., Matsumoto, N., Nakazawa, M., Ozato, K., Tamura, T., 2013. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* 121, 1839–1849.
- Lambeth, J.D., Krause, K.-H., Clark, R.A., 2008. NOX enzymes as novel targets for drug development. *Semin Immunopathol* 30, 339–363.
- Lapouge, K., Smith, S.J.M., Groemping, Y., Rittinger, K., 2002. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J. Biol. Chem.* 277, 10121–10128.
- Lara-Guzmán, O.J., Gil-Izquierdo, Á., Medina, S., Osorio, E., Álvarez-Quintero, R., Zuluaga, N., Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., Muñoz-Durango, K., 2017. Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages. *Redox Biol* 15, 1–11.
- Lavietes, B.B., Carsons, S., Diamond, H.S., Laskin, R.S., 1985. Synthesis, secretion, and deposition of fibronectin in cultured human synovium. *Arthritis Rheum* 28, 1016–1026.
- Lefkowitz, D.L., Lefkowitz, S.S., 2001. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunol Cell Biol* 79, 502–506.
- Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., Ganz, T., 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 105–128.
- León, B., López-Bravo, M., Ardavín, C., 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519–531.
- Leonard, J.P., Waldburger, K.E., Schaub, R.G., Smith, T., Hewson, A.K., Cuzner, M.L., Goldman, S.J., 1997. Regulation of the inflammatory response in animal models of multiple sclerosis by interleukin-12. *Crit Rev Immunol* 17, 545–553.
- Leusen, J.H., Verhoeven, A.J., Roos, D., 1996. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front. Biosci.* 1, d72-90.
- Lewis, E.M., Sergeant, S., Ledford, B., Stull, N., Dinauer, M.C., McPhail, L.C., 2010.

- Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. *J. Biol. Chem.* 285, 2959–2967.
- Liao, C.-T., Andrews, R., Wallace, L.E., Khan, M.W.A., Kift-Morgan, A., Topley, N., Fraser, D.J., Taylor, P.R., 2017. Peritoneal macrophage heterogeneity is associated with different peritoneal dialysis outcomes. *Kidney Int.* 91, 1088–1103.
- Lin, Y.-J., Anzaghe, M., Schülke, S., 2020. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells* 9, E880.
- Liu, Y., Wei, S.H., Ho, A.S., de Waal Malefyt, R., Moore, K.W., 1994. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 152, 1821–1829.
- Lomax, K.J., Leto, T.L., Nunoï, H., Gallin, J.I., Malech, H.L., 1989. Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* 245, 409–412.
- Lopa, S., Leijts, M.J.C., Moretti, M., Lubberts, E., van Osch, G.J.V.M., Bastiaansen-Jenniskens, Y.M., 2015. Arthritic and non-arthritic synovial fluids modulate IL10 and IL1RA gene expression in differentially activated primary human monocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1853–1857.
- Lorenz, U., 2009. SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol Rev* 228, 342–359.
- Lőrincz, Á.M., Szarvas, G., Smith, S.M.E., Ligeti, E., 2014. Role of Rac GTPase activating proteins in regulation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 68, 65–71.
- Luettig, B., Decker, T., Lohmann-Matthes, M.L., 1989. Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J Immunol* 143, 4034–4038.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350.
- Magnani, F., Nenci, S., Millana Fananas, E., Ceccon, M., Romero, E., Fraaije, M.W., Mattevi, A., 2017. Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 6764–6769.
- Malfait, A.M., Butler, D.M., Presky, D.H., Maini, R.N., Brennan, F.M., Feldmann, M., 1998. Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis. *Clin Exp Immunol* 111, 377–383.
- Mannell, H., Krotz, F., 2014. SHP-2 regulates growth factor dependent vascular signalling and function. *Mini Rev Med Chem* 14, 471–483.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., Locati, M., 2013. Macrophage plasticity

- and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229, 176–185.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Markovics, A., Toth, D.M., Glant, T.T., Mikecz, K., 2020. Regulation of autoimmune arthritis by the SHP-1 tyrosine phosphatase. *Arthritis Res Ther* 22, 160.
- Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13, 453–461.
- Martyn, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinauer, M.C., Knaus, U.G., 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell. Signal.* 18, 69–82.
- Mateen, S., Moin, S., Khan, A.Q., Zafar, A., Fatima, N., 2016. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 11, e0152925.
- Matute, J.D., Arias, A.A., Wright, N.A.M., Wrobel, I., Waterhouse, C.C.M., Li, X.J., Marchal, C.C., Stull, N.D., Lewis, D.B., Steele, M., Kellner, J.D., Yu, W., Meroueh, S.O., Nauseef, W.M., Dinauer, M.C., 2009. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* 114, 3309–3315.
- Matzinger, P., 2002. An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* 961, 341–342.
- McInnes, I.B., Leung, B.P., Field, M., Wei, X.Q., Huang, F.P., Sturrock, R.D., Kinninmonth, A., Weidner, J., Mumford, R., Liew, F.Y., 1996. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 184, 1519–1524.
- McInnes, I.B., Schett, G., 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365, 2205–2219.
- Mellman, I., Steinman, R.M., 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255–258.
- Merad, M., Manz, M.G., 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113, 3418–3427.
- Merino, A., Buendia, P., Martin-Malo, A., Aljama, P., Ramirez, R., Carracedo, J., 2011. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J. Immunol.* 186, 1809–1815.
- Meyer, P.W.A., Hodkinson, B., Ally, M., Musenge, E., Wadee, A.A., Fickl, H., Tikly, M.,

- Anderson, R., 2010. Circulating cytokine profiles and their relationships with autoantibodies, acute phase reactants, and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2010, 158514.
- Micheau, O., 2004. To die or not to die ? un modèle de la signalisation dichotomique de TNF-R1. *Med Sci (Paris)* 20, 153–155.
- Migone, T.S., Cacalano, N.A., Taylor, N., Yi, T., Waldmann, T.A., Johnston, J.A., 1998. Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3845–3850.
- Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul, F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., Amit, I., Jung, S., 2017. Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP $\beta$  Transcription Factor Dependence of Ly6C- Cells. *Immunity* 46, 849-862.e7.
- Mitchell, A.J., Roediger, B., Weninger, W., 2014. Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. *Cell. Immunol.* 291, 22–31.
- Miyano, K., Sumimoto, H., 2007. Role of the small GTPase Rac in p22phox-dependent NADPH oxidases. *Biochimie* 89, 1133–1144.
- Miki, H., Funato, Y., 2012. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *J Biochem* 151, 255–261.
- Mochly-Rosen, D., Das, K., Grimes, K.V., 2012. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11, 937–957.
- Moelants, E.A., Mortier, A., Damme, J.V., Proost, P., 2013. Regulation of TNF- $\alpha$  with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunology & Cell Biology* 91, 393–401.
- Momberger, T.S., Levick, J.R., Mason, R.M., 2005. Hyaluronan secretion by synoviocytes is mechanosensitive. *Matrix Biol* 24, 510–519.
- Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P., Feldmann, M., 2015. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol* 27, 55–62.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683–765.
- Mostafa Mtairag, E., Chollet-Martin, S., Oudghiri, M., Laquay, N., Jacob, M.P., Michel, J.B., Feldman, L.J., 2001. Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res* 49, 882–890.
- Mukherjee, R., Kanti Barman, P., Kumar Thatoi, P., Tripathy, R., Kumar Das, B., Ravindran, B., 2015. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* 5, 13886.
- Müssener, A., Litton, M.J., Lindroos, E., Klareskog, L., 1997. Cytokine production in synovial tissue of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 107, 485–493.



- Myers, D.R., Abram, C.L., Wildes, D., Belwafa, A., Welsh, A.M.N., Schulze, C.J., Choy, T.J., Nguyen, T., Omaque, N., Hu, Y., Singh, M., Hansen, R., Goldsmith, M.A., Quintana, E., Smith, J.A.M., Lowell, C.A., 2020. Shp1 Loss Enhances Macrophage Effector Function and Promotes Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol* 11, 576310.
- Naismith, J.H., Devine, T.Q., Brandhuber, B.J., Sprang, S.R., 1995. Crystallographic evidence for dimerization of unliganded tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem* 270, 13303–13307.
- Nakanishi, A., Hie, M., Iitsuka, N., Tsukamoto, I., 2013. A crucial role for reactive oxygen species in macrophage colony-stimulating factor-induced RANK expression in osteoclastic differentiation. *International Journal of Molecular Medicine* 31, 874–880.
- Nakano, H., Lin, K.L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D.N., Kakiuchi, T., Gunn, M.D., 2009. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* 10, 394–402.
- Nakashima, T., Takayanagi, H., 2008. The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Arch Biochem Biophys* 473, 166–171.
- Nandakumar, K.S., Holmdahl, R., 2006. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res Ther* 8, 223.
- Naudé, P.J.W., den Boer, J.A., Luiten, P.G.M., Eisel, U.L.M., 2011. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J* 278, 888–898.
- Nerlov, C., Graf, T., 1998. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12, 2403–2412.
- Nesterovitch, A.B., Gyorfy, Z., Hoffman, M.D., Moore, E.C., Elbuluk, N., Trynieszewska, B., Rauch, T.A., Simon, M., Kang, S., Fisher, G.J., Mikecz, K., Tharp, M.D., Glant, T.T., 2011. Alteration in the gene encoding protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 6 (PTPN6/SHP1) may contribute to neutrophilic dermatoses. *Am J Pathol* 178, 1434–1441.
- Niemand, C., Nimmegern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P.C., Müller-Newen, G., 2003. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 170, 3263–3272.
- Niuro, H., Otsuka, T., Tanabe, T., Hara, S., Kuga, S., Nemoto, Y., Tanaka, Y., Nakashima, H., Kitajima, S., Abe, M., 1995. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood* 85, 3736–3745.
- Nisimoto, Y., Ogawa, H., Miyano, K., Tamura, M., 2004. Activation of the flavoprotein domain of gp91phox upon interaction with N-terminal p67phox (1-210) and the Rac complex. *Biochemistry* 43, 9567–9575.

- Nurcombe, H.L., Bucknall, R.C., Edwards, S.W., 1991. Activation of the neutrophil myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by synovial fluid isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 50, 237–242.
- Nygaard, G., Firestein, G.S., 2020. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes. *Nat Rev Rheumatol* 16, 316–333.
- Okamoto, K., Takayanagi, H., 2011a. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Res Ther* 13, 219.
- Okamoto, K., Takayanagi, H., 2011b. Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *Int Immunopharmacol* 11, 543–548.
- Okura, Y., Yamada, M., Kuribayashi, F., Kobayashi, I., Ariga, T., 2015. Monocyte/macrophage-Specific NADPH Oxidase Contributes to Antimicrobial Host Defense in X-CGD. *J Clin Immunol* 35, 158–167.
- O’Neil, L.J., Kaplan, M.J., 2019. Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance and Fueling Disease. *Trends Mol Med* 25, 215–227.
- Ong, S.-M., Hadadi, E., Dang, T.-M., Yeap, W.-H., Tan, C.T.-Y., Ng, T.-P., Larbi, A., Wong, S.-C., 2018. The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. *Cell Death Dis* 9, 266.
- Ostman, A., Frijhoff, J., Sandin, A., Böhmer, F.-D., 2011. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *J Biochem* 150, 345–356.
- Ovchinnikov, D.A., 2008. Macrophages in the embryo and beyond: much more than just giant phagocytes. *Genesis* 46, 447–462.
- Paclet, M.-H., Berthier, S., Kuhn, L., Garin, J., Morel, F., 2007. Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome b558 activation states. *FASEB J.* 21, 1244–1255.
- Paleolog, E.M., 2002. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3, S81-90.
- Paletta-Silva, R., Meyer-Fernandes, J.R., 2012. Macrophage plasticity and polarization: Cell signaling mechanisms and roles in immunity. *Handbook of Macrophages: Life Cycle, Functions and Diseases* 147–174.
- Paranjape, A.R., Ryan, J.J., 2016. An antagonistic role for Fyn and Lyn kinases in autoimmune arthritis. *The Journal of Immunology* 196, 59.26-59.26.
- Park, H.S., Lee, S.M., Lee, J.H., Kim, Y.S., Bae, Y.S., Park, J.W., 2001. Phosphorylation of the leucocyte NADPH oxidase subunit p47(phox) by casein kinase 2: conformation-dependent phosphorylation and modulation of oxidase activity. *Biochem. J.* 358, 783–790.
- Passlick, B., Flieger, D., Ziegler-Heitbrock, H.W., 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527–2534.

- Pathak, M.K., Yi, T., 2001. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J Immunol* 167, 3391–3397.
- Patterson, H.C., Gerbeth, C., Thiru, P., Vögtle, N.F., Knoll, M., Shahsafaei, A., Samocha, K.E., Huang, C.X., Harden, M.M., Song, R., Chen, C., Kao, J., Shi, J., Salmon, W., Shaul, Y.D., Stokes, M.P., Silva, J.C., Bell, G.W., MacArthur, D.G., Ruland, J., Meisinger, C., Lodish, H.F., 2015. A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E5679-5688.
- Phull, A.-R., Eo, S.-H., Abbas, Q., Ahmed, M., Kim, S.J., 2016. Applications of Chondrocyte-Based Cartilage Engineering: An Overview. *Biomed Res Int* 2016, 1879837.
- Phull, A.-R., Nasir, B., Haq, I. ul, Kim, S.J., 2018. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chemico-Biological Interactions* 281, 121–136.
- Pickl, W.F., Majdic, O., Kohl, P., Stöckl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., Knapp, W., 1996. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14<sup>+</sup> peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 157, 3850–3859.
- Pikwer, M., Bergström, U., Nilsson, J.-Å., Jacobsson, L., Turesson, C., 2012. Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 71, 378–381.
- Pletnev, S., Magracheva, E., Wlodawer, A., Zdanov, A., 2005. A model of the ternary complex of interleukin-10 with its soluble receptors. *BMC Struct Biol* 5, 10.
- Porta, C., Riboldi, E., Ippolito, A., Sica, A., 2015. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin. Immunol.* 27, 237–248.
- Porter, C.D., Parkar, M.H., Verhoeven, A.J., Levinsky, R.J., Collins, M.K., Kinnon, C., 1994. p22-phox-deficient chronic granulomatous disease: reconstitution by retrovirus-mediated expression and identification of a biosynthetic intermediate of gp91-phox. *Blood* 84, 2767–2775.
- Quinn, M.T., Gauss, K.A., 2004. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J. Leukoc. Biol.* 76, 760–781.
- Rana, A.K., Li, Y., Dang, Q., Yang, F., 2018. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int Immunopharmacol* 65, 348–359.
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., Muller, W.A., 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753–761.
- Redpath, S., Ghazal, P., Gascoigne, N.R., 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 9, 86–92.

- Rees, M.D., Hawkins, C.L., Davies, M.J., 2004. Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. *Biochem J* 381, 175–184.
- Robbins, C.S., Swirski, F.K., 2010. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2685–2693.
- Roberts, C.A., Dickinson, A.K., Taams, L.S., 2015. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 6, 571.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., Schuler, G., 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *The Journal of Experimental Medicine* 180, 83–93.
- Roon, J. van, Wijngaarden, S., Lafeber, F.P.J.G., Damen, C., Winkel, J. van de, Bijlsma, J.W.J., 2003. Interleukin 10 treatment of patients with rheumatoid arthritis enhances Fc gamma receptor expression on monocytes and responsiveness to immune complex stimulation. *The Journal of Rheumatology* 30, 648–651.
- Roos, D., de Boer, M., Kuribayashi, F., Meischl, C., Weening, R.S., Segal, A.W., Ahlin, A., Nemet, K., Hossle, J.P., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., Middleton-Price, H., 1996. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 87, 1663–1681.
- Rossi, F., Zatti, M., 1964. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 20, 21–23.
- Roux, C.H., Saraux, A., Le Bihan, E., Fardellone, P., Guggenbuhl, P., Fautrel, B., Masson, C., Chary-Valckenaere, I., Cantagrel, A., Juvin, R., Flipo, R.-M., Euller-Ziegler, L., Coste, J., Guillemin, F., 2007. Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: geographical variations in prevalence in France. *J Rheumatol* 34, 117–122.
- Russell, D.G., Vandervan, B.C., Glennie, S., Mwandumba, H., Heyderman, R.S., 2009. The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 594–600.
- Ryan, G.R., Dai, X.M., Dominguez, M.G., Tong, W., Chuan, F., Chisholm, O., Russell, R.G., Pollard, J.W., Stanley, E.R., 2001. Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood* 98, 74–84.
- Sabio, G., Davis, R.J., 2014. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol* 26, 237–245.
- Safiri, S., Kolahi, A.A., Hoy, D., Smith, E., Bettampadi, D., Mansournia, M.A., Almasi-Hashiani, A., Ashrafi-Asgarabad, A., Moradi-Lakeh, M., Qorbani, M., Collins, G., Woolf, A.D., March, L., Cross, M., 2019. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Ann Rheum Dis* 78, 1463–1471.

- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118.
- Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U.D., Bethunaickan, R., 2018. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol* 9, 1726.
- Sánchez-Torres, C., García-Romo, G.S., Cornejo-Cortés, M.A., Rivas-Carvalho, A., Sánchez-Schmitz, G., 2001. CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4<sup>+</sup> T cells. *Int. Immunol.* 13, 1571–1581.
- Saraiva, M., O’Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10, 170–181.
- Sarkar, S., Fox, D.A., 2005. Dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 10, 656–665.
- Schaffner, A., Douglas, H., Braude, A., 1982. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J. Clin. Invest.* 69, 617–631.
- Schandené, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., Devos, R., de Boer, M., Goldman, M., 1994. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 152, 4368–4374.
- Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhuf, D., Kerr, I.M., Heinrich, P.C., 1998. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 335 ( Pt 3), 557–565.
- Scherer, H.U., Häupl, T., Burmester, G.R., 2020. The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, In honour of Professor Josef S. Smolen 110, 102400.
- Schett, G., Gravallesse, E., 2012. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 8, 656–664.
- Schlitt, A., Heine, G.H., Blankenberg, S., Espinola-Klein, C., Dopheide, J.F., Bickel, C., Lackner, K.J., Iz, M., Meyer, J., Darius, H., Rupprecht, H.J., 2004. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb. Haemost.* 92, 419–424.
- Schultz, H.S., Guo, L., Keller, P., Fleetwood, A.J., Sun, M., Guo, W., Ma, C., Hamilton, J.A., Bjørkdahl, O., Berchtold, M.W., Panina, S., 2016. OSCAR-collagen signaling in monocytes plays a proinflammatory role and may contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 46, 952–963.

- Schultze, J.L., Schmieder, A., Goerd, S., 2015. Macrophage activation in human diseases. *Semin Immunol* 27, 249–256.
- Scott, C.L., Soen, B., Martens, L., Skrypek, N., Saelens, W., Taminau, J., Blancke, G., Van Isterdael, G., Huylebroeck, D., Haigh, J., Saeys, Y., Guilliams, M., Lambrecht, B.N., Berx, G., 2016. The transcription factor Zeb2 regulates development of conventional and plasmacytoid DCs by repressing Id2. *J. Exp. Med.* 213, 897–911.
- Sedeek, M., Montezano, A.C., Hebert, R.L., Gray, S.P., Di Marco, E., Jha, J.C., Cooper, M.E., Jandeleit-Dahm, K., Schiffrin, E.L., Wilkinson-Berka, J.L., Touyz, R.M., 2012. Oxidative Stress, Nox Isoforms and Complications of Diabetes—Potential Targets for Novel Therapies. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 5, 509–518.
- Segal, A.W., Jones, O.T., 1978. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276, 515–517.
- Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., Amigorena, S., 2013. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38, 336–348.
- Serbina, N.V., Pamer, E.G., 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., Pamer, E.G., 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59–70.
- Serhan, C.N., Dalli, J., Karamnov, S., Choi, A., Park, C.-K., Xu, Z.-Z., Ji, R.-R., Zhu, M., Petasis, N.A., 2012. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J* 26, 1755–1765.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A., 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233, 6425–6440.
- Sharma, Y., Bashir, S., Bhardwaj, P., Ahmad, A., Khan, F., 2016. Protein tyrosine phosphatase SHP-1: resurgence as new drug target for human autoimmune disorders. *Immunol Res* 64, 804–819.
- Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., McLaughlin, N.J.D., Banerjee, A., Silliman, C.C., 2005. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of Leukocyte Biology* 78, 1025–1042.
- Sherry, B., Espinoza, M., Manogue, K.R., Cerami, A., 1998. Induction of the chemokine beta peptides, MIP-1 alpha and MIP-1 beta, by lipopolysaccharide is differentially regulated by immunomodulatory cytokines gamma-IFN, IL-10, IL-4, and TGF-beta. *Mol Med* 4, 648–657.

- Shikichi, M., Kitamura, H.P., Yanase, H., Konno, A., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., 1999. Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the horse joint as revealed by the scanning electron microscope. *Arch Histol Cytol* 62, 219–229.
- Shouval, D.S., Ouahed, J., Biswas, A., Goettel, J.A., Horwitz, B.H., Klein, C., Muise, A.M., Snapper, S.B., 2014. Interleukin 10 Receptor Signaling: Master Regulator of Intestinal Mucosal Homeostasis in Mice and Humans. *Adv Immunol* 122, 177–210.
- Shuai, K., Liu, B., 2005. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 593–605.
- Sica, A., Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.
- Sichien, D., Scott, C.L., Martens, L., Vanderkerken, M., Van Gassen, S., Plantinga, M., Joeris, T., De Prijck, S., Vanhoutte, L., Vanheerswynghels, M., Van Isterdael, G., Toussaint, W., Madeira, F.B., Vergote, K., Agace, W.W., Clausen, B.E., Hammad, H., Dalod, M., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., Williams, M., 2016. IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity* 45, 626–640.
- Skrzeczyńska-Moncznik, J., Bzowska, M., Loseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., Pryjma, J., 2008. Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* 67, 152–159.
- Smolen, J.S., Aletaha, D., McInnes, I.B., 2016. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 388, 2023–2038.
- Sonje, M.B., Abram, M., Stenzel, W., Deckert, M., 2010. *Listeria monocytogenes* ( $\delta$ -actA mutant) infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient neonatal mice. *Microb Pathog* 49, 186–195.
- Sprangers, S., de Vries, T.J., Everts, V., 2016. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res* 2016, 1475435.
- Stamp, L.K., Eason, A., Pettersson, L., Highton, J., Hessian, P.A., 2009. Monocyte derived interleukin (IL)-23 is an important determinant of synovial IL-17A expression in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 36, 2403–2408.
- Steiner, G., Tohidast-Akrad, M., Witzmann, G., Vesely, M., Studnicka-Benke, A., Gal, A., Kunaver, M., Zenz, P., Smolen, J.S., 1999. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38, 202–213.
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142–1162.
- Steinman, R.M., Witmer, M.D., 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 5132–5136.
- Stöger, J.L., Gijbels, M.J.J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C.M., Biessen,

- E.A.L., Daemen, M.J.A.P., Lutgens, E., de Winther, M.P.J., 2012. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 225, 461–468.
- Stout, R.D., Suttles, J., 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 76, 509–513.
- Stow, J.L., Ching Low, P., Offenhäuser, C., Sangermani, D., 2009. Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. *Immunobiology* 214, 601–612.
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., Flavell, R., 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481, 278–286.
- Stuhlmüller, B., Ungethüm, U., Scholze, S., Martinez, L., Backhaus, M., Kraetsch, H.G., Kinne, R.W., Burmester, G.R., 2000. Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 775–790.
- Sun, S., Steinberg, B.M., 2002. PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. *J Gen Virol* 83, 1651–1658.
- Swales, C., Sabokbar, A., 2014. Cellular and molecular mechanisms of bone damage and repair in inflammatory arthritis. *Drug Discov Today* 19, 1178–1185.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J., 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612–616.
- Szabolcs, P., Park, K.-D., Reese, M., Marti, L., Broadwater, G., Kurtzberg, J., 2003. Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells* 21, 296–303.
- Taga, K., Mostowski, H., Tosato, G., 1993. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 81, 2964–2971.
- Takanashi, S., Nonaka, R., Xing, Z., O’Byrne, P., Dolovich, J., Jordana, M., 1994. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med* 180, 711–715.
- Tan, H.-Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., Feng, Y., 2016. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1–16.
- Tanner, J.J., Parsons, Z.D., Cummings, A.H., Zhou, H., Gates, K.S., 2011. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases: structural and chemical aspects. *Antioxid Redox Signal* 15, 77–97.
- Tang, X.N., Cairns, B., Kim, J.Y., Yenari, M.A., 2012. NADPH oxidase in stroke and cerebrovascular disease. *Neurological Research* 34, 338–345.
- Tarique, A.A., Logan, J., Thomas, E., Holt, P.G., Sly, P.D., Fantino, E., 2015. Phenotypic,



- functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 53, 676–688.
- Tayal, V., Kalra, B.S., 2008. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update. *Eur J Pharmacol* 579, 1–12.
- Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R.A., Bakan, E., 2002. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 21, 200–204.
- Thiesen, S., Janciauskiene, S., Uronen-Hansson, H., Agace, W., Högerkorp, C.-M., Spee, P., Håkansson, K., Grip, O., 2014. CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 95, 531–541.
- Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C.C., Hanna, R.N., 2015. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 1306–1316.
- Thompson, J.W., Narayanan, S.V., Perez-Pinzon, M.A., 2012. Redox signaling pathways involved in neuronal ischemic preconditioning. *Curr Neuropharmacol* 10, 354–369.
- Thurlings, R.M., Wijbrandts, C.A., Bennink, R.J., Dohmen, S.E., Voermans, C., Wouters, D., Izmailova, E.S., Gerlag, D.M., van Eck-Smit, B.L.F., Tak, P.P., 2009. Monocyte scintigraphy in rheumatoid arthritis: the dynamics of monocyte migration in immune-mediated inflammatory disease. *PLoS One* 4, e7865.
- Tian, W., Li, X.J., Stull, N.D., Ming, W., Suh, C.-I., Bissonnette, S.A., Yaffe, M.B., Grinstein, S., Atkinson, S.J., Dinauer, M.C., 2008. Fc gamma R-stimulated activation of the NADPH oxidase: phosphoinositide-binding protein p40phox regulates NADPH oxidase activity after enzyme assembly on the phagosome. *Blood* 112, 3867–3877.
- Tibaldi, E., Brunati, A.M., Zonta, F., Frezzato, F., Gattazzo, C., Zambello, R., Gringeri, E., Semenzato, G., Pagano, M.A., Trentin, L., 2011. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 25, 1768–1781.
- Tkach, M., Roseblit, C., Rivas, M.A., Proietti, C.J., Díaz Flaqué, M.C., Mercogliano, M.F., Beguelin, W., Maronna, E., Guzmán, P., Gercovich, F.G., Deza, E.G., Elizalde, P.V., Schillaci, R., 2013. p42/p44 MAPK-mediated Stat3Ser727 phosphorylation is required for progestin-induced full activation of Stat3 and breast cancer growth. *Endocr Relat Cancer* 20, 197–212.
- Torsteinsdóttir, I., Arvidson, N.G., Hällgren, R., Håkansson, L., 1999. Monocyte activation in rheumatoid arthritis (RA): increased integrin, Fc gamma and complement receptor expression and the effect of glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 115, 554–560.
- Tournadre, A., Lenief, V., Eljaafari, A., Miossec, P., 2012. Immature muscle precursors are a source of interferon- $\beta$  in myositis: role of Toll-like receptor 3 activation and contribution to HLA class I up-regulation. *Arthritis Rheum* 64, 533–541.
- Tsou, C.-L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M.,

- Charo, I.F., 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 117, 902–909.
- Tsui, H.W., Siminovitch, K.A., de Souza, L., Tsui, F.W., 1993. Mice with mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* 4, 124–129.
- Tsunawaki, S., Kagara, S., Yoshikawa, K., Yoshida, L.S., Kuratsuji, T., Namiki, H., 1996. Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox. *J. Exp. Med.* 184, 893–902.
- Udagawa, N., Koide, M., Nakamura, M., Nakamichi, Y., Yamashita, T., Uehara, S., Kobayashi, Y., Furuya, Y., Yasuda, H., Fukuda, C., Tsuda, E., 2021. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab* 39, 19–26.
- Unanue, E.R., Beller, D.I., Calderon, J., Kiely, J.M., Stadecker, M.J., 1976. Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. *Am. J. Pathol.* 85, 465–478.
- Väänänen, H.K., Laitala-Leinonen, T., 2008. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473, 132–138.
- van der Helm-van Mil, A.H.M., Huizinga, T.W.J., Schreuder, G.M.T., Breedveld, F.C., de Vries, R.R.P., Toes, R.E.M., 2005. An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis Rheum* 52, 2637–2644.
- van Furth, R., Sluiter, W., 1986. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J. Exp. Med.* 163, 474–479.
- Vandooren, B., Kruithof, E., Yu, D.T.Y., Rihl, M., Gu, J., De Rycke, L., Van Den Bosch, F., Veys, E.M., De Keyser, F., Baeten, D., 2004. Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor alpha blockade in spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 50, 2942–2953.
- Verma, R., Balakrishnan, L., Sharma, K., Khan, A.A., Advani, J., Gowda, H., Tripathy, S.P., Suar, M., Pandey, A., Gandotra, S., Prasad, T.S.K., Shankar, S., 2016. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal* 10, 61–67.
- Vervoordeldonk, M.J.B.M., Tak, P.P., 2002. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 4, 208–217.
- Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., Jardine, L., Dixon, D., Stephenson, E., Nilsson, E., Grundberg, I., McDonald, D., Filby, A., Li, W., De Jager, P.L., Rozenblatt-Rosen, O., Lane, A.A., Haniffa, M., Regev, A., Hacohen, N., 2017. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356, eaah4573.
- Vogel, D.Y.S., Glim, J.E., Stavenuiter, A.W.D., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., Dijkstra,

- C.D., Beelen, R.H.J., 2014. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219, 695–703.
- Waetzig, G.H., Rosenstiel, P., Arlt, A., Till, A., Bräutigam, K., Schäfer, H., Rose-John, S., Seegert, D., Schreiber, S., 2005. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1. *FASEB J* 19, 91–93.
- Wallach, T.M., Segal, A.W., 1997. Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem. J.* 321 ( Pt 3), 583–585.
- Wang, J.F., Jerrells, T.R., Spitzer, J.J., 1996. Decreased production of reactive oxygen intermediates is an early event during in vitro apoptosis of rat thymocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 533–542.
- Wang, L., Du, F., Wang, X., 2008. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693–703.
- Wang, N., Liang, H., Zen, K., 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 5, 614.
- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., Hadeiba, H., Butcher, E.C., 2014. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* 15, 98–108.
- Weber, C., Belge, K.U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S., Ziegler-Heitbrock, H.W., 2000. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* 67, 699–704.
- Weber-Nordt, R.M., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Moore, K.W., Darnell, J.E., Schreiber, R.D., 1996. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 271, 27954–27961.
- Werner, E., 2004. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J. Cell. Sci.* 117, 143–153.
- Wewers, M.D., Rinehart, J.J., She, Z.W., Herzyk, D.J., Hummel, M.M., Kinney, P.A., Davis, W.B., 1990. Tumor necrosis factor infusions in humans prime neutrophils for hypochlorous acid production. *Am. J. Physiol.* 259, L276-282.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Gordon, S., 1996. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol. Rev.* 76, 927–947.
- Williams, R.O., Feldmann, M., Maini, R.N., 1992. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9784–9788.

- Windsor, W.T., Syto, R., Tsarbopoulos, A., Zhang, R., Durkin, J., Baldwin, S., Paliwal, S., Mui, P.W., Pramanik, B., Trotta, P.P., 1993. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochemistry* 32, 8807–8815.
- Winyard, P.G., Tatzber, F., Esterbauer, H., Kus, M.L., Blake, D.R., Morris, C.J., 1993. Presence of foam cells containing oxidised low density lipoprotein in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 52, 677–680.
- Wipke, B.T., Allen, P.M., 2001. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167, 1601–1608.
- Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., Bieber, T., 1996. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* 106, 446–453.
- Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., Wong, S.C., 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S.I., Förster, R., 2017. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 30–48.
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W., 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.
- Xiao, W., Ando, T., Wang, H.-Y., Kawakami, Y., Kawakami, T., 2010. Lyn- and PLC-beta3-dependent regulation of SHP-1 phosphorylation controls Stat5 activity and myelomonocytic leukemia-like disease. *Blood* 116, 6003–6013.
- Yan, Z., Yang, W., Parkitny, L., Gibson, S.A., Lee, K.S., Collins, F., Deshane, J.S., Cheng, W., Weinmann, A.S., Wei, H., Qin, H., Benveniste, E.N., 2019. Deficiency of Socs3 leads to brain-targeted EAE via enhanced neutrophil activation and ROS production. *JCI Insight* 5.
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., Wang, H., 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* 2, 1.
- Yang, S., Wang, J., Brand, D.D., Zheng, S.G., 2018. Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Frontiers in Immunology* 9, 784.
- Yang, X., Chang, Y., Wei, W., 2020. Emerging role of targeting macrophages in rheumatoid arthritis: Focus on polarization, metabolism and apoptosis. *Cell Proliferation* 53, e12854.
- Yano, R., Yamamura, M., Sunahori, K., Takasugi, K., Yamana, J., Kawashima, M., Makino, H., 2007. Recruitment of CD16+ monocytes into synovial tissues is mediated by fractalkine and CX3CR1 in rheumatoid arthritis patients. *Acta Med Okayama* 61, 89–

- Yokota, S., Imagawa, T., Mori, M., Miyamae, T., Aihara, Y., Takei, S., Iwata, N., Umebayashi, H., Murata, T., Miyoshi, M., Tomiita, M., Nishimoto, N., Kishimoto, T., 2008. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet* 371, 998–1006.
- Yona, S., Jung, S., 2010. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 53–59.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S., 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- Yoo, S., Starnes, T., Deng, Q., Huttenlocher, A., 2011. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* 480, 109–12.
- Yoon, S.I., Logsdon, N.J., Sheikh, F., Donnelly, R.P., Walter, M.R., 2006. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem* 281, 35088–35096.
- Yoshimura, A., Naka, T., Kubo, M., 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7, 454–465.
- Zdanov, A., 2010. Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 325–330.
- Zhang, C., Derrien, M., Levenez, F., Brazeilles, R., Ballal, S.A., Kim, J., Degivry, M.-C., Quéré, G., Garault, P., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Garrett, W.S., Doré, J., Veiga, P., 2016. Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *ISME J* 10, 2235–2245.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W., 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1–18.
- Zhang, Y.H., Heulsmann, A., Tondravi, M.M., Mukherjee, A., Abu-Amer, Y., 2001. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 276, 563–568.
- Zhao, X., Carnevale, K.A., Cathcart, M.K., 2003. Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.* 278, 40788–40792.
- Zhong, D., Wu, C., Zeng, X., Wang, Q., 2018. The role of gut microbiota in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Clin Rheumatol* 37, 25–34.
- Zhou, J., Wulfkühle, J., Zhang, H., Gu, P., Yang, Y., Deng, J., Margolick, J.B., Liotta, L.A., Petricoin, E., Zhang, Y., 2007. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in

- breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16158–16163.
- Zhou, Z., Gengaro, P., Wang, W., Wang, X., Li, C., Faubel, S., Rivard, C., Schrier, R.W., 2008. Role of NF-kappaB and PI 3-kinase/Akt in TNF-alpha-induced cytotoxicity in microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F932-941.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Ströbel, M., Fingerle, G., Schlunck, T., Pforte, A., Blumenstein, M., Haas, J.G., 1991. Small (CD14+/CD16+) monocytes and regular monocytes in human blood. *Pathobiology* 59, 127–130.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Ströbel, M., Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., Haas, J.G., 1992. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 79, 503–511.
- Ziegler-Heitbrock, L., 2014. Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol.* 289, 135–139.
- Zou, G.M., Tam, Y.K., 2002. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 13, 186–199.

## ANNEXE

Autres travaux : « Apocynin prevents GM-CSF-induced-ERK1/2 activation and -neutrophil survival independently of its inhibitory effect on the phagocyte NADPH oxidase NOX2 ».



# Apocynin prevents GM-CSF-induced-ERK1/2 activation and -neutrophil survival independently of its inhibitory effect on the phagocyte NADPH oxidase NOX2

Coralie Pintard<sup>a</sup>, Marwa Ben Khemis<sup>a</sup>, Dan Liu<sup>a</sup>, Pham My-Chan Dang<sup>a</sup>,  
Margarita Hurtado-Nedelec<sup>a,b</sup>, Jamel El-Benna<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM U1149, ERL 8252 CNRS, Centre de Recherche sur l'Inflammation, Université de Paris, Laboratoire d'Excellence Inflammex, Faculté de Médecine, Site Xavier Bichat, Paris F-75018, France

<sup>b</sup> Département d'Immunologie et d'Hématologie, Unité Dysfonctionnements Immunitaires, Centre Hospitalo-Universitaire Xavier Bichat, Paris, France

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Apocynin  
Neutrophils  
NADPH oxidase NOX2  
Reactive oxygen species  
GM-CSF  
ERK1/2

## ABSTRACT

Neutrophils are key cells in innate immunity and inflammation. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is known to enhance many neutrophil functions such as reactive oxygen species (ROS) production, degranulation and cell survival via the activation of the ERK1/2 pathway. ERK1/2 pathway activation is redox sensitive and could be modulated by ROS. In order to investigate whether NADPH oxidase NOX2-derived ROS could contribute to GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation, we tested the effect of two selective NOX2 inhibitors, diphenylene iodonium (DPI) and apocynin. Results showed that, while both DPI and apocynin strongly inhibited neutrophil ROS production, only apocynin, but not DPI, inhibited GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation, suggesting that ROS are not involved in this process. Apocynin did not affect GM-CSF-induced p38MAPK phosphorylation, another redox sensitive kinase. Interestingly, apocynin inhibited GM-CSF-induced MEK1/2 and AKT phosphorylation without affecting fMLF-induced phosphorylation of these proteins. GM-CSF is known to inhibit neutrophils apoptosis and to promote cell survival via the AKT-ERK1/2 pathway. In this regard, we found that apocynin also inhibited GM-CSF-induced anti-apoptotic effect in neutrophils. These results suggest that NADPH oxidase NOX2-derived ROS are not involved in GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation and that apocynin inhibits GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation pathway independently of its inhibitory action on NADPH oxidase NOX2. Thus, apocynin can exert an anti-inflammatory effect not only by limiting neutrophil ROS production but also by decreasing neutrophil survival at inflammatory site.

## 1. Introduction

Human polymorphonuclear neutrophils play an important role in host defence against micro-organisms and in inflammation. During infection, neutrophils migrate from blood to the tissues, to recognize and engulf the pathogen. This mechanism called phagocytosis triggers the activation of several neutrophil functions, such as the release of proteases, bactericidal peptides and reactive oxygen species (ROS) via nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, leading to the death and destruction of the microbe [1]. Although, neutrophils play a key role in host defence, excessive neutrophil activation is harmful to the adjacent tissues and is involved in inflammatory diseases, like rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases and adult respiratory distress syndrome [2,3]. The phagocyte NADPH oxidase

NOX2 is composed of a heterodimer of two membrane proteins called cytochrome  $b_{558}$  (gp91phox, p22phox) and four cytosolic proteins, p47phox, p67phox, p40phox and the small G-proteins Rac1 (in monocytes) or Rac2 (in neutrophils) [4–6]. In resting cells, these NADPH oxidase NOX2 components are not assembled and are separated in the cytosol, granule and plasma membranes. Upon cell activation, p47phox, p67phox, p40phox, gp91phox, and p22phox are phosphorylated and the cytosolic components translocate to the membranes where they bind to p22phox and gp91phox to assemble the active NADPH oxidase NOX2 which then produces superoxide anions ( $O_2^{\cdot-}$ ) using cytosolic NADPH as the electron donor [4]. Superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) is the precursor of other ROS, such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) and hypochlorous acid (HOCl) [4,7].

Pro-inflammatory agents (cytokines and TLR agonists) such as

\* Corresponding author at: INSERM U1149, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France.

E-mail address: [jamel.elbenna@inserm.fr](mailto:jamel.elbenna@inserm.fr) (J. El-Benna).

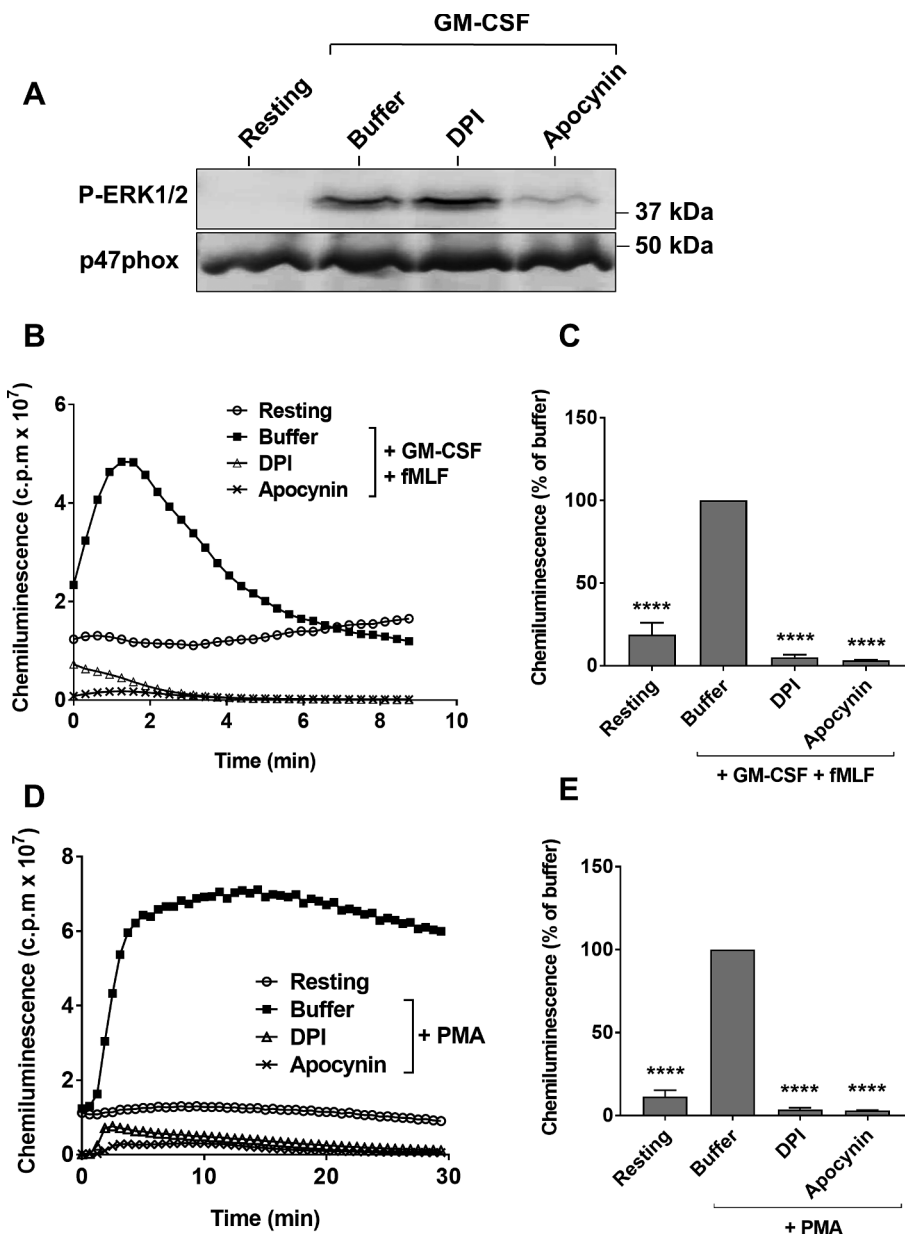
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113950>

Received 24 January 2020; Accepted 1 April 2020

Available online 03 April 2020

0006-2952/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.





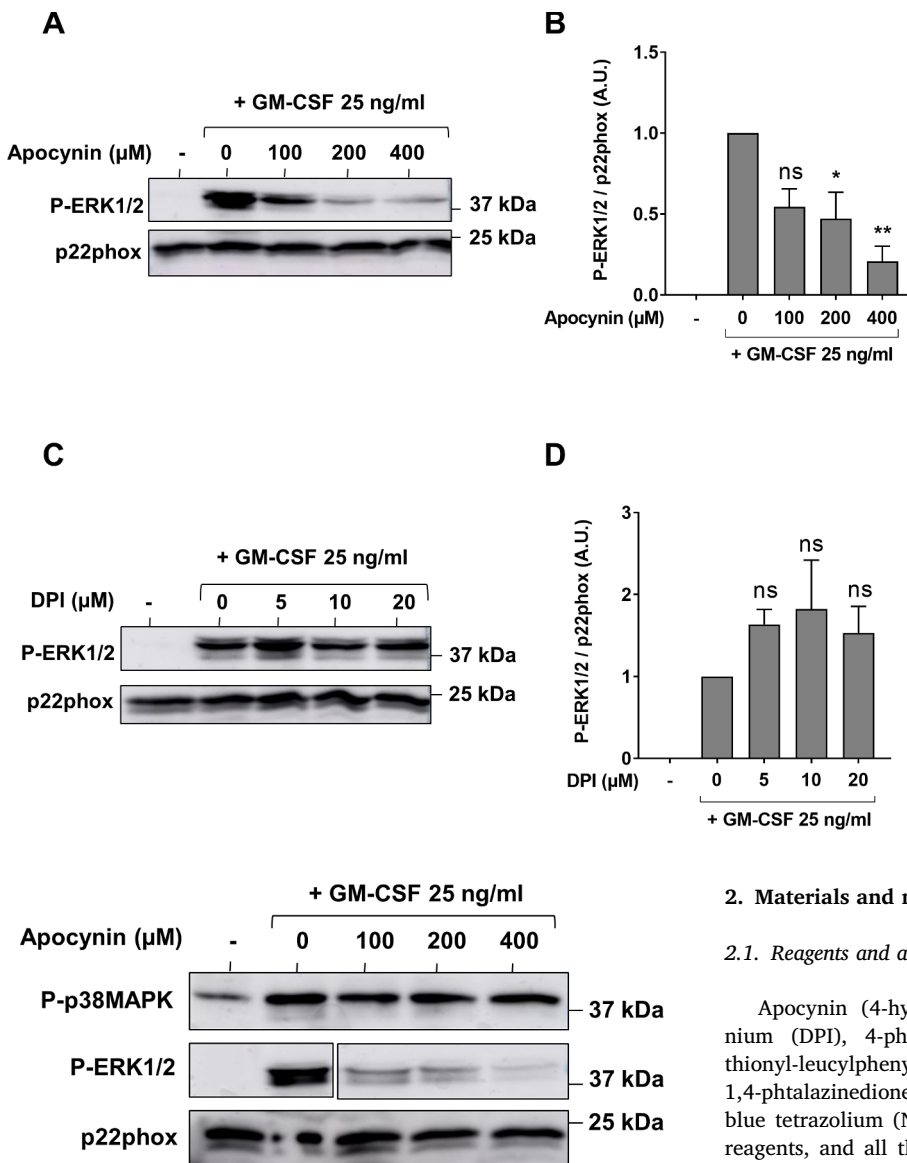
**Fig. 1.** Effect of DPI and apocynin on GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation and on ROS production in human neutrophils. Neutrophils ( $10 \times 10^6$ ) were treated with GM-CSF (25 ng/ml) for 20 min at 37 °C in the absence or presence of DPI (10  $\mu$ M) or apocynin (200  $\mu$ M) and lysed in Laemmli sample buffer. Activation of ERK1/2 was analysed by SDS-PAGE and western blot using an anti-phospho-ERK1/2 antibody. Anti-p47phox antibody was used as control for protein loading and transfer (A). Neutrophils ( $5 \times 10^5$ ) were resuspended in HBSS (0.5 ml) and preincubated for 15 min at 37 °C in the presence of luminol (10  $\mu$ M), with or without DPI (10  $\mu$ M) or apocynin (200  $\mu$ M). Cells were then stimulated with GM-CSF (25 ng/ml) + fMLF ( $10^{-7}$  M) for 10 min (B and C) or PMA (100 ng/ml) for 30 min (D and E). ROS production was measured by Luminol-amplified chemiluminescence for 10 or 30 min at 37 °C and the light emission is expressed in counted photons per minute (c.p.m.). (B) and (D) show result of 1 representative experiment. (C) and (E) show a quantification analysis of 3 independent experiments. Values are expressed as percentage of control (condition named "buffer": neutrophils stimulated without inhibitor). Mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*\*\*\*:  $p < 0.0001$  as compared to the control (100% of ROS production corresponds to  $4.73 \pm 0.5 \times 10^8$  cpm for GMCSF + fMLF stimulation, and  $1.51 \pm 0.25 \times 10^9$  cpm for PMA stimulation).

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ), lipopolysaccharide (LPS) and CL097 induce up-regulation or priming of neutrophil functions when they are stimulated by the bacterial peptide formyl-methionyl-leucylphenylalanine (fMLF) [6].

GM-CSF, is a 22 kDa cytokine produced by macrophages, T-cells, mast cells, endothelial cells and fibroblasts. It is involved in the growth, differentiation and maturation of myeloid precursor cells and enhances the function of mature neutrophils, eosinophils and monocytes [8–10]. GM-CSF binds to a specific receptor which is composed of two chains, a low-affinity alpha subunit (CD116) which is specific to GM-CSF, and a high-affinity beta chain (CD131) which is shared with IL-3 and IL-5 [9]. GM-CSF binding to its receptor induces activation of a number of signal transduction pathways including protein tyrosine kinases (PTK), PI3K and the MAPK family ERK1/2. GM-CSF binding to its receptor also induces and enhances the binding of the protein tyrosine kinase JAK2 and the src-tyrosine kinase Lyn to the intracellular domain of the receptor. These tyrosine kinases transduce the GM-CSF signal by phosphorylating other proteins such as STAT, PKB and PI3K. JAK2 is the only member of the JAK family to be activated by GM-CSF in

neutrophils and it is involved, directly or indirectly, in the tyrosine phosphorylation of p85, the regulatory subunit of PI3K [8–10].

We have previously shown that GM-CSF induced priming of the NADPH oxidase NOX2 and excessive ROS production by human neutrophils via the activation of JAK2-ERK1/2-p47phox phosphorylation pathway [11,12]. In this study we hypothesized that NADPH oxidase NOX2-derived ROS might contribute to GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation thereby acting in a positive feedback loop to induce NADPH oxidase NOX2 hyper-activation. We thus tested the effect of two NADPH oxidase NOX2 inhibitors, diphenylene iodonium (DPI) and apocynin on GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation. DPI is a flavoprotein inhibitor which binds to gp91phox-FAD binding site and inhibits electron transfer from NADPH to heme and oxygen [13–15]. Apocynin (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) is a methoxy-substituted catechol isolated from *Picrorhiza kurroa*, a traditional medicinal plant found in the Himalayan mountains [16,17]. Apocynin has been widely used as an inhibitor of the phagocyte NADPH oxidase NOX2 [17,18] and is known to have anti-inflammatory activity in a variety of cell and animal models of inflammation [16]. In neutrophils, apocynin was found to be activated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and myeloperoxidase



**Fig. 3.** Apocynin inhibits GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation but does not affect GM-CSF-induced p38MAPK phosphorylation in human neutrophils. Neutrophils ( $10 \times 10^6$ ) were treated with GM-CSF (25 ng/ml) for 20 min at 37 °C in the absence or presence of apocynin at different concentrations (100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  and 400  $\mu\text{M}$ ) and lysed in Laemmli sample buffer. Activation of p38MAPK and ERK1/2 were analysed by western blot using an anti-phospho-p38MAPK (T180/Y182) antibody and an anti-phospho-ERK1/2 antibody. Anti-p22phox antibody was used as control for protein loading and transfer. Experiment repeated three times.

(MPO) to form a symmetrical dimer, diapocynin, which oxidizes thiols in the NADPH oxidase NOX2 and thus inhibits p47phox translocation to the membranes and the assembly of this enzyme [17,18].

In order to investigate the role of NADPH oxidase NOX2-derived ROS in GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation and whether ROS could act via a positive feedback loop for NADPH oxidase NOX2 activation, we tested the effect of DPI and apocynin on ERK1/2 phosphorylation. Surprisingly, while apocynin and DPI both inhibited ROS production, only apocynin, but not DPI, inhibited GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation. Furthermore, apocynin also inhibited GM-CSF-induced neutrophil survival which is known to be regulated by ERK1/2. Together these data suggest that the effect of apocynin on GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation and cell survival is probably due to an effect unrelated to NADPH oxidase NOX2 inhibition.

**Fig. 2.** Dose effect of apocynin and DPI on GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation in human neutrophils. Neutrophils ( $10 \times 10^6$ ) were treated with GM-CSF (25 ng/ml) for 20 min at 37 °C in the absence or presence of apocynin at different concentrations (100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  and 400  $\mu\text{M}$ ) and lysed in Laemmli sample buffer. Activation of ERK1/2 was analysed by SDS-PAGE and western blot using an anti-phospho-ERK1/2 antibody. Anti-p22phox antibody was used as control for protein loading and transfer (A). Protein bands were quantified using Image J software and the ratio of phospho-ERK1/2 to the total amount of p22phox was calculated. Values are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. ns (not significant):  $p > 0.05$ , \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  as compared to the control (neutrophils stimulated with GM-CSF without inhibitor) (B). Neutrophils ( $10 \times 10^6$ ) were treated with GM-CSF (25 ng/ml) for 20 min at 37 °C in the absence or presence of DPI at different concentrations (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$ ) and lysed in Laemmli sample buffer. Activation of ERK1/2 was analysed by SDS-PAGE and western blot using an anti-phospho-ERK1/2 antibody. Anti-p22phox antibody was used as control for protein loading and transfer (C). Protein bands were quantified using Image J software and the ratio of phospho-ERK1/2 to the total amount of p22phox was calculated. Values are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. ns (not significant):  $p > 0.05$ , \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  as compared to the control (neutrophils stimulated with GM-CSF without inhibitor) (D).

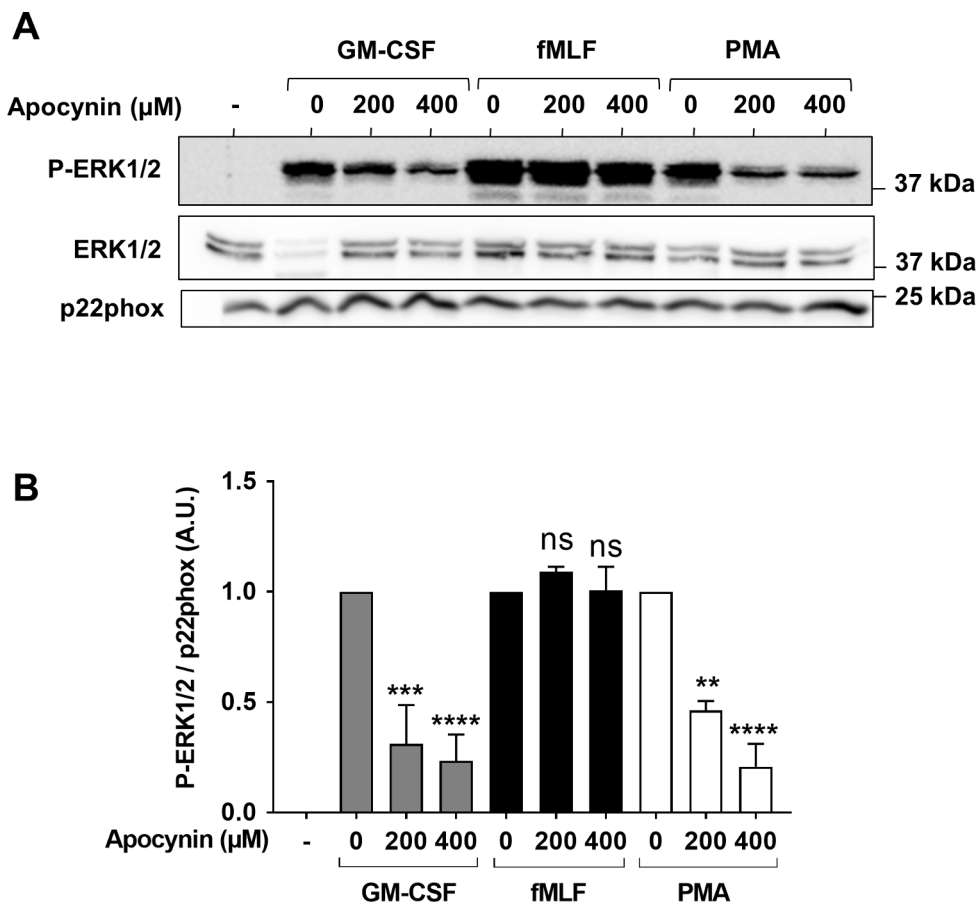
## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and antibodies

Apocynin (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone), diphenyleneiodonium (DPI), 4-phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), formyl-methionyl-leucylphenylalanine (fMLF), Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), Hanks' balanced salt solution (HBSS), p-nitro blue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) reagents, and all the others chemical products used were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Dextran T500 and Ficoll were purchased from GE Healthcare (Orsay, France). The reagents to make SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) and Western blot were purchased from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was from PeproTech France (Neuilly-Sur-Seine, France). RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin solution, trypan blue, Turk blue were purchased from Invitrogen (LifeTechnologies, France). Antibodies against phospho-ERK1/2 and ERK1/2 were from R&D systems (Abingdon, UK). Antibodies against phospho-p38MAPK (T180/Y182), phospho-MEK1/2 (Ser221), MEK1/2, phospho-STAT5 (Y694), STAT5 (D206Y), phospho-AKT (Ser473) and AKT were from Cell Signaling Technology (Leiden, The Netherlands). Antibodies against p22phox, secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse and secondary alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Antibodies against p47phox were generated by our laboratory as previously described [19].

### 2.2. Ethics statement and human neutrophils isolation

All experiments were supported by the Inserm Institutional Review Board and ethics committee. The collection and analyses of data were



**Fig. 4.** Effect of apocynin on ERK1/2 phosphorylation induced by different stimuli. Neutrophils ( $10 \times 10^6$ ) were stimulated with GM-CSF (25 ng/ml), fMLF ( $10^{-6}$  M) or PMA (100 ng/ml) for respectively 20 min, 1 min or 8 min at  $37^\circ\text{C}$  in the absence or presence of apocynin at different concentrations (200  $\mu\text{M}$  and 400  $\mu\text{M}$ ). Activation of ERK1/2 was analysed by western blot using an anti-phospho-ERK1/2 antibody. Anti-ERK1/2 and anti-p22phox antibodies were used as control for protein loading and transfer (A). The ratio of phospho-ERK1/2 to the total amount of p22phox was quantified using Image J software. Values are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. ns (not significant):  $p > 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$  as compared to the control (neutrophils stimulated with GM-CSF, fMLF or PMA without inhibitor) (B).

performed anonymously. Neutrophils were isolated from venous fresh blood of healthy volunteers' donors, with their signed informed consent, by dextran sedimentation, to remove red blood cells, followed by differential centrifugation through a Ficoll-Hypaque density gradient to remove mononuclear cells, and hypotonic lysis to remove any remaining contaminating red blood cells [20,21]. Neutrophils in the pellet were washed and resuspended in appropriate medium, such as HBSS. Cell counting was determined by Turks' blue staining and flow cytometry analysis (CD15, CD16 and CD33 markers) to evaluate the purity of neutrophils, and the viability by Trypan blue staining. Neutrophils were more than 97% pure and 99% viable.

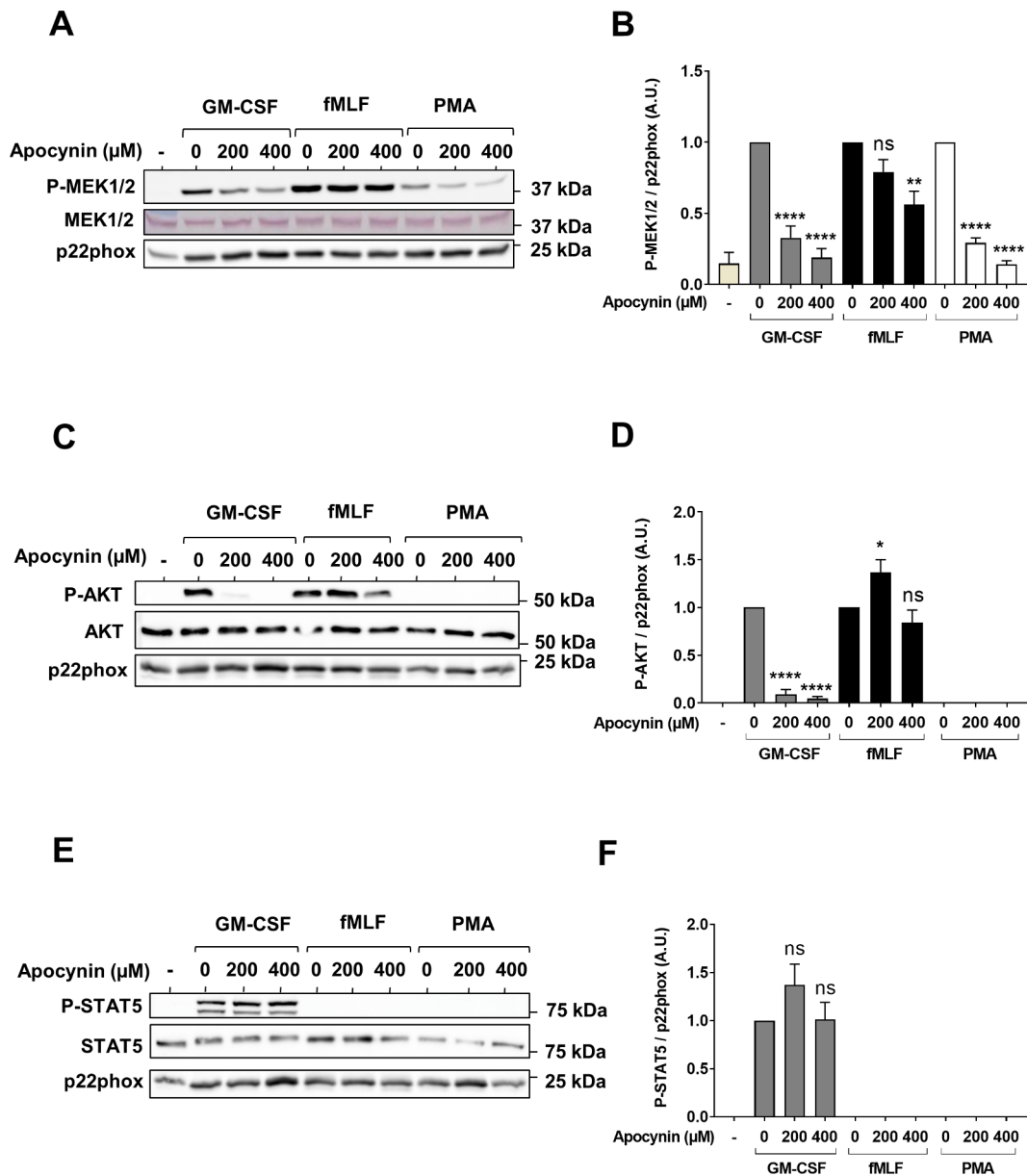
### 2.3. Luminol-amplified chemiluminescence assay in activated neutrophils

Neutrophils ( $5 \times 10^5$ ) were suspended in HBSS (0.5 ml) and pre-incubated for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of luminol (10  $\mu\text{M}$ ), with or without DPI (10  $\mu\text{M}$ ) or apocynin (200  $\mu\text{M}$ ). Cells were then treated with GM-CSF (25 ng/ml) for 20 min and stimulated by fMLF ( $10^{-7}$  M) or PMA (100 ng/ml). Luminol-amplified chemiluminescence was measured using a Berthold 953 apparatus for respectively 10 and 30 min at  $37^\circ\text{C}$  and light emission was expressed in counted photons per minute (c.p.m) [22].

### 2.4. Treatment of neutrophils and western blotting analysis

Neutrophils ( $10 \times 10^6$ ) resuspended in HBSS (400  $\mu\text{l}$ ) were treated with two different NADPH oxidase NOX2 inhibitors, apocynin or DPI, for 15 min and at the indicated concentrations at  $37^\circ\text{C}$  with mild shaking. The stimulation was performed at  $37^\circ\text{C}$  with GM-CSF (25 ng/ml) for 20 min, fMLF ( $10^{-6}$  M) for 1 min or PMA (100 ng/ml) for 8 min.

The reaction was stopped by adding  $5 \times$  concentrated Laemmli sample buffer containing 50% glycerol, 12.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 25% beta-mercaptoethanol, 312.4 mM Tris-HCl pH 6.8, 12.5 mM EDTA, 12.5 mM EGTA, 0.75 mM bromophenol blue, protease and phosphatase inhibitors [23,24]. Samples were then denatured for 3 min at  $100^\circ\text{C}$  and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. Neutrophils lysates were sonicated and subjected to 10% SDS-PAGE (equivalent of  $8 \times 10^5$  cells/well). The separated proteins were transferred to nitrocellulose and blocked for 1 hr at room temperature in TBS-Tween (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20) containing 5% nonfat dry milk. After blocking, the membranes were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the primary antibody at the following dilutions against: phospho-ERK1/2 (T202/Y204) (1:1000), phospho-p38MAPK (T180/Y182) (1:1000), phospho-MEK1/2 (S221) (1:1000), phospho-AKT (S473) (1:1000), phospho-STAT5 (Y694) (1:1000), ERK1/2 (1:1000), MEK1/2 (1:1000), AKT (1:1000), STAT5 (1:1000), p47phox (1:4000), p22phox (1:4000). After three washes of 5 min with TBS-Tween, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti rabbit or anti mouse antibodies for 1 hr (1:10,000). After further washes, the protein bands were revealed by a chemiluminescence method with ECL western blotting reagents (GE Healthcare LifeSciences, Velizy, France) and then exposed to a camera Amersham Imager 600 (GE Healthcare LifeSciences, Velizy, France). Alternatively, the membranes were incubated with an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse antibody or goat anti-rabbit antibody and proteins were revealed with the NBT/BCIP reagents in the carbonate buffer (100 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 9.8). The intensity of bands was quantified by Image J program (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Antibodies against total ERK1/2, MEK1/2, AKT, STAT5, p47phox and p22phox were used as control for protein loading and transfer.

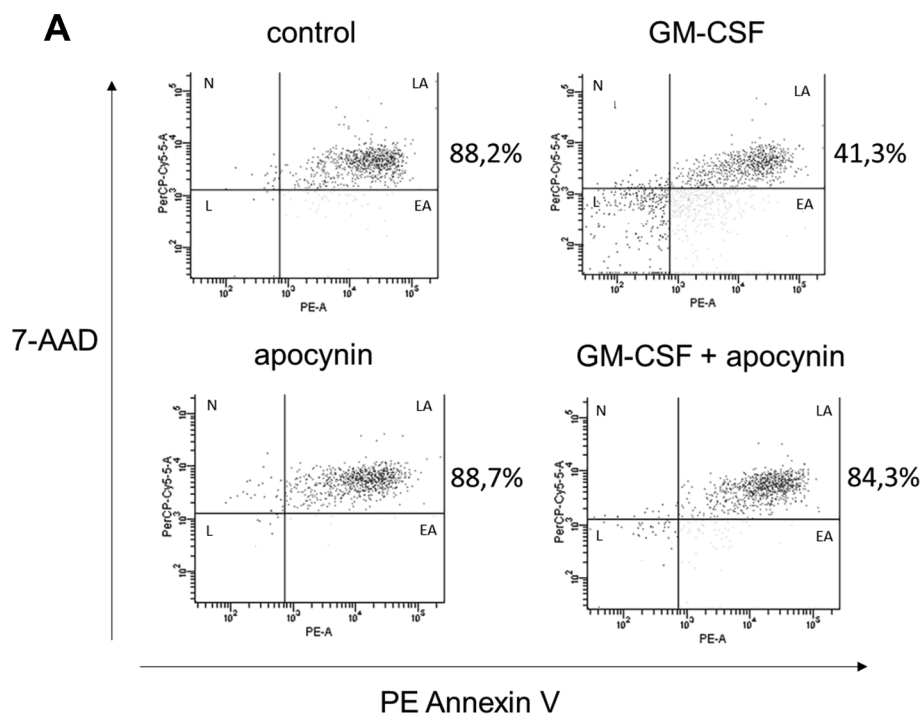


**Fig. 5.** Effect of apocynin on upstream kinases involved in ERK1/2 phosphorylation induced by GM-CSF, fMLF and PMA. Neutrophils ( $10 \times 10^6$ ) were treated with GM-CSF (25 ng/ml), fMLF ( $10^{-6}$  M) or PMA (100 ng/ml) for respectively 20 min, 1 min or 8 min at 37 °C in the absence or presence of apocynin at different concentrations (200 μM and 400 μM). Activation of MEK1/2 was analysed by western blot using an anti-phospho-MEK1/2 (S221) antibody. Anti-MEK1/2 and anti-p22phox antibodies were used as control for protein loading and transfer (A). The ratio of phospho-MEK1/2 to the total amount of p22phox was quantified using Image J software. Values are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. ns (not significant):  $p > 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$  as compared to the control (neutrophils stimulated with GM-CSF, fMLF or PMA without inhibitor) (B). Activation of AKT was analysed by western blot using an anti-phospho-AKT (S473) antibody. Anti-AKT and anti-p22phox antibodies were used as control for protein loading and transfer (C). The ratio of phospho-AKT to the total amount of p22phox was quantified using Image J software. Values are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. ns (not significant):  $p > 0.05$ , \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$  as compared to the control (neutrophils stimulated with GM-CSF, fMLF or PMA without inhibitor) (D). Activation of STAT5 was analysed by western blot using an anti-phospho-STAT5 (Y694) antibody. Anti-STAT5 (D206Y) and anti-p22phox antibodies were used as control for protein loading and transfer (E). The ratio of phospho-STAT5 to the total amount of p22phox was quantified using Image J software. Values are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. ns (not significant):  $p > 0.05$  as compared to the control (neutrophils stimulated with GM-CSF, fMLF or PMA without inhibitor) (F).

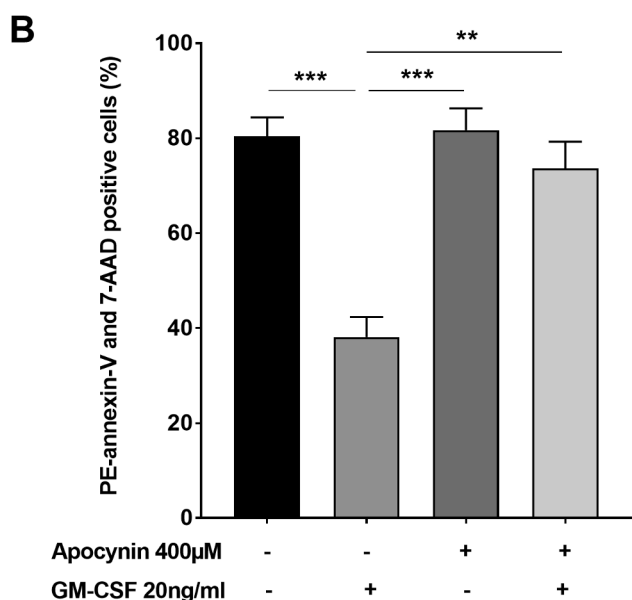
## 2.5. Measurement of neutrophil apoptosis by flow cytometry

Freshly isolated neutrophils were resuspended in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin), and placed in 6-well tissue culture plates to a final concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml. Neutrophils were incubated, for 48 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in presence or absence of 20 ng/ml human GM-CSF, and with or

without 400 μM of apocynin [25]. The percentage of apoptotic neutrophils was quantified by PE annexin V/7-Amino-Actinomycin (7-AAD) binding kit (BD Biosciences, San Jose, CA), using a flow cytometer (FACS CANTO II, BD biosciences), before and after culture with or without addition of human GM-CSF and apocynin, following a protocol provided by the manufacturer. The following controls were used to set up compensation and quadrants: unstained cells, cells stained with PE Annexin V (no 7-AAD), cells stained with 7-AAD (no PE



**Fig. 6.** Effect of apocynin on the anti-apoptotic effect of GM-CSF. Neutrophils ( $10 \times 10^6$ ) were incubated, for 48 hrs at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in presence or absence of 20 ng/ml GM-CSF, and with or without 400  $\mu$ M of apocynin. Neutrophils were stained with PE annexin V and 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) and the fluorescence was measured by flow cytometry. (A) show result of 1 representative experiment. Values represent the percentage of late apoptotic neutrophils (PE annexin V and 7-AAD positive). Live neutrophils (L) are both PE annexin V and 7-AAD negative. Early apoptotic neutrophils (EA) bind PE annexin V but exclude 7-AAD. Late apoptotic neutrophils (LA) are both PE annexin V and 7-AAD positive. Necrotic neutrophils (N) stain with 7-AAD only. (B) show a quantification analysis of 3 independent experiments. Values show the percentage of late apoptotic neutrophils (PE annexin V and 7-AAD positive) and are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Value of 100% corresponds to  $1 \times 10^5$  neutrophils in late apoptotic phase. \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$ .



Annexin V). The untreated population was used to define the basal level of apoptotic and dead cells. 7-AAD was used as an indicator of viability and no distinction was made between early and late apoptosis. Cells that stained positively for PE-annexin-V were considered apoptotic. The combination of PE annexin V and 7-AAD differentiates between early apoptotic neutrophils (annexin V<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>) and late apoptotic neutrophils (annexin V<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>+</sup>).

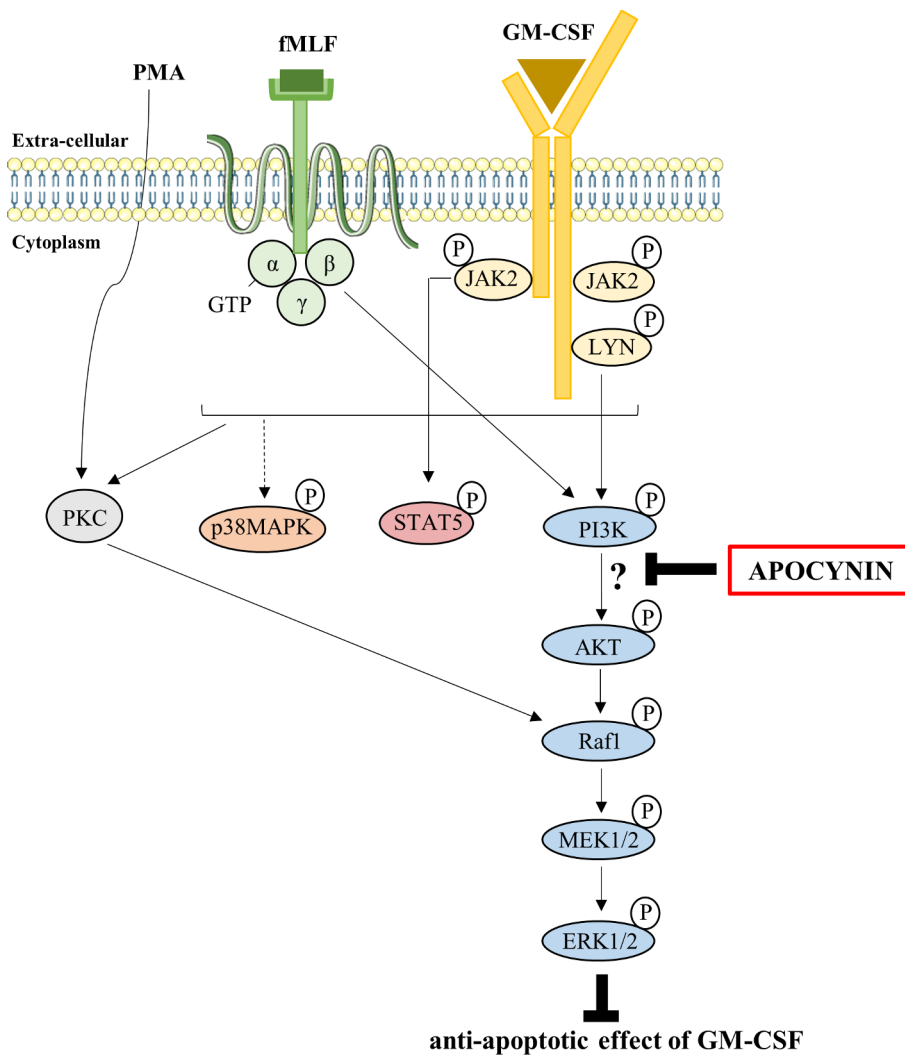
## 2.6. Statistical analysis

All results are expressed as means  $\pm$  SEM. Data were analyzed with GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences between groups were analyzed by One-way ANOVA test with Tukey's Multiple Comparison post-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  values were considered as significant.

## 3. Results

### 3.1. Effect of DPI and apocynin on GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation and on ROS production in human neutrophils

To evaluate the role of NADPH oxidase NOX2-derived ROS on GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation in human neutrophils, freshly isolated neutrophils were treated for 15 min with DPI or apocynin, two NADPH oxidase NOX2 inhibitors, prior to stimulating with GM-CSF. Results show that GM-CSF clearly induced ERK1/2 phosphorylation in human neutrophils (Fig. 1A). Interestingly, treatment of cells by DPI did not affect GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation indicating that ROS are not involved, however surprisingly, treatment of cells by apocynin inhibited this process. We checked that both molecules were able to inhibit neutrophil ROS production induced by GM-CSF + fMLF and by PMA (Fig. 1B-C and D-E). Dose effect studies showed that



**Fig. 7.** Summary diagram of the effect of apocynin on GM-CSF-induced ERK1/2 activation pathway in human neutrophils. Activation of human neutrophils by GM-CSF, fMLF or PMA leads to the phosphorylation of several pathways. Binding of GM-CSF to its receptor induced the activation of JAK2 and Lyn tyrosine kinases which activate PI3Kinase-AKT-Raf1-MEK1/2 and ERK1/2. fMLF induced the activation of PI3Kinase-AKT-Raf1-MEK1/2 and ERK1/2. PMA induced the activation of PKC which phosphorylates raf1. Apocynin strongly inhibits GM-CSF-induced AKT-ERK1/2 activation, but doesn't have any effect on p38 MAPK nor on STAT5 and PKC. Apocynin inhibits the phosphorylation/activation of AKT module.

apocynin inhibited GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation between 100 and 400  $\mu\text{M}$  (Fig. 2A-B), however DPI had no effect even at 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 2C-D). Interestingly, treatment of neutrophils first with DPI to completely inhibit NOX2, then with apocynin, also inhibited GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation (data not shown). These results show that while both DPI and apocynin are able to inhibit neutrophil ROS production, only apocynin is able to inhibit GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation, suggesting that apocynin inhibits this pathway independently of its inhibitory effect on NADPH oxidase.

### 3.2. Apocynin inhibits GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation but does not affect GM-CSF-induced p38MAPK phosphorylation in human neutrophils

To check if apocynin action was specific for ERK1/2, we tested its effect on GM-CSF-induced p38 phosphorylation. Results showed that while apocynin was able to block GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation, it had no effect on p38MAPK phosphorylation even at high concentrations (Fig. 3).

### 3.3. Effect of apocynin on ERK1/2 phosphorylation induced by different stimuli

As ERK1/2 was also activated by other agents like the bacterial peptide fMLF and PMA, we analysed the effect of apocynin on ERK1/2 phosphorylation induced by these agents. Results showed that while

apocynin was able to inhibit GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation, it was without effect on fMLF-induced phosphorylation even at high concentrations (Fig. 4A-B). Surprisingly, apocynin inhibited PMA-induced ERK1/2 phosphorylation.

### 3.4. Effect of apocynin on upstream kinases involved in ERK1/2 phosphorylation induced by GM-CSF, fMLF and PMA

As ERK1/2 was phosphorylated by MEK1/2, our results suggested that apocynin could inhibit MEK1/2 or an upstream kinase. The kinase known to phosphorylate MEK1/2 is Raf. Therefore, in order to verify if apocynin could inhibit Raf activity, we examined its effect on MEK1/2 phosphorylation. Results showed that apocynin inhibited GM-CSF-induced MEK1/2 phosphorylation, while having no effect on fMLF-induced phosphorylation at 200  $\mu\text{M}$  of apocynin and a moderate effect at 400  $\mu\text{M}$  (Fig. 5A-B). Apocynin also inhibited PMA-induced MEK1/2 phosphorylation. These results suggested that apocynin could inhibit Raf kinase or an upstream kinase. It is known that AKT is upstream Raf-MEK1/2 and ERK1/2 in human neutrophils [26–29]. We thus tested the effect of apocynin on AKT phosphorylation. Results showed that apocynin strongly inhibited GM-CSF-induced AKT-phosphorylation, without having any effect on fMLF-induced phosphorylation even at high concentrations (Fig. 5C-D). PMA did not induce AKT phosphorylation. Moreover, PKC activity was not inhibited by apocynin *in vitro* (data not shown). GM-CSF-receptor is associated with different protein tyrosine kinases, like lyn and JAK2 which control the activation of

MAPKs. To identify the target of apocynin in GM-CSF-stimulated neutrophils, we first determined the effect of apocynin on the phosphorylation of STAT5, the endogenous substrate of JAK2. Results showed that apocynin did not affect GM-CSF-induced STAT5-phosphorylation (Fig. 5E-F). fMLF and PMA did not induce STAT5 phosphorylation. Lyn phosphorylation was not inhibited by apocynin (data not shown). Moreover, Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) which is activated by tyrosine kinase was not inhibited by apocynin (data not shown). These results strongly suggest that apocynin inhibits AKT phosphorylation induced by GM-CSF but not the one induced by fMLF, suggesting the presence of two different kinases able to phosphorylate AKT, one of them being apocynin-sensitive.

### 3.5. The anti-apoptotic effect of GM-CSF is inhibited by apocynin

GM-CSF is a pro-inflammatory cytokine known to delay apoptosis of neutrophils. AKT and ERK 1/2 are known to control the anti-apoptotic effect of GM-CSF [27,29]. We therefore analysed whether apocynin was able to prevent GM-CSF-induced delay of neutrophil apoptosis as a consequence of AKT-ERK1/2 pathway inhibition. Results showed that GM-CSF was able to inhibit apoptosis of neutrophils, confirming the anti-apoptotic effect of GM-CSF (Fig. 6A-B). Apocynin alone had no effect on apoptosis but it inhibited the anti-apoptotic effect of GM-CSF.

## 4. Discussion

Human neutrophils play an important role in host defence and in inflammation. During infection, these cells allow the destruction of infectious agent by activation of the NADPH oxidase NOX2 and ROS production. However, excessive ROS production is involved in development of tissues injury and inflammatory diseases [3,6]. Thus, the development of drugs targeting the NADPH oxidase system is an important anti-inflammatory strategy. Apocynin and DPI are among the most used NADPH oxidase inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase NOX2 *in vitro* and *in vivo* [30]. Apocynin is believed to be a specific inhibitor for NADPH oxidase NOX2, among other NOXs, however off-target effects of this molecule are less known. In this study we showed that while apocynin and DPI both inhibited neutrophil ROS production, only apocynin was able to inhibit GM-CSF induced AKT-MEK1/2-ERK1/2 phosphorylation cascade and GM-CSF-induced anti-apoptotic effect. DPI inhibited neutrophil ROS production, but had no effect on GM-CSF induced ERK1/2 phosphorylation pathway. Thus apocynin inhibits GM-CSF-induced ERK1/2 pathway independently of its inhibitory action on NADPH oxidase NOX2.

In addition to ERK1/2 pathway, GM-CSF can also activate p38MAPK pathway in human neutrophils [31]. Interestingly, apocynin did not inhibit GM-CSF induced p38 phosphorylation suggesting that it specifically targeted the ERK1/2 pathway. We also wanted to check if apocynin inhibited the JNK phosphorylation pathway, however GM-CSF did not activate this latter pathway in neutrophils (data not shown). ERK 1/2 is also activated by other agonists such as the chemotactic peptide fMLF and the PKC activator PMA. Interestingly apocynin inhibited GM-CSF- and PMA-induced ERK1/2 phosphorylation but not fMLF-induced ERK1/2 phosphorylation. This indicates that apocynin inhibits a common enzyme required for GM-CSF- and PMA-induced ERK1/2 phosphorylation. This apocynin target is not the tyrosine JAK2, because the phosphorylation of STAT5 was not affected by apocynin. On the basis of our observations, we suggest the presence of a kinase specific for GM-CSF pathway able to phosphorylate AKT and is sensitive to apocynin (Fig. 7).

GM-CSF can regulate several neutrophil functions including priming of neutrophil, ROS production and inhibition of neutrophil apoptosis. Since apocynin inhibited AKT and ERK1/2, two kinases known to control the anti-apoptotic effect of GM-CSF [26–29], we choose to test its effect on GM-CSF-induced neutrophil apoptosis. We showed that

GM-CSF inhibited neutrophil apoptosis and that apocynin prevented this effect. These results suggest that apocynin could be a promising molecule to inhibit GM-CSF- and other cytokines-induced survival at inflammatory sites and that it could exert anti-inflammatory effect by favoring the resolution of inflammation. In this context, several studies demonstrated that apocynin represented a therapeutic candidate for the treatment of inflammatory diseases such rheumatoid arthritis [32,33], inflammatory bowel diseases [34,35] and lung inflammation [36]. Apocynin had also beneficial effects in many other diseases, including cancer [37], cardiovascular diseases [38], diabetic nephropathy [39] and neurodegenerative diseases [40]. These effects could be related to its action on NADPH oxidase NOX2 and on ERK1/2 phosphorylation pathway as reported in this study.

In addition to the inhibitory effect of apocynin on p47phox translocation and NADPH oxidase NOX2 activation [17], little is known about its impact on other processes. It was suggested that apocynin is an antioxidant by reacting with hydrogen peroxide [41]. The same study by Heumuller S et al, showed that apocynin inhibited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced AKT, p38 and ERK1/2 phosphorylation in rat smooth muscle cells and suggested that this effect is probably due to its antioxidant effect [41]. In this report, we showed that in contrast to apocynin, DPI, a powerful inhibitor of neutrophil ROS production, had no effect on GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation, supporting the conclusion that the inhibitory action of apocynin on GM-CSF-induced ERK1/2 phosphorylation was neither related to its inhibitory effect on NADPH oxidase NOX2 nor on its possible antioxidant properties. Moreover, in the current study, we showed that apocynin did not have any effect on phosphorylation of p38 MAPK, STAT5, Lyn and PKC in human neutrophils stimulated by GM-CSF, suggesting that apocynin could inhibit a specific isoform of PI3K or an upstream protein kinase which phosphorylates AKT on Ser373. To check if apocynin has an effect on the phosphorylation of PI3K, we used an anti-Phospho-PI3Kinase-p85(Tyr458) antibody and an anti-p55(Tyr199) antibody. The results showed that apocynin did not inhibit GM-CSF-induced PI3K phosphorylation on these sites (data not shown). To ascertain that apocynin inhibits or not PI3K activity, enzymatic activity assay should be performed. Our results clearly show that apocynin inhibited GM-CSF-induced AKT phosphorylation on Ser473, thus apocynin inhibits the kinase which phosphorylates this site. AKT could be phosphorylated by auto-phosphorylation, mTORC and PDK1. PDK1 phosphorylates AKT on Thr308 and mTORC2 phosphorylates AKT on Ser373 [42]. Apocynin could inhibit mTORC2 or AKT rather than PDK1, more studies are required to check this possibility.

A study by Jan Kucera et al, performed with mouse embryonic stem cells suggested that apocynin at much higher concentration could inhibit PI3K [43]. Other studies showed that the food additive divanillin, the homodimer of vanillin and apocynin decreased the metastatic potential of HepG2 liver cancer cells by inhibiting of FAK/PI3K/Akt signalling pathway [44], and apocynin can induce vasodilation of aortic rings by inhibiting Rho Kinase activity [45].

In conclusion our study shows that apocynin, a known NADPH oxidase inhibitor can have other effects unrelated to inhibition of NADPH oxidase NOX2 such as inhibition of GM-CSF-induced AKT-MEK1/2-ERK1/2 pathway and inhibited GM-CSF-pro-survival effect. Apocynin can thus exert an anti-inflammatory effect by limiting not only neutrophil ROS production but also neutrophil survival at inflammatory site.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), the centre national de la recherche scientifique (CNRS), Université Paris Diderot and vaincre la mucoviscidose (VLM).

## Author contributions

CP designed and performed the experiments. MBK and DL performed the experiments. PMCD, MHN and JEB designed the experiments and analyzed the data. All authors contributed to writing the manuscript.

## References

- W.M. Nauseef, How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view, *Immunol. Rev.* 219 (2007) 88–102.
- G.B. Segel, M.W. Halterman, M.A. Lichtman, The paradox of the neutrophil's role in tissue injury, *J. Leukoc. Biol.* 89 (2011) 359–372.
- M. Mittal, M.R. Siddiqui, K. Tran, S.P. Reddy, A.B. Malik, Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury, *Antioxid. Redox Sign.* 20 (2014) 1126–1167.
- J. El-Benna, P.M. Dang, Gougerot-Pocidalco, C. Elbim, Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defences, *Arch. Immunol. Ther. Ex.* 53 (2005) 199–206.
- S.A. Belambri, L. Rolas, H. Raad, M. Hurtado-Nedelec, P.M. Dang, J. El-Benna, NADPH oxidase activation in neutrophils: role of the phosphorylation of its subunits, *European J. Clin. Invest.* 48 (Suppl 2) (2018) e12951.
- J. El-Benna, M. Hurtado-Nedelec, V. Marzaioli, J.C. Marie, M.A. Gougerot-Pocidalco, P.M. Dang, Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation, *Immunol. Rev.* 273 (2016) 180–193.
- C.C. Winterbourn, A.J. Kettle, M.B. Hampton, Reactive oxygen species and neutrophil function, *Annu. Rev. Biochem.* 85 (2016) 765–792.
- B. Becher, S. Tugues, M. Greter, GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation, *Immunity* 45 (2016) 963–973.
- M. Dougan, G. Dranoff, S.K. Dougan, GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: regulators of inflammation, *Immunity* 50 (2019) 796–811.
- T.R. Hercus, D. Thomas, M.A. Guthridge, P.G. Ekert, J. King-Scott, M.W. Parker, et al., The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease, *Blood* 114 (2009) 1289–1298.
- P.M. Dang, A. Stensballe, T. Boussetta, H. Raad, C. Dewas, Y. Kroviarski, et al., A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 2033–2043.
- M. Hurtado-Nedelec, M.J. Csillag-Grange, T. Boussetta, S.A. Belambri, M. Fay, B. Cassinat, et al., Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation, *Haematologica* 98 (2013) 1517–1524.
- A.R. Cross, O.T. Jones, The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase, *Biochem. J.* 237 (1986) 111–116.
- J.T. Hancock, O.T. Jones, The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages, *Biochem. J.* 242 (1987) 103–107.
- A. Buck, F.P. Sanchez Klose, V. Venkatakrishnan, A. Khamzeh, C. Dahlgren, K. Christenson, et al., DPI selectively inhibits intracellular NADPH oxidase activity in human neutrophils, *Immunohorizons* 3 (2019) 488–497.
- J. Stefanska, R. Pawliczak, Apocynin, molecular aptitudes, *Mediat. Inflamm.* 2008 (2008) 106507.
- J. Stolk, T.J. Hiltermann, J.H. Dijkman, A.J. Verhoeven, Characteristics of the inhibition of NADPH Oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol, *Am. J. Resp. Cell Mol.* 11 (1994) 95–102.
- V.F. Ximenes, M.P. Kanegae, S.R. Rissato, M.S. Galhiane, The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition, *Arch. Biochem. Biophys.* 457 (2007) 134–141.
- T. Boussetta, M.A. Gougerot-Pocidalco, G. Hayem, S. Ciappelloni, H. Raad, R.A. Derkawi, et al., The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- $\alpha$ -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils, *Blood* 116 (2010) 5795–5802.
- S. Kremserova, W.M. Nauseef, Isolation of human neutrophils from venous blood, *Methods Mol. Biol.* 2087 (2020) 33–42.
- S. Bedouhène, P.M. Dang, M. Hurtado-Nedelec, J. El-Benna, Neutrophil degranulation of azurophil and specific granules, *Methods Mol. Biol.* 2087 (2020) 215–222.
- S. Bedouhène, F. Moulti-Mati, M. Hurtado-Nedelec, P.M. Dang, J. El-Benna, Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils, *Am. J. Blood Res.* 7 (2017) 41–48.
- U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- S.A. Belambri, P.M. Dang, J. El-Benna, Evaluation of p47phox phosphorylation in human neutrophils using phospho-specific antibodies, *Methods Mol. Biol.* 1124 (2014) 427–433.
- N. Zahran, A. Sayed, I. William, O. Mahmoud, O. Sabry, M. Rafaat, Neutrophil apoptosis: impact of granulocyte macrophage colony stimulating factor on cell survival and viability in chronic kidney disease and hemodialysis patients, *Arch. Med. Sci.* 9 (2013) 984–989.
- Y. Kotone-Miyahara, K. Yamashita, K.K. Lee, S. Yonehara, T. Uchiyama, M. Sasada, et al., Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 1047–1056.
- M. Derouet, L. Thomas, A. Cross, R.J. Moots, S.W. Edwards, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26915–26921.
- G.M. Fuhler, A.L. Drayer, E. Vellenga, Decreased phosphorylation of protein kinaseB and extracellular signal-regulated kinase in neutrophils from patients with myelodysplasia, *Blood* 101 (2003) 1172–1180.
- J.B. Klein, M.J. Rane, J.A. Scherzer, P.Y. Coxon, R. Kettritz, J.M. Mathieson, et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways, *J. Immunol.* 164 (2000) 4286–4291.
- G.R. Drummond, S. Selemidis, K.K. Griendling, C.G. Sobey, Combating oxidative stress in vascular disease: NADPHoxidases as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (6) (2011) 453–471.
- W. ten Hove, L.A. Houben, J.A. Raaijmakers, M. Bracke, L. Koenderman, Differential regulation of TNF $\alpha$  and GM-CSF induced activation of P38 MAPK in neutrophils and eosinophils, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 2492–2496.
- B.A. 't Hart, J.M. Simons, S. Knaan-Shanzer, N.P. Bakker, R.P. Labadie, Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin, *Free Radic. Biol. Med.* 9 (1990) 127–131.
- F.P. Lafeber, C.J. Beukelman, E. van den Worn, J.L. van Roy, M.E. Vianen, J.A. van Roon, et al., Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 38 (1999) 1088–1093.
- S. Mouzaoui, B. Djerdjouri, N. Makhezer, Y. Kroviarski, J. El-Benna, P.M. Dang, Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced colitis increases NADPH oxidase 1 expression, oxidative stress, and neutrophil recruitment in the colon: preventive effect of apocynin, *Mediators Inflamm.* 2014 (2014) 312484.
- Y.J. Hwang, S.J. Nam, W. Chun, S.I. Kim, S.C. Park, C.D. Kang, et al., Anti-inflammatory effects of apocynin on dextran sulfate sodium-induced mouse colitis model, *PLoS ONE* 14 (2019) e0217642.
- D. Impellizzeri, E. Esposito, E. Mazzon, I. Paterniti, R. Di Paola, P. Bramanti, et al., Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 636–648.
- S. Suzuki, P. Pitchakarn, S. Sato, T. Shirai, S. Takahashi, Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation, *Exp. Toxicol. Pathol.* 65 (2013) 1035–1041.
- K. Kinkade, J. Streeter, F.J. Miller, Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 17017–17028.
- K. Asaba, A. Tojo, M.L. Onozato, A. Goto, M.T. Quinn, T. Fujita, et al., Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy, *Kidney Int.* 67 (2005) 1890–1898.
- B.A. 't Hart, S. Copray, I. Philippens, Apocynin, a low molecular oral treatment for neurodegenerative disease, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 298020.
- S. Heumüller, S. Wind, E. Barbosa-Sicard, H.H. Schmidt, R. Busse, K. Schröder, et al., Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant, *Hypertension* 51 (2008) 211–217.
- B.D. Manning, A. Toker, AKT/PKB signaling: navigating the network, *Cell* 169 (2017) 381–405.
- J. Kučera, L. Binó, K. Štefková, J. Jaroš, O. Vašíček, J. Večeřa, et al., Apocynin and diphenyleneiodonium induce oxidative stress and modulate PI3K/Akt and MAPK/Erk activity in mouse embryonic stem cells, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016) 7409196.
- P. Jantaree, K. Lirdprapamongkol, W. Kaewrsi, C. Thongsornkleeb, K. Chooongkamon, K. Atjanasupatt, et al., Homodimers of vanillin and apocynin decrease the metastatic potential of human cancer cells by inhibiting the FAK/PI3K/Akt signaling pathway, *J. Agr. Food Chem.* 65 (2017) 2299–2306.
- T. Schlüter, A.C. Steinbach, A. Steffen, R. Rettig, O. Grisk, Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition, *Cardiovasc. Res.* 80 (2008) 271–279.